维普资讯 http://www.cqvip.com



文章编号：0253-3626(2002)04-0388-03

# HGF对大鼠移植小肠粘膜细胞增殖及凋亡的作用研究

李可洲[1]，杜成友[2]，黎介寿[3]，李　宁[3]

（1. 成都军区总医院普外科，成都　610083；2. 重庆医科大学临床学院普外科，重庆　400016；
3. 南京军区总医院普通外科　南京　210002）

【摘　要】目的：了解肝细胞生长因子(HGF)对大鼠移植小肠粘膜细胞增殖及凋亡状态的影响。方法：Wistar(RT1$^k$)大鼠行异位全小肠移植后第2天开始给予肠外营养至第10天，对照组($n$=10)行常规TPN支持，HGF组($n$=10)行常规TPN支持并加HGF，采用流式细胞技术及原位末端标记技术观察各组实验前后移植肠粘膜细胞增殖指数的变化。结果：两组移植前基准增殖指数及凋亡指数无显著差异($P$>0.05)，实验后对照组移植肠粘膜细胞增殖指数较移植前明显下降，HGF组增殖指数较移植前明显升高，对照组凋亡指数较移植前明显升高，HGF组凋亡指数增加不明显。结论：HGF能明显促进大鼠移植小肠粘膜细胞增殖，并减轻其凋亡，构成了其对移植肠形态及功能维护作用的物质基础。

【关键词】肝细胞生长因子；移植；完全胃肠外营养；增殖；凋亡

【中国图书分类法分类号】R329.2$^+$8；R622$^+$.9　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002-01-07

## The effect of hepatocyte growth factor(HGF) on graft mucosal cell proliferation and apoptosis after rat small bowel transplantation

*LI Kezhou, et al*

*(Department of General Surgery, Army's General Hospital of ChengDu)*

【Abstract】*Objective*: To study the effect of hepatocyte growth factor(HGF) on mucosal cell of small bowel isograft. *Methods*: Total small bowel transplantation was made with inbred Wistar(RT1$^k$) rats heterotopically, either total patenteral nutrition(TPN group, $n$=10) or hepatocyte growth factor supplemented TPN(HGF group, $n$=10) was used in recipients from POD2 to POD10. Proliferative index and apoptotic index were studied. *Results*: There were no apparent difference between proliferative index and apoptotic index in two groups before small bowel transplantation(SBT); PI decreased greatly and AI increased significantly in TPN group after SBT. There were no significant change in both PI and AI in HGF group after transplantation. *Conclusion*:Hepatocyte growth factor (HGF) can significantly enhance mucosal cell proliferation and inhibit cell apoptosis of isotransplanted small bowel graft.

【Key words】Hepatocyte growth factor; Transplantation; Total parenteral nutrition; Proliferation;Apoptosis

细胞的增殖和凋亡是机体的重要生理过程。小肠移植（SBT）时，多种因素导致移植小肠粘膜萎缩，结构受损和吸收功能低下，其中粘膜细胞增殖和凋亡状态的改变起着重要作用。

HGF具有改善肠道粘膜形态及增强肠吸收功能的作用[1]，本研究采用近交系大鼠SBT模型探讨HGF对移植小肠粘膜细胞增殖和凋亡改变的影响，探讨其对移植小肠的形态和功能支持的可能机理，为临床防治提供新的理论和实验依据。

## 1　材料与方法

作者介绍：李可洲（1966-），男，副主任医师，博士，
主要研究方向：胃肠外科，营养支持。

### 1.1　实验动物

雄性Wistar大鼠(体重240g－260g)作为小肠移植的供体和受体（中国科学院上海实验动物中心提供）。术前禁食12h。

### 1.2　主要试剂和仪器

细胞凋亡原位检测试剂盒（Boehringer Mannheim Biochemicals），碘化丙啶（Sigma），曲拉通X-100（Sigma），蛋白酶K（Promega）；Epics XL流式细胞仪（Coulter）。

### 1.3　实验模型

移植配对时供受体体重相近。采用盐酸氯胺酮(100mg/Kg)腹腔内注射麻醉，应用Soin[2]的改进方法施行异位全小肠移植。术后第2天，经右颈内静脉置入腔静脉导管约1.5cm，导管连接于旋转输液装置行TPN营养支持。

### 1.4　实验分组

移植大鼠随机分为对照组及肝细胞生长因子组(HGF

维普资讯 http://www.cqvip.com



组），对照组行常规TPN支持，HGF组在常规TPN支持基础上加用人胎肝细胞生长因子(fhHGF，北京军事医学科学院提供)150μg/kg/d。两组提供等热量（183kcal／kg/d），等氮量（1.5g／kg/d）。非蛋白热卡：氮=118kCal:1g。糖脂供能比6:4，以200ml/kg/d速度用微量输液泵持续均匀输入至术后第10日。

