

• 综 述 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.21.031

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190730.1317.008.html>(2019-07-30)

NGAL 在肠道炎症中作用的研究进展

刘 文 综述,全巧云[△]审校

(三峡大学第一临床医学院,湖北宜昌 443000)

[摘要] 中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白(NGAL)是 lipocalin 家族成员之一,在不同的病理生理状态下,能与相应配体结合,表现出复杂的生物功能,在肠道黏膜免疫、调节肠道微生物及消化道肿瘤的发生等方面有一定作用。本文就 NGAL 的作用机制、分子调控及其在肠道炎症和肿瘤中的作用做一综述。

[关键词] 中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白;基质金属蛋白酶 9;铁;微生物;炎症性肠病;肠肿瘤

[中图法分类号] R574.62 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)21-3735-04

Research progress on role of NGAL in intestinal inflammation

LIU Wen, TONG Qiaoyun[△]

(First Clinical Medical College of Three Gorges University, Yichang, Hubei 443000, China)

[Abstract] Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) is a member of the lipocalin family, which can bind to the corresponding ligands under different pathophysiological conditions and exhibit complex biological functions. It plays a certain role in intestinal mucosal immunity, regulation of intestinal microbes and the occurrence of digestive tract tumors. This article reviewed the mechanism, molecular regulation of NGAL and its role in intestinal inflammation and tumors.

[Key words] neutrophil gelatinase-associated lipocalin; matrix metalloproteinase 9; Fe; microorganism; inflammatory bowel disease; intestinal neoplasms

中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)又称脂质运载蛋白-2(lipocalin, lcn-2)、噬铁蛋白、24P3,是最早发现于中性粒细胞的一种分泌性蛋白,为 lipocalin 家族成员之一。在体内广泛参与炎症及免疫反应、细胞分化、细胞凋亡、肿瘤形成及侵袭转移等生理病理过程。NGAL 主要表达于中性粒细胞、巨噬细胞、脂肪细胞,在结肠、胃、肾脏、肝脏等组织中也有少量表达,当组织炎症或上皮细胞损伤时,NGAL 的表达明显升高。本文探讨 NGAL 在肠道炎症及肿瘤发生中的作用,为这些疾病的治疗提供潜在靶点。

1 NGAL 的结构及生物学功能

NGAL 是由 178 个氨基酸残基构成的小分子急性期糖蛋白,以单体、同源二聚体及与基质金属蛋白酶 9(MMP9)共价结合的异源二聚体 3 种分子形式存在。免疫细胞主要分泌二聚体 NGAL,而上皮细胞只分泌单聚体 NGAL,决定 NGAL 形态的分子机制尚不清楚。据推测,NGAL 在中性粒细胞中长期储存形成二聚体,而上皮来源的 NGAL 分泌速度相对较快则主要由单体组成^[1]。与 lipocalin 家族成员相似,NGAL 蛋白多肽链的 N-末端为 310 螺旋,C-末端为

α -螺旋,中间为八段反平行式 β -折叠构成的 β 折叠桶, β 折叠桶一端开放,提供与配体结合的进口,另一端被 310 螺旋封闭,桶底部内侧是由疏水性氨基酸残基排列形成的亲脂性结合位点,可运载固醇类、血小板活化因子、白三稀和脂多糖等介导炎性反应的亲脂性小分子。但 NGAL 的 β 折叠桶更大、更开放,与配体的结合腔更浅,使其更易于与大分子配体特异性结合,从而较好地发挥其生物学功能。

MMP9 在炎症性肠病中高表达^[2],通过促进细胞因子的释放及炎症细胞的聚集加速炎症的进展,最终造成广泛的组织损伤。在肿瘤组织中,MMP9 介导肿瘤细胞的浸润,与肿瘤细胞的增殖及侵袭能力密切相关^[3-4]。NGAL 的 β 折叠桶封闭端的游离巯基,可与 MMP9 通过二硫键结合,促进 pro-MMP9 的活化,阻止 MMP9 的内源性降解,减慢基质金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP-1)对 MMP9 的失活作用,从而延长 MMP9 的活性^[2],并由此参与肠道炎症及肿瘤的进展。

