

· 综述 ·

炎症性肠病肠上皮细胞修复机制的研究进展

宋铤航 钟英强

【摘要】 肠上皮细胞及其之间的紧密连接是肠黏膜屏障的重要组成部分。炎症性肠病中可出现肠上皮屏障的损伤，会导致肠黏膜的反复受损和修复。上皮损伤的修复取决于附近上皮细胞的迁移、增殖和分化。多种生长因子、细胞因子、三叶因子参与了调节肠道上皮损伤的修复，近年来还发现固有免疫中的 Toll 样受体和 NOD 样受体对维持肠内稳态和肠黏膜修复也起着重要作用。

【关键词】 炎症性肠病；上皮细胞；细胞修复；胞间信号肽类和蛋白质类；固有免疫

Research progress on repair mechanism of intestinal epithelial cells in inflammatory bowel disease

Song Yihang, Zhong Yingqiang. Department of Gastroenterology, Sun Yat-sen Memorial Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China

Corresponding author, Zhong Yingqiang, E-mail: zhongyingqiang@126.com

【Abstract】 Intestinal epithelial cells and tight intercellular junction are important components of intestinal mucosal barrier. The epithelial barrier damage may occur in inflammatory bowel disease, which leads to recurrent injury and repair of the intestinal mucosa. The process of epithelial injury repair relies upon the migration, proliferation and differentiation of adjacent epithelial cells. Multiple growth factors, cytokines and trefoil factors participate in regulating the process of intestinal epithelial injury repair. In recent years, toll-like receptors and NOD-like receptors in innate immunity have also been found to play a pivotal role in maintaining intestinal homeostasis and intestinal mucosal repair.

【Key words】 Inflammatory bowel disease; Epithelial cell; Cell repair; Intercellular signaling peptide and protein; Innate immunity

肠上皮细胞（IEC）是肠腔表面的单层柱状细胞，成熟的 IEC 主要包括吸收细胞、杯状细胞、内分泌细胞和潘氏细胞等，吸收细胞是肠道含量最丰富的细胞，承担肠道吸收营养物质的功能，杯状细胞分泌高度糖基化的黏蛋白（主要是 MUC2），构成凝胶样黏液，是肠道上皮屏障的重要防御线，潘氏细胞是小肠腺的特征性细胞，局限在隐窝底部，可分泌防御素和溶菌酶，对肠道微生物有杀灭作用^[1]。

一、肠黏膜屏障与作用

肠黏膜屏障由机械屏障、化学屏障、生物屏障和免疫屏障组成。机械屏障主要由黏液凝胶层、IEC、细胞间紧密连接和基膜构成，是肠黏膜屏障最重要的组成部分。消化腺运输到肠腔的分泌物

（胆汁、消化酶）以及肠道自身的分泌物构成了肠黏膜的化学屏障。肠道共生菌可竞争性抑制致病菌的过度生长，组成肠道的生物屏障。最后，免疫屏障由黏膜固有层浆细胞分泌的 sIgA、黏膜淋巴小结和固有层中弥散分布的各类免疫细胞共同构成。肠黏膜屏障的主要作用是有效阻止肠道细菌和内毒素等有害物质进入机体，维持机体内环境的稳定。一旦黏膜屏障受损，多种微生物和毒素突破肠黏膜，可诱发多种疾病^[2]。

二、肠上皮屏障与炎症性肠病（IBD）

IBD 是一组病因未完全明了的慢性肠道非特异性免疫炎症性疾病，主要包括克罗恩病（CD）、溃疡性结肠炎（UC）和中间型炎症性肠病（IC）^[3]。肠道屏障功能的破坏和反复的上皮修复是 IBD 的

特征表现,明确肠上皮损伤修复的机制和鉴定能促进上皮修复的因子对 IBD 的治疗有重要意义。

肠上皮屏障主要由 IEC 和细胞间的紧密连接构成,其组成了上皮屏障的细胞旁屏障,是一种多蛋白复合物,可收紧细胞旁间隙,也可特异地调节其通透性。Claudin 是紧密连接的主要蛋白,许多 claudin (如 claudin-1、3、4、5、8) 参与细胞旁屏障的建立,但也有一部分(如 claudin-2、15)可介导上皮屏障的渗透性(组成细胞旁通道选择性的通过阳离子、阴离子和水)。

