文章编号:1000-5404(2011)11-1119-04

论著

胰岛淀粉样多肽和P物质在不同发育阶段家兔直肠的表达及分布特点

洪 艳,梁文妹,韩 晶,胡 赟,夏白娟,李一欣 (550004 贵阳,贵阳医学院基础医学院组织学与胚胎学教研室)

【摘要】 **目的** 观察不同发育阶段家兔直肠内胰岛淀粉样多肽(islet amyloid polypeptide,IAPP)、P物质(substance P,SP)的表达及分布特点。**方法** 收集生后5、15、25、35、60 d及90 d家兔各10只。取直肠组织入Bouin液固定,梯度酒精脱水,常规石蜡包埋,制成连续切片。用免疫组织化学SABC法和图像分析法对IAPP、SP免疫反应阳性细胞的定位和表达进行观察。**结果** 生后5 d家兔直肠内可见少量散在分布IAPP阳性细胞,多位于上皮;35 d IAPP阳性细胞的数量呈明显上升趋势,至60 d达到最多($P<0.05$),90 d时减少($P<0.05$),主要分布于固有层。图像分析测得IAPP阳性细胞的平均灰度值随家兔的生长发育逐渐降低,60 d达最低($P<0.05$)。SP阳性细胞于生后15 d始出现,35 d后细胞数量明显增多($P<0.05$),60 d达最高($P<0.05$)。其平均灰度值也于35 d开始下降($P<0.05$),于60 d达最低水平($P<0.05$)。**结论** IAPP、SP在直肠的表达随家兔的生长发育而逐渐变化,推测两者参与调节生后发育期间家兔直肠消化功能的成熟过程。

【关键词】 胰岛淀粉样多肽;P物质;直肠;生后发育;家兔
【中图法分类号】 R-332;R321.5;R322.45 【文献标志码】 A

Expression profiles of islet amyloid polypeptide and substance P in rabbit rectum during postnatal development

Hong Yan, Liang Wenmei, Han Jing, Hu Yun, Xia Baijuan, Li Yixin (Department of Histology and Embryology, School of Basic Medical Sciences, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou Province, 550004, China)

【**Abstract**】 **Objective** To determine the expression profiles and distribution features of islet amyloid polypeptide (IAPP) and substance P (SP) in the rectum of rabbits during postnatal development. **Methods** Sixty rabbits were equally divided into 6 groups according to their age, 5th-, 15th-, 25th-, 35th-, 60th- and 90th-day groups. Their rectum tissue were collected, fixed in Bouin solution, embedded in routine paraffin and then made into serial sections. The expressions of IAPP and SP were observed by immunohistochemical SABC staining and image analysis. **Results** In the 5th-day group, a few IAPP positive-cells were scattered into the mucosa epithelium of rectum. Since the 35th-day group, the number of IAPP positive-cells was ascended and obviously reached a peak in the 60th-day group ($P<0.05$), and then was descended from the 60th-day to 90th-day group ($P<0.05$). The positive cells were mainly distributed in the connective tissue of tunica propria. The mean grey values of IAPP positive-cells were decreased gradually during the postnatal development period and reached the lowest in the 60th-day group ($P<0.05$). However, SP positive-cells were first present in the rectum in the 15 days group, and the number of SP positive-cells were increased distinctly since 60th-day group ($P<0.05$). The mean grey values of SP positive-cells were declined gradually from 60 days ($P<0.05$). **Conclusion** The expression of IAPP and SP in the rectum is changed gradually during the postnatal development period, which suggested that both of them should participate in the process of adjusting in maturation of digestive function.

