

单位代码: 84501

学 号: b8450115032



CHINESE CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION

中国疾病预防控制中心

博士学位论文

HIV-1感染致肠道上皮紧密连接异常的 分子机制

研 究 生: 王凤杰

培养单位: 中国疾控中心艾防中心

导 师: 杨贵波 研究员

副 导 师: 邢 辉 研究员

王书晖 副研究员

专 业: 免疫学

2019年

单位代码：84501

学号：b8450115032

博士学位论文

HIV-1 感染致肠道上皮紧密连接异常的 分子机制

研 究 生： 王凤杰

培养单位： 中国疾控中心艾防中心

导 师： 杨贵波 研究员

副 导 师： 邢 辉 研究员

王书晖 副研究员

专 业： 免疫学

中 国 疾 病 预 防 控 制 中 心
2019 年

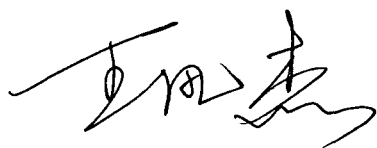
学位论文原创性、真实性声明

本人郑重声明:《HIV-1 感染致肠道上皮紧密连接异常的分子机制》是本人在中国疾病预防控制中心免疫学专业攻读博士学位期间,在导师指导下完成的博士学位论文。我承诺:本论文中所涉及的所有数据、试验记录以及研究结果均真实可信,引用资料已注明出处,无剽窃、篡改、抄袭之行为。如本论文原创性方面出现问题,我愿负法律责任。

本课题的研究成果归中国疾病预防控制中心所有,发表文章的单位署名为中国疾病预防控制中心。

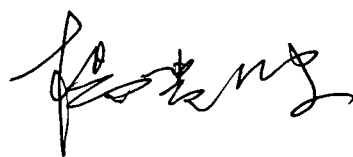
特此声明!

学位论文作者(签名):



2019 年 6 月 28 日

研究生导师(签名):



2019 年 6 月 28 日

目录

中文摘要.....	1
Abstract.....	5
英文缩略词.....	11
前言.....	13
第一部分 SHIV/SIV 感染后恒河猴肠道紧密连接基因表达的变化及其与 <i>IL-17A</i> 、 <i>IL-17F</i> 、 <i>IL-17R</i> 表达的相关性.....	20
第一节 引言.....	20
第二节 材料和方法.....	23
第三节 实验结果.....	32
第四节 讨论.....	58
第五节 小结.....	61
第二部分 <i>IL-17A/IL-17F</i> 对 HIV-1 gp140 介导的肠道上皮屏障损伤的保护作用.....	62
第一节 引言.....	62
第二节 材料和方法.....	64
第三节 实验结果.....	73
第四节 讨论.....	87
第五节 小结.....	90
第三部分 LPS 和 TNF- α 对 <i>IL-17R</i> 表达及肠道上皮屏障功能的影响.....	91
第一节 引言.....	91
第二节 材料和方法.....	93
第三节 实验结果.....	96
第四节 讨论.....	116
第五节 小结.....	119
全文结论.....	120
参考文献.....	121
综述.....	137

个人基本情况.....	150
发表文章.....	151
致谢.....	152

中文摘要

HIV-1 感染致肠道上皮紧密连接异常的分子机制

博士研究生：王凤杰

导师：杨贵波 研究员

单位：中国疾病预防控制中心性病艾滋病预防控制中心

研究背景

粘膜是包括人类免疫缺陷病毒在内的绝大多数病原体入侵机体的主要门户。粘膜固有免疫系统是阻止粘膜感染的天然屏障，具有广谱抗感染能力。作为肠粘膜屏障的重要组成成分，肠道上皮的紧密连接结构可阻止病原微生物及其产物从肠腔内渗透进入粘膜组织以及循环系统。肠道的紧密连接结构一旦被破坏，就会引起肠腔内有害物质及病毒组分的渗透，进而引起炎症反应及粘膜系统的紊乱，最终导致肠道乃至全身免疫系统的活化。虽然长期的抗逆转录病毒治疗能够使 HIV-1 感染者体内病毒载量得以控制，系统免疫活化处于较低水平，但肠道屏障损伤依然存在，这使得 AIDS 的治疗变得困难。了解 HIV-1 感染中肠道紧密连接异常的分子机制对 HIV/AIDS 中肠道屏障损伤的预防及修复具有重要意义。虽然已知肠道粘膜中 CLDN1、CLDN3、OCLN 和 ZO-1 等紧密连接蛋白表达、分布及调控在 HIV-1 和 SIV 感染中均发生异常，但仍有多种在屏障功能的维持中发挥重要作用的紧密连接蛋白的变化未见报道，HIV/AIDS 相关紧密连接异常的分子机制尚不清楚。

作为紧密连接的主要胞外调控因子，IL-17A 和 TNF- α 在 HIV-1/SIV 感染的肠粘膜中均表达异常。IL-17/IL-17R 通路在维持粘膜免疫稳态、肠粘膜屏障完整性以及肠道微生物群的正常组成和功能中发挥至关重要的作用，虽然 SIV 感染中肠粘膜 IL-17A 的表达与多种紧密连接基因存在相关性，但 IL-17 家族其它因子在 HIV/AIDS 中的变化仍未见报道。HIV-1/SIV 感染中肠道 Th17 细胞的大量损耗、相关炎症过程的激活、微生物移位的产生及病毒组分的存在均有可能是导致肠道粘膜屏障功能异常的重要因素，但 IL-17、TNF- α 等炎症因子、微生物移位以及这些因素的联合作用对肠道屏障功能的影响仍知之甚少。为此，本文系统

地观察了 SHIV/SIV 感染的恒河猴 (HIV-1 感染动物模型) 肠道中多种紧密连接相关基因表达的变化及其与 IL-17 家族细胞因子表达的相关性; 建立体外肠道上皮细胞屏障模型研究了 IL-17A 和 IL-17F 对 HIV-1 gp140 介导的肠道上皮屏障损伤的影响; 并探讨了在炎症因子 TNF- α 和微生物移位的标志物 LPS 存在时, IL-17A/IL-17F 对上皮细胞屏障功能及紧密连接相关蛋白表达的影响。

研究方法

1. 建立实时荧光定量 RT-PCR 方法检测正常和 SHIV/SIV 感染的恒河猴 (HIV-1 感染动物模型) 肠道中 *CLDN2*, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 14, 15 等多种紧密连接相关基因的 mRNA 水平以及 *IL-17A/IL-17F* 及其受体的 mRNA 水平, 利用统计学方法分析紧密连接相关基因与 *IL-17A/IL-17F/IL-17R* mRNA 水平之间的相关性。

2. 利用 Transwell 嵌入式培养皿构建体外上皮细胞屏障模型 (Caco-2 细胞), 利用测量屏障单层跨膜电阻值和 FITC-Dextran 透过率的方法评价 HIV-1 gp140 存在时 Caco-2 细胞的屏障功能, 并利用实时荧光定量 RT-PCR 方法检测 HIV-1 gp140 存在时紧密连接相关基因 mRNA 水平。

3. 通过实时荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 的方法检测 IL-17A、IL-17F 及 HIV-1 gp140 单独或联合作用下紧密连接相关基因的表达; 通过 Western blot 的方法检测 IL-17A 和 IL-17F 作用下 NF- κ B p65 和 MAPK p68 总蛋白及磷酸化蛋白的表达, 利用 *Act1* 特异 siRNA 干扰及 BAY11-7082 (NF- κ B 选择性抑制剂)、U0126 (MAPK 选择性抑制剂) 确定参与 IL-17A 和 IL-17F 调控紧密连接相关基因表达的信号通路。

4. 通过实时荧光定量 RT-PCR 方法检测正常和 SHIV/SIV 感染恒河猴肠道中 *TNF- α* mRNA 水平及肠系膜淋巴结中 *16S rRNA* 基因的水平, 分析 *TNF- α* 与病毒载量及 *IL-17R* mRNA 水平之间的相关性; 利用实时荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 的方法检测在 LPS+TNF- α 、IL-17A/IL-17F 单独及联合作用下 *IL-17R* 和紧密连接相关基因及蛋白的表达水平, 并利用细胞免疫荧光的方法检测 LPS+TNF- α 和 IL-17A 联合作用下紧密连接蛋白 ZO-1 的表达水平。

研究结果

1. SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道粘膜中紧密连接相关基因 *CLDN5*, 8, 11, 12, 14 mRNA 水平显著低于正常动物。感染动物肠道粘膜中 *CLDN5* 和 *CLDN8* mRNA 水平是正常动物中的 1/2, *CLDN11*, 12, 14 mRNA 水平是正常动物中的 2/5。 *CLDN4*, 7, 15 mRNA 在正常和感染动物肠道中没有明显差异。在感染动物中 *CLDN5*, 8, 11, 12, 14 mRNA 水平两两之间存在显著正相关性。

2. SHIV/SIV 感染动物肠道粘膜中 *IL-17A* mRNA 是正常动物中的 1/163 倍, 且感染动物中 *IL-17A* 分别与 *CLDN5*、*CLDN11* mRNA 均存在正相关; 感染动物肠道中 *IL-17F* mRNA 是正常动物中的 2.7 倍; *IL-17RA/IL-17RC* mRNA 是正常动物中的 5~6 倍。感染动物中 *IL-17F* 与 *CLDN5*, 8, 11, 12, 14 mRNA 水平均存在负相关性; *IL-17RA* 分别与 *CLDN3*, 5, 8, 12, 14 mRNA 水平呈正相关性; *IL-17RC* 分别与 *CLDN1*, 2, 3, 4, 7, 15 mRNA 水平呈正相关性。

3. HIV-1 gp140 处理 24h 后 Caco-2 跨膜电阻值降低了 30~40%, FITC-Dextran 的透过率增加了约 50%, 并伴随着 *CLDN1*, 2, 3, 4, 5, 7, 8, *OCN* 和 *ZO-1* 等紧密连接相关基因下调表达了 2~3.5 倍。*IL-17A* 和 *IL-17F* 通过协同上调 *CLDN1*、*OCN* 和 *ZO-1* 等紧密连接蛋白的表达阻止 HIV-1 gp140 对肠道上皮细胞屏障的损伤。当 *IL-17A* 不存在时, *IL-17F* 单独作用对上皮屏障功能有一定的促进作用, 但没有统计显著性。siRNA 抑制 *Act1* 的表达后, *IL-17A* 和 *IL-17F* 介导的 *OCN* 和 *ZO-1* 转录和蛋白水平均较 siRNA control 组发生显著下调。*IL-17A* 和 *IL-17F* 对紧密连接相关基因的调控伴随着 *IL-17R* 下游信号通路 NF- κ B 和 MAPK 的活化, NF- κ B 选择性抑制剂 BAY11-7082 对 *CLDN1*, *OCN* 和 *ZO-1* 的表达均有抑制作用, 而 MAPK 激酶 MEK1/2 抑制剂 U0126 仅对 *ZO-1* 的表达具有明显的抑制作用。

4. SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中发生微生物移位, 感染动物肠道中 *TNF- α* mRNA 水平是正常动物的 2 倍, 且感染动物中 *TNF- α* 分别与病毒载量、*IL-17RA*、*IL-17RC* mRNA 水平存在正相关性。在体外细胞模型中, LPS+*TNF- α* 与 *IL-17A/IL-17F* 联合促进 Caco-2 细胞中 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 的表达。HIV-1 gp140 单独作用能够抑制 *IL-17R* 的表达, 但 LPS+*TNF- α* 、*IL-17A/IL-17F* 存在时, HIV-1

gp140 与 LPS+TNF- α 、IL-17A/IL-17F 的联合作用依然能显著上调 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 的表达。

5. LPS+TNF- α 能够轻微上调 Caco-2 细胞中 *CLDN1*, 2, 3, 4, 7, 11 及 *ZO-1* mRNA 的表达, 但不影响 *CLDN12*, 14, 15 和 *OCLN* mRNA 的表达。此外, LPS+TNF- α 对 *CLDN5*、*CLDN8* mRNA 表达具有一定的抑制作用。在 IL-17A 存在时, LPS+TNF- α 对肠道上皮细胞屏障功能及紧密连接蛋白 *CLDN1*、*CLDN3* 和 *ZO-1* 表达的促进作用大于单独作用之和。在 IL-17F 存在的情况下, LPS+TNF- α 不能够显著促进肠道上皮细胞屏障功能。LPS、TNF- α 及 IL-17A 协同促进紧密连接相关蛋白表达的过程伴随着 IL-17R 下游信号通路 NF- κ B 和 MAPK 的活化。NF- κ B 选择性抑制剂 BAY11-7082 对 *CLDN1*、*CLDN3* 和 *ZO-1* 表达均有明显的抑制作用; MAPK 激酶 MEK1/2 抑制剂 U0126 对 *CLDN3* 和 *ZO-1* 的表达有明显的抑制作用, 但对 *CLDN1* 表达无明显影响。

结论

在 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中, *CLDN5*, 8, 11, 12, 14 等多种紧密连接相关基因均发生了显著下调, HIV-1 gp140 能够直接破坏肠道上皮细胞屏障的完整性, 病毒及其蛋白组分的存在可能是导致肠道屏障功能破坏的直接原因。LPS+TNF- α 与 IL-17A 在对肠道上皮屏障功能及紧密连接蛋白表达的促进中具有协同作用。虽然 HIV/AIDS 感染伴随着肠道微生物移位的发生 (LPS 的存在) 和 *IL-17F*、*TNF- α* 等细胞因子的上调表达, 但这些因素仅对肠道屏障功能的保护产生微弱的促进作用, 肠粘膜中 Th17 细胞的缺失及 *IL-17A* 水平降低可能是造成屏障功能损伤及不易恢复的重要原因。这些结果扩展了对 HIV/AIDS 中肠道屏障损伤机制的认识, 提示针对 Th17 细胞缺失的额外治疗方法修复肠道屏障功能的可能性。

关键词: 肠道粘膜屏障, 紧密连接, IL-17, HIV-1 gp140 蛋白

Abstract

Molecular mechanisms of intestinal epithelial tight junction abnormalities caused by HIV-1 infection

Ph.D. Student: Fengjie Wang

Supervisor: Prof. Guibo Yang

Institute: National Center for AIDS/STD Control and Prevention

Chinese Center for Disease Control and Prevention

Background

Mucosa is known as the main portal for most pathogens including human immunodeficiency virus. The mucosal innate immune system is a natural barrier against mucosal infections and has a broad spectrum of anti-infective effects. As the most important component of the intestinal mucosal barrier, the tight junction of the intestinal epithelium plays an important role in preventing the penetration of pathogenic microorganisms in the intestinal lumen from entering into the mucosal tissue and the circulatory system. Once the tight junction of the intestine is destroyed, it will cause the infiltration of harmful substances and microbial components in the intestinal lumen, which will cause inflammation and disorder of the mucosal system, eventually leading to the activation of the intestinal and even the systemic immune system. Although long-term combined antiretroviral therapies (cART) can inhibit HIV-1 to undetectable levels in the infected individuals, gut barrier damage recovers only partially and low levels of systemic immune activation persist, complicating the discovery of functional cures for HIV/AIDS. Understanding the molecular mechanisms of intestinal tight junction abnormalities in HIV-1 infection is important for the prevention and repair of intestinal barrier damage in HIV/AIDS. It is known that the expression, distribution and regulation of tight junction proteins such as

CLDN1, CLDN3, OCLN and ZO-1 in the intestinal mucosa are abnormal in both HIV-1 and SIV infection. However, the changes of many of the other tight junction proteins which play important roles in the maintenance of barrier function have not been reported. The molecular mechanism of HIV/AIDS-related tight junction abnormalities is unclear.

As major extracellular regulators of tight junction, *IL-17A* and *TNF- α* are abnormally expressed in the intestinal mucosa in HIV-1/SIV infection. The IL-17/IL-17R pathway plays a crucial role in maintaining mucosal immune homeostasis, intestinal mucosal barrier integrity, and the normal composition and function of the gut microbiota. Although the expression of *IL-17A* in intestinal mucosa is correlated with multiple tight junction genes, the changes of other factors of IL-17 family have not been reported in HIV/AIDS. The massive loss of Th17 cells in the intestinal tract of HIV-1/SIV infection, the activation of related inflammatory processes, the generation of microbial translocation and the presence of microbial components may all be important factors leading to abnormal function of the intestinal mucosal barrier. However, the effects of inflammatory factors such as IL-17 and *TNF- α* , microbial translocation, and the combination of these factors on intestinal barrier function are still poorly understood. This study systematically observed changes in the expression of multiple tight junction-associated genes in SHIV/SIV infection and their correlation with IL-17 family cytokine expression; established an in vitro intestinal epithelial cell barrier model to study the effect of IL-17A and IL-17F on HIV-1 gp140-mediated intestinal epithelial barrier injury; investigated the effects of IL-17A/IL-17F on the barrier function of epithelial cells and the expression of tight junction-associated proteins in the presence of the inflammatory factor *TNF- α* and the marker of microbial translocation LPS.

Methods

1. Real-time quantitative RT-PCR was established to detect the mRNA levels of various tight junction-associated genes including *CLDN2*, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 14, 15 in the gut of normal and SHIV/SIV-infected *Macaca mulatta* (animal model for HIV-1

infection), and the mRNA levels of *IL-17A/IL-17F* and its receptors were also detected. Statistical methods were used to analyze the correlation between the mRNA levels of tight junction-associated genes and *IL-17A/IL-17F/IL-17R*.

2. Construction of an in vitro epithelial cells barrier model (Caco-2 cells) using transwell. The barrier function of Caco-2 cells in the presence of HIV-1 gp140 was evaluated by measuring the barrier monolayer transmembrane electrical resistance and FITC-Dextran flux, and the mRNA levels of tight junction-associated genes in the presence of HIV-1 gp140 were detected by Real-time quantitative RT-PCR. Intestinal epithelial barrier function and mRNA levels of tight junction-associated genes induced by IL-17A, IL-17F and HIV-1 gp140 alone or in combination were detected by Real-time quantitative RT-PCR and Western blot.

3. Real-time quantitative RT-PCR and Western blot were used to detect the tight junction-associated gene levels of Caco-2 cells treated with IL-17A, IL-17F and HIV-1 gp140 alone or in combination. Western blot was used to detect the expression of total protein and phosphorylated protein of NF- κ B p65 and MAPK p38 induced by IL-17A and IL-17F. Signaling pathways involved in IL-17A and IL-17F regulation of tight junction-associated gene expression were determined using *Act1* specific siRNA interference and BAY11-7082 (NF- κ B selective inhibitor) and U0126 (MAPK selective inhibitor).

4. Real-time quantitative RT-PCR was used to detect the levels of *TNF- α* mRNA in the intestinal mucosa of normal and SHIV/SIV-infected *Macaca mulatta* and the level of *16S rRNA* gene in mesenteric lymph nodes. Correlations between *TNF- α* mRNA levels and viral load or *IL-17R* mRNA levels were analyzed using statistical methods. Real-time quantitative RT-PCR and Western blot were used to detect the expression levels of IL-17R and tight junction-associated genes and proteins in Caco-2 cells treated with LPS+TNF- α and IL-17A/IL-17F alone and in combination. The level of tight junction protein ZO-1 in the presence of LPS+TNF- α and IL-17A was detected by laser confocal microscopy.

Results

1. The tight junction-associated genes *CLDN5*, *8*, *11*, *12*, *14* mRNA levels in the intestinal mucosa of SHIV/SIV-infected *Macaca mulatta* were significantly lower than those in normal animals. The level of *CLDN5* and *CLDN8* mRNA in the intestinal mucosa of infected animals was half that of normal animals, and the level of *CLDN11*, *12*, *14* mRNA was 0.4 fold that of normal animals. *CLDN4*, *7*, *15* mRNA did not change significantly in the intestinal tract of normal and infected animals. There was a significant positive correlation between *CLDN5*, *8*, *11*, *12*, *14* mRNA levels in infected animals.

2. The *IL-17A* mRNA level in the intestinal mucosa of normal animals was 163 fold higher than that in SHIV/SIV infected animals, and there was a positive correlation between *IL-17A* and *CLDN5*, *11* mRNA in infected animals. The *IL-17F* mRNA in the intestinal mucosa of infected animals was 2.7 fold higher than that in normal animals; *IL-17RA/IL-17RC* mRNA was 5~6 fold higher than that in normal animals. There was a negative correlation between *IL-17F* and *CLDN5*, *8*, *11*, *12*, *14* mRNA levels in infected animals; *IL-17RA* was positively correlated with *CLDN3*, *5*, *8*, *12*, *14* mRNA; *IL-17RC* was positively correlated with *CLDN1*, *2*, *3*, *4*, *7*, *15* mRNA, respectively.

3. The Caco-2 transmembrane resistance decreased by 30-40% after treatment with HIV-1 gp140 for 24 h, and the FITC-Dextran transmittance increased by about 50%, accompanied by tight junction-related genes *CLDN1*, *2*, *3*, *4*, *5*, *7*, *8*, *OCN* and *ZO-1* down-regulated by 2 to 3.5 fold. *IL-17A* and *IL-17F* prevent the damage of intestinal epithelial cell barrier by HIV-1 gp140 by synergistically up-regulating the expression of tight junction proteins such as *CLDN1*, *OCN* and *ZO-1*. When *IL-17A* is absent, *IL-17F* alone has a certain effect on the epithelial barrier function, but it is not significant. When the expression of *Act1* was inhibited by siRNA, *IL-17A* and *IL-17F*-mediated *OCN* and *ZO-1* transcription and protein levels were significantly down-regulated compared with siRNA control. The regulation of tight junction-associated genes by *IL-17A* and *IL-17F* is accompanied by the activation of NF- κ B and MAPK in the downstream signaling pathway of *IL-17R*. NF- κ B selective inhibitor BAY11-7082 inhibited the expression of *CLDN1*, *OCN* and *ZO-1*, while

MAPK kinase MEK1/2 inhibitor U0126 only inhibited the expression of ZO-1.

4. Microbial translocation occurs in the intestinal tract of SHIV/SIV-infected *Macaca mulatta*. The level of *TNF- α* mRNA in the intestine of infected animals is twice that of normal animals. There was a positive correlation between *TNF- α* and viral load, *IL-17RA* and *IL-17RC* mRNA levels in infected animals. LPS+TNF- α in combination with IL-17A/IL-17F promotes the expression of IL-17RA and IL-17RC in Caco-2 cells. HIV-1 gp140 alone can inhibit the expression of IL-17R, however, in the presence of LPS+TNF- α and IL-17A/IL-17F, the combination of HIV-1 gp140 with them can significantly up-regulate the expression of IL-17RA and IL-17RC.

5. LPS+TNF- α slightly up-regulated the expression of *CLDN1*, 2, 3, 4, 7, 11 and *ZO-1* mRNA in Caco-2 cells, but did not affect the expression of *CLDN12*, 14, 15 and *OCN*. In addition, LPS+TNF- α has a certain inhibitory effect on the expression of *CLDN5*, 8 mRNA. In the presence of IL-17A, LPS+TNF- α promoted the intestinal epithelial barrier function and the expression of tight junction proteins CLDN1, CLDN3 and ZO-1 more than the sum of the effects alone. In the presence of IL-17F, LPS+TNF- α was not able to significantly promote intestinal barrier function in the intestinal epithelium. The process by which LPS, TNF- α , and IL-17A synergistically promote the expression of tight junction-associated proteins is accompanied by activation of NF- κ B and MAPK. NF- κ B selective inhibitor BAY11-7082 significantly inhibited the expression of CLDN1, CLDN3 and ZO-1. MAPK kinase MEK1/2 inhibitor U0126 significantly inhibited the expression of CLDN3 and ZO-1, but had no significant effect on the expression of CLDN1.

Conclusion

In the gut of SHIV/SIV-infected *Macaca mulatta*, CLDN5, 8, 11, 12, 14 and other tight junction-associated genes were significantly down-regulated, and HIV-1 gp140 directly disrupted the integrity of the intestinal epithelial cell barrier. The presence of the virus and its protein components may be the direct cause of the destruction of the intestinal barrier function. LPS+TNF- α and IL-17A have a synergistic effect on the promotion of intestinal epithelial barrier function and tight junction protein expression.

Although HIV/AIDS infection is accompanied by the occurrence of intestinal microbial translocation (the presence of LPS) and up-regulation of cytokines such as IL-17F and TNF- α , these factors only have a weak effect on the recovery of intestinal barrier function. Deletion of Th17 cells in the intestinal mucosa and decreased levels of IL-17A may be important causes of barrier function damage and difficulty in repair. These results extend the understanding of the mechanisms of intestinal barrier damage in HIV/AIDS, suggested that additional treatments targeting the loss of Th17 in the gut of HIV-1 infected individuals might facilitate the restoration of gut barriers.

Key words

Intestinal mucosal barrier; Tight junction; IL-17; HIV-1 gp140 protein

英文缩略词

缩写词	英文	中文
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome	获得性免疫缺陷综合症
HIV	Human Immunodeficiency Virus	人类免疫缺陷病毒
SIV	Simian Immunodeficiency Virus	猿猴免疫缺陷病毒
SHIV	Simian/Human Immunodeficiency Virus	人/猴嵌合免疫缺陷病毒
LPS	Lipopolysaccharides	脂多糖
LBP	Lipopolysaccharides Binding Protein	脂多糖结合蛋白
DAPI	4',6-Deamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α	肿瘤坏死因子- α
TGF- β	Transforming Growth Factor- β	转化生长因子- β
Th17	T helper type 17	辅助性 T 细胞 17
IL-17A	Interleukin-17A	白细胞介素 17A
IL-17F	Interleukin-17F	白细胞介素 17F
IL-17R	Interleukin-17 Receptor	白细胞介素 17 受体
PHA	Phytohaemagglutinin	植物血球凝集素
PBS	Phosphate Buffer Saline	磷酸盐缓冲液
NF- κ B	Nuclear Factor κ B	核转录因子 κ B
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase	丝裂原活化蛋白激酶
IFN- γ	Interferon- γ	γ -干扰素
ZO-1	Zonula Occludens-1	紧密连接蛋白 Zonula Occludens-1
CLDN	Claudin	紧密连接蛋白 Claudin
OCLN	Occludin	紧密连接蛋白 Occludin
TAMPs	Tight junction-associated MARVEL proteins	紧密连接相关的用于囊泡运输和膜连接的蛋白
JAM	Junctional Adhesive Molecule	连接粘附分子
Act1	Nuclear Factor κ B Activator 1	核转录因子 κ B 激活剂 1

缩写词	英文	中文
siRNA	Small interfering RNA	小干扰 RNA
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain reaction	逆转录聚合酶链式反应
TRAF-6	Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor-6	肿瘤坏死因子受体相关因子-6
TLR	Toll-Like Receptors	Toll 样受体
CCR5	Chemokine CC motif receptor5	趋化因子 CC 基元受体 5
CXCR4	Chemokine CXC motif receptor 4	趋化因子 CXC 基元受体 4

前言

粘膜是一层内衬于与外界相通的腔体或通道且能够分泌粘液的体表结构,其表面积约为皮肤的 200 倍,是机体最大的组织器官。粘膜主要定位于胃肠道、泌尿生殖道、呼吸道及一些外分泌腺,是包括人类免疫缺陷病毒在内的多种病原体入侵机体的主要门户。研究表明,艾滋病、呼吸道感染类疾病、腹泻、结核及麻疹等疾病皆主要由相应的病原体通过粘膜感染宿主[1, 2]。在 HIV-1 传播过程中,生殖道分泌物及母乳中的病毒粒子可以通过直接感染粘膜上皮细胞、胞吞作用、细胞旁路渗透、朗格汉斯细胞/树突状细胞的捕获等四种途径进入粘膜并与宿主靶细胞接触,建立局部感染,进而将病毒或已感染细胞向机体扩散,最终在宿主体内建立系统性感染[3, 4]。对 HIV-1 感染的病理过程研究发现,感染者的疾病进展与粘膜屏障损伤密切相关[5-7],粘膜损伤所导致的微生物移位进而引起的系统免疫活化是艾滋病疾病进程中的主要推动力[8, 9]。事实上,除了少数病原体是通过动物叮咬、注射、输血等途径入侵外,大部分病原体都通过粘膜途径入侵机体[10]。

胃肠道粘膜作为人体最大的粘膜系统除了消化吸收功能之外,还具有强大的抵御有害微生物及毒素的功能。但其表面上皮细胞巨大的表面积及复杂的隐窝和绒毛结构,也为传染性病原体的定植和入侵提供了便利的条件。在正常生理条件下,肠道具有较为完善的粘膜屏障功能,肠道上皮层作为高度选择性的吸收表面同时也成为微生物入侵时非常有效的隔离带,能够将肠腔内物质与机体内环境隔离开来,防止肠腔内细菌、有毒物质和食物抗原等侵入粘膜组织,维持机体内环境的稳定[11]。肠粘膜屏障一旦受损,肠道中的致病微生物和毒素便可突破屏障进入门静脉和淋巴系统,引起肠道微生物移位,进而发展为全身性炎症反应甚至多器官功能衰竭综合征[12]。

1 肠道粘膜屏障的构成

所有潜在的有害病原微生物都必须克服物理、化学、免疫学防御屏障才能够完成在肠道中定植和感染,同样,宿主必须建立强大的防御系统以抵抗病原复杂的入侵策略。肠道粘膜屏障由包括分泌型抗体、肠相关淋巴组织在内的免疫屏障和包括机械屏障、化学屏障、生物屏障在内的非免疫屏障构成,共同对抗潜在病

原的入侵。

1.1 获得性免疫屏障

免疫屏障由肠相关淋巴组织和弥散免疫细胞组成,肠相关淋巴组织富含淋巴细胞,主要分布于淋巴小结、固有层和肠上皮细胞之间。固有层中的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 淋巴细胞在抗原刺激后产生很弱的增殖过程,但却能大量分泌 $IFN-\gamma$ 、IL-4、IL-5 等细胞因子。上皮内淋巴细胞以 $CD8^+$ T 细胞为主,分泌 IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-10、 $IFN-\alpha$ 和 $IFN-\gamma$ 等细胞因子或产生不同的细胞毒作用,对抗致病原并促进粘膜损伤的愈合[13]。Peyer 淋巴结 (Peyer's Patches) 是淋巴细胞发生初始免疫应答的主要场所之一,是免疫应答的诱导和活化部位,它能够调节并启动粘膜的 IgA 免疫,参与免疫排斥反应,增加细胞毒性 T 细胞的数量[14]。上皮细胞中存在的微皱褶细胞 (M 细胞) 能够摄取抗原并将抗原转移给抗原递呈细胞。肠巨噬细胞也具有抗原呈递和吞噬灭菌的功能。此外,分泌型 IgA (Secretory IgA, SIgA) 作为胃肠道粘膜表面主要免疫效应分子,是防御病菌在肠道粘膜粘附和定植的第一道防线,它能够防止细菌粘附,与补体、溶酶体协同杀灭病菌,并促进含 Fc 受体的细胞的吞噬功能,对胃肠道粘膜防御起重要作用[15]。

1.2 固有免疫屏障

机械屏障由肠粘膜表面黏液层、肠道粘膜上皮细胞及细胞间紧密连接等组成,其中肠上皮细胞主要包括吸收细胞、杯状细胞和潘氏细胞。上皮细胞的质膜近肠腔侧的侧表面与相邻的细胞形成紧密连接复合体,只允许水分子和水溶性小分子物质有选择性的通过。杯状细胞能够与病原微生物竞争抑制肠道粘膜上皮的黏附素受体,从而抑制病原微生物在肠道的粘附定植,预防小肠细菌过度增生和肠源性感染,此外,杯状细胞所分泌的粘液糖蛋白能够阻止消化酶和有害物质对消化道上皮细胞的损害。潘氏细胞对细菌具有一定的吞噬能力,其分泌的溶菌酶、天然抗生素肽及防御素在抑制肠道微生物移位和防止肠源性感染中发挥重要作用[16]。

胃肠道分泌的胃酸、胆汁、消化酶、粘多糖、溶菌酶和抗菌肽等构成了肠道的化学屏障。胃酸能够抑制细菌在胃肠道上皮的粘附和定植;胆汁中的胆汁酸盐可与内毒素结合形成复合物从而阻止其吸收;肠道分泌的大量消化液可稀释毒素,冲洗清洁肠腔,使潜在的肠道致病菌难以粘附到肠上皮;溶菌酶能够通过破坏细

菌细胞壁使细菌裂解；粘液中的补体成分可增强溶菌酶和免疫球蛋白的抗菌作用[17]。

肠道是人体最大的细菌库，寄居的微生物数量为 $10^{13} \sim 10^{14}$ 个，其中 99% 左右为专性厌氧菌。肠道内数量、分布相对恒定的常驻菌群形成了一个相互依赖又相互作用的微生态系统，即肠道的生物屏障[18]。专性厌氧菌通过粘附作用与肠上皮紧密结合，被糖衣包被并形成菌膜群，可竞争性抑制肠道中致病菌与肠上皮的结合，从而抑制致病菌在肠道的定植和生长，同时，专性厌氧菌还能够分泌醋酸、乳酸和短链脂肪酸等，降低肠道 pH 值并与致病菌竞争利用营养物质，从而抑制致病菌的生长。需氧菌和兼性厌氧菌游离于肠腔内，形成菌腔群。肠道菌群之间保持着稳定的比例，构成一个相互作用、相互依赖的微生态系统。肠道的生物屏障能够拮抗致病菌，减少肠道内某些有毒物质对肠粘膜的损害，此外，肠道微生物能够激活肠道免疫系统活性，增加 SIgA 和 IgM 的分泌，产生抑菌肽抑制外来菌的生长[19]。

2 肠道上皮紧密连接结构

上皮细胞之间的连接是维持上皮组织结构和功能的重要基础，其连接方式主要包括紧密连接、粘附连接、缝隙连接和桥粒连接。对肠道粘膜上皮而言，细胞间最主要的连接方式即为紧密连接[20]。肠粘膜上皮屏障是选择性渗透的，肠上皮细胞间的紧密连接结构是维持屏障机械结构完整性和肠粘膜正常功能的基础，是肠粘膜屏障最重要的组成成分。该结构是由连接相邻细胞并封闭细胞间间隙的分子构成的胞间屏障结构，广泛存在于上皮细胞之间，呈箍状环绕细胞[21]。紧密连接结构除了具有机械连接作用外，更重要的是对细胞顶部和间隙的封闭作用，防止细胞外的分子在细胞底面与基面和侧面自由扩散。

2.1 紧密连接结构的组成

紧密连接是多种分子形成的结构和功能的复合体[22, 23]，主要包括跨膜蛋白以及胞质内蛋白等。根据分子结构不同跨膜蛋白可分为单跨膜区蛋白（JAM、Crb3、CAR）、三跨膜区蛋白（Bves）以及含有 CLDN 和 TAMP 家族的四跨膜区蛋白（CLDNs、OCLN、tricellulin、MarvelD3），胞质内蛋白包括 ZO-1、ZO-2、ZO-3、7H6、rab13、rab3B、cingulin、symplekin、AF-6 等[24, 25]。

CLDN 蛋白是紧密连接的主要骨架蛋白，其分布具有种属和组织特异性，

CLDN13 表达于啮齿类动物但不表达于灵长类动物, 肠道中可表达多种 CLDN 蛋白 (CLDN1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 14, 15), 而 CLDN9 则选择性的表达于耳蜗内[26, 27]。人类 CLDN 蛋白多达 27 种, 每个 CLDN 蛋白由 207-305 个氨基酸残基组成, 氨基和羧基末端均存在于细胞内部[22]。CLDN 具有四个跨膜结构域, 形成两个长度不等的胞外环结构, 不同 CLDN 分子胞外环的氨基酸序列具有高度的保守性。CLDN 可直接与胞质内蛋白 (ZO-1、ZO-2、ZO-3)、膜相关蛋白的鸟苷酸激酶同工酶及富含 PDZ (Post-synaptic density protein-95、Discs large、Zonula Occludens-1) 结构域的蛋白相互作用, 并间接同 AF-6 和菌环蛋白作用, 维持栅栏和屏障功能[21, 28]。

紧密连接中另一个重要的组成蛋白是 ZO-1, 该蛋白属于膜连接鸟苷酸激酶蛋白家族, 此家族成员多位于胞间连接处并通过胞外信号转导途径与细胞骨架相互作用。自 1986 年首次发现该蛋白以来, 其结构和功能一直备受关注。ZO-1 广泛表达于所有脊椎动物的紧密连接结构, 它与同源体 ZO-2 和 ZO-3 一起搭建具有连接作用的脚手架样平台, 不仅能够参与调节细胞内物质的转运, 维持上皮极性[29], 而且在细胞的增殖和分化以及肿瘤细胞的转移中都发挥了重要作用。

2.2 紧密连接的功能

柱状上皮细胞顶端的紧密连接结构, 可以封闭细胞间隙, 使相邻细胞间紧密贴合并将细胞间隙与肠腔分隔。肠道上皮紧密连接形成细胞旁选择性渗透屏障, 既能够阻止有害物质或病原性抗原进入机体, 同时又调节大分子物质和离子的细胞旁转运, 允许离子、溶质分子等通过细胞间隙自由进入, 调控细胞形成独特的化学梯度和电渗透梯度维持机体的内稳态[30]。在病理状态下, 紧密连接蛋白能够收缩并向胞质中移动, 细胞间孔隙增大, 从而导致毒素、大分子物质及细菌移位, 使肠黏膜屏障丧失其选择性渗透功能。肠道细胞上皮顶侧和基侧膜的蛋白质和脂质的构成存在差异, 与基侧膜的结构不同, 顶侧膜的磷脂成分相对缺乏, 但富含鞘糖脂和胆固醇, 鞘糖脂可通过分子间的 H 键相互连接, 从而维持肠黏膜的硬度和不可通透性, 保护机体免受有害物质的入侵[31]。紧密连接结构中 CLDNs 和 OCLN 等跨膜蛋白的存在限制了以紧密连接为界的上皮细胞顶侧和基侧膜上脂质的自由流动, 体现了紧密连接的栅栏功能[32]。

除此之外, 紧密连接结构在维持细胞极性中也发挥着重要作用。细胞极性主

要由胞内脂质的变化决定,是上皮细胞的重要特性之一,细胞极性与紧密连接结构的变化呈现同时相性[33]。紧密连接结构将细胞分为两个完全不同的液性空间,即顶部的脂质区和基底部的蛋白成分区,保证了不同的受体和转运体等膜分子被定位在各自的局限功能区域[34],从而维持细胞极性。此外,紧密连接还能够参与细胞增殖的调控[35]。

2.3 紧密连接的调控

紧密连接相关蛋白通过复杂的相互作用形成一个处于动态变化中的结构和功能复合体。相邻细胞的跨膜蛋白分子通过胞外区的特殊结构相互作用形成选择透过性屏障,跨膜蛋白的胞质区通过胞质内连接蛋白与细胞骨架相连形成功能完整的结构。紧密连接相关基因的表达及紧密连接蛋白的组装受多种分子的精密调控,包括多种基因在转录水平,转录后及蛋白水平的调控。

紧密连接基因表达的主要调控因子及通路包括 $\text{TNF-}\alpha/\text{NF-}\kappa\text{B}$ 和 $\text{TGF-}\beta\text{-Smad/Snail}$ 通路, $\text{PPAR}\lambda$ 、 SP1 、 $\text{HNF-1}\alpha$ 、 $\text{HNF-4}\alpha$ 、 CDX1 、 CDX2 、 GATA-4 和 Grh12 等分子也参与了 *CLDN* 转录水平的调控。有报道指出, RNA 结合蛋白 (HuR、CUGBP1、TIAR) 和 miRNA (miR-9、miR-122 和 miR-212 等) 参与了紧密连接蛋白基因的转录后调节[36-38]。紧密连接相关基因翻译后的调控主要涉及蛋白质的磷酸化、棕榈酰化、糖基化及泛素化[22, 39, 40]。紧密连接蛋白的磷酸化在紧密连接结构的组装和屏障功能的维持中具有重要的调节作用[41, 42]。在 *CLDN* 和 *OCLN* 等紧密连接相关蛋白分子中存在包括 PKC、PKA、MAPK、WNK、MLCK、RhoK 和酪氨酸激酶等的磷酸化位点。已知 *CLDN1* 含有丝氨酸和酪氨酸磷酸化位点[43, 44], *CLDN3*[45]、*CLDN4*[46]、*CLDN5*[47]的磷酸化位点也有报道。

紧密连接也可以受到多种胞外因素的调控,包括细胞因子、生长因子、病原微生物及其产物、食物成分等。目前已知的能够提高肠道上皮紧密连接通透性的细胞因子和生长因子有 $\text{IFN-}\gamma$ 、 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-4 、 IL-6 和 IL-13 等,能够降低肠道紧密连接通透性或恢复损伤的细胞因子和生长因子包括 IL-10 、 IL-17 、 $\text{TGF-}\beta$ 和 EGF 等,这些细胞因子可以通过影响紧密连接蛋白的表达和分布等影响紧密连接的功能[48-51]。影响紧密连接的病原体较多,包括霍乱弧菌,肠致病性大肠杆菌,肠出血性大肠杆菌、产气荚膜梭菌等[52, 53]。氨基酸、多肽、维

生素和益生菌等营养物质也可以影响紧密连接的结构和功能[54, 55]。

2.4 与紧密连接异常有关的疾病

人类多种肠道性疾病的发生与紧密连接的功能异常有关, 肠上皮细胞紧密连接的变异、减少、缺失导致细胞间隙通透性增加, 细菌、毒素、大分子物质便可通过紧密连接进入机体循环, 导致疾病的产生, 如克罗恩病[56, 57]、溃疡性结肠炎[58]、微观结肠炎[59]等炎症性肠病以及肠道易激综合征[60]、乳糜泻[61]等小肠疾病。另外, 在自身免疫性I型糖尿病[62]、多发性硬化[63]、类风湿性关节炎[64]等自身免疫性疾病中紧密连接也发生了明显的异常。在这些疾病的进程中, 由于紧密连接异常导致的肠道屏障功能缺陷, 致使肠道内的抗原物质更容易进入机体而刺激具有特定遗传背景的个体的免疫系统, 产生针对自身器官或组织的免疫应答反应。不仅如此, 紧密连接异常还与肿瘤发生、感染和变态反应等多种人类疾病密切相关[65, 66], 例如 *CLDN1, 3, 4* 在肠型胃癌和大肠癌中高表达[67, 68], 而在原发性乳腺癌中 *CLDN1* 和 *CLDN7* 的表达显著降低[69]。由于 CLDN 蛋白表达的组织特异性, 使其有望应用于乳腺癌、卵巢癌、肠型胃癌及大肠癌的早期诊断及鉴别。

3 紧密连接与 AIDS

肠道上皮损伤和紧密连接异常是艾滋病患者中存在的普遍现象[70]。早在艾滋病发现后不久, 就有学者观察到 AIDS 患者的肠道粘膜通透性发生了明显异常[71-73]。腹泻是 HIV-1 感染者最为明显的肠道症状之一, 多达 40% 的感染者体内并没有可明确鉴定的致腹泻病原, 其产生可能与肠道上皮屏障功能缺陷有关[74, 75]。尽管关于感染者肠粘膜屏障损伤的早期报道主要是针对 HIV-1 感染的慢性期, 但体外研究和动物模型研究表明, 紧密连接异常可能发生在 HIV-1 感染的早期[76, 77]。研究表明, SIV 可在感染后 3 天内可引起紧密连接异常[78], SHIV/SIV 感染早期恒河猴体内 *CLDN1*、*OCLN*、*ZO-1* 等紧密连接相关基因转录水平发生下调[79], 这在很大程度上表明 HIV-1 感染者中可能存在与 SHIV/SIV 感染类似的情况, 也就是说, 在 HIV-1 感染的早期就已经出现了紧密连接的损伤, 微生物及其产物通过受损的粘膜进入机体刺激免疫系统引起免疫系统活化可能是贯穿 HIV-1 感染始终的病理机制。

体外研究发现, HIV-1 gp120、Tat、Nef 等多种 HIV-1 蛋白能够影响脑血管

内皮细胞紧密连接相关基因的表达和分布[80]。HIV-1 导致血脑屏障中 *ZO-1*、*CLDN5* 和 *OCLN* 表达下调，该过程伴随 JAK/STAT 信号通路中 STAT1 的激活以及 Rho 激酶的磷酸化[81]。HIV-1 gp120 蛋白能够通过增强基质金属蛋白酶-2 和 -9 (MMP2/MMP9) 的表达使黏连蛋白和 *CLDN5* 表达显著下调[82]。HIV-1 Tat 蛋白通过活化 ERK1/2 介导紧密连接蛋白 ZO-1 完整性的破坏以及炎性细胞的渗透[83]。此外，HIV-1、HIV-1 gp120 及 Tat 蛋白均能够介导血-视网膜屏障产生损伤[84-86]。在口腔上皮的研究中人们也发现 HIV-1 gp120 通过与 CCR5 和 CXCR4 受体的结合介导 ERK1/2 的磷酸化，从而引起紧密连接的变化[87]。在生殖道上皮与 HIV-1 相互作用的研究中发现，HIV-1 gp120 可通过 TLR2 和 TLR4 活化 NF- κ B 信号通路诱导细胞因子表达和上皮通透性改变[88]。

综上所述，紧密连接在肠道上皮屏障功能的维持中发挥了不可替代的作用。目前对紧密连接的结构和功能的研究已取得很大进展，随着紧密连接蛋白功能的深入挖掘，紧密连接在多种疾病中的变化及机制也备受关注。对 AIDS 而言，尽管目前已经有充分的证据证明 HIV-1 感染能够引起肠道紧密连接相关蛋白表达和调控的异常，但对 HIV-1 引起紧密连接相关基因表达发生变化的分子机制仍知之甚少。尽管目前已有研究在血管内皮细胞、口腔上皮细胞及生殖道上皮中阐述了 HIV-1 及其蛋白影响紧密连接蛋白表达和分布的部分机制，但由于肠道上皮细胞与其它上皮表达紧密连接蛋白类型的差异以及肠道上皮与其它上皮截然不同的微环境，因此，有必要对 HIV-1 致肠道上皮紧密连接蛋白表达异常的分子机制进行深入研究。本研究对 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道组织中紧密连接相关基因的表达变化进行了探讨，并建立体外细胞模型对 HIV-1 致肠道上皮紧密连接蛋白表达异常的潜在分子基础进行了探讨，本研究不仅可以获得 HIV-1 致病机制的新知识，而且可以为 HIV/AIDS 防治靶点的获得提供一定的理论支持。

第一部分 SHIV/SIV 感染后恒河猴肠道紧密连接基因表达的变化及其与 *IL-17A*、*IL-17F*、*IL-17R* 表达的相关性

第一节 引言

在艾滋病中,肠道免疫紊乱及肠道屏障破坏是主要的病理变化,肠道屏障的一个关键成分是上皮细胞间的紧密连接结构。紧密连接由跨膜蛋白和胞内衔接蛋白组成,包括 CLDN、OCLN、连接粘附分子以及细胞内支架蛋白(ZOs) [25, 89, 90]。CLDN 的分布具有种属和组织特异性,*CLDN6* 和 *CLDN9* 表达于肝脏、PBMC 及肝癌细胞系中[27, 91], *CLDN10* 主要表达于肾脏和汗腺中[92, 93], *CLDN13* 则在鼠科动物各组织中广泛表达[94]。在灵长类动物的肠道组织中具有多种 CLDN 基因(*CLDN1*, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 14, 15 等)的表达,这些紧密连接蛋白在肠道中共同表达并相互作用,共同参与肠道屏障功能的维持。*CLDN* 的表达和分布在多种肠道疾病中发生改变,导致水分和电解质运输的严重失调。溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)患者肠道跨膜电阻值仅为正常人的 20%,伴随着 *CLDN1* 和 *CLDN2* 表达的异常[58, 95];克罗恩病(Crohn's disease, CD)中, *CLDN1*, 2, 3, 4, 5, 8 等紧密连接蛋白均表达异常[96];微观结肠炎(collagenous colitis, CC)中屏障功能受损伴随着 *CLDN4*, 5, 8 表达下调,肠道跨膜电阻值下降且钠离子通过离子通道的运输功能受限[97, 98]。但艾滋病中紧密连接相关基因的表达仍缺乏系统和深入的研究。

研究表明,在 HIV-1/SIV 感染中,肠道上皮紧密连接相关基因表达受多种因素的共同调控,Th17 细胞通过诱导紧密连接相关基因的表达促进上皮细胞的再生可能是肠粘膜屏障功能修复的机制之一[99]。此外,Th17 细胞还能够刺激抗菌蛋白和肽的生产[100],并通过 IL-17 的表达调节紧密连接蛋白的合成[50]。在非疾病状态下,Th17 细胞大量存在于粘膜部位并对微生物病原体产生快速反应,在维持机体与共生微生物的免疫内稳态、防止病原体通过粘膜屏障入侵中发挥作用。在 HIV-1 和 SIV 的急性和慢性感染过程中外周血和粘膜部位的 Th17 细胞大量损耗[101, 102],肠道 Th17 细胞被选择性清除,肠粘膜 *IL-17A* 表达下调

[103-107], 一方面, 受损的 Th17 细胞分泌 IL-17 和 IL-22 等促炎性细胞因子的能力降低[108]; 另一方面, Th17 消耗导致中性粒细胞数量和活性降低, 可能导致机体在控制微生物的传播和扩散中存在缺陷。这在很大程度上提示我们 IL-17A 的耗竭可能与 HIV/AIDS 的发病机制及粘膜屏障的损伤存在联系。然而, IL-17 通路其它成员在 HIV-1 感染中的表达是否发生变化及是否参与 HIV/AIDS 的发病机制目前还尚不清楚。虽然 HIV-1 感染伴随着肠粘膜中 IL-17A 水平降低, 但这可能不是 IL-17 系统的唯一改变, 有必要对 IL-17 家族其它成员的表达变化及其与紧密连接之间的关系进行探讨。

IL-17R 是表达在白介素 17 家族细胞因子的靶细胞表面的一种跨膜分子, 由 IL-17RA、B、C、D、E 五个成员构成, IL-17RA 是最先被发现的哺乳动物白介素 17A 和 F 的受体, 与 IL-17RC 以复合体的形式介导细胞对 IL-17A 和 IL-17F 的应答[109, 110]。IL-17R 信号通路活化后可刺激抗菌肽、促炎性细胞因子和趋化因子的产生, 介导中性粒细胞向感染或炎症部位募集, 在机体自身免疫疾病、宿主防御中起重要作用[111, 112]。在肠道粘膜中, IL-17/IL-17R 通路在维持粘膜免疫稳态、肠粘膜屏障完整性以及肠道微生物群的正常组成和功能中发挥至关重要的作用[113-115]。研究表明, IL-17R 与多发性硬化症、银屑病和系统性红斑狼疮等多种疾病状态有关[116-118], 在系统性硬化成纤维细胞中, *IL-17RA* 的表达下调[119], 在肺脏移植中, IL-17RA 的多态性与原发性移植物功能障碍有关[120], 此外, IL-17RA 与流感病毒感染的免疫机制有关[121]。由于 IL-17R 在人类健康和疾病中的重要作用, 以 IL-17 通路为靶点的治疗方法已应用于临床并显示出良好的治疗效果[122]。

SIV 感染后 3 天内可引起紧密连接异常[78]。本研究组已经对 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中 *CLDN1*、*CLDN3*、*ZO-1* 和 *OCLN* 等紧密连接基因的变化进行了探讨, 发现 SHIV/SIV 感染导致这些紧密连接蛋白在肠道内发生不同程度的破坏。但 SHIV/SIV 感染对 *CLDN4*, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 14, 15 等在屏障维持中发挥重要作用的紧密连接蛋白表达的影响尚不明确。IL-17 受体通路在肠道粘膜屏障完整性的维持中发挥重要作用[111, 123, 124]。但 HIV-1/SIV 感染中肠道 *IL-17R* 表达的变化及其与紧密连接蛋白表达的关系仍知之甚少。为了验证 HIV/AIDS 病理过程中不仅仅有 IL-17A 的参与, 本研究建立实时荧光定量

