

## 基因敲除技术在炎症性肠病肠上皮屏障机制研究中的应用

陈柳, 吴焕淦, 施茵

陈柳, 上海中医药大学岳阳临床医学院 上海市 201203

吴焕淦, 施茵, 上海市针灸经络研究所 上海市 200030

陈柳, 在读硕士, 主要从事炎症性肠病的相关研究。

国家自然科学基金资助项目, Nos. 81273844, 81473757

国家重点基础研究发展计划(973计划)基金资助项目,

No. 2015CB554500

作者贡献分布: 本文综述由陈柳完成; 吴焕淦与施茵负责审校指导。

通讯作者: 施茵, 主任医师, 博士, 200030, 上海市宛平南路

650号, 上海市针灸经络研究所. [flysy0636@163.com](mailto:flysy0636@163.com)

电话: 8621-64383910

收稿日期: 2015-08-06 修回日期: 2015-08-21

接受日期: 2015-09-07 在线出版日期: 2015-10-18

### Application of gene knockout technology in research of intestinal epithelial barrier mechanism in inflammatory bowel disease

Liu Chen, Huan-Gan Wu, Yin Shi

Liu Chen, Yueyang Clinical Medical School, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

Huan-Gan Wu, Yin Shi, Shanghai Institute of Acupuncture-Moxibustion and Meridian, Shanghai 200030, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, Nos. 81273844 and 81473757; National Basic Research Program of China (973 Program), No. 2015CB554500

Correspondence to: Yin Shi, Chief Physician, Shanghai Institute of Acupuncture-Moxibustion and Meridian, 630 Wanping South Road, Shanghai 200030, China. [flysy0636@163.com](mailto:flysy0636@163.com)

Received: 2015-08-06 Revised: 2015-08-21

Accepted: 2015-09-07 Published online: 2015-10-18

### Abstract

Intestinal epithelial barrier permeability

changes/increase caused by intestinal epithelial barrier damage play an important role in the pathogenesis of inflammatory bowel disease, and the maintenance of normal intestinal epithelial barrier permeability depends on the two aspects of the trans-epithelial cell pathway and the tight connection between the cells. In recent years, with the development of molecular biology technology and wide application of a variety of gene engineering technology, specific knocking out a particular gene through gene knockout technology to study the pathogenesis of the disease has become a hot research topic. In this paper, we review the application of gene knockout technology in the research of intestinal epithelial barrier trans-epithelial pathway and tight junction pathway in inflammatory bowel disease, in order to provide some ideas for further study of the pathogenesis of inflammatory bowel disease.

© 2015 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

**Key Words:** Gene knockout technology; Inflammatory bowel disease; Intestinal epithelial barrier; Review

Chen L, Wu HG, Shi Y. Application of gene knockout technology in research of intestinal epithelial barrier mechanism in inflammatory bowel disease. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2015; 23(29): 4673-4679 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4673.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v23.i29.4673>

### 摘要

肠上皮屏障通透性改变/增加所致的肠上皮

### ■背景资料

肠上皮屏障是机体最重要的免疫防御屏障, 其中肠黏膜上皮细胞及其细胞间的紧密连接结构是肠道抵御外环境中有害物质或病原体入侵肠黏膜组织的关键, 是维持肠上皮的选择通透性及其屏障功能的结构基础。跨上皮途径和细胞旁紧密连接途径结构的改变, 可使肠黏膜通透性改变, 即肠上皮屏障出现损伤进而可导致炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)的发生。

### ■同行评议者

潘秀珍, 教授, 主任医师, 福建省立医院消化科

## ■ 研究前沿

基因敲除技术特异性敲除某一特定基因来研究疾病的发病机制成为热点。本文通过介绍基因敲除技术特异性敲除肠上皮屏障的跨上皮途径和紧密连接途径这两条途径中的任意靶点基因来造成其结构改变, 以此来研究IBD的发病机制; 并在此基础上寻找治疗IBD的新靶点, 这将对于开发治疗IBD的新药具有重大的潜在研究价值。

屏障损伤在炎症性肠病发病机制中起重要作用, 正常肠上皮屏障通透性的维持依赖于跨上皮细胞途径和细胞间紧密连接途径这两方面。近年来, 随着分子生物学技术的发展以及各种基因工程技术的广泛应用, 通过基因敲除技术特异性敲除某一特定基因来研究疾病的发病机制成为热点。本文综合了近年来国内外相关研究文献, 旨在对基因敲除技术在炎症性肠病肠上皮屏障的跨上皮途径和紧密连接途径这两方面研究中的应用进行简要概述, 试图对深入开展炎症性肠病的发病机制研究提供一些思路。

