

表皮紧密连接在特应性皮炎发病机制中的作用

刘 宇 李 萍 王 燕 底婷婷 蒙玉娇 赵京霞

摘 要 特应性皮炎(atopic dermatitis, AD)是一种以瘙痒和皮损渗液或干燥为主要表现的皮肤科常见病。该疾病发病机制复杂,免疫系统失衡和表皮屏障受损在其中起着重要作用。紧密连接(tight junction, TJ)作为皮肤屏障中的重要调节分子,与其他各因素相互影响,促进着 AD 的发生、发展。本文将从紧密连接蛋白的结构及功能、紧密连接在 AD 中的病理表现、紧密连接失调在 AD 发病机制中的作用及靶向治疗等方面进行论述。

关键词 特应性皮炎 皮肤屏障 紧密连接

中图分类号 R75

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.11.033

特应性皮炎是一种慢性炎性皮肤病,以瘙痒和反复发作的湿疹样皮损病变为主要临床表现,婴幼儿中多发,给患者及其家庭带来极大的心理和经济负担。该疾病发病机制复杂,免疫系统中 Th2、Th1 失衡和过敏原诱发 IgE 增多引起的过敏反应都是发病中的一部分,而先天或者后天获得性皮肤屏障功能受损在 AD 的发病中被认为是发病初始阶段,紧密连接则作为表皮屏障的主要调控因子发挥着重要作用。

一、表皮紧密连接的结构与功能

紧密连接(tight junction, TJ)包括多种跨膜蛋白和胞内蛋白,主要有 Claudin 家族、Occludin 家族、ZO 家族、黏附分子家族(JAMs)、Symplekin 蛋白等。这些蛋白在细胞产生极性及分化的过程中相互交联,最终形成致密网状结构,封锁细胞间隙^[1]。

Claudin 蛋白是 TJ 结构的主要组成部分,参与维持 TJ 的栅栏功能和屏障功能。它主要表达在表皮颗粒层角质细胞的细胞膜上,呈网状结构。Claudin 蛋白是维持 TJ 结构和功能的重要组成部分,研究发现, Claudin - 1 表达缺失的小鼠出现了表皮屏障的受损及炎症反应,严重缺失小鼠在出生 1 天内死亡^[2]。Occludin 蛋白主要表达在表皮颗粒层细胞的胞膜及胞质中,是角质形成细胞分化的标记之一,负责调控亲水性小分子的细胞旁弥散,与细胞内弥散屏障的形

成有关。ZO 蛋白在 TJ 中起到“骨架”的作用,它们作为与肌动蛋白细胞骨架相关的复合物支架可以与多种连接蛋白互相作用,同黏附分子(JAMs)一起形成致密的连接结构^[3]。

Hanel 等^[4]形容这一种致密网状结构是防止水和溶质过量损失的水液屏障;Anderson 等^[5]研究认为紧密连接不仅仅是物理性地屏障,它可以有选择性地通过离子等物质,因而被紧密连接隔离的两个相邻的空间可以存在不同浓度的溶质。Gruber 等^[6]用离子示踪的方法证实了紧密连接的存在以及它有效维持两侧稳态的作用,证明了紧密连接是渗透性阻隔的有效成分,主要调节水和溶质的细胞间转运^[7]。另外, TJ 可以通过影响信号级联反应来控制细胞增殖和分化,它还被证实可以影响免疫细胞的迁移以及炎症因子的游移^[8,9]。

二、AD 中存在着紧密连接的破坏

AD 患者皮肤中存在着表皮屏障的功能障碍。而紧密连接作为其重要的调节因子,也被证实在 AD 中存在异常^[10]。Bergmann 等^[11]分别检测了 AD 患者皮损、非皮损以及健康皮肤中 Claudin - 1 的表达水平发现,AD 患者皮损、非皮损部位的 Claudin - 1 较健康皮肤中的表达量是明显下降的。但是有意思的是,AD 患者非皮损部位的经皮水分丢失与健康皮肤比较差异无统计学意义。Yuki 等^[12]研究发现,AD 患者皮损中 Claudin - 1 和 ZO - 1 的表达水平降低,同时在所有的非皮损部位出现 ZO - 1 表达的减少,部分非皮损部位还出现了 Claudin - 4 表达的下降。Altunbulakli 等^[13]检测了来自 AD 患者和健康人的皮肤基因表达水平,发现 AD 患者的皮损区及非皮损区的 Claudin - 1 以及 Occludin 的基因表达水平较健康

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81673989);北京市卫生系统高层次卫生技术人才培养计划项目(2015-3-116)

