



# 肠黏膜屏障及短链脂肪酸对其影响的研究进展

侯龙龙<sup>1</sup> 综述 李仲荣<sup>2</sup> 审核

肠道屏障的破坏可导致许多免疫介导疾病,包括炎症性肠道疾病、食物过敏和乳糜泻。肠黏膜由不同类型的具有特定屏障功能的上皮细胞组成,肠上皮细胞内稳态的调节对黏膜防御屏障结构与功能的维持至关重要<sup>[1]</sup>。相关研究表明,多种因素及相关分子途径参与肠道黏膜防御功能的调节。无论是外科手术或内科疾病,只要有肠道缺血缺氧的发生,即可能有肠黏膜屏障功能障碍,容易发生肠道细菌易位,可进一步引发全身炎症反应综合征(SIRS)、脓毒症(sepsis)及多器官功能障碍综合征(MODS)<sup>[2]</sup>。新生儿尤其早产儿肠黏膜上皮细胞发育不完善,易受缺氧、配方奶喂养和细菌感染等因素影响,导致新生儿肠黏膜损伤,而发生 NEC。有研究表明,肠道内短链脂肪酸可改善新生儿早期肠道发育,是维持新生儿肠道生长发育的重要因素<sup>[3]</sup>。现就肠黏膜屏障及短链脂肪酸对肠黏膜屏障功能的影响做一综述。

## 一、肠黏膜屏障的含义

自口腔到直肠的胃肠道由单层细胞构成,这种单层细胞不仅防止腔室内潜在物理刺激及抗原物质的侵害,而且能进行基本的生物学功能,如吸收、分泌并运输各种营养物质和水。肠上皮细胞代表一个临界屏障,保护宿主,抵抗多种有害管腔的物质,以及防止细菌摄取以免激活不受易感宿主控制的免疫应答。完整的黏膜屏障是正常健康的先决条件,伤后迅速重新形成是预防疾病至关重要的因素<sup>[4]</sup>。肠上皮屏障有限制微生物和任何潜在的有害物质入侵,同时调节溶质、养分和离子流进入底层黏膜的作用。肠道屏障由肠黏膜机械屏障、化学屏障、生物屏障和免疫屏障组成,其中机械屏障中的紧密连接对维持肠屏障功能最为重要。肠道、肝脏、肺、肾脏上皮细胞紧密连接(TJs)的破坏是多器官功能障碍综合征的共同机制。肠黏膜屏障包括黏附连接(AJs)

和紧密连接(TJs),由钙粘素,claudins 蛋白,occludin 蛋白,缝隙连接(JAM)蛋白,使相邻的细胞联合起来而成<sup>[5]</sup>。黏附连接和紧密连接蛋白的表达通过磷酸化调节,它可以促进或破坏紧密连接的形成。研究证明,黏附连接和紧密连接复合物对细胞极化、增殖和分化的调节起到了至关重要的作用,且赋予细胞选择性屏障通透性。维持屏障体内平衡要求:① TJs 蛋白的协调性;② 肌动蛋白细胞骨架;③ 内吞作用;④ 细胞内信号通路<sup>[6]</sup>。除此之外,共生细菌在维持宿主屏障平衡方面,可能通过调节细胞更新,促进伤口愈合修复,重组 TJs 起到重要作用。