RT-PCR 的方法检测了 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中 *IL-17A*、*IL-17F*、*IL-17RA* 和 *IL-17RC* 表达的变化。为了探讨 SHIV/SIV 感染中 IL-17 家族成员与肠道屏障功能异常之间的联系，本研究对紧密连接相关基因与 *IL-17A*、*IL-17F* 及 *IL-17R* 分布的相关性进行了分析。

第二节 材料和方法

1 实验材料及试剂

1.1 主要仪器设备

- (1) NUAIRE Class II 生物安全柜 (Techcomp, USA)
- (2) ABI 7500 Real time PCR 仪 (ABI, USA)
- (3) 46K 离心机 (ROTANTA, USA)
- (4) Trobot 基因扩增仪 (Biometra, Germany)
- (5) Nanodrop 2000 微量紫外分光光度计 (Thermo Fisher, USA)
- (6) Bio-Rad PowerPacn HC 高电流电泳仪 (Bio-Rad, USA)
- (7) HPX-9082 数显电热培养箱 (上海博讯实业有限公司医疗设备厂)
- (8) DHZ-CA 大容量恒温振荡器 (太仓市实验设备厂)

1.2 动物组织样品

为研究 HIV-1 感染所致体内变化, 本文使用了 HIV-1 感染动物模型 (SHIV/SIV 感染恒河猴) 样本, 所使用的所有中国恒河猴组织均为实验室保存样品, 动物年龄为 4~5 周岁, 感染组 5 只动物攻毒过程如下: 第一次使用 SHIV-SF162p4 进行直肠攻毒, 第二次使用 SHIV-SF162p4 进行静脉注射法攻毒, 第三次使用 SIVmac251 进行静脉注射法攻毒, 在第三次攻毒后第 273 天至第 306 天对动物进行安乐处死并采集组织样品, 其它病毒学与免疫学背景数据见本研究组之前的报道[125-127]。对照组动物组织源于 5 只正常中国恒河猴。

1.3 主要试剂

质粒小量提取试剂盒 (E.Z.N.A.Plasmid Miniprep Kit I) 购自美国 Omega; 凝胶回收试剂盒 (QIAquick Gel Extraction Kit) 购自德国 Qiagen; 体外转录试剂盒 (RiboMAX large scale RNA Production Systems-SP6/T7) 购自美国 Promega; 动物组织 RNA 提取试剂盒 (RNAprep Pure Tissue Kit) 购自天根生物科技有限公司; RT-PCR 试剂盒 (One Step RNA PCR Kit)、Real time RT-PCR 检测试剂盒 (One Step PrimeScript RT-PCR Kit and One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit) 购自日本 TaKaRa。

1.4 主要溶液及配制

- (1) 0.1 M 磷酸盐缓冲液: NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄·12H₂O 3.58 g,

KH_2PO_4 0.24 g, 加入 800 mL 去离子水充分溶解后定容至 1 L, 调 PH 至 7.4, 高压蒸汽灭菌后 4℃ 保存备用。

(2) 50×TAE 电泳缓冲液: Tris-Base 242.0 g, $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 37.2 g, 冰乙酸 57.1 mL, 加入 800 mL 去离子水充分溶解后定容至 1 L 并调 PH 值至 8.3 备用。

(3) LB 培养基: Yeast Extract 5.0 g, NaCl 10.0 g, Typtone 10.0 g, Agar 15.0 g (固体培养基), 加入去离子水定容至 1 L, 调 PH 至 7.0, 高压蒸汽灭菌后 4℃ 保存备用。

1.5 主要生物学软件

(1) 引物及探针设计软件: OLIGO 6.0; Primer Express 3.0。

(2) 序列分析软件: DNASTar; DNAMAN。

(3) 数据统计学分析及作图软件: Graphpad Prism 5.0; Adobe Photoshop CS4。

2 实验方法

2.1 动物组织中的总 RNA 提取

根据 RNAPrep Pure Tissue Kit 说明书提取动物组织中的总 RNA。

- (1) 称量 10~20 mg 组织样品于 RNase Free 离心管中, 加入 300 μL 裂解液 RL 并充分研磨。
- (2) 向组织匀浆液中加入 10 μL 蛋白酶 K 和 590 μL RNase Free ddH₂O, 充分混匀后置于 56℃ 孵育 10~20 min。
- (3) 12000 rpm 4℃ 离心 5 min, 取上清于新 RNase Free 离心管中并加入 0.5 倍体积无水乙醇充分混匀, 转移液体混合物至吸附柱 CR3 中, 12000 rpm 4℃ 离心 1min, 弃废液。
- (4) 向 CR3 中加入 350 μL 去蛋白液 RW1, 12000 rpm 4℃ 离心 1 min, 弃废液。
- (5) 向 CR3 中央加入 80 μL DNase I 工作液, 室温放置 15 min。
- (6) 重复步骤 (4)。
- (7) 用 500 μL 漂洗液 RW 将 CR3 重复漂洗两次, 12000 rpm 4℃ 离心 1 min, 弃废液。
- (8) 12000 rpm 4℃ 离心 2 min, 弃废液, 静置数分钟彻底晾干 CR3 中残留的漂洗液。

(9) 将 CR3 转移至新 RNase Free 离心管中,向吸附膜中央滴加 30~50 μ L RNase Free ddH₂O, 室温静置 2 min, 12000 rpm 4℃离心 2 min, 将 RNA 溶液分装后置于-80℃保存备用。

2.2 基因标准品的构建

2.2.1 RT-PCR 扩增

以动物组织总 RNA 为模板, 用一步法 RT-PCR 试剂盒进行基因目的片段扩增, 扩增程序如下:

50℃, 30 min

94℃, 5 min

94℃, 45 s

55~57℃, 45 s

72℃, 90 s

} 35 cycles

72℃, 15 min

扩增引物序列见表 1.1, 扩增体系如下:

试剂	用量
10×One Step RNA PCR Buffer	5.0 μ L
MgCl ₂ (25 mM)	10.0 μ L
dNTP Mixture (各 10 mM)	5.0 μ L
RNase Inhibitor (40 U/ μ L)	1.0 μ L
AMV RTase XL (5 U/ μ L)	1.0 μ L
上游引物 (10 μ M)	2.0 μ L
下游引物 (10 μ M)	2.0 μ L
RNA 模板	5.0 μ L
RNase Free ddH ₂ O	18.0 μ L

表 1.1 RT-PCR 引物序列及参考基因

Table 1.1 The primer sequences and reference genes for RT-PCR

Primer name	Sequence 5'-3'	Reference genes
CLDN2 primer F	GAG CAG TCC CTG AAG ACG CTT CT	NM_020384.3; XM_015127960.1

<i>CLDN2</i> primer R	GGT TGG GCT TGG TAG GCA T	
<i>CLDN4</i> primer F	AGG CCA AGA CCA TGA TCG TG	NM_001305.4; NM_001194564.2
<i>CLDN4</i> primer R	ACC ACA CCC TGT CAC TTC CGT	
<i>CLDN5</i> primer F	CAG TGC ACC ACC TGC GTG GC	NM_001130861.1; XM_015149709.1
<i>CLDN5</i> primer R	AGC GCC CTC AGA CGT AGT TCT	
<i>CLDN7</i> primer F	ACT GGA GGG GTC GAT TTG TG	NM_001307.5; XM_001107265.3
<i>CLDN7</i> primer R	GCC ATA CCA GGA GCA AGC TA	
<i>CLDN8</i> primer F	CTA TCT GGC CAG AAG TAG CAA	NM_199328.2; NM_001194152.1
<i>CLDN8</i> primer R	GTC AGC AGA ATG TGA GCC T	
<i>CLDN11</i> primer F	ATC CTC TGC TGC GCT GGA GAT	NM_005602.5; NM_001260553.2
<i>CLDN11</i> primer R	TGG GCA TTA TCT GAG CTA GAG	
<i>CLDN12</i> primer F	CAC AAG CTT GCC TGC CAT	NM_001185072.2; NM_001194860.1
<i>CLDN12</i> primer R	TTG ATG TTG GGC ACC GAG	
<i>CLDN14</i> primer F	TCA TCG GGA TGA AGT GCA CG	NM_144492.2; XM_015132884.1
<i>CLDN14</i> primer R	CCA CTG ACC AAA CTC CCA	
<i>CLDN15</i> primer F	GCA CTC ATG ATC ACC GCC ATC	NM_001185080.1; XM_015134531.1
<i>CLDN15</i> primer R	TGC GAC TTC CCA AGA GCA GT	
<i>IL-17A</i> primer F	AAG GCA GGA ATA GCA ATC	U32659.1; XM_001106391.3
<i>IL-17A</i> primer R	CAC GGA CAC CAG TAT CTT	
<i>IL-17F</i> primer F	CAA CAT GAC AGT GAA GAC CCT	NM_052872.3; NM_001261287.1
<i>IL-17F</i> primer R	AAC AGA GCA GCC TTG GTG CTT	
<i>IL-17RA</i> primer F	CTC CCA GCC GGG GCT AAA CTG	NM_014339.6; XM_001102483.3
<i>IL-17RA</i> primer R	AGG AAA TTC TTG GAC TGG TGG	
<i>IL-17RC</i> primer F	TAG AAG ATG CCT GTG CCC TGG TT	NM_153460.3; XM_015130278.1
<i>IL-17RC</i> primer R	AGG CAG CTG CTG TGT GAG GTT GA	
<i>GAPDH</i> primer F	CCA CCC ATG GCA AAT TCC ATG GCA	DQ894744.1; NM_001195426.1
<i>GAPDH</i> primer R	TCT AGA CGG CAG GTC AGG TCC ACC	

2.2.2 RT-PCR 产物回收及克隆

- (1) 对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 收集目的位置的凝胶, 称重后置于 1.5 mL EP 管中, 加入适量溶胶液 QG 并置于 50℃ 水浴中充分溶解凝胶。
- (2) 将溶解好的凝胶转移至 QIAquick 回收柱中, 8000 rpm 离心 1 min 并弃废液。
- (3) 向回收柱中加入 500 μ L 溶胶液, 8000 rpm 离心 1 min 并弃废液。
- (4) 向回收柱中加入 750 μ L Buffer PE, 室温静置 5 min, 8000 rpm 离心 1 min 并弃废液。
- (5) 12000 rpm 离心 2 min 去除吸附柱中的残存液体, 将吸附柱置于新的离心管中, 加入 50~80 μ L 预热的蒸馏水, 室温静置 2 min, 8000 rpm 离心 1 min 收集回收产物。
- (6) 对回收产物进行琼脂糖凝胶电泳, 鉴定浓度及纯度。
- (7) 回收产物与 pGEM[®]-T 载体连接, 连接体系如下: DNA 模板 3.5 μ L, pGEM[®]-T Easy Vector 0.5 μ L, 2 $\times$ Rapid Ligation Buffer 5 μ L, T4 DNA Ligase 1 μ L, 混匀后置于 4℃ 孵育过夜。

2.2.3 质粒重组及转化

- (1) 从-70℃ 超低温冰柜中取出 DH5 α 感受态细胞于冰上融化, 加入连接产物轻柔混匀, 冰上孵育 30 min。
- (2) 插入 42℃ 水浴中热休克 60~90 s, 迅速放回冰中, 静置 3~5 min。
- (3) 在超净工作台中向上述管内加入 1 mL 不含抗菌素的 LB 液体培养基, 轻轻混匀并置于 37℃ 摇床中震荡培养 1 h。
- (4) 取上述转化混合液 200 μ L 滴加到含合适抗菌素的 LB 固体培养皿中, 用无菌玻璃棒涂布均匀, 37℃ 过夜培养。

2.2.4 提取质粒

- (1) 挑取单一菌落于 LB 液体培养基中, 37℃ 震荡培养 12 h。
- (2) 取 1.5~5 mL 菌液于离心管中, 10000 rcf 室温离心 1 min, 弃上清液。
- (3) 向细菌中加入 250 μ L Solution I, 漩涡震荡使细菌重悬。
- (4) 加入 250 μ L Solution II, 轻柔混匀数次, 室温静置 2 min。
- (5) 加入 350 μ L Solution III, 颠倒离心管数次直至产生白色絮状沉淀, 10000 rcf 室温离心 10 min。

- (6) 吸取上清至回收柱中, 10000 rcf 室温离心 1 min, 弃废液。
- (7) 加 500 μL Buffer HB 于回收柱中, 10000 rcf 室温离心 1 min, 弃废液。
- (8) 加 700 μL Wash Buffer 于回收柱中重复清洗两次, 10000 rcf 室温离心 1 min, 弃废液。
- (9) 13000 rcf 室温离心 2 min 甩干回收柱中的液体。
- (10) 向回收柱中央加入 30~50 μL Elution Buffer, 室温静置 1~2 min, 13000 rcf 离心 2 min 收集 DNA 产物。

2.2.5 质粒测序

对测序质粒进行序列分析, 保存测序正确的质粒。

2.2.6 质粒的线性化

用 NcoI 限制性内切酶对质粒进行酶切, 酶切体系如下: 质粒 DNA 30 μL , NcoI 1 μL , 10 $\times$ BufferIII 5 μL , 10 $\times$ BSA 0.5 μL , RNase Free ddH₂O 13.5 μL 。取 5 μL 酶切产物进行琼脂糖凝胶电泳, 鉴定质粒的线性化是否成功, 未酶切的样品作为阴性对照。按 2.2.2 步骤对线性化质粒进行回收。

2.2.7 体外转录

按照 RiboMAXTM Large Scale RNA Production System-SP6 试剂盒说明书对线性化质粒进行体外转录, 反应体系如下: 线性 DNA 模板 50 μL , SP6 Transcription 5 $\times$ Buffer 20 μL , Enzyme Mix 10 μL , rNTPs 20 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 2~4 h, 向转录产物中加入 2 μL RQ1 RNase-Free DNA 酶消化残存的 DNA。

2.2.8 RNA 样品的纯化

按照 RNeasy Mini Kit 试剂盒说明书对 RNA 样品进行纯化。

- (1) 向体外转录产物中加入 350 μL Buffer RLT, 轻柔混匀后加入 250 μL 无水乙醇。
- (2) 将液体缓慢加入 RNeasy 柱中, 12000 rpm 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 1 min, 弃废液。
- (3) 向 RNeasy 柱中加入 350 μL 去蛋白液 RW1, 12000 rpm 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 1 min, 弃废液。
- (4) 向 RNeasy 柱中央加入 80 μL DNase I 工作液, 室温放置 15 min。
- (5) 重复操作步骤 (3)。
- (6) 用 500 μL Buffer RPE 将 RNeasy 柱重复漂洗两次, 12000 rpm 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 1

- min，弃废液。
- (7) 12000 rpm 4℃离心 2 min，弃废液，静置数分钟使 RNeasy 柱彻底晾干。
- (8) 将 RNeasy 柱转移至新 RNase Free 离心管中，向吸附膜中央滴加 30~50 μL RNase Free ddH₂O，室温静置 2 min，12000 rpm 4℃离心 2 min，得到 RNA 样品。

2.2.9 标准品的稀释

用 Nanodrop 2000 微量紫外分光光度计测定 RNA 样品浓度，根据公式

$$\text{RNA 样品拷贝数 (copies/mL)} = \frac{\text{RNA 样品浓度 (}\mu\text{g/mL)} \times 10^{-6} \times 6.02 \times 10^{23}}{\text{片段长度 (bp)} \times 340.95 \text{ (g/mL)}}$$

换算为拷贝数，用含 tRNA 的 RNase Free H₂O 对样品进行 10 倍连续稀释，分装后置于-80℃储存备用。

2.3 实时荧光定量 RT-PCR

以动物组织总 RNA 为模板，用 One Step PrimeScript RT-PCR Kit 进行目的基因的定量检测，扩增程序如下：

42℃，10 min

95℃，10 s

95℃，5 s

60℃，34 s

} 45 cycles

扩增引物及探针序列见表 1.2，扩增体系如下：

试剂	用量
2×One Step RT PCR BufferIII	10.0 μL
Ex Taq HS（5 U/μL）	0.4 μL
PrimeScript RT Enzyme Mix II（各 10 mM）	0.4 μL
上游引物（10 μM）	0.4 μL
下游引物（10 μM）	0.4 μL
探针（12.5 μM）	0.4 μL
ROX Reference Dye II（50×）	0.4 μL
RNA 模板	5.0 μL
RNase Free ddH ₂ O	2.6 μL

表 1.2 实时荧光定量 RT-PCR 引物探针序列及参考基因

Table 1.2 Primers and probe sequences and reference genes for Real-time RT-PCR

Primer name	Sequence 5'-3'	Reference sequence
qCLDN2 primer F	GAG CAG TCC CTG AAG ACG CTT CT	NM_020384.3; XM_015127960.1
qCLDN2 primer R	AGC CAA CTG CTG TCA CAA TGC T	
qCLDN2 probe	CAT GGC CTC TCT TGG CCT CCA ACT TGT G	
qCLDN4 primer F	CAG CAA CTA CGT GTA AGG TGC CA	NM_001305.4; NM_001194564.2
qCLDN4 primer R	CCA CAC CCT GTC ACT TCC GT	
qCLDN4 probe	GCA GCA GCC TTC AGC CTC TCT GGC CCA	
qCLDN5 primer F	TCT GTG CCC GTG TCG CAG AA	NM_001130861.1; XM_015149709.1
qCLDN5 primer R	AGC GCC CTC AGA CGT AGT TCT	
qCLDN5 probe	TCC CGA CCT CAG CTT CCC CGT GAA GTA	
qCLDN7 primer F	CTG AGG GCG GAA ATG GCC AAT	NM_001307.5; XM_001107265.3
qCLDN7 primer R	CTG GGC CGT GAT GAT GTT GTC	
qCLDN7 probe	ATC CCG CAG TGG CAG ATG AGC TCC TAT GC	
qCLDN8 primer F	CTA TCT GGC CAG AAG TAG CAA	NM_199328.2; NM_001194152.1
qCLDN8 primer R	CAC CAC CAA GAA ACA GCC CAG	
qCLDN8 probe	GGA TAA TGG CAA CCC ATG CCT TAG AA	
qCLDN11 primer F	TAT AAG AGG GCT GCC CGG CTG	NM_005602.5; NM_001260553.2
qCLDN11 primer R	TGG GCA TTA TCT GAG CTA GAG	
qCLDN11 probe	AGC ATC CTG TCT GGC ATT TTG TAG TCT TA	
qCLDN12 primer F	TGC CAT GGG CTG TCG GGA TGT	NM_001185072.2; NM_001194860.1
qCLDN12 primer R	TCA CTG CTC CCG TCA TAC	
qCLDN12 probe	TCT GCT TCC CAA CTG GAG AAA ATT A	
qCLDN14 primer F	TTT GCC TGT CCT GCC AGG ACG A	NM_144492.2; XM_015132884.1
qCLDN14 primer R	GGA CTC ACA CGT AGT CGT TCA G	
qCLDN14 probe	TGC CTA CCA GCC ACC AGC TGC CTA CA	
qCLDN15 primer F	CAT TCT GGC CGG TAT CTG C	NM_001185080.1; XM_015134531.1

qCLDN15 primer R	GGC CAG AGC TGC TAC ACG TA	
qCLDN15 probe	CAT CTC CTG GTA CGC CTT CAA CAT CA	
qIL-17A primer F	CAT CCA TAA CCG GAA TAC CAA TAC C	NM_003257.4; XM_002804692.1
qIL-17A primer R	TCC TCA TTG CGG TGG AGA TTC	
qIL-17A probe	TCA GAT TAC TAC AAC CGA TCC ACC TCA CCT	
qIL-17F primer F	CCT GGA ATT ACA CTG TCA CTT	U32659.1; XM_001106391.3
qIL-17F primer R	CTT GAG CAT TGA TGC AGC	
qIL-17F probe	CCT CGG AAG TTG TAC AGG CCC AGT GTA	
qIL-17RA primer F	TGG ATT CAC CCT CGA AAC CT	NM_014339.6; XM_001102483.3
qIL-17RA primer R	AGA TAA CTC TGC ACC CTC GAG GTA	
qIL-17RA probe	CAC TGC AGA CAG ACG CCA GCA TCC	
qIL-17RC primer F	TAG AAG ATG CCT GTG CCC TGG TT	NM_153460.3; XM_015130278.1
qIL-17RC primer R	TCA TCT TCA GGT TCT TCC CAG TG	
qIL-17RC probe	CTG GTG CTG AGG TGC CGC AAG GAG A	
qGAPDH primer F	GAC CAC AGT CCA TGC CAT CA	DQ894744.1; NM_001195426.1
qGAPDH primer R	CAT CAC GCC ACA GTT TCC C	
qGAPDH probe	ACC CAG AAG ACT GTG GAT GGC CCC	

用 7500 System Software 对荧光定量 PCR 数据进行处理，建立检测基因的标
准曲线并对模板中所检测的基因进行绝对定量，最后与管家基因 *GAPDH* 的拷贝
数进行校准。

第三节 实验结果

1 SHIV/SIV 感染影响恒河猴肠道中紧密连接相关基因的表达

1.1 正常与 SHIV/SIV 感染恒河猴肠道中紧密连接相关基因 mRNA 水平的差异

为了解紧密连接相关基因在正常恒河猴肠道各段的分布情况,本研究建立实时荧光定量 RT-PCR 的方法检测了 5 只正常恒河猴十二指肠近端、空肠近端、回肠末端、盲肠、结肠近端和直肠中 *CLDN2*, *4*, *5*, *7*, *8*, *11*, *12*, *14*, *15* 的转录水平。如图 1.1 所示,所检测的基因在肠道各段均有表达, *CLDN2*, *4*, *5*, *12* mRNA 在肠道各段的表达水平在 $3 \times 10^5 \sim 9 \times 10^5$ copies/ 10^6 GAPDH 之间, *CLDN2* mRNA 在空肠近端和直肠中的水平存在显著差异 ($P=0.0159$); *CLDN7*, *8*, *11*, *14* mRNA 在肠道各段表达水平均相对较高,其中, *CLDN8* 和 *CLDN11* mRNA 在回肠末端中表达水平最高,均达到了 4×10^6 copies/ 10^6 GAPDH, *CLDN7* 和 *CLDN8* mRNA 在空肠近端和直肠的表达中均存在显著差异 ($P=0.0159$; $P=0.0317$); *CLDN15* mRNA 在肠道各段的表达水平相对较低,盲肠、结肠近端和直肠中的表达水平均低于 10^4 copies/ 10^6 GAPDH,其中结肠近端表达量最低,仅为 7028 copies/ 10^6 GAPDH, *CLDN15* mRNA 在回肠末端中的表达分别与盲肠、结肠近端和直肠中存在显著差异 ($P=0.0159$; $P=0.0152$; $P=0.0135$)。另外, *CLDN2*, *5*, *7*, *8*, *11*, *12*, *14* mRNA 在直肠中表达水平均低于其它肠道组织。

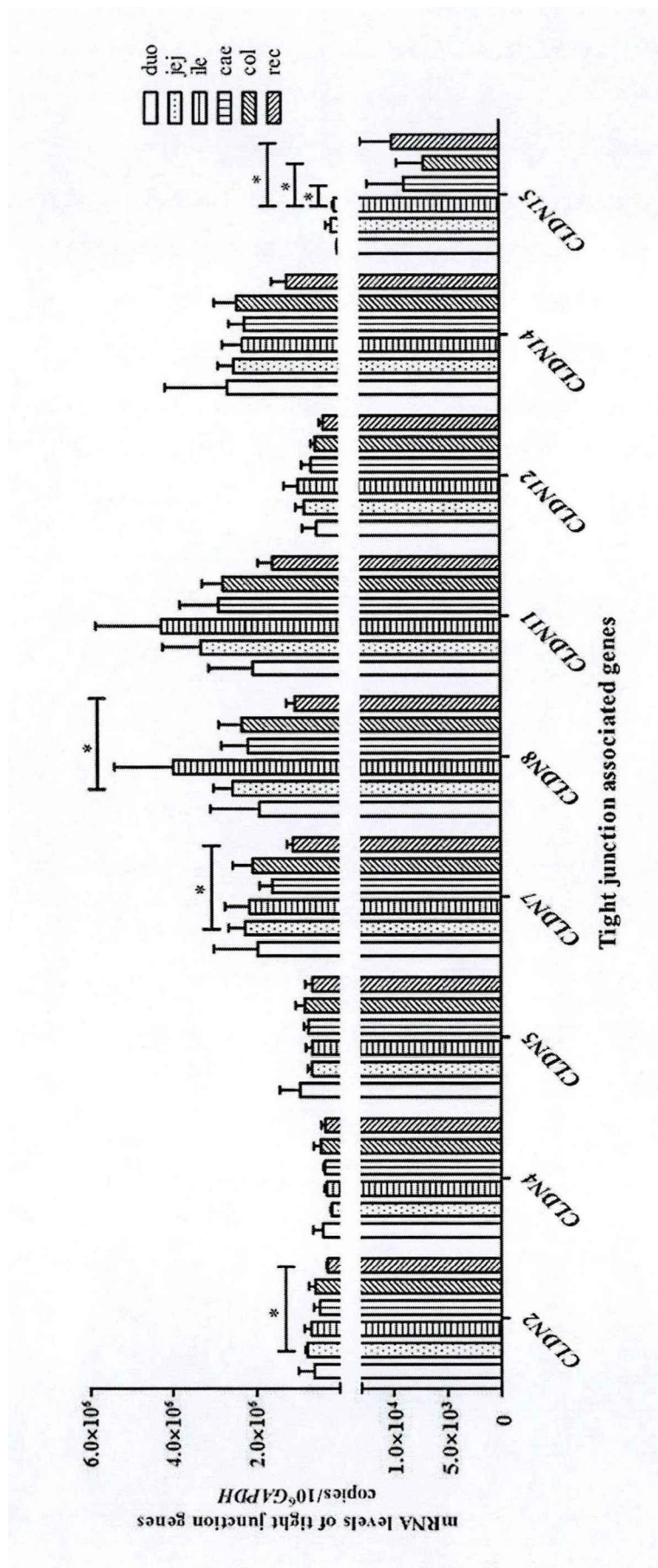


图 1.1 正常恒河肠道粘膜中紧密连接相关基因的表达水平

Fig 1.1 Expression of tight junction associated genes in the intestinal mucosa of *Macaca mulatta*

正常恒河猴 (n=5) 肠道粘膜中紧密连接相关基因 mRNA 水平的 qPCR 检测; duo: 十二指肠近端; jej: 空肠近端; ile: 回肠末端; cac: 盲肠; col: 结肠近端; rec: 直肠; 垂直条代表平均值±SD, 统计学方法: Mann-Whitney test (*: P < 0.05)

已知 SHIV/SIV 感染可导致恒河猴肠道中 *CLDN1*、*CLDN3*、*ZO-1*、*OCLN* 等紧密连接蛋白的表达和分布异常。为了探讨 SHIV/SIV 感染对其它在粘膜屏障功能维持中发挥重要作用的紧密连接相关基因的影响,本研究采用实时荧光定量 RT-PCR 的方法对正常和 SHIV/SIV 感染恒河猴肠道组织中紧密连接相关基因转录水平进行了比较,如图 1.2 所示,SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中紧密连接相关基因 *CLDN5*, *8*, *11*, *12*, *14* mRNA 水平显著低于正常动物,感染动物肠道中 *CLDN5* 和 *CLDN8* mRNA 水平是正常动物中的 1/2 ($P<0.0001$; $P=0.0055$), *CLDN11*, *12*, *14* mRNA 水平是正常动物中的 2/5 ($P=0.0036$; $P=0.0063$; $P<0.0001$)。感染动物肠道 *CLDN2* mRNA 也低于对照组,但没有统计学差异 ($P=0.0815$)。此外,本研究发现感染组 *CLDN4*, *7*, *15* 转录水平与对照组相比并没有明显的差异。

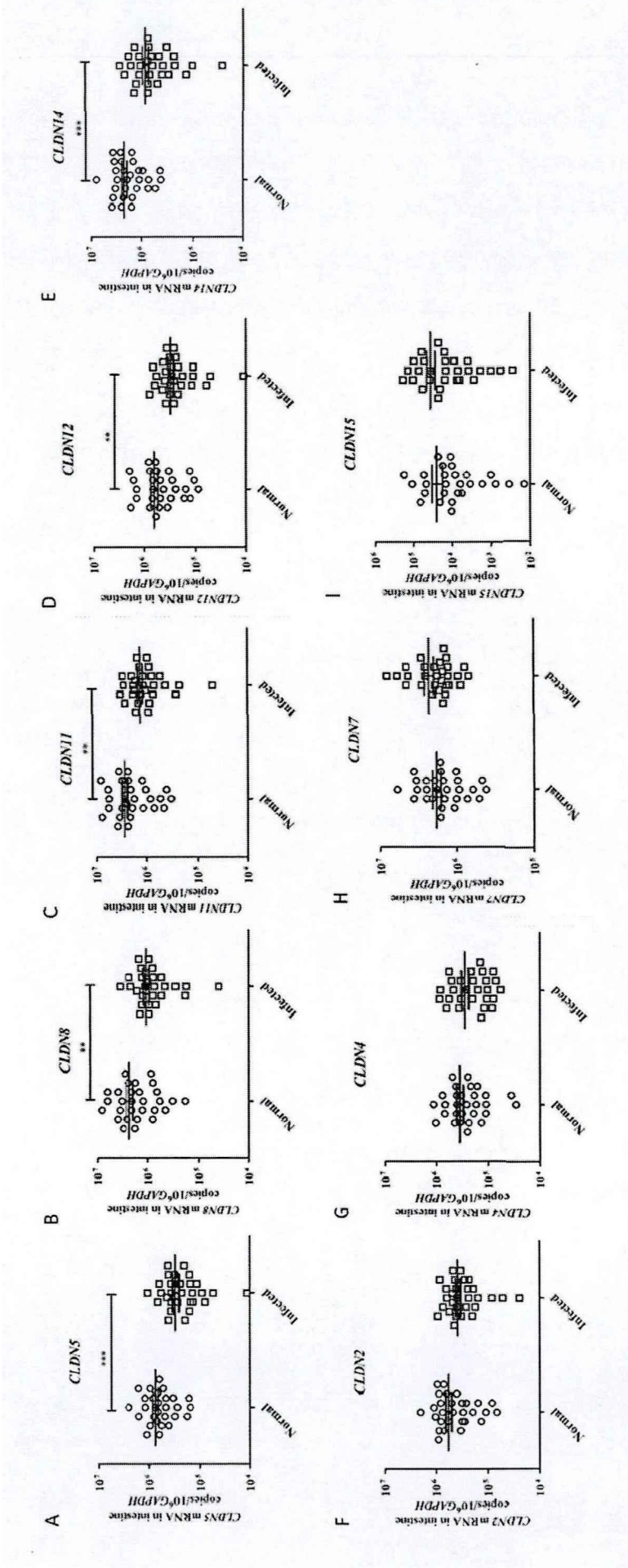


图 1.2 正常与 SHIV/SIV 感染恒河猴肠道粘膜中紧密连接相关基因 mRNA 水平的比较

Fig 1.2 Comparison of the mRNA levels of tight junction associated-genes in the intestinal mucosa between *Macaca mulatta* with and without SHIV/SIV infection. Normal rhesus monkey (n=5) and SHIV/SIV infected rhesus monkey (n=5) intestinal mucosa. CLDN5 (A), CLDN8 (B), CLDN11 (C), CLDN12 (D), CLDN14 (E), CLDN2 (F), CLDN4 (G), CLDN7 (H), CLDN15 (I) mRNA levels. The data are presented as mean $\pm$ SD. Statistical analysis: Mann-Whitney test (**: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$)

为了进一步明确 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中紧密连接相关基因 *CLDN5*, *8*, *11*, *12*, *14* 表达水平降低主要发生的部位, 我们分别对感染前后小肠 (十二指肠近端、空肠近端、回肠末端) 和大肠 (盲肠、结肠近端、直肠) 中紧密连接相关基因的表达进行了比较, 发现 *CLDN5* 和 *CLDN14* mRNA 在感染动物的小肠 ($P=0.0018$; $P=0.0056$) 和大肠 ($P=0.004$; $P=0.0011$) 中的表达水平均显著低于正常动物, 虽然感染动物肠道中 *CLDN8*, *11*, *12* mRNA 总体水平低于正常动物 (图 1.2 B、C、D), 但该变化主要发生在大肠中 ($P=0.0343$; $P=0.0154$; $P=0.0275$), 小肠中存在表达水平下降的趋势, 但没有统计显著性 (图 1.3 B、C、D)。

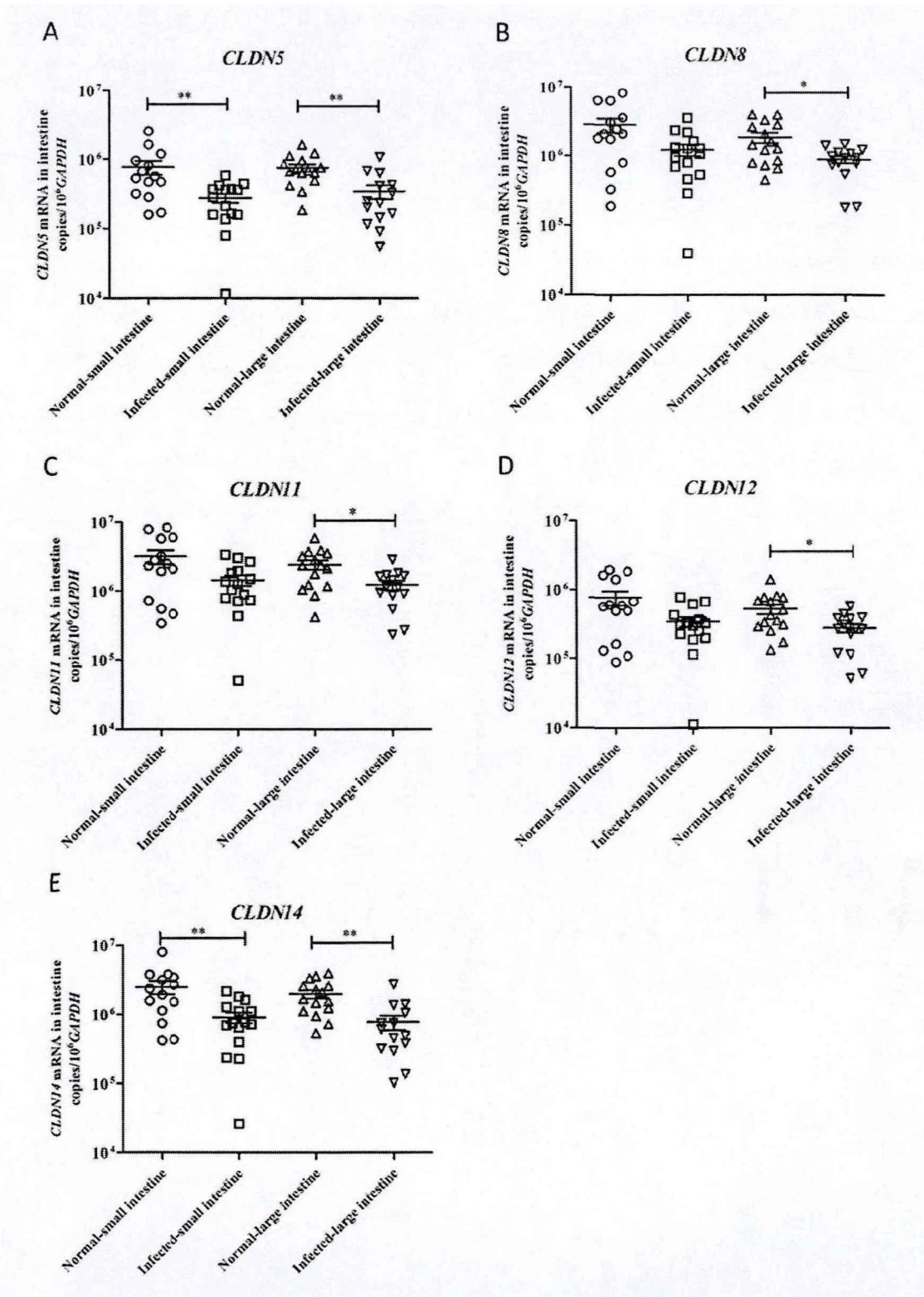


图 1.3 正常与 SHIV/SIV 感染恒河猴大肠和小肠中紧密连接相关基因 mRNA 水平的比较

Fig 1.3 Comparison of the mRNA levels of tight junction associated-genes in the large intestine

and small intestine between *Macaca mulatta* with and without SHIV/SIV infection

正常恒河猴 (n=5) 与 SHIV/SIV 感染恒河猴 (n=5) 肠道粘膜中 *CLDN5* (A)、*CLDN8* (B)、*CLDN11* (C)、*CLDN12* (D)、*CLDN14* (E) mRNA 水平的 qPCR 检测; 垂直条代表平均值 $\pm$ SD, 统计学方法: Mann-Whitney test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$)

1.2 恒河猴肠道中紧密连接相关基因 mRNA 水平的相关性

在 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中, *CLDN1*、*OCLN* 和 *ZO-1* 表达水平降低, 且三者的表达两两之间存在正相关性[79]。为了进一步探讨恒河猴肠道中紧密连接相关基因表达之间的联系, 本研究分析了紧密连接相关基因 *CLDN5*, *8*, *11*, *12*, *14* mRNA 之间的相关性。如图 1.4 所示, 正常动物中 *CLDN5*, *8*, *11*, *12*, *14* mRNA 水平两两之间存在显著的正相关性。同样, 在 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中, *CLDN 5* 分别与 *CLDN8*, *11*, *12*, *14* 表达呈正相关性($r=0.7187$, $P<0.0001$; $r=0.8030$, $P<0.0001$; $r=0.7789$, $P<0.0001$; $r=0.7887$, $P<0.0001$), *CLDN8* 分别与 *CLDN11*, *12*, *14* 表达呈正相关性($r=0.9335$, $P<0.0001$; $r=0.8976$, $P<0.0001$; $r=0.8188$, $P<0.0001$), *CLDN11* 分别与 *CLDN12*, *14* 表达呈正相关性($r=0.9267$, $P<0.0001$; $r=0.8352$, $P<0.0001$;), *CLDN12* 与 *CLDN14* 表达呈正相关性($r=0.8019$, $P<0.0001$) (图 1.5)。这些紧密连接相关基因表达的相关性提示它们在肠道屏障功能的维持中可能发挥相似的作用。

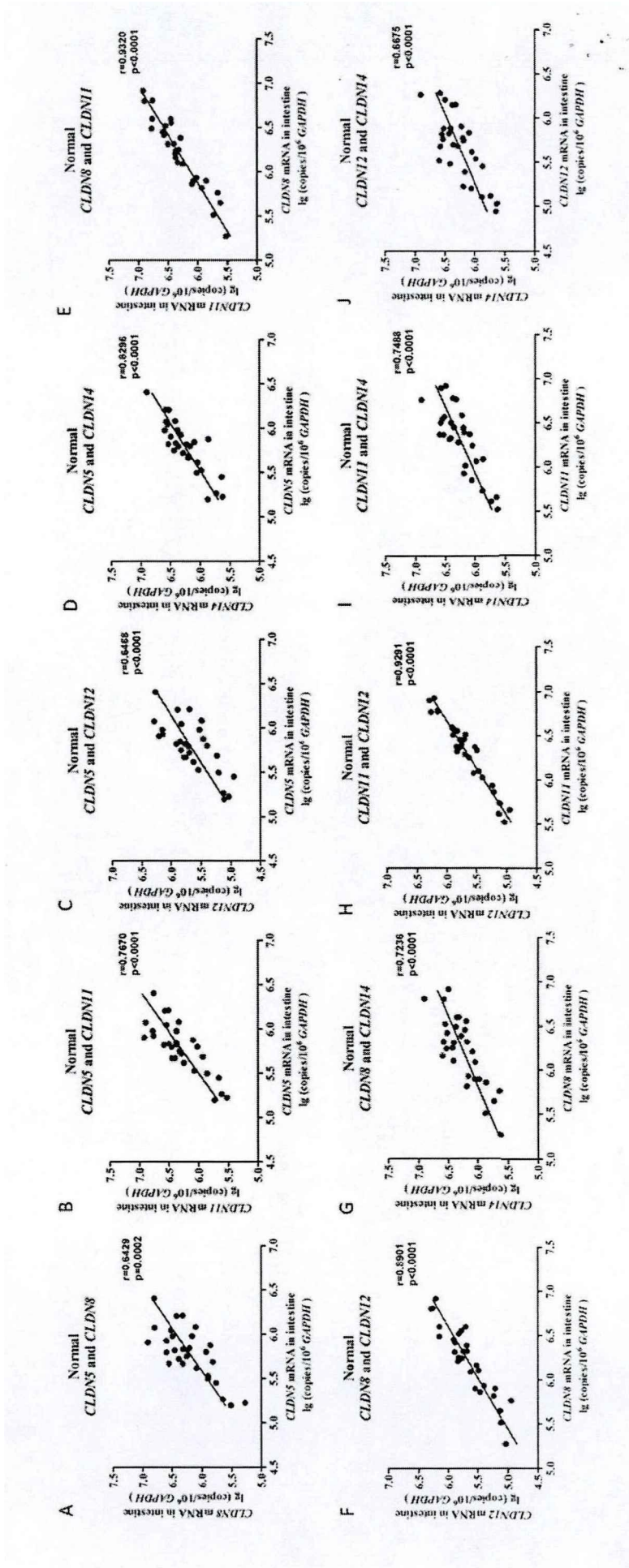


图 1.4 正常恒河猴结肠粘膜中紧密连接相关基因 mRNA 水平的相关性

Fig 1.4 Correlations between mRNA levels of tight junction associated genes in the intestinal mucosa of uninfected *Macaca mulatta*

正常恒河猴 (n=5) 肠道粘膜中 CLDN5、CLDN8、CLDN11、CLDN12、CLDN14 mRNA 两两之间相关性分析散点图; r 为相关系数, $p < 0.05$ 为显著相关;

统计学方法: 非参数检验 Spearman test

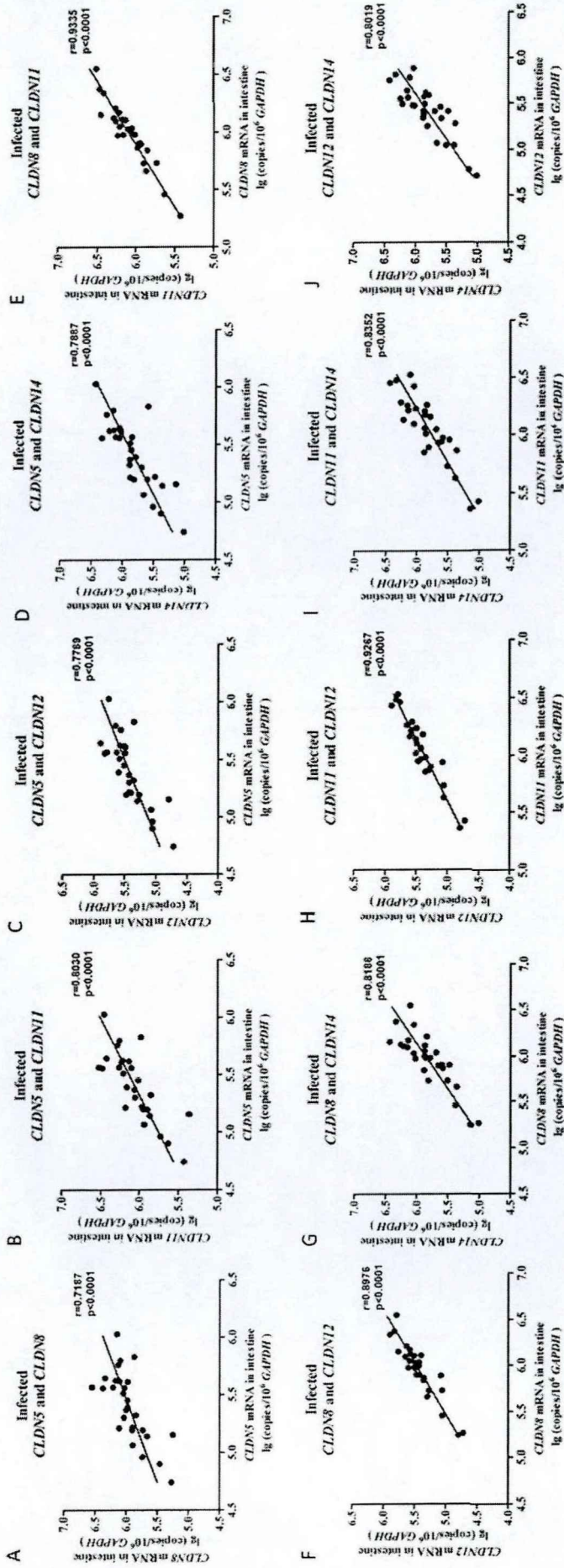


图 1.5 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠粘膜中紧密连接相关基因 mRNA 水平的相关性

Fig 1.5 Correlations between mRNA levels of tight junction associated genes in the intestinal mucosa of SHIV/SIV infected *Macaca mulatta*

SHIV/SIV 感染恒河猴 (n=5) 肠道粘膜中 CLDN5、CLDN8、CLDN11、CLDN12、CLDN14 mRNA 两两之间相关性分析散点图; r 为相关系数, p < 0.05 为

显著相关; 统计学方法: 非参数检验 Spearman test

2 SHIV/SIV 感染影响恒河猴肠粘膜中 *IL-17A/IL-17F* 及其受体的表达

2.1 正常与 SHIV/SIV 感染恒河猴肠粘膜中 *IL-17A* mRNA 水平的比较

本研究用实时荧光定量 RT-PCR 的方法检测了正常恒河猴空肠近端、回肠末端、盲肠、结肠近端、直肠和肠系膜淋巴结中 *IL-17A* mRNA 的水平，发现肠系膜淋巴结中 *IL-17A* mRNA 水平最高，为 2522 copies/10⁶ *GAPDH*；空肠近端、盲肠、结肠近端中 *IL-17A* mRNA 水平相当，约为 630 copies/10⁶ *GAPDH*；回肠末端和直肠中 *IL-17A* mRNA 表达相对较低，约为 288 copies/10⁶ *GAPDH*，见图 1.6 A。

对正常和 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道各段 *IL-17A* 转录水平比较发现，与预期结果一致，对照组恒河猴肠道中 *IL-17A* mRNA 水平是 SHIV/SIV 感染组的 163.6 倍（图 1.6 B），感染组 *IL-17A* mRNA 在空肠近端、回肠末端、盲肠、结肠近端、直肠和肠系膜淋巴结中表达水平均显著低于对照组（ $P=0.001$ ； $P=0.0081$ ； $P=0.0008$ ； $P<0.0001$ ； $P=0.0093$ ； $P=0.0005$ ）（图 1.6 A）。

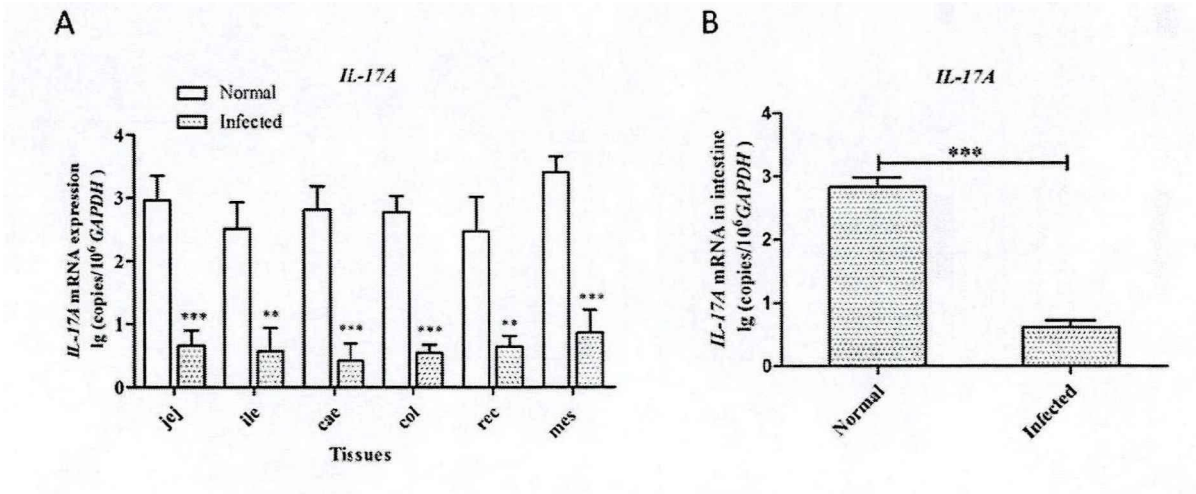


图 1.6 正常与 SHIV/SIV 感染恒河猴肠粘膜组织中 *IL-17A* mRNA 水平的差异

Fig 1.6 Differences of *IL-17A* mRNA levels in the intestinal tissues between *Macaca mulatta* with and without SHIV/SIV infection

A. 正常恒河猴 (n=5) 与 SHIV/SIV 感染恒河猴 (n=5) 肠道各节段中 *IL-17A* mRNA 水平的 qPCR 检测；B. 正常恒河猴 (n=5) 与 SHIV/SIV 感染恒河猴 (n=5) 肠道中 *IL-17A* mRNA 总体水平的 qPCR 检测；jej: 空肠近端；ile: 回肠末端；cae: 盲肠；col: 结肠近端；rec:

直肠；mes：肠系膜淋巴结；垂直条代表平均值±SD，统计学方法：Mann-Whitney test (**： $P<0.01$ ；***： $P<0.001$)

2.2 正常与 SHIV/SIV 感染恒河猴肠道中 IL-17F mRNA 水平的差异

本研究建立实时荧光定量 RT-PCR 方法检测了正常恒河猴肠道中 IL-17F mRNA 的表达水平，发现 IL-17F mRNA 在直肠中表达水平最高，为 10092 copies/ 10^6 GAPDH，其次为回肠末端，在十二指肠近端、空肠近端、盲肠、结肠近端中表达水平相当，均为 3000~5000 copies/ 10^6 GAPDH（图 1.7 A）。

对 SHIV/SIV 感染与未感染恒河猴肠道中 IL-17F mRNA 的表达水平进行比较发现，感染组肠道中 IL-17F mRNA 整体水平高于对照组 ($P=0.0008$)，表达水平是对照组的 2.74 倍（图 1.7 B）。各肠道组织中除回肠末端没有明显差异外，IL-17F mRNA 在十二指肠近端、空肠近端、盲肠、结肠近端、直肠中的表达水平比未感染动物中高（图 1.7 A）。