作者单位:100010 首都医科大学附属北京中医医院、北京市中医研究所、银屑病中医临床基础研究北京市重点实验室(刘宇、李萍、王燕、底婷婷、蒙玉娇、赵京霞);100029 北京中医药大学(李萍、蒙玉娇)

通讯作者:赵京霞,副研究员,电子信箱:redzjx26@163.com

人是明显降低的;但是与细胞内骨架蛋白相连接的 ZO-1、ZO-2 的基因表达水平是明显升高的。这与 Yuki 等^[12]的研究结果相反,可能是选择临床患者时,未考虑到患者病情发展阶段。

三、紧密连接的损坏与角质层屏障的互相影响作为 AD 发病的早期环节

角质层作为物理性屏障参与皮肤屏障功能,抵御外来伤害并阻止表皮的异常水分流失。TJ 作为角质层下方的细胞旁屏障起作用。二者既构成完整的皮肤屏障,维持皮肤环境稳态,又能互相作用影响,参与 AD 的发生、发展。

有研究选用它莫西芬诱导的 Cre 重组酶构建 Claudin-1 基因敲除小鼠来观察 TJ 的形成情况。结果发现,注射它莫西芬 4 天后,在表皮的基底层和棘层就未见 Claudin-1,在实验第 8 天,颗粒层也见不到 Claudin-1,TJ 就“漏洞百出”,然后朗格汉斯细胞(langerhans cell,LC)被激活,这时,并未见组织学上表皮有明显变化,也没有明显的水分流失,由此推测 LC 的激活是由于 TJ 的障碍。在实验的第 18 天,可以发现明显的表皮水分丢失,于是推测,TJ 的障碍继发了角质层屏障功能障碍导致经皮水量丢失严重^[14]。Sugawara 等^[15]通过基因敲除小鼠模型发现 Claudin(-)小鼠通过角质层的水分蒸发要多于 Claudin(+)小鼠,且 Claudin(-)小鼠角质层脂质中的神经酰胺和丝聚合蛋白(filaggrin,FLG)表达水平在逐渐的降低。Yuki 等^[16]通过建立 TJ 损伤的等效模型,证实了 TJ 可能是通过影响角质层的 PH 来影响极性脂质和 FLG 的形成,从而阻碍了正常角质层屏障的形成。

AD 患者中部分存在着 FLG 基因的突变,从而导致 FLG 合成受阻。Wang 等^[17]构建了 FLG 缺失的角质形成细胞系,发现 FLG 缺失后,角质形成细胞中 ZO-1、E-钙黏蛋白(E-cadherin)、Claudin-1 和 Occludin 的蛋白表达量和基因表达量均降低,证明角质层屏障的缺失会引起 TJ 的异常。

大量研究发现,表皮屏障的相关基因与 AD 发病是有强相关性的,如 FLG、Claudin-1 等。早期研究发现,FLG 基因缺失的 AD 患者的发病早于其他 AD 患者,并出现特应性的过敏症状,在成年后,患者 AD 症状持续时间更长。Brunner 等^[18]将儿童 AD 患者与成年 AD 患者的皮损进行基因分析发现,一些脂质屏障基因在儿童 AD 患者中显示优先下调,屏障受损可能是 AD 发生的早期改变。Hirano 等^[19]研究证明

TJ 的障碍可以导致皮肤炎症。被破坏的 TJ 进而引起角质层屏障的异常,导致大量经皮水分丢失,并帮助 LC 捕获更多的抗原、过敏原,促进过敏敏化,引发或加重 AD 炎症。另外,角质层屏障的受损有助于金黄色葡萄球菌的皮肤定植,加重炎症反应^[20]。

总之,TJ 和角质层屏障相互影响,破坏表皮屏障功能。屏障功能受损,促进微生物定植、免疫细胞的激活从而诱发、加重免疫炎症反应,反过来加重屏障功能受损,形成恶性循环。另有研究发现,早期润肤剂干预皮肤屏障可以延缓 AD 的发病,因此,认为表皮屏障受损是 AD 主要的早期发病环节^[21]。

四、紧密连接与免疫系统相互影响,维持慢性炎症

TJ 受到环境因素的影响,处于动态调节的过程中,它决定了离子、蛋白甚至是朗格汉斯细胞的转运模式。Yoshida 等^[22]通过实验结果表明,激活的 LCs 渗透了 TJ 来捕捉抗原。渗透了 TJ 的 LCs 的数量在有红斑损伤的 AD 患者的皮肤中升高了大约 5 倍,而在没有红斑损伤的 AD 患者表皮中和鱼鳞病、银屑病患者中并未发现渗透 TJ 的 LCs 明显增多。LCs 的树突延伸穿透 TJ 特异性捕获抗原,刺激分泌相应因子促使 Th2 型免疫反应的发生,可推测,TJ 的漏洞可以增加抗原的渗透,进而刺激 DCs 活化,放大炎症反应。