© 2015年版权归百世登出版集团有限公司所有。

**关键词:** 基因敲除技术; 炎症性肠病; 肠上皮屏障; 综述

**核心提示:** 肠上皮屏障通透性改变或通透性增加所致的肠上皮屏障损伤在炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)发病机制中发挥着重要作用, 本文通过阐述基因敲除技术在肠上皮屏障跨上皮途径中的应用和在肠上皮屏障紧密连接途径中的应用来研究肠上皮屏障结构或功能损伤在IBD中的影响作用。

陈柳, 吴焕淦, 施茵. 基因敲除技术在炎症性肠病肠上皮屏障机制研究中的应用. 世界华人消化杂志 2015; 23(29): 4673-4679 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/23/4673.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v23.i29.4673>

## 0 引言

炎症性肠病(inflammatory bowel disease, IBD)包括溃疡性结肠炎(ulcerative colitis, UC)和克罗恩病(Crohn's disease, CD), 由于其发病率逐年升高, 其病因和发病机制的研究也越来越受到重视。其中肠上皮屏障损伤机制的研究已成为IBD发病机制研究中的热点之一。随着分子生物学技术的发展以及各种基因工程技术的广泛应用, 从20世纪90年代起就有研究者<sup>[1-3]</sup>通过采用基因敲除技术特异性敲除某一特定基因来研究细胞因子、细胞因子受体、T细胞受体、抗原递呈细胞以及肠上皮细胞在IBD发病机制尤其是在其免疫发病机制中的作用。

基因敲除(gene knockout)技术是20世纪80年代发展起来的一门新技术。基因敲除动物模型的建立使许多与人类疾病相关的新基因的

功能得到阐明, 从而使现代生物学及医学研究领域取得了突破性进展。该技术应用DNA同源重组技术, 将灭活的基因导入小鼠胚胎干细胞以取代目的基因, 再筛选出已靶向灭活的细胞, 微注射入小鼠囊胚。该细胞参与胚胎发育形成嵌合型小鼠, 再进一步传代培育可得到纯合基因敲除小鼠。最新的基因敲除技术即可诱导区域性蛋白质敲除技术, 用这一技术构建的模式动物已成为目前功能基因组和功能蛋白质组研究最先进的工具之一<sup>[4]</sup>。基因敲除动物可用于研究动物在该基因缺陷时的生理病理过程。

肠上皮屏障是机体最重要的免疫防御屏障, 其中肠黏膜上皮细胞及其细胞间的紧密连接结构是肠道抵御外环境中有害物质或病原体入侵肠黏膜组织的关键, 是维持肠上皮的选择通透性及其屏障功能的结构基础。正常的肠上皮通透性主要依赖于两个途径, 即跨上皮途径和细胞旁途径(紧密连接), 在跨上皮途径中, 肠黏膜上皮细胞允许营养物质从肠腔吸收进入循环, 同时限制对人体有害的物质(如内毒素和炎症因子)通过<sup>[5,6]</sup>。细胞旁途径是一组复杂的结构, 主要由上皮细胞之间的紧密连接构成。细胞旁途径对大分子物质(如内毒素和细菌的其他产物)是否通过起到关键性调控作用<sup>[7]</sup>。研究<sup>[8]</sup>表明, 跨上皮途径和细胞旁紧密连接途径结构的改变, 可使肠黏膜通透性改变, 即肠上皮屏障出现损伤进而可导致IBD的发生。通过利用基因敲除技术特异性敲除这两条途径中的任意靶点基因来造成其结构改变, 由此来研究肠上皮屏障结构或功能损伤在IBD中的影响作用。本文旨在从肠上皮屏障的跨上皮途径和紧密连接途径研究基因敲除技术在这两条途径中的应用。

## 1 基因敲除技术在肠上皮屏障跨上皮途径中的应用

**1.1 肿瘤坏死因子 $\alpha$**  肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )即经典TNF, 是一种主要由单核-巨噬细胞产生的促炎细胞因子, 主要参与炎症反应和免疫反应。他可诱导其他多种炎症介质的释放, 激活全身和肠道局部免疫反应, 引起免疫级联反应和恶性循环, 导致肠道持续炎症<sup>[9]</sup>。Fukumoto等<sup>[10]</sup>通过研究证实, 用

吡喹啉美辛诱导的小肠损伤模型中,  $\text{TNF-}\alpha^{-/-}$  的小鼠与野生型小鼠相比, 其肠上皮细胞凋亡含量和Caspase3蛋白的表达明显低于野生型小鼠,  $\text{Bcl-2}$  mRNA的表达水平高于野生型小鼠. 他们认为 $\text{TNF-}\alpha$ 在吡喹啉美辛诱导的小肠损伤模型发病机制中发挥着重大作用, 是通过其自身参与肠黏膜的中性粒细胞浸润和肠上皮细胞凋亡途径实现的.

