doi:10.11659/jjssx.03E015054

树鼩消化道胰高血糖素样肽-1 阳性细胞分布的研究

陈丽雄[1],王俊斌[1],刘汝文[2],吕龙宝[3],陈丽玲[2] (1.中国医学科学院医学生物学研究所,云南 昆明 650118;2.昆明医科大学实验动物学部,云南 昆明 650500;3.中国科学院昆明动物研究所动物实验中心,云南 昆明 650223)

[摘 要] **目的** 观察树鼩胃肠道胰高血糖素样肽-1(GLP-1)免疫反应阳性细胞(EG 细胞)分布情况与大鼠消化道的差异,以期为树鼩模型的进一步使用提供参考。**方法** 免疫组化 SABC 法检测树鼩消化道(口腔、咽除外)GLP-1 的细胞阳性含量。**结果** EG 细胞分布于树鼩十二指肠、回肠、结肠、空场中的腺上皮细胞间,阳性物质分布于细胞质。树鼩胃、直肠未见 EG 细胞分布。回肠免疫组织化学染色结果显示 EG 细胞阳性,消化道中只有回肠、结肠分布 GLP-1 阳性较多,树鼩与大鼠相比较消化道中 GLP-1 差异显著($P<0.01$)。**结论** 树鼩胃肠道内十二指肠、回肠和结肠、空肠都有胰高血糖素阳性细胞。大鼠只在回肠、结肠有阳性细胞。据 GLP-1 的作用机理和树鼩消化道 GLP-1 的分布,树鼩动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)AS 模型不易制作可能与 GLP-1 的作用相关。

[关键词] 胰高血糖素样肽-1;消化道;树鼩;模型

[中图分类号] R574.4;Q578 [文献标识码] A [收稿日期] 2015-11-23

Research on distribution of gastrointestinal peptide glucagon-1 of positive cells in tree shrews

CHEN Li-xiong[1],WANG Jun-bin[1],LIU Ru-wen[2],LYU Long-bao[3],CHEN Li-ling[2] (1. Institute of Medical Biology,Chinese Academy of Medical Sciences,Kunming Yunnan 650118,China;2. Faculty of Experimental Animals,Kunming Medical University,Kunming Yunnan 650500,China;3. Kunming Institute of Zoology,Chinese Academy of Sciences Laboratory Animal Center,Kunming Yunnan 650223,China)

Abstract: Objective To observe tree shrews gastrointestinal glucagon like peptide 1 (glp-1) immune response positive cells (EG cells) distribution and the difference of the digestive tract of rats. **Methods** Immunohisto chemical SABC method to detect tree shrews digestive tract (except for oral cavity, pharynx) glp-1 cells positive content. **Results** EG cells distributed in tree shrews duodenum,ileum and colon,glandular epithelial cells of jejunum,positive material is distributed in the cytoplasm. Tree shrews stomach,rectum did not see EG cell distribution. Ileal immune dyeing results show positive,EG cells of the digestive tract,only the ileum and colon distribution glp-1 more positive, tree shrews compared with the rats in the digestive tract glp-1 significant difference ($P<0.01$). **Conclusion** Gastrointestinal tree shrew in duodenum,ileum and colon,jejunum have glucagon positive cells. The rat only have positive cells in the ileum and colon. According to the mechanism of the glp-1 and the distribution of tree shrews gastrointestinal glp-1,tree shrews atherosclerosis (atherosclerosis,AS) AS the model is not easy to make may be associated with the role of glp-1.

Keywords: glucagon-1;digestive tract;tree shrew;model

胰高血糖素是由 29 个氨基酸组成的多肽,在由肠道 L 分泌细胞胰岛 A 细胞所分泌[1];胰高血糖素分泌的 PC1/3 将胰高血糖素原分解为胰高血糖素样肽-1(GLP-1)、GLP-1(9-36)胰高血糖素样肽、胰高血糖素和胃泌酸调节素[2]。GLP-1 对血糖、体质量、血压、血脂等心血管危险因素有作用。树鼩作为模式生物,但树鼩动脉粥样硬化模型(atherosclerosis,AS)不易制作成功,这是否与其体内 GLP-1 的分布有关? 且对树鼩生理特点的报道甚少,目前已发现其肠蠕动过快,食物代谢排除很快,但具体作用机制尚不清楚。为了解树鼩特点,本研究将其与大鼠消化道中(除口腔和咽)GLP-1 的分布进行比较,以便今后更好地利用树鼩的生物学特性为生命科学研究提供参考。

