

综述

紧密连接蛋白 claudin 的研究进展

雷 军 综述,夏祥国 审校

(泸州医学院附属医院神经外科,四川泸州 646000)

中图分类号 Q51 文献标识码 A 文章编号 1000-2669(2009)6-0655-03

细胞粘附既是维持组织结构稳定的基本条件,也是细胞运动和发挥功能的调节因素,并且对细胞的增殖、分化有重要影响。现已知的粘附结构包括4种细胞间连接形式:紧密连接(tight junctions, TJ)、粘附带、缝隙连接和桥粒^[1]。在上皮组织中,细胞-细胞间的相互作用由连接复合体调节。位于连接复合体最顶端的就是紧密连接。紧密连接由咬合蛋白 occludin、闭合蛋白 claudins 和连接粘附分子(junction adhesion molecule JAMs)3种完整的膜蛋白和闭合小环蛋白(ZO-1, ZO-2和ZO-3)等外周胞浆蛋白组成^[2]。目前认为起主要作用的是前二者,尤以 claudins 的功能最为重要,它是构成紧密连接的主要骨架蛋白。

1. Claudins 的分子结构和生物学特性

Furuse 等首先发现了鼠 TJ 带中两种不同于 occludin 的 TJ 蛋白,分别包括 211 个和 230 个氨基酸,亲水性的分析显示它们均有 4 个跨膜区,并分别命名为 claudin-1 和 claudin-2。而 Swisshelm 等在 1999 年首先克隆出了人类 claudin 基因。目前已发现 claudins 家族由 24 个跨膜蛋白亚型组成,分子量约 20~27KD,其序列的一致性为 12.5%~69.7%。每一个 claudin 分子均由 4 个跨膜结构域组成,氨基和羧基末端都在细胞内,羧基末端富含丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基^[3]。claudins 有 2 个长度不等的细胞外环,在不同 claudin 分子之间,第 1 和第 4 个跨膜片段以及细胞外环的氨基酸序列具有高度保守性。claudins 直接作用于紧密连接膜相关蛋白的鸟苷酸激酶同工酶、ZO-1、ZO-2、ZO-3 以及富含 PDZ 结构域的蛋白,并间接同 AF-6 和菌环蛋白作用,维持紧密连接特有的栅栏功能和屏障功能。多种信号分子参与紧密连接的调节,如 Rho 因子, Ca²⁺, PKC, 异三聚体 G 蛋白 Galphal2 等。这些分子有两个共同的作用靶位点:肌动蛋白和肌球蛋白,肌球蛋白与肌动蛋白相连并定位于从底部到顶点的连接复合物,肌球蛋白结构收缩可以对紧密连接膜产生离心性的牵引、进而调节紧密连接的渗透性。Claudins 对细胞连接处选择渗透性的调节主要通过蛋白激酶途径实现,蛋白激酶 A(PKA)或蛋白激酶 C(PKC)作用于 claudins 上特定氨基酸靶点,一般以丝氨酸、苏氨酸为主。claudins 磷酸化后,紧密连接功能下降,表现为氯化物渗透性增加。可能原因是磷酸化的 claudins 干扰紧密连接的形成^[4],从而破坏细胞间紧密连接的正常功能。不同蛋白激

酶作用于不同的 claudins 分子,在研究卵巢癌中 claudins 的调节机制时发现,当 PKA 和 PKC 激活后,它们作用在不同的靶蛋白:PKA 作用于 claudin-3 上 C-末端第 192 位氨基酸,而 PKC 使 claudin-4 磷酸化。claudins 的改变可以影响整个紧密连接的结构和功能。这种改变可以是 claudins 数量上的改变,也可以是基因的突变。一旦紧密连接功能下降,上皮细胞的极性即遭到破坏,不同液性空间的脂质和完整蛋白可自由扩散,上皮细胞两个不同环境之间的渗透屏障同样遭到破坏,直接导致其生物学特性的改变,甚至潜在的有害物质或病原体进入机体。