**1.2 锌指蛋白A20** 锌指蛋白A20(zinc finger protein A20, A20), 他是由 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导产生的 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导蛋白3( $\text{TNF-}\alpha$  induced protein 3,  $\text{TNFAIP3}$ ), 是核因子- $\kappa\text{B}$ (nuclear factor- $\kappa\text{B}$ ,  $\text{NF-}\kappa\text{B}$ )的目标基因, 能够编码泛素化修饰酶, 除可负调控 $\text{TNF-}\alpha$ 介导的 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 激活, 还可抑制 $\text{TNF-}\alpha$ 介导的细胞凋亡<sup>[11]</sup>. Vereecke等<sup>[12]</sup>研究发现,  $\text{A20}^{-/-}$ 的小鼠没有出现自发的肠道炎症, 但是却显示出对实验性结肠炎的敏感性, 并且 $\text{A20}^{-/-}$ 的小鼠肠上皮细胞对 $\text{TNF-}\alpha$ 诱导的细胞凋亡具有高敏感性, 可导致肠上皮细胞凋亡以及肠上皮屏障破坏, 最终源于肠道共生菌的侵袭引起系统性炎症反应而导致死亡.

**1.3 Ras相关结构域蛋白1A** Ras相关结构域蛋白1A(Ras association domain family protein 1A, *RASSF1A*)是一个肿瘤抑制基因. 近年来研究<sup>[13-15]</sup>发现, *RASSF1A*是一种新的细胞调节因子, 他是Rassf/Salvador/Hippo通路的组成部分, 而Rassf通路能够调节细胞的死亡和增殖. Gordon等<sup>[16]</sup>通过实验证实, 特意敲除*RASSF1A*基因可导致肠上皮细胞凋亡增加. 他们通过实验观察到, *RASSF1A*与膜近端Toll样受体组件有密切关联. *RASSF1A*能够抑制Toll样受体诱导的 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 活化, 活化的 $\text{NF-}\kappa\text{B}$ 可以调节肠上皮细胞的增殖和诱导Hippo通路的靶蛋白YAP(Yes-associated protein)酪氨酸磷酸化, 而酪氨酸磷酸化的YAP可以上调促凋亡基因从而导致肠上皮细胞凋亡. 从果蝇的肠上皮细胞移除YAP或在YAP<sup>-/-</sup>的葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)诱导产生的结肠炎小鼠中显示出肠上皮细胞的低存活率和细胞增殖减弱<sup>[17]</sup>.

**1.4 MicroRNA-21** MicroRNA-21(miR-21)是一个独特的miRNA, 能够在多种炎症性疾病中过量表达, 包括IBD<sup>[18-22]</sup>. miRNAs属于一种小核糖核酸分子, 他能够在后转录水平调节基因的表达. Shi等<sup>[23]</sup>研究证实, 在用DSS处理之前,

miR-21<sup>-/-</sup>小鼠和野生型小鼠的肠上皮通透性和肠上皮细胞凋亡率并没有明显差别, 而在用DSS诱导产生结肠炎模型之后, 野生型小鼠与miR-21<sup>-/-</sup>小鼠相比, 其肠上皮通透性和肠上皮细胞凋亡率明显增加. 因此, 认为特异性敲除miR-21可以提高DSS诱导的实验性结肠炎小鼠的存活率.

**1.5 白介素-6** 白介素-6(interleukin 6, IL-6)是一类具有多重生物学效应的细胞因子, 他参与各种细胞免疫应答和细胞凋亡与增殖, 对维持肠黏膜完整性有重要意义<sup>[24]</sup>. Grivennikov等<sup>[25]</sup>研究证实, 用DSS诱导产生的急性肠炎模型中, IL-6<sup>-/-</sup>小鼠与野生型小鼠相比, 其诱导的结肠炎更加严重, 体质量减轻也较野生型小鼠更为明显; IL-6<sup>-/-</sup>小鼠的肠上皮细胞凋亡率也显著增高. 认为IL-6可以提高肠上皮细胞的增殖, 增强肠上皮细胞对抗凋亡的能力.

**1.6 信号转录和转录激活5b** 信号转录和转录激活5b(signal transducer and activator of transcription 5b, *STAT5b*)是转录因子家族的成员之一, 他被多种细胞因子和激素活化来调节机体免疫、造血和新陈代谢. Han等<sup>[26]</sup>认为, 在CD患者受损的结肠组织中*STAT5b*的活化是减少的. 而用TNBS诱导产生的实验性结肠炎模型中, *STAT5b*<sup>-/-</sup>小鼠对实验性结肠炎表现出易感, 推测*STAT5b*对研究结肠屏障功能有重要意义. 他们进一步研究证实, 特异性敲除*STAT5b*基因, 导致结肠基因表达的凋亡模式的活化, 可增加肠黏膜的通透性和肠上皮细胞的凋亡<sup>[27]</sup>.