IBD 患者中,正常上皮细胞紧密连接的典型连续线性结构可转变为断裂的、不连续的颗粒样外观。分子水平上,claudin-2 的表达增加,从而使阳离子和水通过细胞旁通道进入肠腔,最终导致渗透性腹泻^[4]。另外,TNF- α 和 IL-13 的释放增多也与 claudin-2 的增加有关。其他的紧密连接蛋白,如 claudin-4 和 claudin-7 在 UC 表达降低,claudin-5 和 claudin-8 在 CD 表达减少,而 occludin 的表达则在 UC、CD 中均有下降。并且,上述蛋白表达的下调已被证实与细胞因子 IFN- γ 和 TNF- α 的作用有关。

三、IBD 患者肠上皮损伤的修复机制

正常情况下,每日大约有 10^{11} 个上皮细胞(约 200 g)从肠腔丢失,为了维持正常的屏障功能,机体必须不断地补充上皮细胞数量,这主要依赖于肠干细胞的增殖分化。富含亮氨酸重复序列的 G 蛋白偶联受体 5 (Lgr5) 是肠道干细胞的特异性标记,这类干细胞位于隐窝基底部,通过不对称分裂形成具有很强增殖能力的过渡放大细胞(TAC),后者再经数次分裂后可向上迁移并分化形成不同类型的 IEC。在小肠中,另有一类特殊的细胞,其位于隐窝基底部中心的第四个细胞位置且直接毗邻潘氏细胞的上方,被称为 +4 干细胞。而这种细胞不表达 Lgr5,被认为是一种保守的或潜在的干细胞,它们在特殊的生理环境下(如损伤)会被激活成为 Lgr5 阳性的干细胞,参与 IEC 的修复^[5]。

在肠上皮修复过程中,伤口附近的 IEC 会丧失极性,细胞表面的微绒毛也会消失,继而形成突起延伸、迁移到受损区域,使伤口闭合。当黏膜损伤严重时,隐窝基底干细胞的再生能力不足以使损伤愈合,骨髓来源的间充质干细胞可迁移到胃肠道,形成分化的间充质细胞(如肌成纤维细胞),进行黏膜修复^[6]。

1. 细胞骨架的重构和细胞迁移

细胞迁移是上皮细胞伸长、迁移以覆盖裸露表面的过程,是上皮恢复的前提,而细胞迁移的同时也伴有细胞骨架的重构。多种跨膜蛋白参与细胞间粘附的建立。其中,E-钙黏蛋白通过连环蛋白等与激动蛋白细胞骨架相连,以允许细胞黏附。连环蛋白复合物不仅作为细胞间的黏合剂,还可作为细胞内信号转导途径的一部分,将细胞膜与下游胞质和胞核产生的效应相联系。破坏 E-钙黏蛋白介导的细胞间连接会导致胞质中 β -连环蛋白蓄积,后者经过核转位可启动 Wnt/Frizzled 信号通路,最终引起 Wnt 靶基因(特别是参与组织修复和重塑以及炎症反应的基因)的表达^[7]。E-钙黏蛋白的丢失会破坏细胞间的连接,为细胞的迁移提供了前提。损伤周围的 IEC 在 Rho GTP 酶家族的控制下会失去极性,后者主要包括 Rho、Rac 和 Cdc42 亚家族,分别与应力纤维、板状伪足和丝状伪足的生成有关,最终使肌动蛋白细胞骨架发生重组。