肠上皮细胞由干细胞来源的不同类型细胞组成,如吸收细胞(肠)和分泌细胞(分泌黏液的杯状细胞,分泌激素的内分泌细胞,簇绒细胞和分泌防御素的潘氏细胞)。所有细胞除了潘氏细胞的分化是从隐窝成熟的形式,其余细胞均以绒毛挤压的方式进行分化。肠上皮细胞这种连续更新的过程一般需要 4~7 d,这对于肠上皮完整性的维护非常重要。尽管紧密连接的稳定性是维持肠黏膜屏障完整所必须,但紧密连接的形成必须是动态的,以适应肠上皮细胞 4~5 d 的细胞周期<sup>[7]</sup>。为此,紧密连接蛋白经内吞作用回到质膜进行连续地内化和再循环。在正常生理条件下,紧密连接蛋白的宏观重建更新涉及到连续链断裂和网格蛋白介导的内吞作用。在生理状态下,紧密连接是连续的、完整的。但在病理情况下,如氧化应激、NO 等均可导致紧密连接结构和功能的破坏,引起肠壁通透性增高,致肠道细菌移位,导致黏膜屏障破坏,从而出现相应胃肠道疾病<sup>[8]</sup>。紧密连接蛋白主要由 4 种跨膜蛋白组成: occludin、claudins、缝隙连接蛋白(JAMs)和 tricellulin。他们与连接复合物蛋白(ZO-1、ZO-2、ZO-3、p130、7H6、Symplekin)、细胞骨架结构(微管、中丝、微丝)共同构成紧密连接复合物<sup>[9]</sup>。跨膜蛋白通过连接复合物蛋白与细胞骨架连接在一起。磷酸化细胞骨架,即肌球蛋白轻链(MLC)通过肌球蛋白轻链激酶(MLCK)或 Rho 相关激酶(ROCK)的成分,导致其收缩,分离紧密连接蛋白,增加细胞旁通透性<sup>[10]</sup>。黏膜屏障平衡的生理调节依赖于严格控制的信号转

导途径在胞质紧密连接蛋白的汇聚,除了紧密连接的物理分离,Rho 相关激酶通过增加紧密连接蛋白的细胞内吞作用损害了屏障的完整性<sup>[11]</sup>。目前研究显示,紧密连接蛋白的结合是蛋白激酶 C(PKC),蛋白激酶 A(PKA),丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和磷酸肌醇 3-激酶(PI3-K)交互网络之间的微妙平衡<sup>[12]</sup>。

几个传统的信号传导级联放大反应,即 Wnt,转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )/骨形态发生蛋白(BMP),Notch、Hippo 和 Hedgehog 通路都与维持不同类型的上皮细胞形态和功能特征相关。Wnt 信号通路在肠道内环境稳定中扮演多重角色,它包含经典和非经典途径。在经典 Wnt 信号传导级联中核心蛋白是  $\beta$ -连环蛋白,一种通过 APC 肿瘤抑制基因调控表达的稳定的细胞质蛋白。经典 Wnt 通路是上皮增生和隐窝维护必不可少的<sup>[13]</sup>。Wnt 信号传导是潘氏细胞在隐窝的定位和成熟及用于分离增殖和分化的细胞所必需。这些过程由特定的配体蛋白受体在肠中 Wnt 信号依赖性表达调控<sup>[14]</sup>。非经典( $\beta$ -连环蛋白独立)Wnt 信号被称为平面细胞极性通路,激活 GTP 酶 Rho 和 Rac。这些诱导细胞骨架重排,有助于形成新的隐窝<sup>[15]</sup>。Notch 信号活跃在肠隐窝内,并协助 Wnt 信号通路促进干细胞增殖和负调控分泌谱系的分化<sup>[16]</sup>。Hippo 途径主要通过抑制细胞增殖和凋亡细胞间联系的回应,在控制器官的大小方面起重要作用。这种肿瘤抑制途径调节肠的再生和抑制肿瘤的发生<sup>[17]</sup>。TGF- $\beta$  信号调控胚胎发育、伤口愈合、细胞增殖与分化。在 TGF- $\beta$  家族包括细胞因子、TGF- $\beta$  亚型、BMP 和激活素类。BMP 信号通路介导 Hedgehog 的作用以阻断异位隐窝的形成,同时 BMP 拮抗剂 noggin 在隐窝的表达可抑制 BMP 的活性,从而使其增生继续。Hedgehog 信号是通过 Hedgehog 配位体与修补同源物 1(PTCH1)受体的结合启动。Hedgehog 信号转导通路抑制剂诱导潘氏细胞发育不全,因而此信号转导途径可能部分通过潘氏细胞的调控进而影响肠上皮修复<sup>[18]</sup>。在修复阶段,Hedgeho 信号增加,而在伤害阶段,Hedgehog 信号则减小<sup>[19]</sup>,它证实 Hedgehog 信号在肠上皮细胞损伤修复中起重要作用。