2. Claudins 与血脑屏障

血脑屏障主要由内皮细胞、周细胞构成,星形细胞足突包绕毛细血管外周。内皮细胞间的紧密连接是构成血脑屏障的重要部分。在脑微血管循环内皮系统中,claudin-3 和 claudin-5 表达丰富。claudin 蛋白在脂质内膜与外膜的表达比率大概为 55%和 45%,而在非血脑屏障内皮细胞中,紧密连接只与脂质外膜联系。Wolburg 等研究在自身免疫性脑脊髓炎和人类成胶质细胞细胞瘤的脑和脊髓中,炎性物质包绕的小静脉上紧密连接失去 claudin-3 的免疫着色,而其他紧密连接蛋白未发生改变,因此推断 claudin-3 是决定体内血脑屏障紧密连接的主要成分。Shoichiro 等人认为 claudin-5 是脑血管内皮细胞通透性调节的最重要调节因子,对血脑屏障通透性可能起着至关重要的调节作用。Ishizaki 等人的研究证明,cAMP 可以通过依赖或非依赖蛋白激酶 A 途径,通过苏氨酸磷酸化而上调猪血脑屏障上 claudin-5 的表达,从而促进内皮细胞上紧密连接的功能。然而,Karl 等人的研究却发现,敲除 claudin-5 基因大鼠的血脑屏障在结构和形态上并未出现明显变化,结果只是血脑屏障上的小分子物质(小于 800KD)在细胞间的通透性升高,而且这种通透性升高是非特异性的,具体机制尚不清楚。另有研究发现,claudin-5 可以促进基质金属蛋白酶(MMP-2)的激活。Claudin-5 的这项新功能对于血管发生和血管通透性增高都起了重要的作用。总的说来,claudin 在血脑屏障上的研究仍是热点,并存在较大争议,为了临床上能选择性开放血脑屏障,claudin 对其的调节机制需待深入研究。

3. Claudins 基因突变与紧密连接遗传疾病

Hadj-Rabias 等发现,人和动物的大多数胆汁郁积症与肝细胞骨架和紧密连接的改变有关,这些在肝内和肝外的胆汁

作者简介:雷 军(1979-),男,住院医师,硕士生

郁积症都不是特异性的改变。在家族性高胆固醇血症的病人中,发现了紧密连接蛋白2的错义突变以及 claudin-1 基因的外显子1有两个碱基的缺失,他们认为该疾病与 claudin-1 基因的突变有关;Simon DB 等通过定位克隆技术,鉴定了一个人类基因,命名为 paracellin-1(claudin-16)。编码紧密连接蛋白 claudin-16 的该基因突变会发生一种常染色体隐性疾病,它的突变导致 claudin-16 的 PDZ 结合域失活, claudin-16 不能与 ZO-1 结合,影响细胞间二价阳离子的选择性和渗透性。这种突变的杂合性携带者可发生肾脏的钙质沉着,慢性间质性肾炎,肾脏重吸收 Mg^{2+} 障碍,造成严重的低镁血症^[5]; Ben. Yosef 等^[6]研究发现 claudin-14 突变引起小鼠耳蜗外部毛细胞的快速退化,内部毛细胞缓慢退化,最终导致耳聋; Rabia^[7]等研究发现 claudin-1 基因第1个外显子200和201位置上2个碱基的缺失突变可产生成熟前终止密码子,导致肝脏和皮肤 claudin-1 的完全缺失,而这就是新生儿硬化性胆管炎和鱼鳞病的发病原因。

4. Claudins 与神经和生殖系统疾病

Claudin-11 是髓磷脂和睾丸中的跨膜蛋白,通过它们之间的相互作用调节细胞的增殖和迁移,对于维持精子生成和神经系统功能十分重要。缺乏 claudin-11 的小鼠会出现神经和生殖方面的缺陷,因此, claudin-11 在少突胶质细胞和其他中枢神经系统外细胞的生长和分化过程中必定是十分关键的。同时, Claudin-11 也作为一种自身抗原参与自身免疫性脱髓鞘疾病。此外^[8],正常人的中枢神经系统血管中可以检测到 claudin-3 和 claudin-5 等紧密连接蛋白的存在,而脑肿瘤水肿时 claudins 则部分表达为缺失或下调,证明 claudins 可能参与了脑肿瘤周水肿的形成。