**1.7 肠三叶因子** 肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF)是肠上皮修复的重要调控因子, 在肠黏膜损伤时有利于肠黏膜的连续性重建. 在结直肠癌和衍生的细胞系中ITF分泌会增多, 肠黏膜修复需要肠上皮细胞从基底脱离, 这将诱导细胞凋亡的发生. Taupin等<sup>[28]</sup>研究证实, 特异性敲除*ITF*基因的小鼠结肠上皮细胞凋亡明显增加, 并且不伴随有受体相关( $\text{TNFR/Fas}$ )和应激相关( $\text{Bcl-family}$ )的细胞凋亡调节因子表达的改变.

## ■ 相关报道

Marcon等认为特异性敲除缓激肽1受体基因的小鼠对实验性结肠炎易感是通过代偿性上调缓激肽2受体实现的, 而缓激肽2受体可以破坏肠上皮屏障的紧密连接途径, 进而使肠黏膜的通透性增加. 缓激肽2受体激动剂可减轻试验性结肠炎的症状, 可望成为一个重要的靶向治疗剂.

## 2 基因敲除技术在肠上皮屏障紧密连接途径中的应用

**2.1 缓激肽1受体和缓激肽2受体** 缓激肽受体(bradykinin receptor, BDKR)是G蛋白偶联受



## ■ 创新盘点

本文较全面的论述了基因敲除技术在IBD肠上皮屏障的跨上皮途径和紧密连接途径这两方面研究中的应用, 从方法学上对今后深入开展IBD肠上皮屏障损伤机制的研究具有重要参考价值。

体视紫红质亚家族的重要成员之一, 可参与调节血压、中枢痛觉调制、炎症发生和发展等众多病理生理过程。BDKR分为缓激肽1受体(bradykinin 1 receptor, B1R)和缓激肽2受体(bradykinin 2 receptor, B2R)两种受体亚型。BDKR的相应配体-缓激肽(bradykinin, BK)则是激肽释放酶-激肽系统(kallikrein-kinin system, KKS)的重要产物<sup>[29]</sup>。B2R在各种不同器官中都有表达, 能够介导多数已知激肽的生理活动; 而B1R在正常状态下表达量很少, 但是在创伤或是病理状态下能迅速表达<sup>[30-32]</sup>。研究<sup>[33]</sup>证实, BK作为B2R激动剂, 能够破坏紧密连接通路, 从而使肠黏膜通透性增加。Marcon等<sup>[34]</sup>研究证实, 特异性敲除B1R基因的小鼠对DSS诱导的结肠炎易感, 与DSS诱导的野生型小鼠相比, IL-1 $\beta$ 、IFN- $\gamma$ 、角质形成细胞趋化因子和巨噬细胞炎性蛋白2的表达明显增加; 而对野生型小鼠进行B1R拮抗剂治疗后, 对DSS诱导的结肠炎并没有明显影响; 用DSS诱导的B1R<sup>-/-</sup>小鼠, 其B2R mRNA的表达明显上调, 紧密连接相关蛋白occludin的基因表达减少; 但通过对DSS诱导的B1R<sup>-/-</sup>小鼠进行B2R拮抗剂治疗后, 其可以阻断结肠炎的恶化。因此, 认为基因敲除B1R的小鼠对实验性结肠炎易感可能与其代偿性上调B2R有关, 进而通过调节紧密连接来实现。

**2.2 蛋白C** 蛋白C(protein C, PC)是PC通路的成员之一, PC通路是连接炎症和凝血的一个主要桥梁。PC通路主要由血栓调节蛋白(thrombomodulin, TM)、内皮细胞蛋白C受体(endothelial cell PC receptor, EPCR)、PC、蛋白酶激活受体-1(protease-activated receptor-1, PAR-1)蛋白组成<sup>[35]</sup>。通常PC通路被认为主要具有抗凝作用, 有研究<sup>[36,37]</sup>证实, 他对炎症通路也起着重要作用, 其通路的每个组成部分都表现出极大的抗炎活性, 且其在肠上皮细胞中也有表达。PC作为一种抗凝和抗炎分子, 在IBD的患者中上皮细胞表达的PC和PC受体下调。Vetrano等<sup>[38]</sup>通过研究证实, 特异性敲除PC基因的小鼠会形成自发性结肠炎, 并对实验性结肠炎易感。PC<sup>-/-</sup>小鼠释放的炎症细胞因子和肠黏膜通透性都出现增加。而通过对肠上皮紧密连接结构分析发现, PC<sup>-/-</sup>小鼠的连接黏附分子A(junctional adhesion molecule A, JAM-A)和claudin-3表达减少, ZO-1表达模式改变。在体