这种微妙平衡的破坏会导致各种肠道炎症和自身免疫综合征。肠上皮的稳态由多个调控机制相互作用来维持。肠上皮屏障功能障碍已被认为在一些易感性胃肠疾病如 IBD、食物过敏和乳糜泻中起关键作用,可能会导致肠道微生物、肠上皮和免疫应答

等多方面缺陷,从而损伤上皮层,这是肠道免疫介导疾病发病的重要机理<sup>[20]</sup>。

## 二、短链脂肪酸(SCFAs)的意义

短链脂肪酸(Short-chain fatty acids, SCFAs)是具有 1~6 个碳原子的羧酸,其中包括其它不同官能团,如羟基或二羧基。在人体中,SCFAs 由细菌酵解碳水化合物、蛋白质、肽和糖蛋白前体等物质产生。SCFAs 如乙酸、丙酸和丁酸大部分来源于肠腔内未经消化的碳水化合物等经结肠中的微生物酵解产生,少部分来源于肠道细菌酵解脱落的上皮细胞和内源性蛋白如粘液蛋白等。短链脂肪酸是一组由微生物发酵饮食性碳水化合物和纤维产生的肠道特定燃料。人体内短链脂肪酸(乙酸、丙酸、丁酸)的总量和相对摩尔浓度取决于饮食结构、食物的发酵部位和肠道内的微生物构成等因素。乙酸、丙酸和丁酸是主要的 SCFAs,占肠腔产生 SCFA 的 85%,它们之间的摩尔比是 60:25:15。结肠内细菌的种类或肠道内环境,对 SCFAs 的种类及数量影响很大,产气荚膜杆菌在碳源限制的条件下培养时,主要产物为乙酸、丁酸、乳酸和琥珀酸。短双歧杆菌在碳源过多的条件下,主要产生乙酸和乳酸,当碳水化合物限制时,主要产物却是甲酸和乙酸。卵形拟杆菌在碳源限制的条件下主要产物为乙酸、丙酸和琥珀酸,而碳源过多时,则为乙酸和琥珀酸。当结肠内淀粉量增加时,粪便样品中水解淀粉的细菌在厌氧菌总数中的比例增加,产生的丁酸浓度及其在 SCFAs 中的比例也随之增加<sup>[21]</sup>。

SCFAs 对宿主有重要生理功能,不仅具有氧化供能作用,还具有改善肠道功能、调节肠道菌群、抗炎、抗肿瘤及调控基因表达等作用。相关研究发现,通过 SCFAs 来增加肠道沙门菌亚硝酸盐和降低超氧化物歧化酶的量可能是诱导巨噬细胞凋亡的机制之一<sup>[22]</sup>。国外研究表明,通过直肠和口服途径给予 SCFAs 能刺激肠道上皮细胞的增殖<sup>[23]</sup>。炎症反应的一个重要特征是内皮细胞活化,活化的内皮细胞使血管细胞粘附分子-1(VCAM-1)、细胞间粘附分子-1(ICAM-1)和 E-选择素等白细胞粘附分子表达上调,从而导致白细胞粘附于血管内皮,而后移向组织中。SCFAs 尤其是丁酸能通过影响白细胞粘附分子从而起到抗炎作用。有研究结果显示所有短链脂肪酸对炎症反应均有一定治疗作用,能减少 IL-6 蛋白从培养器官上的释放。但其在效能方面存在差异,丙酸和丁酸具有等效作用,而乙酸作用则较小<sup>[24]</sup>。Takato Kawamura 等<sup>[25]</sup>认为,虽然短链脂肪