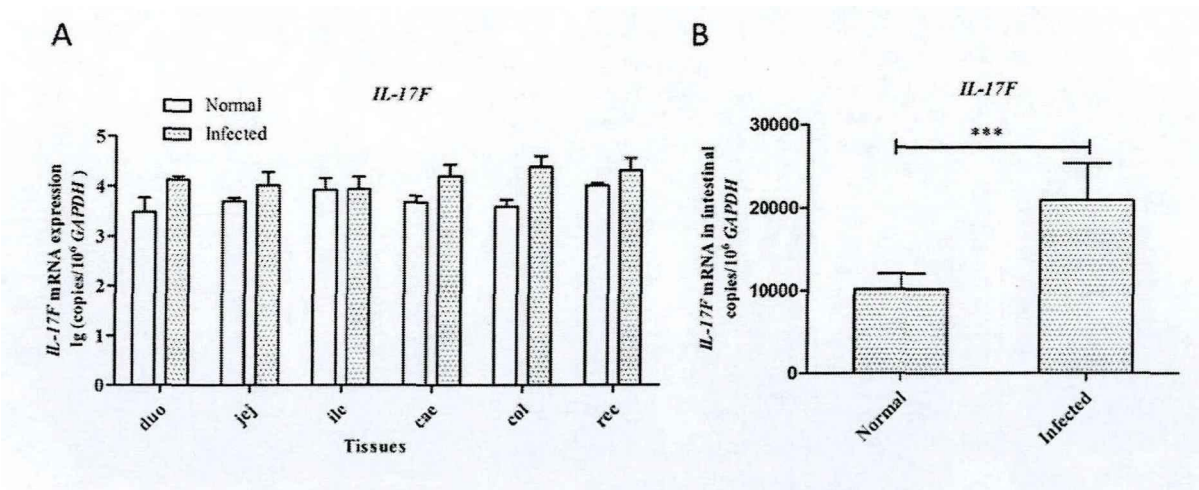


图 1.7 正常与 SHIV/SIV 感染恒河猴肠道组织中 IL-17F mRNA 水平的比较

Fig 1.7 Comparison of IL-17F mRNA levels in the intestinal mucosa of *Macaca mulatta* with and without SHIV/SIV infection

A. 正常恒河猴 (n=5) 与 SHIV/SIV 感染恒河猴 (n=5) 肠道各节段中 IL-17F mRNA 水平的 qPCR 检测；B. 正常恒河猴 (n=5) 与 SHIV/SIV 感染恒河猴 (n=5) 肠道中 IL-17F mRNA 总体水平的 qPCR 检测；duo：十二指肠近端；jej：空肠近端；ile：回肠末端；cae：盲肠；col：结肠近端；rec：直肠；垂直条代表平均值±SD，统计学方法：Mann-Whitney test (***)：

$P < 0.001$)

2.3 正常与 SHIV/SIV 感染恒河猴肠道中 *IL-17RA/IL-17RC* mRNA 表达水平的差异

为阐明 *IL-17RA* 在恒河猴中的分布特征, 本研究首先检测了包括免疫系统、消化系统、生殖系统等在内的 36 个组织中 *IL-17RA* mRNA 的表达水平。如图 1.8 所示, *IL-17RA* 在免疫相关组织中表达水平相对较高, 其中腹股沟淋巴结的表达水平最高, 其次为腋窝淋巴结, 扁桃体中表达水平最低。与免疫系统相比, 消化道中 *IL-17RA* 的表达水平普遍偏低, 口腔黏膜 *IL-17RA* 表达水平最低, 仅为 2810 copies/ 10^6 GAPDH。大肠中的表达水平高于小肠, 大肠中盲肠 *IL-17RA* 表达水平最高, 结肠近端表达水平最低, 小肠中十二指肠近端水平最高, 空肠中部表达水平最低。在生殖系统中, 雌性恒河猴的子宫颈和雄性恒河猴的睾丸中 *IL-17RA* 表达水平较高。此外, *IL-17RA* 在胰脏、肺脏和肝脏等组织中高表达, 在所有检测的组织中, 肌肉组织 *IL-17RA* mRNA 表达水平最低, 仅为 370 copies/ 10^6 GAPDH。

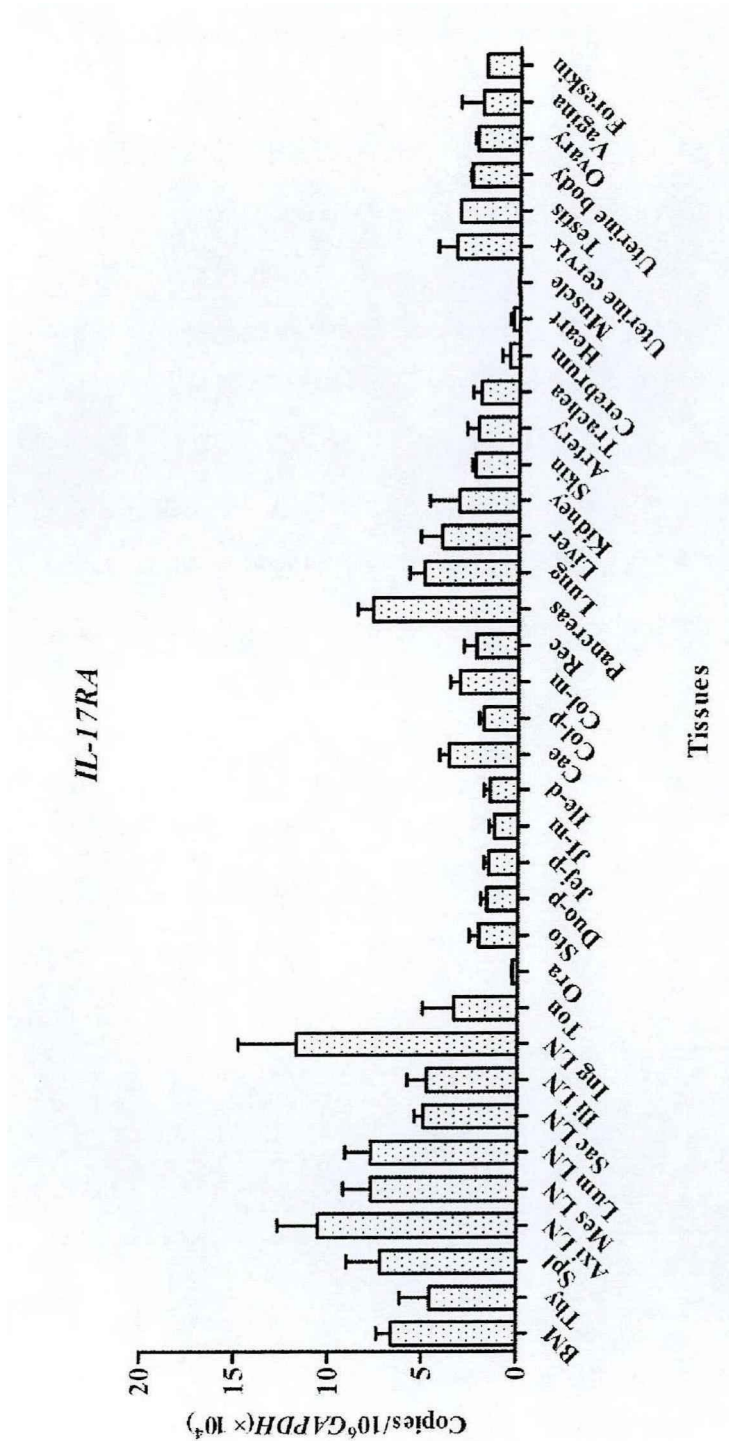


图 1.8 *IL-17RA* mRNA 在恒河猴各组织中的分布

Fig 1.8 Distribution of *IL-17RA* mRNA in different tissues of *Macaca mulatta*

正常恒河猴 (n=5) 各组织中 *IL-17RA* mRNA 水平的 qPCR 检测; BM: 骨髓; Thy: 甲状腺; Spl: 脾脏; Ing LN: 腹股沟淋巴结; Axi LN: 腋窝淋巴结; Mes LN: 肠系膜淋巴结; Lum LN: 腰部淋巴结; Sac LN: 骶骨淋巴结; Ili LN: 髂淋巴结; Ton: 扁桃体; Ora: 口腔黏膜; Sto: 胃底; Duo-p: 十二指肠近端; Jej-p: 空肠近端; Ile-d: 回肠末端; Cae: 盲肠; Col-p: 结肠近端; Col-m: 结肠中部; Rec: 直肠; Pancreas: 胰脏; Lung: 肺脏; Liver: 肝脏; Kidney: 肾脏; Skin: 皮肤; Artery: 主动脉; Trachea: 气管; Cerebrum: 大脑; Heart: 心脏; Muscle: 肌肉; Uterine cervix: 子宫颈; Testis: 睾丸; Uterine body: 子宫体; Ovary: 卵巢; Vagina: 阴道; Foreskin: 包皮; 垂直条代表平均值±SD

在 SHIV/SIV 感染中，恒河猴肠道 *IL-17A* 和 *IL-17F* mRNA 均发生了显著的变化但变化的方向相反。为了进一步探讨 *IL-17A* 和 *IL-17F* 的表达变化与 HIV/AIDS 病理及肠道屏障损伤之间的关系，本研究建立实时荧光定量 RT-PCR 方法对 *IL-17A/IL-17F* 受体 (*IL-17RA* 和 *IL-17RC*) 的表达进行了检测。如图 1.9 所示，在所检测的 6 个节段的肠道组织中，感染组 *IL-17RA* mRNA 水平均高于对照组。在十二指肠近端中，感染组 *IL-17RA* mRNA 水平显著高于对照组 ($P=0.0442$)，感染组 *IL-17RA* mRNA 水平是对照组的 5.5 倍左右；感染组动物的空肠近端中 *IL-17RA* mRNA 是对照组的 4.9 倍 ($P=0.0055$)；同样，感染组动物回肠末端和结肠近端中，*IL-17RA* mRNA 水平也显著高于对照组 ($P=0.0006$ ； $P=0.0007$)，表达水平为对照组的 6 倍左右；在盲肠和直肠中，感染组 *IL-17RA* mRNA 水平显著高于对照组 ($P=0.017$ ， $P=0.0246$)，表达水平为对照组的 4 倍。

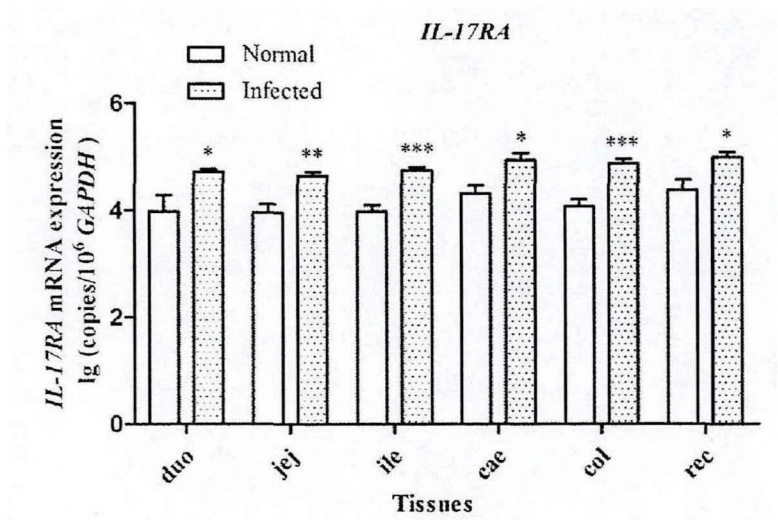


图 1.9 正常与 SHIV/SIV 感染恒河猴肠道组织中 *IL-17RA* mRNA 水平的比较

Fig 1.9 Comparision of *IL-17RA* mRNA levels in the intestinal mucosa of *Macaca mulatta* with and without SHIV/SIV infection

正常恒河猴 (n=5) 与 SHIV/SIV 感染恒河猴 (n=5) 肠道各节段中 *IL-17RA* mRNA 水平的 qPCR 检测；duo：十二指肠近端；jej：空肠近端；ile：回肠末端；cae：盲肠；col：结肠近端；rec：直肠；垂直条代表平均值±SD，统计学方法：Mann-Whitney test (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$)

IL-17RC mRNA 在正常恒河猴肠道各段广泛表达。大肠中 *IL-17RC* mRNA 水平略高于小肠。大肠中直肠 *IL-17RC* mRNA 水平最高,为 24825 copies/ 10^6 *GAPDH*, 其次是结肠近端,为 20075 copies/ 10^6 *GAPDH*, 大肠中盲肠 *IL-17RC* mRNA 水平最低,为 16725 copies/ 10^6 *GAPDH*。但与 *IL-17RA* 相比,*IL-17RC* 在大肠中的 mRNA 水平偏低。小肠中空肠近端表达水平最高,为 19227 copies/ 10^6 *GAPDH*, 十二指肠近端和回肠末端 *IL-17RC* mRNA 水平相当,约为 11000 copies/ 10^6 *GAPDH*, 见图 1.10。

与 *IL-17RA* 相似,感染组 *IL-17RC* mRNA 水平在所检测的肠道组织中也均高于对照组,且上调的倍数 *IL-17RC* 整体高于 *IL-17RA*。在结肠近端中,感染组 *IL-17RC* mRNA 较对照组升高倍数最大,约为 13 倍 ($P<0.0001$); 在十二指肠近端中,感染组 *IL-17RC* mRNA 水平是对照组的 8.4 倍 ($P=0.0006$); 回肠末端中,感染组 *IL-17RC* mRNA 水平是对照组的 6 倍 ($P=0.0043$); 在感染组的空肠近端和盲肠中, *IL-17RC* mRNA 水平也高于对照组 ($P=0.0484$; $P=0.0323$), 表达水平是对照组的 4 倍, 同样, 感染组直肠 *IL-17RC* mRNA 水平也显著高于对照组 ($P=0.0047$), 表达水平是对照组的 4.5 倍, 见图 1.10。

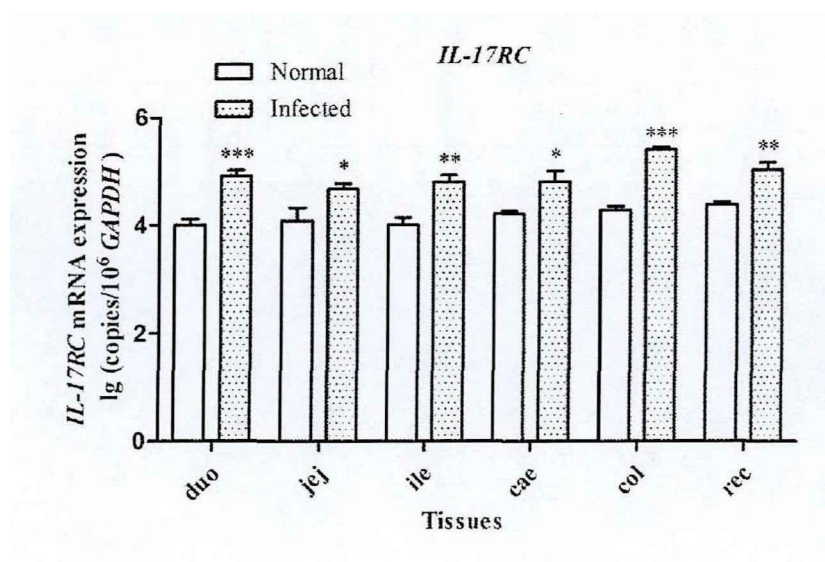


图 1.10 正常与 SHIV/SIV 感染恒河猴肠道组织中 *IL-17RC* mRNA 水平的比较

Fig 1.10 Comparison of *IL-17RC* mRNA levels in the intestinal mucosa of *Macaca mulatta* with

and without SHIV/SIV infection

正常恒河猴 (n=5) 与 SHIV/SIV 感染恒河猴 (n=5) 肠道各节段中 *IL-17RC* mRNA 水平的 qPCR 检测; duo: 十二指肠近端; jej: 空肠近端; ile: 回肠末端; cae: 盲肠; col: 结肠近端; rec: 直肠; 垂直条代表平均值±SD, 统计学方法: Mann-Whitney test (*: $P<0.05$; **: $P<0.01$; ***: $P<0.001$)

为了探讨 SHIV/SIV 感染中 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* mRNA 表达水平的关系, 本研究对正常组动物和感染组动物 6 个节段肠道组织中 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* mRNA 表达水平分别做相关性分析, 发现在正常动物肠道中 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* mRNA 的表达不存在相关性 (图 1.11A), 但是在感染组动物肠道中, 二者的表达呈显著正相关 ($r=0.4157$, $P=0.0278$) (图 1.11B)。

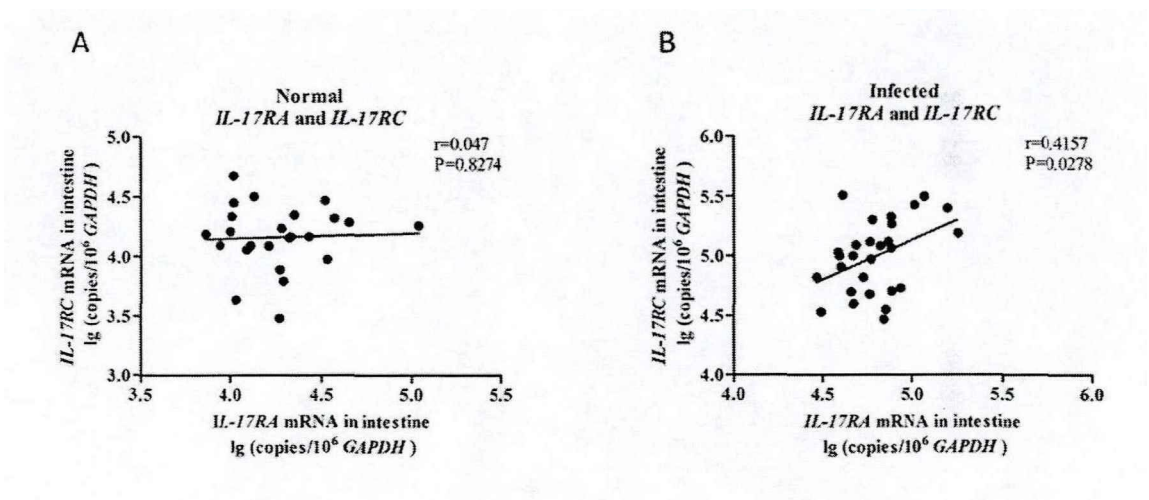


图 1.11 恒河猴肠道粘膜组织中 *IL-17RA* 与 *IL-17RC* mRNA 水平的相关性

Fig 1.11 Correlation between *IL-17RA* and *IL-17RC* mRNA levels in the intestinal mucosa of *Macaca mulatta*

正常恒河猴 (A, n=5) 和 SHIV/SIV 感染恒河猴 (B, n=5) 肠道粘膜中 *IL-17RA* 与 *IL-17RC* mRNA 水平的相关性分析散点图; r 为相关系数, $p<0.05$ 为显著相关; 统计学方法: 非参数检验 Spearman test

2.4 恒河猴肠道粘膜中 *IL-17A/IL-17F* 与受体 mRNA 水平的相关性

SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道粘膜中 *IL-17A* mRNA 水平低于正常动物，而我们的研究发现 *IL-17F*、*IL-17RA* 和 *IL-17RC* 的变化趋势与 *IL-17A* 相反。为了进一步研究 *IL-17A*、*IL-17F* 及 *IL-17R* 表达之间的关系，本研究对正常组动物和 SHIV/SIV 感染组动物肠道组织 *IL-17A* 和 *IL-17R*、*IL-17F* 和 *IL-17R* 表达的相关性做了分析。

如图 1.12A 和 B 所示，无论是在正常动物还是感染动物中，*IL-17A* 和 *IL-17RA* 的表达均呈负相关的趋势，但没有统计显著性。*IL-17A* 和 *IL-17RC* 在正常动物肠道中不存在相关性（图 1.12C），在感染动物肠道中呈现正相关的趋势，但没有统计显著性（图 1.12D）。

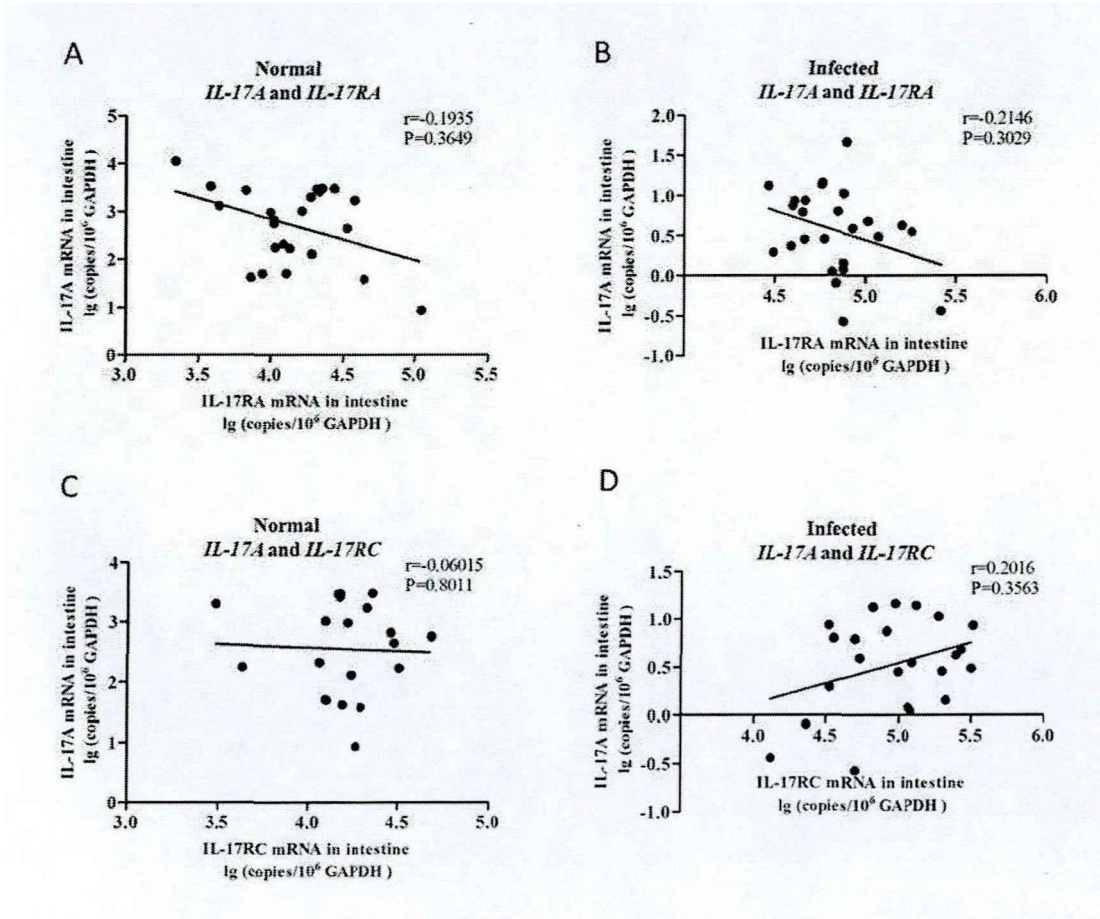


图 1.12 恒河猴肠道组织中 *IL-17A* 与 *IL-17R* mRNA 水平的相关性

Fig 1.12 Correlation between *IL-17A* and *IL-17R* mRNA levels in the intestinal mucosa of *Macaca mulatta*

正常恒河猴 (n=5) 肠道粘膜中 *IL-17A* 与 *IL-17RA* (A) 或 *IL-17A* 与 *IL-17RC* (C) mRNA 水平的相关性分析散点图; SHIV/SIV 感染恒河猴 (n=5) 肠道粘膜中 *IL-17A* 与 *IL-17RA* (B) 或 *IL-17A* 与 *IL-17RC* (D) mRNA 水平的相关性分析散点图; r 为相关系数, $p < 0.05$ 为显著相关; 统计学方法: 非参数检验 Spearman test

对正常组动物和 SHIV/SIV 感染组动物肠道组织 *IL-17F* 和 *IL-17R* 的表达分别进行相关性分析发现, 无论是在正常动物还是感染动物中, *IL-17F* 和 *IL-17RA* 的表达均呈现正相关的趋势, 但没有统计显著性 (图 1.13 A 和 B), 而 *IL-17F* 和 *IL-17RC* 在正常动物和感染动物中均呈现显著正相关性 ($r=0.6258$, $P=0.0018$; $r=0.4002$, $P=0.0386$) (图 1.13 C 和 D)。

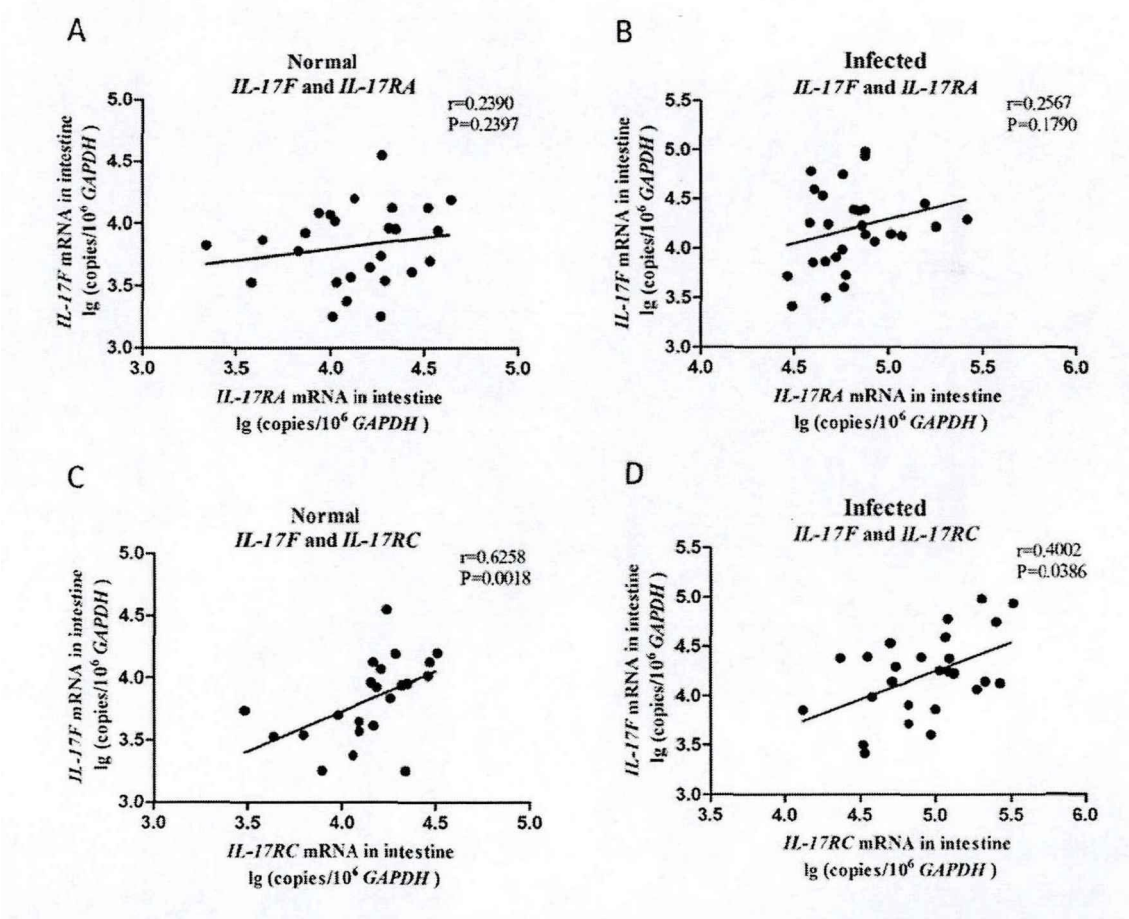


图 1.13 恒河猴肠道组织中 *IL-17F* 与 *IL-17R* mRNA 水平的相关性

Fig 1.13 Correlation between *IL-17F* and *IL-17R* mRNA levels in the intestinal mucosa of *Macaca mulatta*

正常恒河猴 (n=5) 肠道粘膜中 *IL-17F* 与 *IL-17RA* (A) 或 *IL-17F* 与 *IL-17RC* (C) mRNA 水平的相关性分析散点图; SHIV/SIV 感染恒河猴 (n=5) 肠道粘膜中 *IL-17F* 与 *IL-17RA* (B) 或 *IL-17F* 与 *IL-17RC* (D) mRNA 水平的相关性分析散点图; r 为相关系数, $p < 0.05$ 为显著相关; 统计学方法: 非参数检验 Spearman test

3 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中 *IL-17/IL-17R* 与紧密连接相关基因表达的相关性

3.1 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中 *IL-17A* 与紧密连接相关基因表达的相关性

在 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中, *IL-17A* 与 *CLDN1*、*CLDN3*、*OCLN* 及 *ZO-1* 等紧密连接相关基因在转录水平存在正相关性。为了更好的了解 *IL-17A* 与紧密连接相关基因表达之间的关系, 本研究对空肠近端、回肠末端、盲肠、结肠近端和直肠中 *IL-17A* 与 *CLDN5*, 8, 11, 12, 14 mRNA 表达分别作了相关性分析, 发现在正常动物中, *IL-17A* 与这些紧密连接相关基因均不存在显著的相关性, 但有正相关的趋势(图 1.14A-E)。在感染动物中, *IL-17A* 分别与 *CLDN5* 和 *CLDN11* 的表达存在显著正相关性 ($r=0.5257$, $P=0.01$; $r=0.418$, $P=0.0472$) (图 1.14F 和 H), 此外, *IL-17A* 与 *CLDN8*, 12, 14 的表达存在正相关的趋势, 但没有统计显著性 (图 1.14G、I 和 J)。

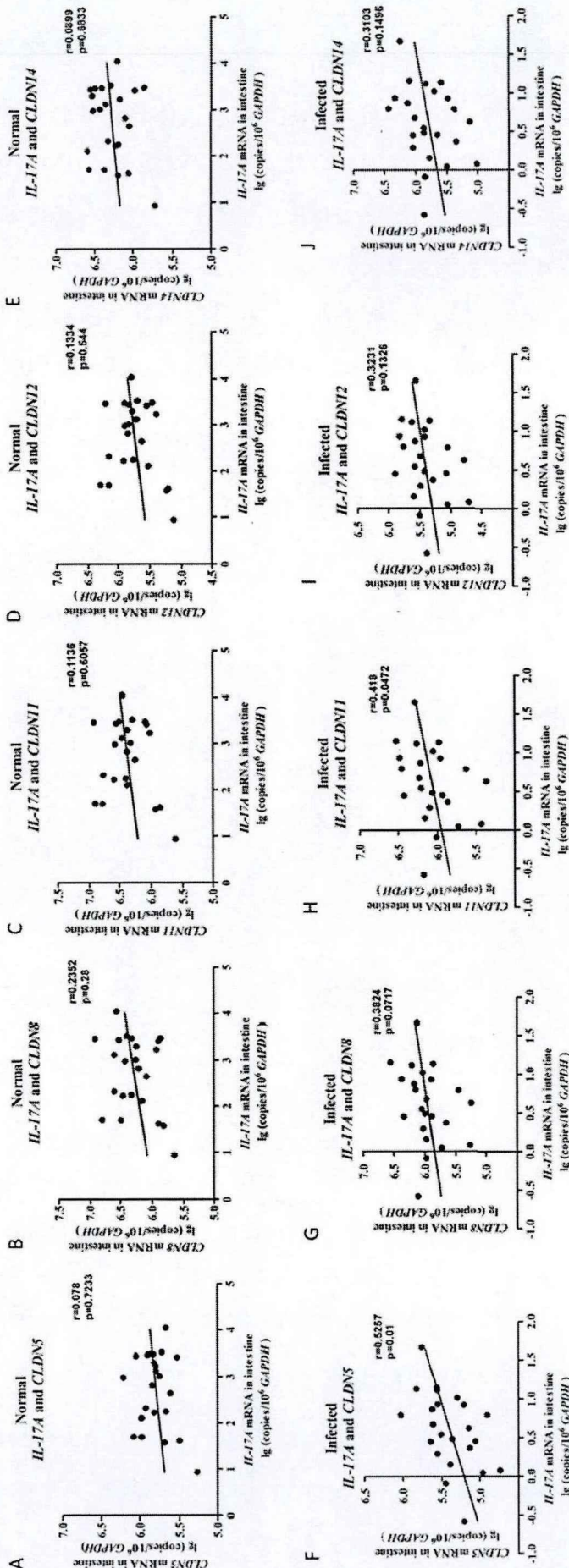


图 1.14 恒河猴肠道粘膜中 *IL-17A* 与紧密连接相关基因 mRNA 水平的相关性

Fig 1.14 Correlation between the mRNA levels of *IL-17A* and tight junction associated genes in the intestinal mucosa of *Macaca mulatta*

正常恒河猴 (A-E, n=5) 和 SHIV/SIV 感染恒河猴 (F-J, n=5) 肠道粘膜中 *IL-17A* 与 *CLDN5* (A, F)、*CLDN8* (B, G)、*CLDN11* (C, H)、*CLDN12* (D, I)、*CLDN14* (E, J) mRNA 水平的相关性分析散点图; r 为相关系数, $p < 0.05$ 为显著相关; 统计学方法: 非参数检验 Spearman test

3.2 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中 *IL-17F* 与紧密连接相关基因表达的相关性

为了进一步探讨 HIV-1/SIV 中 IL-17 家族与紧密连接相关基因表达调控之间的关系,本研究对 IL-17 家族另外一个重要的细胞因子 *IL-17F* 与紧密连接基因表达的相关性做了分析。结果表明,在正常动物肠道中,*IL-17F* 与 *CLDN5, 8, 11, 12, 14* mRNA 的表达存在正相关的趋势,但没有统计显著性。而感染动物中,*IL-17F* 与 *CLDN5, 8, 11, 12, 14* mRNA 的表达存在显著负相关性($r=-0.5457$, $P=0.0027$; $r=-0.6393$, $P=0.0002$; $r=-0.6825$, $P<0.0001$; $r=-0.5917$, $P=0.0009$; $r=-0.7975$, $P<0.0001$), 见图 1.15。

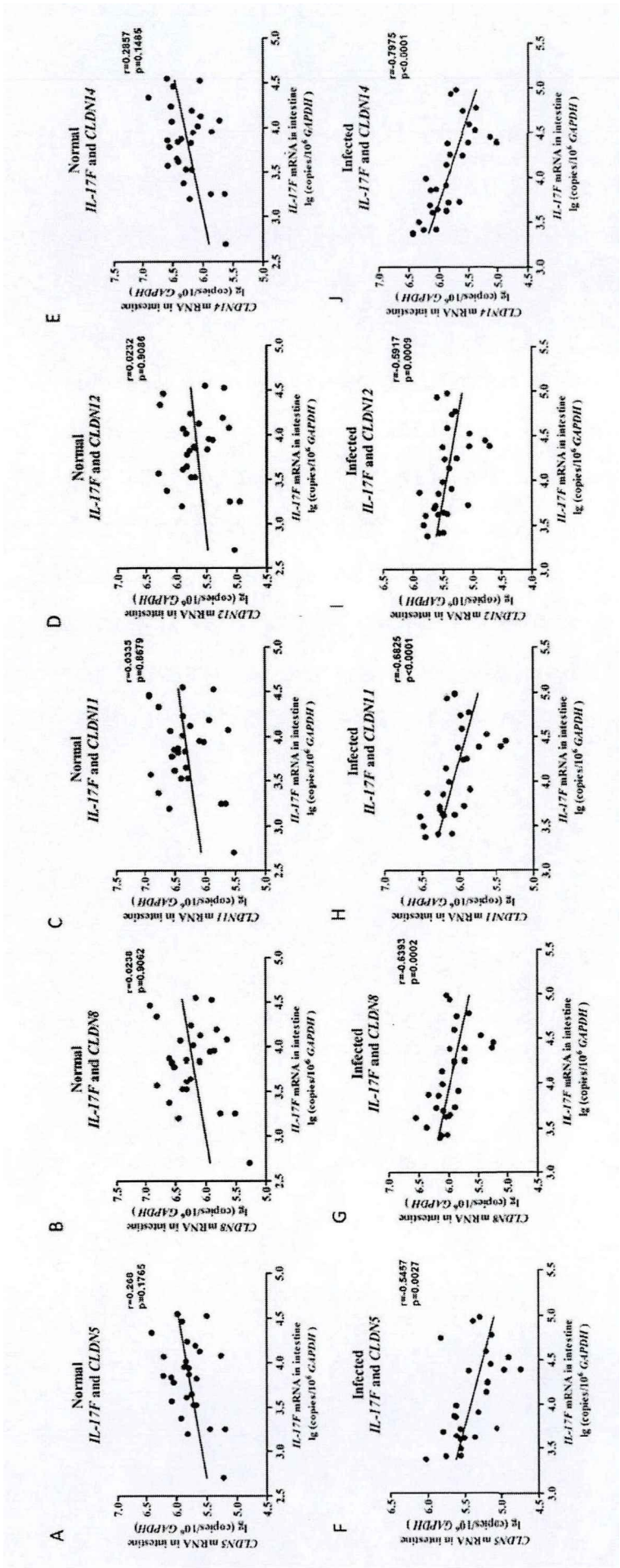


图 1.15 恒河猴肠道粘膜中 *IL-17F* 与紧密连接相关基因 mRNA 水平的相关性

Fig 1.15 Correlation between the mRNA levels of *IL-17F* and tight junction associated genes in the intestinal mucosa of *Macaca mulatta*

正常恒河猴 (A-E, n=5) 和 SHIV/SIV 感染恒河猴 (F-J, n=5) 肠道粘膜中 *IL-17F* 与 *CLDN5* (A, F)、*CLDN8* (B, G)、*CLDN11* (C, H)、*CLDN12* (D, I)、*CLDN14* (E, J) mRNA 水平的相关性分析散点图; r 为相关系数, $p < 0.05$ 为显著相关; 统计学方法: 非参数检验 Spearman test

3.3 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中 *IL-17R* 与紧密连接相关基因表达的相关性

为了研究 SHIV/SIV 感染中 IL-17 受体与肠道上皮屏障功能之间的关系, 本研究对 SHIV/SIV 感染的恒河猴 *IL-17R* 与紧密连接相关基因表达的相关性进行了分析, 发现在感染动物的大肠 (盲肠、结肠近端、直肠) 中, *IL-17RA* 分别与 *CLDN3*, *5*, *8*, *12*, *14* mRNA 的表达呈显著正相关 ($r=0.5659$, $P=0.0438$; $r=0.6727$, $P=0.0233$; $r=0.6818$, $P=0.0208$; $r=0.6182$, $P=0.0426$; $r=0.8455$, $P=0.001$) (图 1.16)。同样, 大肠中 *IL-17RC* 分别与 *CLDN2* 和 *CLDN3* 的表达呈显著正相关 ($r=0.5893$, $P=0.0101$; $r=0.6143$, $P=0.0148$) (图 1.17)。在 SHIV/SIV 感染的恒河猴小肠 (十二指肠近端、空肠近端、回肠末端) 中, *IL-17RA* 与紧密连接相关基因表达没有明显的相关性, *IL-17RC* 分别与 *CLDN1*, *3*, *4*, *7*, *15* mRNA 的表达呈显著正相关 ($r=0.6636$, $P=0.026$; $r=0.5956$, $P=0.0246$; $r=0.7133$, $P=0.0092$; $r=0.5824$, $P=0.0367$; $r=0.5824$, $P=0.0289$) (图 1.18)。提示肠道粘膜屏障通透性及紧密连接蛋白的调控中可能有 IL-17/IL-17R 信号通路的参与。

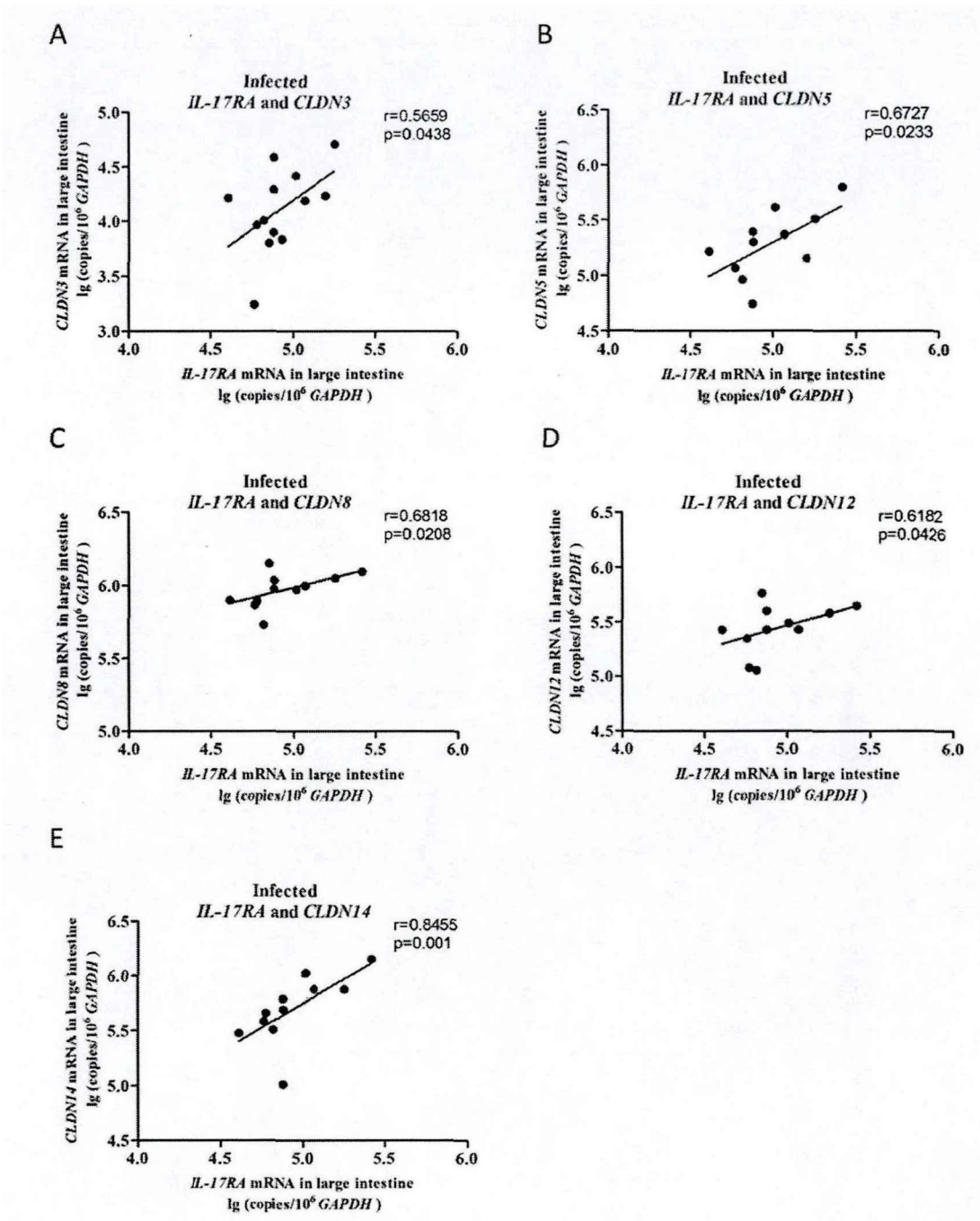


图 1.16 SHIV/SIV 感染恒河猴大肠中 *IL-17RA* 与紧密连接相关基因 mRNA 水平的相关性

Fig 1.16 Correlation between the mRNA levels of *IL-17RA* and tight junction associated genes in the large intestinal mucosa of SHIV/SIV infected *Macaca mulatta*

SHIV/SIV 感染恒河猴 (n=5) 大肠中 *IL-17RA* 与 *CLDN3* (A)、*CLDN5* (B)、*CLDN8* (C)、*CLDN12* (D)、*CLDN14* (E) mRNA 水平的相关性分析散点图; *r* 为相关系数, *p* <0.05 为

显著相关；统计学方法：非参数检验 Spearman test

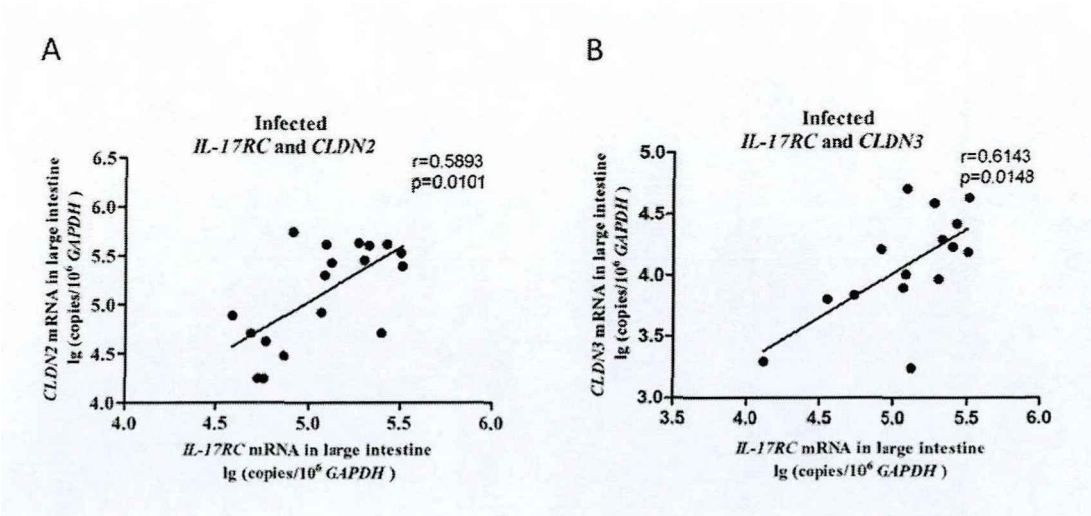


图 1.17 SHIV/SIV 感染恒河猴大肠中 *IL-17RC* 与紧密连接相关基因 mRNA 水平的相关性

Fig 1.17 Correlation between the mRNA levels of *IL-17RC* and tight junction associated genes in the large intestinal mucosa of SHIV/SIV infected *Macaca mulatta*

SHIV/SIV 感染恒河猴 (n=5) 大肠中 *IL-17RC* 与 *CLDN2* (A)、*CLDN3* (B) mRNA 水平的相关性分析散点图；r 为相关系数， $p < 0.05$ 为显著相关；统计学方法：非参数检验 Spearman test

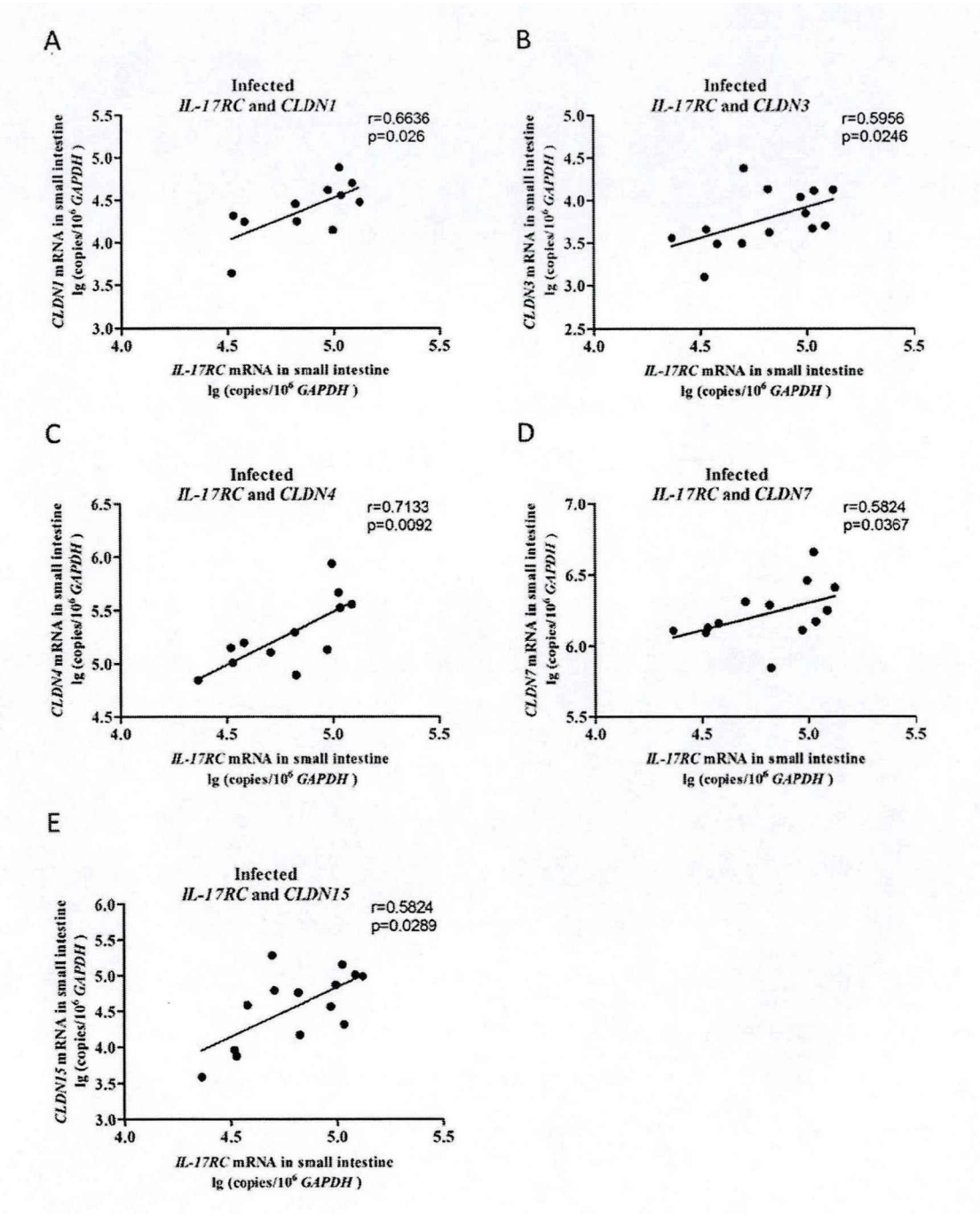


图 1.18 SHIV/SIV 感染恒河猴小肠中 *IL-17RC* 与紧密连接相关基因 mRNA 水平的相关性

Fig 1.18 Correlation between the mRNA levels of *IL-17RC* and tight junction associated genes in the small intestinal mucosa of SHIV/SIV infected *Macaca mulatta*

SHIV/SIV 感染恒河猴 (n=5) 小肠中 *IL-17RC* 与 *CLDN1* (A)、*CLDN3* (B)、*CLDN4* (C)、*CLDN7* (D)、*CLDN15* (E) mRNA 水平的相关性分析散点图: r 为相关系数, $p < 0.05$ 为显著相关; 统计学方法: 非参数检验 Spearman test

第四节 讨论

HIV/AIDS 引起的肠道上皮屏障损伤对微生物移位和系统免疫活化至关重要。本研究发现 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中 *CLDN5*, 8, 11, 12, 14 转录水平的表达较对照组降低了 2~3 倍, 且这些基因的表达两两之间存在显著正相关性。已知这些基因在屏障功能的维持中都具有重要作用, *CLDN5* 主要参与小分子渗透, 有研究表明 Caco-2 细胞稳定转染 *CLDN5* cDNA 后其跨膜电阻值升高, 甘露醇的透过率降低[128]; 在 MDCK II 细胞中, *CLDN8* 参与阳离子、铵离子及碳酸氢盐等选择性通道的形成[129, 130]; 髓鞘中 *CLDN11* 的缺失会导致其对水和小分子的渗透性增强[131], 上皮细胞中 *CLDN12* 的下调影响了维生素 D 诱导的 Ca^{2+} 的渗透[132], 此外, *CLDN11* 在胃癌、胆囊癌中的异常表达[133], *CLDN12* 在结肠癌、乳腺癌中异常表达[134], 提示二者可能与恶性肿瘤中粘膜屏障的破坏、细胞内粘附的丧失及体内渗透的紊乱直接相关; *CLDN14* 通过降低阳离子特别是钾离子的通透性来增加内皮细胞的跨膜阻力, 参与内皮屏障功能的维持, MDCK II 细胞中 *CLDN14* 过表达导致细胞的跨膜电阻值增加了 6 倍[135]。这些基因的变化提示我们在 HIV-1/SIV 感染中, 除目前已经确认的 *CLDN1*, 3, *OCLN* 和 *ZO-1* 等表达异常外, *CLDN5*, 8, 11, 12, 14 等的异常表达可能是引起肠道屏障对阳离子及水分子等渗透缺陷的重要因素, 提示在 AIDS 研究中多个以前未被重视的紧密连接相关基因参与了 HIV/AIDS 的病理过程。另外, 本研究发现 *CLDN4*, 7, 15 的表达在 SHIV/SIV 感染后并无明显改变, *CLDN4* 主要参与肾脏中介导氯离子的细胞旁路转运, 在肾小管氯的重吸收中发挥重要作用; *CLDN7* 则主要表达于在肾脏、肺脏、前列腺等组织的上皮中, SHIV/SIV 感染并没有影响肠道中 *CLDN4* 和 *CLDN7* 的表达, 说明肠道可能不是二者发挥功能的主要部位。