【**Key words**】 islet amyloid polypeptide; substance P; rectum; development; rabbit

Supported by the Science and Technology Foundation of Guizhou Province (200350) and the Natural Science Foundation of Department of Education of Guizhou Province (2002314). Corresponding author: Liang Wenmei, Tel: 86-851-6909118, E-mail: wenmeiliang@126.com

胰岛淀粉样多肽(islet amyloid polypeptide,IAPP)又称胰淀素,是一种调节糖代谢的新激素。近来研究发现胰淀素还具有调节骨代谢、抑制食欲和胃酸分泌、促进细胞增殖等多种生物学作用[1]。本课题组曾报

【基金项目】 贵州省科学技术基金(黔科通200350);贵州省教育厅自然科学研究基金(黔教科2002314)
【通信作者】 梁文妹,电话:(0851)6909118,E-mail:wenmeiliang@126.com

道大鼠胚胎期、新生期和生后发育各时期胃肠道IAPP-免疫反应(IR)细胞的分布及人胎不同发育时期结肠及直肠IAPP-IR细胞的个体发生[2]。但有关IAPP在家兔不同发育时期直肠的定位及表达情况报道甚少。P物质(substance P,SP)作为重要的脑肠肽之一,在中枢神经系统和胃肠道中均有广泛的分布。SP可引起结肠平滑肌收缩,刺激肠道水和电解质分泌。研究证实P物质不仅是一种神经肽,也是一种传递信息,调节机体反应的重要信使物质[3]。但关于SP在生后不同发育阶段胃肠道的定位研究国内外报道甚少。近年来研究显示直肠黏膜内分泌细胞较丰富,是典型类癌的好发部位[4],另有学者证实IAPP具有生长因子作用[5],SP对结肠黏膜上皮细胞有较明显的促增殖作用[6]。因此本研究采用免疫组织化学方法对家兔不同发育时期直肠黏膜IAPP、SP的定位分布及IAPP、SP免疫阳性细胞的个体发生进行较系统的观察,旨为进一步探讨生后发育时期胃肠激素对家兔直肠消化功能成熟的可能作用提供较完整的形态学资料。

1 材料与方法

1.1 取材及标本制备

出生后5、15、25、35、60及90 d家兔各10只,体质量分别为(0.072±0.006)、(0.151±0.003)、(0.209±0.021)、(0.345±0.091)、(1.210±0.152)、(2.001±0.093)kg,由贵阳医学院实验动物中心提供。经股动脉放血处死后,迅速于降结肠至肛门之间取直肠组织入Bouin液固定,梯度酒精脱水,常规石蜡包埋,制成4 μm厚连续切片。

1.2 免疫组织化学染色(SABC法)

分别显示IAPP、SP阳性细胞。主要步骤:甲醇-H_2O_2室温30 min,正常羊血清(1∶50)室温30 min,兔抗IAPP(1∶2 000,Peninsula Lab INC产品)、兔抗S-P(1∶100,北京中杉金桥生物技术有限公司)4 ℃过夜,羊抗兔IgG 37 ℃ 20 min,SABC复合物(武汉博士德生物工程公司)37 ℃ 20 min,DAB-H_2O_2液显色,苏木精复染胞核,中性树胶封片。以PBS缓冲液代替特异性抗血清为对照,其余步骤不变。

1.3 图像分析

随机选取各发育阶段家兔直肠切片3张,应用BioMias图像分析系统进行检测。在40倍物镜下,每张切片选取5个不重叠视野,计数IAPP、SP阳性细胞数量,并测其平均灰度值。

1.4 统计学分析

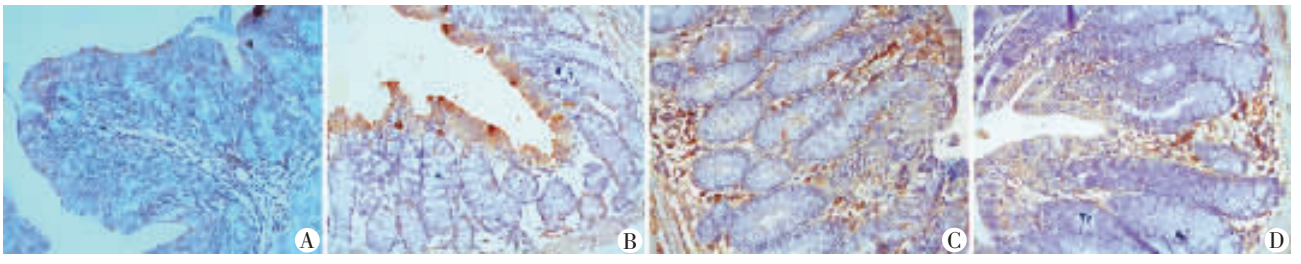
数据以$\bar{x}\pm s$表示。统计学处理应用SPSS 11.5软件对所得数据进行组间单因素方差分析。