1 资料与方法

1.1 实验动物

10 只健康成年树鼩(F3 代)[生产许可证:SCXK(滇)K2012-0001],体质量 121 ~ 140 g,雌雄比为 1∶1,均来自中国科学院昆明动物研究所动物实验中心。10 只 SD 大鼠[生产许可证:SCXK(滇)2011-0005],体质量 150 ~ 180 g,雌雄比为1∶1,来自昆明医科大学实验动物学部;动物单笼饲养于 12 h 人工光照(光照时间 07∶00 ~ 19∶00)的动物房中,室温(22 ± 3) ℃,湿度 40% ~ 60%,自由饮食饮水,每天清理动物笼舍 1 次,所有动物在实验前适应饲养 2 周后再进行实验。

1.2 实验器材及材料

树鼩、大鼠全部空腹 12 h 后,3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉安乐死,按下列消化道各段取材:食管、胃贲门部、胃体、胃幽门部、十二指肠、空肠、回肠和直肠。

[基金项目] 云南省应用基础研究面上基金(2011FZ107)

[通信作者] 陈丽玲,E-mail:kmyxy18@sina.com

先用生理盐水快速冲洗,然后用改良的 Bouins 液固定 24 h 后 ,常规脱水透明, 石蜡包埋,切片 6 μm,贴于涂有铬矾明胶载玻片上,37 ℃温箱烘片备用。

1.3 试剂

GLP-1R 抗和 Vecta SABC 法试剂盒免疫组织化学试剂盒购于 Epitomics,美国 ABCAM 公司生产。

1.4 光密度值的测定

用计算机图像分析技术半定量检测其蛋白表达的强弱,平均光密度越高说明表达越强,反应细胞内 GLP-1 表达量越多。以平均光密度值来进行量化后的统计学分析。

1.5 免疫组织化学方法

免疫组织化学染色步骤:①用 3% H_2O_2 涂于玻片上 8 min;②PBS 液冲洗 2 ~ 3 次,各 4 ~ 6 min;③将玻片浸入 0.01 M(pH 6.0)的枸橼酸钠缓冲液中,电磁炉加热至沸腾,关闭电源,静置 10 min,冷却后用 PBS 液冲洗 1 ~ 2 次;④切片滴加 5% BSA 1 滴封闭, 并在 37 ℃湿盒中温育 20 min;⑤加一抗,现加入稀释液配好的第一抗体(参照所购抗体说明书, 通常为 1∶100 或1∶200稀释度)工作液 20 ~ 50 μl;于37 ℃,湿盒温育 1 ~ 3 h 或者于 4 ℃过夜,重复第二步反复洗 3 次;⑥加二抗,加入 SABC 试剂盒中的第二抗体(如小鼠兔 IgG)工作液 1 滴, 于 37 ℃湿盒温育 1 h,重复第二步反复洗 3 次;⑦每片加入 SABC 试剂 1 滴, 于 37 ℃湿盒温育 30 ~ 45 min,冲洗 2 ~ 3 次,加阳性物显色剂 DAB 显色应用液 20 ~ 50 μl;染色 5 ~ 20 min,冲洗 2 ~ 3 次,多克隆 GLP-1R 抗体与树鼩组织切片上的 GLP-1R 抗原结合,标记上生物素的多克隆抗体再与 GLP-1R 抗体结合,经 SABC 法在组织细胞上显示出棕黄色阳性产物,即表示该切片组织有 GLP-1R 的表达。显微镜下选择实验片和对照片进行视野选取摄片。

1.6 细胞计数

在 Olympus-2 型显微镜下观察,对每个部位的切片随机取 20 个视野,计算每平方毫米 GLP-1 免疫蛋白表达数。LEICADC5OOLB2 显微镜成像系统拍照。

1.7 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析处理,计量资料用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并对结果进行方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 光密度值的测定

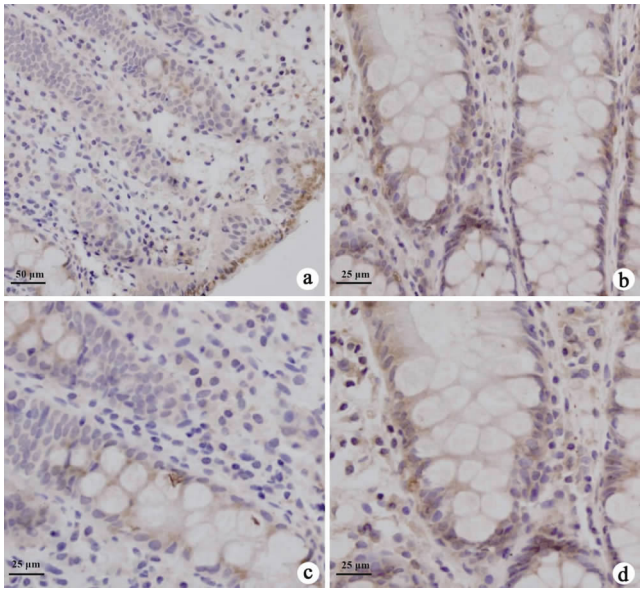
组织切片中细胞质内出现黄色或棕色颗粒蛋白表达阳性细胞,无色颗粒为阴性细胞。树鼩与大鼠的消化道的平均光密度值见表 1。