内, 用活化的PC治疗PC<sup>-/-</sup>小鼠, 其肠黏膜损伤治愈和结肠炎症得到改善。由此推测, 肠上皮细胞的PC通路在调节肠上皮通透性和紧密连接完整性上发挥重要作用。

**2.3 叉头框转录因子4** 叉头框转录因子4(forkhead box transcription factor O4, FoxO4)是叉头框转录因子家族成员之一。FoxO蛋白参与多种细胞功能, 其中包括免疫应答的调节<sup>[39-44]</sup>。Zhou等<sup>[45]</sup>研究证实, 特异性敲除FoxO4基因的小鼠对TNBS诱导的结肠炎易感性增加; 与野生型小鼠相比, FoxO4<sup>-/-</sup>小鼠的上皮细胞内趋化因子CCL5、CD4<sup>+</sup>上皮内T细胞的招募和炎症细胞因子INF- $\gamma$ 、TNF- $\alpha$ 的表达均显著增加。此外, FoxO4<sup>-/-</sup>小鼠的肠黏膜通透性增加, 相关的紧密连接蛋白ZO-1、claudin-1表达减少。

**2.4 JAM-A** JAM-A是紧密连接家族的成员之一。紧密连接分子家族的组成比较复杂, 主要由多种跨膜蛋白(transmembrane proteins)家族和JAM家族组成。研究<sup>[46]</sup>表明JAM-A能参与调节屏障功能和炎症应答, 其在很多类型的细胞中都有表达, 特别是在内皮细胞和上皮细胞中表达较多。Laukoetter等<sup>[47]</sup>研究发现, 与野生型小鼠相比, 特异性敲除JAM-A基因的小鼠对DSS诱导的结肠炎易感。此外, 在JAM-A<sup>-/-</sup>的小鼠中, 其结肠黏膜炎症和肠上皮细胞的通透性增加, 肠上皮细胞的增殖增加, 同时其紧密连接蛋白claudin-10、claudin-15的表达也上调。这些研究结果显示, JAM-A介导肠上皮屏障功能是通过调节跨膜蛋白的表达和肠上皮细胞的增殖来实现的, 进而调节肠黏膜炎症和肠上皮黏膜急性损伤的应答。

**2.5 IL-1 $\beta$**  IL-1 $\beta$ 是一种多功能细胞因子, 主要由活化的单核-巨噬细胞产生, 在IBD的发病机制中发挥重要作用。有研究<sup>[48,49]</sup>表明, IL-1 $\beta$ 可以导致生长的Caco-2细胞的肠上皮紧密连接通透性增加。临床研究<sup>[50-52]</sup>也发现, IBD患者体内IL-1 $\beta$ 水平的增加可导致肠黏膜通透性增加。Al-Sadi等<sup>[53]</sup>通过研究证实, IL-1 $\beta$ 可以导致小鼠肠上皮通透性增加, 且其可能是通过介导肌球蛋白轻链激酶(myosin light-chain kinase, MLCK)表达增加和/或活化实现的; 而在特异性敲除MLCK基因的小鼠中, IL-1 $\beta$ 没有导致肠上皮通透性的增加。由此提示MLCK在肠上皮屏障紧密连接途径中发挥着

重要的调节作用。

### 3 结论

肠黏膜上皮屏障是机体最重要的免疫防御屏障, 其损害程度与IBD的发生与发展密切相关; 肠黏膜上皮屏障一旦受损则可引起肠上皮通透性增加, 因此, 修复肠黏膜上皮屏障已经成为治疗IBD的新目标。基因敲除技术是在动物整体水平研究目的基因的生物学技术, 在新基因的功能鉴定及人类疾病的研究中展现出不可估量的应用前景, 本文通过查阅大量的国内外文献, 认为基因敲除技术在IBD的发病机制以及治疗策略上存在着很大的潜在应用价值。本文旨在对基因敲除技术在IBD肠上皮屏障的跨上皮途径和紧密连接途径这两方面研究中的应用进行简要概述, 以期对深入开展IBD的发病机制的研究和寻找新的治疗方法提供一些思路。

