

综 述

上皮细胞间紧密连接功能的研究进展

丛馨¹, 张艳¹, 俞光岩², 吴立玲^{1,*}¹北京大学口腔医学院唾液腺疾病研究中心, 北京大学医学部生理学与病理生理学系, 北京 100191; ²北京大学口腔医学院口腔颌面外科, 北京 100081

摘要: 紧密连接(tight junction, TJ)广泛存在于所有上皮或内皮细胞间连接的最顶端, 是物质经旁细胞途径转运的结构和功能基础。TJ是由跨膜蛋白和胞浆蛋白两大类构成的大分子复合物, 主要行使“屏障”和“栅栏”功能, 前者可对物质的大小和电荷进行选择, 进而调控旁细胞途径的物质转运; 后者则通过调控顶膜和基底侧膜两个功能区之间的脂质和蛋白等物质的自由弥散形成高度极性的细胞。近年来, 关于TJ在各种上皮细胞中的作用及调控机制的研究日益增多。本文重点综述了上皮细胞间TJ研究的最新进展, 包括TJ的构成、结构和功能检测以及调控机制, 并以几类研究比较集中的上皮类型为例介绍TJ研究的现状, 这将为防治与TJ改变相关的上皮屏障功能障碍性疾病提供新的思路。

关键词: 紧密连接; 上皮细胞; 旁细胞途径**中图分类号:** R363

Research progress on the function of epithelial tight junction

CONG Xin¹, ZHANG Yan¹, YU Guang-Yan², WU Li-Ling^{1,*}¹Center for Salivary Gland Diseases, Peking University School and Hospital of Stomatology, Department of Physiology and Pathophysiology, Peking University Health Science Center, Beijing 100191, China; ²Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Peking University School and Hospital of Stomatology, Beijing 100081, China

Abstract: Tight junctions (TJs) are widely expressed in the most apical portion of both epithelial and endothelial cell-cell interactions, serving as a structural and functional basis for material transport through the paracellular pathway. TJs are multi-protein complex composed of transmembrane and cytoplasmic proteins. TJs constitute pores allowing materials with specific size and electrical charge to pass through the paracellular pathway, which is so called “barrier” function. Besides, TJs also separate the lumen and interstitial space of epithelium and endothelium by the function of “fence”. Recently, there is increasing body of evidence regarding the crucial role of TJs, together with the possible signaling pathways, in many epithelial cells, such as salivary, airway, intestinal and renal epithelial cells. The present review focuses on the latest research progresses on TJs, including TJ’s composing, structure, and function measurement, as well as the mechanisms for modulating TJ’s functions in some important epithelial cell types. We hope that the review may provide new insight into the therapeutic strategy of epithelium-related disease by targeting TJs.

Key words: tight junction; epithelial cells; paracellular pathway

在人和动物体内, 相邻的上皮或内皮细胞的侧面有多种特化的结构组成连接复合体, 分别称为紧密连接 (tight junction, TJ)、黏附连接 (adherens junction)

、缝隙连接 (gap junction) 和桥粒 (desmosome)^[1]。黏附连接主要由跨膜的上皮钙黏着蛋白 (E-cadherin) 和细胞内的连环蛋白 (p120-catenin, β -catenin 和

Received 2016-02-28 Accepted 2016-05-24

Research from the corresponding author’s laboratory was supported by grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 81300893, 81271161, 81470756).

*Corresponding author. Tel: +86-10-82802403; Fax: +86-10-82802403; E-mail: pathophy@bjmu.edu.cn

α -catenin) 组成，与细胞骨架蛋白相连。黏附连接和桥粒参与细胞间机械性黏附的形成和维持；缝隙连接是相邻细胞间直接交流胞质的亲水膜通道结构，由连接蛋白 (connexin) 构成其基本结构单位。近年来，关于 TJ 在各种上皮和内皮组织中功能的研究日益增多，本文将阐述 TJ 的构成、功能检测及调控机制，并列举几类研究比较集中的上皮类型 TJ 的研究进展。

1 TJ的功能与构成

TJ 是由多种蛋白构成的大分子复合物，位于连接复合物的最顶端，呈连续的带状结构围绕着上皮或内皮细胞，主要具有栅栏 (fence) 和屏障 (barrier) 功能。TJ 通过阻止细胞膜中的脂质和蛋白等的自由流动，将上皮或内皮细胞膜划分为顶膜和基底侧膜两部分，完成栅栏功能；通过对透过物质的大小和所带电荷的选择性，调控水、离子和小分子溶质经旁细胞途径的转运，完成屏障功能。

按照亚细胞定位可将 TJ 蛋白分为跨膜蛋白和胞浆蛋白。相邻细胞间的 TJ 跨膜蛋白通过胞外环相互结合，形成“拉链”状结构，以封闭细胞旁间隙；

胞浆蛋白则作为桥梁连接跨膜蛋白和细胞骨架蛋白，形成一个完整的网状结构 (图 1)^[1]。

1.1 跨膜蛋白

目前关于跨膜蛋白的分类有两种方式。一种是按照蛋白结构相似性进行分类，包括 (1) claudin 家族分子 (claudin-1~27)；(2) TJ 相关膜相关结构域蛋白家族 (tight junction-associated MARVEL protein)，包括 occludin、tricellulin 和 marvelD3；(3) 连接黏附分子家族 (junctional adhesion molecule, JAM)。另一种是按照蛋白分布的位置进行分类，包括 (1) 两细胞间 TJ (bicellular tight junction, bTJ)，如 claudin 家族分子、occludin 和 JAM；(2) 三细胞间 TJ (tri-cellular tight junction, tTJ)，如 tricellulin 和 angulin 家族分子。

1.1.1 Claudin家族分子

1998 年 Furuse 等首先克隆出人类 claudin-1 和 -2 基因^[2]，迄今已发现 27 个 claudin 家族成员，分子量约为 20~27 kDa，各成员序列的一致性为 12.5%~69.7%。Claudin 家族分子具有四次跨膜结构域，其 N-端和 C-端均位于胞浆内，形成 2 个长度不等的胞外环和 1 个短的胞内环。研究表明，长度较大的第

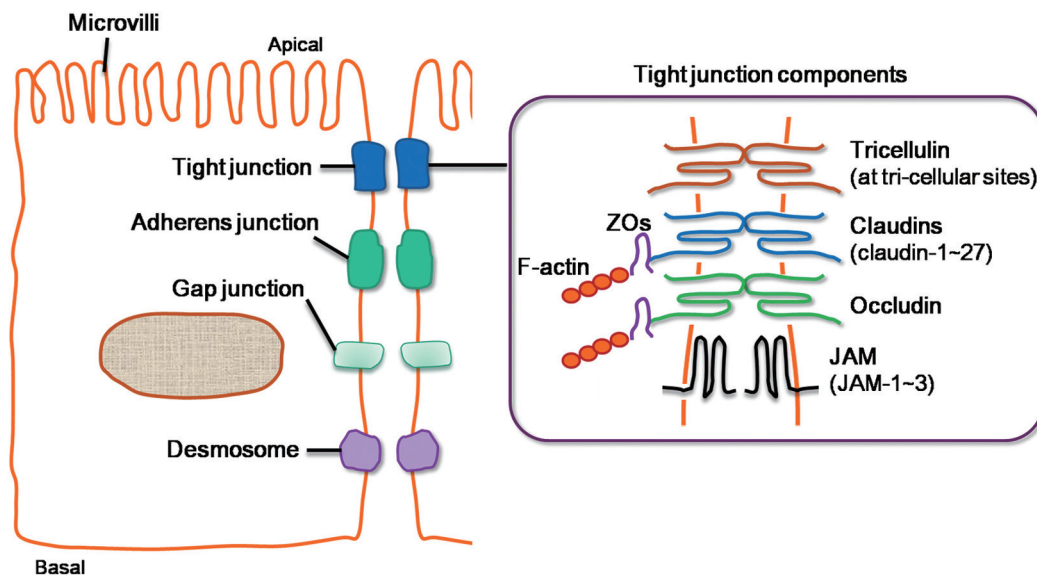


图 1 细胞间连接复合物及 TJ 构成示意图

Fig. 1. The schematic drawing of cell-cell junctional complex and tight junction composition. Left, the typical cell-cell junctional complex between epithelial or endothelial cells is composed of tight junction, adherens junction, gap junction, and desmosome. Right, the tight junction complex includes transmembrane proteins, such as claudin family members, occludin, tricellulin, and junctional adhesion molecules (JAM), together with cytoplasmic proteins like zonula occludens (ZO) family members. The extracellular loops of transmembrane proteins from neighboring cells interact with each other to occlude the intercellular space, while the cytoplasmic proteins link the transmembrane proteins with the cytoskeleton F-actin, forming a well established tight junction network.