在 HIV-1/SIV 感染的急性期和慢性期, 表达 CCR5 的粘膜 CD4^+ T 细胞以及表达整合素 $\beta 7$ 和趋化因子受体 CCR6 的外周 HIV-1 特异性 CD4^+ T 淋巴细胞的数量都大幅度降低[136, 137]。与之前的报道一致[103-105, 138, 139], 本研究发现在 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中, *IL-17A* mRNA 表达水平下降, *IL-17A* 的低水平表达可能影响宿主粘膜屏障, 进而参与 HIV/AIDS 的病理过程[104, 140-143]。此外, 本研究还发现 *IL-17F*、*IL-17RA/IL-17RC* 在 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中表达均高于正常动物, 该结果表明, IL-17 通路的多个关键成分在 HIV-1/SIV

感染中受到了影响, IL-17F、IL-17RA 和 IL-17RC 可能与 HIV/AIDS 的发病机制有关, 在寻找 HIV/AIDS 治疗的新靶点时应予以考虑。

IL-17A 和 IL-17F 作为多种炎症性疾病和感染性疾病中重要的细胞因子, 其表达水平在疾病状态下通常会发生上调[114, 118, 122]。但 *IL-17A* 在 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中却低水平表达, 可能是 IL-17A⁺细胞的大幅度减少所致。显然, SHIV/SIV 感染中 IL-17A⁺细胞的减少并不能解释 *IL-17F* 表达量的增加, 但是并非所有的 IL-17A⁺细胞都表达 *IL-17F*, IL-17F⁺细胞也并非都表达 *IL-17A*[144], Th17 之外的 IL-17F⁺细胞可能是导致 *IL-17F* 表达增加的主要原因, 有必要对 IL-17F⁺细胞在 SHIV/SIV 感染中的变化进行深入探讨。IL-17A 和 IL-17F 的功能有所重叠但又各不相同[145, 146], 二者在调节和维持肠道屏障完整性中均有重要作用[147, 148], 推测 *IL-17A* 表达水平的下降可能直接导致 SHIV/SIV 感染中肠道屏障功能障碍, *IL-17F* 可能补偿了 *IL-17A* 表达降低的部分影响, IL-17F 在维持肠道屏障功能中的作用仍有待进一步研究。

对 *IL-17A/IL-17F* 与紧密连接相关基因的相关性分析发现, 在正常动物中, *IL-17A* 和 *IL-17F* 主要分布在紧密连接相关基因高水平表达的肠道组织, 说明在生理条件下, IL-17A 和 IL-17F 可能参与恒河猴肠道屏障功能的维持, 在 SHIV/SIV 感染动物中, *IL-17A* 分别和 *CLDN5*、*CLDN11* 的表达存在正相关性, 这可能与感染过程中 *IL-17A* 和紧密连接相关基因均表达下调有关, 说明由紧密连接异常引起的粘膜功能损伤可能与 *IL-17A* 的缺失存在一定的联系。感染动物中, *IL-17F* 主要分布于屏障受损严重(紧密连接相关基因表达水平低)的部位, 这可能是机体的一种代偿性调控行为, 提示病理状态下 IL-17F 可能在肠道紧密连接屏障功能的修复中发挥一定的作用。

本研究对正常恒河猴体内 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 的分布做了探讨, 发现 *IL-17RA* mRNA 在消化道中的平均水平低于淋巴组织, 但由于肠道相关淋巴组织的免疫细胞超过其它所有淋巴组织的总和, 因此肠道相关淋巴组织中表达的总的 IL-17RA 仍然可能是最多的。提示肠道可能是 IL-17RA 发挥功能的主要部位。此外, 本研究发现 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 表达水平均高于对照动物, 事实上, 在多种炎症性疾病中 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 的表达均会发生上调, 类风湿性关节炎患者体内 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 的过表达在该病的发病机制

中起重要作用[149], 先天性巨结肠患者的结肠上皮中 *IL-17R* 和 *Act1* 的表达均发生上调[150], 但在 HIV/AIDS 中二者的表达变化未见报道。在 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中, *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 表达水平升高且与多种紧密连接相关基因的表达存在正相关性, 提示作为 IL-17A/IL-17F 的受体, IL-17RA 和 IL-17RC 及其下游信号可能在肠道上皮细胞受损时通过调控肠道紧密连接蛋白表达的方式来限制过度渗透和修复屏障完整性, 有必要对 HIV/AIDS 中 IL-17R 与肠道屏障功能之间的关系做进一步探讨。

第五节 小结

1. SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中 *CLDN5*, *8*, *11*, *12*, *14* 的表达水平均显著低于对照组, *CLDN4*, *7*, *15* 的表达较对照组没有明显变化; *CLDN5*, *8*, *11*, *12*, *14* 的表达两两之间存在显著正相关性。
2. SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中 *IL-17A* mRNA 水平显著低于对照组, 且感染动物中 *IL-17A* 分别与 *CLDN5* 和 *CLDN11* 表达呈显著正相关性。
3. SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中 *IL-17F* 和 *IL-17R* mRNA 水平均显著高于对照组, 在感染动物中, *IL-17F* 分别与 *CLDN5*, *8*, *11*, *12*, *14* 表达呈显著负相关; *IL-17RA* 分别与 *CLDN5*, *8*, *12*, *14* 表达呈显著正相关; *IL-17RC* 分别与 *CLDN2*, *4*, *7*, *15* 表达呈显著正相关。

第二部分 IL-17A/IL-17F 对 HIV-1 gp140 介导的肠道上皮屏障损伤的保护作用

第一节 引言

HIV/AIDS 相关肠道屏障功能障碍始发于 HIV-1 感染的早期,微生物及其产物通过受损的肠道进入机体,刺激免疫系统引起免疫活化,可能是贯穿 HIV-1 感染始终的病理机制[151, 152]。虽然长期的抗逆转录病毒治疗可将感染者体内的病毒量控制在检测水平以下,并使系统的免疫活化维持在较低水平,但肠道屏障损伤仅能得到部分恢复,这使得 AIDS 治疗方法的探索变得更加复杂[147, 153]。作为肠粘膜屏障最重要的组成成分,肠道上皮细胞间的紧密连接结构在维持屏障机械结构完整性和肠粘膜正常功能的执行中发挥了不可替代的作用。紧密连接结构不仅能够维持屏障机械结构完整性,对水、溶质等具有选择渗透性,还能通过限制膜脂和蛋白质的横向扩散来维持细胞极性。紧密连接表达异常会引起肠道免疫紊乱及肠道屏障破坏,甚至危及生命[154, 155]。肠道屏障功能修复可降低微生物移位和系统免疫活化,对 AIDS 的功能性治疗起到促进作用[156]。

目前,对 AIDS 中肠道屏障功能障碍的机制知之甚少,可能是病毒组分的存在和病毒感染的间接作用引起了紧密连接的破坏[88]。已有大量报道指出,在 HIV/AIDS 感染过程中,HIV-1 gp120、Tat 蛋白以及 HIV-1 粘膜上皮相关炎症过程的激活均可诱导紧密连接相关基因的表达下调,致使粘膜屏障功能障碍[78]。HIV-1 gp120 能够破坏血脑屏障和血视网膜屏障中紧密连接的完整性[82, 84],且能够造成肺泡上皮和生殖道上皮屏障功能的紊乱[157-159],此外,HIV-1 gp120 对肠粘膜屏障的完整性也具有破坏作用[88]。HIV-1 gp140 为去除了跨膜区和胞内区的截短型 HIV-1 膜蛋白,它保存了 HIV-1 gp120 和 gp41 完整的膜外区结构,其细胞毒性较 HIV-1 gp160 大大降低,且与 HIV-1 gp120 相比,HIV-1 gp140 具有更多的中和表位[160]。但目前关于 HIV-1 gp140 对粘膜屏障功能的损伤研究较少。

紧密连接的通透性可以受多种细胞因子的调控[48, 161, 162],已知 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-4、IL-6、IL-13、和 TNF- α 等炎性细胞因子能够下调紧密连接相关基

因的表达, 增加上皮通透性, IL-17、TGF- β 、EGF 等能够降低上皮通透性, 但细胞因子在肠道屏障功能恢复中的作用尚不清楚。第一部分的研究已指出, SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中 *IL-17A*、*IL-17F* 及 *IL-17RA/IL-17RC* 表达均发生显著变化, 且这些因子与紧密连接相关基因的表达均存在相关性, 这些结果提示我们 IL-17A 和 IL-17F 及其受体可能参与 HIV/AIDS 中紧密连接相关基因表达异常的调控。事实上, 已有报道指出 IL-17A 能够上调 *CLDN1* 和 *CLDN2* 的表达[162], 但其对其它紧密连接蛋白的影响知之甚少, IL-17 家族其它成员对紧密连接的调控也鲜有报道。

IL-17A 和 IL-17F 均以 IL-17RA 和 IL-17RC 为受体, 其受体结合以后, 受体中包含的 SEFIR 结构域与下游的信号分子 Act1 相互作用[118], 激活下游 ERK, JNK/SAPK, p38 MAPK 以及 NF- κ B 等信号通路[111, 163], 诱导产生多种细胞因子(IL-6, GM-CSF, G-CSF)、抗菌肽(S100A8, S100A9, β -defensin-2)、趋化因子(CXCL1, CXCL5, CCL2, CCL7, CCL20)、基质金属蛋白酶(MMP1, MMP3, MMP9, MMP12, MMP13) 以及黏蛋白(MUC5AC, MUC5B) [164]。Act1 是 IL-17R 通路中一种重要的信号转导元件, 其缺失可导致 IL-17 下游信号的激活存在选择性缺陷[165]。在肠道粘膜中, IL-17/IL-17R 通路在抑制肠道上皮周围细菌的繁殖, 维持粘膜屏障完整性中发挥至关重要的作用[111, 123, 124]。NF- κ B 是 IL-17R 下游的一个重要的信号通路, IL-17R 可以通过 ERK、JNK/SAPK、p38 MAPK 和 TRAF-6 依赖的 NF- κ B 信号通路调控免疫相关受体、细胞因子、炎症因子、粘附分子等靶基因的表达。有报道曾指出 IL-17A 可能通过 Ras-Raf-MEK-ERK 这一 MAPK 信号通路促进 T84 细胞间紧密连接的形成[162], 但 IL-17 影响紧密连接的其它分子基础仍有待进一步探讨。

本部分利用 Caco-2 细胞作为肠道上皮屏障的体外研究模型, 检测了 HIV-1 gp140 介导的肠道上皮损伤中多种紧密连接相关基因表达的变化, 探讨了 IL-17A 和 IL-17F 对 HIV-1 gp140 介导的屏障损伤的影响并对参与该生物过程的信号通路进行了初步探讨。

第二节 材料和方法

1 实验材料及试剂

1.1 主要仪器设备

- (1) WD-9405B 水平摇床 (北京市六一仪器厂)
- (2) Sanyo CO₂ 恒温细胞培养箱 (SANYO, Japan)
- (3) ROTANTA 46 R 台式冷冻离心机 (ROTANTA, Germany)
- (4) Amersham Imager 600 成像仪 (Amersham, USA)
- (5) 电热恒温水槽 (上海一恒科技有限公司)
- (6) DYCP-40C 型电泳仪及 DYY-7C 型电泳仪 (北京市六一仪器厂)
- (7) DYY-31A 型水平电泳槽 (北京市六一仪器厂)
- (8) 振荡器 (Eppendorf, Germany)
- (9) Epoch2 微孔板分光光度计 (BioTek, USA)
- (10) 85-2 定时恒温磁力搅拌器 (上海司乐仪器有限公司)
- (11) Millicell-ERS 电阻仪 (Millipore, USA)
- (12) 细胞计数仪 (Nihon Kohden, Japan)
- (13) FACSCalibur 流式细胞仪 (BD Biosciences, USA)

其它仪器设备同第一部分。

1.2 主要试剂及抗体

动物组织及细胞总蛋白提取试剂盒购自康为世纪生物科技有限公司; SuperSignal Western Blot 增强试剂盒、Act1 干扰 RNA 及 LipofectamineTM RNAiMAX 转染试剂购自美国 Invitrogen; SuperSignal West Femto 底物超敏试剂盒购自美国 Pierce; DMEM 培养基、胰酶 (0.25% Trypsin-EDTA) 和 100×青链霉素购自 Hyclone; 胎牛血清、丙酮酸钠和非必须氨基酸均购自 GIBICO; HIV-1 gp140 购自 Sino Biological Inc; 人重组 IL-17A、人重组 IL-17F 和 FITC-dextran 购自 Sigma; RNAiso Plus 购自日本 TaKaRa; BCA 法蛋白定量试剂盒及 NF-κB 信号通路选择性抑制剂 BAY11-7082 购自上海碧云天生物技术公司; MAPK 信号通路选择性抑制剂 U0126 购自华中海威基因科技有限公司。

RELA (NF-κB-p65) 多克隆抗体购自美国 ABclonal; Act1 和 NF-κB-p65 (phospho Ser529) 多克隆抗体购自美国 ImmunoWay; P38 MAPK (PT180/PY182)

单克隆抗体购自美国 BD; P38 MAPK α 多克隆抗体、CLDN1 多克隆抗体、OCLN 多克隆抗体及 ZO-1 单克隆抗体均购自美国 Invitrogen; β -actin 单克隆抗体购自北京博奥龙免疫技术有限公司; 山羊抗兔 IgG HRP 标记二抗购自康为世纪生物科技有限公司; 山羊抗鼠 IgG HRP 标记二抗购自美国 Santa Cruz。

1.3 主要溶液及配制

- (1) HIV-1 gp140 与细胞结合缓冲液: HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, MnCl_2 1 mM, CaCl_2 0.1 mM, BSA 0.5%, NaN_3 0.009%, 加入 800 mL 去离子水充分溶解, 定容至 1 L, 4℃ 保存备用。
- (2) SDS-PAGE 缓冲液: Tris-Base 3.02 g, 甘氨酸 18.8 g, SDS 1.0 g, 加入 800 mL 去离子水充分溶解后定容至 1 L, 室温保存备用。
- (3) 转膜缓冲液: Tris-Base 0.303 g, 甘氨酸 6.906 g, SDS 1.0 g, 加入 800 mL 去离子水充分溶解后定容至 1 L, 室温保存备用。
- (4) PBST 缓冲液: 0.1 M 磷酸盐缓冲液 500 mL, 加入 1 mL Tween-20 充分混匀后室温保存备用。
- (5) TBST 缓冲液: NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g, 1M Tris-HCl (pH 值为 7.5) 50 mL, Tween-20 0.5 mL, 加入 800 mL 去离子水充分溶解后定容至 1 L, 室温保存备用。
- (6) 5%脱脂牛奶: 脱脂乳 5 g, 加入 100 mL TBST 缓冲液充分溶解, 4℃ 保存备用。
- (7) 3%脱脂牛奶: 脱脂乳 3 g, 加入 100 mL TBST 缓冲液充分溶解, 4℃ 保存备用。
- (8) 5×SDS-PAGE Loading Buffer: 1 M Tris-HCl (pH 值为 6.8) 1.25 mL, 甘油 2.5 mL, SDS 0.5 g, 溴酚蓝 25 mg, 加入去离子水定容至 5 mL, 室温保存备用, 使用前加入 250 μL β -巯基乙醇。
- (9) 10% SDS-PAGE 分离胶: 30% Acrylamide 1.7 mL, 1.5 M Tris-HCl (pH 值为 8.8) 1.3 mL, 10% APS 0.05 mL, 10% SDS 0.05 mL, 去离子水 2.0 mL, TEMED 2 μL 。
- (10) 12% SDS-PAGE 分离胶: 30% Acrylamide 2.0 mL, 1.5 M Tris-HCl (pH 值为 8.8) 1.3 mL, 10% APS 0.05 mL, 10% SDS 0.05 mL, 去离子水 1.7 mL,

TEMED 2 μ L。

(11) 15% SDS-PAGE 分离胶: 30% Acrylamide 2.5 mL, 1.5 M Tris-HCl (pH 值为 8.8) 1.3 mL, 10% APS 0.05 mL, 10% SDS 0.05 mL, 去离子水 1.2 mL, TEMED 2 μ L。

(12) 4% SDS-PAGE 浓缩胶: 30% Acrylamide 0.5 mL, 1.5 M Tris-HCl (pH 值为 6.8) 0.38 mL, 10% APS 0.03 mL, 10% SDS 0.03 mL, 去离子水 2.1 mL, TEMED 3 μ L。

其它溶液及配制同第一部分。

1.4 主要生物学软件

蛋白免疫印迹条带光密度分析软件: ImageJ。

流式细胞术数据分析软件: FlowJo 7.6.1

其它生物学软件同第一部分。

2 实验方法

2.1 CD4⁺ T 淋巴细胞的阳性分选

- (1) PBMC 计数后 300 rcf 离心 10min, 小心弃尽上清。
- (2) 每 10^7 个细胞中加入 80 μ L 分选缓冲液使 PBMC 重悬。
- (3) 每 10^7 个细胞中加入 20 μ L CD4 MicroBead, 充分混匀后置于 4℃ 孵育 15 min。
- (4) 每 10^7 个细胞中加入 1 至 2 mL 的分选缓冲液, 300 rcf 离心 10 min, 小心弃尽上清。
- (5) 加入 500 μ L 分选缓冲液使细胞重悬 (细胞数量不超过 10^8)。
- (6) 将 MS 分选柱置于分选器上并加入 500 μ L 分选缓冲液冲洗 MS 分选柱。
向 MS 分选柱中加入细胞悬液, 流出的液体即为磁珠未标记的细胞, 待细胞悬液完全流出后, 向 MS 分选柱中加入分选缓冲液冲洗 3 次, 每次 500 μ L。
- (7) 从分选器中取下 MS 分选柱, 向其中加入 1 mL 分选缓冲液并收集流出的液体。
- (8) 重复操作步骤 (7)。
- (9) 向收集液中加入 RPMI-1640 全培养基并离心 2~3 次, 去除分选缓冲液,

即得到富集的 CD4⁺ T 淋巴细胞。

2.2 CD4⁺ T 淋巴细胞的培养

CD4⁺ T 淋巴细胞从健康人 PBMC 中分选获得,培养基为含有 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素及链霉素的 RPMI-1640 完全培养基,在含 IL-2 的完全培养基中加入 PHA 至终浓度为 2 $\mu\text{g/mL}$, 5% CO₂, 37℃ 条件下刺激培养 3 天备用。

2.3 Caco-2 细胞的培养及处理

人结肠腺癌细胞 Caco-2 由本实验室保存,培养基为含有 10%胎牛血清、100 U/ml 青霉素及链霉素、1%丙酮酸钠、1%谷氨酰胺和 1%非必须氨基酸的 DMEM,培养条件为 5% CO₂, 37℃ 静置培养。

在 IL-17A/IL-17F 及 HIV-1 gp140 对 Caco-2 细胞中紧密连接蛋白表达影响的实验中, Caco-2 细胞以 10⁶ 个/孔的密度接种到 6 孔板中,待细胞单层铺满率达到 80~90%,加入 IL-17A、IL-17F 至终浓度为 100 ng/mL,或加入 HIV-1 gp140 至终浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$, 37℃ 培养 24 h 后收集细胞进行转录水平检测或 48 h 后收集细胞进行蛋白水平检测。

在信号通路抑制实验中, Caco-2 细胞以 10⁶ 个/孔的密度接种到 6 孔板中,待细胞单层铺满率达到 80~90%,向细胞上清液中加入 NF- κ B 选择性抑制剂 BAY11-7082 (10 μM) 或 MAPK 选择性抑制剂 U0126 (10 μM),对照组中加入相同体积的 DMSO, 37℃ 孵育 2 h 后,小心弃掉上清并用 PBS 缓慢清洗细胞 2 次,加入 IL-17A (100 ng/mL)、IL-17F (100 ng/mL) 或 HIV-1 gp140 (1 $\mu\text{g/mL}$), 37℃ 培养 24h 后收集细胞进行转录水平检测或 48 h 后收集细胞进行蛋白水平检测。

2.4 Caco-2 单层屏障模型的构建及屏障功能检测

Caco-2 细胞以 10⁵ 个/cm² 的密度接种到 24 孔嵌入式培养皿中,每 2~3 天更换新鲜培养基,连续培养 18~21 天,跨上皮细胞电阻值 (TER) 达到 500 $\Omega\cdot\text{cm}^2$ 说明细胞单层屏障模型构建成功。

上皮细胞的屏障功能可通过测定 TER 和测定上皮对 FITC-Dextran 的透过率进行评估。向 Caco-2 细胞单层屏障模型的嵌入式培养皿上层小室加入 IL-17A (100 ng/mL)、IL-17F (100 ng/mL) 或 HIV-1 gp140 (1 $\mu\text{g/mL}$), 37℃ 孵育一定时间 (见结果) 后进行屏障功能测定。在 TER 的测定试验中,将孵育完成的细

胞室温静置 10 min，用 Millicell-ERS 电阻仪测定 TER。在测定 FITC-Dextran 透
过率的试验中，向嵌入式培养皿上层小室加入终浓度为 2.5 mg/mL 的
FITC-Dextran 并在 37℃ 孵育 3h，收集下层培养液，用荧光分析系统(TecanGENios
reader) 分析培养液中 FITC-Dextran 的荧光强度。

2.5 HIV-1 gp140 与细胞结合实验

- (1) 单细胞悬液的制备：将 Caco-2 细胞接种于 25T 细胞培养瓶中，待细胞单
层铺满后，用 PBS 洗 3 次，加入适量胰酶消化并收集细胞于 15 mL 离心
管中，1000 rpm 室温离心 5 min，弃液，加入 2 mL PBS 重悬细胞，1000 rpm
室温离心 5 min，弃液并加入 1 mL Binding Buffer 轻柔重悬细胞后备用；
CD4⁺ T 淋巴细胞为悬浮细胞，直接收集细胞于 15 mL 离心管中，按上述
步骤离心备用。
- (2) 细胞计数：取 10 μL 细胞悬液加入 90 μL PBS 中进行 10 倍稀释，用移液
器轻柔混匀，用细胞计数仪对细胞进行计数。
- (3) 将步骤（1）中的细胞分装到流式管中，每管的细胞数量约为 10⁶ 个。
- (4) 分别向每管中加入一定量的 HIV-1 gp140-FC 蛋白，轻微震荡混匀后冰上
孵育 30 min。
- (5) 每管中加入 500 μL Binding Buffer，轻微震荡混匀，1000 rpm 室温离心 5
min，弃液。
- (6) 重复操作步骤（5），弃液后每管中加入抗人 IgG-FC FITC 标记的二抗，室
温避光孵育 30 min。
- (7) 重复操作步骤（5）两次，每管中加入 200 μL PBS，震荡使细胞成为单细
胞悬液，用 FACSCalibur 收集细胞。

2.6 基因标准品的构建

方法同第一部分，RT-PCR 扩增引物序列及参考基因见表 2.1。

表 2.1 RT-PCR 引物序列及参考基因

Table 2.1 The primer sequences and reference genes for RT-PCR

Primer name	Sequence 5'-3'	Reference genes
CLDN1 primer F	GCG ACA ACA TCG TGA C	NM_021101.4; NM_001193969.1
CLDN1 primer R	ACA GGA ACA GCA AAG TAG	

<i>CLDN3</i> primer F	GGT CCG CCA ACA CCA TTA TCC G	NM_001306.3; NM_001194562.1
<i>CLDN3</i> primer R	TCC TTG CGG TCG TAG GCT GTG	
<i>OCN</i> primer F	GCA TTG CTC ATC CTG AAG ATC	U53823.1; XM_002804403.1
<i>OCN</i> primer R	CTG CTC TTG GGT CTG TAT AGC	
<i>ZO-1</i> primer F	CGG ATG GTG CTA CAA GTG	NM_003257.4; XM_002804692.1
<i>ZO-1</i> primer R	CAG GGG AGT CTA TTC TAT G	

2.7 细胞中的总 RNA 提取

- RNAiso Plus 法提取细胞中总 RNA。
- (1) 向 10⁷ 个细胞中加入 1mL RNAiso Plus，将裂解后的样品室温放置 5~10 min，使核蛋白与核酸完全分离。
 - (2) 加入 0.2 mL 三氯甲烷，剧烈震动 1 min，室温放置 5 min，12000 rpm 4℃ 离心 10 min。
 - (3) 吸取上层水相并转移至 RNase Free 离心管中，加入等体积的异丙醇，混匀后于-20℃放置 30 min。
 - (4) 12000 rpm 4℃ 离心 10 min，弃上清液。
 - (5) 加入 1 ml 75%的乙醇洗涤沉淀，12000 rpm 4℃ 离心 5 min，弃上清，室温干燥 5~10 min。
 - (6) 加入 30~50 μL RNase Free ddH₂O 充分溶解 RNA，将 RNA 溶液分装后置于-80℃保存备用。

2.8 实时荧光定量 RT-PCR

方法同第一部分，扩增引物及探针序列见表 2.2。

表 2.2 实时荧光定量 RT-PCR 引物探针序列及参考基因

Table 2.2 Primers and probe sequences and reference genes for Real-time RT-PCR

Primer name	Sequence 5'-3'	Reference sequence
q <i>CLDN1</i> primer F	GTC TTT GAC TCC TTG CTG AAT CTG	NM_021101.4; NM_001193969.1
q <i>CLDN1</i> primer R	TTG CTA TCA CTC CCA GGA GGA T	
q <i>CLDN1</i> probe	CAG CAC ATT GCA AGC AAC CCG TG	
q <i>CLDN3</i> primer F	GTC CGC CAA CAC CAT TAT CC	NM_001306.3; NM_001194562.1

qCLDN3 primer R	GTA CAG GCT CGT GCC CAT CT	
qCLDN3 probe	TAC AAC CCC GTG GTG CCT GAG GC	
qOCLN primer F	TCA GCC ATG TCA TCC AGG	U53823.1; XM_002804403.1
qOCLN primer R	AGA TGG CAA TGC ACA TCA CA	
qOCLN probe	CTC TTG AAA GTC CAC CTC CTT ACA G	
qZO-1 primer F	ACA AGT GAT GAC CTT GAT TTG CAT	NM_003257.4; XM_002804692.1
qZO-1 primer R	GTC TAC TGT CCG TGC TAT ACA TTG AGT	
qZO-1 probe	ATG ATC GTC TGT CCT ACC TGT CAG CTC CA	

2.9 蛋白免疫印迹

2.9.1 细胞中总蛋白的提取

向预冷的蛋白抽提试剂中加入 1%体积的蛋白酶抑制剂，配制成蛋白抽提工作液，工作液要求现用现配。向 10⁶ 个 Caco-2 细胞中加入 200 μL 蛋白抽提工作液，冰上孵育 20 min，1000 rcf 4℃ 离心 15min，收集上清并分装。

2.9.2 蛋白浓度测定

- 按照 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书测定蛋白浓度。
- (1) 取 0.8 mL 蛋白标准配制液加入 20 mg BSA 蛋白标准中充分溶解，配制成 25 mg/mL 蛋白标准溶液。
 - (2) 取适量 25 mg/mL 蛋白标准溶液，加入 PBS 稀释至终浓度为 0.5 mg/mL。
 - (3) 取 50 体积 BCA 试剂 A 加入 1 体积 BCA 试剂 B,充分混匀后配制成 BCA 工作液。
 - (4) 将蛋白标准品按照 0, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 20 μL 加入 96 孔板的标准品孔中，加 PBS 将各孔补足到 20 μL。
 - (5) 向 96 孔板的样品孔中加入 2 μL 待测蛋白样品，每孔加入 18 μL PBS。
 - (6) 向各标准品孔和各样品孔中分别加入 200 μL BCA 工作液，37℃ 放置 30 min。
 - (7) 将 96 孔板放入酶标仪中,测定 A562,根据标准曲线计算蛋白样品的浓度。

2.9.3 SDS-PAGE

- (1) 配制浓缩胶及分离胶，将装好的凝胶板放置于电泳槽中，加入 SDS-PAGE

电泳缓冲液。

- (2) 向收集的蛋白样品中加入适量 5×SDS-PAGE Loading Buffer, 混匀后煮沸 10 min 使蛋白充分变性。
- (3) 待变性的蛋白样品冷却到室温后, 将其直接上样到 SDS-PAGE 胶加样孔内, 上样时需根据不同蛋白样品的浓度调节上样体积, 保证每孔的上样蛋白量一致。样品孔旁需加入 5 μ L 预染蛋白质分子量标准液。
- (4) 连接电源, 设定电压为 80V 使样品通过浓缩胶, 待溴酚蓝进入下层分离胶时将电压调节为 120V, 待溴酚蓝到达胶的底端处附近时停止电泳。

2.9.4 转膜

- (1) 剪取适当大小的 PVDF 膜并将其浸泡于甲醇中待用, 剪取适当大小的转印滤纸并将其浸泡于转膜缓冲液中至饱和待用。
- (2) 将切胶刀的斜边楔入两块胶板之间的缝隙中小心撬开, 小心分离聚丙烯酰胺凝胶和胶板。
- (3) 将转印滤纸放在凝胶顶部, 小心将胶转移置滤纸上, 该过程保证转印缓冲液持续饱和滤纸。
- (4) 放置到平面上后, 用切胶刀切掉聚丙烯酰胺凝胶的加样孔和底边, 将预先浸泡过的 PVDF 膜轻放到凝胶的上面将其覆盖, 然后将浸泡过的转印滤纸轻放到 PVDF 膜上。
- (5) 将制备好的聚丙烯酰胺凝胶及膜的夹层缓慢转移至转印槽中, 保证从阳极到阴极的顺序依次为: 滤纸、PVDF 膜、凝胶、滤纸。用玻璃棒轻轻推赶排除所有气泡。
- (6) 连接电源, 调节电流为 150mA, 恒流转印 1h。

2.9.5 免疫反应

转膜完毕后, 用 SuperSignal Western Blot 增强试剂盒对 PVDF 膜进行处理, 继而进行后续的免疫反应。

- (1) 将 PVDF 膜置于超纯水中摇动洗涤 2 min, 弃掉超纯水, 再用超纯水将 PVDF 膜冲洗 2 遍。
- (2) 向 PVDF 膜中加入足够体积的抗原预处理液使膜充分浸泡, 室温孵育 10 min。

- (3) 弃掉液体, 用超纯水将 PVDF 膜冲洗 5 遍。
- (4) 封闭: 向 PVDF 膜中加入 5% 脱脂牛奶, 室温摇动孵育 2 h。
- (5) 弃掉封闭液, 向 PVDF 膜中加入 TBST 缓冲液, 摇动洗涤 3 次, 每次 5 min。
- (6) 用抗原预处理液稀释一抗, 稀释比例为 1: 1000, 将 PVDF 膜充分浸入稀释好的一抗中, 4℃ 孵育过夜。
- (7) 弃掉一抗, 向 PVDF 膜中加入 TBST 缓冲液, 摇动洗涤 4 次, 每次 5 min。
- (8) 用 3% 脱脂牛奶稀释二抗, 稀释比例为 1: 8000, 将 PVDF 膜充分浸入稀释好的二抗中, 室温避光摇动孵育 30 min。
- (9) 弃掉二抗, 向 PVDF 膜中加入 TBST 缓冲液, 摇动洗涤 5 次, 每次 5 min。
- (10) 根据 SuperSignal West Femto 底物超敏试剂盒说明书, 将稳定剂和增强发光剂按 1: 1 混合, 室温下避光保存 (现用现配)。
- (11) 将发光液均匀滴加到 PVDF 膜上, 室温孵育 1~2 min, 用吸水纸吸去多余发光液。将 PVDF 膜用保鲜膜固定, 用 Amersham Imager 600 成像仪扫膜或用医用 X 胶片进行曝光显影。

2.10 *Act1* siRNA 干扰试验

- (1) 设计特异性识别 *Act1* 序列的 siRNA 序列如下: 5'-GAC ACU GGC CAU GAC UCA GAC AAA U-3'。
- (2) 将 Caco-2 细胞接种到六孔板中, 接种密度为 0.5×10^6 个/孔, 培养 24 h, 待细胞的单层铺满率达到 60~80% 后加入 PBS 轻柔的清洗细胞 2 次备用。
- (3) 取两个离心管, 向第一个离心管中加入 150 μ L 无血清培养基和 9 μ L 转染试剂, 向第二个离心管中加入 150 μ L 无血清培养基和 3 μ L siRNA (30 pmol)。
- (4) 将两个离心管中的液体 1: 1 混合, 室温静置 5 min。
- (5) 将转染试剂-siRNA 混合液缓慢滴加入细胞中, 37℃ 培养 24 h。
- (6) 小心弃掉细胞上清液, 用 PBS 缓慢冲洗细胞 2 次后备用。

其它实验方法同第一部分。

第三节 实验结果

1 HIV-1 gp140 直接破坏肠道上皮细胞屏障的完整性

1.1 HIV-1 gp140 与 CD4⁺ T 淋巴细胞结合

从健康人的 PBMC 中阳性分选 CD4⁺ T 淋巴细胞，在含 IL-2 的完全培养液中加入终浓度为 2 μg/mL 的 PHA，5% CO₂ 37℃ 刺激培养 3 天，离心收集细胞，将细胞分为 6 组，向每组细胞中分别加入终浓度为 0.1 μg/mL、1 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL 的 HIV-1 gp140，孵育后加入抗人 IgG-FC FITC 标记的二抗，用流式细胞术检测与 HIV-1 gp140 结合的 CD4⁺ T 淋巴细胞量。如图 2.1 所示，当 HIV-1 gp140 作用浓度为 1 μg/mL 时，CD4⁺ T 细胞中 FITC 阳性细胞率为 17.9%，随着 HIV-1 gp140 作用剂量的加大，阳性细胞率逐渐升高，当 HIV-1 gp140 作用剂量为 20 μg/mL 时，阳性细胞率可达到 75%。

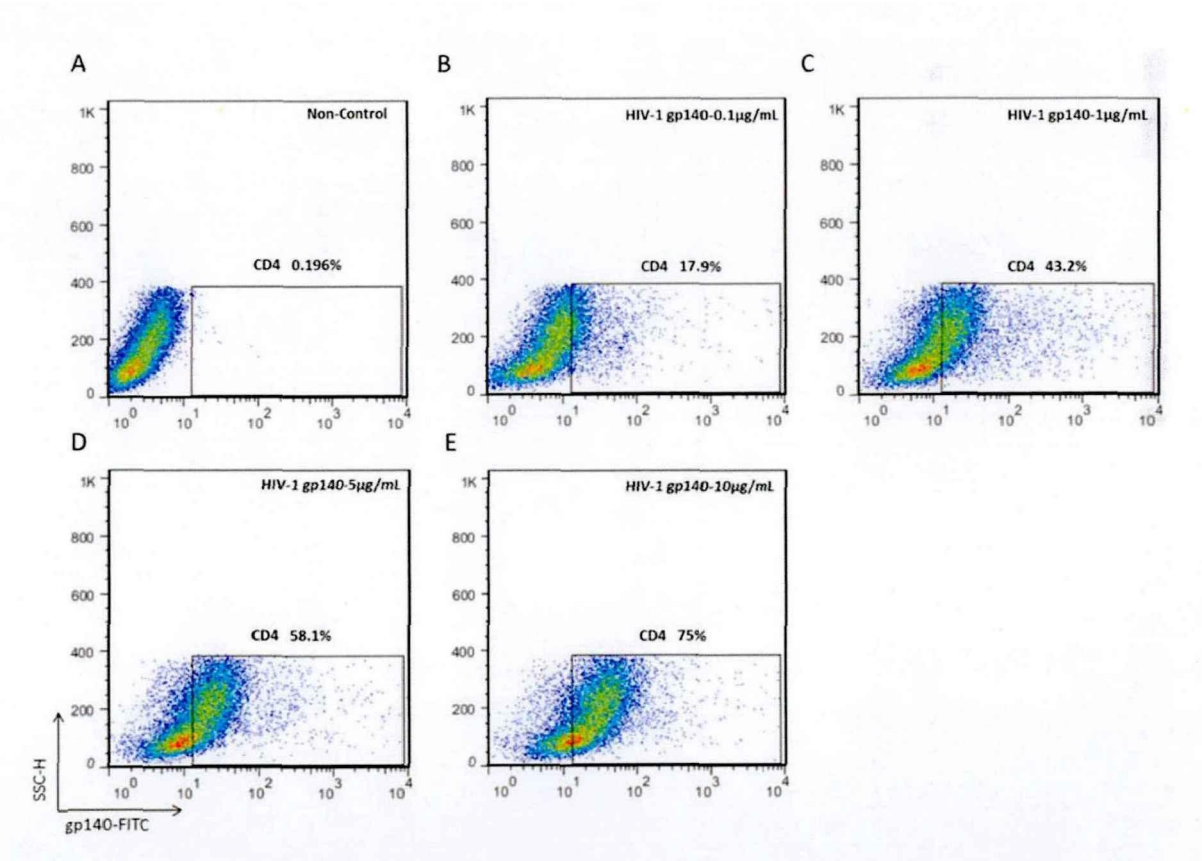


图 2.1 不同浓度的 HIV-1 gp140 与 CD4⁺ T 淋巴细胞的结合

Fig 2.1 The binding of different concentrations of HIV-1 gp140 to CD4⁺ T lymphocytes

CD4⁺ T 淋巴细胞分别与 0 μg/mL (A)、0.1 μg/mL (B)、1 μg/mL (C)、5 μg/mL (D)、10 μg/mL (E) 的 HIV-1 gp140 结合能力的流式检测

1.2 HIV-1 gp140 与 Caco-2 细胞结合

Caco-2 细胞培养至单层铺满后，用胰酶消化并离心收集细胞，检测其与 HIV-1 gp140 的结合情况。如图 2.2 所示，HIV-1 gp140 蛋白能够与 Caco-2 细胞结合，当 HIV-1 gp140 作用剂量为 0.1 μg/mL 时，Caco-2 细胞中 FITC 阳性细胞率为 6.27%，当 HIV-1 gp140 浓度增加到 1 μg/mL 时，阳性细胞率达到 19.1%，当 HIV-1 gp140 作用浓度继续增加到 5 μg/mL 和 10 μg/mL 时，阳性细胞率较 1 μg/mL 时没有明显的变化。此外，本研究通过流式细胞术检测了 Caco-2 细胞表面 CD4 的表达情况，发现 Caco-2 细胞表面几乎没有 CD4 的表达（图 2.3），说明 HIV-1 gp140 是与 Caco-2 细胞表面 CD4 以外的其它受体结合。

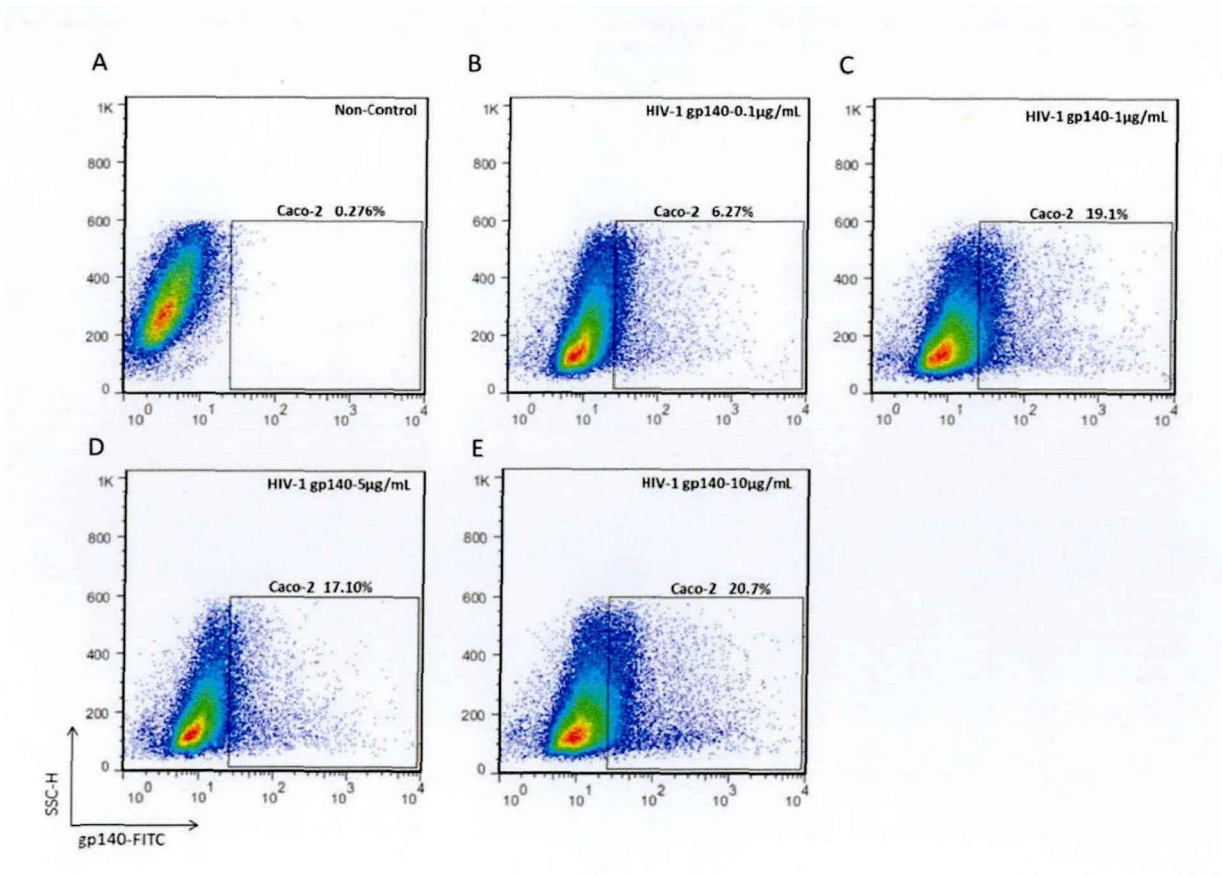


图 2.2 不同浓度的 HIV-1 gp140 与 Caco-2 细胞的结合

Fig 2.2 The binding of different concentrations of HIV-1 gp140 to Caco-2 cells

Caco-2 细胞分别与 0 $\mu\text{g/mL}$ (A)、0.1 $\mu\text{g/mL}$ (B)、1 $\mu\text{g/mL}$ (C)、5 $\mu\text{g/mL}$ (D)、10 $\mu\text{g/mL}$ (E) 的 HIV-1 gp140 结合能力的流式检测

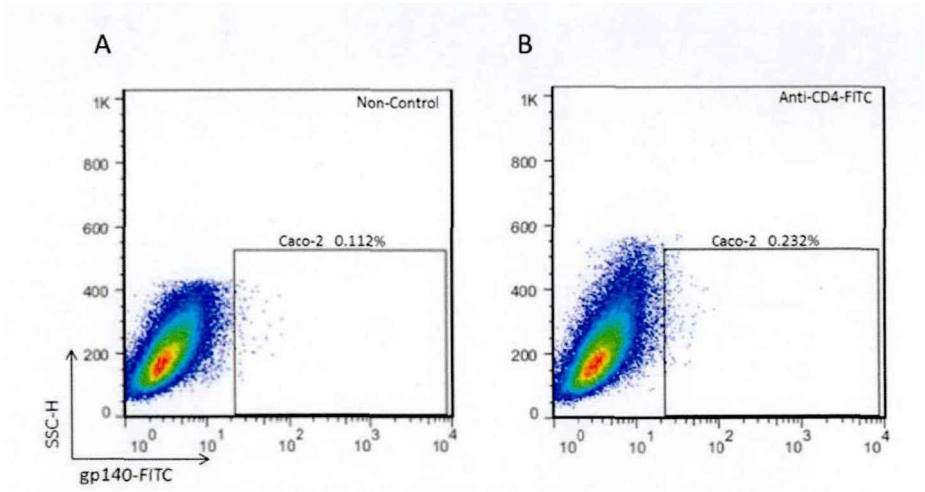


图 2.3 Caco-2 细胞表面 CD4 的流式检测

Fig 2.3 Flow cytometry of CD4 on Caco-2 cells

A. 正常细胞对照; B. Caco-2 细胞与 anti-CD4-FITC 抗体结合

1.3 HIV-1 gp140 增加肠道上皮屏障的通透性

向 Caco-2 细胞单层屏障模型的嵌入式培养皿上层小室加入终浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 HIV-1 gp140, 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别孵育 0h、3h、8h、24h、48h 后用 Millicell-ERS 电阻仪测定 TER。如图 2.4A 所示, 对照组在 0h 到 48h 的 TER 基本恒定, 而 HIV-1 gp140 处理 3h 后 TER 较对照组降低了 23% ($P=0.0053$), 24h 后 TER 降低到对照组的 70% ($P=0.005$), TER 在 HIV-1 gp140 处理后 24h 到 48h 保持稳定。

为了对 TER 的结果进行验证, 本研究检测了 HIV-1 gp140 蛋白对 Caco-2 单层屏障通透性的影响。如图 2.4B 所示, HIV-1 gp140 处理 3h 后 FITC-Dextran 的透过率增加了约 40% ($P=0.0491$), 处理 24h 后 FITC-Dextran 的透过率增加了约 50% ($P=0.0097$) 并在 24h 到 48h 保持稳定。

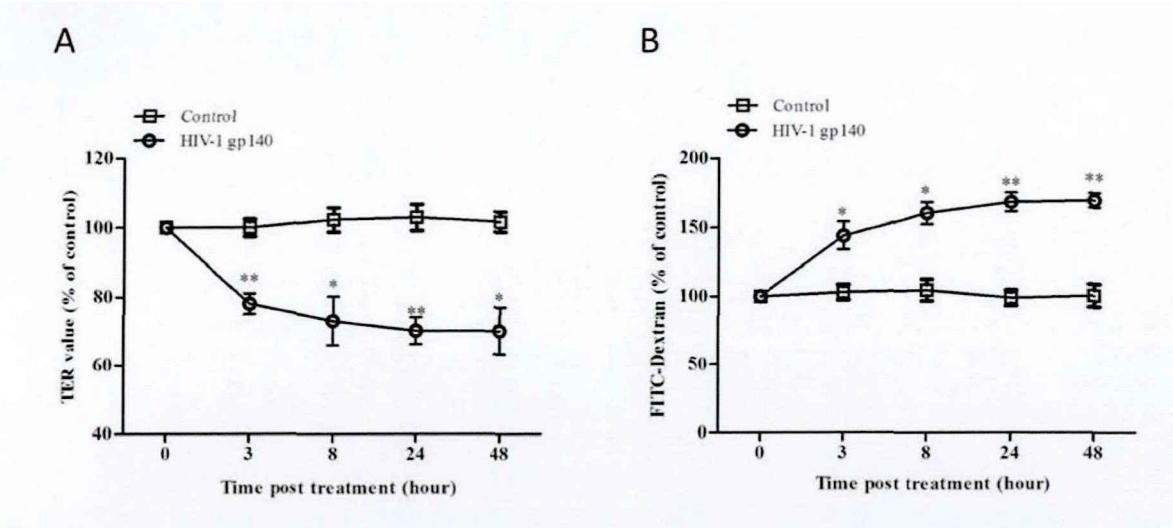


图 2.4 HIV-1 gp140 对 Caco-2 细胞上皮通透性的影响

Fig 2.4 Effect of HIV-1 gp140 on the paracellular permeability of Caco-2 cell monolayers

HIV-1 gp140 作用不同时间点对 Caco-2 细胞 TER (A) 和 FITC-Dextran 透过率 (B) 的影响；垂直条代表平均值±SD (n=3)，统计学方法：unpaired two-tailed t test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$)

1.4 HIV-1 gp140 下调肠道上皮紧密连接相关基因的表达

为了探讨 HIV-1 gp140 对紧密连接相关基因表达的影响，本研究用实时荧光定量 RT-PCR 的方法检测了 HIV-1 gp140 作用 24 h 后 Caco-2 细胞紧密连接相关基因转录水平的变化。如图 2.5 所示，与对照组相比，HIV-1 gp140 处理组中 *CLDN1*, 2, 3, 5, 7, 8, *OCN* 和 *ZO-1* mRNA 下调表达了 2~2.5 倍 ($P=0.0328$; $P=0.0181$; $P=0.005$; $P=0.0038$; $P=0.001$; $P=0.0239$; $P=0.0008$; $P=0.0002$)，*CLDN4* 下调表达了约 3.5 倍 ($P=0.003$)，*CLDN11* 和 *CLDN12* 的表达也发生了下调，但没有统计显著性 ($P=0.0924$; $P=0.1268$)。另外，*CLDN14* 和 *CLDN15* 的表达并没有明显的改变。

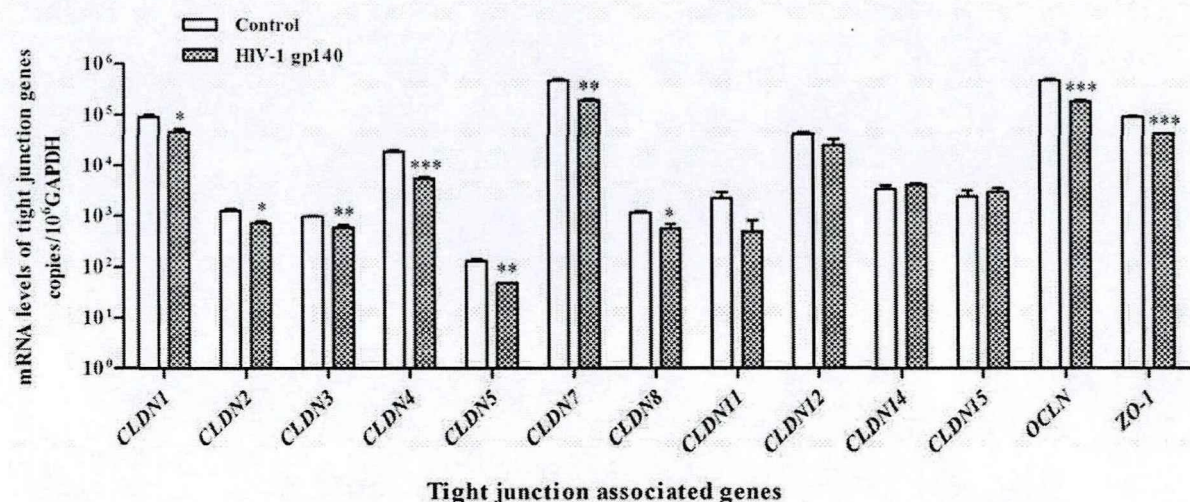


图 2.5 HIV-1 gp140 改变 Caco-2 细胞紧密连接相关基因的表达

Fig 2.5 HIV-1 gp140 treatment altered tight junction associated genes expression of Caco-2 cell monolayers

HIV-1 gp140 处理 24 h 后 Caco-2 细胞中紧密连接相关基因 mRNA 水平的 qPCR 检测；垂直条代表平均值 $\pm$ SD ($n=3$)，统计学方法：unpaired two-tailed t test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$)