2 结果

2.1 免疫组织化学染色结果

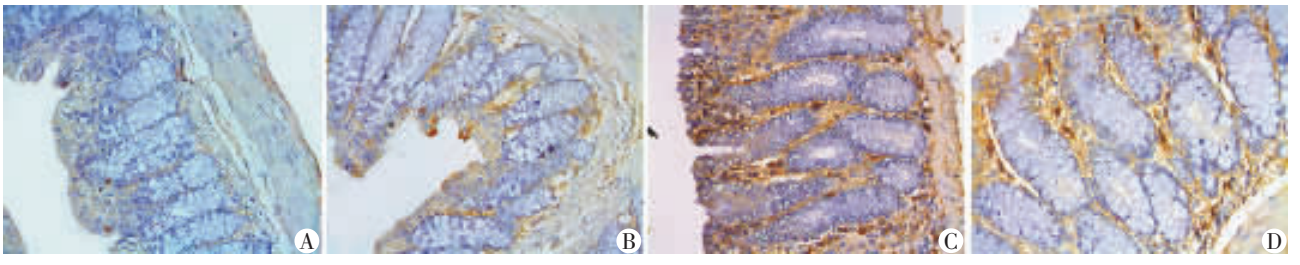
2.1.1 IAPP阳性细胞 生后5 d家兔直肠内可见少量散在分布IAPP免疫阳性细胞,多位于黏膜上皮;免疫阳性产物呈棕黄色颗粒状(图1A)。15~25 d,直肠内IAPP阳性细胞数量未见明显增多,但肠腺上皮及固有层均可见;35 d IAPP阳性细胞的数量呈明显上升趋势(图1B),至60 d达到最多(图1C),固有层内细胞增多,免疫染色显著加深,90d后阳性细胞数量有所减少(图1D)。IAPP阳性细胞形态多样,可见细胞发出突起作用于邻近细胞。方法对照切片未见阳性反应细胞。

2.1.2 SP阳性细胞 家兔直肠内SP免疫阳性细胞始见于生后15 d,单个散在分布于上皮内,胞质内阳性反应物的染色多呈棕黄色(图2A),数量少,多呈圆形。25~35 d,SP阳性细胞数量未见明显增多(图2B)。60d SP阳性细胞于固有层显著增多(图2C),肠腺上皮内分布较少,免疫反应强度明显增强。90 d细胞数量有所减少(图2D)。对照切片未见阳性反应细胞。



A 5 d B 35 d C 60 d D 90 d

图1 出生后不同发育天数家兔直肠IAPP阳性细胞免疫组化观察 (SABC×400)



A 15 d B 35 d C 60 d D 90 d

图2 出生后不同发育天数家兔直肠SP阳性细胞免疫组化观察 (SABC×400)

2.2 图像分析结果

2.2.1 IAPP、SP 阳性细胞计数 不同发育阶段家兔，直肠切片，高倍镜下，每视野 IAPP、SP 阳性细胞数见表 1。

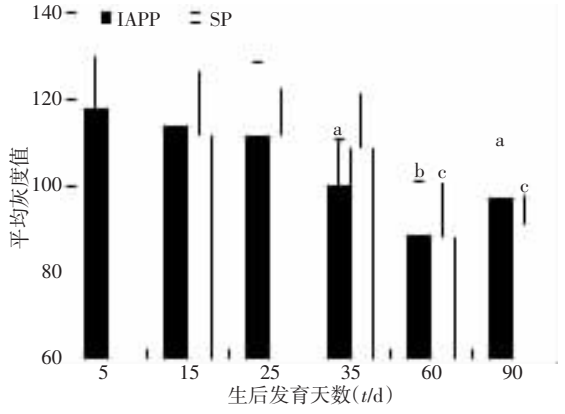
表 1 家兔不同发育阶段有核阳性细胞数的比较（$\bar{x} \pm s$）

生后发育天数	IAPP 阳性细胞	SP 阳性细胞
5 d	5.40 ± 2.17	0
15 d	6.70 ± 2.35	2.83 ± 0.75
25 d	5.90 ± 3.38	3.33 ± 2.34
35 d	8.80 ± 2.17[a]	4.03 ± 6.06
60 d	13.80 ± 3.42[ab]	9.83 ± 6.05[c]
90 d	9.70 ± 3.86[a]	9.67 ± 3.98[c]