5. Claudins 表达水平改变与肿瘤

正常分化组织的细胞组成是高度有序的,癌组织则通常缺乏这种特性,肿瘤细胞常常是分化变差、细胞极性消失及胞间紧密连接功能失常。紧密连接完整性的破坏可能是导致肿瘤细胞生长所需的营养因子及其他因子扩散的原因。许多肿瘤发生时, claudins 表达水平明显下降。如在多种乳腺癌细胞系和原发性乳腺癌中 claudin-1 和 claudin-7 mRNA 和蛋白质水平均显著降低并且降低表达与较高的肿瘤分级、肿瘤的复发和转移相关; Soini^[9]通过免疫组化发现 Claudin-2 在前列腺癌、乳腺癌中, Claudin-3 在肾癌、膀胱癌中,以及 Claudin-4 在肾癌、肝癌中的表达均是下调的,而淋巴瘤中, Claudin-1~5 和 7 均不表达; Moustafa 等^[10]用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白印迹(Western blot)方法证实头颈部鳞癌中, Claudin-7 的表达较周围正常组织也是降低的。 Claudins 蛋白表达水平的降低并不是由于其基因的改变引起的, claudins 基因的启动子和编码区序列并未发生遗传学上的变化,提示其他调节或外源性的因素在肿瘤发展过程中影响 claudins 的下调,这些外源性因素至今尚不清楚。然而在更多肿瘤组织中 claudins 表达水平明显较周围组织中增高,且随着肿瘤级别的升高、淋巴结转移的发生,表达水平随之升高。

Long 等^[11]利用 Northern 印迹发现在人类前列腺癌上皮中, Claudin-3 基因转录的 mRNA 量较周围正常组织明显增高,同时用免疫组化发现 Claudin-3 蛋白在骨转移灶中的表达也是增高的; Rangel 等比较分析了 70 例的卵巢癌、正常组织及卵巢囊腺瘤,结果发现 Claudin-3、4 在卵巢癌各亚型中均高表达且定位于胞浆; Montgomery 等^[12]发现 Claudin-3、4、7 在胃腺癌、食管癌及胃黏膜分化不良细胞、Barrett'S 食管中的表达均较正常组织增高; Nichols^[13]等发现胰腺癌 99% 的原发灶和 100% 转移灶的癌细胞膜上高表达 Claudin-4; Resnick 等^[14]发现 Claudin-1、3、4 在肠型胃癌中是高表达的。另外, Qliveiraa 等^[15]也证实在大肠癌中 Claudin-1、3、4 的表达是较正常组织增高的。除此之外,在一些有 claudin 高表达的肿瘤中,其表达水平与肿瘤的恶性等级、侵袭性以及淋巴转移有关。 Landers KA 等^[16]利用实时 RT-PCR,蛋白质印迹法和免疫组化的方法发现在前列腺原发肿瘤中 claudin-4 都是上调的,而它在低等级(Gleason 6)癌组织中的表达明显高于其在高等级(Gleason 大于等于 7)癌组织中的表达。 Yong-Lian Wu 等^[17]在胃腺癌研究中得到的结论是 claudin-1 在低分化腺癌中的表达低于高、中分化腺癌中的表达,而在已侵及固有肌层和腹壁或淋巴转移的腺癌中表达明显高于仅侵及黏膜和黏膜下层而无淋巴转移的腺癌。肿瘤组织中 claudins 过表达的机制目前正在研究中,研究结直肠癌组织中 claudin-1 过表达的机制时发现, claudin-1 过表达可以抑制 E-cadherin 表达,失去 E-cadherin 表达使 E-cadherin/Tcf 信号通路上调。 Claudin-1 在细胞膜上定位的改变、E-cadherin 表达减少、E-cadherin/Tcf 信号通路上调共同作用促进肿瘤的发生发展。 Claudins 虽在各种肿瘤中的表达水平有高低,但这并不矛盾,它们在恶性肿瘤组织中的表达无论高低或是否被磷酸化,最终总是引起紧密连接屏障的正常结构破坏而导致胞间分子异常侧向扩散、细胞极性消失等一系列变化^[18], Claudins 接触抑制的丢失,是肿瘤进展早期(细胞极性的丢失和生长失控)和晚期(浸润和转移)的典型特征。