2 IL-17A 和 IL-17F 阻止 HIV-1 gp140 介导的肠道上皮细胞屏障的破坏

2.1 IL-17A 和 IL-17F 对肠道上皮通透性的影响

为了研究 IL-17A 和 IL-17F 单独作用及联合作用对 Caco-2 上皮通透性及 HIV-1 gp140 介导的肠道上皮屏障损伤的影响，本研究检测了 HIV-1 gp140 存在或不存在的条件下，IL-17A 和 IL-17F 单独及联合作用 24h 后 Caco-2 细胞 TER 及 FITC-Dextran 透过率的变化。如图 2.6 所示，HIV-1 gp140 不存在时，IL-17A 或 IL-17F 单独作用均使 TER 和 FITC-Dextran 透过率产生轻微的改变。HIV-1 gp140 存在时，IL-17A 处理使 TER 较 HIV-1 gp140 单独处理组显著增加($P=0.033$)，FITC-Dextran 透过率显著降低 ($P=0.0189$)，IL-17F+gp140 处理使 TER 和 FITC-Dextran 透过率均产生轻微改变。而无论 HIV-1 gp140 是否存在，IL-17A 和 IL-17F 的联合作用均能够使 TER 显著增加 ($P=0.0404$; $P=0.018$)，FITC-Dextran 透过率显著降低 ($P=0.0447$; $P=0.017$)，且二者联合作用对 TER 和 FITC-Dextran

透过率的影响大于单独作用之和。说明 IL-17A 和 IL-17F 均能够降低肠道上皮的通透性，阻止 HIV-1 gp140 介导的肠道上皮的通透性的增加，且二者具有协同作用。

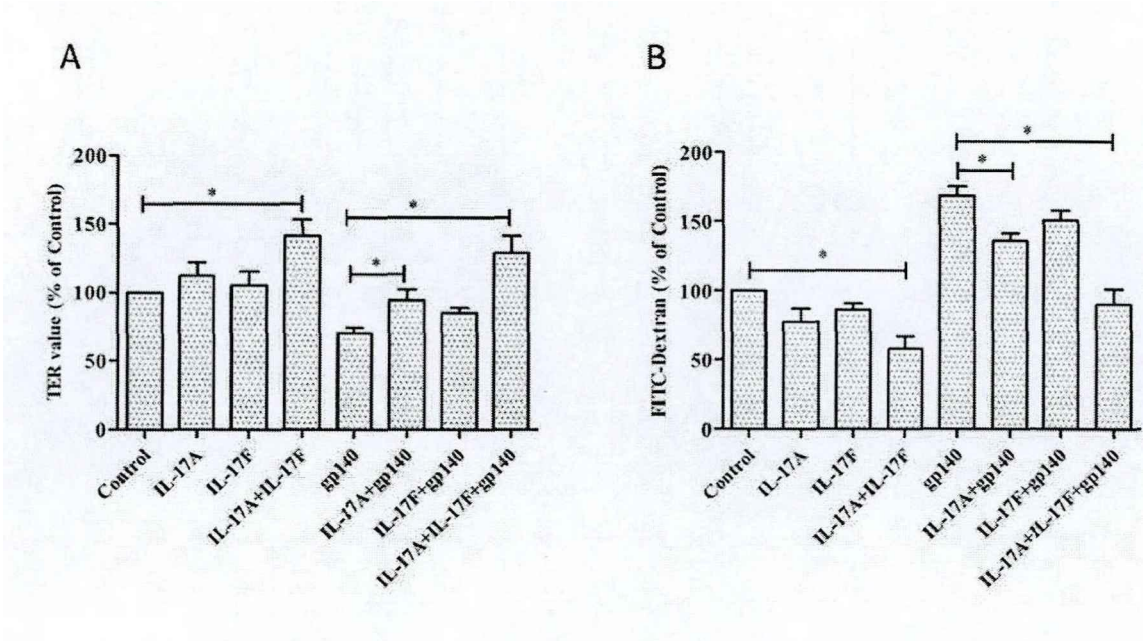


图 2.6 IL-17A 和 IL-17F 对 Caco-2 细胞屏障功能的影响

Fig 2.6 The effects of IL-17A and IL-17F on barrier function in Caco-2 cell monolayers

A. IL-17A 和 IL-17F 对 Caco-2 细胞 TER 的影响；B. IL-17A 和 IL-17F 对 Caco-2 细胞 FITC-Dextran 透过率的影响；垂直条代表平均值±SD (n=3)，统计学方法：unpaired two-tailed t test (*: $P < 0.05$)

2.2 IL-17A 和 IL-17F 对肠道上皮紧密连接蛋白表达的影响

本研究分别用实时荧光定量 RT-PCR 和 Western blot 的方法检测了 IL-17A 和 IL-17F 对紧密连接蛋白 *CLDN1*，*OCLN* 和 *ZO-1* 转录及蛋白表达的影响。如图 2.7 所示，无论 HIV-1 gp140 是否存在，IL-17A 均能显著上调 *CLDN1* ($P=0.0484$ ； $P=0.0016$) 和 *ZO-1* ($P=0.0054$ ； $P=0.0069$) 转录水平的表达，而 IL-17F 对 *CLDN1* 和 *ZO-1* mRNA 仅产生轻微的影响。在 HIV-1 gp140 存在时，IL-17A 和 IL-17F 单独作用均能显著上调 *OCLN* 的表达 ($P=0.0152$ ； $P=0.0041$)。IL-17A 和 IL-17F 联合作用均能够显著上调 *CLDN1*、*OCLN* 和 *ZO-1* 的表达，且联合作用的促表达

效果大于单独作用之和,说明 IL-17A 和 IL-17F 能够协同促进 *CLDN1*、*OCLN* 和 *ZO-1* 的表达。在 HIV-1 gp140 存在时, IL-17A 和 IL-17F 协同作用的促紧密连接表达效果甚至高于未经 HIV-1 gp140 处理的对照组 ($P=0.0093$; $P=0.047$; $P=0.0314$)。Western blot 检测了 IL-17A 和 IL-17F 联合作用对 *CLDN1*、*OCLN* 和 *ZO-1* 蛋白水平的影响,结果与实时荧光定量 RT-PCR 一致 (图 2.7D)。

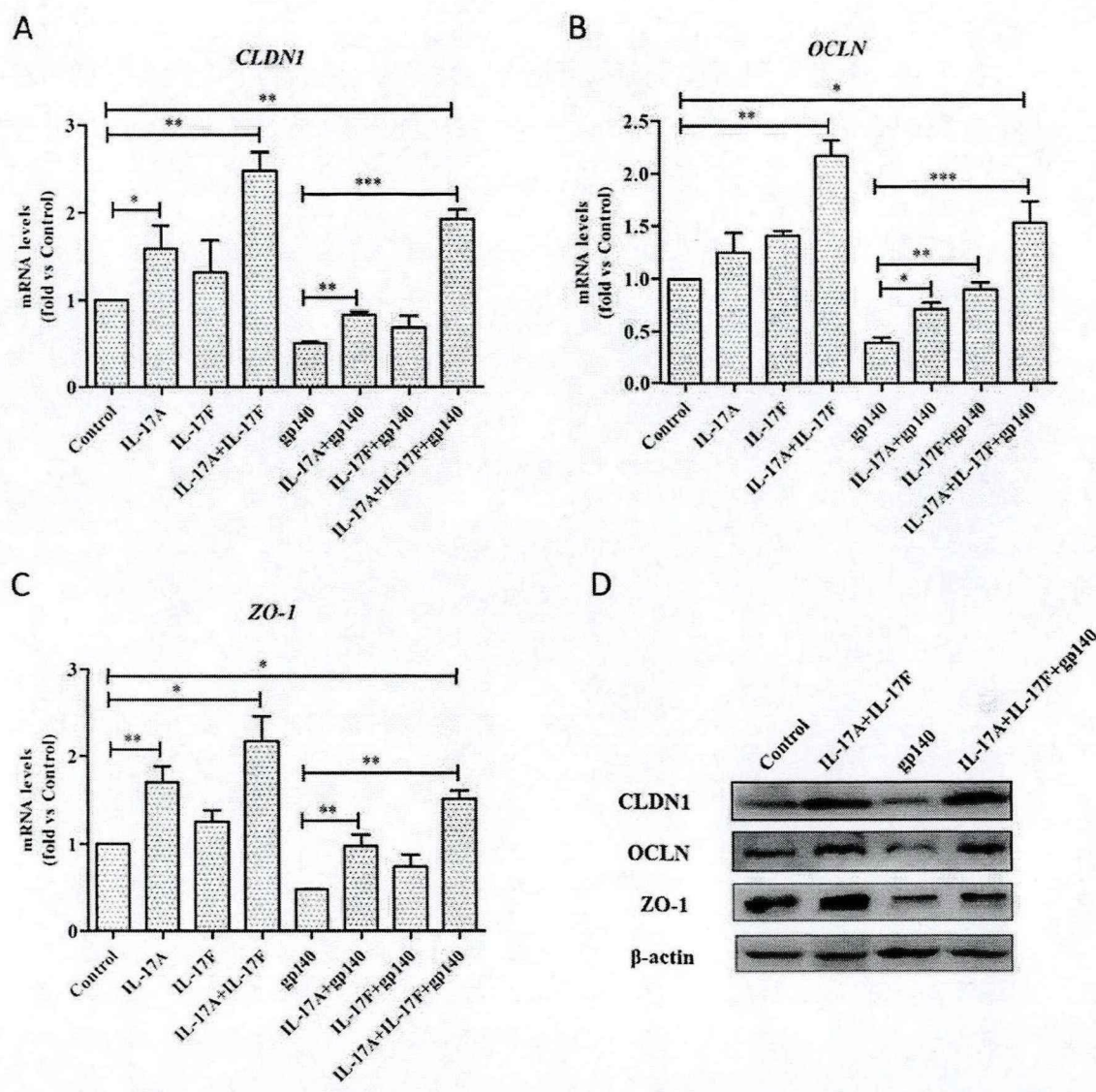


图 2.7 IL-17A 和 IL-17F 对 Caco-2 细胞中 *CLDN1*、*OCLN* 和 *ZO-1* 表达的影响

Fig 2.7 The effects of IL-17A and IL-17F on *CLDN1*, *OCLN* and *ZO-1* expression in Caco-2 cell monolayers

IL-17A 和 IL-17F 处理 24 h 后 Caco-2 细胞中 *CLDN1*、*OCLN* 和 *ZO-1* mRNA 水平的 qPCR 检测(A-C)及处理 48 h 后蛋白水平的 Western blot 检测(D);垂直条代表平均值 $\pm$ SD($n=3$), 统计学方法: unpaired two-tailed t test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$)

另外,本研究用实时荧光定量 RT-PCR 的方法检测了 IL-17A 和 IL-17F 对其紧密连接相关基因表达的影响。如图 2.8 所示, IL-17A 和 IL-17F 单独作用或联合作用均会导致 *CLDN2*, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 14, 15 mRNA 发生不同程度的上调。IL-17A 单独作用使 *CLDN5* mRNA 上调表达了 2 倍 ($P=0.0349$), *CLDN2* 和 *CLDN15* mRNA 也上调表达了接近 2 倍, 但没有统计显著性; IL-17F 单独作用使 *CLDN5* 和 *CLDN11* mRNA 均上调表达了 2 倍 ($P=0.0402$, $P=0.0606$); IL-17A 和 IL-17F 联合作用使 *CLDN5* mRNA 上调表达了接近 3 倍 ($P=0.0157$), *CLDN2* 和 *CLDN12* mRNA 上调表达约 2 倍 ($P=0.0048$, $P=0.0452$), *CLDN7* 和 *CLDN15* mRNA 均上调表达约 1.5 倍 ($P=0.0637$, $P=0.0179$)。除 *CLDN4*, 14, 15 外, IL-17A 和 IL-17F 联合作用对 *CLDN2*, 3, 5, 7, 8, 11, 12 等紧密连接相关基因的促表达作用效果均优于单独作用。

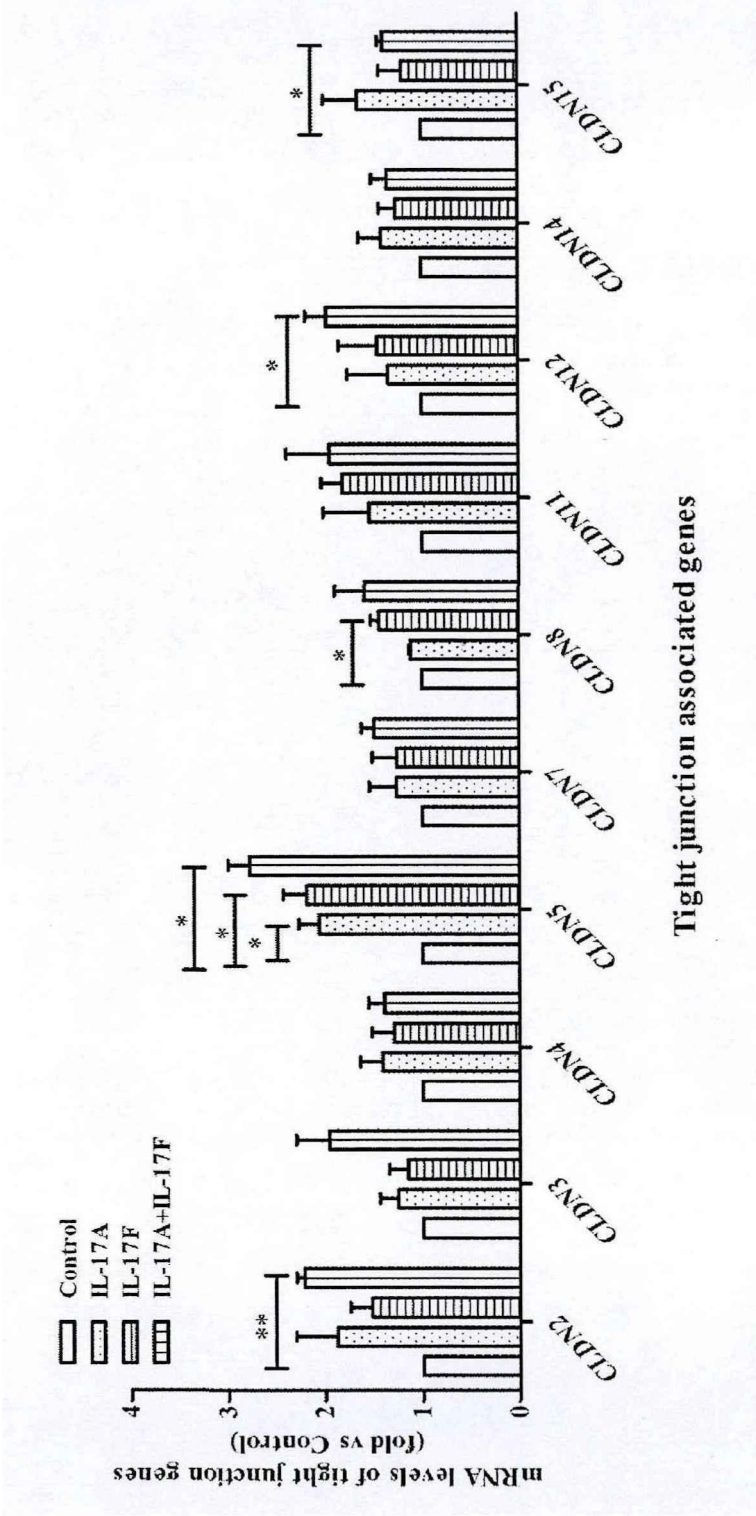


图 2.8 IL-17A 和 IL-17F 对 Caco-2 细胞中其它紧密连接相关基因表达的影响

Fig 2.8 The effects of IL-17A and IL-17F on other tight junction associated genes expression in Caco-2 cell monolayers

IL-17A 或 IL-17F 或 IL-17A+IL-17F 处理 24 h 后 Caco-2 细胞中紧密连接相关基因 mRNA 水平的 qPCR 检测；垂直条代表平均值±SD (n=3)，统计学方法：unpaired two-tailed t test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$)

3 IL-17A 和 IL-17F 通过 Act1 依赖通路介导 Caco-2 细胞中紧密连接相关基因和蛋白的表达

作为 IL-17A 和 IL-17F 的受体，IL-17RA 和 IL-17RC 的胞质区都包含一个保守的 SEFIR 结构域，IL-17R 通过该结构域与 Act1 结合活化下游信号。为了探讨 IL-17A 和 IL-17F 介导的促紧密连接表达过程是否有 IL-17R 下游信号的参与，本研究检测了 *Act1* 表达抑制对 IL-17A+IL-17F 介导的紧密连接表达的影响。如图 2.9 所示，siRNA 干扰 Caco-2 细胞中 *Act1* 的表达后，*Act1* 转录水平下调表达了 70% ($P=0.0448$)，蛋白表达也得到了明显的抑制。

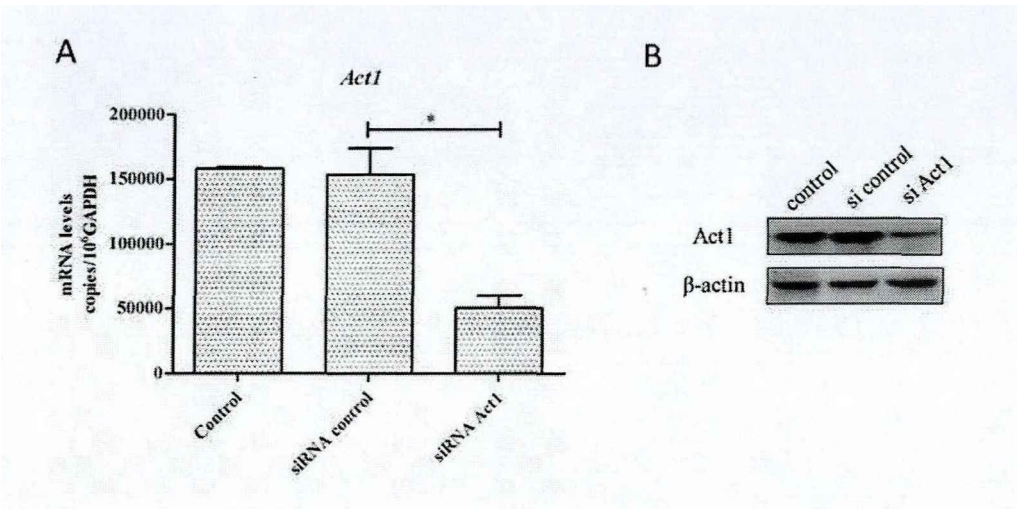


图 2.9 siRNA 抑制 Caco-2 细胞中 *Act1* 的表达

Fig 2.9 siRNA inhibits *Act1* expression in Caco-2 cells

siRNA *Act1* 处理 24 h 后 Caco-2 细胞中 *Act1* mRNA 水平的 qPCR 检测 (A) 和蛋白水平的 Western blot 检测 (B); 垂直条代表平均值 $\pm$ SD ($n=3$), 统计学方法: unpaired two-tailed t test (*: $P < 0.05$)

siRNA 抑制 *Act1* 表达后，对照组及 HIV-1 gp140 单独处理组紧密连接相关基因的表达未受影响，然而，IL-17A+IL-17F 介导的 *OCN* 和 *ZO-1* 转录水平的表达较对照组 (siRNA control) 发生了显著下调 ($P=0.0239$; $P=0.0246$) (图 2.10B 和 C)，IL-17A+IL-17F 介导的 *CLDN1* 转录水平的表达较对照组也发生了下调，但没有统计显著性 (图 2.10A)。蛋白水平检测结果显示，siRNA *Act1* 抑制了

IL-17A+IL-17F 介导的 OCLN 和 ZO-1 蛋白的表达，但对 CLDN1 蛋白水平没有明显的影响（图 2.10D）。

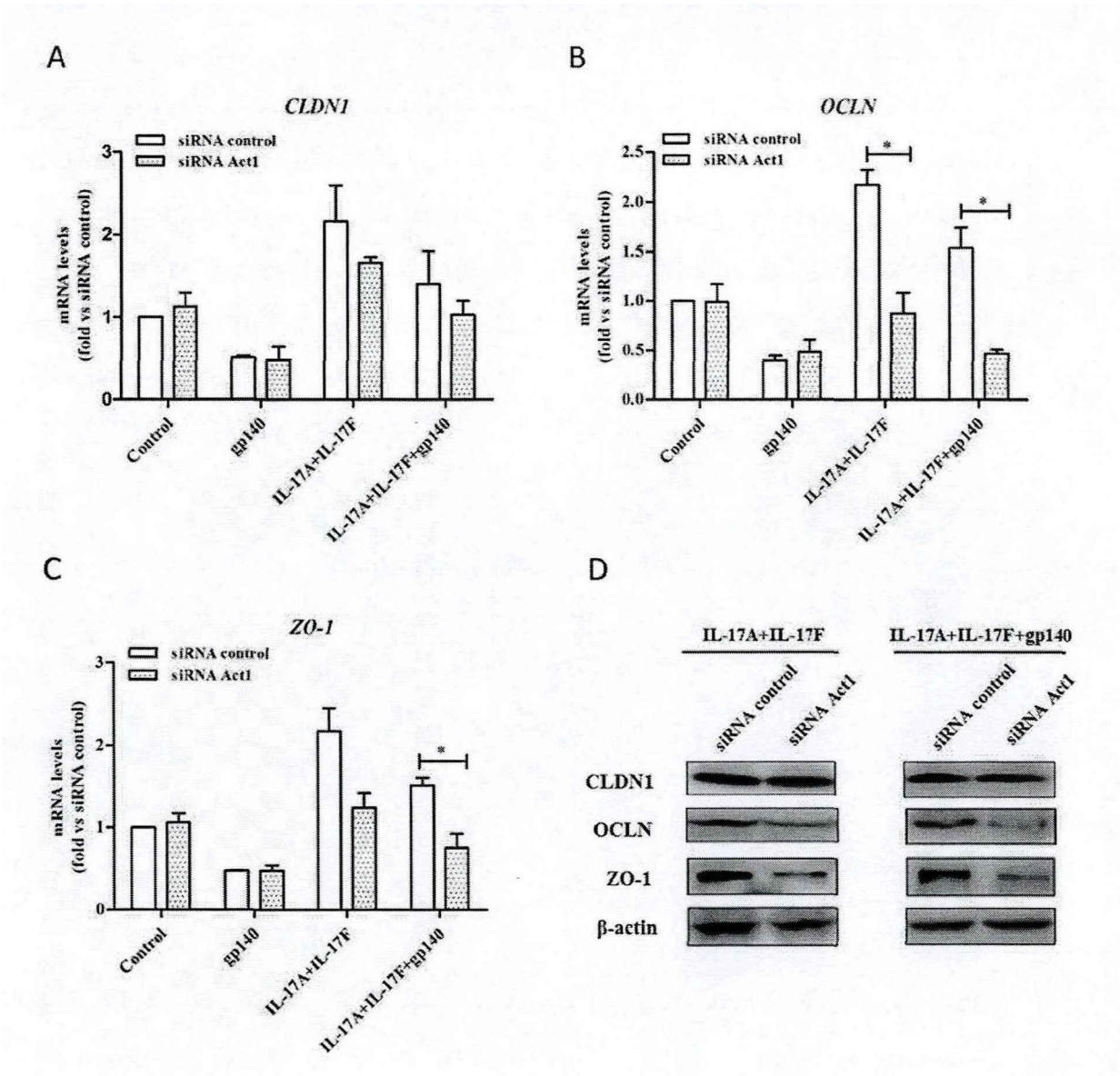


图 2.10 siRNA 抑制 *Act1* 后影响了 Caco-2 细胞中 IL-17A+IL-17F 介导的 *CLDN1*、*OCLN* 和 *ZO-1* 的表达

Fig 2.10 Suppression of *Act1* by siRNA alleviated IL-17A+IL-17F-induced expression of *CLDN1*, *OCLN* and *ZO-1*

siRNA 处理 Caco-2 细胞 24 h，加入 IL-17A/IL-17F/gp140 处理 24 h 后 Caco-2 细胞中 *CLDN1*、*OCLN* 和 *ZO-1* mRNA 水平的 qPCR 检测 (A-C) 和处理 48 h 后蛋白水平的 Western blot 检测

(D); 垂直条代表平均值±SD (n=3), 统计学方法: unpaired two-tailed t test (*: $P < 0.05$)

4 NF-κB 和 MAPK 信号通路参与 IL-17A/IL-17F 介导的紧密连接相关基因的表达

Caco-2 细胞单层铺满以后, 向细胞中加入 IL-17A(100 ng/mL)和 IL-17F(100 ng/mL), 作用 0 min、15 min、30 min、60 min 后收集细胞样品并提取细胞总蛋白, 用 Western blot 方法检测 NF-κB p65 蛋白和 MAPK p38 蛋白磷酸化水平并与总蛋白水平做了比较。如图 2.11 所示, NF-κB p65 在 IL-17A+IL-17F 作用后 15 min 开始活化, 并随着作用时间的延长活化水平依次递增, 在作用后 60 min 活化程度最高; MAPK p38 蛋白在 IL-17A+IL-17F 作用后 30min 开始活化, 60 min 活化程度最高。该研究结果表明 IL-17A+IL-17F 能够活化 NF-κB 和 MAPK 信号通路。

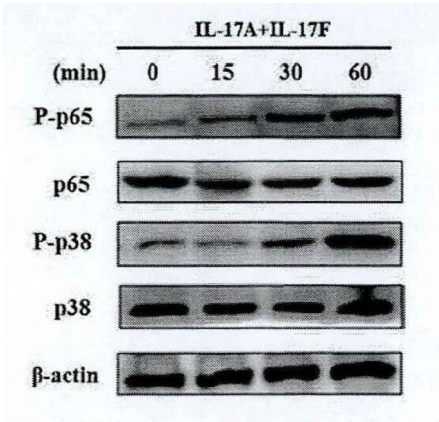


图 2.11 IL-17A+IL-17F 对 Caco-2 细胞中 NF-κB p65 蛋白和 MAPK p38 蛋白磷酸化水平的影响

Fig 2.11 Effects of IL-17A+IL-17F on the phosphorylation of NF-κB subunit p65 and MAPK p38 proteins in Caco-2 cells

IL-17A+IL-17F 处理不同时间点后 Caco-2 细胞中 NF-κB p65 蛋白、MAPK p38 蛋白及磷酸化蛋白的 Western blot 检测

为了进一步说明 IL-17A+IL-17F 调控紧密连接蛋白表达的过程中有 NF-κB 和 MAPK 信号通路的参与, 本研究用 NF-κB 选择性抑制剂 BAY11-7082 和 MAPK 激酶 MEK1/2 抑制剂 U0126 分别抑制通路活性, 并检测其对 IL-17A+IL-17F 介导的 *CLDN1*、*OCLN* 和 *ZO-1* 表达的影响。如图 2.12 所示, 通路抑制剂并没有影

响对照组及 HIV-1 gp140 单独处理组紧密连接相关基因的表达; BAY11-7082 显著抑制了 IL-17A+IL-17F 介导的 *CLDN1*、*OCLN* 和 *ZO-1* 转录水平的表达 ($P=0.036$; $P=0.0251$; $P=0.0438$) (图 2.12A、B 和 C); 而 U0126 仅显著抑制了 IL-17A+IL-17F 介导的 *ZO-1* 转录水平的表达 ($P=0.0402$) (图 2.12C), 对 *OCLN* 转录水平也具有一定的抑制作用, 但没有统计显著性 (图 2.12B); U0126 对 IL-17A+IL-17F 介导的 *CLDN1* 的转录水平几乎没有抑制作用 (图 2.12A)。同样, 在 HIV-1 gp140 存在时, BAY11-7082 显著抑制了 IL-17A+IL-17F 介导的 *CLDN1* 和 *ZO-1* 转录水平的表达 ($P=0.0436$; $P=0.0335$), 对 IL-17A+IL-17F 介导的 *OCLN* mRNA 也存在一定的抑制作用, 但没有统计显著性; U0126 仅对 IL-17A+IL-17F 介导的 *ZO-1* 转录水平的表达存在显著的抑制作用 ($P=0.0473$)。蛋白水平检测结果与转录水平一致, BAY11-7082 对 *CLDN1*、*OCLN* 和 *ZO-1* 均产生了抑制作用, 而 U0126 仅对 *ZO-1* 蛋白具有明显的抑制作用 (图 2.12D)。

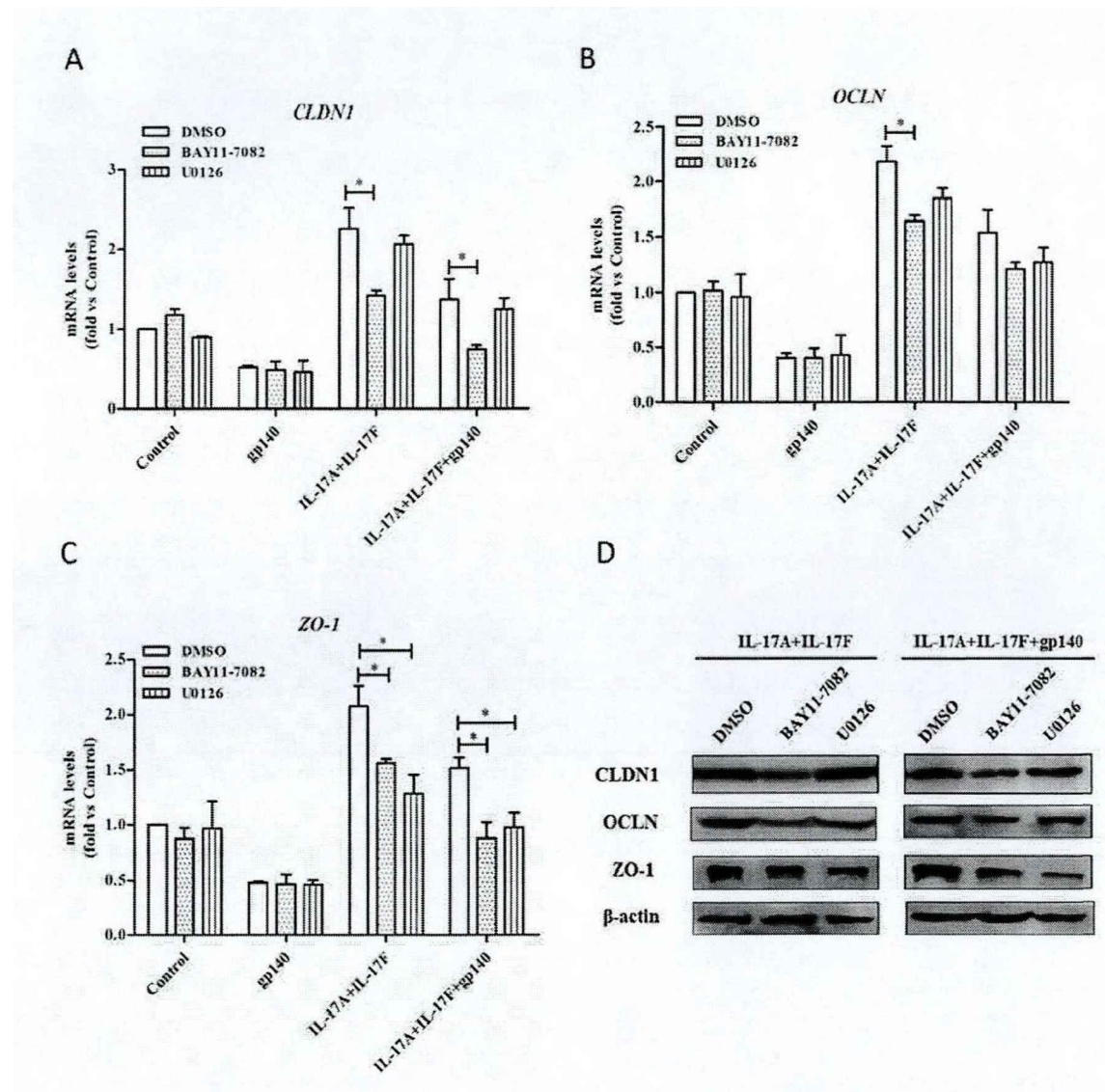


图 2.12 NF-κB 和 MAPK 通路选择性抑制剂影响 Caco-2 细胞中 IL-17A 和 IL-17F 介导的 *CLDN1*、*OCLN* 和 *ZO-1* 的表达

Fig 2.12 Selective inhibitors of NF-κB and MAPK signaling influence IL-17A and IL-17F-mediated expression of *CLDN1*, *OCLN* and *ZO-1* in Caco-2 cells

通路选择性抑制剂处理 Caco-2 细胞 2 h，加入 IL-17A/IL-17F/gp140 处理 24 h 后 Caco-2 细胞中 *CLDN1*、*OCLN* 和 *ZO-1* mRNA 水平的 qPCR 检测(A-C)和处理 48 h 后蛋白水平的 Western blot 检测 (D)；垂直条代表平均值±SD (n=3)，统计学方法：unpaired two-tailed t test (*: $P < 0.05$)

第四节 讨论

HIV-1 膜蛋白不仅是 T 细胞反应的目的抗原, 还是保护性中和抗体反应的唯一靶标。HIV-1 gp140 为去除了跨膜区和胞内区的截短型 HIV-1 膜蛋白, 本研究通过流式细胞术观察发现 HIV-1 gp140 能够与 Caco-2 细胞结合, 但由于 Caco-2 细胞表面未检测到 CD4 的表达, 因此我们猜想 Caco-2 细胞表面可能存在其它与 HIV-1 gp140 结合的受体。有研究表明, 人结肠细胞系 HT29 表面并不表达 CD4 蛋白或 mRNA, 但仍然能够结合 HIV-1 gp120 蛋白, 原因是该细胞系表面表达另一种潜在的 HIV-1 gp120 受体--半乳糖神经酰胺[166], 它能够与 HIV-1 gp120 蛋白的 V3 区结合[167], 但有报道曾指出 Caco-2 细胞并不表达半乳糖神经酰胺[166], 因此 Caco-2 细胞表面与 HIV-1 gp140 结合的受体还有待进一步研究。

在艾滋病等感染性疾病中, 肠道免疫紊乱及肠道屏障破坏是主要的病理变化。本研究探讨了 HIV-1 gp140 对 Caco-2 细胞单层屏障功能及紧密连接相关基因表达的影响, 发现 HIV-1 gp140 能够破坏 Caco-2 细胞单层屏障功能, 伴随着 *CLDN1*, 2, 3, 4, 5, *OCLN*, *ZO-1* 等多种紧密连接相关基因表达的下调。该发现与之前报道的 HIV-1 对肠道上皮屏障[78, 79, 88]、血-脑屏障[168, 169]及血-视网膜屏障[84, 85]中紧密连接相关基因表达影响的结果一致。曾有研究者报道过 HIV-1 gp120 蛋白能够通过增强基质金属蛋白酶-2 和-9 的表达介导血脑屏障中 *CLDN5*、*OCLN*、*ZO-1* 表达的破坏[81, 82]。HIV-1 gp120 对肠道粘膜完整性的破坏也有报道, 伴随着 *CLDN1*, 2, 4, *OCLN*, *ZO-1* 等表达下调[88]。尽管研究选用细胞系不同, 但本研究的结果再一次证明了 HIV-1 gp140 对粘膜屏障的破坏作用。此外, 本研究发现 HIV-1 gp140 能够下调 Caco-2 细胞中 *CLDN7*, 8, 11, 12 的表达, 这些发现之前未见报道。HIV-1 gp140 对 Caco-2 细胞中紧密连接蛋白表达的调控与 HIV/AIDS 患者肠道屏障功能受损的研究结果相吻合。考虑到紧密连接蛋白在肠道屏障完整性中的关键作用, 紧密连接相关基因的下调可能导致 HIV-1 gp140 介导的屏障完整性的破坏, 说明在 HIV-1/SIV 感染中, 病毒及其蛋白组分的存在可能是导致肠道屏障功能破坏的直接原因, 提示在 AIDS 研究中多个以前未被重视的紧密连接相关基因参与了 HIV/AIDS 的病理过程。

对肠道免疫系统在病毒感染后的变化的研究中发现, HIV-1 和 SIV 感染均能快速诱导粘膜 CD4⁺ T 淋巴细胞数量降低[170], Th17 细胞被选择性清除。作为

HIV-1 的主要靶细胞, CD4⁺ T 淋巴细胞尤其是 HIV-1 感染者肠道粘膜中 CD4⁺ Th17 细胞的优先耗竭可能是造成肠道粘膜屏障损伤的主要原因[171]。IL-17A 的缺失和 HIV-1 组分的存在可能共同导致了肠道粘膜屏障的损伤。为了探讨 IL-17 家族细胞因子在 HIV/AIDS 肠道屏障损伤的作用, 本研究探讨了在 HIV-1 gp140 引起的上皮屏障损伤中 IL-17A 和 IL-17F 对屏障功能及紧密连接相关基因表达的影响, 发现二者能够协同增强 Caco-2 细胞的屏障功能, 伴随着 *CLDN1*, 2, 5, 12, 15, *OCLN* 和 *ZO-1* 等多种紧密连接相关基因表达的显著上调, 在与 HIV-1 gp140 共同作用于细胞时, 二者能够阻止 HIV-1 gp140 对 Caco-2 细胞的屏障的破坏。曾有报道指出, IL-17A 能够通过 MEK 依赖的信号通路上调 T84 细胞中 *CLDN1* 和 *CLDN2* 的表达[162], 在小鼠中, IL-17A 能够调控 *CLDN1*、*CLDN4* 和 *OCLN* 转录水平的表达[172], 我们的结果与这些报道一致。IL-17F 对人肠道上皮细胞紧密连接表达的影响报道甚少, 本部分的研究拓展了之前未被认识的受 IL-17A 和 IL-17F 调控的多种紧密连接相关基因, 并第一次指出 IL-17A 和 IL-17F 能够协同阻止 HIV-1 gp140 对 *CLDN1*、*OCLN* 和 *ZO-1* 表达的下调, 维持上皮屏障功能。这些结果表明, 在生理条件下, IL-17A 和 IL-17F 对粘膜屏障完整性的维持(通过调控紧密连接相关基因的表达)是必不可少的。此外, 本研究发现在 IL-17A 存在时, IL-17A 和 IL-17F 联合作用对 HIV-1 gp140 介导的屏障功能的破坏能够提供很好的保护, 但当 IL-17A 不存在时, IL-17F 单独作用对上皮屏障功能仅产生轻微的影响, 说明在 HIV-1 感染中, 肠道 Th17 细胞的耗竭导致的 IL-17A 水平下降可能是导致肠道屏障功能不易恢复的重要原因。IL-17A 和 IL-17F 对紧密连接的调控可能定义了一种肠道上皮细胞与免疫细胞相互作用的新机制。

使用 siRNA 干扰 *Act1* 的表达后, IL-17A 和 IL-17F 介导的促 *CLDN1*、*OCLN* 和 *ZO-1* 表达的作用受到了影响。IL-17A 和 IL-17F 能够促进 Caco-2 细胞中 NF- κ B p65 和 MAPK p38 蛋白的磷酸化水平, 说明该生物学过程伴随着 NF- κ B 和 MAPK 信号通路的激活。NF- κ B 选择性抑制剂抑制通路活性后, IL-17A 和 IL-17F 介导的促 *CLDN1*、*OCLN* 和 *ZO-1* 表达的作用受损, 而 MAPK 信号通路选择性抑制剂只能影响 IL-17A 和 IL-17F 介导的 *ZO-1* 的表达, 说明 *CLDN1*、*OCLN* 和 *ZO-1* 的表达调控机制存在差异。Kinugasa 等也曾经报道过 IL-17A 通过 ERK MAPK 信号通路调节 *CLDN2* 的表达, 但该信号通路被抑制后并没有影响 IL-17A 介导

的 *CLDN1* 的表达[162]。这些结果表明 IL-17A 和 IL-17F 对多种紧密连接蛋白的调控可能是通过不同的生物学机制实现的。IL-17A 和 IL-17F 对紧密连接表达的调控有 IL-17R 下游信号 NF- κ B 和 MAPK 的参与,提示通过靶向 IL-17 通路进行 HIV/AIDS 肠道屏障功能修复的可能性。

HIV-1 感染者肠道粘膜中 CD4⁺ Th17 细胞的优先耗竭可能是造成肠道粘膜屏障损伤的主要原因[171]。IL-17 是一种多功能性的细胞因子,它可以通过促进 *pIgR*、紧密连接相关基因和抗菌肽的表达等多种机制维持粘膜屏障的完整性[100, 148, 173]。在 SHIV/SIV 感染的恒河猴体内 *IL-17A* 的表达与 *pIgR* 和紧密连接相关基因的表达均呈现正相关性[79, 140]。本研究发现 HIV-1 gp140 下调紧密连接相关基因的表达并破坏肠道上皮屏障的完整性,在 IL-17A 和 IL-17F 存在时,二者能够协同阻止 HIV-1 gp140 对肠道屏障的破坏,这些发现尚未见报道,提示针对 AIDS 患者肠道中 Th17 缺失的额外治疗可能有助于肠道屏障功能的恢复。

综上所述,本部分的研究发现 IL-17A 和 IL-17F 是紧密连接相关基因的有效调控因子,二者的单独作用及联合作用均能阻止 HIV-1 gp140 介导的肠道屏障的破坏,该过程有 IL-17R 下游信号通路 NF- κ B 和 MAPK 的参与。这些发现为 HIV-1 gp140 破坏肠道上皮屏障的研究提供了新的知识,拓展了我们对 IL-17A/IL-17F 调控紧密连接相关基因功能的认识,为 HIV-1 gp140 介导的肠道上皮损伤的修复机制的研究提供了理论支持,提示 IL-17 通路在 HIV/AIDS 肠道屏障功能障碍中的直接作用,在针对 HIV/AIDS 肠道屏障功能障碍的治疗中应予以考虑。

第五节 小结

1. HIV-1 gp140 通过下调肠道上皮紧密连接相关基因的表达直接破坏肠道上皮细胞屏障的完整性。
2. IL-17A 和 IL-17F 通过协同上调多种紧密连接蛋白的表达阻止 HIV-1 gp140 对肠道上皮屏障的破坏。
3. IL-17A 和 IL-17F 通过 Act1 依赖的通路介导 Caco-2 细胞中紧密连接相关基因和蛋白的表达。
4. IL-17A 和 IL-17F 介导的紧密连接相关基因和蛋白的表达有 IL-17R 下游 NF- κ B 和 MAPK 信号通路的参与。

第三部分 LPS 和 TNF- α 对 IL-17R 表达及肠道上皮屏障功能的影响

第一节 引言

在 HIV/AIDS 中,肠道屏障的损伤是微生物移位和免疫活化的先决条件,而微生物移位揭示了免疫激活的重要机制。LPS 是革兰氏阴性菌外膜的组成部分,被认为是微生物移位的主要标志[174]。革兰氏阴性杆菌介导的局部急性炎症反应会导致肠道上皮屏障的破坏及细菌移位[175],另有证据表明,在 SIV 感染的恒河猴血浆中,LPS 等病原相关分子模式大量存在并与免疫激活密切相关[176]。肠道中的细菌及其产物 LPS 可通过受损的粘膜屏障进入血液循环,转移到肝脏和肠系膜淋巴结等部位,引起全身性免疫激活,这是 HIV-1 感染进展到 AIDS 的主要原因。

TNF- α 已被证实是肠粘膜屏障损伤的重要启动因子,在肠道炎症和诱导肠上皮细胞紧密连接的渗透率改变中发挥重要作用[177, 178]。LPS 可诱导包括巨噬细胞在内的免疫和非免疫细胞大量表达 TNF- α 等炎症因子,进一步加剧炎症反应。TNF- α 作为诱导肠道炎症的一种重要细胞因子,在多种自身免疫和炎症失调过程中通过诱导 Th1 细胞的激活而参与炎症级联反应。在炎症性肠病中肠粘膜 TNF- α 表达增加并参与炎症的发生及信号的转导[179],此外,在 HIV-1 感染者的血液中 TNF- α 表达也增加并且与 LPS 的刺激直接相关[180]。

第一部分的研究发现 SHIV/SIV 感染致恒河猴肠道中 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 均上调表达且与多种紧密连接蛋白存在正相关性,但是引起 *IL-17R* 上调表达的因素仍然未知,由于 SHIV/SIV 感染中 Th17 细胞分泌 IL-17 和 IL-22 等促炎性细胞因子的能力降低,使 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 表达上调的原因变得复杂。在第二部分的研究中,我们利用体外上皮细胞屏障模型(Caco-2)证实了 IL-17A 和 IL-17F 能够通过 IL-17R 信号通路调控肠道上皮细胞中紧密连接相关基因的表达并阻止 HIV-1 gp140 介导的肠道上皮屏障的损伤。基于 TNF- α 与 LPS 在 HIV/AIDS 中的变化及其在肠道粘膜屏障和炎症中的重要作用,我们有理由相信在 HIV-1/SIV 感染中,肠道粘膜 TNF- α 等炎症因子的上调表达与微生物移位可能与 *IL-17R* 的上

调之间存在一定的联系, LPS 和炎性细胞因子可能均参与了 HIV/AIDS 病理过程中肠道紧密连接相关基因表达的调控。

在本部分的研究中, 我们检测了 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中 *TNF- α* 的变化, 分析了 *TNF- α* 与 *IL-17R* 表达的相关性, 并利用体外细胞模型分析了 IL-17A、IL-17F、*TNF- α* 等炎性细胞因子和 LPS 对 *IL-17R* 表达的影响。此外, 我们探讨了 LPS 和 *TNF- α* 对 Caco-2 细胞单层紧密连接相关基因表达及屏障功能的影响, 并对参与该过程的相关信号通路进行了初步探讨。

第二节 材料和方法

1 实验材料及试剂

1.1 主要仪器设备

IX81-ZDC 激光共聚焦显微镜 (OLYMPUS, Japan)

其它仪器设备同第一、二部分。

1.2 主要试剂

动物组织 DNA 提取试剂盒 (QIAamp DNA Mini Kit) 购自德国 Qiagen; 荧光定量试剂盒 (TB GreenTM Premix Ex TaqTM) 购自日本 TaKaRa; LPS (E. coli 0111: B4 strain-TLR4 ligand) 购自美国 Invivogen; 人重组 TNF- α 购自美国 Sigma。

其它试剂同第一、二部分。

1.3 主要溶液及配制

- (1) 4%多聚甲醛: 多聚甲醛 20.0 g, 加入 250 mL PBS (200 mM) 和 250 mL 去离子水, 50℃水浴溶解后 4℃保存备用。
- (2) 3%TritonX-100-PBS 母液: TritonX-100 1.5 mL, PBS 48.5 mL, 充分混匀后 4℃保存备用。
- (3) 免疫荧光抗体稀释液: 10%BSA 100 μ L, 3%TritonX-100-PBS 母液 100 μ L, PBS 800 μ L, 充分混匀后 4℃保存备用。

其它溶液及配制同第一、二部分。

2 实验方法

2.1 基因标准品的构建

方法同第一部分, RT-PCR 扩增引物序列及参考基因如下: *TNF- α* primer F 5'-GAA CCC CAA GTG ACA AGC -3'; *TNF- α* primer R 5'-GGC AAT GAT CCC AAA GTA -3', 参考基因为 NM_001047149.1。

2.2 实时荧光定量 RT-PCR

方法同第一部分, 扩增引物及探针序列如下: q*TNF- α* primer F 5'-CTC TTC AAG GGC CAA GGC T -3'; q*TNF- α* primer R 5'-GAT GCG GCT GAT GGT GTG -3'; q*TNF- α* probe 5'-CCC CTC CAA CCA TGT GCT CCT CA -3', 参考基因为 DQ902483.1。

2.3 动物组织 DNA 的提取

根据 QIAamp DNA Mini Kit 说明书提取动物组织中的 DNA。

- (1) 取 10~20 mg 组织样品粉碎后放入放入 1.5 ml 的离心管中，加入 20 μ L 蛋白酶 K，涡旋混匀后置于 56℃ 水浴中孵育直至溶解。
- (2) 涡旋 15 s 并加入 200 μ L buffer AL，涡旋使充分混匀后置于 70℃ 孵育 10 min，加入 200 μ L 乙醇（96~100%）并再次涡旋混合。
- (3) 移出步骤（2）中的混合物至 Dneasy Mini spin column 中，6000 rcf 离心 1 min，弃液。
- (4) 加入 500 μ L buffer AW1，6000 rcf 离心 1 min，弃液。
- (5) 加入 500 μ L buffer AW2，6000 rcf 离心 1 min，弃液。
- (6) 将 Dneasy Mini spin column 移到新的 1.5 ml 离心管中，加入 200 μ L buffer AE，室温孵育 1 min，6000 rcf 离心 1 min。

2.4 16S rRNA 的检测

根据 TB Green™ Premix Ex Taq™ 试剂盒说明书，以肠系膜淋巴结 DNA 为模板进行 16S rRNA 的定量检测，扩增程序如下：

95℃，30 s

95℃，5 s

60℃，34 s

} 40 cycles

扩增引物序列如下：16S rRNA primer F 5'-AGAGTTTGATYMTGGCTCAG-3'；
16S rRNA primer R 5'-CGYCCATTGBGBAADATTCC-3'。

扩增体系如下：

试剂	用量
2×TB Green Premix Ex Taq	10.0 μ L
上游引物（10 μ M）	0.4 μ L
下游引物（10 μ M）	0.4 μ L
DNA 模板（<100 ng）	2.0 μ L
RNase Free ddH ₂ O	7.2 μ L

2.5 Caco-2 细胞的处理

在 LPS、TNF- α 、IL-17A/IL-17F 对 Caco-2 细胞中 IL-17R 及紧密连接相关基因表达影响的实验中, Caco-2 细胞以 10^6 个/孔的密度接种到 6 孔板中, 待细胞单层铺满率达到 80~90%, 加入 LPS ($1\text{ }\mu\text{g/mL}$)、TNF- α (100 ng/mL) 和/或相应浓度的 IL-17A/IL-17F (见实验结果), 37°C 培养 24 h 后收集细胞进行转录水平检测或 48 h 后收集细胞进行蛋白水平检测。

在信号通路抑制实验中, Caco-2 细胞处理同第二部分。

2.6 细胞免疫荧光

- (1) 将无菌的盖玻片放入细胞培养板底部, 接种 Caco-2 细胞于细胞培养板中, 将培养板放入细胞培养箱中培养, 使细胞在盖玻片上形成单层。
- (2) 向 Caco-2 细胞单层中加入 LPS ($1\text{ }\mu\text{g/mL}$)、TNF- α (100 ng/mL) 和 IL-17A (100 ng/mL), 37°C 培养 48 h。
- (2) 取出铺好细胞的盖玻片, 用 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min。
- (3) 用 4% 的多聚甲醛对盖玻片上的细胞进行固定, 室温固定 20 min 后, 用 PBST 漂洗 3 次, 每次 5 min。
- (4) 用 Triton X-100 浸泡盖玻片 20 min, PBST 漂洗 3 次, 每次 5 min。
- (5) 在盖玻片上滴加适量 10% 正常山羊血清, 室温孵育 30 min, 使无关抗原得以封闭。
- (6) 用吸水纸小心吸去多余的封闭液, 将稀释好的 ZO-1 单克隆抗体 (1: 250) 滴加到盖玻片上, 将盖玻片移入湿盒中, 4°C 孵育过夜。PBST 漂洗盖玻片 3 次, 每次 5 min。
- (7) 用吸水纸小心吸去多余的液体, 将稀释好的 Alexa Fluor 488 标记的山羊抗鼠 IgG (H+L) 二抗 (1: 8000) 滴加到盖玻片上, 37°C 避光孵育 1 h。PBST 漂洗盖玻片 3 次, 每次 5 min。
- (8) 细胞核染色: 滴加 DAPI 工作液于盖玻片上, 室温避光孵育 20 min, 用 PBST 避光漂洗 3 次, 每次 5 min。
- (9) 向盖玻片上滴加适量抗荧光淬灭封片液, 封片后将细胞样品置于激光共聚焦显微镜下观察, 采集并保存图像。

