

杯状细胞及肠道黏液屏障的功能研究

黄春兰 曾 悦

【摘要】 杯状细胞合成分泌的黏蛋白 MUC2 构成肠上皮表面黏液层,是主要的肠道机械屏障之一。结肠有两层黏液结构,内层黏液可避免肠道细菌与肠上皮的接触,避免组织损伤与菌群移位。肠道微生物及其代谢产物可通过改变 MUC2 合成分泌或黏液层结构影响肠道通透性及其稳态。该文就近年来国内外对杯状细胞及肠道黏液屏障的研究进展作一综述。

【关键词】 杯状细胞;MUC2;肠道菌群;黏液屏障

DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2017.06.005

肠道是人体重要的消化器官。肠道内混合着大量致病菌、病毒及寄生虫,为一潜在的感染源。肠道杯状细胞分泌的黏蛋白 MUC2 与水、无机盐等形成了肠黏膜表面的凝胶样黏液层,是肠道的机械屏障之一,使肠上皮细胞免受肠腔内容物及病原生物物的损害。黏液层与肠上皮细胞、肠道微生态和宿主的免疫系统相互作用,共同维持肠道内环境的稳态。MUC2 合成、分泌的改变以及黏液层结构的改变可能导致病理情况的发生。

1 杯状细胞的分化及功能

杯状细胞的分化源于肠道隐窝基底部的多能干细胞^[1]。杯状细胞是一种特定的分泌细胞,它合成分泌多种因子,包括蛋白、三叶肽及黏蛋白等,共同构成肠道黏液层以保护肠上皮细胞^[2]。未成熟杯状细胞就开始合成并释放黏蛋白颗粒,在从隐窝基底部向绒毛顶端迁徙的过程中,形成上大下小的典型杯状形态^[3]。杯状细胞这种迁移、分化、脱落的过程持续 2~4 d^[4],生命周期短暂且持续稳定更新。

杯状细胞在肠上皮细胞中的分布密度并不均衡,从十二指肠的 4%逐步增加到远端结肠的 16%,与肠道菌群的增加趋势相符合^[5]。与普通喂养小鼠相比,无菌小鼠肠道杯状细胞数量少、形态小,表明微生物对于其具有调控作用^[6]。

2 杯状细胞的主要产物

黏蛋白是一种高度糖基化的大分子蛋白,根据其结构特性分为膜结合型和分泌型。杯状细胞合成的分泌型黏蛋白 MUC2 是构成肠道黏液的最主

要成分。MUC2 由富含脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸(PTS 序列)的蛋白质核心区域和富含半胱氨酸的 N 端和 C 端组成^[7]。原始转录的 MUC2 单体在杯状细胞内质网中通过 C 端的二硫键形成二聚体,如非折叠蛋白在内质网中大量聚集就可能诱发内质网应激。肌醇必需酶 1(IRE1)是最保守的内质网应激感受器,IRE1 β 特异性位于消化道,促进黏蛋白在内质网的正确组装^[8]。有研究认为内质网应激、非折叠蛋白质反应(UPR)与肠道炎症反应之间存在相互关系^[9-10]。MUC2 二聚体进一步在高尔基体中完成 O-糖基化,蛋白质核心区域被多糖保护,形成瓶刷样结构。这种结构使 MUC2 能够抵御肠道里内源性蛋白酶,并形成凝胶样黏液保护肠道。

MUC2 在合成后被包裹成颗粒,运输到杯状细胞表面,释放入肠腔。释放有两种途径:一种是基础分泌,通过细胞骨架运动实现的小剂量持续分泌;另一种是调控分泌,多种生物活性物质可刺激杯状细胞通过胞吐作用大量释放 MUC2,包括神经肽、细菌、细菌产物和毒素、细胞因子等^[11]。MUC2 的分泌伴随着合成的增加,生物活性因子通过信号通路激活转录因子,与 MUC2 启动子结合,调控其转录。肠道炎症反应中存在核因子- κ B(NF- κ B)的激活,细菌产物如脂多糖(LPS)、鞭毛 A 和脂磷壁酸以及炎症因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等可激活 NF- κ B,使 MUC2 转录增加^[12-13]。长期大量分泌可能导致杯状细胞功能耗竭,MUC2 合成减少。

3 肠道黏液层的结构与特性

黏液中超过 98%的成分为水,这使黏液呈现胶质样特性。与小肠肠腔内仅有一层疏松的黏液层

基金项目:上海交通大学医工交叉面上项目(YG2015MS29)