### 4 参考文献

- Kulkarni AB, Karlsson S. Transforming growth factor-beta 1 knockout mice. A mutation in one cytokine gene causes a dramatic inflammatory disease. *Am J Pathol* 1993; 143: 3-9 [PMID: 8317552]
- Yeung RS, Penninger J, Mak TW. T-cell development and function in gene-knockout mice. *Curr Opin Immunol* 1994; 6: 298-307 [PMID: 8011213]
- Wang ZE, Reiner SL, Zheng S, Dalton DK, Locksley RM. CD4<sup>+</sup> effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med* 1994; 179: 1367-1371 [PMID: 7908325]
- Cui Z, Wang H, Tan Y, Zaia KA, Zhang S, Tsien JZ. Inducible and reversible NR1 knockout reveals crucial role of the NMDA receptor in preserving remote memories in the brain. *Neuron* 2004; 41: 781-793 [PMID: 15003177 DOI: 10.1016/S0896-6273(04)00072-8]
- Madara JL. Warner-Lambert/Parke-Davis Award lecture. Pathobiology of the intestinal epithelial barrier. *Am J Pathol* 1990; 137: 1273-1281 [PMID: 2260620]
- Barrett KE. New ways of thinking about (and teaching about) intestinal epithelial function. *Adv Physiol Educ* 2008; 32: 25-34 [PMID: 18334565 DOI: 10.1152/advan.00092.2007]
- Turner JR. Molecular basis of epithelial barrier regulation: from basic mechanisms to clinical application. *Am J Pathol* 2006; 169: 1901-1909 [PMID: 17148655 DOI: 10.2353/ajpath.2006.060681]
- Mankertz J, Schulzke JD. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications. *Curr Opin Gastroenterol* 2007; 23: 379-383 [PMID: 17545772]
- Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu Rev Med* 1994; 45: 491-503 [PMID: 8198398]
- Fukumoto K, Naito Y, Takagi T, Yamada S, Horie R, Inoue K, Harusato A, Hirata I, Omatsu T, Mizushima K, Hirai Y, Yoshida N, Uchiyama K, Ishikawa T, Handa O, Konishi H, Wakabayashi N, Yagi N, Kokura S, Ichikawa H, Kita M, Yoshikawa T. Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in the pathogenesis of indomethacin-induced small intestinal injury in mice. *Int J Mol Med* 2011; 27: 353-359 [PMID: 21249312 DOI: 10.3892/ijmm.2011.602]
- Vereecke L, Beyaert R, van Loo G. The ubiquitin-editing enzyme A20 (TNFAIP3) is a central regulator of immunopathology. *Trends Immunol* 2009; 30: 383-391 [PMID: 19643665 DOI: 10.1016/j.it.2009.05.007]
- Vereecke L, Sze M, Mc Guire C, Rogiers B, Chu Y, Schmidt-Supprian M, Pasparakis M, Beyaert R, van Loo G. Enterocyte-specific A20 deficiency sensitizes to tumor necrosis factor-induced toxicity and experimental colitis. *J Exp Med* 2010; 207: 1513-1523 [PMID: 20530205 DOI: 10.1084/jem.20092474]
- Halder G, Johnson RL. Hippo signaling: growth control and beyond. *Development* 2011; 138: 9-22 [PMID: 21138973 DOI: 10.1242/dev.045500]
- Fausti F, Di Agostino S, Sacconi A, Strano S, Blandino G. Hippo and rassf1a Pathways: A Growing Affair. *Mol Biol Int* 2012; 2012: 307628 [PMID: 22830020 DOI: 10.1155/2012/307628]
- Avruch J, Zhou D, Bardeesy N. YAP oncogene overexpression supercharges colon cancer proliferation. *Cell Cycle* 2012; 11: 1090-1096 [PMID: 22356765 DOI: 10.4161/cc.11.6.19453]
- Gordon M, El-Kalla M, Zhao Y, Fiteih Y, Law J, Volodko N, Anwar-Mohamed A, El-Kadi AO, Liu L, Odenbach J, Thiesen A, Onyskiw C, Ghazaleh HA, Park J, Lee SB, Yu VC, Fernandez-Patron C, Alexander RT, Wine E, Baksh S. The tumor suppressor gene, RASSF1A, is essential for protection against inflammation-induced injury. *PLoS One* 2013; 8: e75483 [PMID: 24146755 DOI: 10.1371/journal.pone.0075483]
- Avruch J, Zhou D, Fitamant J, Bardeesy N. Mst1/2 signalling to Yap: gatekeeper for liver size and tumour development. *Br J Cancer* 2011; 104: 24-32 [PMID: 21102585 DOI: 10.1038/sj.bjc.6606011]
- Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, Richardson JA, Bassel-Duby R, van Rooij E, Olson EN. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer Cell* 2010; 18: 282-293 [PMID: 20832755 DOI: 10.1016/j.ccr.2010.08.013]
- Medina PP, Nolde M, Slack FJ. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* 2010; 467: 86-90 [PMID: 20693987 DOI: 10.1038/nature09284]
- Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, Bussen M, Galuppo P, Just S, Rottbauer W, Frantz S, Castoldi M, Soutschek J, Koteliansky V, Rosenwald A, Basson MA, Licht JD, Pena JT, Rouhanifard SH, Muckenthaler MU,