其它实验方法同第一、二部分。

第三节 实验结果

1 SHIV/SIV 感染影响恒河猴肠道中 $TNF-\alpha$ 的表达

1.1 正常与 SHIV/SIV 感染恒河猴肠道中 $TNF-\alpha$ mRNA 表达水平的差异及与病毒载量之间的相关性

本研究检测了对照组和感染组恒河猴胃底、十二指肠近端、空肠近端、空回肠中部、回肠末端、盲肠、结肠近端、结肠中段和直肠这 9 个胃肠道部位 $TNF-\alpha$ mRNA 的表达水平。如图 3.1A 所示, 正常恒河猴胃肠道组织中 $TNF-\alpha$ mRNA 在 $200\sim 300$ copies/ 10^6 GAPDH 之间, SHIV/SIV 感染组胃肠道组织中 $TNF-\alpha$ mRNA 水平较对照组显著升高 ($P=0.0316$), 表达量为正常组的两倍。对 $TNF-\alpha$ mRNA 表达水平与病毒载量做相关性分析发现, $TNF-\alpha$ mRNA 水平与病毒载量在消化道组织中呈显著正相关($r=0.917$, $P=0.0005$)(如图 3.1B), 说明肠道中 $TNF-\alpha$ mRNA 水平的升高与 SHIV/SIV 感染存在联系。

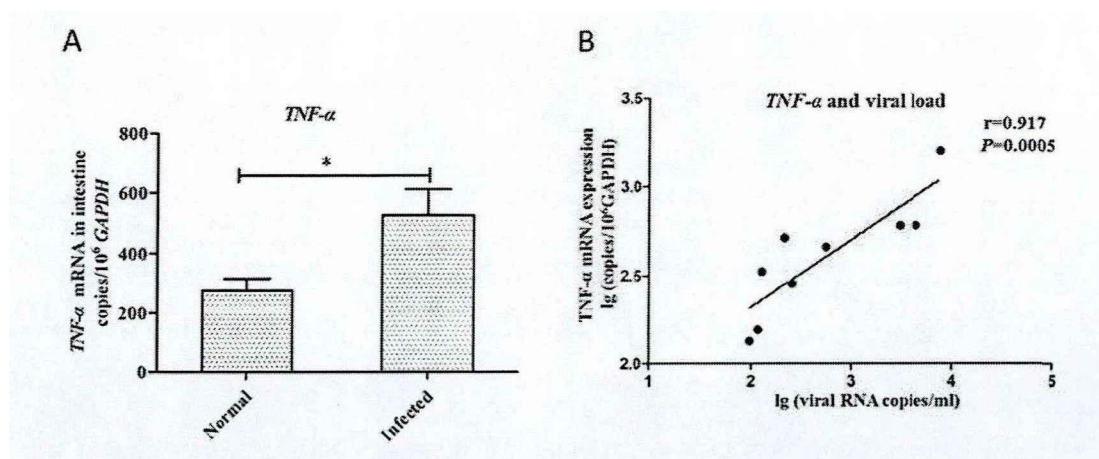


图 3.1 正常与 SHIV/SIV 感染的恒河猴消化道组织中 $TNF-\alpha$ mRNA 水平的差异及与病毒载量的相关性

Fig 3.1 Differences in $TNF-\alpha$ mRNA levels between SHIV/SIV infected and uninfected *Macaca mulatta* and their correlation with viral load

A. 正常恒河猴 ($n=5$) 与 SHIV/SIV 感染恒河猴 ($n=5$) 肠道粘膜中 $TNF-\alpha$ mRNA 水平的 qPCR 检测; B. SHIV/SIV 感染的恒河猴 ($n=5$) 消化道组织中 $TNF-\alpha$ mRNA 与病毒载量的相关性分析散点图; 图 B 中每个点代表一个消化道组织中 5 只感染组动物 $TNF-\alpha$ mRNA 水

平/病毒载量的平均值; r 为相关系数, $p < 0.05$ 为显著相关; 垂直条代表平均值 $\pm$ SD, 统计学方法: Mann-Whitney test (*: $P < 0.05$), 非参数检验 Spearman test

1.2 恒河猴肠道粘膜中 $TNF-\alpha$ 与 $IL-17RA/IL-17RC$ mRNA 水平的相关性

本研究第一部分的结果指出 SHIV/SIV 感染引起肠道各段 $IL-17RA/IL-17RC$ 表达上调, 为了探讨 $TNF-\alpha$ 和 $IL-17RA/IL-17RC$ 表达之间的联系, 本研究对 $TNF-\alpha$ 和 $IL-17RA/IL-17RC$ 的表达做了相关性分析, 发现在正常动物肠道中, 无论是 $IL-17RA$ 还是 $IL-17RC$, 表达水平与 $TNF-\alpha$ 均无相关性。而在 SHIV/SIV 感染组动物肠道中, $IL-17RA$ 与 $TNF-\alpha$ 呈显著正相关性 ($r=0.3991$, $P=0.0321$), 同样, $IL-17RC$ 与 $TNF-\alpha$ 也存在显著正相关性 ($r=0.3763$, $P=0.0405$)。

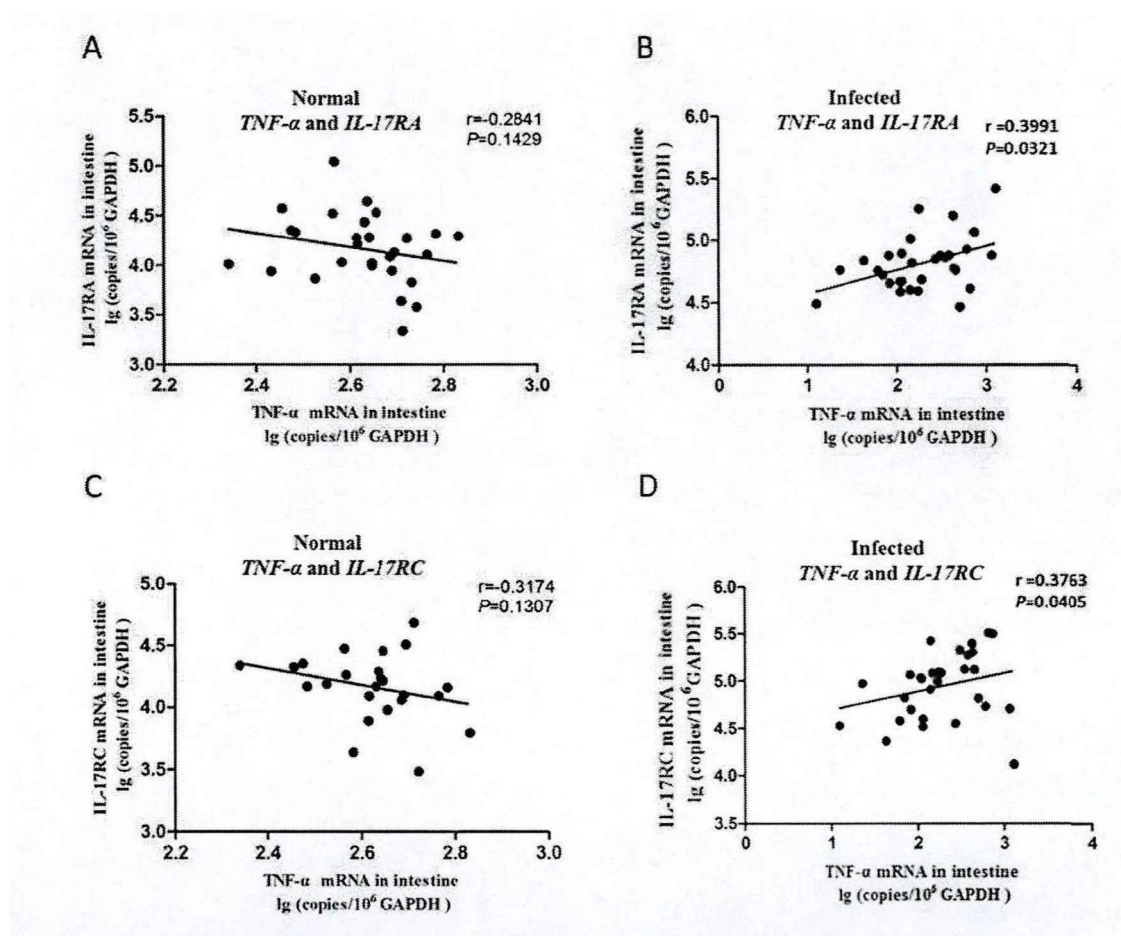


图 3.2 恒河猴肠道粘膜组织中 $TNF-\alpha$ 与 $IL-17R$ mRNA 水平的相关性

Fig 3.2 Correlation between $TNF-\alpha$ and $IL-17R$ mRNA levels in the intestinal mucosa of *Macaca*

mulatta

正常恒河猴 (A, C, n=5) 和 SHIV/SIV 感染恒河猴 (B, D, n=5) 肠道粘膜中 *TNF- α* 与 *IL-17RA* (A, B) 或 *IL-17RC* (C, D) mRNA 水平的相关性分析散点图; r 为相关系数, $p < 0.05$ 为显著相关; 统计学方法: 非参数检验 Spearman test

2 SHIV/SIV 感染对肠系膜淋巴结中 *16S rRNA* 基因的影响

对正常组动物和 SHIV/SIV 感染组动物肠系膜淋巴结中 *16S rRNA* 基因进行定量分析发现, 感染组 *16S rRNA* 基因水平比对照组高出 3 倍以上 ($P=0.0064$), 提示 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中发生了微生物移位。

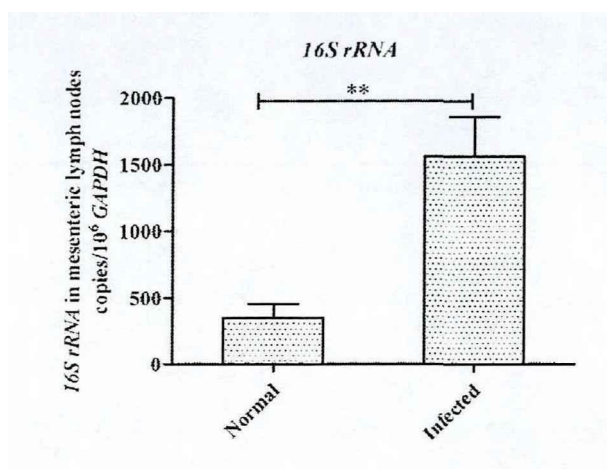


图 3.3 正常与 SHIV/SIV 感染恒河猴肠系膜淋巴结中 *16S rRNA* 基因水平的比较

Fig 3.3 Comparison of *16S rRNA* gene levels in mesenteric lymph nodes of *Macaca mulatta* with and without SHIV/SIV infection

正常恒河猴 (n=5) 和 SHIV/SIV 感染恒河猴 (n=5) 肠系膜淋巴结中 *16S rRNA* 基因的 qPCR 检测; 垂直条代表平均值 $\pm$ SD, 统计学方法: Mann-Whitney test (**: $P < 0.01$)

3 LPS、*TNF- α* 、*IL-17A/IL-17F* 对 *Caco-2* 细胞中 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 表达的影响

3.1 *IL-17A* 和 *IL-17F* 对 *Caco-2* 细胞中 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 表达的影响

在 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中, *IL-17A* 和 *IL-17F* 表达均发生了显著变

化,但变化的方向不同(*IL-17A* 表达水平降低,*IL-17F* 表达水平升高),二者的表达变化均有可能影响肠粘膜中 *IL-17R* 的水平。为了进一步研究 *IL-17A* 和 *IL-17F* 对 *IL-17RA/IL-17RC* 表达的调控,本研究利用实时荧光定量 RT-PCR 检测了 *IL-17A* 和 *IL-17F* 单独作用及二者联合作用对 Caco-2 细胞中 *IL-17RA/IL-17RC* 表达的影响。如图 3.4A 和 B 所示,低浓度的 *IL-17A* (10-100 ng/mL) 促进 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 的表达,随着 *IL-17A* 浓度的升高,其促 *IL-17R* 表达作用逐渐减弱,当 *IL-17A* 浓度达到 200 ng/mL 时,其对 *IL-17RA* 的促表达作用消失,甚至对 *IL-17RC* 的表达产生抑制作用。如图 3.4C 和 D 所示,100 ng/mL 的 *IL-17F* 对 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 的表达也均有促进作用,但与 *IL-17A* 不同,当 *IL-17F* 的浓度增加到 200 ng/mL 时,*IL-17F* 对 *IL-17RA* 的表达产生了更强的促进作用。与 200 ng/mL 的 *IL-17F* 相比,当用 100 ng/mL 的 *IL-17A* 代替 *IL-17F* 时 (100 ng/mL *IL-17A*+100 ng/mL *IL-17F*),*IL-17RA* 和 *IL-17RC* 的表达并没有得到促进,相反,*IL-17RA* 的表达甚至受到了抑制。然而,与 200 ng/mL 的 *IL-17A* 相比,当用 100 ng/mL 的 *IL-17F* 代替 *IL-17A* 时 (100 ng/mL *IL-17A*+100 ng/mL *IL-17F*),*IL-17RA* 和 *IL-17RC* 的表达都发生了上调。这些结果表明,无论 *IL-17A* 是否存在,*IL-17F* 均能促进 *IL-17R* 的表达。

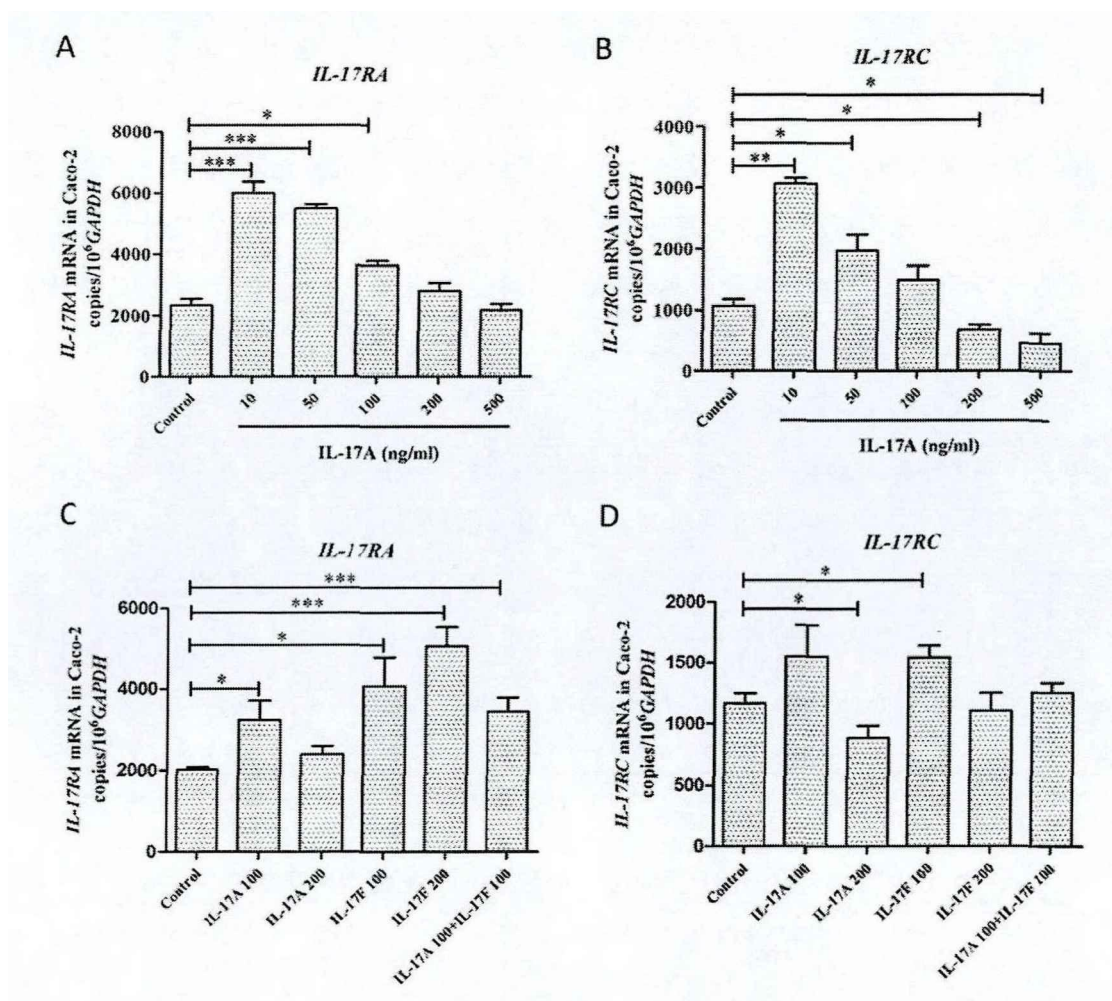


图 3.4 IL-17A 和 IL-17F 对 Caco-2 细胞 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* mRNA 水平的影响

Fig 3.4 Effects of IL-17A and IL-17F on the mRNA levels of *IL-17RA* and *IL-17RC* in Caco-2 cells

不同浓度的 IL-17A 处理 24 h 后 Caco-2 细胞中 *IL-17RA* (A) 和 *IL-17RC* (B) mRNA 水平的 qPCR 检测; 不同浓度的 IL-17A 和/或 IL-17F 处理 24 h 后 Caco-2 细胞中 *IL-17RA* (C) 和 *IL-17RC* (D) mRNA 水平的 qPCR 检测; 垂直条代表平均值±SD (n=3), 统计学方法: unpaired two-tailed t test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$)

3.2 LPS、TNF- α 对 Caco-2 细胞中 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 表达的影响

SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中发生微生物移位 (LPS 存在), *TNF- α* 表达量均增加且与 *IL-17RA/IL-17RC* 的表达存在显著正相关, 提示 LPS 和 *TNF- α* 可能参与 *IL-17R* 表达的调控。为了验证这一假设, 本研究用 LPS (1 μ g/mL) 和 *TNF- α*

(100 ng/mL)刺激 Caco-2 细胞系并观察其与 IL-17A (100 ng/mL)或 IL-17F (100 ng/mL)联合作用对 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 表达的影响。如图 3.5 所示, LPS+TNF- α 能够显著上调 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 转录水平的表达 ($P<0.0001$; $P=0.0068$) (图 3.5A 和 B), 对 IL-17RA 和 IL-17RC 蛋白水平的表达也有一定的促进作用, 但没有统计显著性 (图 3.5E 和 F)。在 IL-17A 存在的情况下, LPS+TNF- α 对 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* mRNA ($P=0.0002$; $P<0.0001$) 和蛋白 ($P=0.0442$; $P=0.0276$) 均表现出更加明显的促表达效果 (图 3.5A、B、E、F)。同样, 在 IL-17F 存在时, LPS+TNF- α 对 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 的转录 ($P=0.007$; $P=0.0257$) 及蛋白水平 ($P=0.0356$; $P=0.0466$) 也均具有明显的促表达作用 (图 3.5C、D、G、H)。这些结果说明, LPS+TNF- α 能够促进 *IL-17RA/IL-17RC* 的表达, 当 IL-17A/IL-17F 存在时, 其促表达作用更加明显。

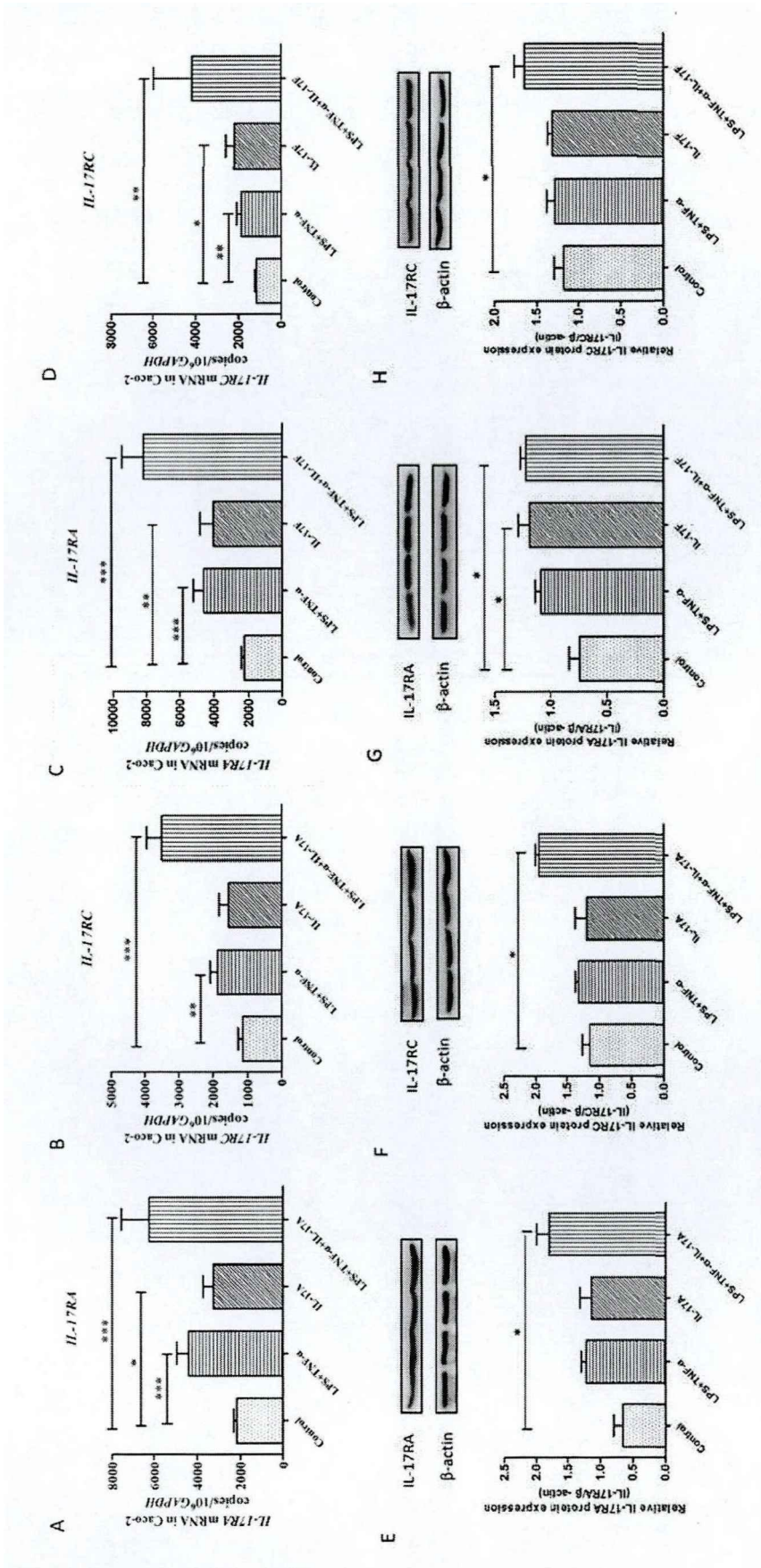


图 3.5 IL-17A/IL-17F 与 LPS+TNF-α 共同作用对 Caco-2 细胞中 IL-17RA 和 IL-17RC 表达的影响

Fig 3.5 Effects of IL-17A or IL-17F or their combination with LPS+TNF-α on the expression of IL-17RA and IL-17RC in Caco-2 cells

IL-17A 与 LPS+TNF-α 作用 24 h 后 Caco-2 细胞中 IL-17RA 和 IL-17RC mRNA 水平的 qPCR 检测 (A, B) 和作用 48 h 后蛋白水平的 Western blot 检测 (E, F); IL-17F 与 LPS+TNF-α 作用 24 h 后 Caco-2 细胞中 IL-17RA 和 IL-17RC mRNA 水平的 qPCR 检测 (C, D) 和作用 48 h 后蛋白水平的 Western blot 检测 (G, H); 垂直条代表平均值±SD (n=3), 统计学方

法: unpaired two-tailed t test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$)

3.3 HIV-1 gp140 对 Caco-2 细胞中 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 表达的影响

为了探讨 HIV-1 gp140 对 *IL-17RA/IL-17RC* 表达的影响, 本研究用不同浓度的 HIV-1 gp140 刺激 Caco-2 细胞 24 h 后, 观察 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 表达的变化。如图 3.6 所示, HIV-1 gp140 能够抑制 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 转录水平的表达, 当 HIV-1 gp140 浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$ 时, 其对 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* mRNA 均产生轻微的抑制作用, 当 HIV-1 gp140 浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 时, 其对 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* mRNA 的抑制作用较较低浓度时增强, 并对 *IL-17RA* mRNA 产生显著的抑制作用 ($P=0.0023$)。

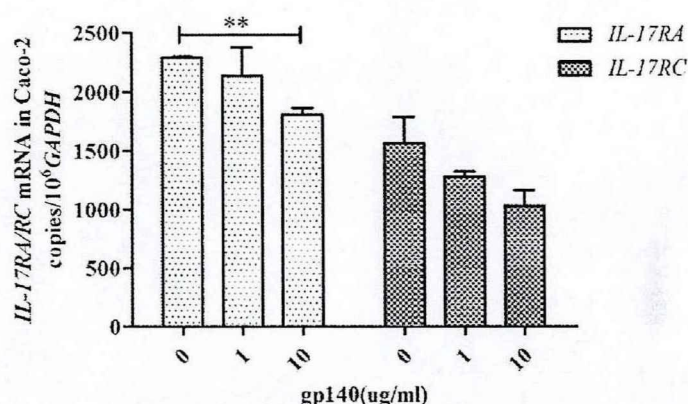


图 3.6 HIV-1 gp140 对 Caco-2 细胞 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 表达的影响

Fig 3.6 Effects of HIV-1 gp140 on the expression of *IL-17RA* and *IL-17RC* in Caco-2 cells

不同浓度的 HIV-1 gp140 处理 24 h 后 Caco-2 细胞中 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* mRNA 水平的 qPCR 检测; 垂直条代表平均值 $\pm$ SD ($n=3$), 统计学方法: unpaired two-tailed t test (**: $P < 0.01$)

为了进一步探讨 HIV-1 gp140 的作用能否影响 LPS、TNF- α 及 IL-17A/IL-17F 的促 *IL-17R* 表达效果, 本研究检测了在 HIV-1 gp140 (10 $\mu\text{g/mL}$) 存在的情况下, LPS、TNF- α 及 IL-17A/IL-17F 对 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 转录及蛋白表达的影响。如图 3.7 所示, 在 HIV-1 gp140 存在时, *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 转录和蛋白水平的表达均受到一定的抑制, 但 HIV-1 gp140 不足以逆转 LPS、TNF- α 及 IL-17A/IL-17F 的促 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 表达效果, HIV-1 gp140 与 LPS、TNF- α 及 IL-17A 的联合作用依然能够显著上调 *IL-17RA* 转录和蛋白水平的表达 ($P=0.0009$; $P=0.0059$) (图 3.7A 和 E), 并显著上调 *IL-17RC* 转录水平的表达 ($P=0.0056$) (图 3.7B),

IL-17RC 蛋白水平也发生了上调但没有统计显著性 (图 3.7F); HIV-1 gp140 与 LPS、TNF- α 及 IL-17F 的联合作用使 *IL-17RA* 转录水平发生显著上调 ($P=0.0009$) (图 3.7C), *IL-17RC* 转录水平也发生上调, 但没有统计显著性 ($P=0.0897$) (图 3.7D)。从蛋白水平上看, HIV-1 gp140 与 LPS、TNF- α 及 IL-17F 的联合作用使 IL-17RA 和 IL-17RC 蛋白均发生显著上调 ($P=0.0203$; $P=0.0355$) (图 3.7G 和 H)。这些数据表明, 在 HIV-1 gp140 存在的情况下, LPS、TNF- α 及 IL-17A/IL-17F 依然能够促进 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 的表达。

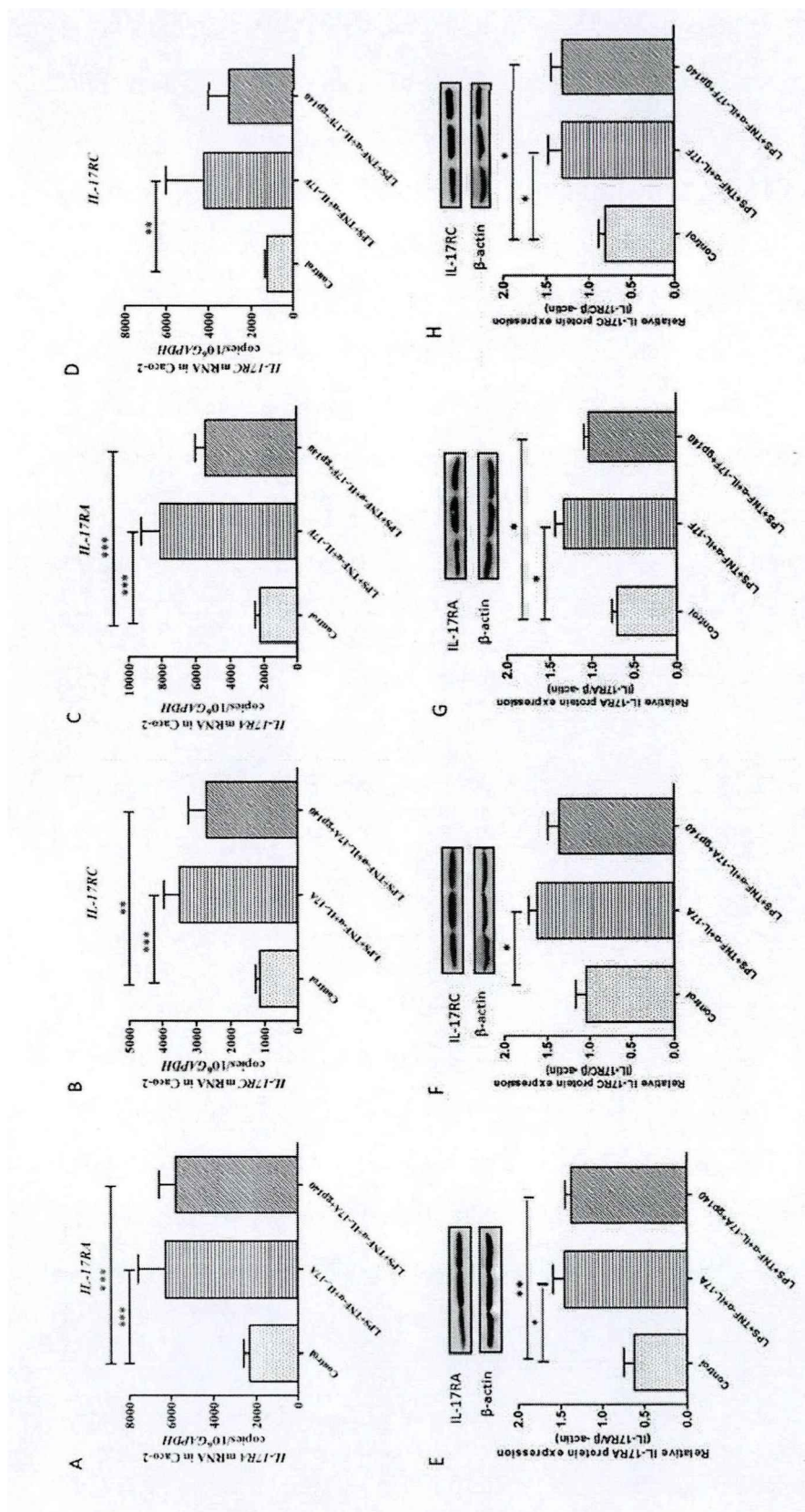


图 3.7 HIV-1 gp140 与 LPS+TNF-α+IL-17A/IL-17F 共同作用对 Caco-2 细胞中 IL-17RA 和 IL-17RC 表达的影响

Fig 3.7 Effects of HIV-1 gp140 in combination with LPS+TNF-α+IL-17A/IL-17F on the expression of IL-17RA and IL-17RC in Caco-2 cells
HIV-1 gp140 与 LPS+TNF-α+IL-17A 作用 24 h 后 Caco-2 细胞中 IL-17RA 和 IL-17RC mRNA 水平的 qPCR 检测 (A, B) 和作用 48 h 后蛋白水平的 Western blot 检测 (E, F); HIV-1 gp140 与 LPS+TNF-α+IL-17F 作用 24 h 后 Caco-2 细胞中 IL-17RA 和 IL-17RC mRNA 水平的 qPCR 检测 (C, D) 和作用 48 h 后蛋白水平的 Western blot 检测 (G, H); 垂直条代表平均值±SD (n=3), 统计学方法: unpaired two-tailed t test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$)

4 LPS 和 TNF- α 对肠道上皮细胞屏障功能和紧密连接相关基因表达的影响

4.1 LPS 和 TNF- α 对 Caco-2 细胞屏障功能的影响

为了研究 LPS+TNF- α 及其与 IL-17A/IL-17F 联合作用对上皮细胞屏障功能的影响, 我们向 Caco-2 细胞单层屏障模型的嵌入式培养皿上层小室加入终浓度为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 LPS 和/或终浓度为 100 ng/mL 的 TNF- α 、IL-17A、IL-17F, 37 $^{\circ}\text{C}$ 分别孵育 0h、3h、8h、24h 后用 Millicell-ERS 电阻仪测定 TER。如图 3.8A 所示, 从 0h 到 3h, LPS+TNF- α 刺激并没有对 Caco-2 细胞 TER 产生明显的影响, 在作用后 8h 和 24h, TER 较对照组略有升高。LPS+TNF- α 与 IL-17A 联合作用 3h 后, TER 比对照组增加了 20%, 24h 后 TER 较对照组增加了 40%, 高于 LPS+TNF- α 与 IL-17A 单独作用之和 (图 2.6A, IL-17A 单独作用 24h 后 TER 升高了 20%, 图 3.8A, LPS+TNF- α 作用 24h 后 TER 升高了 5%), 说明 LPS+TNF- α 和 IL-17A 能够协同促进 Caco-2 细胞的 TER。LPS+TNF- α 与 IL-17F 联合作用 24h 后, TER 比对照组增加了约 20%, 相当于 LPS+TNF- α 与 IL-17F 分别作用的效果之和 (图 2.6A, IL-17F 单独作用 24h 后 TER 升高了 15%, 图 3.8A, LPS+TNF- α 作用 24h 后 TER 升高了 5%), 故 LPS+TNF- α 与 IL-17F 对 Caco-2 细胞 TER 的影响具有加和作用而非协同作用。

为了对 TER 的结果进行验证, 本研究检测了 LPS+TNF- α 、IL-17A、IL-17F 对 Caco-2 单层屏障通透性的影响。如图 3.8B 所示, LPS+TNF- α 处理 0h 到 24h FITC-Dextran 的透过率并没有明显的改变。与 TER 检测结果一致, LPS+TNF- α 与 IL-17A 联合作用 24h 后 FITC-Dextran 透过率降低了约 40%, 下调比例大于 LPS+TNF- α 与 IL-17A 单独作用之和 (图 2.6B, IL-17A 单独作用 24h 后 FITC-Dextran 透过率降低了 20%, 图 3.8B, LPS+TNF- α 作用 24h 后 FITC-Dextran 透过率降低了约 8%), 说明 LPS+TNF- α 和 IL-17A 能够协同降低 Caco-2 细胞对 FITC-Dextran 的透过率。而 LPS+TNF- α 与 IL-17F 联合作用 24h 后 FITC-Dextran 透过率降低了约 20%, 相当于 LPS+TNF- α 与 IL-17F 分别作用的效果之和, 说明 LPS+TNF- α 与 IL-17F 对 Caco-2 细胞 FITC-Dextran 透过率的影响具有加和作用而非协同作用。

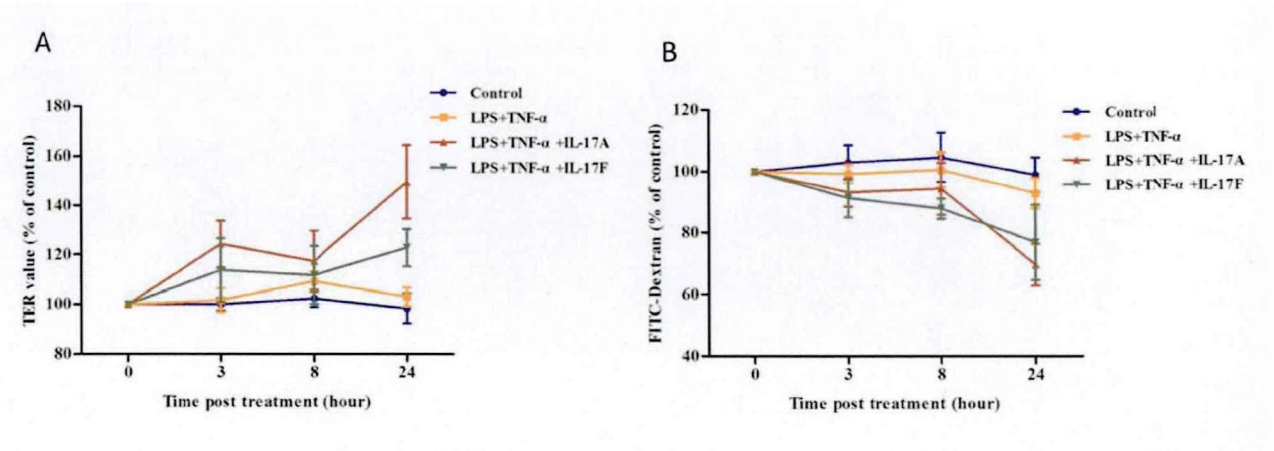


图 3.8 LPS+TNF- α 单独作用及与 IL-17A/IL-17F 联合作用对 Caco-2 细胞上皮通透性的影响

Fig 3.8 Effects of LPS+TNF- α alone or in combination with IL-17A/IL-17F on the paracellular permeability of Caco-2 cell monolayers

LPS+TNF- α 、IL-17A/IL-17F 处理不同时间点对 Caco-2 细胞 TER (A) 和 FITC-Dextran 透过率 (B) 的影响; 垂直条代表平均值 $\pm$ SD (n=3)

4.2 LPS 和 TNF- α 对 Caco-2 细胞紧密连接相关基因表达的影响

为了研究 LPS+TNF- α 单独作用对上皮细胞紧密连接相关基因表达的影响, 我们向 Caco-2 细胞单层中加入 LPS (1 μ g/mL)、TNF- α (100 ng/mL) 共培养 24h, 收集细胞提取总 RNA, 用实时荧光定量 RT-PCR 的方法检测 Caco-2 细胞中紧密连接相关基因转录水平的表达。如图 3.9 所示, LPS+TNF- α 能够轻微上调 Caco-2 细胞中 *CLDN1*, 2, 3, 4, 7, 11 及 *ZO-1* mRNA 的表达, 但没有统计显著性。LPS+TNF- α 不影响 *CLDN12*, 14, 15 和 *OCN* mRNA 的表达。LPS+TNF- α 对 *CLDN5*, 8 mRNA 表达具有一定的抑制作用, 但没有统计显著性。

此外, 我们检测了 LPS+TNF- α 与 IL-17A (100 ng/mL) /IL-17F (100 ng/mL) 联合作用对上皮细胞紧密连接相关基因表达的影响, 如图 3.9 所示, LPS+TNF- α 与 IL-17A 联合作用使 *CLDN1*, 2, 4, 5, 7, 8, 11, 12, 14, 15 及 *OCN* mRNA 均表达上调了 2~3 倍, 其中 *CLDN1* mRNA 发生了显著上调 ($P=0.0125$)。 *CLDN3* 和 *ZO-1* mRNA 上调了 4~5 倍 ($P=0.0194$, $P=0.0363$)。此外, LPS+TNF- α 与 IL-17A 联合作用对这些紧密连接相关基因的促表达效果大于 LPS+TNF- α 与 IL-17A 单独作用之和, 说明 LPS+TNF- α 与 IL-17A 能够协同促进紧密连接相关基因的表达。

LPS+TNF- α 与 IL-17F 联合作用使 *CLDN1*, 2, 3, 5, 7, 12, 14, 15 的表达略有上调 (1.2~2 倍), *CLDN8* 上调表达了 4 倍, *CLDN11* 上调表达了 8 倍, 但都没有统计显著性。此外, LPS+TNF- α 与 IL-17F 联合作用并没有影响 *CLDN4*、*OCLN* 和 *ZO-1* 的表达。

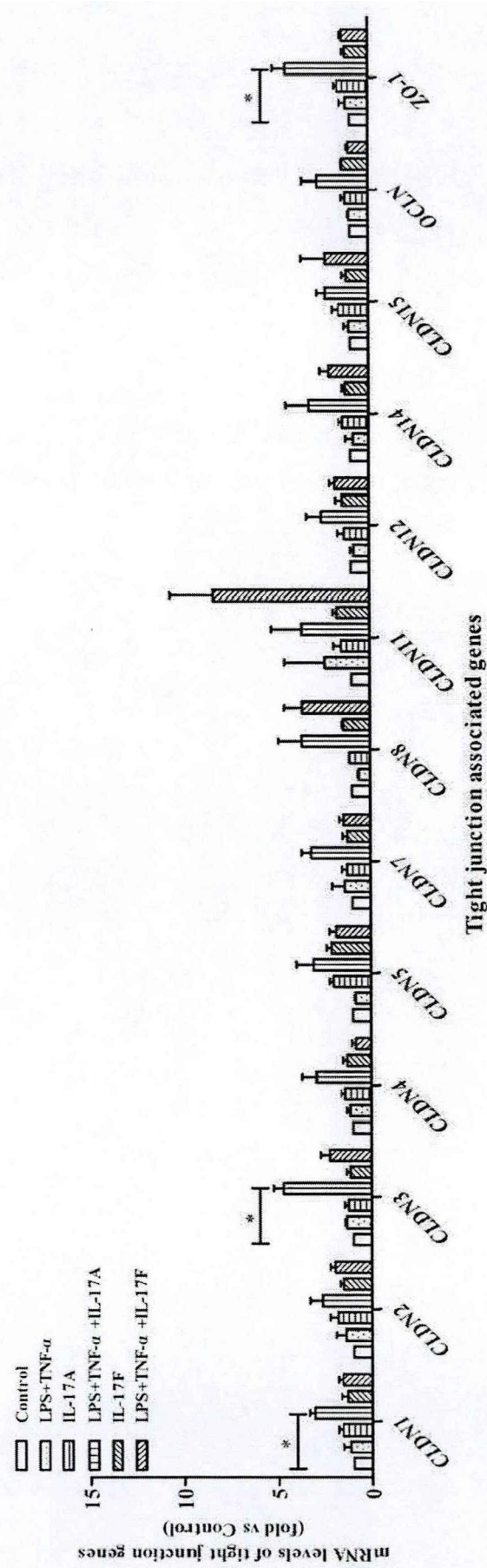


图 3.9 LPS+TNF-α 与 IL-17A/IL-17F 联合作用对 Caco-2 细胞紧密连接相关基因 mRNA 水平的影响

Fig 3.9 Effects of LPS+TNF-α in combination with IL-17A or IL-17F on the mRNA levels of tight junction associated genes in Caco-2 cells

LPS+TNF-α 或 IL-17A/IL-17F 或 LPS+TNF-α+IL-17A/IL-17F 处理 24 h 后 Caco-2 细胞中紧密连接相关基因 mRNA 水平的 qPCR 检测；垂直条代表平均值 ±SD (n=3)，统计学方法：unpaired two-tailed t test (*: P < 0.05)

为了进一步了解 LPS+TNF- α 和 IL-17A 联合作用对紧密连接蛋白表达的影响, 本研究在刺激剂处理 Caco-2 细胞单层 48h 后, 用蛋白免疫印迹的方法对 CLDN1、CLDN3 和 ZO-1 的表达进行了蛋白水平的分析。如图 3.10 所示, 与转录水平检测结果一致, 三种紧密连接蛋白在 LPS+TNF- α 与 IL-17A 联合刺激下均发生显著上调, 其中 CLDN1 上调表达了 2 倍 ($P=0.0085$), 上调幅度略低于转录水平检测结果; CLDN3 上调表达了 3.2 倍 ($P=0.0122$), 上调幅度高于转录水平检测结果; ZO-1 上调表达了近 5 倍 ($P=0.0144$), 上调幅度与转录水平相当。另外, 本研究用激光共聚焦显微镜观察了 LPS+TNF- α 与 IL-17A 对 Caco-2 细胞中 ZO-1 蛋白表达的影响, 与实时荧光定量 RT-PCR 及 Western blot 结果一致, LPS+TNF- α 与 IL-17A 联合作用使 ZO-1 蛋白荧光信号明显增强。

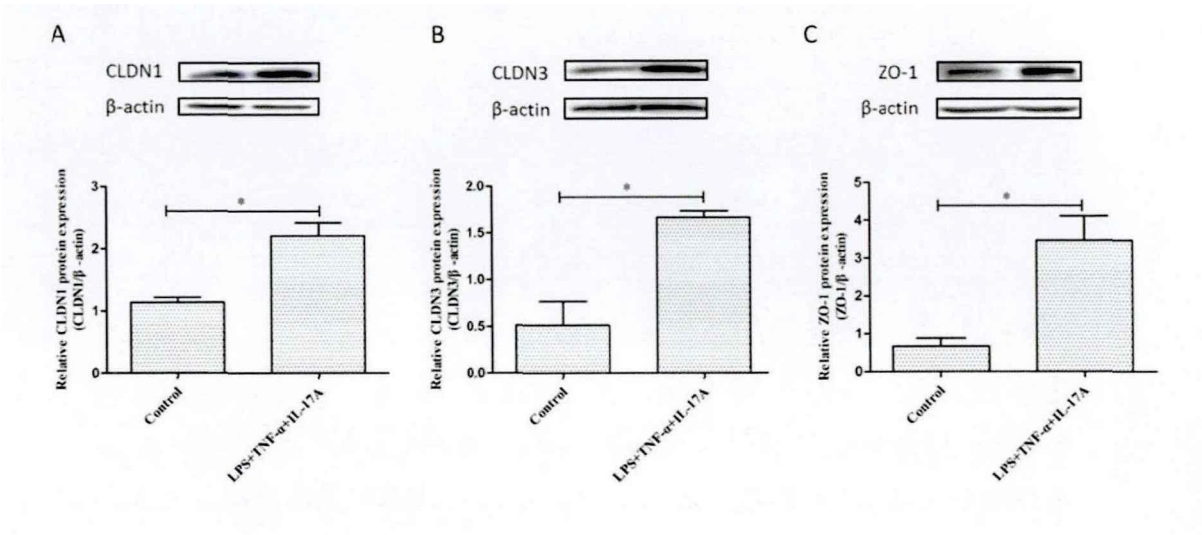


图 3.10 LPS+TNF- α 与 IL-17A 联合作用对 Caco-2 细胞中 CLDN1、CLDN3 和 ZO-1 蛋白水平的影响

Fig 3.10 Effects of LPS+TNF- α in combination with IL-17A on CLDN1, CLDN3 and ZO-1 protein levels in Caco-2 cells

LPS+TNF- α +IL-17A 处理 48 h 后 Caco-2 细胞中 CLDN1 (A)、CLDN3 (B) 和 ZO-1 (C) 蛋白水平的 Western blot 检测; 垂直条代表平均值 $\pm$ SD($n=3$), 统计学方法: unpaired two-tailed t test (*: $P < 0.05$)

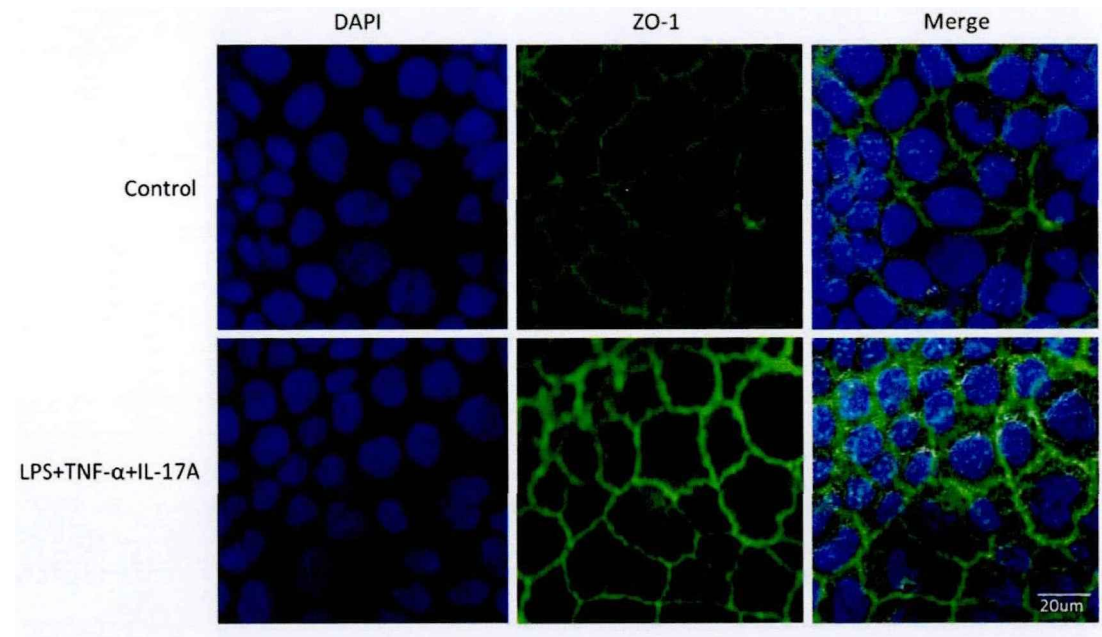


图 3.11 激光共聚焦观察 LPS+TNF- α 与 IL-17A 联合作用对 Caco-2 细胞中 ZO-1 蛋白水平的影响

Fig 3.11 Laser scanning confocal microscopy observed effects of LPS+TNF- α in combination with IL-17A on ZO-1 protein expression in Caco-2 cells.