作者单位:200080 上海交通大学附属第一人民医院消化内科

通信作者:曾悦, Email: carrie@medmail.com.cn

不同,结肠内含有两层的黏液系统——疏松的外层黏液和致密的内层黏液,均由 MUC2 组成。MUC2 单体为约 $0.6\ \mu\text{m}$ 长的杆状结构^[14],通过 C 端二硫键连接形成二聚体,通过 N 端二硫键连接形成三聚体,继而形成巨大的网状结构^[15-16]。MUC2 通过 N 端之间钙离子依赖的相互作用聚集在杯状细胞顶端^[14],一旦释放入肠腔其体积立即扩张 1 000 倍以上,网状结构瓦片状平铺叠加,形成内层黏液锚着在上皮细胞表面^[17]。人类内层黏液的更新起始于上皮细胞侧,大约每小时轮回一次^[18]。内层黏液结构致密,紧密附着在上皮细胞表面,不能被吸除,避免了细菌与肠上皮细胞接触^[19]。

内层黏液在肠腔侧通过蛋白水解裂解,移行为疏松的外层黏液,这种裂解并不破坏网状结构,MUC2 的体积却扩展了 3~4 倍。虽然外层黏液由内层黏液移行而成,但构成成分未变,其属性为疏松、不附着、允许细菌通过,与内层黏液截然相反^[19]。

4 肠道共生菌与黏液层的关系

人类肠道内存在大量细菌,其总量为人体细胞的数十倍。肠道菌群与人体细胞紧密关联,互相交换营养物质和代谢产物,共生细菌可相当于一个人体器官^[20]。结肠中存在 $10^{13} \sim 10^{14}$ 的共生菌,外层黏液为肠道细菌提供寄居场所及部分食物来源。细菌的外切糖苷酶缓慢分解 MUC2 中的多糖,一旦触及蛋白核心,黏液凝胶即被细菌的蛋白酶溶解^[21]。细菌制造短链脂肪酸,提供乙酸、丙酸及丁酸作为肠上皮细胞的能量来源^[22]。杯状细胞的 MUC2 合成分泌作用和细菌的分解作用,共同决定了黏液层的厚度。

人类肠道共生菌含有大约 50% 厚壁菌门和 30% 拟杆菌门。无菌斑马鱼和小鼠之间的交叉菌群移植实验表明,不同物种在选择肠道微生态方面有其独特的机制^[23]。人类结肠的外层黏液由于含有细菌表面配基而成为共生菌的结合位点^[24],也说明宿主并非随机选择共生菌。有研究发现鼠类 MUC2 的 O-糖基化与人类的有本质区别,可能是两物种之间肠道共生菌差异的原因之一^[25]。

肠道细菌通过激活不同的信号通路或者通过上皮细胞和固有层细胞产生的生物活性因子来调控 MUC2 的合成分泌。共生菌能够通过直接作用以及给予宿主信号转导来调控肠道菌群^[26]。植物乳杆菌能够诱导 MUC2 产生,抑制肠致病性大肠杆菌的黏附,表明益生菌可通过占据细菌结合位点使肠黏液层增厚来保护机体免于病原体侵袭^[27]。经抗生素预处理的小鼠,口服鼠伤寒沙门氏杆菌后发

生肠道感染,而未经预处理小鼠则普遍抵御该细菌感染。抗生素使肠道共生菌群受损,细菌结合位点空缺,病原菌大量占据并定植^[28]。研究显示在发生自发性结肠炎的 Muc2^{-/-} 小鼠中,口服鼠乳杆菌可以改善菌群失调及结肠炎^[29]。

5 黏液层对于病原生物的屏障作用

黏液层起保护性屏障作用,与野生型小鼠相比,Muc2^{-/-} 小鼠感染柠檬酸杆菌后,黏膜层表面形成更多的微菌落,且粪便中的柠檬酸杆菌含量增加了 10~100 倍^[30]。黏液的分泌还对病原菌起冲刷作用,减少肠腔内的细菌总量,而 Muc2^{-/-} 小鼠缺乏这项功能。此外,黏液层还可避免肠腔内的有毒有害物质接触上皮细胞,同时其半透膜特性又允许水分、气体与营养物质交换。