NGAL 是天然抗菌免疫的重要组成部分,它可与细菌分泌的铁载体结合形成 NGAL-铁载体-铁复合物,阻止细菌从周围环境中获取铁,抑制细菌生长。

当组织炎症时,大肠杆菌增加铁载体产量以满足其对铁的需求,同时中性粒细胞大量分泌 NGAL 以隔离和中和铁载体^[5]。与野生组小鼠相比,NGAL 缺乏的小鼠对细菌感染更为敏感,感染大肠杆菌后表现出更高的病死率。因此,组织炎症中 NGAL 诱导的低铁反应可被看作是对感染的原始保护^[6]。此外,NGAL 可以与其受体 NGALR 结合将铁转运进入细胞内,构成一条新的铁转运途径,细胞外的低铁环境可通过减少氧自由基的产生来减轻氧化应激对细胞的损伤。

除了限制肠道细菌对铁の利用而起抗炎作用外,NGAL 对黏膜损伤也具有细胞保护作用,当肠道上皮细胞受损伤时,NGAL 可促进存活的上皮细胞、炎症细胞向损伤后的裸露区域迁移,重建上皮完整性;其再生上皮细胞、隐窝细胞中 NGAL 的免疫反应活性和 mRNA 信号均显著增加^[7]。同时,NGAL 也可增强巨噬细胞的细菌吞噬作用,与白细胞介素-10(IL-10)缺失小鼠腹腔内巨噬细胞相比,在 NGAL/IL-10 双缺失的巨噬细胞中自噬蛋白 LC3-II 的形成明显减少,重组 NGAL 可恢复 LC3-II 的形成,从而改善巨噬细胞细菌吞噬功能;在大肠杆菌感染后的 NGAL/IL-10 双缺陷小鼠模型中,分泌 NGAL 的巨噬细胞的植入可减轻结肠炎^[8]。肿瘤相关巨噬细胞(TAM)是肿瘤微环境中的重要铁源,NGAL 作为肿瘤微环境中主要的铁转运蛋白,在 TAM 调控的肿瘤铁稳态中发挥着重要作用。TAM 具有较强的吞噬活性,可以有效地回收铁并与 TAM 合成的 NGAL 结合主动释放到肿瘤微环境中,增加肿瘤微环境中铁的可用性,促进肿瘤细胞增殖、血管生成和转移,NGAL 缺陷型 TAM 胞内含铁量显著增加,肿瘤微环境中含铁量减少^[9]。NGAL 对肿瘤细胞的生物学活性具有双向调节作用,取决于 NGAL 的载铁状态,铁负载的 NGAL 通过 NGALR 将铁跨膜转运到肿瘤细胞内,胞内铁浓度的增加可抑制凋亡通路中 Bim 蛋白的表达,进而诱导 B 淋巴细胞瘤 2 基因(Bcl-2)合成增加,最终抑制细胞的凋亡信号通路和抑制细胞的凋亡;无铁 NGAL 可促进肿瘤细胞内铁流出进而促进肿瘤细胞凋亡^[10-11],NGAL 对铁转运的介导使其可能成为肿瘤治疗的新靶点。

NGAL 也可与其受体 NGALR 结合诱导中性粒细胞中的细胞外信号调节激酶 ERK1 和 ERK2 信号传导,进而调节中性粒细胞迁移、黏附^[12]。研究发现从 NGAL 缺陷小鼠中提取的中性粒细胞不能渗入感染部位,不能吞噬和杀灭细菌,且中性粒细胞的趋化性和黏附性也明显减弱^[13]。有体外证据表明 NGAL 能以不依赖铁的方式增加 CD4⁺ T 淋巴细胞上人白细胞抗原 G 的表达,而铁结合的 NGAL 也可激活 CD4⁺ / FoxP3⁺ 调节性 T 淋巴细胞,提示其参与细胞