1个胞外环主要形成旁细胞“孔道 (pore)”，可对透过物质特别是离子具有选择性；长度较短的第2个胞外环并不参与旁细胞通透性的调控作用，而主要负责 claudin 分子之间的反式结合 (*trans-interaction*)，此外还是产气荚膜杆菌肠毒素 (*Clostridium perfringens enterotoxin*) 的结合位点；胞内的 C-端则通过 PDZ 结构域与 TJ 胞浆蛋白黏连蛋白 (*zonula occludens, ZO*) 家族分子相连^[3]。虽然 claudin 在所有的上皮和内皮组织都有表达，但其亚型的分布具有明显的组织特异性。Claudin-1 广泛表达于体内各种上皮组织，claudin-5 主要表达于血管内皮组织。即使在同一种组织，不同部位所表达的 claudin 亦有差异。例如，在近曲小管表达 claudin-2，髓祥粗段表达 claudin-14、-16 和 -19，而集合管则表达 claudin-4、-7 和 -8^[4]。此外，在某些组织表达的是特定种类的 claudin 分子，如脑少突胶质细胞和睾丸足突细胞均主要表达单一的 claudin-11^[5]。Claudin 家族分子的这种组织或细胞特异性表达模式与各 claudin 分子所发挥的作用特点有关，有助于机体适应不同组织或不同部位的需要从而维持生理稳态。

目前认为，离子经旁细胞途径的转运主要是由相邻细胞间的 claudin 分子所形成的“孔道”所决定的。某些 claudin 分子第1个胞外环的氨基酸残基带有较多的负电荷，过表达这类 claudin 分子可引起跨上皮细胞电阻 (*transepithelial resistance, TER*) 的降低和对 Na^+ 通透性的增加；而某些 claudin 分子则因胞外环氨基酸残基带有较多的正电荷，因而对阳离子的通透性低、对阴离子的通透性高。据此，可将具有离子选择作用的 claudin 分子分为阳离子通道和阴离子通道，前者代表性分子包括 claudin-2、-10b、-15 和 -16，后者如 claudin-4、-5、-8 和 -14^[6]。以往的研究多集中在一些疾病模型中检测 claudin 分子在不同组织中所发挥的作用。近年来随着基因敲除技术的应用，各种 claudin 敲除小鼠模型为明确其在组成 TJ 中的具体作用提供了直接证据 (表 1)。其中，敲除 claudin-1 的小鼠由于皮肤上皮的屏障功能丧失可发生水和电解质的过度流失，仅能存活 1 天，因此，claudin-1 被认为是机体旁细胞屏障中最为重要的 TJ 蛋白^[7]。

1.1.2 Occludin

Occludin 广泛表达于所有上皮和内皮细胞中，尽管亦具有四次跨膜结构，但 occludin 的结构与 claudin 家族分子并不相似。Occludin 分子量约为

65 kDa，具有两个较大的胞外环。相邻细胞间 occludin 的胞外环相互结合，从而封闭旁细胞途径，参与维持和调节 TJ 的屏障功能；胞内域的氨基酸残基富含大量电荷，与组成 TJ 的胞浆蛋白直接作用而结合，再通过胞浆蛋白与细胞骨架蛋白相互作用，形成稳定的连接系统。此外，occludin 蛋白存在多个可被磷酸化的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸残基位点^[23]。

作为第一个被发现的 TJ 跨膜蛋白，occludin 在决定相邻细胞的紧密度和 TJ 的屏障功能中发挥重要作用。过表达 occludin 可以降低单层细胞 TER 以及旁细胞途径示踪分子右旋糖酐的透过率。但在敲除 occludin 基因的小鼠，肠道和膀胱上皮的旁细胞通透性并未发生改变；进一步利用冰冻蚀刻技术在电镜下观察 TJ 的结构也未见异常，这提示 occludin 可能不是构成 TJ 复合物所必需的结构蛋白。但值得注意的是，occludin 基因敲除小鼠仍然存在很多表型异常，如生长阻滞、胃黏膜上皮细胞慢性炎症和增生、睾丸肥大、唾液腺纹状管细胞浆内的分泌颗粒缺失等^[24]，说明 occludin 仍然是 TJ 中调节通透性的重要分子。

1.1.3 Tricellulin

Tricellulin 是 2005 年新发现的 TJ 蛋白，分子量约为 63.6 kDa，在结构上与 occludin 相似，也为四次跨膜结构蛋白，N-端和 C-端位于胞浆内，其中 C-端 130 个氨基酸残基与 occludin 序列一致^[25]，推测 tricellulin 也可受磷酸化的调节。Tricellulin 只表达于三个细胞的接头处，而 claudin 家族分子和 occludin 则表达于两个细胞间的侧膜。据此，学者将 TJ 跨膜蛋白划分为 tTJ 和 bTJ，tricellulin 以及 2011 年发现的 angulin 家族分子 (angulin-1~3) 均属于 tTJ 分子^[26]。

与 bTJ 构成的两细胞间通路相比，tTJ 所构成的三细胞间“中心管”的间隙更大，电镜下测量其直径约为 10 nm。因此，学者推测由 tTJ 介导的三细胞间隙可能与一些大分子物质的转运有关，而 bTJ 构成的两细胞间隙则与离子和小分子物质的转运有关。在小鼠乳腺上皮 Eph4 细胞中，敲低 tricellulin 不仅可使旁细胞途径的通透性显著增加，而且 bTJ 的网状结构也受到破坏^[26]；而在敲低 occludin 的细胞中，可观察到 tricellulin 由 tTJ 向 bTJ 重分布，部分代偿 occludin 的缺失。此外，tricellulin 突变体导入小鼠 (*Tric*^{R497X/R497X}) 可发生听力下降，最终导致

表1. Claudin家族分子敲除小鼠的主要病理表现

Table 1. Primary pathological characteristics of claudin-deficient mice

Model	Primary pathological characteristics	References
Claudin-1-deficient mice (<i>Cldn1</i>^{-/-})	Die within 1 day of birth with wrinkled skin; the epidermal barrier is severely affected; tracer with approximately 600 Da molecular weight diffuse across epidermal TJs	[7]
Claudin-2-knockout mice	Normal appearance, activity, growth, and behavior; TJs are poorly developed in the proximal tubules of kidney; the transepithelial reabsorption of Na ⁺ , Cl ⁻ , and water is decreased; loss of cation selectivity	[8]
Claudin-2-knockout mice	Paracellular Na ⁺ permeability is decreased in the small intestine	[9]
Claudin-6-null mice	Viable and fertile with no obvious phenotypic abnormalities	[10]
Claudin-7-knockout mice (<i>Cldn7</i>^{-/-})	Born viable but die within 12 days after birth; severe salt wasting, chronic dehydration, and growth retardation; urine Na ⁺ , Cl ⁻ , and K ⁺ are elevated; dramatic increased aldosterone synthase mRNA level	[11]
Claudin-7-deficient mice	Severe intestinal defects including mucosal ulcerations, epithelial cells sloughing, and inflammation; increased production of cytokines, the nuclear factor κB p65 subunit, cyclooxygenase-2, matrix metalloproteinases-3 and -7, and integrin α2 subunit; intercellular gaps between TJs and cell matrix loosening in the intestine	[12]
Claudin-9-null mice	Hearing loss due to TJ dysfunction in inner ear including abnormal ion concentration in the fluid surrounding the basolateral surface of outer hair cells	[13–15]
Claudin-10-deficient mice	Loss of claudin-10 in the thick ascending limb induces decreased paracellular Na ⁺ permeability and increased relative permeability of Ca ²⁺ and Mg ²⁺ , leading to hypermagnesemia and nephrocalcinosis	[16]
Claudin-11-null mice	TJ strands are absent in central nervous system (CNS) myelin and between Sertoli cells; CNS nerve conduction is slowed, hindlimb weakness is conspicuous, and males are sterile	[17]
Claudin-11-null mice	TJs loss between base cells; normal K ⁺ recycling; elevated hearing thresholds	[18]
Claudin-14-knockout mice	Normal endocochlear potential but are deaf due to rapid degeneration of cochlear outer hair cells, followed by slower degeneration of the inner hair cells, during the first 3 weeks after birth	[14]
Claudin-15-knockout mice (<i>Cldn15</i>^{-/-})	Born and grow normally with an enlarged upper small intestinal phenotype megaintestine; expression of other claudins is unaltered; decreased luminal Na ⁺ and reduced glucose absorption in the small intestine	[9, 19]
Claudin-16-deficient mice	Hypercalciuria and hypomagnesemia, but without nephrocalcinosis; transcriptional upregulation of several Ca ²⁺ and Mg ²⁺ transport systems including Trpv5, Trpm6, and calbindin-D9k, Cnm2 and Atp13a4	[20]
Claudin-16-knockout mice	Reduced cation selectivity in the thick ascending limb, leading to salt and acid-base imbalance; increased urine, and decreased HCO ₃ ⁻ excretion and urine pH	[21, 22]