病原生物必须通过独特的侵袭途径才能跨越结肠致密的内层黏液入侵宿主。肠杆菌丝氨酸蛋白酶的自主转运蛋白(SPATE)是一组侵袭性蛋白,由肠道病原生物通过 V 型自主转运蛋白途径分泌^[31]。SPATE 能够裂解包括 MUC2 在内的黏蛋白,加速毒素运送至肠上皮细胞。溶组织阿米巴不仅能到达结肠上皮细胞层,还能侵入细胞内^[32]。它通过黏附素附着在黏液上,触发分泌半胱氨酸蛋白酶,使 MUC2 裂解,导致内层黏液溶解。裂解发生在 MUC2 糖基化较为薄弱的 C 端^[33],其他病原生物也可能有类似致病机制。

致病性大肠杆菌模型中,MUC2 限制一切病原菌和共生菌与黏膜层接触,表明在类似感染中 MUC2 的产生可以有效管理肠道细菌,避免组织损伤和细菌移位^[30]。病原菌可以通过干扰黏液的产生,从而提高致病侵袭性。在沙门菌感染中,发现干扰素- γ (IFN- γ)受体信号影响杯状细胞黏液的产生和释放^[34]。艰难梭菌主要通过毒素 A 破坏肠道屏障功能,引发重症肠道感染。给予艰难梭菌毒素 A 预处理后,杯状细胞对多种刺激黏液分泌的激动剂无反应^[35]。

6 黏液层与溃疡性结肠炎的关系

溃疡性结肠炎(UC)病变局限于结肠,通过测序技术已发现 UC 中存在肠道菌群失调^[36]。有学者认为炎症性肠病是细菌和细菌抗原与固有层的免疫细胞接触,从而触发免疫炎症反应^[37]。因此,除研究免疫反应之外,内层黏液受损所导致的细菌与肠上皮细胞接触增多也成为了关注重点^[38]。

现有研究表明了黏液层的重要屏障作用,Muc2^{-/-} 小鼠肠腔内没有黏液层,细菌与上皮细胞直接接触,甚至深入隐窝内或移位至上皮细胞内。

细菌与上皮细胞的紧密接触引发炎症反应,而慢性炎症反应是结肠肿瘤已知的发病因素之一^[19]。另一些黏液缺陷的小鼠模型,如 MUC2 蛋白低聚反应域发生单点突变的小鼠,表现为 MUC2 合成异常,杯状细胞黏液储备减少,黏液层薄弱且通透性增加,并发生自发性结肠炎^[39]。因此肠道黏液层的缺陷可能是部分患者发生 UC 的重要原因之一。

葡聚糖硫酸钠(DSS)是 UC 动物造模中较常采用的方法,实验表明接触 DSS 后,肠道内层黏液对于细菌的通透性增加,细菌接触到上皮细胞^[40]。DSS 增加了内层黏液通透性,但没有改变其厚度。在白细胞介素-10(IL-10)^{-/-}小鼠模型中,虽然黏液层厚度增加,细菌却可以穿透内层黏液^[41]。由此可见,黏液层的通透性可能更多地取决于其结构特性,而不仅仅是厚度。

7 高脂饮食对于肠道黏液屏障的影响

高脂饮食(HFD)与糖耐量受损、血脂升高、肝内脂肪沉积等病理生理改变之间的关系已为大家熟知。目前另有研究提示高脂饮食与肠屏障功能改变有关,也因此与某些肠道疾病如结肠肿瘤^[42]、炎症性肠病^[43]的发生可能有一定相关性。

高脂饮食喂养的 DSS 处理小鼠,结肠炎症反应较对照组严重^[44-45]。给予小鼠高脂饮食后观察到结肠炎症反应,结肠黏液层变薄且完整性受到破坏^[46-47],黏膜层发生改变,杯状细胞数量减少^[48]。不同化学结构的脂肪酸对于杯状细胞的调控作用也不尽相同^[49]。

高脂饮食导致肠道黏膜附近的脂肪酸浓度升高,肠道屏障受损,过量的脂肪酸向远端肠腔内推进,其抗菌作用导致肠道共生菌的多样性下降,菌群比例失调^[50]。目前对于长链脂肪酸与杯状细胞功能、肠道黏液层以及肠道共生菌之间的相互作用仍有待研究。

8 结语

杯状细胞合成分泌 MUC2 构成肠道黏液层,是肠道的第一线机械屏障。结肠有两层黏液结构,内层黏液隔绝肠道细菌与肠上皮接触,避免组织损伤和菌群移位。MUC2 合成、分泌缺陷或黏液层结构特性的改变可能导致疾病如 UC 的发生。饮食习惯如高脂饮食也可能影响杯状细胞功能和黏液层特性。