酸可以抑制结肠中的基质金属蛋白酶分泌,但在抗炎过程中仍然发挥重要作用。Schepbach 等用[3H]-胸腺嘧啶脱氧核苷和溴脱氧尿嘧啶标记培养的隐窝细胞,计算整个隐窝细胞和 5 个相等隐窝区室的标记指数(测定隐窝细胞生长速率),丁酸和丙酸均可增加细胞繁殖速度,而乙酸不能。它们对细胞生长的刺激仅限于基部 3 个区室,而不是那些接近表面出现早期肿瘤特征的区室。目前丁酸钠抗肿瘤的理论已成功用于溃疡性结肠炎的治疗及大肠癌的预防。随着对丁酸研究的进一步深入,以及肿瘤分化、发生、凋亡机制的进一步阐释,丁酸及其类似物、衍生物等将在肿瘤预防和治疗方面发挥巨大作用。结肠上皮细胞中 SCFA 的代谢活动,可能是肠道细菌与宿主间相互作用最重要的体现。3 种主要的 SCFA,如乙酸、丙酸和丁酸,对上皮细胞代谢具有重要意义,其中丁酸是这些细胞特别重要的能量来源,在细胞分化和生长中起着非常重要的作用。丁酸对细胞分化的影响与其调控基因表达有关,丁酸可改变多种基因的表达,如鼠红白血病细胞中血红蛋白合成的诱导,肝细胞表皮生长因子(EGF)、内皮细胞血纤蛋白溶酶原激活物、肝癌细胞的金属硫蛋白、乳腺组织细胞 EGF 的合成等。

### 三、肠黏膜屏障与短链脂肪酸

肠道内的厌氧环境允许某些肠道微生物对经胃肠道进入肠腔的营养物质进行发酵,从而产生大量多种多样的代谢产物并加以利用。以这种方式产生的代谢产物是必需的维生素,如维生素 K 和大部分水溶性 B 族维生素,像生物素、钴胺素和核黄素,然后由宿主吸收利用。此外,还有一些代谢物是短链脂肪酸,如丙酸、乙酸和丁酸,这些不是在上消化道分解而得的,而是对膳食纤维、碳水化合物和抗性淀粉进行发酵产生的。结肠黏膜中存在大量内分泌 L 型细胞,它们分泌各种参与食欲调节的肽,如胰高血糖素样肽-1(GLP-1),肽 YY(PYY)和胃泌酸调节素。膳食纤维的发酵是重要的肠动态平衡,这个过程能引起上消化道能动性性和饱腹感激素,如胰高血糖素样肽-1(GLP-1)和肽 YY(PYY)分泌<sup>[26]</sup>。另外,这些短链脂肪酸不仅具有在治疗 IBD(炎症性肠病)患者方面的潜力,还可以改善结肠健康<sup>[27]</sup>。

短链脂肪酸在肠道的存在直接影响肠黏膜屏障的通透性。丁酸有个非常重要的生理功能是可以增强胃肠道上皮细胞的屏障功能,因此丁酸可减轻因肠屏障功能障碍如炎症性肠病( IBD) 导致的腹泻<sup>[28]</sup>。研究发现,丁酸对紧密连接的完整性有作