a：$P < 0.05$，与 5、15、25 d IAPP 阳性细胞比较；b：$P < 0.05$，与 35、90 d IAPP 阳性细胞比较；c：$P < 0.05$，与 15、25、35 d SP 阳性细胞比较

如表 1 所示，家兔生后 5 ~ 25 d IAPP 阳性细胞数量未见明显变化，从 35 d 开始，细胞数量开始增多（$P < 0.05$），以 60 d 最多（$P < 0.05$），90 d 细胞数量下降（$P < 0.05$）。SP 阳性细胞数量在 15 ~ 35 d 变化不明显，到 60 d 后细胞数量显著增多（$P < 0.05$），从 60 ~ 90 d 阳性细胞数量改变无统计学意义。

2.2.2 IAPP、SP 阳性细胞平均灰度值测定 不同发育阶段家兔 IAPP、SP 阳性细胞平均灰度值变化见图 3。



a：$P < 0.05$，与 5、15、25d IAPP 阳性细胞比较；b：$P < 0.05$，与 5、15、25、35、90d IAPP 阳性细胞比较；c：$P < 0.05$，与 15、25、35d SP 阳性细胞比较

图 3 不同发育阶段家兔 IAPP、SP 阳性细胞平均灰度值比较

如图 3 所示，IAPP 阳性细胞的平均灰度值在家兔生后 5、15、25 d 时变化不明显，在 35、60 d 时呈逐渐降低趋势（$P < 0.05$），90 d 略有升高（$P < 0.05$）。生后 15 ~ 35 d，SP 阳性细胞的平均灰度值变化无统计学意义，60 d 后显著下降（$P < 0.05$）。

3 讨论

IAPP 是一种由 37 个氨基酸组成的多肽，与胰岛素共同储存在胰岛素分泌囊泡中，并且在胰岛 β 细胞促分泌因子作用下与胰岛素共同分泌[1]。有关 IAPP 在胚胎及生后发育期间胃肠胰分布与定位研究国内外已有报道[2]，但关于家兔生后发育期间尤其是直肠内分布的研究甚为少见。本实验结果显示在生后 5d 家兔直肠内即有 IAPP 阳性细胞出现，多数分布于黏膜上皮，随发育时间的延长，IAPP 阳性细胞数量显著增多，且主要分布于固有层。这与本课题组对大鼠生后发育时期胃肠道中 IAPP-IR 细胞的研究结果类似，即 IAPP-IR 细胞胚胎期主要位于上皮中，随着生后的发育，固有膜中阳性细胞逐渐增多[2]。综合以上研究结果，我们认为在生长发育的过程中，随着 IAPP 的表达由上皮向固有层迁移，IAPP 逐渐参与了肠道消化和内分泌功能的调节过程。

近年来研究显示 IAPP 具有类生长因子作用[5]，参与了机体的生长、发育过程。研究发现，胰淀素可刺激成骨细胞及近端肾小管细胞的增生[7]。IAPP 能够抑制食物的吸收和胃排空。在相同环境下，IAPP 基因敲除小鼠的胃排空加速，体质量比正常小鼠高出 30%[8]。此外，IAPP 还能抑制胃酸分泌，促进胃溃疡的愈合，保持胃黏膜完整等作用[9]。本研究结果提示 IAPP 对家兔生后发育期直肠的生长发育可能有重要的调节作用。