参 考 文 献

- van der Flier LG, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium [J]. *Annu Rev Physiol*, 2009, 71: 241-260.
- McCauley HA, Guasch G. Three cheers for the goblet cell;

- maintaining homeostasis in mucosal epithelia[J]. *Trends Mol Med*, 2015, 21: 492-503.
- Radwan KA, Oliver MG, Specian RD. Cytoarchitectural reorganization of rabbit colonic goblet cells during baseline secretion[J]. *Am J Anat*, 1990, 189: 365-376.
- van der Flier LG, van Gijn ME, Hatzis P, et al. Transcription factor achaete scute-like 2 controls intestinal stem cell fate[J]. *Cell*, 2009, 136: 903-912.
- Karam SM. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut[J]. *Front Biosci*, 1999, 4: D286-D298.
- Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer[J]. *Am J Clin Nutr*, 2001, 73: 1131S-1141S.
- Lang T, Hansson GC, Samuelsson T. Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104: 16209-16214.
- Tsuru A, Fujimoto N, Takahashi S, et al. Negative feedback by IRE1 β optimizes mucin production in goblet cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 2864-2869.
- Kaser A, Lee AH, Franke A, et al. XBP1 links ER stress to intestinal inflammation and confers genetic risk for human inflammatory bowel disease[J]. *Cell*, 2008, 134: 743-756.
- Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease [J]. *Annu Rev Immuno*, 2010, 28: 573-621.
- Davis CW, Dickey BF. Regulated airway goblet cell mucin secretion[J]. *Annu Rev Physiol*, 2008, 70: 487-512.
- Dharmani P, Srivastava V, Kissoon-Singh V, et al. Role of intestinal mucins in innate host defense mechanisms against pathogens[J]. *J Innate Immun*, 2009, 1: 123-135.
- Ahn DH, Crawley SC, Hokari R, et al. TNF-alpha activates MUC2 transcription via NF-kappaB but inhibits via JNK activation[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2005, 15: 29-40.
- Ambort D, Johansson ME, Gustafsson JK, et al. Calcium and pH-dependent packing and release of the gel-forming MUC2 mucin[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109: 5645-5650.
- Godt K, Johansson ME, Lidell ME, et al. The N-termini of the MUC2 mucin form trimers that are held together within a trypsin-resistant core fragment[J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 47248-47256.
- Lidell ME, Johansson ME, Mörgelin M, et al. The recombinant C-terminus of the human MUC2 mucin forms dimers in CHO cells and heterodimers with full-length MUC2 in LS 174T cells [J]. *Biochem J*, 2003, 372: 335-345.
- Round AN, Rigby NM, Garcia de la Torre A, et al. Lamellar structures of MUC2-rich mucin: a potential role in governing the barrier and lubricating functions of intestinal mucus [J]. *Biomacromolecules*, 2012, 13: 3253-3261.
- Johansson ME. Fast renewal of the distal colonic mucus layers by the surface goblet cells as measured by in vivo labeling of mucin glycoproteins[J]. *PLoS One*, 2012, 7: e41009.
- Johansson ME, Phillipson M, Petersson J, et al. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105: 15064-15069.
- Zhao L. Genomics: The tale of our other genome[J]. *Nature*,