非综合性听力丧失 (nonsyndromic hearing loss)^[27]。这些研究结果提示, tricellulin 可能在调控大分子物质经旁细胞途径的转运以及维持 TJ 网状结构中发挥重要的作用。但目前关于这类新发现的 tTJ 蛋白的调控机制研究仍十分有限。

1.1.4 JAM家族分子

JAM 家族分子属于免疫球蛋白超家族成员, 包

括 JAM-1~3, 分子量约为 40 kDa。与上述两类 TJ 跨膜蛋白不同, JAM 家族分子是单次跨膜蛋白, N-端位于细胞膜外并具有两个免疫球蛋白样环状结构, C-端位于胞浆内与 TJ 胞浆蛋白结合。JAM 家族分子广泛表达于淋巴组织和脑内皮细胞以及多种上皮细胞中, 参与内皮细胞迁移、维持血管功能以及调控细胞间 TJ 的通透性等^[28]。

1.2 胞浆蛋白

构成 TJ 胞浆蛋白的主要包括 ZO 家族、扣带素 (cingulin)、丝状肌动蛋白结合蛋白 (afadin) 和 partitioning-defective protein-3/6 (PAR-3/6) 等。大部分胞浆蛋白均含有多个 PDZ 结构域, 可与 claudin 家族和 occludin 等 TJ 跨膜蛋白的 C-端相互结合, 并具有信号传递的功能。

1.2.1 ZO 家族分子

ZO 蛋白属于膜相关鸟氨酸激酶 (membrane-associated guanylate kinase, MAGUK) 家族, 包括 3 个异构体即 ZO-1~3, 分子量分别为 220 kDa、160 kDa 和 130 kDa。ZO 家族分子均具有 PDZ 结构域、Src homology 3 (SH3) 结构域和鸟苷酸激酶结构域, 这些结构域参与 ZO 蛋白与 TJ 跨膜蛋白及其与细胞内骨架蛋白的相连, 同时也可与多种调控 TJ 结构和功能的蛋白激酶、磷酸酶、小分子 G 蛋白和核转录因子等相连^[29]。已有研究表明 ZO 家族分子之间可以 ZO-1/-2 和 ZO-2/-3 异构体复合物的形式存在, 结合到细胞骨架蛋白 F-actin 上的肌动蛋白结合域 (actin-binding region) 上^[30]。

目前, ZO 家族中以 ZO-1 的研究最多, 它广泛表达于体内所有的上皮细胞和内皮细胞间的 TJ 复合物中, 是参与 TJ 组装与信号转导的关键分子。单独敲低 ZO-1 或 ZO-2 的小鼠均可发生胚胎致死, 而单独敲低 ZO-3 的小鼠未出现该现象^[31]。在多种上皮细胞中, 敲低 ZO-1 均可引起 TJ 功能的改变, 包括 TER 值降低、旁细胞示踪分子透过率增加等。除了参与维持和调节极性细胞的屏障功能外, ZO-1 还参与细胞的增殖与分化、上皮间质转化引起的肿瘤细胞转移等重要过程^[32]。由于 ZO-1 是构成 TJ 网状结构的“桥梁”, 在多种情况下, 只要 ZO-1 受到破坏, TJ 复合物的结构和功能也随之变化, 故 ZO-1 常被用作判定各种上皮或内皮组织 TJ 屏障功能的标志性分子。

1.2.2 Cingulin

Cingulin 位于胞浆内, 分子量为 140 kDa, 其 N-端与 ZO-1 和细胞骨架蛋白 F-actin 相结合, 发挥着连接细胞骨架与胞浆蛋白的作用。有研究表明, cingulin 基因敲除小鼠的上皮组织具有正常的 TJ 结构, 但 claudin-2、-6 和 -7 的基因表达水平增加, 提示缺失 cingulin 并不影响 TJ 复合物的形成, 但可改变某些 TJ 分子的含量^[33]。此外, cingulin 可在腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine monophosphate acti-

vated protein kinase, AMPK) 作用下发生磷酸化, 进而增强 TJ 和细胞骨架微管系统的结合性^[34]。

2 TJ 结构与功能的检测

2.1 TJ 结构的检测

冰冻蚀刻是一种经典的用于检测 TJ 超微结构的技术, 它可将细胞膜上凸出的 TJ 链 (实为 TJ 跨膜蛋白胞外环) 完整地以浮雕形式呈现。通过在电镜下观察 TJ 链的复杂性并进行计数, 可在一定程度上反映 TJ 的通透性。如有研究报道雄性小鼠下颌腺腺泡细胞平均有 3.9 个 TJ 链, 而颗粒导管细胞有 10.4 个 TJ 链^[35], 这与腺泡细胞对水、离子和小分子物质通透而导管细胞对水几乎不通透的现象是一致的。

此外, 采用戊二醛固定组织后直接在透射电镜下观察 TJ 的超微结构也是目前常用的一项技术。虽然这时在电镜下观察到的是平面结构, 不像冰冻蚀刻时是相对立体的结构, 但由于可以观察整个腺泡腔或导管腔的全貌, 所以对于 TJ 位置的测量具有一定的优势。测定 TJ 的深度 (tight junction depth) 和宽度 (tight junction width) 常用于反映 TJ 的功能。TJ 的深度即组成 TJ 复合物的长度, 深度越大, TJ 的屏障功能越强。例如, 在电镜下可见小鼠下颌腺腺泡细胞的 TJ 深度约为 0.1 μm , 而颗粒导管细胞的 TJ 深度则为 0.5 μm ^[35]。TJ 的宽度是指相邻细胞的 TJ 之间的距离, 功能学研究结果显示 TJ 宽度和旁细胞屏障功能具有一定的相关性。但也有一些研究认为 TJ 宽度可受黏附连接的影响, 因此并不反映 TJ 的功能^[36]。

此外, 还可以采用免疫组化和免疫荧光等形态学染色技术在光镜和激光共聚焦显微镜下观察各个 TJ 蛋白分子的亚细胞分布。正常状态下, TJ 蛋白主要分布在上皮或内皮细胞间隙的最顶端, 与黏附连接蛋白 (如 E-cadherin 和 β -catenin) 进行共染时可见 TJ 位于黏附连接的上方。采用图像分析软件分别对各种 TJ 蛋白在细胞顶侧膜、基底膜以及胞浆中特异性染色的强度进行测定, 可以反映该 TJ 蛋白分子是否发生了胞内重分布或表达水平的改变。在离体细胞水平, 还可通过统计 TJ 连续性受到破坏的细胞数目比例, 代表该分子重分布的发生率。近年来, 激光共聚焦技术的发展也为研究 TJ 的结构提供了新手段, 如采用实时监测荧光标记的 TJ 蛋白在不同刺激下的动态改变, 采用荧光漂白恢复