LPS+TNF- α +IL-17A 处理 48 h 后 Caco-2 细胞中 ZO-1 蛋白水平的细胞免疫荧光检测, 蓝色为细胞核, 绿色为 ZO-1 蛋白, 比例尺为 20 μ m

5 LPS、TNF- α 及 IL-17A 影响紧密连接相关基因表达的信号通路

5.1 LPS+TNF- α 和 IL-17A 对 NF- κ B、MAPK 通路相关蛋白磷酸化水平的影响

Caco-2 细胞单层铺满后, 向细胞中加入 LPS (终浓度为 1 μ g/mL)、TNF- α (终浓度为 100 ng/mL)、IL-17A (终浓度为 100 ng/mL), 在刺激剂作用 0 min、5 min、15 min、30 min、60 min 后收集细胞样品并提取总蛋白, 用 Western blot 方法检测 NF- κ B、MAPK 信号通路中 p65、p38 蛋白的磷酸化水平并与总蛋白水平做了比较。如图 3.12 所示, NF- κ B p65 在 LPS+TNF- α +IL-17A 作用后 15 min 开始活化 ($P=0.0321$), 在作用后 30 min 活化程度最高 ($P=0.0111$), 并在作用后 60 min 恢复; MAPK P38 蛋白在刺激剂作用后 5min 就开始活化 ($P=0.0018$), 在作用后 15 min 恢复, 并在作用后 30 min 时发生第二次活化 ($P=0.0016$), 作用后 60 min 恢复正常。该结果表明 LPS+TNF- α 与 IL-17A 协同影响紧密连接蛋白表达过程中有 NF- κ B、MAPK 信号通路的参与, 且信号通路的活化发生在刺激剂作用后 5 min 到 1 h 之内, 其中 MAPK 信号通路分别在刺激剂作用后 5 min 和 30 min 发生了两次活化。

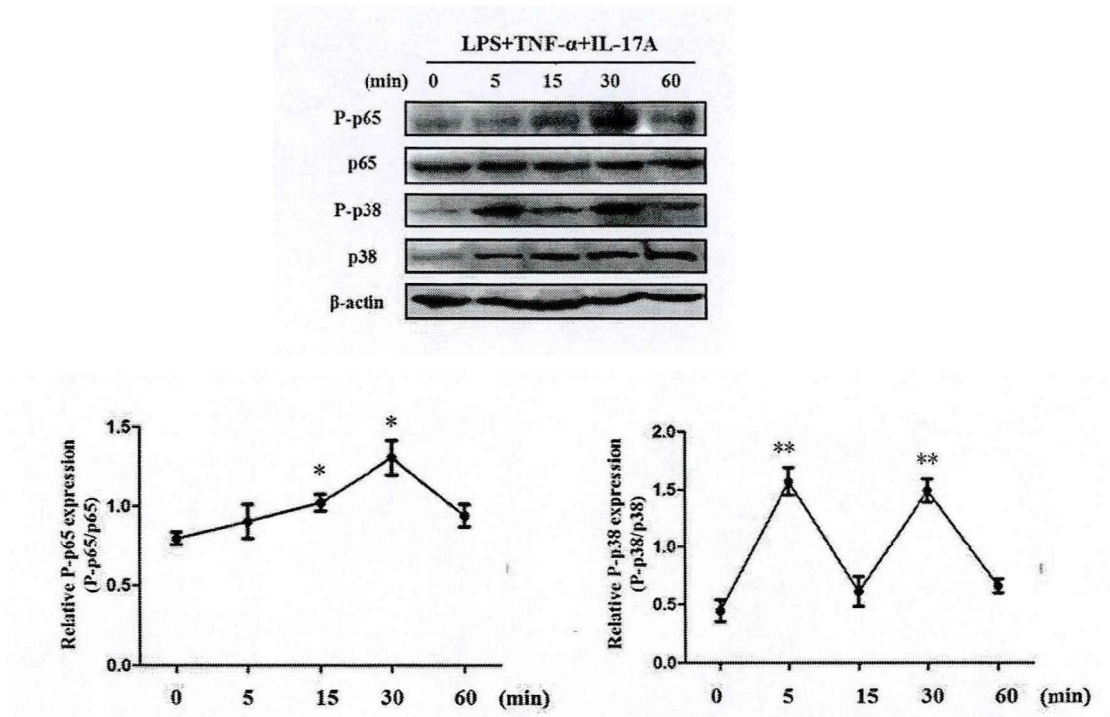


图 3.12 LPS+TNF- α 和 IL-17A 联合作用对 Caco-2 细胞中 NF- κ B p65 蛋白和 MAPK p38 蛋白磷酸化水平的影响

Fig 3.12 Effects of LPS+TNF- α in combination with IL-17A on the phosphorylation of NF- κ B subunit p65 and MAPK p38 proteins in Caco-2 cells

LPS+TNF- α +IL-17A 处理不同时间点后 Caco-2 细胞中 NF- κ B p65 蛋白、MAPK p38 蛋白及磷酸化蛋白的 Western blot 检测；垂直条代表平均值 $\pm$ SD (n=3)，统计学方法：unpaired two-tailed t test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$)

5.2 NF- κ B、MAPK 通路选择性抑制剂对 LPS、TNF- α 、IL-17A 介导的紧密连接相关基因及蛋白表达的影响

为了进一步说明 NF- κ B 和 MAPK 信号通路参与 LPS、TNF- α 、IL-17A 介导的紧密连接相关基因表达的调控,本研究用 BAY11-7082(NF- κ B 抑制剂, 10 μ M)、U0126 (MAPK 激酶 MEK1/2 抑制剂, 10 μ M) 分别处理 Caco-2 细胞单层 2h 后, 弃掉抑制剂并用 PBS 将细胞清洗 2 次, 向细胞单层中加入 LPS、TNF- α 、IL-17A 共培养 24h, 利用实时荧光定量 RT-PCR 对 *CLDN1*、*CLDN3*、*ZO-1* 的表达进行转录水平的检测, 或共培养 48h 后用蛋白免疫印迹进行蛋白水平的检测。

NF- κ B 抑制剂 BAY11-7082 对三种紧密连接相关基因转录水平的表达均起到

了抑制作用 ($CLDN1$ $P=0.0181$, $CLDN3$ $P=0.0482$, $ZO-1$ $P=0.0395$), 且与未加抑制剂组相比, 三种紧密连接蛋白 mRNA 水平均下降了 1 倍; MEK1/2 抑制剂 U0126 仅对 $ZO-1$ mRNA 产生了明显的抑制作用 ($P=0.0038$), 对 $CLDN1$ 和 $CLDN3$ mRNA 有抑制表达的趋势, 但没有统计学意义, 见图 3.13。

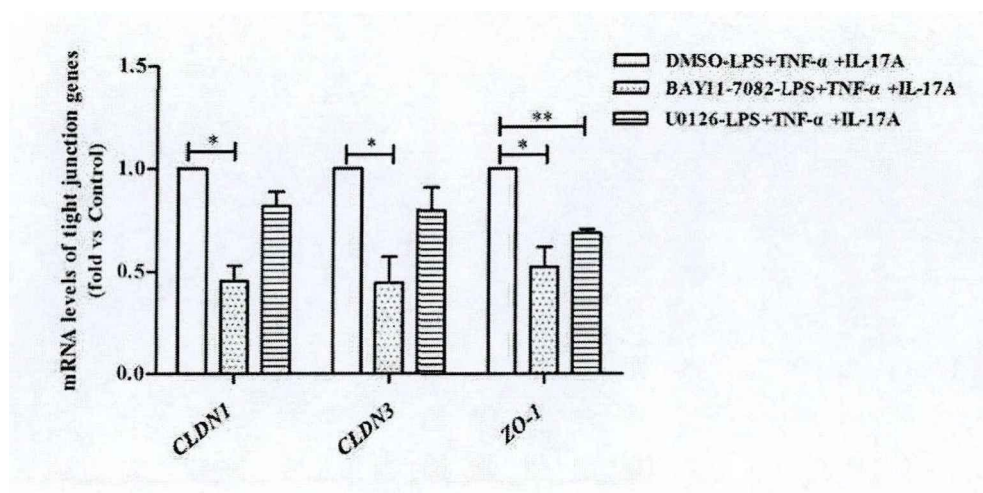


图 3.13 NF- κ B 和 MAPK 抑制剂对 Caco-2 细胞中 $CLDN1$ 、 $CLDN3$ 和 $ZO-1$ 转录水平的影响

Fig 3.13 Effects of NF- κ B and MAPK inhibitors on the transcription levels of $CLDN1$, $CLDN3$ and $ZO-1$ in Caco-2 cells

NF- κ B 或 MAPK 抑制剂处理 Caco-2 细胞 2 h, 加入 LPS、TNF- α 、IL-17A 处理 24 h 后 Caco-2 细胞中 $CLDN1$ 、 $CLDN3$ 和 $ZO-1$ mRNA 水平的 qPCR 检测; 垂直条代表平均值 $\pm$ SD ($n=3$), 统计学方法: unpaired two-tailed t test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$)

从蛋白水平看, 抑制 NF- κ B 信号通路对 $CLDN1$ 、 $CLDN3$ 和 $ZO-1$ 表达均有明显的抑制作用 ($P=0.0063$, $P=0.0331$, $P=0.0076$), 其中 $ZO-1$ 表达下降了 2 倍; 抑制 MAPK 信号通路使 $CLDN3$ 和 $ZO-1$ 蛋白显著下调 ($P=0.0241$, $P=0.0339$), 但对 $CLDN1$ 蛋白表达无明显影响。

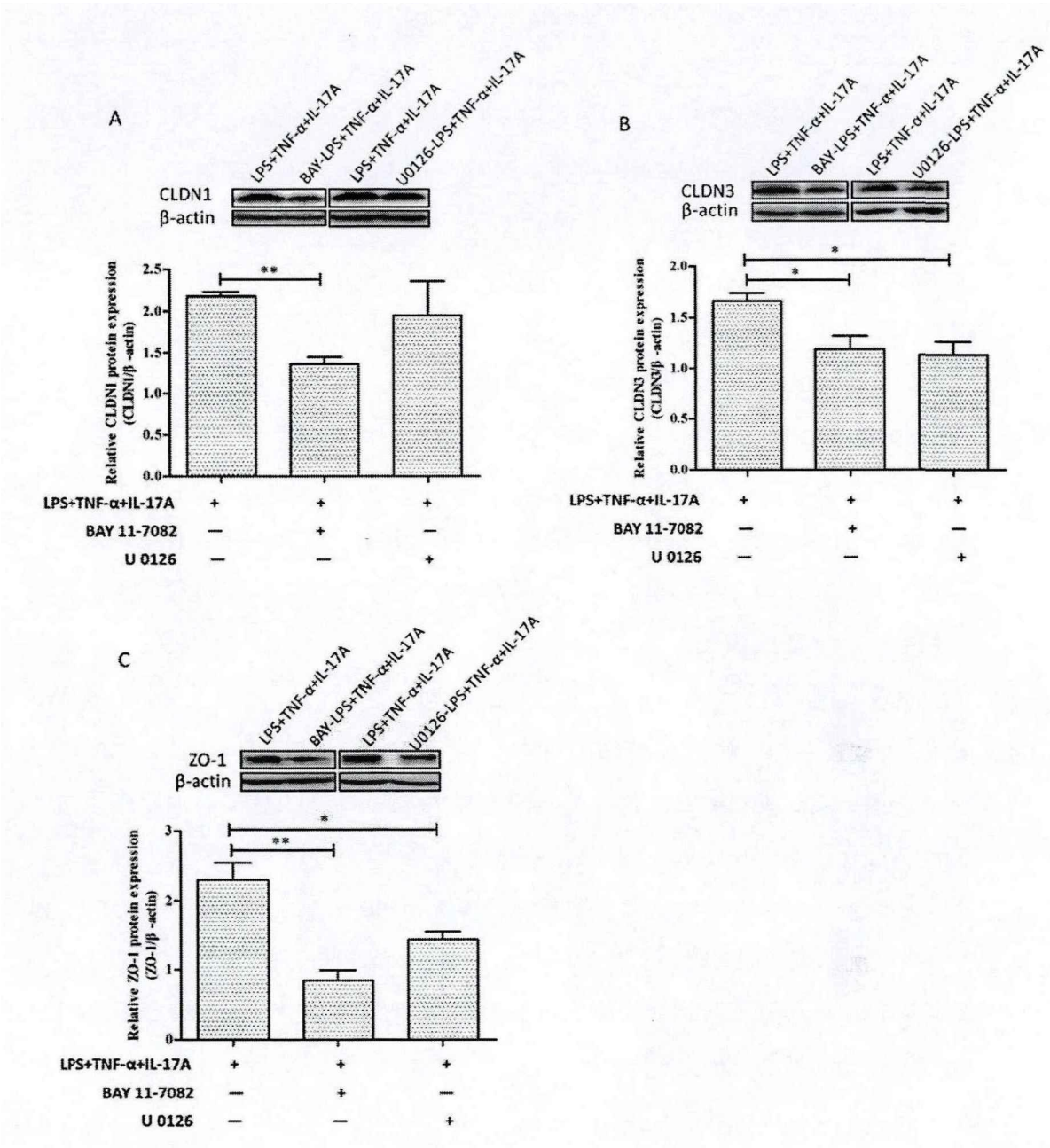


图 3.14 NF-κB 和 MAPK 抑制剂对 Caco-2 细胞中 CLDN1、CLDN3 和 ZO-1 蛋白水平的影响

Fig 3.14 Effects of NF-κB and MAPK inhibitors on CLDN1, CLDN3 and ZO-1 protein levels in Caco-2 cells

NF-κB 或 MAPK 抑制剂处理 Caco-2 细胞 2 h, 加入 LPS、TNF-α、IL-17A 处理 48 h 后 Caco-2 细胞中 CLDN1 (A)、CLDN3 (B) 和 ZO-1 (C) 蛋白水平的 Western blot 检测; 垂直条代表平均值±SD (n=3), 统计学方法: unpaired two-tailed t test (*: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$)

第四节 讨论

SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* mRNA 水平是对照组的 5~10 倍, 但高表达的原因尚不明确。在 HIV-1/SIV 感染中, 肠道粘膜 TNF- α 和 LPS 水平的升高可能是致使 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 表达升高的重要原因[181]。本部分研究发现 SHIV/SIV 感染伴随着肠道粘膜中 TNF- α 的表达水平的升高和肠道微生物移位, 且 TNF- α 的表达与组织中病毒载量和 *IL-17R* 都存在正相关性。在体外细胞模型中, 本研究证实了在 *IL-17A* 或 *IL-17F* 存在的情况下, LPS 和 TNF- α 能够促进 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 的表达。虽然肠道中 *IL-17A* 水平的下降可能导致 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 表达水平降低, 但 *IL-17F* 升高可能补偿了 *IL-17A* 下调的作用。这些数据表明, SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 表达的增加可能主要由微生物移位和炎症环境所致。关于促进 *IL-17R* 表达的其它因素尚需要进一步研究确定。

HIV-1 包膜糖蛋白除了在病毒进入宿主细胞过程中起关键作用外, 它对宿主细胞还具有多种非进入相关的生物学效应[182]。在肠道中, HIV-1 及 gp120 蛋白可以影响肠上皮细胞紧密连接相关基因的表达[88], 另外, HIV-1 包膜糖蛋白以高浓度存在于 HIV-1 感染者及 SIV 感染的恒河猴组织中[183], 可能会影响 *IL-17R* 的表达。本研究发现在肠道上皮细胞中 HIV-1 gp140 单独作用会抑制 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 的表达, 然而, 当 LPS、TNF- α 及 *IL-17* 存在时, HIV-1 gp140 对 *IL-17R* 的抑制作用不足以逆转 LPS 和炎症因子对 *IL-17R* 的促表达作用。这些数据说明, 肠道粘膜炎症环境可能是 SHIV/SIV 感染中 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 高表达的主要驱动因素。

IL-17R 信号对于控制粘膜感染和维持粘膜屏障功能至关重要[147, 184, 185], 同时, *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 在控制肠道共生微生物中发挥重要作用[115]。在 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中, *IL-17* 通路及其在 HIV/AIDS 发病机制中的作用仍有待进一步研究。虽然已有研究指出 HIV-1 感染者肠道微生物菌群与正常人相比发生了显著的变化[181, 186], 但 *IL-17R* 表达改变与微生物失调之间的分子联系仍有待进一步揭示。*IL-17RA* 和 *IL-17RC* 广泛表达于上皮细胞和成纤维细胞中[111, 123, 144], 但是由于没有找到恒河猴 *IL-17R* 的合适抗体, 导致本研究中表达 *IL-17R* 的细胞类型尚未确定。

本部分研究观察了 LPS 和 TNF- α 对肠道上皮细胞屏障功能及紧密连接相关基因表达的影响,发现二者共刺激对 Caco-2 细胞屏障功能没有明显的影响。二者对 *CLDN5* 和 *CLDN8* 转录水平表达也无影响,对其它紧密连接相关基因表达也只具有轻微的促进或抑制作用。事实上,在目前的研究中,TNF- α 对体外细胞系中紧密连接蛋白的表达的影响存在不同的结果,有的研究认为 TNF- α 能够在转录水平降低 *OCN* 和 *ZO-3* 的表达[187],*CLDN* 蛋白存在磷酸化和非磷酸化两种形式,紧密连接蛋白的组装和跨膜电阻的形成与其酪氨酸残基的磷酸化有关[188],TNF- α 对肠道粘膜通透性的影响可能是其下调紧密连接蛋白磷酸化水平的结果。有的研究认为 TNF- α 对 *CLDN* 蛋白的表达没有影响[189, 190]。也有报道曾指出 LPS 在 24 小时之内并不会对 Caco-2 的跨膜电阻值产生影响[191],但关于 LPS 和 TNF- α 共同作用对 Caco-2 细胞紧密连接蛋白表达的影响目前还没有报道。这些结果的差异可能与研究所选的细胞系及 LPS/TNF- α 的作用时间有关,单一细胞因子及短时间作用可能不会引起紧密连接蛋白的变化。

本部分研究发现 LPS+TNF- α 与 IL-17A 能够协同促进 Caco-2 细胞屏障功能及紧密连接相关基因的表达。之前的报道主要关注了 LPS、TNF- α 、IL-17A 单独作用对肠道上皮紧密连接表达的影响,并已经证实了 IL-17A 可以通过上调 *CLDN1* 和 *ZO-1* 的表达促进粘膜表面的紧密连接形成,且 IL-17A 能够以一种非促进细胞增殖的方式促进 T84 细胞间紧密连接的形成,这与本研究的结果相符,这在一定程度上解释了 Th17 细胞通过诱导表达紧密连接来实现上皮细胞的再生。在 LPS 和 TNF- α 存在时 IL-17A 对紧密连接相关基因的促表达作用更加明显,研究表明,TNF- α 介导肠道上皮细胞紧密连接蛋白表达中有 MLCK 和 NF- κ B 信号的参与[187],此外,LPS 与 LBP 相互作用后,能够将 LPS 转移到膜 CD14-TLR4 复合物上,TLR4 将信号转导至细胞核,导致 NF- κ B 信号的激活和 TNF- α 、IL-1、IL-6 等细胞因子产生[192],LPS+TNF- α 和 IL-17A 对肠道上皮屏障功能的调控过程中都伴随着 NF- κ B 信号通路的激活可能是 LPS+TNF- α 与 IL-17A 产生协同作用的一个重要原因。

IL-17A 可以通过 MAPK 信号通路调控 T84 细胞间紧密连接蛋白的表达[162, 193]。本研究对 IL-17A 诱导紧密连接相关基因表达的机制进行了探讨,发现在 LPS 和 TNF- α 存在时,IL-17A 不仅能够激活 MAPK 信号通路,NF- κ B 信号通路

同样也发生了活化，通路的选择性抑制剂均对 *ZO-1* 的表达产生了明显的抑制作用。另外，NF- κ B 信号通路的选择性抑制剂对 *CLDN1*、*CLDN3* 和 *ZO-1* 的转录水平和蛋白水平均产生了明显的抑制。本研究已经明确了细胞因子调控紧密连接相关基因表达过程中 NF- κ B、MAPK 的活化，在一定程度上揭示了细胞因子参与调控肠道上皮屏障功能的分子基础，但对于信号通路的活化机制仍有待研究。

本部分研究探讨了可能引起 SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 表达升高的因素，并在体外细胞模型中探讨了这些因素对肠道上皮细胞屏障功能及紧密连接相关基因表达的影响，证实了炎性细胞因子和微生物移位对肠道屏障功能的调控。这些结果为 HIV/AIDS 相关肠道损伤防治靶点的获得提供一定的理论支持。

第五节 小结

1. SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中发生微生物移位并伴随着 *TNF- α* mRNA 水平升高, 且 *TNF- α* 表达与肠道病毒载量、*IL-17RA/IL-17RC* 表达均存在正相关性。
2. 低浓度的 IL-17A 促进 *IL-17RA/IL-17RC* 的表达, 随着 IL-17A 浓度的升高, 其促 *IL-17RA/IL-17RC* 表达作用逐渐减弱, 甚至产生抑制作用。
3. LPS+TNF- α 与 IL-17A/IL-17F 联合促进 Caco-2 细胞中 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 的表达。
4. HIV-1 gp140 抑制 *IL-17RA/IL-17RC* 的表达, 当 LPS、TNF- α 、IL-17A/IL-17F 存在时, HIV-1 gp140 不足以逆转这些因子的促 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 表达效果。
5. LPS+TNF- α 与 IL-17A 协同促进紧密连接蛋白 *CLDN1*、*CLDN3* 和 *ZO-1* 的表达, 该过程有 NF- κ B 和 MAPK 信号通路的参与。

全文结论

1. SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道中 *CLDN5*, *8*, *11*, *12*, *14* 等多种紧密连接相关基因表达水平均低于对照组, 病毒及其蛋白组分的存在可能是导致肠道屏障功能破坏的直接原因。
2. SHIV/SIV 感染的恒河猴肠道粘膜中 *IL-17RA* 和 *IL-17RC* 表达的增加可能主要由微生物移位和炎症环境所致。
3. IL-17A 和 IL-17F 能够协同促进肠道上皮屏障功能, 并对 HIV-1 gp140 介导的屏障损伤提供良好的保护作用, 该过程伴随着 IL-17R 下游 NF- κ B 和 MAPK 信号通路的参与。
4. 虽然 HIV-1 感染伴随着肠道微生物移位的发生(LPS 的存在)和 IL-17F、TNF- α 等细胞因子的上调表达, 但这些因素仅对肠道屏障功能产生微弱的影响, 肠粘膜中 Th17 细胞的缺失及 IL-17A 水平降低可能是造成屏障功能损伤及不易修复的重要原因。

参考文献

1. Gonzalez SM, Aguilar-Jimenez W, Su RC, Rugeles MT. **Mucosa: Key Interactions Determining Sexual Transmission of the HIV Infection.** *Frontiers in immunology*. 2019;10:144.
2. Mayer L. **Mucosal immunity.** *Immunological reviews*. 2005 Aug;206:5.
3. Le Roux SM, Abrams EJ, Nguyen KK, Myer L. **HIV Incidence during breastfeeding and mother-to-child transmission in cape town, south africa.** *AIDS*. 2019 Mar 29.
4. Tugizov S. **Human immunodeficiency virus-associated disruption of mucosal barriers and its role in HIV transmission and pathogenesis of HIV/AIDS disease.** *Tissue barriers*. 2016 Jul-Sep;4(3):e1159276.
5. Marchetti G, Cozzi-Lepri A, Merlini E, Bellistri GM, Castagna A, Galli M, et al. **Microbial translocation predicts disease progression of HIV-infected antiretroviral-naive patients with high CD4+ cell count.** *AIDS*. 2011 Jul 17;25(11):1385-94.
6. Karim R, Mack WJ, Stiller T, Operskalski E, Frederick T, Landay A, et al. **Association of HIV clinical disease progression with profiles of early immune activation: results from a cluster analysis approach.** *AIDS*. 2013 Jun 1;27(9):1473-81.
7. Perkins MR, Bartha I, Timmer JK, Liebner JC, Wolinsky D, Gunthard HF, et al. **The Interplay Between Host Genetic Variation, Viral Replication, and Microbial Translocation in Untreated HIV-Infected Individuals.** *The Journal of infectious diseases*. 2015 Aug 15;212(4):578-84.
8. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. **Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection.** *Nature medicine*. 2006 Dec;12(12):1365-71.
9. Santos-Oliveira JR, Regis EG, Giacoia-Gripp CB, Valverde JG, Alexandrino-de-Oliveira P, Lindoso JA, et al. **Microbial translocation induces an intense proinflammatory response in patients with visceral leishmaniasis and HIV type 1 coinfection.** *The Journal of infectious diseases*. 2013 Jul;208(1):57-66.
10. Hoft DF, Eickhoff CS. **Type 1 immunity provides both optimal mucosal and systemic protection against a mucosally invasive, intracellular pathogen.** *Infection and immunity*. 2005 Aug;73(8):4934-40.
11. Chen Y, Chou K, Fuchs E, Havran WL, Boismenu R. **Protection of the intestinal mucosa by intraepithelial gamma delta T cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002 Oct 29;99(22):14338-43.
12. Berg RD. **Bacterial translocation from the gastrointestinal tract.** *Trends in microbiology*. 1995 Apr;3(4):149-54.

13. Vancamelbeke M, Vermeire S. **The intestinal barrier: a fundamental role in health and disease.** Expert review of gastroenterology & hepatology. 2017 Sep;11(9):821-34.
14. Chen J, Tsang LL, Ho LS, Rowlands DK, Gao JY, Ng CP, et al. **Modulation of human enteric epithelial barrier and ion transport function by Peyer's patch lymphocytes.** World journal of gastroenterology. 2004 Jun 1;10(11):1594-9.
15. Kugadas A, Wright Q, Geddes-McAlister J, Gadjeva M. **Role of Microbiota in Strengthening Ocular Mucosal Barrier Function Through Secretory IgA.** Investigative ophthalmology & visual science. 2017 Sep 1;58(11):4593-600.
16. Wang K, Wu LY, Dou CZ, Guan X, Wu HG, Liu HR. **Research Advance in Intestinal Mucosal Barrier and Pathogenesis of Crohn's Disease.** Gastroenterology research and practice. 2016;2016:9686238.
17. Tincati C, Douek DC, Marchetti G. **Gut barrier structure, mucosal immunity and intestinal microbiota in the pathogenesis and treatment of HIV infection.** AIDS research and therapy. 2016;13:19.
18. Roy U, Galvez EJC, Iljazovic A, Lesker TR, Blazejewski AJ, Pils MC, et al. **Distinct Microbial Communities Trigger Colitis Development upon Intestinal Barrier Damage via Innate or Adaptive Immune Cells.** Cell reports. 2017 Oct 24;21(4):994-1008.
19. Diebel LN, Liberati DM, Dulchavsky SA, Diglio CA, Brown WJ. **Enterocyte apoptosis and barrier function are modulated by SIgA after exposure to bacteria and hypoxia/reoxygenation.** Surgery. 2003 Oct;134(4):574-80.
20. Gunzel D, Yu AS. **Claudins and the modulation of tight junction permeability.** Physiol Rev. 2013 Apr;93(2):525-69. PubMed PMID: 23589827.
21. Gunzel D, Fromm M. **Claudins and other tight junction proteins.** Comprehensive Physiology. 2012 Jul;2(3):1819-52.
22. Gunzel D, Yu AS. **Claudins and the modulation of tight junction permeability.** Physiol Rev. 2013 Apr;93(2):525-69.
23. Runkle EA, Mu D. **Tight junction proteins: from barrier to tumorigenesis.** Cancer letters. 2013 Aug 28;337(1):41-8.
24. Hirase T, Kawashima S, Wong EY, Ueyama T, Rikitake Y, Tsukita S, et al. **Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by Rhoa-p160ROCK-dependent and -independent mechanisms.** The Journal of biological chemistry. 2001 Mar 30;276(13):10423-31.
25. Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E. **Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin, and occludin.** The Journal of biological chemistry. 2000 Jul 7;275(27):20520-6.
26. Kitajiri S, Miyamoto T, Mineharu A, Sonoda N, Furuse K, Hata M, et al. **Compartmentalization established by claudin-11-based tight junctions in stria**

- vascularis is required for hearing through generation of endocochlear potential. *J Cell Sci.* 2004 Oct 1;117(Pt 21):5087-96.
27. Nakano Y, Kim SH, Kim HM, Sanneman JD, Zhang Y, Smith RJ, et al. **A claudin-9-based ion permeability barrier is essential for hearing.** *PLoS genetics.* 2009 Aug;5(8):e1000610.
28. Fasano A. **Zonulin and its regulation of intestinal barrier function: the biological door to inflammation, autoimmunity, and cancer.** *Physiol Rev.* 2011 Jan;91(1):151-75.
29. Yonemura S, Itoh M, Nagafuchi A, Tsukita S. **Cell-to-cell adherens junction formation and actin filament organization: similarities and differences between non-polarized fibroblasts and polarized epithelial cells.** *J Cell Sci.* 1995 Jan;108 (Pt 1):127-42.
30. Kasapkara CS, Tumer L, Okur I, Hasanoglu A. **A novel mutation of the claudin 16 gene in familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis mimicking rickets.** *Genet Couns.* 2011;22(2):187-92.
31. Niessen CM. **Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function.** *The Journal of investigative dermatology.* 2007 Nov;127(11):2525-32.
32. Schneeberger EE, Lynch RD. **Structure, function, and regulation of cellular tight junctions.** *The American journal of physiology.* 1992 Jun;262(6 Pt 1):L647-61.
33. Morin-Brureau M, Lebrun A, Rousset MC, Fagni L, Bockaert J, de Bock F, et al. **Epileptiform activity induces vascular remodeling and zonula occludens 1 downregulation in organotypic hippocampal cultures: role of VEGF signaling pathways.** *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience.* 2011 Jul 20;31(29):10677-88.
34. Miyamoto N, de Kozak Y, Jeanny JC, Glotin A, Mascarelli F, Massin P, et al. **Placental growth factor-1 and epithelial haemato-retinal barrier breakdown: potential implication in the pathogenesis of diabetic retinopathy.** *Diabetologia.* 2007 Feb;50(2):461-70.
35. Farkas AE, Capaldo CT, Nusrat A. **Regulation of epithelial proliferation by tight junction proteins.** *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2012 Jul;1258:115-24.
36. Vicario M, Martinez C, Santos J. **Role of microRNA in IBS with increased gut permeability.** *Gut.* 2010 Jun;59(6):710-2.
37. Yang H, Rao JN, Wang JY. **Posttranscriptional Regulation of Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier by RNA-binding Proteins and microRNAs.** *Tissue barriers.* 2014 Jan 1;2(1):e28320. PubMed PMID: 24843843.
38. Cichon C, Sabharwal H, Ruter C, Schmidt MA. **MicroRNAs regulate tight junction proteins and modulate epithelial/endothelial barrier functions.** *Tissue barriers.* 2014;2(4):e944446.
39. Murakami T, Felinski EA, Antonetti DA. **Occludin phosphorylation and ubiquitination regulate tight junction trafficking and vascular endothelial growth factor-induced permeability.** *The Journal of biological chemistry.* 2009 Jul 31;284(31):21036-46.

40. Chattopadhyay R, Dyukova E, Singh NK, Ohba M, Mobley JA, Rao GN. **Correction: Vascular endothelial tight junctions and barrier function are disrupted by 15(S)-hydroxyecosatetraenoic acid partly via protein kinase C -mediated zona occludens-1 phosphorylation at threonine 770/772.** The Journal of biological chemistry. 2019 Mar 1;294(9):3311.
41. Avila-Flores A, Rendon-Huerta E, Moreno J, Islas S, Betanzos A, Robles-Flores M, et al. **Tight-junction protein zonula occludens 2 is a target of phosphorylation by protein kinase C.** The Biochemical journal. 2001 Dec 1;360(Pt 2):295-304.
42. Stuart RO, Nigam SK. Regulated assembly of tight junctions by protein kinase C. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 1995 Jun 20;92(13):6072-6.
43. Nunbhakdi-Craig V, Machleidt T, Ogris E, Bellotto D, White CL, 3rd, Sontag E. **Protein phosphatase 2A associates with and regulates atypical PKC and the epithelial tight junction complex.** The Journal of cell biology. 2002 Sep 2;158(5):967-78.
44. Fujibe M, Chiba H, Kojima T, Soma T, Wada T, Yamashita T, et al. **Thr203 of claudin-1, a putative phosphorylation site for MAP kinase, is required to promote the barrier function of tight junctions.** Experimental cell research. 2004 Apr 15;295(1):36-47.
45. D'Souza T, Agarwal R, Morin PJ. **Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells.** The Journal of biological chemistry. 2005 Jul 15;280(28):26233-40.
46. Tanaka M, Kamata R, Sakai R. **EphA2 phosphorylates the cytoplasmic tail of Claudin-4 and mediates paracellular permeability.** The Journal of biological chemistry. 2005 Dec 23;280(51):42375-82.
47. Soma T, Chiba H, Kato-Mori Y, Wada T, Yamashita T, Kojima T, et al. **Thr(207) of claudin-5 is involved in size-selective loosening of the endothelial barrier by cyclic AMP.** Experimental cell research. 2004 Oct 15;300(1):202-12.
48. Bruewer M, Utech M, Ivanov AI, Hopkins AM, Parkos CA, Nusrat A. **Interferon-gamma induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process.** FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 2005 Jun;19(8):923-33.
49. Amoozadeh Y, Dan Q, Xiao J, Waheed F, Szaszi K. **Tumor necrosis factor-alpha induces a biphasic change in claudin-2 expression in tubular epithelial cells: role in barrier functions.** American journal of physiology Cell physiology. 2015 Jul 1;309(1):C38-50.
50. Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker HC. **Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators.** Gastroenterology. 2000 Jun;118(6):1001-11.
51. Banan A, Zhang LJ, Farhadi A, Fields JZ, Shaikh M, Keshavarzian A. **PKC-beta1 isoform activation is required for EGF-induced NF-kappaB inactivation and IkappaBalpha stabilization and protection of F-actin assembly and barrier function**

- in enterocyte monolayers. American journal of physiology Cell physiology. 2004 Mar;286(3):C723-38.
52. Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, et al. **Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier.** The Journal of cell biology. 1999 Oct 4;147(1):195-204.
53. Tomson FL, Koutsouris A, Viswanathan VK, Turner JR, Savkovic SD, Hecht G. **Differing roles of protein kinase C-zeta in disruption of tight junction barrier by enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli.** Gastroenterology. 2004 Sep;127(3):859-69.
54. Johnson-Henry KC, Donato KA, Shen-Tu G, Gordanpour M, Sherman PM. **Lactobacillus rhamnosus strain GG prevents enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7-induced changes in epithelial barrier function.** Infection and immunity. 2008 Apr;76(4):1340-8.
55. Karczewski J, Troost FJ, Konings I, Dekker J, Kleerebezem M, Brummer RJ, et al. **Regulation of human epithelial tight junction proteins by Lactobacillus plantarum in vivo and protective effects on the epithelial barrier.** American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. 2010 Jun;298(6):G851-9.
56. Ou G, Hedberg M, Horstedt P, Baranov V, Forsberg G, Drobni M, et al. **Proximal small intestinal microbiota and identification of rod-shaped bacteria associated with childhood celiac disease.** The American journal of gastroenterology. 2009 Dec;104(12):3058-67.
57. De Palma G, Nadal I, Medina M, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, et al. **Intestinal dysbiosis and reduced immunoglobulin-coated bacteria associated with coeliac disease in children.** BMC microbiology. 2010 Feb 24;10:63.
58. Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, et al. **Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis.** Gastroenterology. 1999 Feb;116(2):301-9.
59. Burgel N, Bojarski C, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. **Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis.** Gastroenterology. 2002 Aug;123(2):433-43.
60. Dunlop SP, Hebden J, Campbell E, Naesdal J, Olbe L, Perkins AC, et al. **Abnormal intestinal permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable bowel syndromes.** The American journal of gastroenterology. 2006 Jun;101(6):1288-94.
61. Schulzke JD, Bentzel CJ, Schulzke I, Riecken EO, Fromm M. **Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue.** Pediatric research. 1998 Apr;43(4 Pt 1):435-41.
62. Watts T, Berti I, Sapone A, Gerarduzzi T, Not T, Zielke R, et al. **Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type I diabetes in BB diabetic-prone rats.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United

- States of America. 2005 Feb 22;102(8):2916-21.
63. Yokote H, Miyake S, Croxford JL, Oki S, Mizusawa H, Yamamura T. **NKT cell-dependent amelioration of a mouse model of multiple sclerosis by altering gut flora.** The American journal of pathology. 2008 Dec;173(6):1714-23.
64. Edwards CJ. **Commensal gut bacteria and the etiopathogenesis of rheumatoid arthritis.** The Journal of rheumatology. 2008 Aug;35(8):1477-1479.
65. Skardelly M, Armbruster FP, Meixensberger J, Hilbig H. **Expression of Zonulin, c-kit, and Glial Fibrillary Acidic Protein in Human Gliomas.** Translational oncology. 2009 Aug 18;2(3):117-20.
66. Cerejido M, Contreras RG, Flores-Benitez D, Flores-Maldonado C, Larre I, Ruiz A, et al. **New diseases derived or associated with the tight junction.** Arch Med Res. 2007 Jul;38(5):465-78.
67. Resnick MB, Gavilanez M, Newton E, Konkin T, Bhattacharya B, Britt DE, et al. **Claudin expression in gastric adenocarcinomas: a tissue microarray study with prognostic correlation.** Human pathology. 2005 Aug;36(8):886-92.
68. de Oliveira SS, de Oliveira IM, De Souza W, Morgado-Diaz JA. **Claudins upregulation in human colorectal cancer.** FEBS letters. 2005 Nov 7;579(27):6179-85.
69. Soini Y. **Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours.** Histopathology. 2005 May;46(5):551-60.
70. Wojcik-Cichy K, Piekarska A, Jablonowska E. **Intestinal Barrier Impairment and Immune Activation in HIV-Infected Advanced Late Presenters are Not Dependent on CD4 Recovery.** Archivum immunologiae et therapiae experimentalis. 2018 Aug;66(4):321-7.
71. Colebunders R, Lusakumuni K, Nelson AM, Gigase P, Lebughe I, van Marck E, et al. **Persistent diarrhoea in Zairian AIDS patients: an endoscopic and histological study.** Gut. 1988 Dec;29(12):1687-91.
72. Smith PD, Lane HC, Gill VJ, Manischewitz JF, Quinnan GV, Fauci AS, et al. **Intestinal infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). Etiology and response to therapy.** Ann Intern Med. 1988 Mar;108(3):328-33.
73. Ullrich R, Zeitz M, Heise W, L'Age M, Hoffken G, Riecken EO. **Small intestinal structure and function in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV): evidence for HIV-induced enteropathy.** Ann Intern Med. 1989 Jul 1;111(1):15-21.
74. Stockmann M, Fromm M, Schmitz H, Schmidt W, Riecken EO, Schulzke JD. **Duodenal biopsies of HIV-infected patients with diarrhoea exhibit epithelial barrier defects but no active secretion.** AIDS. 1998 Jan 1;12(1):43-51.
75. Kapembwa MS, Fleming SC, Sewankambo N, Serwadda D, Lucas S, Moody A, et al. **Altered small-intestinal permeability associated with diarrhoea in human-immunodeficiency-virus-infected Caucasian and African subjects.** Clinical

- science. 1991 Sep;81(3):327-34.
76. Epple HJ, Allers K, Troger H, Kuhl A, Erben U, Fromm M, et al. **Acute HIV infection induces mucosal infiltration with CD4+ and CD8+ T cells, epithelial apoptosis, and a mucosal barrier defect.** Gastroenterology. 2010 Oct;139(4):1289-300.
77. Sankaran S, George MD, Reay E, Guadalupe M, Flamm J, Prindiville T, et al. **Rapid onset of intestinal epithelial barrier dysfunction in primary human immunodeficiency virus infection is driven by an imbalance between immune response and mucosal repair and regeneration.** J Virol. 2008 Jan;82(1):538-45.
78. Hirao LA, Grishina I, Bourry O, Hu WK, Somrit M, Sankaran-Walters S, et al. **Early mucosal sensing of SIV infection by paneth cells induces IL-1beta production and initiates gut epithelial disruption.** PLoS pathogens. 2014 Aug;10(8):e1004311.
79. Zhang WJ, Wang Y, Yu K, Duan JZ, Yao WR, Wang Y, et al. **Associated changes in the transcription levels of IL-17A and tight junction-associated genes in the duodenal mucosa of rhesus macaques repeatedly exposed to simian/human immunodeficiency virus.** Experimental and molecular pathology. 2014 Oct;97(2):225-33.
80. Annunziata P. **Blood-brain barrier changes during invasion of the central nervous system by HIV-1. Old and new insights into the mechanism.** J Neurol. 2003 Aug;250(8):901-6.
81. McRae M. **HIV and viral protein effects on the blood brain barrier.** Tissue barriers. 2016 Jan-Mar;4(1):e1143543.
82. Louboutin JP, Agrawal L, Reyes BA, Van Bockstaele EJ, Strayer DS. **HIV-1 gp120-induced injury to the blood-brain barrier: role of metalloproteinases 2 and 9 and relationship to oxidative stress.** Journal of neuropathology and experimental neurology. 2010 Aug;69(8):801-16.
83. Pu H, Tian J, Andras IE, Hayashi K, Flora G, Hennig B, et al. **HIV-1 Tat protein-induced alterations of ZO-1 expression are mediated by redox-regulated ERK 1/2 activation.** Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. 2005 Oct;25(10):1325-35.
84. Qian YW, Li C, Jiang AP, Ge S, Gu P, Fan X, et al. **HIV-1 gp120 Glycoprotein Interacting with Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule 3-grabbing Non-integrin (DC-SIGN) Down-Regulates Tight Junction Proteins to Disrupt the Blood Retinal Barrier and Increase Its Permeability.** The Journal of biological chemistry. 2016 Oct 28;291(44):22977-87.
85. Tan S, Duan H, Xun T, Ci W, Qiu J, Yu F, et al. **HIV-1 impairs human retinal pigment epithelial barrier function: possible association with the pathogenesis of HIV-associated retinopathy.** Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 2014 Jul;94(7):777-87.
86. Bai L, Zhang Z, Zhang H, Li X, Yu Q, Lin H, et al. **HIV-1 Tat protein alter the tight**

- junction integrity and function of retinal pigment epithelium: an in vitro study. BMC infectious diseases. 2008 Jun 6;8:77.
87. Sufiawati I, Tugizov SM. **HIV-associated disruption of tight and adherens junctions of oral epithelial cells facilitates HSV-1 infection and spread.** PloS one. 2014;9(2):e88803.
88. Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN, Ouellet M, Tremblay MJ, Gray-Owen SD, et al. **Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation.** PLoS pathogens. 2010 Apr 8;6(4):e1000852.
89. Denker BM, Nigam SK. **Molecular structure and assembly of the tight junction.** The American journal of physiology. 1998 Jan;274(1 Pt 2):F1-9.
90. Fukuhara A, Irie K, Nakanishi H, Takekuni K, Kawakatsu T, Ikeda W, et al. **Involvement of nectin in the localization of junctional adhesion molecule at tight junctions.** Oncogene. 2002 Oct 31;21(50):7642-55.
91. Zheng A, Yuan F, Li Y, Zhu F, Hou P, Li J, et al. **Claudin-6 and claudin-9 function as additional coreceptors for hepatitis C virus.** J Virol. 2007 Nov;81(22):12465-71.
92. Gunzel D, Stuiver M, Kausalya PJ, Haisch L, Krug SM, Rosenthal R, et al. **Claudin-10 exists in six alternatively spliced isoforms that exhibit distinct localization and function.** J Cell Sci. 2009 May 15;122(Pt 10):1507-17.
93. Klar J, Piontek J, Milatz S, Tariq M, Jameel M, Breiderhoff T, et al. **Altered paracellular cation permeability due to a rare CLDN10B variant causes anhidrosis and kidney damage.** PLoS genetics. 2017 Jul;13(7):e1006897.
94. Thompson PD, Tipney H, Brass A, Noyes H, Kemp S, Naessens J, et al. **Claudin 13, a member of the claudin family regulated in mouse stress induced erythropoiesis.** PloS one. 2010 Sep 10;5(9).
95. Weber CR, Nalle SC, Tretiakova M, Rubin DT, Turner JR. **Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation.** Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology. 2008 Oct;88(10):1110-20.
96. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, et al. **Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease.** Gut. 2007 Jan;56(1):61-72.
97. Barmeyer C, Troeger H, Bojarski C, Siegmund B, Fromm M, Schulzke JD: **Su1461 Lymphocytic Colitis-Related Diarrhea Is Caused by Both, ERK1/2-Dependent Inhibition of the Epithelial Sodium Channel (ENaC) and a Claudin-Induced Barrier Defect.** Gastroenterology 2014, 146(5):S-475-S-475.
98. Barmeyer C, Erko I, Fromm A, Bojarski C, Allers K, Moos V, et al. **Ion transport and barrier function are disturbed in microscopic colitis.** Annals of the New York Academy of Sciences. 2012 Jul;1258:143-8.

99. Brand S, Beigel F, Olszak T, Zitzmann K, Eichhorst ST, Otte JM, et al. **IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration.** American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology. 2006 Apr;290(4):G827-38.
100. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, et al. **Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides.** The Journal of experimental medicine. 2006 Oct 2;203(10):2271-9.
101. Kok A, Hocqueloux L, Hocini H, Carriere M, Lefrou L, Guguin A, et al. **Early initiation of combined antiretroviral therapy preserves immune function in the gut of HIV-infected patients.** Mucosal immunology. 2015 Jan;8(1):127-40.
102. Shi S, Seki S, Matano T, Yamamoto H. **IL-21-producer CD4+ T cell kinetics during primary simian immunodeficiency virus infection.** Microbes and infection / Institut Pasteur. 2013 Sep-Oct;15(10-11):697-707.
103. Favre D, Lederer S, Kanwar B, Ma ZM, Proll S, Kasakow Z, et al. **Critical loss of the balance between Th17 and T regulatory cell populations in pathogenic SIV infection.** PLoS pathogens. 2009 Feb;5(2):e1000295.
104. Brenchley JM, Paiardini M, Knox KS, Asher AI, Cervasi B, Asher TE, et al. **Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections.** Blood. 2008 Oct 1;112(7):2826-35.
105. Chege D, Sheth PM, Kain T, Kim CJ, Kovacs C, Loutfy M, et al. **Sigmoid Th17 populations, the HIV latent reservoir, and microbial translocation in men on long-term antiretroviral therapy.** AIDS. 2011 Mar 27;25(6):741-9.
106. Guillot-Delost M, Le Gouvello S, Mesel-Lemoine M, Cherai M, Baillou C, Simon A, et al. **Human CD90 identifies Th17/Tc17 T cell subsets that are depleted in HIV-infected patients.** Journal of immunology. 2012 Feb 1;188(3):981-91.
107. Schuetz A, Deleage C, Sereti I, Rerknimitr R, Phanuphak N, Phuang-Ngern Y, et al. **Initiation of ART during early acute HIV infection preserves mucosal Th17 function and reverses HIV-related immune activation.** PLoS pathogens. 2014 Dec;10(12):e1004543.
108. McKinnon LR, Nyanga B, Kim CJ, Izulla P, Kwatampora J, Kimani M, et al. **Early HIV-1 infection is associated with reduced frequencies of cervical Th17 cells.** Journal of acquired immune deficiency syndromes. 2015 Jan 1;68(1):6-12.
109. Ge D, You Z. **Expression of interleukin-17RC protein in normal human tissues.** International archives of medicine. 2008 Oct 17;1(1):19.
110. Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP, Lee J, Cai L, Risser P, et al. **IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding.** The EMBO journal. 2001 Oct 1;20(19):5332-41.
111. Cortez DM, Feldman MD, Mummidi S, Valente AJ, Steffensen B, Vincenti M, et al.

- IL-17 stimulates MMP-1 expression in primary human cardiac fibroblasts via p38 MAPK- and ERK1/2-dependent C/EBP-beta , NF-kappaB, and AP-1 activation.** American journal of physiology Heart and circulatory physiology. 2007 Dec;293(6):H3356-65.
112. Freitas A, Alves-Filho JC, Victoni T, Secher T, Lemos HP, Sonogo F, et al. **IL-17 receptor signaling is required to control polymicrobial sepsis.** Journal of immunology. 2009 Jun 15;182(12):7846-54.
113. Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, et al. **Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis.** The Journal of experimental medicine. 2009 Feb 16;206(2):299-311.
114. Yang B, Wang Y, Zhao C, Yan W, Che H, Shen C, et al. **Increased Th17 cells and interleukin-17 contribute to immune activation and disease aggravation in patients with chronic hepatitis B virus infection.** Immunol Lett. 2013 Jan;149(1-2):41-9.
115. Kumar P, Monin L, Castillo P, Elsegeiny W, Horne W, Eddens T, et al. **Intestinal Interleukin-17 Receptor Signaling Mediates Reciprocal Control of the Gut Microbiota and Autoimmune Inflammation.** Immunity. 2016 Mar 15;44(3):659-71.
116. Levy R, Okada S, Beziat V, Moriya K, Liu C, Chai LY, et al. **Genetic, immunological, and clinical features of patients with bacterial and fungal infections due to inherited IL-17RA deficiency.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2016 Dec 20;113(51):E8277-E85.
117. Ambrosi A, Espinosa A, Wahren-Herlenius M. **IL-17: a new actor in IFN-driven systemic autoimmune diseases.** European journal of immunology. 2012 Sep;42(9):2274-84.
118. Gaffen SL. **Structure and signalling in the IL-17 receptor family.** Nature reviews Immunology. 2009 Aug;9(8):556-67.
119. Nakashima T, Jinnin M, Yamane K, Honda N, Kajihara I, Makino T, et al. **Impaired IL-17 signaling pathway contributes to the increased collagen expression in scleroderma fibroblasts.** Journal of immunology. 2012 Apr 15;188(8):3573-83.
120. Somers J, Ruttens D, Verleden SE, Vandermeulen E, Piloni D, Wauters E, et al. **Interleukin-17 receptor polymorphism predisposes to primary graft dysfunction after lung transplantation.** The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation. 2015 Jul;34(7):941-9.
121. Crowe CR, Chen K, Pociask DA, Alcorn JF, Krivich C, Enelow RI, et al. **Critical role of IL-17RA in immunopathology of influenza infection.** Journal of immunology. 2009 Oct 15;183(8):5301-10.
122. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. **The IL-23-IL-17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing.** Nature reviews Immunology. 2014 Sep;14(9):585-600.
123. Koerner P, Traeger T, Mehmcke H, Cziupka K, Kessler W, Busemann A, et al. **Stimulation of TLR7 prior to polymicrobial sepsis improves the immune control of**

- the inflammatory response in adult mice.** Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society. 2011 Mar;60(3):271-9.
124. Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, et al. **Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis.** The Journal of experimental medicine. 2009 Feb 16;206(2):299-311.
125. Li D, Wang FJ, Yu L, Yao WR, Cui YF, Yang GB. **Expression of pIgR in the tracheal mucosa of SHIV/SIV-infected rhesus macaques.** Zoological research. 2017 Jan 18;38(1):44-8.
126. Wang Y, Yang GB. **Alteration of Polymeric Immunoglobulin Receptor and Neonatal Fc Receptor Expression in the Gut Mucosa of Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Macaques.** Scandinavian journal of immunology. 2016 Apr;83(4):235-43.
127. Yang GB, Wang Y, Babaahmady K, Scholler J, Rahman D, Bunnik E, et al. **Immunization with recombinant macaque major histocompatibility complex class I and II and human immunodeficiency virus gp140 inhibits simian-human immunodeficiency virus infection in macaques.** The Journal of general virology. 2012 Jul;93(Pt 7):1506-18.
128. Greene C, Hanley N, Campbell M. **Claudin-5: gatekeeper of neurological function.** Fluids and barriers of the CNS. 2019 Jan 29;16(1):3.
129. Yu AS, Enck AH, Lencer WI, Schneeberger EE. **Claudin-8 expression in Madin-Darby canine kidney cells augments the paracellular barrier to cation permeation.** The Journal of biological chemistry. 2003 May 9;278(19):17350-9.
130. Angelow S, Kim KJ, Yu AS. **Claudin-8 modulates paracellular permeability to acidic and basic ions in MDCK II cells.** The Journal of physiology. 2006 Feb 15;571(Pt 1):15-26.
131. Denninger AR, Breglio A, Maheras KJ, LeDuc G, Cristiglio V, Deme B, et al. **Claudin-11 Tight Junctions in Myelin Are a Barrier to Diffusion and Lack Strong Adhesive Properties.** Biophysical journal. 2015 Oct 6;109(7):1387-97.
132. Fujita H, Sugimoto K, Inatomi S, Maeda T, Osanai M, Uchiyama Y, et al. **Tight junction proteins claudin-2 and -12 are critical for vitamin D-dependent Ca²⁺ absorption between enterocytes.** Molecular biology of the cell. 2008 May;19(5):1912-21.
133. Lu Y, Jing J, Sun L, Gong Y, Chen M, Wang Z, et al. **Expression of claudin-11, -23 in different gastric tissues and its relationship with the risk and prognosis of gastric cancer.** PloS one. 2017;12(3):e0174476.
134. Iravani O, Yip GW, Thike AA, Chua PJ, Jane Scully O, Tan PH, et al. **Prognostic significance of Claudin 12 in estrogen receptor-negative breast cancer.** Journal of clinical pathology. 2016 Oct;69(10):878-83.
135. Ben-Yosef T, Belyantseva IA, Saunders TL, Hughes ED, Kawamoto K, Van Itallie CM, et al. **Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration.** Human molecular genetics. 2003 Aug

- 15;12(16):2049-61.
136. Gosselin A, Monteiro P, Chomont N, Diaz-Griffero F, Said EA, Fonseca S, et al. **Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection.** Journal of immunology. 2010 Feb 1;184(3):1604-16.
137. Wacleche VS, Chomont N, Gosselin A, Monteiro P, Goupil M, Kared H, et al. **The colocalization potential of HIV-specific CD8+ and CD4+ T-cells is mediated by integrin beta7 but not CCR6 and regulated by retinoic acid.** PloS one. 2012;7(3):e32964.
138. Xu H, Wang X, Liu DX, Moroney-Rasmussen T, Lackner AA, Veazey RS. **IL-17-producing innate lymphoid cells are restricted to mucosal tissues and are depleted in SIV-infected macaques.** Mucosal immunology. 2012 Nov;5(6):658-69.
139. Nigam P, Kwa S, Velu V, Amara RR. **Loss of IL-17-producing CD8 T cells during late chronic stage of pathogenic simian immunodeficiency virus infection.** Journal of immunology. 2011 Jan 15;186(2):745-53.
140. Wang Y, Yang GB. **Alteration of Polymeric Immunoglobulin Receptor and Neonatal Fc Receptor Expression in the Gut Mucosa of Immunodeficiency Virus-Infected Rhesus Macaques.** Scandinavian journal of immunology. 2016 Apr;83(4):235-43.
141. Ryan ES, Micci L, Fromentin R, Paganini S, McGary CS, Easley K, et al. **Loss of Function of Intestinal IL-17 and IL-22 Producing Cells Contributes to Inflammation and Viral Persistence in SIV-Infected Rhesus Macaques.** PLoS pathogens. 2016 Feb;12(2):e1005412.
142. Stieh DJ, Matias E, Xu H, Fought AJ, Blanchard JL, Marx PA, et al. **Th17 Cells Are Preferentially Infected Very Early after Vaginal Transmission of SIV in Macaques.** Cell host & microbe. 2016 Apr 13;19(4):529-40.
143. Wacleche VS, Goulet JP, Gosselin A, Monteiro P, Soudeyns H, Fromentin R, et al. **New insights into the heterogeneity of Th17 subsets contributing to HIV-1 persistence during antiretroviral therapy.** Retrovirology. 2016 Aug 24;13(1):59.
144. Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, et al. **Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucoepithelial bacterial infection and allergic responses.** Immunity. 2009 Jan 16;30(1):108-19.
145. Liang SC, Long AJ, Bennett F, Whitters MJ, Karim R, Collins M, et al. **An IL-17F/A heterodimer protein is produced by mouse Th17 cells and induces airway neutrophil recruitment.** Journal of immunology. 2007 Dec 1;179(11):7791-9.
146. Yang XO, Chang SH, Park H, Nurieva R, Shah B, Acero L, et al. **Regulation of inflammatory responses by IL-17F.** The Journal of experimental medicine. 2008 May 12;205(5):1063-75.
147. Dandekar S, George MD, Baumler AJ. **Th17 cells, HIV and the gut mucosal barrier.** Current opinion in HIV and AIDS. 2010 Mar;5(2):173-8.
148. Lee JS, Tato CM, Joyce-Shaikh B, Gulen MF, Cayatte C, Chen Y, et al.