AD 的特点是瘙痒、皮肤屏障破坏以及免疫系统的激活失衡,伴随 Th2 类细胞因子的参与。研究发现,AD 患者的角质形成细胞中过度表达了白细胞介素-33(interleukin-33,IL-33)。另有研究证实,角质形成细胞特异性表达 IL-33 的转基因小鼠可以自发出现 AD 样皮损表现,表明 IL-33 可以促进 AD 的发展。既往研究表明,IL-33 可以通过刺激表皮 LCs 在内的免疫细胞产生 2 型细胞因子,如 IL-6、IL-13 等参与 AD 的发病和病程进展。Ryu 等^[23]研究发现,过表达 IL-33 的 AD 小鼠表达 Claudin-1 的水平是降低的。体外实验发现,IL-33 可以降低细胞的跨上皮电阻,并增加其对 FITC-葡聚糖的通透性,提示对紧密连接功能的损伤;IL-33 还可以降低 FLG 的表达,破坏角质层屏障功能,从而导致皮肤敏感易刺激,免疫系统的激活反过来又导致炎症因子的释放,从而形成恶性循环,维持皮损区的慢性炎症反应。

有研究在等效模型中探询 Th2 和 Th17 细胞因子对 TJ 蛋白表达的影响。皮肤取自 AD 模型小鼠的非损伤部位和损伤部位,结果显示在 AD 的非损伤部

位,ZO-1 的表达减少,在 AD 的损伤部位,ZO-1 和 Claudin-1 的含量较正常减少,后续检测了 IL-4、TNF- α 、IL-17 和 IL-22 对 TJ 的影响。其中结果显示,只有 IL-17 损伤了 TJ,另外,在 IL-17 作用下丝聚合蛋白的表达减少。此实验中非损伤部位的蛋白表达情况和具体的机制需要更深入地研究,这里非损伤部位的 TJ 损伤与疾病的未来进展是否有相关性也需要进一步实验探讨^[12]。

特应性皮炎患者多伴有哮喘、过敏性鼻炎等过敏性疾病,也被证实血清中 IgE 和组胺水平较正常人是升高的。有研究证实 IgE 和组胺也可对 TJ 产生影响。Roussel 等^[24]通过尘螨诱发 IgE 升高的过敏犬模型,检测犬表皮紧密连接蛋白 ZO-1、Occludin 和 Claudin-1 的表达水平,发现 IgE 诱导减少 Claudin-1 的表达水平,但是 Occludin 和 ZO-1 的表达水平不受影响。

Gschwandtner 等^[25]研究证实了组胺作用于人皮肤等价模型后,Claudin-1、Claudin-4、Occludin 和桥粒蛋白明显减少并且伴随着生物素的渗透增加,说明组胺可以破坏皮肤的 TJ 的完整性。De Benedetto 等^[26]研究证实组胺通过 H1R 受体作用于角质形成细胞来抑制晚期分化,角质形成细胞的分化不全可能导致不完整的 TJ 网络。Glatzer 等^[27]研究证明组胺是通过 T4R 受体刺激角质形成细胞过度增殖的,这种过度增殖可能是导致分化不全和 TJ 的结构功能障碍的原因。相关研究证实了组胺释放对 TJ 的损伤,并表明这种损伤可能是通过影响角质形成细胞的增殖和分化导致的。

综上所述,TJ 损伤可以帮助皮肤驻留的 LC 捕获外来抗原或变应原,引起体内的一系列免疫反应;而上述 IL-33、TH2 型细胞因子、IgE、组胺等因子又可以攻击 TJ,从而形成恶性循环,维持皮损区炎症环境。

五、调节紧密连接是治疗 AD 的重要策略之一

AD 多为慢性病程,迁延难愈,对患者的身心健康造成极大负担。而且临床中广泛用于 AD 治疗的皮质类固醇具有较大的不良反应,因此迫切需要替代治疗。前文发现 TJ 在 AD 发病中起着重要作用,尤其是在发病早期。因此,是否能够通过调节 TJ 起到治疗疾病的作用是亟待深入研究的。

Yamada 等^[28]检查了在 AD 小鼠模型中局部应用大剂量葡萄糖对发炎皮肤的影响。结果发现 AD 模型中 Claudin-1 和 FLG 表达明显减少;低剂量葡