- 2010, 465: 879-880.
- 21 Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, et al. Host-bacterial mutualism in the human intestine [J]. *Science*, 2005, 307: 1915-1920.
- 22 Wong JM, de Souza R, Kendall CW, et al. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids [J]. *J Clin Gastroenterol*, 2006, 40: 235-243.
- 23 Rawls JF, Mahowald MA, Ley RE, et al. Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection [J]. *Cell*, 2006, 127: 423-433.
- 24 Johansson ME, Larsson JM, Hansson GC. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(Suppl 1): 4659-4665.
- 25 Thomsson KA, Holmén-Larsson JM, Angström J, et al. Detailed O-glycomics of the Muc2 mucin from colon of wild-type, core 1- and core 3-transferase-deficient mice highlights differences compared with human MUC2 [J]. *Glycobiology*, 2012, 22: 1128-1139.
- 26 Fukata M, Abreu MT. Pathogen recognition receptors, cancer and inflammation in the gut [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2009, 9: 680-687.
- 27 Mack DR, Michail S, Wei S, et al. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression [J]. *Am J Physiol*, 1999, 276: G941-G950.
- 28 Barthel M, Hapfelmeier S, Quintanilla-Martínez L, et al. Pretreatment of mice with streptomycin provides a *Salmonella enterica* serovar Typhimurium colitis model that allows analysis of both pathogen and host [J]. *Infect Immun*, 2003, 71: 2839-2858.
- 29 Morampudi V, Dalwadi U, Bhinder G, et al. The goblet cell-derived mediator RELM- β drives spontaneous colitis in Muc2-deficient mice by promoting commensal microbial dysbiosis [J]. *Mucosal Immunol*, 2016, 9: 1218-1233.
- 30 Bergstrom KS, Kisoos-Singh V, Gibson DL, et al. Muc2 protects against lethal infectious colitis by disassociating pathogenic and commensal bacteria from the colonic mucosa [J]. *PLoS Pathog*, 2010, 6: e1000902.
- 31 Kumar P, Luo Q, Vickers TJ, et al. EatA, an immunogenic protective antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*, degrades intestinal mucin [J]. *Infect Immun*, 2014, 82: 500-508.
- 32 Petri WA Jr, Haque R, Mann BJ. The bittersweet interface of parasite and host: lectin-carbohydrate interactions during human invasion by the parasite *Entamoeba histolytica* [J]. *Annu Rev Microbiol*, 2002, 56: 39-64.
- 33 Lidell ME, Moncada DM, Chadee K, et al. *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal part and dissolves the protective colonic mucus gel [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006, 103: 9298-9303.
- 34 Songhet P, Berthel M, Stecher B, et al. Stromal IFN- γ R-signaling modulates goblet cell function during *Salmonella typhimurium* infection [J]. *PLoS One*, 2011, 6: e22459.
- 35 Kelly CP, Becker S, Linevsky JK, et al. Neutrophil recruitment in *Clostridium difficile* toxin A enteritis in the rabbit [J]. *J Clin Invest*, 1994, 93: 1257-1265.
- 36 Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel disease: current status and the future ahead [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146: 1489-1499.
- 37 Ordás I, Eckmann L, Talamini M, et al. Ulcerative colitis [J]. *Lancet*, 2012, 380: 1606-1619.
- 38 Swidsinski A, Loening-Baucke V, Theissig F, et al. Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon [J]. *Gut*, 2007, 56: 343-350.
- 39 Heazlewood CK, Cook MC, Eri R, et al. Aberrant mucin assembly in mice causes endoplasmic reticulum stress and spontaneous inflammation resembling ulcerative colitis [J]. *PLoS Med*, 2008, 5: e54.
- 40 Johansson ME, Gustafsson JK, Sjöberg KE, et al. Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model [J]. *PLoS One*, 2010, 5: e12238.
- 41 Johansson ME, Gustafsson JK, Holmén-Larsson J, et al. Bacteria penetrate the normally impenetrable inner colon mucus layer in both murine colitis models and in patients with ulcerative colitis [J]. *Gut*, 2014, 63: 281-291.
- 42 Vargas AJ, Thompson PA. Diet and nutrient factors in colorectal cancer risk [J]. *Nutr Clin Pract* 2012, 27: 613-623.
- 43 Sakamoto N, Kono S, Wakai K, et al. Dietary risk factors for inflammatory bowel disease: a multicenter case-control study in Japan [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2005, 11: 154-163.
- 44 Hokari R, Matsunaga H, Miura S. Effect of dietary fat on intestinal inflammatory diseases [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28: 33-36.
- 45 Zarepoor L, Lu JT, Zhang C, et al. Dietary flaxseed intake exacerbates acute colonic mucosal injury and inflammation induced by dextran sodium sulfate [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, 306: G1042-G1055.
- 46 Duriancik DM, Comstock SS, Langohr IM, et al. High levels of fish oil enhance neutrophil development and activation and influence colon mucus barrier function in a genetically susceptible mouse model [J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26: 1261-1272.
- 47 Everard A, Belzer C, Geurts L, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110: 9066-9071.
- 48 Paik J, Fierce Y, Treuting PM, et al. High-fat diet-induced obesity exacerbates inflammatory bowel disease in genetically susceptible *Mdr1a2/2* male mice [J]. *J Nutr*, 2013, 143: 1240-1247.
- 49 Benoit B, Bruno J, Kayal F, et al. Saturated and unsaturated fatty acids differently modulate colonic goblet cells in vitro and in rat pups [J]. *J Nutr*, 2015, 145: 1754-1762.
- 50 de Wit N, Derrien M, Bosch-Vermeulen H, et al. Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012, 303: G589-G599.

(收稿日期:2017-07-05)

(本文编辑:王雨婷)