2. IEC 的增殖和分化

经典的 Wnt 信号传导通路驱动 IEC 的增殖,作用于富含 TAC 的区域,使后者迅速增殖以补充缺失的上皮细胞。肠干细胞微环境关键调节因子的表达受 Hedgehog 信号通路调控,后者在体内可限制结肠隐窝底部 Wnt 的表达。Indian Hedgehog 基因的缺失可启动肠道创伤修复反应。黏着斑激酶(FAK)是一种胞浆酪氨酸激酶蛋白,也被称为蛋白酪氨酸激酶 2。其主要集中在胞间的黏着斑,被证明具有调节细胞增殖、介导细胞存活的作用。在缺乏 FAK 时,葡聚糖硫酸钠诱导小鼠引起结肠炎症损伤后,上皮修复功能明显受损。

IEC 在完成迁移和增殖后,分化形成具有正常的绒毛结构和吸收/分泌功能的成熟上皮细胞。在隐窝的上部区域主要观察到非经典的 Wnt 信号传导,诱导细胞产生极性。在参与细胞分化的诸多因素中,成熟的上皮细胞表达的 Indian Hedgehog 基因通过负调控 Wnt 通路在体外和体内均能调节未成熟 IEC 分化。另外,IEC 的分化方向也通过 Notch 信号传导途径调控。Notch 受体主要在隐窝区域表达,其配体(Delta 和 Serrate/Jagged 亚家族成员)则由相邻细胞表达^[8]。有研究表明,Notch 信号通路以及吸收和分泌性 IEC 的平衡可通过炎症因子调节。例如,IL-33 可以下调 Notch 信号传导,从而使祖细胞向潘氏细胞或杯状细胞分化^[9]。

3. 上皮屏障功能的调节和凋亡

紧密连接复合物封闭了细胞间的胞外间隙,有助于调节上皮屏障功能,因此可能促进肠道修复。三叶因子 3 (TFF3) 通过上调 claudin-1, 将紧密连接蛋白 ZO-1 从细胞质重新分配到细胞膜, 增加与 occludin 蛋白的结合, 从而稳定紧密连接^[10]。而向间充质细胞过渡的 IEC, 由于 E-钙黏蛋白受到抑制, 可导致 IEC 中紧密连接的解体和极性的丧失。

炎症条件下 P53 介导的细胞凋亡在 IBD 中比较常见。因此, 抗凋亡对上皮细胞的修复也至关重要。具有锚定依赖性的上皮细胞必须互相分离才能迁移到损伤区域, 这使得它们更容易发生失巢凋亡。TFF3 可通过激活 NF- κ B 通路对 IEC 具有抗凋亡的作用, 而 PI3K/Akt 则是促进细胞生存、增殖和分化的重要信号途径^[10]。

4. 肠上皮修复过程中的调节因子

各种生长因子, 包括转化生长因子 (TGF)、表皮生长因子 (EGF)、肝细胞生长因子 (HGF)、成纤维细胞生长因子 (FGF)、角质细胞生长因子 (KGF)、胰岛素样生长因子 (IGF), IL-1b、IL-2 以及 TFF3 均可增强 IEC 的恢复或增殖^[11]。IL-1b、IL-2、EGF、FGF 和 HGF 均可通过 TGF- β 依赖的途径促使肠道损伤的修复^[6]。另外, 最近的研究发现, IL-10 可通过上皮细胞 WISP-1 信号通路介导肠黏膜愈合, IL-22 可通过激活 STAT3 和 PKA 使 H19 lncRNA 的表达增多, 后者是肠道上皮细胞增殖和黏膜愈合的必要成分^[12-13]。

三叶因子是一类含有三叶因子结构域的小分子多肽。目前哺乳动物体内发现的三叶因子共有三种, 即 TFF1、TFF2、TFF3, 它们在体内多种组织均有分布, 但主要表达于胃肠道内。其中 TFF3 又被称为肠三叶因子, 主要在小肠和结肠杯状细胞表达^[14]。TFF 对肠黏膜损伤的修复主要体现在以下几个方面: ①与黏蛋白的相互作用保护肠道黏膜。TFF3 与 MUC2 的相互作用可促进黏液层中黏蛋白网络的稳定性^[15]。②诱导上皮细胞迁移。TFF3 可抑制细胞间黏附分子的表达, 改变细胞连接、诱导正常上皮细胞向受损区域迁移。③调节 IEC 的分化。TFF3 可抑制细胞从 G1 期向 S 期进展, 调控干细胞向肠上皮细胞分化。④抗凋亡和促进血管重建作用。高表达 TFF3 的结肠细胞系 HT-ITF1 能抵抗由神经酰胺和血浆缺乏诱发的凋亡。另外, 在胃肠道修复后期, TFF 也参与血管重建, 其机制