用,主要归因于丁酸对屏障免疫调节和抗炎效应,体外实验发现丁酸在无其他免疫刺激物质存在时也可以增强肠上皮细胞屏障功能。如丁酸已被证明通过增加跨膜电阻,以防御空肠弯曲菌对 Caco-2 单层细胞的侵袭和增加跨上皮电阻(TEER)。丁酸增加跨上皮电阻的能力可能与它能增加 Rat-1 成纤维细胞中的 cingulin, ZO-1 和 ZO-2 蛋白以及 mRNA 水平有关。在同一研究中,丁酸盐被证明在 COS-7 细胞中能增加 cingulin 蛋白水平,在 HeLa 细胞中能增加 cingulin 和 occludin 蛋白水平。这些结果表明,短链脂肪酸通过增加跨上皮电阻和紧密连接蛋白产量来加强黏膜屏障。SCFAs 尤其是丁酸作为结肠细胞的主要能量物质可刺激结肠上皮细胞增殖。同样,丁酸能显著增加肠通透性,从而影响细菌移位,并扭转小鼠暴露于化学治疗剂 5-氟尿嘧啶导致的组织学损伤。Suzuki 等<sup>[29]</sup>发现短期混合应用 SCFAs 可使跨上皮电阻升高,可见这一作用不仅仅是丁酸特有。研究发现缺乏肠内营养的早产儿肠屏障功能发育差,肠腔内 SCFAs 的产生可能在新生儿早期胃肠道适应和成熟过程中发挥至关重要的作用<sup>[30]</sup>。Lin 等认为新生儿坏死性小肠结肠炎可能与肠腔内 SCFAs 的过量产生或积累及早产儿胃肠动力缺乏,使积累在肠腔内的 SCFAs 不能及时被清除有关<sup>[31]</sup>。我们通过前期实验研究证实,低浓度的 SCFAs 对维持肠黏膜屏障的完整性有益,但高浓度的 SCFAs 却能通过破坏肠黏膜屏障而导致胃肠道损伤。

综上所述,肠黏膜屏障处于一个非常复杂的环境中,一方面可以通过促进机会致病菌的增加,通过增加肠渗透性和细菌移位,以及减少紧密连接蛋白、降低跨上皮电阻,进而引起炎症反应来破坏肠黏膜屏障。另一方面,通过饮食,包括不同种类的益生菌或益生元纤维产生的 SCFAs 以增加紧密连接蛋白和跨上皮电阻,进而加强上皮屏障功能,以及降低肠渗透性和细菌移位,从而避免或减轻病理反应。

### 参考文献

- 1 Jeon MK, Klaus C, Kaemmerer E, et al. Intestinal barrier: Molecular pathways and modifiers[J]. World J Gastrointest Pathophysiol, 2013, 4(4): 94-99.
- 2 Catalioto RM, Maggi CA, Giuliani S. Intestinal epithelial barrier dysfunction in disease and possible therapeutical interventions[J]. Curr Med Chem, 2011, 18: 398-426.
- 3 Jacobi SK, Odle J. Nutritional factors influencing intestinal health of the neonate[J]. Adv Nutr, 2012, 3(5): 687-696.