6. Claudins 蛋白应用于肿瘤诊断、治疗

由于 Claudin 蛋白的表达是具有高度组织特异性的,使它们有希望应用于不同肿瘤的早期诊断及鉴别。如前所述, Claudin-3、4 在卵巢癌、乳腺癌、肠型胃癌、大肠癌等组织中的高表达,可参与早期诊断,而它们又较少在弥漫型胃癌中表达则有利于胃癌类型的早期鉴别; Claudin-4 在胆管癌细胞中高表达而在肝细胞癌及正常肝组织中不表达,也可应用于两者的早期鉴别; Claudin-5 仅在血管肉瘤及良性脉管肿瘤中表达,可作为其标记物; Claudin-10 的表达与否则可作为原发性肝癌根治术后复发的独立预后因子,以及甲状腺乳头状癌、滤泡状癌的鉴别手段。产气荚膜杆菌外毒素(clostridium perfringens enterotoxin CPE) 在人群中可引起食物中毒,而 Claudin-3、4 蛋白是 CPE 的受体。这种细菌有一个独特的作用机制,当与其受体结合后,可以形成一种大的、十二烷基硫酸钠抵抗的复合物,这种复合物促使细胞膜通透性的改变,导致细胞溶解坏死。而 Claudin-3、4 在不同人类肿瘤组织中

的含量是不同的,由此想到在 Claudin-3、4 高表达的癌组织中,可以利用这种细菌进行肿瘤治疗。Michl 等曾描述了用细胞病变效应 CPE 瘤内注射异种嫁接的胰腺癌细胞,结果引起肿瘤细胞大面积坏死,明显延缓了肿瘤生长,同时证实了 CPE 的细胞毒性仅限于 claudin-4 高表达的癌细胞,并呈剂量依赖性。CPE 的功能区域可以分为受体结合区(C-terminal of CPE, C-CPE)和细胞毒素区(N-terminal of CPE)。Masuo kondoh 等发现了 C-CPE 有使药物吸收增加的效应,而且没有粘膜毒性。同时,考虑到若能在肿瘤化疗药物中整合入 CPE 的骨架,使其能结合特异的 Claudin 受体,则可使化疗药物具有肿瘤特异性,从而可增强化疗效果、减少副作用。其次, Claudin 蛋白均是跨膜蛋白,胞外通常具有两个环,如果使用特异的抗体识别结合特异的 Claudin 蛋白胞外环靶点,将可能成为有前景的肿瘤治疗方法之一。重组单克隆抗体已开始应用于肿瘤治疗研究,如人类免疫球蛋白 G(IgG)抗体应用于乳腺癌、鸡单克隆抗体应用于 Claudin-1、3、4 高表达肿瘤的治疗研究等^[9]。再者,由于某些 Claudin 蛋白在肿瘤细胞中的表达是下调或缺失的,所以如何转导或激活这类蛋白的基因、转录因子从而恢复细胞间正常紧密连接结构、减弱肿瘤细胞侵袭转移等问题也是今后的研究方向。