### ■名词解释

基因敲除技术: 该技术应用DNA同源重组技术, 将灭活的基因导入小鼠胚胎干细胞以取代目的基因, 再筛选出已靶向灭活的细胞, 微注射入小鼠囊胚。该细胞参与胚胎发育形成嵌合型小鼠, 再进一步传代培育可得到纯合基因敲除小鼠。

# 同行评价

本文综述了基因敲除技术在IBD肠上皮屏障的跨上皮途径与紧密连接途径的应用, 对IBD的发病机制和临床诊疗有参考意义。

- 21 Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 2008; 27: 2128-2136 [PMID: 17968323 DOI: 10.1038/sj.onc.1210856]
- 22 Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 2008; 18: 350-359 [PMID: 18270520 DOI: 10.1038/cr.2008.24]
- 23 Shi C, Liang Y, Yang J, Xia Y, Chen H, Han H, Yang Y, Wu W, Gao R, Qin H. MicroRNA-21 knockout improve the survival rate in DSS induced fatal colitis through protecting against inflammation and tissue injury. *PLoS One* 2013; 8: e66814 [PMID: 23826144 DOI: 10.1371/journal.pone.0066814]
- 24 Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 1-21 [PMID: 15771564 DOI: 10.1146/annurev.immunol.23.021704.115806]
- 25 Grivennikov S, Karin E, Terzic J, Mucida D, Yu GY, Vallabhapurapu S, Scheller J, Rose-John S, Cheroutre H, Eckmann L, Karin M. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009; 15: 103-113 [PMID: 19185845 DOI: 10.1016/j.ccr.2009.01.001]
- 26 Han X, Osuntokun B, Benight N, Loesch K, Frank SJ, Denson LA. Signal transducer and activator of transcription 5b promotes mucosal tolerance in pediatric Crohn's disease and murine colitis. *Am J Pathol* 2006; 169: 1999-2013 [PMID: 17148664 DOI: 10.2353/ajpath.2006.060186]
- 27 Han X, Ren X, Jurickova I, Groschwitz K, Pasternak BA, Xu H, Wilson TA, Hogan SP, Denson LA. Regulation of intestinal barrier function by signal transducer and activator of transcription 5b. *Gut* 2009; 58: 49-58 [PMID: 18687707 DOI: 10.1136/gut.2007.145094]
- 28 Taupin DR, Kinoshita K, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 799-804 [PMID: 10639160]
- 29 Brechter AB, Persson E, Lundgren I, Lerner UH. Kinin B1 and B2 receptor expression in osteoblasts and fibroblasts is enhanced by interleukin-1 and tumour necrosis factor-alpha. Effects dependent on activation of NF-kappaB and MAP kinases. *Bone* 2008; 43: 72-83 [PMID: 18467203 DOI: 10.1016/j.bone.2008.02.003]
- 30 McEachern AE, Shelton ER, Bhakta S, Obernolte R, Bach C, Zuppan P, Fujisaki J, Aldrich RW, Jarnagin K. Expression cloning of a rat B2 bradykinin receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 7724-7728 [PMID: 1715575]
- 31 Menke JG, Borkowski JA, Bierilo KK, MacNeil T, Derrick AW, Schneck KA, Ransom RW, Strader CD, Linemeyer DL, Hess JF. Expression cloning of a human B1 bradykinin receptor. *J Biol Chem* 1994; 269: 21583-21586 [PMID: 8063797]
- 32 Calixto JB, Medeiros R, Fernandes ES, Ferreira J, Cabrini DA, Campos MM. Kinin B1 receptors: key G-protein-coupled receptors and their role in inflammatory and painful processes. *Br J Pharmacol* 2004; 143: 803-818 [PMID: 15520046 DOI: 10.1038/sj.bjp.0706012]
- 33 Liu LB, Xue YX, Liu YH, Wang YB. Bradykinin increases blood-tumor barrier permeability by down-regulating the expression levels of ZO-1, occludin, and claudin-5 and rearranging actin cytoskeleton. *J Neurosci Res* 2008; 86: 1153-1168 [PMID: 18183615 DOI: 10.1002/jnr.21558]
- 34 Marcon R, Claudino RF, Dutra RC, Bento AF, Schmidt EC, Bouzon ZL, Sordi R, Morais RL, Pesquero JB, Calixto JB. Exacerbation of DSS-induced colitis in mice lacking kinin B(1) receptors through compensatory up-regulation of kinin B(2) receptors: the role of tight junctions and intestinal homeostasis. *Br J Pharmacol* 2013; 168: 389-402 [PMID: 22889120 DOI: 10.1111/j.1476-5381.2012.02136.x]
- 35 Danese S, Vetrano S, Zhang L, Poplis VA, Castellino FJ. The protein C pathway in tissue inflammation and injury: pathogenic role and therapeutic implications. *Blood* 2010; 115: 1121-1130 [PMID: 20018912 DOI: 10.1182/blood-2009-09-201616]
- 36 Esmon CT. Interactions between the innate immune and blood coagulation systems. *Trends Immunol* 2004; 25: 536-542 [PMID: 15364056 DOI: 10.1016/j.it.2004.08.003]
- 37 Esmon CT, Fukudome K, Mather T, Bode W, Regan LM, Stearns-Kurosawa DJ, Kurosawa S. Inflammation, sepsis, and coagulation. *Haematologica* 1999; 84: 254-259 [PMID: 10189392]
- 38 Vetrano S, Ploplis VA, Sala E, Sandoval-Cooper M, Donahue DL, Correale C, Arena V, Spinelli A, Repici A, Malesci A, Castellino FJ, Danese S. Unexpected role of anticoagulant protein C in controlling epithelial barrier integrity and intestinal inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 19830-19835 [PMID: 22109555 DOI: 10.1073/pnas.1107140108]
- 39 Garçon L, Rivat C, James C, Lacout C, Camara-Clayette V, Ugo V, Lecluse Y, Bennaceur-Griscelli A, Vainchenker W. Constitutive activation of STAT5 and Bcl-xL overexpression can induce endogenous erythroid colony formation in human primary cells. *Blood* 2006; 108: 1551-1554 [PMID: 16684963]
- 40 Luo G, Yu-Lee L. Stat5b inhibits NFkappaB-mediated signaling. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 114-123 [PMID: 10628751 DOI: 10.1210/mend.14.1.0399]
- 41 Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spöttl T, Andus T, Schölmerich J, Herfarth H, Ray K, Falk W, Rogler G. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2002; 122: 1987-2000 [PMID: 12055604 DOI: 10.1053/gast.2002.33662]