介导的适应性免疫^[14]。

2 NGAL 的分子诱导与表达调节

2.1 NGAL 与核因子- κ B(NF- κ B) NGAL 启动子区域包含转录因子 NF- κ B、STAT1、STAT3 的结合位点,肠道炎症时,NF- κ B 通过激活 NGAL 的基因转录,上调血清 NGAL 水平来维持正常肠黏膜稳态及对机体的免疫应答,IL-1 可通过激活 NF- κ B 促进 NGAL 的表达^[15];NGAL 也可通过负反馈机制调节 NF- κ B 和 STAT3 通路的激活,减少 NF- κ B 抑制蛋白 α (I κ B α)降解和 STAT3 磷酸化来发挥抗炎效应。在小鼠巨噬细胞中,NGAL 缺乏导致脂多糖(LPS)诱导的 NF- κ B、STAT3 炎症信号通路的激活增加,并加剧 LPS 引起的促炎标志物 CD11c、IL-6 和 NOS 的表达,但在无 LPS 刺激的条件将重组 NGAL 导入巨噬细胞时,NGAL 对 NF- κ B、STAT3 信号传导途径的活化没有影响,表明 NGAL 本身不是促炎因子,而是在促炎刺激存在时发挥抗炎作用^[16]。

2.2 NGAL 与 TH17 细胞相关细胞因子 TH17 细胞作为一种 CD4 辅助性 T 细胞,可分泌 IL-17、IL-21、IL-22 等细胞因子,在维持肠道免疫稳态及抵御外源性病原体感染中发挥重要作用^[17]。研究表明,IL-22 和 IL-17A 共同刺激可显著诱导结肠上皮细胞 NGAL mRNA 的表达,且肿瘤坏死因子 α (TNF- α)可进一步放大这种效应,使 NGAL 有望成为判断抗 TNF- α 抗体治疗炎症性肠病(IBD)的疗效的候选标记物^[18]。此外,IL-23/IL-17 轴可通过诱导炎症部位对中性粒细胞的招募,进而促进 NGAL 在炎症部位的分泌,增强抗菌及免疫调节作用。NGAL 的表达受 IL-23R 基因型的调控,当增加 IL-23R 突变基因时,血清 NGAL 浓度呈明显下降趋势,但在用抗 IL-23R 抗体治疗 IBD 小鼠模型后,NGAL 水平逐渐恢复到初始水平,表明基因受损的 IL-23 轴阻碍了 NGAL 的正常上调^[18]。

3 NGAL 与肠道炎症相关性疾病

3.1 NGAL 与 IBD 黏膜免疫、肠道微生态和宿主易感性在 IBD 的发病中起重要作用。基因微阵列分析显示 NGAL 基因是溃疡性结肠炎(UC)患者结肠黏膜中表达最丰富的基因之一,也是 UC 的易感基因;在肠上皮细胞和肠黏膜的中性粒细胞中均有发现 NGAL 蛋白,而 mRNA 的合成仅位于上皮细胞,提示结肠黏膜中性粒细胞中的 NGAL 是由骨髓中未成熟的中性粒细胞前体合成并在炎症部位释放;而肠上皮细胞则参与大量 NGAL 的从头合成,使上皮细胞作为黏膜防御的一部分直接参与炎症过程的调节^[19]。在小鼠模型中,NGAL 的缺失导致结肠细菌黏附蛋白表达上调;粪便细菌数量较前增加 3 倍,以在 IBD 更为普遍的拟杆菌属及肠杆菌属居多;且 NGAL 表达

缺陷的小鼠结肠炎症及便血较野生型更显著^[20]。将鼠 NGAL 导入乳酸菌中产生大量表达 NGAL 的乳酸菌,在体外环境中,其对异常 pH、高浓度胆汁酸、氧化应激的耐受性增强;而小鼠体内实验中,表达 NGAL 的乳酸杆菌可以抑制大肠杆菌的生长、降低肠杆菌素的生物活性,并显示出更好的肠道黏膜保护作用,这一结论表明益生菌产生和分泌 NGAL 的基因修饰可提高益生菌在治疗结肠炎方面的稳定性、有效性^[21]。