综上所述, claudins 作为细胞间紧密连接的主要功能蛋白通过细胞屏障、细胞旁路转运和信号转导保持了细胞内环境的平衡。编码它的基因改变以及它在多种疾病特别是不同肿瘤组织中的异常表达已成为细胞生物学以及众多相关学者的研究热点。虽然目前已完成的研究主要是侧重于基础及动物实验,而且 Claudin 蛋白在相关疾病及肿瘤发生、发展过程中究竟确切作用机制如何,目前尚不是很清楚。但通过对 claudins 家族编码的蛋白在肿瘤和正常组织中的差异表达,利用 claudins 表达存在高度的组织特异性,有可能将其作为多种肿瘤侵袭和转移的标志。同时随着对 claudins 结构和功能的进一步深入研究和分子生物学技术的飞速发展, claudins 在药理学和在肿瘤的检测、诊断、治疗中必定会有一个非常好的前景。

参 考 文 献

1. 李华,郑秀.紧密连接蛋白与妇科肿瘤的相关研究[J].医学综述 2007;5.13(10):725
2. 潘晓玉,王波.紧密连接蛋白 claudins 与肿瘤的研究进展[J].国际病理科学与临床杂志,2006;4.26(2):113
3. Morin PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy[J]. Cancer Res,2005;65:9603
4. Go M, Kojima T, Takano K, et al. Expression and function of tight junctions in the crypt epithelium of human palatine tonsils[J]. J Histochem Cytochem, 2004;52(12):1627
5. Maria OM, Kim JW, Gerstenhaber JA, et al. Distribution of tight junction proteins in adult human salivary glands [J]. J Histochem cytochem, 2008 Sep 2.
6. Ben -Yosef T, Belyantseva IA, Saunders TL, et al. Claudin-14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration[J]. Hum Mol Genet, 2007;12(16):2049
7. Hadj -Rabia S, Baala L, Vabres P, et al. Claudin -1 gene mutations in neonatal sclerosing cholangitis associated with ichthyosis: a tight junction disease[J]. Gastroenterology, 2004;127(5):1386
8. 张布衣,姚根有.紧密连接蛋白 claudins 的研究进展[J].国际病理科学与临床杂志,2006;2.26[1]:14
9. Soini Y. Expression of claudin-1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumors[J]. Histopathology, 2005;46:551
10. Al Moustafa AE, Alaoui -Jamali MA, Batist G, et al. Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells[J]. Oncogene, 2002, 21:2634
11. Long H, Crean CD, Lee WH, et al. Expression of clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin -3 and claudin -4 in prostate cancer epithelium [J]. Cancer Res, 2001;61:7878
12. Kominsky SL, Vali M, Korz D, et al. Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin-3 and -4[J]. Am J Pathol, 2004;164:1627
13. Nichols LS, Ashfaq R, Iacobuzio -Donahue CA. Claudin -4 protein expression in primary and metastatic pancreatic cancer: support for use as a therapeutic target[J]. Am J Clin Pathol, 2004;121:226
14. Resnick MB, Gavilanez M, Newton E, et al. Claudin expression in gastric adenocarcinomas: a tissue microarray study with prognostic correlation[J]. Hum Pathol, 2005;36:886
15. De Oliveiraa SS, De Oliveira IM, Souza WD. Claudins up-regulation in human colorectal cancer [J]. FEBS Lett, 2005;579:6179
16. Landers KA, Samaratunga H, Teng L, et al. Identification of claudin -4 as a marker highly overexpressed in both primary and metastatic prostate cancer [J]. Br J Cancer, 2008 Aug 5;99(3):491
17. Yong -Lian Wu, Sheng Zhang, Guo -Rong Wang, et al. Expression transformation of claudin -1 in the process of gastric adenocarcinoma invasion [J]. World J Gastroenterol, 2008; August 21; 14(31): 4943
18. 陈徐艰, 郑树森. Claudin 蛋白与恶性肿瘤关系的研究进展[J]. 国际外科学杂志, 2006;33[5]:380
19. Offer S, Hekele A, Teichmann U, et al. Epithelial tight junction proteins as potential antibody targets for pancreatic carcinoma therapy [J]. Cancer Immunology and immunotherapy, 2005;54:431

(2009-09-17 收稿)