SP 为含 11 个氨基酸残基的多肽，在全身均有分布，以胃肠道和中枢神经系统浓度最高。肠道的 SP 绝大部分存在于多肽能神经元中，少量由肠嗜铬样细胞分泌。国内外关于 SP 在消化道不同发育阶段的定位研究已有报道，但多局限于肠肌从内神经元，对黏膜内神经肽的分布研究较少。Parisi-Salvi 等[10] 研究肠道的发育显示鸡胚 12d 小肠黏膜下及肌间神经丛可见 P 物质和血管活性肠肽的表达。陈晓宇等[11] 研究发现人胎儿 14 周小肠壁出现 SP-IR 阳性神经元。Peck 等[12] 对不同年龄豚鼠结肠肠肌从神经元的数量进行研究，结果显示 SP-IR 神经纤维数量随年龄增加而增多。本实验结果显示家兔直肠 SP 的表达随生后发育逐渐增多，在 60 d 达到高峰，SP 阳性细胞首先分布于上皮，随时间的延长逐渐向固有层迁移。出现上述变化的原因目前尚不清楚，推测 SP 可能参与对肠黏膜上皮和肠腺分泌功能的调节。

大量研究证实，SP 作为神经递质的调节因子，可增加胃肠蠕动，有强烈促消化道平滑肌收缩，加强结肠的集团推进运动，刺激小肠、结肠黏膜分泌水和电解质的作用[3]。关于 SP 对肠黏膜上皮细胞的影响，研究表明 SP 与特异性 NK-1 受体相互作用可通过激活金属蛋白酶和上皮生长因子受体促进结肠上皮细胞增殖[6]，SP 也能通过激活 Akt 途径间接阻止结肠上皮细胞凋亡[13]。SP 在修复细胞的增殖、迁移、分化方面有重要作用，黄波等[14] 研究 SP 对早产大鼠Ⅱ型肺泡上皮细胞的保护作用，结果表明 SP 可促进Ⅱ型肺泡上皮细胞增殖并抑制其凋亡。P 物质可作为免疫调节递质，作用于外周 T 细胞上的胃肠肽受体，对细胞免疫功能发挥直接调节作用，也可间接通过影响多种细胞因子的分泌，从而实现对胃肠道免疫功能的调节[15]。本实验结果表明家兔直肠内 SP 的表达及定位随生后发育出现显著变化，提示 SP 与家兔生后发育期间消化道黏膜上皮细胞的增殖及免疫功能的建立密切相关。

参考文献：

[1] Khemtemourian L, Engel M F, Kruijtzer J A, *et al*. The role of the disulfide bond in the interaction of islet amyloid polypeptide with membranes[J]. Eur Biophys J, 2010, 39(9): 1359-1364.

[2] 石爱荣，梁文妹，黄岩. 胃肠胰胰岛淀粉样多肽的定位和表达[J]. 世界华人消化杂志，2000，8(2)：211-213.

[3] Satake H, Kawada T. Overview of the primary structure, tissue-distribution, and functions of tachykinins and their receptors[J]. Curr Drug Targets, 2006, 7(8): 963-974.

[4] 王沧海. 消化系神经内分泌肿瘤的临床特点[J]. 世界华人消化杂志，2008，16(24)：2788-2791.

[5] Wookey P J, Cooper M E. Amylin: physiological roles in the kidney and a hypothesis for its role in hypertension[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1998, 25(9): 653-660.

[6] Koon H W, Zhao D, Xu H, *et al*. Substance P-mediated expression of the pro-angiogenic factor CCN1 modulates the course of colitis [J]. Am J Pathol, 2008, 173(2): 400-410.

[7] 付方明，李利平，董砚虎. 胰淀素研究新进展[J]. 国外医学：内科学分册，2004，31(5)：191-193.

[8] Friis-Hansen L, Wierup N, Rehfeld J F, *et al*. Reduced ghrelin, islet amyloid polypeptide, and peptide YY expression in the stomach of gastrin-cholecystokinin knockout mice [J]. Endocrinology, 2005, 146(10): 4464-4471.

[9] 张鑫，程彪，黄昆. 胰岛淀粉样多肽的研究进展[J]. 生命科学，2010，22(6)：567-574.

[10] Parisi-Salvi E, Vaccaro R, Baglaj S M, *et al*. Nervous system development in normal and atresic chick embryo intestine: an immunohistochemical study[J]. Anat Embryol (Berl), 2004, 209(2): 143-151.