技术 (fluorescence photobleaching recover, FPR) 计算 TJ 分子在活细胞表面或内部运动的迁移速率等^[37]。此外, 随着近年来研究的不断深入, 人们认识到应将 TJ 作为一个整体来研究的重要性, 荧光共振能量转移 (fluorescence resonance energy transfer, FRET) 技术正是通过检测两种荧光分子之间随空间距离的远近发生能量共振的程度从而反映两个分子相互作用的强弱, 现已应用在评价 TJ 蛋白之间以及 TJ 蛋白和细胞骨架蛋白之间的相互作用情况^[38]。

2.1 TJ功能的检测

TJ 的功能状态可以通过检测 TER 值和旁细胞示踪分子通透性实验来评价。使用跨上皮细胞电阻仪测定的 TER 值主要用于评价旁细胞电导 (paracellular conductance) 快速和连续的变化, TER 值越低, 代表旁细胞途径的通透性越大, 反之亦然。使用 Ussing 灌流室测量跨上皮离子弥散电位 (transepithelial ionic diffusion potentials) 可以评价 TJ 对离子的通透性。此外, 利用某些无毒、水溶性、标记或非标记、不易在体内降解和代谢的胞旁转运小分子物质作为探针, 如荧光素黄 (lucifer yellow)、FITC 标记的右旋糖酐 (FITC-dextran) 和聚乙二醇 (polyethylene glycols) 等, 也可检测单层上皮细胞间 TJ 的通透性。通常 TER 值和旁细胞途径通透性实验的结果是呈反向相关的关系, 即 TER 值越低, 示踪分子的透过率也越高。但有时 TER 值和通透性实验的结果可不一致, 这主要是两种实验方法的原理不同所致。TER 值的产生依赖于各种离子通过旁细胞途径时产生的电阻值, 可能与 tTJ 跨膜蛋白中的 claudin 家族分子形成的离子孔道有关, 因此测定的主要是直径小于 4 Å 的小分子物质, 如钠离子 (0.95 Å)、氯离子 (1.81 Å) 等; 而旁细胞通透性实验所使用的示踪分子都是直径大于 4 Å 的大分子物质, 推测其可能是由 tTJ 蛋白的开放或胞浆蛋白的破坏所引起的 TJ 较大程度的开放而产生的^[32]。鉴于 TER 值和旁细胞通透性实验所代表的透过物质的种类不同, 在评价 TJ 功能时应结合两种方法的检测结果。

3 TJ的调控机制

TJ 构成的旁细胞屏障是一个动态的可被调控的屏障。许多内源性或外源性刺激可通过激活某些信号转导通路作用于 TJ, 从而改变生理性屏障功能以适应机体需要或诱发病理性损害。这些生理和病理

性因素包括饮食状态、生长因子、细胞因子、激素、肥大细胞产物、细菌或病毒及其代谢产物、药物等, 都可以影响 TJ 的结构和功能, 使旁细胞途径通透性发生改变。

调控 TJ 蛋白的机制有多种, 包括磷酸化 / 去磷酸化 / 泛素化等蛋白修饰、内化 / 内吞 (internalization/endocytosis)、插入新的 TJ 蛋白或缺失某一连接蛋白、改变 TJ 各个蛋白之间的相互作用等。TJ 蛋白的调控涉及体内多种信号转导机制, 目前已发现的信号转导分子主要有磷脂酶 C、Ca²⁺、一氧化氮 (NO)、酪氨酸蛋白激酶 (src、c-yes)、丝 / 苏氨酸蛋白激酶 (PKC、PKA、ERK1/2)、磷酸酶 (protein phosphatase 2A)、小分子 GTP 酶 (Rho family、Rabs) 和肌球蛋白轻链激酶 (myosin light chain kinase, MLCK) 等^[1, 23]。TJ 相关的信号调控机制可以归纳为: (1) 改变 TJ 蛋白的含量与分布: TJ 黏连蛋白 ZO-1 的表达减少与血脑屏障的损伤程度具有明显相关性, 被认为是血脑屏障破坏的标志^[39]。糖尿病大鼠肾小球上皮细胞 ZO-1 的表达减少, 且 ZO-1 由细胞膜到细胞浆的重新分布可能参与糖尿病肾病的发生和微蛋白尿的形成^[40]; (2) 引起细胞骨架蛋白重排: TJ 蛋白与肌动蛋白组成的细胞骨架 F-actin 相连, 通过空间结构和信号传递维持旁细胞途径的功能。某些肠道致病菌通过激活 PKC 信号通路或上调细胞内一氧化氮合酶的表达, 引起细胞骨架 F-actin 重排, 改变旁细胞途径的通透性, 最终引起肠道炎症性疾病^[41]; (3) 改变 TJ 蛋白的磷酸化: 磷酸化 / 去磷酸化调节在 TJ 的分布和功能调控中起关键作用。非磷酸化 claudin-1 沿肠黏膜细胞的基底侧分布, 而磷酸化 claudin-1 定位在 TJ 上。给予外源性 TNF- α 能减少磷酸化 claudin-1 的表达, 增加肠黏膜屏障通透性。进一步的研究揭示了 TJ 蛋白特异的磷酸化位点, 如 claudin-1 第 206 位苏氨酸、claudin-4 第 195 位丝氨酸和 claudin-16 第 217 位丝氨酸等^[1], 当这些位点发生磷酸化时, TJ 的通透性可受到影响。

4 TJ在上皮细胞中的作用

4.1 唾液腺上皮

唾液对于维持摄食、抑制或杀灭口腔细菌及病毒、保护口腔软组织及牙齿的功能、维持口腔健康起着关键性作用。某些局部或全身性疾病, 如慢性下颌腺炎和舍格伦综合征, 可引起腺体分泌功能低下, 唾液分泌量降低, 严重者不仅有明显的口腔

黏膜干燥, 尚可伴发猖獗龋、念珠菌感染、吞咽及语言功能障碍等, 患者痛苦不堪, 严重影响生活质量。因此, 全面揭示唾液腺的分泌机制可为防治唾液腺分泌功能异常提供新的思路。

TJ 为维持唾液腺上皮的极性、建立正常的跨上皮细胞离子梯度提供了重要保障, 是水、离子和小分子物质经过旁细胞途径转运的结构基础和限制因素。1990 年有学者发现, 在离体灌流的家兔下颌腺上水转运主要是经旁细胞途径进行的^[42]。随后, Segawa 和 Hashimoto 等分别在新鲜分离的大鼠下颌腺组织块以及离体灌流的腺体中发现, 促分泌剂可明显增加旁细胞途径示踪分子的透过率^[43,44]。这些结果提示, 唾液腺上皮的旁细胞途径在水和小分子物质的转运中可能起主导作用。

本研究组在细胞水平和组织水平对唾液腺 TJ 的调控进行了研究, 发现磷酸化修饰介导的 TJ 蛋白含量和 / 或分布改变是影响旁细胞途径通透性的重要机制。在大鼠下颌腺细胞系 SMG-C6 中, 激活毒蕈碱乙酰胆碱受体 (muscarinic acetylcholine receptor, mAChR) 可经 ERK1/2 磷酸化 claudin-4 第 195 位丝氨酸残基, 并经 β -arrestin-2/clathrin/ubiquitin

信号通路选择性引起 claudin-4 内化及降解, 从而增加旁细胞途径的通透性 (图 2A)^[45]。本研究组前期研究还发现在下颌腺存在瞬时感受器电位香草醛受体亚型 1 (transient receptor potential vanilloid subtype 1, TRPV1, 又称辣椒素受体) 的表达, 在功能上证实其是调节唾液分泌的新途径^[46]。激活 TRPV1 一方面可经 ERK1/2/MLC2/F-actin 信号通路选择性引起跨膜蛋白 occludin 发生重分布, 另一方面也可经 RhoA 信号分子引起胞浆蛋白 ZO-1/-2 重排, 增加旁细胞途径的通透性 (图 2B)^[47,48]。此外, TJ 蛋白结构的改变也参与了脂联素受体和 AMPK 调控的促分泌作用^[49,50]。这些研究提示, TJ 介导的旁细胞途径是生理状态下唾液腺分泌唾液的重要途径。

在一些唾液腺疾病模型中, TJ 可出现表达、分布或功能的改变, 是唾液腺分泌功能受损的重要原因。例如, Ewert 等在舍格伦综合征患者的唇腺标本中观察到 TJ 的超微结构被破坏, occludin 和 ZO-1 的表达和分布异常^[51]。本研究组在舍格伦综合征动物模型——非肥胖性糖尿病 (non-obese diabetic) 小鼠中发现, 下颌腺浸润灶产生的炎症因子 IL-17 可引起多种 TJ 蛋白的表达、分布和结构异