NGAL 目前也被认为是 IBD 诊断和活性监测的潜在标记物。少数临床研究表明,与健康对照或 IBS 患者相比,IBD 患者的肠黏膜、粪便、血清中 NGAL 明显升高^[22-23],且肠黏膜及粪便中 NGAL 浓度与临床表现活动性及内镜下病变活动性具有明显的相关性^[24],敏感性、特异性优于 C 反应蛋白(CRP)及红细胞沉降率(ESR);在克罗恩病(CD)中,结肠型患者粪便 NGAL 水平显著高于小肠型患者;在 UC 中,全结肠炎较直肠炎患者粪便 NGAL 明显升高^[22]。缺铁性贫血是 IBD 常见并发症,尽管静脉补铁,但在 10 个月内超过 50% 的患者会复发^[25],有研究发现 UC 和 CD 中 NGAL 与铁浓度之间存在显著负相关性,一方面与 IBD 患者长时间的血液损失有关,另一方面与长期潜在的亚临床炎症引起 IL-6、TNF- α 等炎症因子上调,造成 NGAL 合成增多导致铁螯合作用加强有关^[24],因此 NGAL 可能是诊断炎症相关性贫血患者缺铁与否更可靠的潜在标志。

3.2 NGAL 与肠道肿瘤 慢性炎症是肠道肿瘤发病的重要机制之一,结肠炎相关癌症(CAC)的风险随病程增加而增加,与炎症的严重程度正相关。因此,明确肿瘤相关性炎症在结直肠癌(CRC)中的作用及调控具有重要意义。大量研究发现在结肠炎、癌前病变和恶性肿瘤中,结肠上皮细胞均可见 NGAL 的高表达,而正常结肠组织几乎不表达 NGAL^[22,26]。但关于 NGAL 与肠道肿瘤的发生、侵袭转移之间的关系,目前持两种观点。一种观点认为,NGAL 与肿瘤发生、侵袭转移呈负相关。KIM 等^[27]通过免疫印迹法检测 NGAL,也证实了 NGAL 在 CRC 细胞中的高表达;敲除 NGAL 基因,可诱导细胞增殖和从上皮到间充质状态的形态学转变;此外,CRC 细胞中 NGAL 的下调也增加了细胞迁移和上皮间质转换,诱导了大量葡萄糖的消耗和乳酸的产生,伴随着能量代谢相关基因的增加。因此,NGAL 对 CRC 细胞的增殖、上皮间质转换和能量代谢具有负调控作用,可能是 CRC 中潜在的转移抑制因子和治疗靶点。这一结论与文献^[28]的研究结果相符,他们发现 NGAL/IL-10 双缺陷小鼠的肠道所有黏液层完全丧失,黏膜屏障恶化,附着于肠上皮细胞和隐窝的细菌大量入侵,并以 IL6-STAT3 依赖的方式促进肠道炎症-异型增生-肿瘤的发生、发

展,而 NGAL 可防止结肠炎因 IL-10 缺乏引起的右侧结肠肿瘤的自发形成,其机制与微生物菌群的改变有关。另一种观点认为,NGAL 促进肿瘤发生、侵袭转移。多种肿瘤中 NGAL 可与 MMP9 形成复合物,阻止 MMP9 的降解。MMP9 不仅可以直接降解基底膜和基质中的 IV 型胶原,同时可以促进细胞外基质释放血管内皮细胞生长因子,促进肿瘤血管形成、浸润和远处转移^[29-30]。HU 等^[31]发现在人结肠癌细胞中,NGAL 过表达通过 Rac1、E-cadherin 和 catenins 的异位,导致癌细胞的骨架系统重组,减低细胞与细胞之间的黏附,增加细胞与基质之间的黏附,进而提高癌细胞的运动能力,促进癌细胞侵袭转移。