可能与 TFF 激活 Src/STAT3 信号通路, 诱导血管内皮生长因子表达增加有关^[16]。

5. TLR 与 NOD 受体与肠道上皮的修复

肠道共生菌至少有 400 多种, 它们通过多种机制保持肠道稳态。目前人类识别微生物的受体主要是 Toll 样受体 (TLR) 和含有核苷酸结合寡聚化结构域 (NOD) 的受体——NOD 样受体 (NLR)。

TLR 是先天免疫识别受体, 可结合病原体、共生细菌、病毒和一些内源蛋白中存在的病原体相关分子模式。IBD 患者中存在 TLR 表达的改变以及 TLR 配体特异性抗体的产生。UC 和 CD 中存在 TLR4 的上调, CD 中存在 TLR3 的下调。另外, TLR2 多态性 R753Q 与严重的 UC 表型之间存在关联^[17]。大多数 TLR 功能的研究提示共生菌激活 TLRs 有助于维持肠内稳态和肠黏膜的修复。例如, TLR2 的激活可有效保护 IEC 紧密连接组成的细胞旁屏障, 抵抗应激诱导的损伤。TLR3 和 TLR4 的激活对于预防 DSS 诱导的肠道损伤和相关死亡率至关重要。TLR5 可识别细菌的鞭毛蛋白, 在沙门氏菌的感染中, 鞭毛蛋白不仅在固有免疫的激活中起主导作用, 还可在上皮细胞中起抗凋亡作用。TLR9 能识别源自细菌 DNA 的 CpG 序列。其可通过诱导 I 型 IFN 的产生改善 DSS 诱导的结肠炎。有些学者还认为 TLR9 信号在介导益生菌的抗炎作用中是必不可少的, 而且还发现活菌或是射线灭活后的益生菌均可改善结肠炎^[18]。

NOD1 和 NOD2 可感知特定的肽聚糖区分革兰阴性菌和革兰阳性菌, 在触发肠道固有免疫信号传导中起重要作用。IEC 中主要表达 NOD2, 且 NOD2 是第一个与 CD 相关的鉴定基因, 也是迄今为止 CD 的最强遗传风险因素^[19]。缺乏 NOD1 或 NOD2 的小鼠肠上皮通透性增加、上皮组织修复功能下降, 对化学诱导的结肠炎极其敏感, 提示了肠道免疫屏障 NLR 对微生物的感应有利于肠道稳态的维持^[20]。除上述 2 种受体外, 其他 NLR 参与炎症小体的组成, 活化 caspases-1 和 caspases-11, 促进炎症因子 IL-1b 和 IL-18 的分泌以及病原菌诱导的细胞凋亡^[21]。目前可以确定的是, IL-1R、IL-18R 或 IL-18 的缺乏可使小鼠对 DSS 诱导的结肠炎高度敏感, 且 IL-18/IL-18R/MyD88 信号通路对肠上皮屏障的保护和损伤的修复也起着重要作用^[22]。肠道炎症中, IL-18 在 IEC 发挥保护作用, 在固有层中发挥有害作用, 这取决于 IL-18 的活化部位和产生水平。最近的研究表明 NLP 含 pyrin 结构域蛋

白 6 (NLRP6) 炎症小体是杯状细胞黏蛋白胞吐作用的关键协调者, 缺乏 NLRP6 会导致自噬和黏蛋白分泌缺陷, 暗示了其可能通过机体的生理防御机制 (如自噬) 间接地保护肠黏膜^[23]。