表 1 树鼩与大鼠的消化道的平均光密度值比较($\bar{x} \pm s$)

类别	n	平均光密度植
树鼩	10	0.67 ± 0.06
SD 大鼠	10	0.29 ± 0.11
P		0.000 1

2.2 免疫组织化学染色结果

树鼩 GLP-1 阳性细胞主要在小肠、空肠、回肠肠黏膜上皮细胞及腺体细胞中表达,口腔咽部很少,呈圆形、椎形、三角形、椭圆形等。此外间质细胞也有表达,阳性产物呈大小不等的浅黄、深黄至棕黄颗粒,定位于细胞质中,细胞核呈阴性。大鼠 GLP-1 在结肠、回肠黏膜上皮细胞及腺体细胞中表达,主要呈圆形、椭圆形、锥形、柱状和不规则形,胞质呈棕黄颗粒,间质细胞可见散在阳性颗粒呈黄色。树鼩与大鼠 GLP-1 在肠黏膜上皮细胞、腺体细胞和间质细胞中均有表达,胞质呈黄色颗粒(图 1)。



a:树鼩小肠中 GLP-1 的表达;b:大鼠小肠中 GLP-1 的表达;c:树鼩结肠中 GLP-1 的表达;d:大鼠结肠中 GLP-1 的表达

图 1 免疫组织化学染色

2.3 消化道各段 GLP-1 免疫活性细胞的分布密度

树鼩 GLP-1 没有分布在食道和胃体,在十二指肠、空肠及结肠分布较多,回肠直肠分布较少,树鼩肠解剖结构回肠、结肠界限不是非常明确,结肠袋很少,所以分布区域较长、较广,密度也较大。可能是特殊的结构决定着其分泌功能。大鼠的肠道中,回肠和结肠内存在胰高血糖素免疫反应阳性细胞。结肠袋比树鼩多,主要集中分布于结肠,而胃、十二指肠和空肠见很少胰高血糖素细胞分布。

3 讨论

GLP-1 的受体分布于胰腺、胃、十二指肠、空肠、结

肠、下丘脑、孤束核大脑的网状结构、脑干、海马等多个区域,资料研究报道在体实验通过迷走神经通路和胃肠道 GLP-1 受体,发挥其对胃肠运动的调节作用[2]。在消化道的胃和肠道黏膜组织内含有具有分泌功能的内分泌细胞分泌 GLP-1,本实验通过切片也看出树鼩小肠与大肠分界不明,结肠袋比大鼠少很多,显得小肠区域比 SD 大鼠多。但常规 GLP-1 主要分布于消化道十二指肠、回肠、结肠段。由于树鼩消化道的特殊结构,小肠比例较大,其分泌 GLP-1 区域较大,这与大鼠比较差异显著;计算机图像分析检测其蛋白表达的强弱光度值可看出,树鼩小肠道的 GLP-1 平均光度值比 SD 大鼠的强; GLP-1 分泌细胞在树鼩胃、十二指肠、空肠中单位面积分布很少,只是区域较广,因其可以减少胃酸分泌,调节餐后胃底部的容积,增加贲门部的顺应性,抑制胃窦及幽门部的收缩,从而抑制胃运动,延缓固体和液体食物的胃排空,故同等大小的树鼩和大鼠比较,树鼩胃容量较小、胃排空较快。

另外,GLP-1 参与由心理应激引起的结肠传输运动,如在大鼠中枢注射 GLP-1,其结肠传输运动会增强。一些生理应激物会影响胃肠道的运动,它们能通过自主神经系统延缓胃排空刺激结肠运动,特别是生理和心理的应激会强烈影响结肠的运动,由于树鼩结肠太短、结肠袋少,GLP-1 的受体也相应少,肠蠕动较大鼠快。

GLP-1 是一种进餐时由胃肠道系统生成的肽类物质,具有促进胰腺 P 细胞葡萄糖依赖性的释放胰岛素的功能,具有降低血浆中的胰高血糖素水平,减低胃排空的速度,增强饱食感及刺激胰岛 B 细胞的增殖与分化等多种生理活性。这也可能是导致树鼩对食物的偏好和营养吸收代谢不同的原因之一。树鼩较喜欢吃甜食、虫子、肉类,并且不易肥胖和高血脂,这可能与树鼩 GLP-1 消化道的分布区域和作用有关。有研究发现,GLP-1 有“肠促胰岛素效应”和对心血管的作用,可促进胰岛素分泌,刺激 β 细胞增生,调节胰岛素对摄食的反应[3]。GLP-1 进食后由小肠内分泌细胞分泌,可帮助机体在进食碳水化合物后产生适当的胰岛素反应,说明树鼩喜欢吃甜食,从中补充糖份是消化功能的自然调节 。