NGAL 在不同肿瘤细胞中功能的差异,可能与肿瘤细胞的类型不同有关,仍需进一步大样本、更深入的研究。

综上所述,NGAL 与肠道炎症及肿瘤的发生、发展密切相关,但目前对于 NGAL 在肠道炎症及肿瘤方面的具体作用及机制尚有很多不同的观点。所以,有必要对其展开更加深入的研究,这不仅有利于在基因分子水平上深化 NGAL 对肠道炎症及肿瘤发病机制的基础理论认识,更有利于推进 NGAL 在 IBD 及肠道肿瘤中的临床应用。

参考文献

- [1] CAI L J, RUBIN J, HAN W Y, et al. The origin of multiple molecular forms in urine of HNL/NGAL[J]. Clin J Am Soc Nephrol, 2010, 5(12): 2229-2235.
- [2] KJELDSEN L, JOHNSEN A H, SENGELOV H, et al. Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase[J]. J Biol Chem, 1993, 268(14): 10425-10432.
- [3] JAKUBOWSKA K, PRYCYNICZ A, IWANOWICZ P, et al. Expressions of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-7, and MMP-9) and their inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) in inflammatory bowel diseases[J]. Gastroenterol Res Pract, 2016(3): 2456179.
- [4] PUJADA A, WALTER L, PATEL A, et al. Matrix metalloproteinase MMP9 maintains epithelial barrier function and preserves mucosal lining in colitis associated cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(55): 94650-94665.
- [5] FISCHBACH M A, LIN H, LIU D R, et al. How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for Iron[J]. Nat Chem Biol, 2006, 2(3): 132-138.
- [6] XIAO X, YEOH B S, VIJAY-KUMAR M. Lipocalin 2: an emerging player in Iron homeostasis and inflammation[J]. Annu Rev Nutr, 2017, 37(1): 103-130.
- [7] PLAYFORD R J, BELO A, POULSOM R, et al. Effects of mouse and human lipocalin homologues 24p3/lcn2 and neutrophil gelatinase-associated lipocalin on gastrointesti-