- 42 Rakoff-Nahoum S, Hao L, Medzhitov R. Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity* 2006; 25: 319-329 [PMID: 16879997 DOI: 10.1016/j.immuni.2006.06.010]
- 43 Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004; 118: 229-241 [PMID: 15260992 DOI: 10.1016/j.cell.2004.07.002]
- 44 Yang Z, Fuss IJ, Watanabe T, Asano N, Davey MP, Rosenbaum JT, Strober W, Kitani A. NOD2 transgenic mice exhibit enhanced MDP-mediated down-regulation of TLR2 responses and resistance to colitis induction. *Gastroenterology* 2007; 133: 1510-1521 [PMID: 17915219 DOI: 10.1053/j.gastro.2007.07.025]
- 45 Zhou W, Cao Q, Peng Y, Zhang QJ, Castrillon DH, DePinho RA, Liu ZP. FoxO4 inhibits NF-kappaB and protects mice against colonic injury and inflammation. *Gastroenterology* 2009; 137: 1403-1414 [PMID: 19560465 DOI: 10.1053/j.gastro.2009.06.049]
- 46 Martín-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E. Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 1998; 142: 117-127 [PMID: 9660867]
- 47 Laukoetter MG, Nava P, Lee WY, Severson EA, Capaldo CT, Babbitt BA, Williams IR, Koval M, Peatman E, Campbell JA, Dermody TS, Nusrat A, Parkos CA. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med* 2007; 204: 3067-3076 [PMID: 18039951 DOI: 10.1084/jem.20071416]
- 48 Al-Sadi RM, Ma TY. IL-1beta causes an increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol* 2007; 178: 4641-4649 [PMID: 17372023]
- 49 Al-Sadi R, Ye D, Dokladny K, Ma TY. Mechanism of IL-1beta-induced increase in intestinal epithelial tight junction permeability. *J Immunol* 2008; 180: 5653-5661 [PMID: 18390750]
- 50 Hollander D, Vadheim CM, Brettholz E, Petersen GM, Delahunty T, Rotter JI. Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor. *Ann Intern Med* 1986; 105: 883-885 [PMID: 3777713]
- 51 Miehsler W, Püspök A, Oberhuber T, Vogelsang H. Impact of different therapeutic regimens on the outcome of patients with Crohn's disease of the upper gastrointestinal tract. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7: 99-105 [PMID: 11383598]
- 52 Vavricka SR, Rogler G. New insights into the pathogenesis of Crohn's disease: are they relevant for therapeutic options? *Swiss Med Wkly* 2009; 139: 527-534 [PMID: 19838869]
- 53 Al-Sadi R, Guo S, Dokladny K, Smith MA, Ye D, Kaza A, Watterson DM, Ma TY. Mechanism of interleukin-1 $\beta$  induced-increase in mouse intestinal permeability in vivo. *J Interferon Cytokine Res* 2012; 32: 474-484 [PMID: 22817402 DOI: 10.1089/jir.2012.0031]

编辑: 郭鹏 电编: 都珍珍