[11] 陈晓宇，贾友苏，王惠珠. 人胎小肠肥大细胞与肽能神经的分布和发育研究[J]. 安徽医科大学学报，2005，40(6)：502-504.

[12] Peck C J, Samsuria S D, Harrington A M, *et al*. Fall in density, but not number of myenteric neurons and circular muscle nerve fibres in guinea-pig colon with ageing[J]. Neurogastroenterol Motil, 2009, 21(10): 1075-e90.

[13] Koon H W, Zhao D, Zhan Y, *et al*. Substance P mediates antiapoptotic responses in human colonocytes by Akt activation[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(6): 2013-2018.

[14] 黄波，付红敏，杨鸣，等. 高氧对早产鼠肺泡Ⅱ型上皮细胞的影响及神经肽P物质的保护作用[J]. 第三军医大学学报，2008，30(24)：2285-2288.

[15] Koon H W, Pothoulakis C. Immunomodulatory properties of substance P: the gastrointestinal system as a model[J]. Ann N Y Acad Sci, 2006, 1088: 23-40.

（收稿：2010-11-09 修回：2010-12-15）
（编辑 张 维）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2011)11-1122-01

头部伽玛刀治疗脑转移瘤1 205例的护理体会

张 炜，张 霞 （100048 北京，海军总医院神经外科伽玛刀治疗研究中心）

【关键词】 伽玛刀；脑肿瘤；护理
【中图法分类号】 R473.6 【文献标志码】 B

对脑转移瘤的治疗目的主要是控制病程，缓解症状，减轻病痛，延长患者的生存期，提高其生存质量[1]。1996年9月至2008年6月本中心应用OUR旋转式伽玛刀治疗脑转移瘤1 205例，现将护理体会报告如下。

1 临床资料

1.1 一般资料

1 205例脑转移瘤患者中，男性734例，女性471例；年龄28~90岁，平均56.4岁，其中，60岁以上356例（占29.5%），40岁以下者93例（占7.7%）。从原发病灶看，肺癌脑转移863例，占71.6%；乳腺癌脑转移92例，占7.6%；肾癌脑转移66例，占5.5%；消化道肿瘤颅内转移59例，占4.9%；其他肿瘤脑转移63例，占5.2%。有62例患者（5.1%）伽玛刀治疗时未查出癌源灶。从病灶数量看，单个病灶381例，占31.6%；2个及以上病灶384例，占68.4%。从肿瘤体积看，瘤体0.4~75 cm^3，平均18.4 cm^3。

1.2 治疗方案

局麻下安装Leksell G型立体定向头架，采用核磁增强扫描（3 mm，无间距，全脑扫描），放射治疗计划（TPS）：V 2.0版。准直器口径4、8、14、18 mm。治疗剂量：中心剂量18~60 Gy（平均34Gy）；周边剂量9~30Gy（平均15Gy），用40~60%曲线包绕；大体积病灶相应降低剂量。

1.3 护理方法

1.3.1 心理护理 脑转移瘤患者一般都已接受过原发肿瘤的放疗、化疗或手术治疗，相对病程较长、体质较差、情绪低落，因此，心理护理非常重要，并应贯穿整个围治疗期。①术前，针对患者和家属的疑虑和担忧，使用合适的沟通方式，做好耐心细致的宣传解释工作。②术中，针对上定位头架所产生的疼痛和照射治疗过程中的孤独，采取及时解释安慰，密切观察患者反应，不时对话分散其注意力，播放轻音乐营造温馨环境等措施，消除他们的恐惧心理。③术后，针对患者急切等待治疗效果和对可能出现并发症的担心，向患者和家属交代术后注意事项，解释放射治疗从肿瘤受到辐照至坏死、萎缩的时效性。

1.3.2 基础护理

1.3.2.1 术前阶段 ①常规检查。尤其对部分曾行全身放化疗的患者，要检查有无白细胞减少、贫血等情况，了解凝血功能如何，有无乙肝，艾滋病等，以便做好防护及消毒工作。②配合医生安置立体定位框架。上头架之前，询问患者有否戴义齿或金属饰物，如有要全部取下。③核磁定位。详细告知患者在检

（下转1127页）

【通信作者】 张 炜，E-mail：zhangwei66311@sina.com