- nal mucosal integrity and repair[J]. *Gastroenterology*, 2006, 131(3): 809-817.
- [8] TOYONAGA T, MATSUURA M, MORI K, et al. Lipocalin 2 prevents intestinal inflammation by enhancing phagocytic bacterial clearance in macrophages[J]. *Sci Rep*, 2016, 6(6): 35014.
 - [9] MERTENS C, MORA J, ÖREN B, et al. Macrophage-derived lipocalin-2 transports Iron in the tumor microenvironment[J]. *Oncoimmunology*, 2018, 7(3): e1408751.
 - [10] CHIEN M H, YING T H, YANG S F, et al. Lipocalin-2 induces apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells through activation of mitochondria pathways[J]. *Cell Biochem Biophys*, 2012, 64(3): 177-186.
 - [11] DEVIREDDY L R, GAZIN C, ZHU X C, et al. A cell-surface receptor for lipocalin 24p3 selectively mediates apoptosis and Iron uptake[J]. *Cell*, 2005, 123(7): 1293-1305.
 - [12] SCHROLL A, ELLER K, FEISTRITZER C, et al. Lipocalin-2 ameliorates granulocyte functionality[J]. *Eur J Immunol*, 2012, 42(12): 3346-3357.
 - [13] LIU Z M, PETERSEN R, DEVIREDDY L. Impaired neutrophil function in 24p3 null mice contributes to enhanced susceptibility to bacterial infections[J]. *J Immunol*, 2013, 190(9): 4692-4706.
 - [14] LA M G, GHINATTI G, TAZZARI P L, et al. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin increases HLA-G (+) / FoxP3 (+) T-regulatory cell population in an in vitro model of PBMC[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e89497.
 - [15] XAVIER R J, PODOLSKY D K. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. *Nature*, 2007, 448(7152): 427-434.
 - [16] GUO H, JIN D Z, CHEN X L. Lipocalin 2 is a regulator of macrophage polarization and NF- κ B/STAT3 pathway activation[J]. *Mol Endocrinol*, 2014, 28(10): 1616-1628.
 - [17] UENO A, GHOSH A, HUNG D, et al. Th17 plasticity and its changes associated with inflammatory bowel disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2015, 21(43): 12283-12295.
 - [18] STALLHOFFER J, FRIEDRICH M, KONRAD-ZERNA A, et al. Lipocalin-2 is a disease activity marker in inflammatory bowel disease regulated by IL-17A, IL-22, and TNF- α and modulated by IL23R genotype status[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2015, 21(10): 2327-2340.
 - [19] ØSTVIK A E, GRANLUND A V, TORP S H, et al. Expression of toll-like receptor-3 is enhanced in active inflammatory bowel disease and mediates the excessive release of lipocalin 2[J]. *Clin Exp Immunol*, 2013, 173(3): 502-511.
 - [20] SINGH V, YEOH B S, CHASSAING B, et al. Microbiota-inducible Innate Immune. Siderophore Binding Protein Lipocalin 2 is Critical for Intestinal Homeostasis[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2016, 2(4): 482-498.
 - [21] SAHA P, CHASSAING B, YEOH B S, et al. Ectopic expression of innate immune protein, lipocalin-2, in *Lactococcus lactis* protects against gut and environmental stressors[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2017, 23(7): 1120-1132.
 - [22] THORSVIK S, DAMÅS J K, GRANLUND A V, et al. Fecal neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a biomarker for inflammatory bowel disease[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2017, 32(1): 128-135.
 - [23] 刘海燕. 中性粒细胞明胶酶相关载脂蛋白通路关键因子在溃疡性结肠炎患者体内变化的研究[J]. *中国临床药理学杂志*, 2017, 33(23): 2371-2374.
 - [24] BUDZYNSKA A, GAWRON-KISZKA M, NOWAKOWSKA-DULAWA E, et al. Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) correlates with clinical and endoscopic activity in ulcerative colitis but fails to predict activity in Crohn's disease[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2017, 68(6): 859-865.
 - [25] PATEL D, TRIVEDI C, KHAN N. Management of anemia in patients with inflammatory bowel disease (IBD) [J]. *Curr Treat Options Gastroenterol*, 2018, 16(1): 112-128.
 - [26] MAIER H T, AIGNER F, TRENKWALDER B, et al. Up-regulation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in colorectal cancer predicts poor patient survival[J]. *World J Surg*, 2014, 38(8): 2160-2167.
 - [27] KIM S L, LEE S T, MIN I S, et al. Lipocalin 2 negatively regulates cell proliferation and epithelial to mesenchymal transition through changing metabolic gene expression in colorectal cancer[J]. *Cancer Sci*, 2017, 108(11): 2176-2186.
 - [28] MOSCHEN A R, GERNER R R, WANG J, et al. Lipocalin 2 protects from inflammation and tumorigenesis associated with gut microbiota alterations[J]. *Cell Host Microbe*, 2016, 19(4): 455-469.
 - [29] CANDIDO S, ABRAMS S L, STEELMAN L S, et al. Roles of NGAL and MMP-9 in the tumor microenvironment and sensitivity to targeted therapy[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2016, 1863(3): 438-448.
 - [30] YANG X Z, CUI S Z, ZENG L S, et al. Overexpression of Rab1B and MMP9 predicts poor survival and good response to chemotherapy in patients with colorectal cancer[J]. *Aging*, 2017, 9(3): 914-931.
 - [31] HU L M, HITTELMAN W, LU T, et al. NGAL decreases E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and increases cell motility and invasion through Rac1 in colon carcinoma cells[J]. *Lab Invest*, 2009, 89(5): 531-548.