四、展 望

肠上皮损伤修复的过程中受到多种因素的影响, 近年来, 多项研究发现饮食中的各种因素 (如非必需氨基酸、短链脂肪酸和多种维生素)、胃黏膜保护剂 (伊卡倍特钠、硫糖铝、瑞巴派特) 也可促进 IBD 肠黏膜损伤的修复^[8, 10]。另外, CC 趋化因子受体 5 (CCR5) 和 IBD 的关系受到了密切关注, CCR5 是趋化因子受体的一种, 属 G 蛋白偶联受体家族, 参与调控多种细胞因子产生、介导多种炎症细胞迁移、聚集以及活化。刘思雪等^[24]的研究采用噬菌体肽库展示技术成功筛选出两条与 CCR5 第一、第二胞外环特异性结合的模拟肽 (简称 GH 肽和 HY 肽)。后续的研究发现 CCR5 特异性拮抗短肽 GH 和 HY 短肽治疗 TNBS 诱导的结肠炎大鼠后, 结肠黏膜与上皮细胞发生了重建现象, 但具体机制尚未明确, CCR5 拮抗肽是否直接参与上皮细胞修复和增殖, 还有待进一步的研究^[25]。

参 考 文 献

- [1] Kurashima Y, Kiyono H. Mucosal ecological network of epithelium and immune cells for gut homeostasis and tissue healing. *Annu Rev Immunol*, 2017, 35 : 119-147.
- [2] Sánchez de Medina F, Romero-Calvo I, Mascaraque C, Martínez-Augustín O. Intestinal inflammation and mucosal barrier function. *Inflamm Bowel Dis*, 2014, 20 (12) : 2394-2404.
- [3] 钟英强, 黄花荣, 陈其奎. 肠道溃疡性疾病. 北京: 人民卫生出版社, 2009, 97-204.
- [4] Lameris AL, Huybers S, Kaukinen K, Mäkelä TH, Bindels RJ, Hoenderop JG, Nevalainen PI. Expression profiling of claudins in the human gastrointestinal tract in health and during inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol*, 2013, 48 (1) : 58-69.
- [5] Barker N. Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014, 15 (1) : 19-33.
- [6] Lan A, Blachier F, Benamouzig R, Beaumont M, Barrat C, Coelho D, Lancha A Jr, Kong X, Yin Y, Marie JC, Tomé D. Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: is there a place for nutritional supplementation? *Inflamm Bowel Dis*, 2015, 21 (1) : 198-207.
- [7] Baarsma HA, Konigshoff M, Gosens R. The WNT signaling pathway from ligand secretion to gene transcription: molecular mechanisms and pharmacological targets. *Pharmacol Ther*, 2013, 138 (1) : 66-83.
- [8] VanDussen KL, Carulli AJ, Keeley TM, Patel SR, Puthoff BJ, Magness ST, Tran IT, Maillard I, Siebel C, Kolterud Å, Grosse AS, Gumucio DL, Ernst SA, Tsai YH, Dempsey PJ, Samuelson LC. Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells. *Development*, 2012, 139 (3) : 488-497.
- [9] Shang Y, Smith S, Hu X. Role of Notch signaling in regulating innate immunity and inflammation in health and disease. *Protein Cell*, 2016, 7 (3) : 159-174.
- [10] Lin N, Xu LF, Sun M. The protective effect of trefoil factor 3 on the intestinal tight junction barrier is mediated by toll-like receptor 2 via a PI3K/Akt dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 440 (1) : 143-149.
- [11] Göke M, Kanai M, Podolsky DK. Intestinal fibroblasts regulate intestinal epithelial cell proliferation via hepatocyte growth factor. *Am J Physiol*, 1998, 274 (5 Pt 1) : G809-G818.
- [12] Quiros M, Nishio H, Neumann PA, Siuda D, Brazil JC, Azcutia V, Hilgarth R, O'Leary MN, Garcia-Hernandez V, Leoni G, Feng M, Bernal G, Williams H, Dedhia PH, Gerner-Smidt C, Spence J, Parkos CA, Denning TL, Nusrat A. Macrophage-derived IL-10 mediates mucosal repair by epithelial WISP-1 signaling. *J Clin Invest*, 2017, 127 (9) : 3510-3520.
- [13] Geng H, Bu HF, Liu F, Wu L, Pfeifer K, Chou PM, Wang X, Sun J, Lu L, Pandey A, Bartolomei MS, De Plaen IG, Wang P, Yu J, Qian J, Tan XD. In inflamed intestinal tissues and epithelial cells, interleukin 22 signaling increases expression of H19 long noncoding RNA, which promotes mucosal regeneration. *Gastroenterology*, 2018, 155 (1) : 144-155.
- [14] Aamann L, Vestergaard EM, Grønbaek H. Trefoil factors in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*, 2014, 20 (12) : 3223-3230.
- [15] Albert TK, Laubinger W, Müller S, Hanisch FG, Kalinski T, Meyer F, Hoffmann W. Human intestinal TFF3 forms disulfide-linked heteromers with the mucus-associated FCGBP protein and is released by hydrogen sulfide. *J Proteome Res*, 2010, 9 (6) : 3108-3117.
- [16] 孙勇, 王良喜. 三叶因子家族研究进展. 肠外与肠内营养, 2015, 22 (1) : 49-52.
- [17] Kordjazy N, Haj-Mirzaian A, Haj-Mirzaian A, Rohani MM, Gelfand EW, Rezaei N, Abdolghaffari AH. Role of toll-like receptors in inflammatory bowel disease. *Pharmacol Res*, 2018, 129 : 204-215.
- [18] Martini E, Krug SM, Siegmund B, Neurath MF, Becker C. Mend your fences: the epithelial barrier and its relationship with mucosal immunity in inflammatory bowel disease. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2017, 4 (1) : 33-46.
- [19] Mirkov MU, Verstockt B, Cleyne I. Genetics of inflammatory bowel disease: beyond NOD2. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2017, 2 (3) : 224-23.
- [20] Couturier-Maillard A, Secher T, Rehman A, Normand S, De Arcangelis A, Haesler R, Huot L, Grandjean T, Bressenot A, Delanoye-Crespin A, Gaillot O, Schreiber S, Lemoine Y,