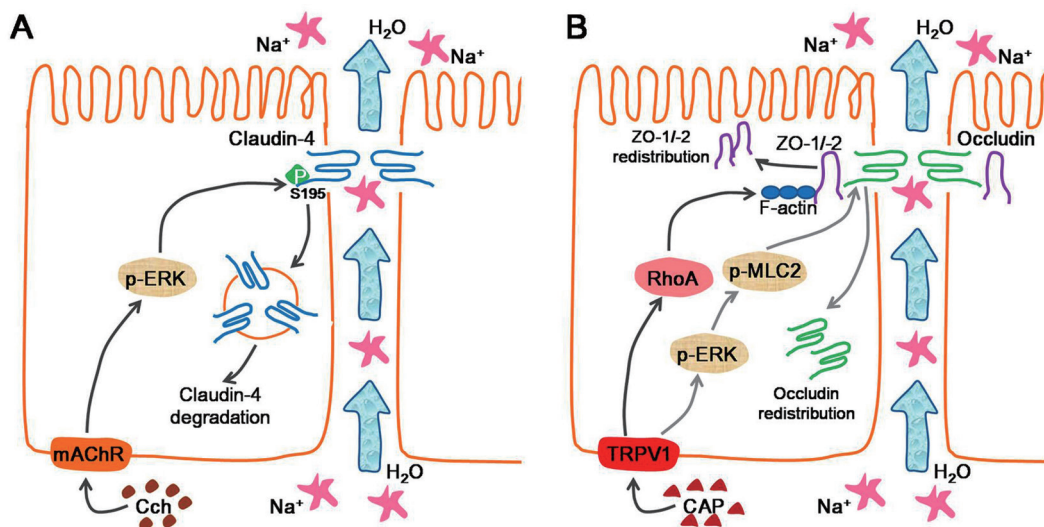


图 2. TJ 参与下颌腺生理性分泌的分子机制示意图

Fig. 2. The signaling pathways involved in the tight junction-modulated salivation under physiological conditions. A: Activation of muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) by carbachol (Cch) induced phosphorylation of claudin-4 in an ERK1/2-dependent pathway, and downregulation of claudin-4 through β -arrestin-2/clathrin/ubiquitin signaling pathway, resulting in increased paracellular permeability^[45]. B: Activation of transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1) by capsaicin (CAP) induces the redistribution of occludin and ZO-1/-2 through ERK1/2/MLC2 and RhoA-dependent signaling pathway, respectively, and herein promotes water and ion transport via paracellular route^[47, 48]. ERK, extracellular signal-regulated kinase 1/2; MLC2, myosin light chain 2; F-actin, filamentous actin.

常(图3A)^[52]。在培养的SMG-C6细胞，TNF- α 可经ERK1/2增加转录因子slug的表达，而slug可进一步与claudin-3启动子区结合并抑制claudin-3基因的转录，最终引起旁细胞屏障功能的损伤(图3B)^[53]。在家兔下颌腺移植术后早期低分泌的腺体中，TJ分子claudin-3、-11和ZO-1的表达降低和分布异常，激活TRPV1可通过ERK1/2信号通路选择性上调TJ蛋白的表达、恢复其分布进而改善低分泌移植腺

体的功能(图3C和D)^[54]。这些研究表明，TJ表达、分布和功能异常是导致病理状态下唾液腺分泌功能改变的一个重要因素，这为以TJ为靶点调控唾液腺的分泌提供了实验依据。

4.2 呼吸道上皮

目前，TJ在呼吸道上皮中的研究以肺上皮为主。肺泡上皮细胞之间的TJ可通过对离子、分子和溶液的选择性透过以及对不同极性物质的选择性滤过

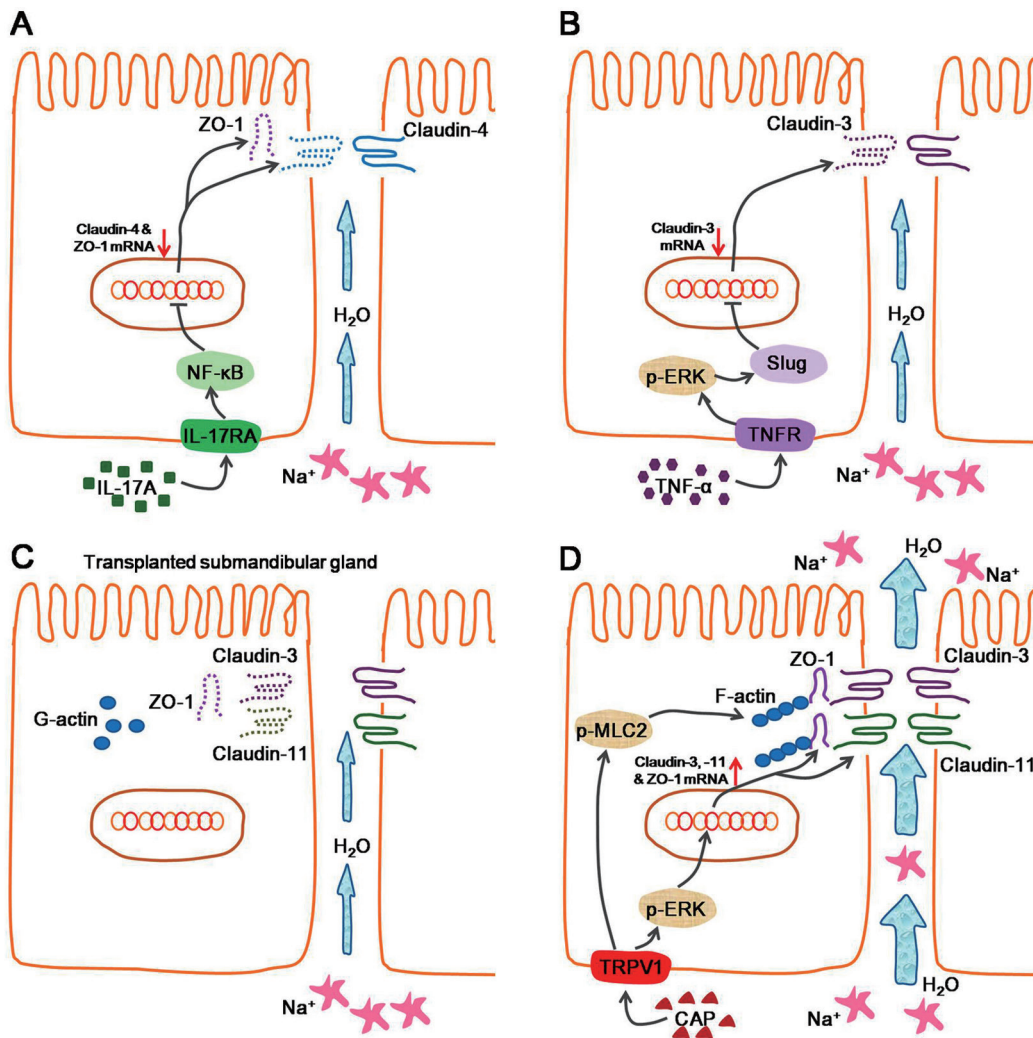


图 3. TJ参与下颌腺病理性分泌的分子机制示意图

Fig. 3. The signaling pathways involved in the tight junction-modulated salivation under pathological conditions. *A*: In the submandibular gland of non-obese (NOD) mice, the inflammatory cytokine interleukin-17A (IL-17A) downregulates the expression of claudin-4 and ZO-1 in a NF- κ B signaling pathway^[52]. *B*: Treatment with tumor necrosis factor- α (TNF- α) selectively decreases the expression of claudin-3 through ERK1/2/slug signaling axis^[53]. *C*: In the early stage of the transplanted submandibular gland without treatment, saliva secretion is reduced and the expression of claudin-3, -11, and ZO-1 are decreased^[54]. *D*: Activation of transient receptor potential vanilloid subtype (TRPV1) by capsaicin (CAP) upregulates the expression of claudin-3, -11, and ZO-1 through ERK1/2-dependent pathway, while modulates the distribution of claudin-3, -11, and ZO-1 through MLC2/F-actin signaling pathway in the transplanted submandibular gland^[54]. ERK, extracellular signal-regulated kinase 1/2; MLC2, myosin light chain 2; G-actin, globular actin; F-actin, filamentous actin.