另外 GLP-1 对心脏及血管有舒张效应[4],是目前所知的胰岛素分泌促进激素,在高血压小鼠中,GLP-1 类似物可减轻血管紧张素Ⅱ诱导的 ERK1/2 磷酸化,抑制钠离子重吸收,从而发挥降血压作用[5-7]。GLP-1 还可以通过抑制炎症因子表达、减轻炎症反应和对内皮细胞的凋亡而改善内皮功能,减缓动脉粥样硬化进展[8-10]。即具有增加心肌葡萄糖摄取,改善内皮功能,减少心肌梗死面积,抗炎症及抗动脉硬化,抑制血管内皮、心肌细胞凋亡等作用[3]。树鼩消化道 GLP-1 的分布区域比大鼠广、单位区域含量比大鼠多,其对树鼩的糖代谢、心血管疾病有着更重要作用,其作用机制有待进一步的研究。有较多文献报道,树鼩不能制作 AS 模型,从消化道 GLP-1 的分布与大鼠比较看,树鼩的 GLP-1 分布区域较广泛,数量也较多,对高糖食物、高蛋白质消化分解有重要作用,也可能是树鼩不易制作 AS 模型原因之一[11-14]。今后利用树鼩制作模型时必须考虑其生理特点因素,消化道的解剖及内分泌功能,本研究可为树鼩在心血管、糖代谢、肥胖方面使用和 GLP-1 功能的进一步研究提供一种新思路。

[参考文献]

[1] Bailey CJ. Treating insulin resistance: future prospects[J]. Diab Vasc Dis Res, 2007, 4(1): 20.

[2] Wasada T. Glucagon -like peptide -1 (GLP -1)[J]. Nihon Rinsho, 2004,62(6):1175 - 1178.

[3] Ban K, Noyan-Ashraf MH, Hoefer J, et al. Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon -like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon -like peptide 1 receptor- dependent and-independent pathways[J]. Circulation, 2008, 117(18):2340 - 2346.

[4] Hirata K, Kume S, Araki S, et al. Exendin-4 has an anti-hypertensive effect in salt- sensitive mice model[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 380(1):44 - 49. doi:10.1016/j.bbrc.2009.01.003.

[5] Sokos GG, Nikolaidis LA, Mankad S, et al. Glucagon like peptide-1 infusion improves left ventricular ejection fraction and functional status in patients with chronic heart failure[J]. J Card Fail, 2006, 12(9):694.

[6] 胡 家. Exenatide 对肥胖大鼠肝脏糖异生基因表[D]. 南京:南京医科大学,2012.

[7] 刘剑锋. Exendin-4 联合脂肪来源干细胞移植治疗急性心梗的作用及机制研究[D]. 北京:中国人民解放军医学院,2013.

[8] Widenmaier SB, Sampaio AV, Underhill TM, et al. Noncanonical activation of Akt /protein kinase B in β-cells by the Incretin Hormone Glucose dependent Insulinotropic polypeptide[J]. J Biol Chem, 2009, 284(16):10764. doi:10.1074/jbc.M809116200.

[9] 赵文成. 利拉鲁肽对 2 型糖尿病患者心血管危险因素作用的临床研究[D]. 吉林:吉林大学,2013.

[10] 刘灵佳. GLP-1R 在 1 型糖尿病患者 CD4 ~ + CD25 ~ -T 细胞和 CD4 ~ + CD25 ~ + 调节性 T 细胞中的表达[D]. 长沙:中南大学,2013.

[11] 王 竞. 胰高血糖素样肽-1 及其类似物的心血管保护作用研究进展[J]. 天津药学,2012,24(5):56 - 60.

[12] 吴晓云, 李昀海, 常 青, 等. 链脲佐菌素诱导树鼩 2 型糖尿病[J]. 动物学研究,2013,34(4):108 - 115. doi:10.3724/SP.J.1141.2013.02108.

[13] 韩 伟,朱 亮,马晓健,等. 胰高血糖素样肽-2 对小鼠小肠黏膜作用及其受体在体内的分布[J]. 现代中西医结合杂志,2010,19(30):3237 - 3240. doi:10.3969/j.issn.1008 - 8849.2010.30.006.

[14] 韩 伟. GLP-2 对小鼠胃肠粘膜作用及其受体分布的初步研究[D]. 大连:大连医科大学,2009.

(编辑:杨 颖)