- Ryffel B, Hot D, Núñez G, Chen G, Rosenstiel P, Chamaillard M. NOD2-mediated dysbiosis predisposes mice to transmissible colitis and colorectal cancer. *J Clin Invest*, 2013, 123 (2): 700-711.
- [21] Latz E, Xiao TS, Stutz A. Activation and regulation of the inflammasomes. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13 (6): 397-411.
- [22] Parlato M, Yeretssian G. NOD-like receptors in intestinal homeostasis and epithelial tissue repair. *Int J Mol Sci*, 2014, 15 (6): 9594-9627.
- [23] Wlodarska M, Thaïs CA, Nowarski R, Henao-Mejia J, Zhang JP, Brown EM, Frankel G, Levy M, Katz MN, Philbrick WM, Elinav E, Finlay BB, Flavell RA. NLRP6 inflammasome orchestrates the colonic host-microbial interface by regulating goblet cell mucus secretion. *Cell*, 2014, 156 (5): 1045-1059.
- [24] 刘思雪, 胡梅, 叶小研, 黄花荣, 钟英强. 应用噬菌体展示肽库技术淘选大鼠 CCR5 膜外第一、二胞外环特异性结合的活性拮抗肽与初步鉴定. *中国病理生理杂志*, 2015, 31 (7): 1225-1230.
- [25] 宋杨达, 刘思雪, 宋钦航, 沈溪明, 黄花荣, 钟英强. CCR5 第一和第二胞外环特异性结合短肽对大鼠结肠炎的炎症细胞浸润及 NF- κ B/TNF- α 信号通路的影响. *新医学*, 2018, 49 (5): 309-314.
- (收稿日期: 2018-12-18)
(本文编辑: 杨江瑜)