进而阻止大量的液体进入肺泡腔，并将过多的液体运出肺泡腔。近年来研究显示，多种肺疾病，包括肺部感染、肺水肿、肺纤维化等都与 TJ 蛋白的异常表达和 TJ 复合物的结构破坏密切相关。例如，肺部感染时，肺上皮细胞间 TJ 的屏障功能受损，炎症因子及炎症细胞可以自由穿越上皮细胞和内皮细胞，进一步损伤 TJ 的完整性、增加细胞间的渗透性以及降低细胞的极性^[55]。肺水肿也已被证实与肺泡上皮通透性增加以及肺泡内液体清除率降低密切相关。Cohen 等发现肺水肿大鼠肺泡上皮细胞的 TJ 屏障功能显著降低，claudin-4、-18 和 occludin 的含量降低^[56]。Wray 等证实，在急性肺损伤早期，claudin-4 表达增加可抑制肺水肿的形成，提示调节 TJ 蛋白 claudin 的表达水平可能是治疗急性肺损伤和肺水肿的潜在方向^[57]。

4.3 肠道上皮

目前，关于肠道上皮 TJ 功能调控的研究集中在炎症因子诱发的 TJ 屏障功能损伤的发生机制，其他如氧化剂等也可通过调控 TJ 的表达、分布和结构进而影响肠道上皮 TJ 的完整性。研究表明，炎症性肠病 (inflammatory bowel disease) 患者的肠黏膜中 IFN- γ 的表达上调，增加的 IFN- γ 可引起肠道上皮细胞 TJ 蛋白 occludin、claudin-1 和 JAM-1 发生由胞膜向胞浆的重分布，并引起细胞骨架蛋白重排，造成旁细胞途径的通透性增加，这一效应是通过 Rho 激酶依赖的信号转导通路而实现的^[58]。此外，还有学者在炎症性肠病患者的肠黏膜、血清以及粪便中均检测到 TNF- α 的含量增加。TNF- α 可能通过多种机制影响肠道上皮的屏障功能，一方面 TNF- α 可直接诱导肠道细胞发生凋亡，另一方面可经活化 MLC 信号分子引起 TER 值降低和旁细胞途径通透性增加，TNF- α 还可经 PI3K/Akt 信号通路下调肠道 claudin-2 的表达，使得 claudin-2 构成的阳离子通道受到破坏，从而降低了肠上皮细胞的屏障功能^[59,60]，这说明 TNF- α 也是炎症性肠病时引起肠黏膜屏障功能损伤的重要致病因素。除了上述提及的炎症性肠病外，肠道上皮 TJ 结构、表达和功能的异常还被证实参与了乳糜泻 (celiac disease) 和肠道易激综合征 (irritable bowel syndrome) 的发生和发展^[61]。

在认识到 TJ 的屏障功能受损可引起一系列肠道疾病的基础上，现有学者开始探索如何增强肠道上皮 TJ 的屏障功能以减轻和缓解肠道疾病所带来

的不良反应。过氧化氢可引起肠上皮 Caco-2 细胞中 occludin 和 ZO-1 发生酪氨酸磷酸化、从胞膜向胞浆的内化以及两者与细胞骨架蛋白的结合性减弱；而应用表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 可经 ERK1/2 信号通路抑制过氧化氢的上述效应，从而保证 TJ 的屏障功能不被破坏^[62]。EGF 还可经 ERK1/2 信号通路抑制由乙醛引起的 TER 值降低、occludin 和 ZO-1 重分布的效应，从而保护 Caco-2 细胞上皮屏障功能免受乙醛的破坏^[63]。

值得注意的是，肠道上皮的屏障功能并非越紧密就越好，一些毒性较小的亲水性药物，由于无法经跨细胞途径被肠道所吸收而影响其应用。因此，如能寻找一种有效、并可逆性调节 TJ 的开放和关闭的促渗透剂将有利于药物更好地被机体吸收和利用。由霍乱弧菌产生的带状黏附毒素 (zonula occludens toxin, ZOT) 即是一种目前研究较多的具有应用前景的促渗透剂。

4.4 肾脏上皮

每个肾单位可以表达多种 claudin 家族分子，而 claudin 的类型也决定了该段肾单位旁细胞途径的通透性。肾小球上皮细胞主要表达 claudin-1、occludin 和 ZO-1。在链脲佐霉素 (streptozotocin, STZ) 诱导的糖尿病小鼠或肥胖性糖尿病小鼠 (*db/db*) 肾小球足细胞中，claudin-1 的基因表达水平显著增加，并伴有蛋白尿^[64]。在新月性肾小球肾炎动脉模型中，claudin-1 的含量降低，肾小球上皮细胞的通透性则显著增加，这提示 claudin-1 在构成肾小球 TJ 屏障中起着重要作用^[65]。Claudin-2 是构成肾脏近曲小管的主要 TJ 分子，研究表明在 claudin-2 基因敲除小鼠的近曲小管处，Na⁺、Cl⁻ 以及水的重吸收均减少，因而出现多尿症，这可能与 claudin-2 第 65 位天冬氨酸残基所带的负电荷而构成的旁细胞阳离子通道有关^[8]。髓袢升支粗段主要表达的 claudin 家族分子种类包括 claudin-14、-16 和 -19，目前这三种分子均被证实参与了遗传性钙镁失调类疾病。Simon 等首先发现 claudin-16 基因突变可引起一种罕见的常染色体隐性遗传病——家族性高尿钙、低血镁性肾钙质沉着病 (familial hypercalciuric hypomagnesemia with nephrocalcinosis, FHHNC)^[66]；而 Konrad 等随后在 claudin-16 未发生突变的该病患者中发现了 claudin-19 基因出现异常^[67]。动物实验证实，敲除 claudin-16 或 -19 均可引起 FHHNC。随后，有报道 claudin-14 是发生高钙性肾结石的一个重要

危险因素，这可能与 claudin-14 能通过与 claudin-16 相互作用进而抑制 claudin-16 的功能有关，因此在髓袢升支粗段特异性过表达 claudin-14 的小鼠可产生与 claudin-16 敲除小鼠相似的症状^[68]。集合管表达的主要 TJ 分子包括 claudin-4 和 -8，两者均可构成 Cl⁻ 通道从而调节 Cl⁻ 的转运。敲低 claudin-4 和 -8 可显著降低旁细胞途径对 Cl⁻ 的通透，敲除 claudin-4 的小鼠可出现明显的肾性 Cl⁻ 的丢失。进一步研究发现，claudin-4 和 -8 可以相互作用，敲低其中一个分子后会引发另一个分子从 TJ 复合物中离开^[69]。

5 总结和展望

上皮细胞间的 TJ 是构成旁细胞途径物质转运的结构和功能基础，随着各类 TJ 蛋白的陆续发现，尤其是对调控 TJ 结构和功能的机制的揭示，极大地拓展了研究 TJ 的视野。然而，由于 TJ 蛋白的种类繁多以及 TJ 构成的复杂性，目前将 TJ 作为一个整体来研究还存在一定的难度。此外，TJ 蛋白与各类疾病的发生、发展和转归之间的复杂关系也需要更为细致的观察、分析和验证。继续深入开展 TJ 领域的研究将为揭示旁细胞物质转运的机制提供依据，也为认识多种疾病的发病原理及人工调控旁细胞途径和药物转运提供新的研究方向。