萄糖局部使用后,Claudin-1 和 FLG 的表达无明显变化,而使用大剂量葡萄糖后,可以增加 Claudin-1 和 FLG 水平。并且在体外 IL-4、IL-13、胸腺基质淋巴细胞生成素(thymic stromal lymphopoietin,TSLP)共同刺激 HaCaT 模型中,大剂量葡萄糖也可以诱导 Claudin-1 和 FLG 表达的增加。

Na 等^[29]研究了芦荟多糖对卵白蛋白(OVA)诱导的 AD 小鼠模型的干预作用,发现 AD 模型中 ZO-1、Claudin-1 和 Claudin-8 的基因表达水平明显降低,而口服芦荟多糖之后可以部分增加 ZO-1、Claudin-1 和 Claudin-8 的基因表达水平,缓解 AD 皮损表现。

Wang 等^[30]以 FITC 致敏并攻击小鼠以建立 AD 模型的初始阶段,检测升麻素对其干预作用。结果发现,升麻素减少了 TSLP 的表达,同时减少了上皮细胞之间的分离间隙并增加了 TJ 蛋白的表达。另外沉默 Claudin-1 基因时,升麻素对 TSLP 的影响显著降低。升麻素可以通过恢复 TJ 抑制了细胞因子,在疾病初始阶段抑制了过敏性炎症。因此,TJ 可以作为治疗 AD 的作用靶点之一,且在 AD 早期,药物可以通过修复 TJ 减轻炎症及皮损表现。

综上所述,TJ 在 AD 的发病中起到重要作用。TJ 的功能障碍可以诱发角质层结构、功能障碍,引发炎症反应,从而加重病情;产生的炎症因子又可以通过调控紧密连接蛋白的表达来影响 TJ 的功能,形成恶性循环,导致疾病迁延不愈。越来越多的研究也发现调控 TJ 从而打破恶性循环,是针对 AD 可行的治疗方法,本文旨在为以后临床治疗 AD 提供新的方向。

参考文献

- Reiche J, Huber O. Post-translational modifications of tight junction transmembrane proteins and their direct effect on barrier function[J]. *Biochim Biophys Acta Biomembr*, 2020; 183330
- Tokumasu R, Tamura A, Tsukita S. Time- and dose-dependent claudin contribution to biological functions: lessons from claudin-1 in skin[J]. *Tissue Barriers*, 2017, 5(3): e1336194
- Gao X, Acharya BR, Engl W, et al. Probing compression versus stretch activated recruitment of cortical actin and apical junction proteins using mechanical stimulations of suspended doublets[J]. *APL Bioeng*, 2018, 2(2): 26111
- Hanel KH, Cornelissen C, Luscher B, et al. Cytokines and the skin barrier[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(4): 6720-6745
- Anderson JM, Van Itallie CM. Physiology and function of the tight junction[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009, 1(2): a2584
- Gruber R, Bornchen C, Rose K, et al. Diverse regulation of claudin-1 and claudin-4 in atopic dermatitis[J]. *Am J Pathol*, 2015, 185(10): 2777-2789