- Interleukin-23-Independent IL-17 Production Regulates Intestinal Epithelial Permeability.** *Immunity*. 2015 Oct 20;43(4):727-38.
149. Zrioual S, Toh ML, Tournadre A, Zhou Y, Cazalis MA, Pachot A, et al. **IL-17RA and IL-17RC receptors are essential for IL-17A-induced ELR+ CXC chemokine expression in synoviocytes and are overexpressed in rheumatoid blood.** *Journal of immunology*. 2008 Jan 1;180(1):655-63.
150. Tomuschat C, O'Donnell AM, Coyle D, Puri P. **Increased Act1/IL-17R expression in Hirschsprung's disease.** *Pediatric surgery international*. 2016 Dec;32(12):1201-7.
151. Zevin AS, McKinnon L, Burgener A, Klatt NR. **Microbial translocation and microbiome dysbiosis in HIV-associated immune activation.** *Current opinion in HIV and AIDS*. 2016 Mar;11(2):182-90.
152. Brenchley JM, Douek DC. **HIV infection and the gastrointestinal immune system.** *Mucosal immunology*. 2008 Jan;1(1):23-30.
153. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. **Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection.** *Nature medicine*. 2006 Dec;12(12):1365-71.
154. Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, et al. **Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice.** *The Journal of cell biology*. 2002 Mar 18;156(6):1099-111.
155. Nitta T, Hata M, Gotoh S, Seo Y, Sasaki H, Hashimoto N, et al. **Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice.** *The Journal of cell biology*. 2003 May 12;161(3):653-60.
156. Reeves RK, Burgener A, Klatt NR. **Targeting the gastrointestinal tract to develop novel therapies for HIV.** *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2015 Oct;98(4):381-6.
157. Lassiter C, Fan X, Joshi PC, Jacob BA, Sutliff RL, Jones DP, et al. **HIV-1 transgene expression in rats causes oxidant stress and alveolar epithelial barrier dysfunction.** *AIDS research and therapy*. 2009 Feb 4;6:1.
158. Fan X, Staitieh BS, Jensen JS, Mould KJ, Greenberg JA, Joshi PC, et al. **Activating the Nrf2-mediated antioxidant response element restores barrier function in the alveolar epithelium of HIV-1 transgenic rats.** *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2013 Aug 1;305(3):L267-77.
159. Fanibunda SE, Modi DN, Gokral JS, Bandivdekar AH. **HIV gp120 binds to mannose receptor on vaginal epithelial cells and induces production of matrix metalloproteinases.** *PloS one*. 2011;6(11):e28014.
160. Kim M, Qiao ZS, Montefiori DC, Haynes BF, Reinherz EL, Liao HX. **Comparison of HIV Type 1 ADA gp120 monomers versus gp140 trimers as immunogens for the induction of neutralizing antibodies.** *AIDS research and human retroviruses*. 2005 Jan;21(1):58-67.
161. Mankertz J, Amasheh M, Krug SM, Fromm A, Amasheh S, Hillenbrand B, et al.

- TNF α up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling.** Cell and tissue research. 2009 Apr;336(1):67-77.
162. Kinugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker HC. **Claudins regulate the intestinal barrier in response to immune mediators.** Gastroenterology. 2000 Jun;118(6):1001-11.
163. Cheng-Yuan K, Fei H, Yin C, Philip T, Shinichiro W, Christy K, et al. **Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF-kappaB-dependent signaling pathway.** Journal of immunology. 2005;175(10):6676-85.
164. McAleer JP, Kolls JK. **Directing traffic: IL-17 and IL-22 coordinate pulmonary immune defense.** Immunological reviews. 2014 Jul;260(1):129-44.
165. Chang SH, Park H, Dong C. **Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor.** The Journal of biological chemistry. 2006 Nov 24;281(47):35603-7.
166. Fantini J, Cook DG, Nathanson N, Spitalnik SL, Gonzalez-Scarano F. **Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor.** Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1993 Apr 1;90(7):2700-4.
167. Fantini J, Hammache D, Delezay O, Yahi N, Andre-Barres C, Rico-Lattes I, et al. **Synthetic soluble analogs of galactosylceramide (GalCer) bind to the V3 domain of HIV-1 gp120 and inhibit HIV-1-induced fusion and entry.** The Journal of biological chemistry. 1997 Mar 14;272(11):7245-52.
168. Louboutin JP, Strayer DS. **Blood-brain barrier abnormalities caused by HIV-1 gp120: mechanistic and therapeutic implications.** The Scientific World Journal. 2012;2012:482575.
169. Awan FM, Anjum S, Obaid A, Ali A, Paracha RZ, Janjua HA. **In-silico analysis of claudin-5 reveals novel putative sites for post-translational modifications: Insights into potential molecular determinants of blood-brain barrier breach during HIV-1 infiltration.** Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases. 2014 Oct;27:355-65.
170. Guadalupe M, Reay E, Sankaran S, Prindiville T, Flamm J, McNeil A, et al. **Severe CD4+ T-cell depletion in gut lymphoid tissue during primary human immunodeficiency virus type 1 infection and substantial delay in restoration following highly active antiretroviral therapy.** J Virol. 2003 Nov;77(21):11708-17.
171. Wacleche VS, Landay A, Routy JP, Ancuta P. **The Th17 Lineage: From Barrier Surfaces Homeostasis to Autoimmunity, Cancer, and HIV-1 Pathogenesis.** Viruses. 2017 Oct 19;9(10).
172. Reynolds JM, Martinez GJ, Nallaparaju KC, Chang SH, Wang YH, Dong C. **Cutting**

- edge: regulation of intestinal inflammation and barrier function by IL-17C. *Journal of immunology*. 2012 Nov 1;189(9):4226-30.
173. Cao AT, Yao S, Gong B, Elson CO, Cong Y. **Th17 cells upregulate polymeric Ig receptor and intestinal IgA and contribute to intestinal homeostasis.** *Journal of immunology*. 2012 Nov 1;189(9):4666-73.
174. Vassallo M, Mercie P, Cottalorda J, Ticchioni M, Dellamonica P. **The role of lipopolysaccharide as a marker of immune activation in HIV-1 infected patients: a systematic literature review.** *Virology journal*. 2012 Aug 27;9:174.
175. Raffatellu M, Santos RL, Verhoeven DE, George MD, Wilson RP, Winter SE, et al. **Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes Salmonella dissemination from the gut.** *Nature medicine*. 2008 Apr;14(4):421-8.
176. Negi N, Singh R, Sharma A, Das BK, Vajpayee M. **Comparative evaluation of microbial translocation products (LPS, sCD14, IgM Endocab) in HIV-1 infected Indian individuals.** *Microbial pathogenesis*. 2017 Oct;111:331-7.
177. Ma TY, Boivin MA, Ye D, Pedram A, Said HM. **Mechanism of TNF- α modulation of Caco-2 intestinal epithelial tight junction barrier: role of myosin light-chain kinase protein expression.** *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2005 Mar;288(3):G422-30.
178. Zhang H, Kovacs-Nolan J, Kodera T, Eto Y, Mine Y. **gamma-Glutamyl cysteine and gamma-glutamyl valine inhibit TNF- α signaling in intestinal epithelial cells and reduce inflammation in a mouse model of colitis via allosteric activation of the calcium-sensing receptor.** *Biochimica et biophysica acta*. 2015 May;1852(5):792-804.
179. Garside P. **Cytokines in experimental colitis.** *Clinical and experimental immunology*. 1999 Dec;118(3):337-9.
180. Molina JM, Scadden DT, Byrn R, Dinarello CA, Groopman JE. **Production of tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta by monocytic cells infected with human immunodeficiency virus.** *The Journal of clinical investigation*. 1989 Sep;84(3):733-7.
181. Dinh DM, Volpe GE, Duffalo C, Bhalchandra S, Tai AK, Kane AV, et al. **Intestinal microbiota, microbial translocation, and systemic inflammation in chronic HIV infection.** *The Journal of infectious diseases*. 2015 Jan 1;211(1):19-27.
182. Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C, Stricker K, Dhein J, Walczak H, et al. **Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120.** *Nature*. 1995 Jun 8;375(6531):497-500.
183. Santosuosso M, Righi E, Lindstrom V, Leblanc PR, Poznansky MC. **HIV-1 envelope protein gp120 is present at high concentrations in secondary lymphoid organs of individuals with chronic HIV-1 infection.** *The Journal of infectious diseases*. 2009 Oct 1;200(7):1050-3.
184. Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, et al. **Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral**

- candidiasis**. The Journal of experimental medicine. 2009 Feb 16;206(2):299-311.
185. Trautwein-Weidner K, Gladiator A, Kirchner FR, Becattini S, Rulicke T, Sallusto F, et al. **Antigen-Specific Th17 Cells Are Primed by Distinct and Complementary Dendritic Cell Subsets in Oropharyngeal Candidiasis**. PLoS pathogens. 2015 Oct;11(10):e1005164.
186. Tincati C, Douek DC, Marchetti G. **Gut barrier structure, mucosal immunity and intestinal microbiota in the pathogenesis and treatment of HIV infection**. AIDS research and therapy. 2016;13:19.
187. Zhang J, Lu Y, Wei J, Li L, Han L. **Protective effect of carboxymethylpachymaran on TNF-alpha-induced damage in Caco-2 cell monolayers**. International journal of biological macromolecules. 2016 Dec;93(Pt A):506-11.
188. Chen YH, Lu Q, Goodenough DA, Jeansonne B. **Nonreceptor tyrosine kinase c-Yes interacts with occludin during tight junction formation in canine kidney epithelial cells**. Molecular biology of the cell. 2002 Apr;13(4):1227-37.
189. Poritz LS, Garver KI, Tilberg AF, Koltun WA. **Tumor necrosis factor alpha disrupts tight junction assembly**. The Journal of surgical research. 2004 Jan;116(1):14-8.
190. Quesnell RR, Erickson J, Schultz BD. **Apical electrolyte concentration modulates barrier function and tight junction protein localization in bovine mammary epithelium**. American journal of physiology Cell physiology. 2007 Jan;292(1):C305-18.
191. Safdari BK, Sia TC, Wattchow DA, Smid SD. **Effects of pro-inflammatory cytokines, lipopolysaccharide and COX-2 mediators on human colonic neuromuscular function and epithelial permeability**. Cytokine. 2016 Jul;83:231-8.
192. Escribano BM, Medina-Fernandez FJ, Aguilar-Luque M, Aguera E, Feijoo M, Garcia-Maceira FI, et al. **Lipopolysaccharide Binding Protein and Oxidative Stress in a Multiple Sclerosis Model**. Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics. 2017 Jan;14(1):199-211.
193. Wacleche VS, Landay A, Routy JP, Ancuta P. **The Th17 Lineage: From Barrier Surfaces Homeostasis to Autoimmunity, Cancer, and HIV-1 Pathogenesis**. Viruses. 2017 Oct 19;9(10).

综述

CLDN 异常相关肠道疾病的研究进展

肠道的表面积接近 400 平方米,是人体最大的消化器官和排毒器官。肠道单层上皮细胞将人体与周围环境分开,它既能选择性的吸收营养物质、离子、水分等,又是人体抵御外界抗原的第一道防线。肠黏膜屏障功能受损与临床多种疾病的发生发展有密切的关系,紧密连接在肠黏膜屏障结构和功能的维持中发挥着重要的作用[1]。紧密连接蛋白是肠道上皮细胞屏障功能的关键成分,特别是紧密连接蛋白中庞大的 CLDN 家族成员。CLDN 蛋白分子结构的变化既能够减少与肠道吸收功能相关的通道,又能够通过增加与肠道小分子溶质和水分分泌相关的通道而导致腹泻,另外,CLDN 蛋白分子结构的变化还能够使肠道大分子的吸收通道增加,导致炎症的发生。许多肠道疾病都与 CLDN 蛋白分子结构的变化所引起的腹痛、腹泻等肠道炎症性症状有关。本文主要探讨了肠道功能紊乱及 CLDN 蛋白调节异常所引起的 HIV-1 肠道病变、肠道炎症性肠病、结肠炎、乳糜泻、肠道易激综合症等多种肠道疾病。

1. CLDN 蛋白的特点及其发生改变的病理生理学机制

CLDN 蛋白大小为 20-27kDa,是一种小分子跨膜蛋白,它与 JAM(连接粘附分子)、OCLN 以及胞质分子 ZO-1、ZO-2、ZO-3 等一起作为构成机体所有器官上皮和内皮细胞中紧密连接蛋白的分子原件。自 1998 年首次发现两种 CLDN 蛋白以来[2],接下来的 20 年人们在哺乳动物体内又先后发现了 27 种 CLDN [3]。CLDN 蛋白的功能主要有以下几个方面:首先,CLDN 蛋白是形成屏障和通道结构的关键成分;其次,CLDN 蛋白能够影响细胞信号的形成、细胞增殖和分化、细胞迁移并能够影响细胞受体的功能;另外,CLDN 还能够作为“栅栏”限制细胞膜侧面和顶端蛋白的混合。作为肠道屏障和通道结构的关键成分,一方面,CLDN 能够阻止肠腔内的电解质、水分及抗原物质无限制的通过肠道上皮,另一方面,CLDN 能够形成细胞旁路渗透网络,使肠道吸收或分泌的物质通过紧密连接蛋白得以运输。目前已经证实的 CLDN 作为细胞旁路通道主要有三种类型的选择渗透作用,第一种是对阴离子的选择渗透性,此类作用主要与 CLDN10a 和

CLDN17 的功能有关;第二种是对阴离子的选择渗透性,此类作用主要与 CLDN2、CLDN10b 和 CLDN15 的功能有关;第三种是对水分的选择渗透性,此类作用主要与 CLDN2 的功能有关。其它 CLDN 蛋白,如 CLDN1、CLDN3、CLDN5 等对特定电荷和质量的物质具有严格的屏障功能。CLDN4、CLDN8 和 CLDN14 则能够对带一个或多个电荷的物质发挥更高效的屏障功能[4, 5]。

CLDN 蛋白在肠道各段的表达存在差异,在肠道疾病过程中,CLDN 的表达和分布也会发生很大的变化,这些改变将会导致肠道内电解质和水分运输的严重失调,并导致大分子物质在炎症部位被吸收,进而形成特定的临床表现。

2. CLDN 与 HIV-1 引起的肠道损伤

HIV-1 肠道病变出现在感染的早期[6], HIV-1 感染能够导致系统免疫活化从而使肠道组织固有层中的 CD4⁺ T 淋巴细胞损耗[7, 8]。HIV-1 急性感染过程中肠道屏障功能紊乱[9],促进了肠道对微生物抗原的吸收,进而导致 HIV-1 慢性感染中系统免疫活化[8]。HIV-1 对肠道屏障功能的破坏主要体现在三个方面:(1)促进肠道上皮细胞凋亡;(2)表达穿孔素的 CD8⁺ T 淋巴细胞数量增多;(3)改变紧密连接蛋白的表达[9, 10]。由于紧密连接蛋白中封闭蛋白 CLDN1 的破坏和孔道形成蛋白 CLDN2 表达的增加,未经治疗的 AIDS 病人空肠上皮细胞跨膜电阻值降低了 40%并伴有甘露糖醇的透过率增加的现象[10]。经高效抗逆转录病毒药物治疗后,CLDN1 和 CLDN2 的表达恢复到正常水平。封闭蛋白 OCLN 和 CLDN4 在 HIV-1 感染的肠道中未发生明显变化。由此可以推断,未经治疗的 AIDS 病人肠道屏障功能的破坏是肠道上皮细胞凋亡和紧密连接蛋白表达改变共同作用的结果,且高效抗逆转录病毒药物治疗可以通过促进紧密连接蛋白的重建使肠道屏障得以恢复[10]。

促炎性细胞因子 IL-2、IL-4、IL-13 和 TNF- α 刺激鼠的空肠粘膜,发现上皮细胞跨膜电阻值降低[9]。HIV-1 与肠道上皮细胞在体外共培养发现促炎性细胞因子 IL-6、IL-8 和 TNF- α 表达均发生上调[11]。这在一定程度上可能揭示 HIV-1 感染过程中肠道屏障损伤的机制。在 HIV-1 感染早期病毒在肠道粘膜中的能够进行自我复制,这也可能促使肠道上皮屏障的损伤[12, 13]。同样,病毒 gp120 蛋白、Tat 蛋白、Vpr 蛋白均能够介导上皮屏障的改变和上皮细胞的凋亡[14, 15]。尽管

目前已经明确了一些促炎性细胞因子在 HIV-1 感染过程中是如何变化的,但这些过程的分子生物学机制尚不清楚。同样,作为粘膜修复和再生过程中的重要细胞因子,IL-22 在 HIV-1 感染中发生下调的机制也有待进一步研究[16]。

3. CLDN 与炎症性肠病

炎症性肠病 (Inflammatory bowel diseases, IBD) 主要分为两种,一种是克罗恩病 (Crohn's disease, CD), 另一种是溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC)。在 CD 中,病患处波及从口腔到结肠的整个消化道组织,而 UC 的病患处往往只出现在结肠和直肠。IBD 病人常出现频繁腹泻、便血、腹痛等临床症状,除肠道以外,IBD 的临床表现还出现在关节、肝脏、皮肤等部位。IBD 感染者一般比较年轻,但老年人亦可感染。

3.1 溃疡性结肠炎

已有研究指出,UC 是一种肠道异常免疫反应性疾病,该病是由微生物因素、环境因素和肠道免疫系统之间复杂地相互作用所致。数据显示,UC 患者肠道跨膜电阻值约为正常人的 20%,并伴随紧密连接蛋白的破坏[17],这表明紧密连接蛋白组分的改变使上皮屏障功能的严重损伤,电解质和水分在不受屏障功能调控的状态下严重流失,抗原物质摄入增多,后者可能造成一个长期的慢性炎症反应过程。在 UC 中 CLDN 的表达和分布均发生了变化,Oshima 等人发现在 UC 病人的直肠中 CLDN1 表达并没有发生显著的变化[18],而 Poritz 的报道指出 CLDN1 在 UC 病人的结肠中表达上调[19],Weber 通过对 UC 病人进行活检发现 CLDN1 和 CLDN2 的上调表达仅发生在严重炎症反应部位,说明 CLDN1 和 CLDN2 的表达与炎症的发展密切相关[20, 21]。CLDN1 的上调能够促进上皮细胞的紧密连接,而 CLDN2 的上调则有利于上皮的渗漏,事实上,CLDN2 在正常人的结肠中是检测不到的,但在 UC 病人的结肠中大量表达。CLDN2 的上调表达受 IL-13、TNF- α 、IL-6 等细胞因子的调控,这些细胞因子通过介导 Th2 型免疫应答参与 UC 的炎症过程。除了调控 CLDN2 的表达之外,IL-13、TNF- α 还能够促进上皮细胞的凋亡[22, 23],该过程有信号转导子和转录激活子 6 (STAT6)、肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 以及磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (PI3K) 信号的参与[24-26]。在 Caco-2 细胞中,IL-6 能够通过激活 MEK/ERK 和 PI3K 信号通路促进 CLDN2

的表达[27]。在人的肠道中, CLDN3 主要位于未形成隐窝凹陷的结肠细胞膜侧壁, 且不能与 ZO-1 发生共定位[28], CLDN3 在 UC 病人的肠道中并没有发生显著的变化[29]。CLDN4 和 CLDN7 在 UC 病人直肠中发生下调[29]。其它紧密连接蛋白如 CLDN5、CLDN8、CLDN12、CLDN15, 目前没有数据支持他们在 UC 中发生表达和分布的变化[28, 30]。

3.2 克罗恩病

CD 以肠道上皮屏障功能紊乱为主要特征。对轻度和中度 CD 的结肠活检发现, 中度 CD 上皮细胞跨膜电阻值较轻度 CD 下降了 40%, 电子显微镜观察发现紧密连接蛋白呈间断、不连续的形态[28], 这就提示在疾病过程中 CLDN 蛋白的表达可能发生了变化。事实上, 多种 CLDN 蛋白在 CD 中发生了表达和分布的变化。首先, CLDN1 仅在细胞之间交接处的膜侧壁发生了下调, 但 CD 患者肠道内总的 CLDN1 表达和分布较正常人均没有发生明显的变化[28]。由于 CLDN1 在 UC 患者肠道中发生上调, 而在 CD 患者中没有发生明显的变化, 所以 CLDN1 的表达可以作为区分这两种疾病的标志[31]。与 UC 相同, CLDN2 的表达在 CD 患者的结肠和十二指肠中表达也发生上调[28, 32]。另外, CLDN2 主要分布在隐窝的基底部且在 CLDN8 表达水平低的病人中其表达量更高[28]。与 UC 不同, 参与 CD 的主要是 Th1 型免疫应答, 在 HT-29/B6 和 Caco-2 细胞中, TNF- α 和 IFN- γ 参与调控 CLDN2 的上调表达, 细胞的跨膜电阻值降低, 对阳离子的透过率增加[28, 33]。Caco-2 细胞中存在的糖皮质激素能够一定程度修复由 TNF- α 和 IFN- γ 介导的上皮细胞屏障损伤, 但该过程的生物学机制尚不清楚[33]。在 CD 患者的结肠中 CLDN3 的表达是下调的, 该蛋白弥散分布于结肠上皮细胞的胞浆中, 未经抗病毒治疗的患者十二指肠中 CLDN3 的水平低于正常人, 在糖皮质激素和咪唑硫嘌呤治疗 6 个月后恢复到正常值[32]。CLDN4 和 CLDN7 均分布于细胞膜侧壁和上皮细胞表面, 在轻度至中度 CD 的结肠中, 这两种蛋白的表达和分布均未见明显异, 但在 CD 患者的十二指肠中 CLDN4 表达下调, 且经 6 个月治疗后其表达水平有所回转但并未恢复[28, 32]。CLDN5 和 CLDN8 表达水平在患者结肠中发生明显的下调[28]。在人的结肠中未检测到 CLDN11、CLDN12、CLDN14、CLDN15 和 CLDN16 的表达[28]。总而言之, CD 的屏障功能损伤由孔道形成蛋白 CLDN2 的上调表达、封闭蛋白 CLDN5 和 CLDN8 的下调表达共同介导, 但

是没有 CLDN1、CLDN4 和 CLDN7 的参与。

3.3 微观结肠炎

微观结肠炎主要包括胶原性结肠炎 (collagenous colitis, CC) 和淋巴细胞性结肠炎 (lymphocytic colitis, LC), 二者均属于炎症性肠病。该疾病以水泻为主要特征, 多发于老年人。由于患者的肠道内窥镜检查中缺乏肉眼可见的临床症状, 所以只能通过病理学分析将 CC 和 LC 加以区分。LC 患者的肠道上皮内淋巴细胞数量剧增, CC 除此症状外, 还表现出结肠粘膜上皮胶原带增厚。由于微观结肠炎在临床上比较罕见, 所以关于该疾病发病机理以及疾病过程中 CLDN 表达和分布的报道较少。

Bürgel 在对 CC 腹泻机制的研究中发现疾病过程中肠道上皮的胞内运输和胞外运输发生改变, 他认为 NaCl 的吸收和氯离子的分泌是腹泻的主要发病机理。此外, 他们还发现肠道上皮跨膜电阻值的降低与 CLDN4 的破坏有直接关系, CLDN1、CLDN2、CLDN3 和 CLDN5 的表达在疾病过程中并没有发生明显改变 [34]。

目前仅有的一篇关于 CLDN 在 LC 中表达和功能发生变化的报道中指出, 疾病过程中肠道 CLDN4、CLDN5 和 CLDN8 表达下调, 且 CLDN5 和 CLDN8 发生了重新分配 [35]。另外一篇报道指出, 在 LC 中肠道上皮屏障功能受损, 跨膜电阻值下降, 且钠离子通过离子通道的运输功能受限 [36], 但该报道中并没有提及紧密连接蛋白的变化, 这提示在微观结肠炎的疾病进程中, 钠离子吸收受限导致的体内离子失衡对疾病的影响要大于上皮屏障功能破坏的影响。

4. CLDN 与小肠疾病

4.1 肠道易激综合征

肠道易激综合征是一种常见的肠道功能失调性疾病, 有超过五分之一的西方人受该病的影响 [37]。患者常见的临床表现有腹痛、腹胀, 且伴有排便习惯的改变。由于常规诊断方法中缺乏病理表现致使该病的治疗方式有限, 所以疾病的过程往往漫长而痛苦。近年来, 该疾病对肠道屏障功能的影响备受关注。已有数据表明患者的肠道渗透性增加, 且严重腹泻的病人肠道屏障功能损伤尤为严重 [38]。患者结肠部位的屏障渗透性增加也已得到证实 [39, 40]。肠道紧密连接蛋白在腹

泻型肠道易激综合征中也发生了改变, CLDN1 和 CLDN4 的表达发生了明显的下调, 但 CLDN3 未发生明显变化[41]。在腹泻型肠道应激综合征病人的结肠中, ZO-1、OCLN 和 CLDN1 的转录和蛋白水平均发生了下调[42, 43], 但非腹泻型病人中却未观察到以上改变[43]。其它紧密连接蛋白 (CLDN2、CLDN5、CLDN7、CLDN8、CLDN10、CLDN15 等) 在结肠中的表达变化目前尚无报道。另有报道指出, 腹泻型肠道易激综合征病人的空肠中 CLDN2 表达增加, 并伴随大量肥大细胞的活化以及肌球蛋白激酶的上调表达, 与此同时, OCLN 的表达发生下调, 细胞骨架收缩, 细胞间距增大[44]。在腹泻型肠道易激综合征中紧密连接蛋白表达的变化使肠道屏障渗透性发生改变, 从而促进了肠腔内抗原性物质的吸收, 进而导致肠道的炎症反应和免疫活化[45, 46]。

4.2 乳糜泻

乳糜泻是一种自身免疫性肠道疾病, 主要影响遗传易感人群。该病与醇溶蛋白的摄入有关, 醇溶蛋白通过其胞内和胞外转运途径进入上皮细胞的基底部, 在疾病进程中发挥重要作用。在疾病的早期阶段, 醇溶蛋白的摄入通过细胞的内吞作用和转胞吞作用实现[47, 48], 醇溶蛋白可直接与肠道免疫系统 (Th1 细胞介导的炎症应答) 相互作用最终导致肠绒毛和隐窝的损伤。在疾病后期, 由于肠道紧密连接蛋白的破坏引起细胞旁路功能紊乱, 导致醇溶蛋白通过细胞旁路途径摄入而造成营养物质和电解质的吸收障碍[49-51]。

Schulzke 对乳糜泻病人空肠进行活检发现上皮细胞跨膜电阻降低了 56%, 这是对乳糜泻肠道屏障功能破坏的首次报道[52]。另有报道指出, 采用冷冻蚀刻电镜观察病人肠道紧密连接蛋白显微结构发现, 紧密连接蛋白出现形态异常, 呈不连续的断裂状[53]。这些结果为后续研究中发现病人肠上皮中与孔道形成有关的 CLDN 蛋白发生上调、起封闭作用的 CLDN 蛋白发生下调奠定了基础[50, 54]。研究表明, CLDN1 在乳糜泻中并没有发生显著的变化, CLDN2 在未经治疗的病人十二指肠发生了上调, 而且由于 mRNA 表达并没有发生变化, 所以 CLDN2 这种变化是发生在基因的转录后[54]。在未经治疗的儿童十二指肠内, CLDN2 蛋白的表达取决于疾病的活跃程度, 病情越严重肠道 CLDN2 水平往往越高[51]。在该病过程中发生上调的细胞因子主要有 IL-21 和 IFN- γ , IFN- γ 是细胞内吞作用的重要调控因子[55-57], 高水平的 IFN- γ 能够促进醇溶蛋白的吸收, 但乳糜泻中

IFN- γ 对 CLDN2 表达的影响目前尚不清楚。已经有报道指出, IFN- γ 能够下调 T84 细胞中 CLDN2 的表达, 同时增加细胞的跨膜电阻值[58], 这一结论在 Willemsen 的研究中也得到了证实[59]。尽管在 T84 细胞中 IFN- γ 参与 CLDN2 的调控, 但乳糜泻中高水平的 IFN- γ 与 CLDN2 的上调表达是否有直接关系仍需要进一步证实。乳糜泻中 IL-21 是否参与 CLDN2 的调控目前尚无报道。

CLDN15 是另一种与孔道形成有关的紧密连接蛋白, 在乳糜泻中 CLDN15 的表达也发生了上调, 与 CLDN2 相同, CLDN15 与细胞旁路阳离子选择性通道的形成有关[60]。在乳糜泻中 CLDN15 的表达上调主要发生在细胞内的囊泡中[54]。研究表明, CLDN15 与鼠的小肠中葡萄糖的运输有关[61], 这提示我们乳糜泻中 CLDN15 的异常表达对肠道中葡萄糖的吸收的影响可能大于其对肠道屏障机能的影响。乳糜泻中肠道上皮屏障功能的损伤是紧密连接蛋白中孔道形成蛋白下调与封闭蛋白上调共同作用的结果, 但 CLDN 表达发生改变的调控机制还有待进一步研究。

展望

许多肠道疾病以肠道上皮屏障损伤为特征, 这与肠道紧密连接蛋白结构和表达水平的改变直接相关。自 1993 年 OCLN 发现以来[62], 包括 CLDN 家族在内的紧密连接蛋白的组成和调控受到了越来越多的关注。接下来研究者们又发现了一些 CLDN 蛋白与细胞旁路中离子和水分的选择性通道的形成有关。目前对 CLDN 蛋白的研究主要包括其异聚体的晶体结构的研究, 表达和定位的生理病理调控的研究以及其除屏障和通道功能以外的其它功能的研究。

尽管有些肠道疾病有着相似的临床表现, 但在疾病过程中紧密连接蛋白表达和分布的变化却有着很大的差异。目前, 许多肠道疾病的分子机制已经明确, 但一些肠道疾病的发病机制仍然需要进一步的探索。未来我们仍需不断探索肠道疾病中新的特异性诊断方法, 以期实现 CLDN 相关肠道疾病的靶向治疗。

参考文献

1. Otani S, Coopersmith CM. **Gut integrity in critical illness.** Journal of intensive care. 2019;7:17.
2. Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. **Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin.** The Journal of cell biology. 1998 Jun 29;141(7):1539-50.
3. Mineta K, Yamamoto Y, Yamazaki Y, Tanaka H, Tada Y, Saito K, et al. **Predicted expansion of the claudin multigene family.** FEBS letters. 2011 Feb 18;585(4):606-12.
4. Gunzel D, Yu AS. **Claudins and the modulation of tight junction permeability.** Physiol Rev. 2013 Apr;93(2):525-69.
5. Krug SM, Schulzke JD, Fromm M. **Tight junction, selective permeability, and related diseases.** Seminars in cell & developmental biology. 2014 Dec;36:166-76.
6. Sankaran S, George MD, Reay E, Guadalupe M, Flamm J, Prindiville T, et al. **Rapid onset of intestinal epithelial barrier dysfunction in primary human immunodeficiency virus infection is driven by an imbalance between immune response and mucosal repair and regeneration.** J Virol. 2008 Jan;82(1):538-45.
7. Hadadi A, Ostovar A, Edalat Noor B, Rasoolinejad M, Haji Abdolbaghi M, Yousefi S, et al. **The effect of selenium and zinc on CD4(+) count and opportunistic infections in HIV/AIDS patients: a randomized double blind trial.** Acta clinica Belgica. 2019 Mar 19:1-7.
8. Xu W, Luo Z, Alekseyenko AV, Martin L, Wan Z, Ling B, et al. **Distinct systemic microbiome and microbial translocation are associated with plasma level of anti-CD4 autoantibody in HIV infection.** Scientific reports. 2018 Aug 27;8(1):12863.
9. Epple HJ, Allers K, Troger H, Kuhl A, Erben U, Fromm M, et al. **Acute HIV infection induces mucosal infiltration with CD4+ and CD8+ T cells, epithelial apoptosis, and a mucosal barrier defect.** Gastroenterology. 2010 Oct;139(4):1289-300.
10. Epple HJ, Schneider T, Troeger H, Kunkel D, Allers K, Moos V, et al. **Impairment of the intestinal barrier is evident in untreated but absent in suppressively treated HIV-infected patients.** Gut. 2009 Feb;58(2):220-7.
11. Nazli A, Chan O, Dobson-Belaire WN, Ouellet M, Tremblay MJ, Gray-Owen SD, et al. **Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation.** PLoS pathogens. 2010 Apr 8;6(4):e1000852.
12. Fackler OT, Schafer M, Schmidt W, Zippel T, Heise W, Schneider T, et al. **HIV-1 p24 but not proviral load is increased in the intestinal mucosa compared with the peripheral blood in HIV-infected patients.** AIDS. 1998 Jan 22;12(2):139-46.
13. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, Roederer M. **Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV**

- infection.** *Nature*. 2005 Apr 28;434(7037):1093-7.
14. Qian YW, Li C, Jiang AP, Ge S, Gu P, Fan X, et al. **HIV-1 gp120 Glycoprotein Interacting with Dendritic Cell-specific Intercellular Adhesion Molecule 3-grabbing Non-integrin (DC-SIGN) Down-Regulates Tight Junction Proteins to Disrupt the Blood Retinal Barrier and Increase Its Permeability.** *The Journal of biological chemistry*. 2016 Oct 28;291(44):22977-87.
 15. Buccigrossi V, Laudiero G, Nicastro E, Miele E, Esposito F, Guarino A. **The HIV-1 transactivator factor (Tat) induces enterocyte apoptosis through a redox-mediated mechanism.** *PloS one*. 2011;6(12):e29436.
 16. Kim CJ, Nazli A, Rojas OL, Chege D, Alidina Z, Huibner S, et al. **A role for mucosal IL-22 production and Th22 cells in HIV-associated mucosal immunopathogenesis.** *Mucosal immunology*. 2012 Nov;5(6):670-80.
 17. Tan Y, Guan Y, Sun Y, Zheng C. **Correlation of Intestinal Mucosal Healing and Tight Junction Protein Expression in Ulcerative Colitis Patients.** *The American journal of the medical sciences*. 2019 Mar;357(3):195-204.
 18. Oshima T, Miwa H, Joh T. **Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis.** *Journal of gastroenterology and hepatology*. 2008 Dec;23 Suppl 2:S146-50.
 19. Poritz LS, Harris LR, 3rd, Kelly AA, Koltun WA. **Increase in the tight junction protein claudin-1 in intestinal inflammation.** *Digestive diseases and sciences*. 2011 Oct;56(10):2802-9.
 20. Weber CR, Nalle SC, Tretiakova M, Rubin DT, Turner JR. **Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2008 Oct;88(10):1110-20.
 21. Van den Bossche J, Laoui D, Morias Y, Movahedi K, Raes G, De Baetselier P, et al. **Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 genes differentially associate with distinct types of anti-inflammatory macrophages in vitro and with parasite- and tumour-elicited macrophages in vivo.** *Scandinavian journal of immunology*. 2012 Jun;75(6):588-98.
 22. Hoving JC. **Targeting IL-13 as a Host-Directed Therapy Against Ulcerative Colitis.** *Frontiers in cellular and infection microbiology*. 2018;8:395.
 23. Hering NA, Schulzke JD. **Therapeutic options to modulate barrier defects in inflammatory bowel disease.** *Digestive diseases*. 2009;27(4):450-4.
 24. Rosen MJ, Frey MR, Washington MK, Chaturvedi R, Kuhnhein LA, Matta P, et al. **STAT6 activation in ulcerative colitis: a new target for prevention of IL-13-induced colon epithelial cell dysfunction.** *Inflammatory bowel diseases*. 2011 Nov;17(11):2224-34.
 25. Weber CR, Raleigh DR, Su L, Shen L, Sullivan EA, Wang Y, et al. **Epithelial myosin light chain kinase activation induces mucosal interleukin-13 expression to alter tight junction ion selectivity.** *The Journal of biological chemistry*. 2010 Apr

- 16;285(16):12037-46.
26. Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, Hayes KL, Powell RM, MacDonald TT, et al. **Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells.** *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology.* 2005 Sep;85(9):1139-62.
27. Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S. **Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium.** *The Journal of biological chemistry.* 2011 Sep 9;286(36):31263-71.
28. Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, et al. **Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease.** *Gut.* 2007 Jan;56(1):61-72.
29. Oshima T, Miwa H, Joh T. **Changes in the expression of claudins in active ulcerative colitis.** *Journal of gastroenterology and hepatology.* 2008 Dec;23 Suppl 2:S146-50.
30. Kucharzik T, Walsh SV, Chen J, Parkos CA, Nusrat A. **Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins.** *The American journal of pathology.* 2001 Dec;159(6):2001-9.
31. Poritz LS, Harris LR, 3rd, Kelly AA, Koltun WA. **Increase in the tight junction protein claudin-1 in intestinal inflammation.** *Digestive diseases and sciences.* 2011 Oct;56(10):2802-9.
32. Goswami P, Das P, Verma AK, Prakash S, Das TK, Nag TC, et al. **Are alterations of tight junctions at molecular and ultrastructural level different in duodenal biopsies of patients with celiac disease and Crohn's disease?** *Virchows Archiv : an international journal of pathology.* 2014 Nov;465(5):521-30.
33. Fischer A, Gluth M, Weege F, Pape UF, Wiedenmann B, Baumgart DC, et al. **Glucocorticoids regulate barrier function and claudin expression in intestinal epithelial cells via MKP-1.** *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology.* 2014 Feb;306(3):G218-28.
34. Burgel N, Bojarski C, Mankertz J, Zeitz M, Fromm M, Schulzke JD. **Mechanisms of diarrhea in collagenous colitis.** *Gastroenterology.* 2002 Aug;123(2):433-43.
35. Barmeyer C, Troeger H, Bojarski C, Siegmund B, Fromm M, Schulzke JD: **Su1461 Lymphocytic Colitis-Related Diarrhea Is Caused by Both, ERK1/2-Dependent Inhibition of the Epithelial Sodium Channel (ENaC) and a Claudin-Induced Barrier Defect.** *Gastroenterology* 2014, 146(5):S-475-S-475.
36. Barmeyer C, Erko I, Fromm A, Bojarski C, Allers K, Moos V, et al. **Ion transport and barrier function are disturbed in microscopic colitis.** *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2012 Jul;1258:143-8.
37. **Systematic review on the management of irritable bowel syndrome in the European**

- Union. Eur J Gastroenterol Hepatol. 2007 Feb;19 Suppl 1:S11-37.
38. Dunlop SP, Hebden J, Campbell E, Naesdal J, Olbe L, Perkins AC, et al. **Abnormal intestinal permeability in subgroups of diarrhea-predominant irritable bowel syndromes.** The American journal of gastroenterology. 2006 Jun;101(6):1288-94.
39. Marshall JK, Thabane M, Garg AX, Clark W, Meddings J, Collins SM, et al. **Intestinal permeability in patients with irritable bowel syndrome after a waterborne outbreak of acute gastroenteritis in Walkerton, Ontario.** Alimentary pharmacology & therapeutics. 2004 Dec;20(11-12):1317-22.
40. Zhou Q, Zhang B, Verne GN. **Intestinal membrane permeability and hypersensitivity in the irritable bowel syndrome.** Pain. 2009 Nov;146(1-2):41-6.
41. Kong WM, Gong J, Dong L, Xu JR. **Changes of tight junction claudin-1,-3,-4 protein expression in the intestinal mucosa in patients with irritable bowel syndrome.** Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University. 2007 Sep;27(9):1345-7.
42. Piche T, Barbara G, Aubert P, Bruley des Varannes S, Dainese R, Nano JL, et al. **Impaired intestinal barrier integrity in the colon of patients with irritable bowel syndrome: involvement of soluble mediators.** Gut. 2009 Feb;58(2):196-201.
43. Bertiaux-Vandaele N, Youmba SB, Belmonte L, Lecleire S, Antonietti M, Gourcerol G, et al. **The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype.** The American journal of gastroenterology. 2011 Dec;106(12):2165-73.
44. Martinez C, Lobo B, Pigrau M, Ramos L, Gonzalez-Castro AM, Alonso C, et al. **Diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome: an organic disorder with structural abnormalities in the jejunal epithelial barrier.** Gut. 2013 Aug;62(8):1160-8.
45. Chadwick VS, Chen W, Shu D, Paulus B, Bethwaite P, Tie A, et al. **Activation of the mucosal immune system in irritable bowel syndrome.** Gastroenterology. 2002 Jun;122(7):1778-83.
46. Aerssens J, Camilleri M, Talloen W, Thielemans L, Gohlmann HW, Van Den Wyngaert I, et al. **Alterations in mucosal immunity identified in the colon of patients with irritable bowel syndrome.** Clinical gastroenterology and hepatology : the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association. 2008 Feb;6(2):194-205.
47. Matysiak-Budnik T, Candalh C, Dugave C, Namane A, Cellier C, Cerf-Bensussan N, et al. **Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease.** Gastroenterology. 2003 Sep;125(3):696-707.
48. Schumann M, Richter JF, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M, Schneider T, et al. **Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue.** Gut. 2008 Jun;57(6):747-54.
49. Ciccocioppo R, Finamore A, Ara C, Di Sabatino A, Mengheri E, Corazza GR. **Altered expression, localization, and phosphorylation of epithelial junctional proteins in**

- celiac disease.** *Am J Clin Pathol.* 2006 Apr;125(4):502-11.
50. Schumann M, Kamel S, Pahlitzsch ML, Lebenheim L, May C, Krauss M, et al. **Defective tight junctions in refractory celiac disease.** *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2012 Jul;1258:43-51.
51. Szakal DN, Gyorffy H, Arato A, Cseh A, Molnar K, Papp M, et al. **Mucosal expression of claudins 2, 3 and 4 in proximal and distal part of duodenum in children with coeliac disease.** *Virchows Archiv : an international journal of pathology.* 2010 Mar;456(3):245-50.
52. Schulzke JD, Schulzke I, Fromm M, Riecken EO. **Epithelial barrier and ion transport in coeliac sprue: electrical measurements on intestinal aspiration biopsy specimens.** *Gut.* 1995 Dec;37(6):777-82.
53. Schulzke JD, Bentzel CJ, Schulzke I, Riecken EO, Fromm M. **Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue.** *Pediatric research.* 1998 Apr;43(4 Pt 1):435-41.
54. Schumann M, Gunzel D, Buergele N, Richter JF, Troeger H, May C, et al. **Cell polarity-determining proteins Par-3 and PP-1 are involved in epithelial tight junction defects in coeliac disease.** *Gut.* 2012 Feb;61(2):220-8.
55. Utech M, Ivanov AI, Samarin SN, Bruewer M, Turner JR, Mrsny RJ, et al. **Mechanism of IFN-gamma-induced endocytosis of tight junction proteins: myosin II-dependent vacuolarization of the apical plasma membrane.** *Molecular biology of the cell.* 2005 Oct;16(10):5040-52.
56. Bodd M, Raki M, Tollefsen S, Fallang LE, Bergseng E, Lundin KE, et al. **HLA-DQ2-restricted gluten-reactive T cells produce IL-21 but not IL-17 or IL-22.** *Mucosal immunology.* 2010 Nov;3(6):594-601.
57. Caruso R, Marafini I, Sedda S, Del Vecchio Blanco G, Giuffrida P, MacDonald TT, et al. **Analysis of the cytokine profile in the duodenal mucosa of refractory coeliac disease patients.** *Clinical science.* 2014 Mar;126(6):451-8.
58. Wisner DM, Harris LR, 3rd, Green CL, Poritz LS. **Opposing regulation of the tight junction protein claudin-2 by interferon-gamma and interleukin-4.** *The Journal of surgical research.* 2008 Jan;144(1):1-7.
59. Willemsen LE, Hoetjes JP, van Deventer SJ, van Tol EA. **Abrogation of IFN-gamma mediated epithelial barrier disruption by serine protease inhibition.** *Clinical and experimental immunology.* 2005 Nov;142(2):275-84.
60. Van Itallie CM, Fanning AS, Anderson JM. **Reversal of charge selectivity in cation or anion-selective epithelial lines by expression of different claudins.** *American journal of physiology Renal physiology.* 2003 Dec;285(6):F1078-84.
61. Tamura A, Hayashi H, Imasato M, Yamazaki Y, Hagiwara A, Wada M, et al. **Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na⁺ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine.** *Gastroenterology.* 2011 Mar;140(3):913-23.

62. Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, et al. **Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions.** The Journal of cell biology. 1993 Dec;123(6 Pt 2):1777-88.

个人基本情况

基本信息

姓名：王凤杰
性别：女
民族：汉
政治面貌：中共党员
出生年月：1988 年 6 月
籍贯：山东省烟台市

教育背景

2008.09—2012.06	山东农业大学	动物检疫	学士学位
2012.09—2015.06	中国农业科学院	兽医学	硕士学位
2015.09—2019.06	中国疾病预防控制中心	免疫学	博士学位

发表文章

1. **Wang F**, Cui Y, Shen X, Wang S, Yang GB. IL-17A and IL-17F repair HIV-1 gp140 damaged Caco-2 cell barriers by upregulating tight junction genes. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. 2019 Apr 2. PubMed PMID: 30951887.
2. **王凤杰**, 李冬, 余磊, 崔艳芳, 叶华虎, 法云智, 杨贵波. 白介素 17 受体 mRNA 在恒河猴中的分布[J]. *中国免疫学杂志*, 2018, 1 (34) :19-23.
3. **Feng-Jie Wang**, Lei Yu, Yan-Fang Cui, Dong Li, Yue Wang, Gui-Bo Yang. Elevated expression of IL-17A receptors in the gut mucosa of SHIV/SIV infected rhesus macaques is suggestive of a role for IL-17 pathways in HIV/AIDS pathogenesis. Under preparation.
4. Yu L, **Wang F J**, Cui Y F, et al. Molecular characteristics of rhesus macaque interleukin-22: cloning, in vitro expression and biological activities[J]. *Immunology*, 2018 Feb 21. DOI:10.1111/imm.12914.
5. Li D, **Wang F J**, Yu L, et al. Expression of pIgR in the tracheal mucosa of SHIV/SIV-infected rhesus macaques[J]. *动物学研究*, 2017, 38(1):44-48.
6. Yan-Fang Cui, **Feng-Jie Wang**, Lei Yu, Hua-Hu Ye, Gui-Bo Yang. Metagenomic comparison of the rectal microbiota between rhesus macaques (*Macaca mulatta*) and cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). [J]. *动物学研究*, DOI:10.24272/j.issn.2095-8137.2018.061.
7. Yao, W. R., Li, D., Yu, L., **Wang, F. J.**, Xing, H., & Yang, G. B. (2017). The levels of dngr-1 and its ligand-bearing cells were altered after human and simian immunodeficiency virus infection. *Immunologic Research*, 65(4), 869.
8. 余磊, 李冬, 姚文荣, **王凤杰**, 崔艳芳, & 杨贵波. (2017). 恒河猴 xc 趋化因子受体 1(xcr1)基因的克隆和体外表达. *细胞与分子免疫学杂志*, 33(4), 433-439.

致谢

时光荏苒，转眼间博士生涯即将落下帷幕，付出与期待、挫折与成长共同铸造了这段珍贵的人生历程。数年的实验与研究终成这薄薄的一本，虽谈不上珍贵，却饱含着老师的教诲、同学的帮助和自己的艰辛。在此，向所有关心、帮助我的老师和同学表示衷心的感谢。

由衷的感谢我的导师杨贵波研究员，感谢杨老师在课题的开展、文章的撰写及论文的修改中给予的悉心指导和帮助。每当我深陷困境时，您的开解与详析总能为我直指要害，帮助我攻克难关。您严谨的治学态度和求实的工作作风一直深深影响着我，我定会在今后的科学研究和工作中铭记于心，学以致用。

感谢邵一鸣研究员、马丽英研究员、邢辉研究员对课题的指导和建议。感谢郝彦玲研究员在蛋白实验中给予的热情指导。感谢洪坤学研究员、阮玉华研究员、廖玲洁研究员、刘颖研究员、王书晖副研究员、梁华副研究员、冯毅副研究员、王铮副研究员、任莉副研究员和彭虹老师等病免室全体老师在课题实施中给予的帮助。

感谢粘膜免疫组的崔艳芳师妹、申秀丽师妹、余磊师兄以及李冬师弟在实验中的指导与协助以及生活中的关怀与分享。感谢病免室的张岱博士、王彦博士、鞠斌博士后、王琛博士、胡园园博士、孙莎莎博士、丁奕博博士、康瑞华博士、周泽华博士、孙佳博士、刘威男硕士、李康硕士、葛向阳、胡婧、宋畅、王硕等人的热情帮助。

感谢办公室的曹严华老师给予我学习和生活上的帮助。

感谢我的爱人孔德生以及我们双方的父母，感谢你们无私的付出和默默的支持，为我排除后顾之忧，让我能够心无旁骛地完成学业。愿父母身体安康，愿家人一切顺利。

感谢我的姐姐王威杰以及挚友王瑕、龙燕、张晓燕、袁振等，感谢你们的陪伴和鼓励，这份珍贵的情谊我定珍藏于心。

最后感谢各位答辩与评审专家能在百忙之中评阅论文并给予指导。

王凤杰

二零一九年五月于北京