参考文献

- Gonzalez-Mariscal L, Tapia R, Chamorro D. Crosstalk of tight junction components with signaling pathways. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1778(3): 729–756.
- 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. *J Cell Biol* 1998; 141(7): 1539–1550.
- Mrsny RJ, Brown GT, Gerner-Smidt K, Buret AG, Meddings JB, Quan C, Koval M, Nusrat A. A key claudin extracellular loop domain is critical for epithelial barrier integrity. *Am J Pathol* 2008; 172(4): 905–915.
- Hou J, Rajagopal M, Yu AS. Claudins and the kidney. *Annu Rev Physiol* 2013; 75: 479–501.
- Bronstein JM, Chen K, Tiwari-Woodruff S, Kornblum HI. Developmental expression of OSP/claudin-11. *J Neurosci Res* 2000; 60(3): 284–290.
- Angelow S, Ahlstrom R, Yu AS. Biology of claudins. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295(4): F867–F876.
- Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 2002; 156(6): 1099–1111.
- Muto S, Hata M, Taniguchi J, Tsuruoka S, Moriwaki K, Saitou M, Furuse K, Sasaki H, Fujimura A, Imai M, Kusano E, Tsukita S, Furuse M. Claudin-2-deficient mice are defective in the leaky and cation-selective paracellular permeability properties of renal proximal tubules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(17): 8011–8016.
- Tamura A, Hayashi H, Imasato M, Yamazaki Y, Hagiwara A, Wada M, Noda T, Watanabe M, Suzuki Y, Tsukita S. Loss of claudin-15, but not claudin-2, causes Na⁺ deficiency and glucose malabsorption in mouse small intestine. *Gastroenterology* 2011; 140(3): 913–923.
- Anderson WJ, Zhou Q, Alcalde V, Kaneko OF, Blank LJ, Sherwood RI, Guseh JS, Rajagopal J, Melton DA. Genetic targeting of the endoderm with claudin-6CreER. *Dev Dyn* 2008; 237(2): 504–512.
- Tatum R, Zhang Y, Salleng K, Lu Z, Lin JJ, Lu Q, Jeanson BG, Ding L, Chen YH. Renal salt wasting and chronic dehydration in claudin-7-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 298(1): F24–F34.
- Ding L, Lu Z, Foreman O, Tatum R, Lu Q, Renegar R, Cao J, Chen YH. Inflammation and disruption of the mucosal architecture in claudin-7-deficient mice. *Gastroenterology* 2012; 142(2): 305–315.
- Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B, Belyantseva I, Ben-Yosef T, Liburd NA, Morell RJ, Kachar B, Wu DK, Griffith AJ, Friedman TB. Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* 2001; 104(1): 165–172.
- Ben-Yosef T, Belyantseva IA, Saunders TL, Hughes ED, Kawamoto K, Van Itallie CM, Beyer LA, Halsey K, Gardner DJ, Wilcox ER, Rasmussen J, Anderson JM, Dolan DF, Forge A, Raphael Y, Camper SA, Friedman TB. Claudin 14 knockout mice, a model for autosomal recessive deafness DFNB29, are deaf due to cochlear hair cell degeneration. *Hum Mol Genet* 2003; 12(16): 2049–2061.
- Nakano Y, Kim SH, Kim HM, Sanneman JD, Zhang Y, Smith RJ, Marcus DC, Wangemann P, Nessler RA, Banfi B. A claudin-9-based ion permeability barrier is essential for hearing. *PLoS Genet* 2009; 5(8): e1000610.
- Breiderhoff T, Himmerkus N, Stuver M, Mutig K, Will C, Meij IC, Bachmann S, Bleich M, Willnow TE, Muller D. Deletion of claudin-10 (Cldn10) in the thick ascending limb impairs paracellular sodium permeability and leads to hypermagnesemia and nephrocalcinosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109(35): 14241–14246.
- Gow A, Southwood CM, Li JS, Pariali M, Riordan GP, Brodie

- SE, Danias J, Bronstein JM, Kachar B, Lazzarini RA. CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in *Osp/cludin-11* null mice. *Cell* 1999; 99(6): 649–659.
- 18 Gow A, Davies C, Southwood CM, Frolenkov G, Chrus-towski M, Ng L, Yamauchi D, Marcus DC, Kachar B. Deaf-ness in *Claudin 11*-null mice reveals the critical contribution of basal cell tight junctions to stria vascularis function. *J Neurosci* 2004; 24(32): 7051–7062.
- 19 Tamura A, Kitano Y, Hata M, Katsuno T, Moriwaki K, Sasaki H, Hayashi H, Suzuki Y, Noda T, Furuse M, Tsukita S. Megaintestine in *cludin-15*-deficient mice. *Gastroenterology* 2008; 134(2): 523–534.
- 20 Will C, Breiderhoff T, Thumfart J, Stuiver M, Kopplin K, Sommer K, Gunzel D, Querfeld U, Meij IC, Shan Q, Bleich M, Willnow TE, Muller D. Targeted deletion of murine *Cldn16* identifies extra- and intrarenal compensatory mecha-nisms of Ca^{2+} and Mg^{2+} wasting. *Am J Physiol Renal Physiol* 2010; 298(5): F1152–F1161.
- 21 Himmerkus N, Shan Q, Goerke B, Hou J, Goodenough DA, Bleich M. Salt and acid-base metabolism in *cludin-16* knockdown mice: impact for the pathophysiology of FHHNC patients. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295(6): F1641–F1647.
- 22 Shan Q, Himmerkus N, Hou J, Goodenough DA, Bleich M. Insights into driving forces and paracellular permeability from *cludin-16* knockdown mouse. *Ann N Y Acad Sci* 2009; 1165: 148–151.
- 23 Dorfel MJ, Huber O. Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 807356.
- 24 Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S. Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 2000; 11(12): 4131–4142.
- 25 Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, Sasaki H, Tsukita S. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 2005; 171(6): 939–945.
- 26 Iwamoto N, Higashi T, Furuse M. Localization of angulin-1/LSR and tricellulin at tricellular contacts of brain and retinal endothelial cells *in vivo*. *Cell Struct Funct* 2014; 39(1): 1–8.
- 27 Kamitani T, Sakaguchi H, Tamura A, Miyashita T, Yamazaki Y, Tokumasu R, Inamoto R, Matsubara A, Mori N, Hisa Y, Tsukita S. Deletion of tricellulin causes progressive hearing loss associated with degeneration of cochlear hair cells. *Sci Rep* 2015; 5: 18402.
- 28 Martin-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 mole-cule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 1998; 142(1): 117–127.
- 29 Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2(4): 285–293.
- 30 Utepbergenov DI, Fanning AS, Anderson JM. Dimerization of the scaffolding protein ZO-1 through the second PDZ domain. *J Biol Chem* 2006; 281(34): 24671–24677.
- 31 Xu J, Kausalya PJ, Phua DC, Ali SM, Hossain Z, Hunziker W. Early embryonic lethality of mice lacking ZO-2, but not ZO-3, reveals critical and nonredundant roles for individual zonula occludens proteins in mammalian development. *Mol Cell Biol* 2008; 28(5): 1669–1678.
- 32 Van Itallie CM, Fanning AS, Bridges A, Anderson JM. ZO-1 stabilizes the tight junction solute barrier through coupling to the perijunctional cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 2009; 20(17): 3930–3940.
- 33 Guillemot L, Schneider Y, Brun P, Castagliuolo I, Pizzuti D, Martines D, Jond L, Bongiovanni M, Citi S. Cingulin is dispensable for epithelial barrier function and tight junction structure, and plays a role in the control of *cludin-2* expres-sion and response to duodenal mucosa injury. *J Cell Sci* 2012; 125(Pt 21): 5005–5014.
- 34 Yano T, Matsui T, Tamura A, Uji M, Tsukita S. The associa-tion of microtubules with tight junctions is promoted by cingulin phosphorylation by AMPK. *J Cell Biol* 2013; 203(4): 605–614.
- 35 Kikuchi K, Kawedia J, Menon AG, Hand AR. The structure of tight junctions in mouse submandibular gland. *Anat Rec (Hoboken)* 2010; 293(1): 141–149.
- 36 Capaldo CT, Macara IG. Depletion of E-cadherin disrupts establishment but not maintenance of cell junctions in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Mol Biol Cell* 2007; 18(1): 189–200.
- 37 Capaldo CT, Farkas AE, Hilgarth RS, Krug SM, Wolf MF, Benedik JK, Fromm M, Koval M, Parkos C, Nusrat A. Proinflammatory cytokine-induced tight junction remodeling through dynamic self-assembly of claudins. *Mol Biol Cell* 2014; 25(18): 2710–2719.
- 38 Milatz S, Piontek J, Schulzke JD, Blasig IE, Fromm M, Gunzel D. Probing the cis-arrangement of prototype tight junction proteins *cludin-1* and *cludin-3*. *Biochem J* 2015; 468(3): 449–458.
- 39 Kniesel U, Wolburg H. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol* 2000; 20(1): 57–76.
- 40 Rincon-Choles H, Vasylyeva TL, Pergola PE, Bhandari B, Bhandari K, Zhang JH, Wang W, Gorin Y, Barnes JL, Abboud HE. ZO-1 expression and phosphorylation in dia-betic nephropathy. *Diabetes* 2006; 55(4): 894–900.