- 7 Buckley A, Turner JR. Cell Biology of tight junction barrier regulation and mucosal disease[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018, 10(1): a029314
- 8 Piontek J, Krug SM, Protze J, *et al.* Molecular architecture and assembly of the tight junction backbone[J]. Biochim Biophys Acta Biomembr, 2020, 1862(7): 183279
- 9 Tanaka F, Uda M, Hirose Y, *et al.* Restoration of calcium - induced difference potential and tight junction formation in HaCaT keratinocytes by functional attenuation of overexpressed high mobility group box - 1 protein[J]. Cytotechnology, 2020, 72(1): 165 - 174
- 10 Tokumasu R, Yamaga K, Yamazaki Y, *et al.* Dose - dependent role of claudin - 1 in vivo in orchestrating features of atopic dermatitis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2016, 113(28): E4061 - E4068
- 11 Bergmann S, von Buenau B, Vidal - Y - Sy S, *et al.* Claudin - 1 decrease impacts epidermal barrier function in atopic dermatitis lesions dose - dependently[J]. Sci Rep, 2020, 10(1): 2024
- 12 Yuki T, Tobiishi M, Kusaka - Kikushima A, *et al.* Impaired tight junctions in atopic dermatitis skin and in a skin - equivalent model treated with interleukin - 17[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e161759
- 13 Altunbulakli C, Reiger M, Neumann AU, *et al.* Relations between epidermal barrier dysregulation and Staphylococcus species - dominated microbiome - dysbiosis in patients with atopic dermatitis[J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 142(5): 1643 - 1647
- 14 Atsugi T, Yokouchi M, Hirano T, *et al.* Holocrine secretion occurs outside the tight junction barrier in multicellular glands: lessons from claudin - 1 - deficient mice[J]. J Invest Dermatol, 2020, 140(2): 298 - 308
- 15 Sugawara T, Iwamoto N, Akashi M, *et al.* Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin - 1 - deficient mice[J]. J Dermatol Sci, 2013, 70(1): 12 - 18
- 16 Yuki T, Tobiishi M, Kusaka - Kikushima A, *et al.* Impaired tight junctions in atopic dermatitis skin and in a skin - equivalent model treated with interleukin - 17[J]. PLoS One, 2016, 11(9): e161759
- 17 Wang XW, Wang JJ, Gutowska - Owsiak D, *et al.* Deficiency of filaggrin regulates endogenous cysteine protease activity, leading to impaired skin barrier function[J]. Clin Exp Dermatol, 2017, 42(6): 622 - 631
- 18 Brunner PM, Israel A, Zhang N, *et al.* Early - onset pediatric atopic dermatitis is characterized by TH2/TH17/TH22 - centered inflammation and lipid alterations[J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 141(6): 2094 - 2106
- 19 Hirano T, Yokouchi M, Atsugi T, *et al.* Epidermis - specific ablation of claudin - 1 in adult mice demonstrates the essential role of a tight junction barrier in skin homeostasis[J]. J Dermatol Sci, 2016, 84(1): e37 - e37
- 20 Baurecht H, Ruhlemann MC, Rodriguez E, *et al.* Epidermal lipid composition, barrier integrity, and eczematous inflammation are associated with skin microbiome configuration[J]. J Allergy Clin Immunol, 2018, 141(5): 1668 - 1676
- 21 Liang Y, Chang C, Lu Q. The genetics and epigenetics of atopic dermatitis - filaggrin and other polymorphisms[J]. Clin Rev Allergy Immunol, 2016, 51(3): 315 - 328
- 22 Yoshida K, Kubo A, Fujita H, *et al.* Distinct behavior of human Langerhans cells and inflammatory dendritic epidermal cells at tight junctions in patients with atopic dermatitis[J]. J Allergy Clin Immunol, 2014, 134(4): 856 - 864
- 23 Ryu WI, Lee H, Bae HC, *et al.* IL - 33 down - regulates CLDN1 expression through the ERK/STAT3 pathway in keratinocytes [J]. J Dermatol Sci, 2018, 90(3): 313 - 322
- 24 Roussel AJ, Bruet V, Marsella R, *et al.* Tight junction proteins in the canine epidermis: a pilot study on their distribution in normal and in high IgE - producing canines[J]. Can J Vet Res, 2015, 79(1): 46 - 51
- 25 Gschwandtner M, Mildner M, Mlitz V, *et al.* Histamine suppresses epidermal keratinocyte differentiation and impairs skin barrier function in a human skin model[J]. Allergy, 2013, 68(1): 37 - 47
- 26 De Benedetto A, Yoshida T, Fridy S, *et al.* Histamine and skin barrier: are histamine antagonists useful for the prevention or treatment of atopic dermatitis? [J]. J Clin Med, 2015, 4(4): 741 - 755
- 27 Glatzer F, Gschwandtner M, Ehling S, *et al.* Histamine induces proliferation in keratinocytes from patients with atopic dermatitis through the histamine 4 receptor[J]. J Allergy Clin Immunol, 2013, 132(6): 1358 - 1367
- 28 Yamada K, Matsushita K, Wang J, *et al.* Topical glucose induces claudin - 1 and filaggrin expression in a mouse model of atopic dermatitis and in keratinocyte culture, exerting anti - inflammatory effects by repairing skin barrier function[J]. Acta Derm Venereol, 2018, 98(1): 19 - 25
- 29 Na K, Lkhagva - Yondon E, Kim M, *et al.* Oral treatment with Aloe polysaccharide ameliorates ovalbumin - induced atopic dermatitis by restoring tight junctions in skin[J]. Scand J Immunol, 2020, 91(3): e12856
- 30 Wang X, Jiang X, Yu X, *et al.* Cimifugin suppresses allergic inflammation by reducing epithelial derived initiative key factors via regulating tight junctions[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(11): 2926 - 2936

(收稿日期: 2020 - 05 - 09)

(修回日期: 2020 - 05 - 24)