- 4 Obata Y, Takahashi D, Ebisawa M, et al. Epithelial cell intrinsic Notch signaling plays an essential role in the maintenance of gut immune homeostasis [J]. *The Journal of Immunology*, 2012, 188(5): 2427–2436.
- 5 Laukoetter MG, Bruewer M, Nusrat A. Regulation of the intestinal epithelial barrier by the apical junctional complex [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2006, 22(2): 85–89.
- 6 Guzman JR, Conlin VS, Jobin C, et al. Diet, microbiome, and the intestinal epithelium: an essential triumvirate? [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013: 425146.
- 7 Vereecke L, Beyaert R, van Loo G. Enterocyte death and intestinal barrier maintenance in homeostasis and disease [J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2011, 17(10): 584–593.
- 8 Assimakopoulos SF, Tsamandas AC, Louvros E, et al. Intestinal epithelial cell proliferation, apoptosis and expression of tight junction proteins in patients with obstructive jaundice [J]. *Eur J Clin Invest*, 2011, 41: 117–125.
- 9 Visser J, Rozing J, Sapone A, et al. Tight junctions, intestinal permeability, and autoimmunity: celiac disease and type 1 diabetes paradigms [J]. *Ann NY Acad Sci* 2009, 1165: 195–205.
- 10 Wu CC, Lu YZ, Wu LL, et al. Role of myosin light chain kinase in intestinal epithelial barrier defects in a rat model of bowel obstruction. *BMC [J]. Gastroenterology*, 2010, 10: 39.
- 11 Utech M, Ivanov AI, Samarin SN, et al. Mechanism of IFN-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, 16(10): 5040–5052.
- 12 Gonzalez-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, 1778(3): 729–756.
- 13 Pinto D, Gregorieff A, Begthel H, et al. Canonical Wnt signals are essential for homeostasis of the intestinal epithelium [J]. *Genes Dev*, 2003, 17: 1709–1713.
- 14 Stappenbeck TS, Mills JC, Gordon JL. Molecular features of adult mouse small intestinal epithelial progenitors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 1004–1009.
- 15 Nusse R. Wnt signaling [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012, 4(5): 1749–1753.
- 16 Van Dussen KL, Carulli AJ, Keeley TM, et al. Notch signaling modulates proliferation and differentiation of intestinal crypt base columnar stem cells [J]. *Development* 2012, 139: 488–497.
- 17 Cai J, Zhang N, Zheng Y, et al. The Hippo signaling pathway restricts the oncogenic potential of an intestinal regeneration program [J]. *Genes Dev*, 2010, 24: 2383–2388.
- 18 Van den Brink GR. Hedgehog signaling in development and homeostasis of the gastrointestinal tract [J]. *Physiol Rev* 2007, 87(4): 1343–1375.
- 19 Liang R, Morris P, Cho SS, et al. Hedgehog signaling displays a biphasic expression pattern during intestinal injury and repair [J]. *J Pediatr Surg* 2012; 47: 2251–2263.
- 20 Wu Y, Cain-Hom C, Choy L, et al. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors [J]. *Nature* 2010, 464: 1052–1057.
- 21 Wolin MJ, Miller TL, Yerry S, et al. Changes of fermentation pathways of fecal microbial communities associated with a drug treatment that increases dietary starch in the human colon [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65(7): 2807–2812.
- 22 Harish C, Siddarth M, Sunita S, et al. 55kDa outer-membrane protein from short-chain fatty acids exposed *Salmonella enterica* serovar Typhi induces apoptosis in macrophage. [J]. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2006, 89: 317–323.
- 23 Hirofumi I, Ryuzaburo S, Susumu S, et al. Gastric or rectal instillation of short-chain fatty acids stimulates epithelial cell proliferation of small and large intestine in rats [J]. *Digestive Diseases and Sciences*, 2002, 47(5): 1141–1146.
- 24 Tedelind S, Westberg F, Kjerrulf M, et al. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(20): 2826–2832.
- 25 Takato K, Akira A, Atsushi N, et al. Inhibitory effects of short-chain fatty acids on matrix metalloproteinase secretion from human colonic subepithelial myofibroblasts [J]. *Dig Dis Sci*, 2009, 54: 238–245.
- 26 Cani PD, Lecourt E, Dewulf EM, et al. Gut microbiota fermentation of prebiotics increases satietogenic and incretin gut peptide production with consequences for appetite sensation and glucose response after a meal [J]. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2009, 90: 1236–1243.
- 27 Hamer HM, Jonkers DM, Bast A, et al. Butyrate modulates oxidative stress in the colonic mucosa of healthy humans [J]. *Clinical Nutrition*, 2009, 28(1): 88–93.
- 28 Lewis K, Lutgendorff F, Phan V, et al. Enhanced translocation of bacteria across metabolically stressed epithelia is reduced by butyrate [J]. *Bowel Dis* 2010, 16(7): 1138–1148.
- 29 Suzuki T, Yoshida S, Hara H. Physiological concentrations of short-chain fatty acids immediately suppress colonic epithelial permeability [J]. *Br. J. Nutr* 2008, 100(2): 297–305.
- 30 Nankova BB, Chua J, Mishra R, et al. Nicotinic induction of preproenkephalin and tyrosine hydroxylase gene expression in butyrate-differentiated rat PC12 cells: a model for adaptation to gut-derived environmental signals [J]. *Pediatr Res.*, 2003, 53(1): 113–118.
- 31 Lin J, Nafday SM, Chauvin SN, et al. Variable effects of short chain fatty acids and lactic acid in inducing intestinal mucosal injury in newborn rats [J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 2002, 35(4): 545–550.