- 41 Zhou Y, Qin H, Zhang M, Shen T, Chen H, Ma Y, Chu Z, Zhang P, Liu Z. Lactobacillus plantarum inhibits intestinal epithelial barrier dysfunction induced by unconjugated bilirubin. *Br J Nutr* 2010; 104(3): 390–401.
- 42 Steward MC, Seo Y, Rawlings JM, Case RM. Water permeability of acinar cell membranes in the isolated perfused rabbit mandibular salivary gland. *J Physiol* 1990; 431: 571–583.
- 43 Segawa A. Tight junctional permeability in living cells: dynamic changes directly visualized by confocal laser microscopy. *J Electron Microsc (Tokyo)* 1994; 43(5): 290–298.
- 44 Hashimoto S, Murakami M. Morphological evidence of paracellular transport in perfused rat submandibular glands. *J Med Invest* 2009; 56 Suppl: 395–397.
- 45 Cong X, Zhang Y, Li J, Mei M, Ding C, Xiang RL, Zhang LW, Wang Y, Wu LL, Yu GY. Claudin-4 is required for modulation of paracellular permeability by muscarinic acetylcholine receptor in epithelial cells. *J Cell Sci* 2015; 128(12): 2271–2286.
- 46 Zhang Y, Xiang B, Li YM, Wang Y, Wang X, Wang YN, Wu LL, Yu GY. Expression and characteristics of vanilloid receptor 1 in the rabbit submandibular gland. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 345(1): 467–473.
- 47 Cong X, Zhang Y, Yang NY, Li J, Ding C, Ding QW, Su YC, Mei M, Guo XH, Wu LL, Yu GY. Occludin is required for TRPV1-modulated paracellular permeability in the submandibular gland. *J Cell Sci* 2013; 126(Pt 5): 1109–1121.
- 48 Li J, Cong X, Zhang Y, Xiang RL, Mei M, Yang NY, Su YC, Choi S, Park K, Zhang LW, Wu LL, Yu GY. ZO-1 and -2 are required for TRPV1-modulated paracellular permeability. *J Dent Res* 2015; 94(12): 1748–1756.
- 49 Xiang RL, Mei M, Cong X, Li J, Zhang Y, Ding C, Wu LL, Yu GY. Claudin-4 is required for AMPK-modulated paracellular permeability in submandibular gland cells. *J Mol Cell Biol* 2014; 6(6): 486–497.
- 50 Ding C, Li L, Su YC, Xiang RL, Cong X, Yu HK, Li SL, Wu LL, Yu GY. Adiponectin increases secretion of rat submandibular gland via adiponectin receptors-mediated AMPK signaling. *PLoS One* 2013; 8(5): e63878.
- 51 Ewert P, Aguilera S, Alliende C, Kwon YJ, Albornoz A, Molina C, Urzúa U, Quest AF, Olea N, Pérez P, Castro I, Barrera MJ, Romo R, Hermoso M, Leyton C, González MJ. Disruption of tight junction structure in salivary glands from Sjögren's syndrome patients is linked to proinflammatory cytokine exposure. *Arthritis Rheum* 2010; 62(5): 1280–1289.
- 52 Zhang LW, Cong X, Zhang Y, Wei T, Su YC, Serrao AC, Brito AR Jr, Yu GY, Hua H, Wu LL. Interleukin-17 impairs salivary tight junction integrity in Sjögren's syndrome. *J Dent Res* 2016; 95(7): 784–792.
- 53 Mei M, Xiang RL, Cong X, Zhang Y, Li J, Yi X, Park K, Han JY, Wu LL, Yu GY. Claudin-3 is required for modulation of paracellular permeability by TNF- α through ERK1/2/slug signaling axis in submandibular gland. *Cell Signal* 2015; 27(10): 1915–1927.
- 54 Cong X, Zhang Y, Shi L, Yang NY, Ding C, Li J, Ding QW, Su YC, Xiang RL, Wu LL, Yu GY. Activation of transient receptor potential vanilloid subtype 1 increases expression and permeability of tight junction in normal and hyposecretory submandibular gland. *Lab Invest* 2012; 92(5): 753–768.
- 55 Donelli G, Fiorentini C, Matarrese P, Falzano L, Cardines R, Mastrantonio P, Payne DW, Titball RW. Evidence for cytoskeletal changes secondary to plasma membrane functional alterations in the *in vitro* cell response to *Clostridium perfringens* epsilon-toxin. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2003; 26(3): 145–156.
- 56 Cohen TS, Gray Lawrence G, Margulies SS. Cultured alveolar epithelial cells from septic rats mimic *in vivo* septic lung. *PLoS One* 2010; 5(6): e11322.
- 57 Wray C, Mao Y, Pan J, Chandrasena A, Piasta F, Frank JA. Claudin-4 augments alveolar epithelial barrier function and is induced in acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 297(2): L219–L227.
- 58 Bruewer M, Utech M, Ivanov AI, Hopkins AM, Parkos CA, Nusrat A. Interferon- γ induces internalization of epithelial tight junction proteins via a macropinocytosis-like process. *FASEB J* 2005; 19(8): 923–933.
- 59 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. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288(3): G422–G430.
- 60 Mankertz J, Amasheh M, Krug SM, Fromm A, Amasheh S, Hillenbrand B, Tavalali S, Fromm M, Schulzke JD. TNF α up-regulates claudin-2 expression in epithelial HT-29/B6 cells via phosphatidylinositol-3-kinase signaling. *Cell Tissue Res* 2009; 336(1): 67–77.
- 61 Lee SH. Intestinal permeability regulation by tight junction: implication on inflammatory bowel diseases. *Intest Res* 2015; 13(1): 11–18.
- 62 Basuroy S, Seth A, Elias B, Naren AP, Rao R. MAPK interacts with occludin and mediates EGF-induced prevention of tight junction disruption by hydrogen peroxide. *Biochem J* 2006; 393(Pt 1): 69–77.
- 63 Samak G, Aggarwal S, Rao RK. ERK is involved in EGF-mediated protection of tight junctions, but not adherens junctions, in acetaldehyde-treated Caco-2 cell monolayers. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2011; 301(1): G50–

- G59.
- 64 Hasegawa K, Wakino S, Simic P, Sakamaki Y, Minakuchi H, Fujimura K, Hosoya K, Komatsu M, Kaneko Y, Kanda T, Kubota E, Tokuyama H, Hayashi K, Guarente L, Itoh H. Renal tubular Sirt1 attenuates diabetic albuminuria by epigenetically suppressing Claudin-1 overexpression in podocytes. *Nat Med* 2013; 19(11): 1496–1504.
- 65 Ohse T, Chang AM, Pippin JW, Jarad G, Hudkins KL, Alpers CE, Miner JH, Shankland SJ. A new function for parietal epithelial cells: a second glomerular barrier. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 297(6): F1566–F1574.
- 66 Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP. Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. *Science* 1999; 285(5424): 103–106.
- 67 Konrad M, Schaller A, Seelow D, Pandey AV, Waldegger S, Lesslauer A, Vitzthum H, Suzuki Y, Luk JM, Becker C, Schlingmann KP, Schmid M, Rodriguez-Soriano J, Ariceta G, Cano F, Enriquez R, Juppner H, Bakkaloglu SA, Hediger MA, Gallati S, Neuhauss SC, Nurnberg P, Weber S. Mutations in the tight-junction gene claudin 19 (CLDN19) are associated with renal magnesium wasting, renal failure, and severe ocular involvement. *Am J Hum Genet* 2006; 79(5): 949–957.
- 68 Claverie-Martin F. Familial hypomagnesaemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis: clinical and molecular characteristics. *Clin Kidney J* 2015; 8(6): 656–664.
- 69 Hou J, Renigunta A, Yang J, Waldegger S. Claudin-4 forms paracellular chloride channel in the kidney and requires claudin-8 for tight junction localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107(42): 18010–18015.