1.5 标本制备

于供体大鼠Treitz韧带下方5cm处切取空肠5cm，取其与Treitz韧带间近断端2cm空肠用于流式细胞分析，远断端3cm空肠留作细胞凋亡原位检测。受体大鼠接受SBT及TPN特殊营养支持10天后，剖腹取移植小肠近端5cm空肠段作标本，其近端2cm用于FCM分析，远端3cm留作细胞凋亡检测。将离体的新鲜标本制成单细胞悬液，将细胞浓度调整为$1\times10^{6}$／ml。取1ml以800r／min离心10min，弃上清，加1ml低渗碘化丙啶溶液对细胞核中的DNA染色，4℃过夜，次日上流式细胞仪分析。细胞凋亡原位检测标本的制备按TUNEL法操作。

1.6 标本检测

用流式细胞仪行移植肠粘膜细胞周期分析。排除碎片及粘连细胞的干扰分析10 000个细胞，结果输入Multicycle细胞周期分析软件分析$G_0$、$G_1$、S和$G_2$期细胞所占的百分比并得出增殖指数（proliferative index，PI），$PI=(S+G_2M)/(G_1G_0+S+G_2M)\times100\%$。

光镜随机观察20个隐窝／切片，记录标记阳性的凋亡细胞总数并计算出每个隐窝的凋亡细胞数即凋亡指数(Apoptotic index，AI)，AI=凋亡细胞总数/20。

1.7 统计学分析

实验结果以均数±标准差表示，采用Statistica（version 5.0）软件进行统计分析。$P<0.05$为差异有显著性。

## 2 结 果

### 2.1 移植肠粘膜细胞增殖指数(PI)变化

移植前对照组与HGF组间增殖指数(PI)无显著性差异($P>0.05$)。SBT及TPN支持后STPN组PI明显低于移植前基准，HGF组PI较移植前明显升高，两组间增殖指数变化差异明显(表1)。

表1 SBT及TPN支持前后两组移植肠上皮细胞增殖指数(PI)变化(%)

| 组别 | 数量 | SBT及TPN前 | SBT及TPN后 |
|---|---|---|---|
| TPN | 10 | 5.54 ± 2.16 | 2.23 ± 1.01★ |
| HGF | 10 | 4.93 ± 2.23 | 10.65 ± 2.58★☆ |

★:与SBT及TPN前比较，$P<0.05$；☆:与TPN组比较，$P<0.05$。

### 2.2 移植肠粘膜细胞细胞凋亡指数（AI）变化

移植前两组凋亡指数(AI)无明显差异($P>0.05$)。SBT及TPN支持后STPN组凋亡细胞明显增多，AI明显上升，HGF组AI轻度升高，较移植前基准无显著性差异（$P>0.05$）。STPN组AI升高程度明显大于HGF组(表2)。

表2 SBT及TPN支持前后两组移植肠上皮细胞凋亡指数(AI)变化

| 组别 | 数量 | SBT及TPN前 | SBT及TPN后 |
|---|---|---|---|
| TPN | 10 | 0.49 ± 0.05 | 0.96 ± 0.06★ |
| HGF | 10 | 0.48 ± 0.06 | 0.51 ± 0.05☆ |

★:与SBT及TPN前比较，$P<0.05$；☆:与TPN组比较、$P<0.05$。

## 3 讨 论

小肠粘膜细胞旺盛的代谢活动需要有充足的营养物质和能量的供应及促生长因子的刺激。肠粘膜的增殖情况代表了肠粘膜生长状态。在SBT时，营养物质和能量供应不足或生长刺激因子缺乏，缺血、缺氧、保存和再灌注损伤以及排斥、感染等因素使细胞及其超微结构受损后能量利用障碍[3]，粘膜上皮的细胞周期循环缺乏动力，粘膜增殖状态代谢低下，细胞得不到及时更新，结果发生粘膜萎缩和细胞死亡，导致移植小肠结构破坏和功能低下。

细胞凋亡是机体维持自身稳定的基本生理机制。器官移植时细胞凋亡具有重要意义，大鼠原位肝移植缺血/再灌注损伤的早期，无论是同基因移植还是异基因移植，均出现细胞凋亡。同种肾移植发生排斥反应时也观察到肾小管上皮凋亡的细胞数量增加。而在小肠移植急性排斥反应时，肠组织淋巴细胞浸润较少，腺管细胞却产生明显的凋亡[4]。近年来肝细胞生长因子(HGF)在肠道的作用开始受到重视，研究表明HGF能促进培养的小肠上皮细胞的数量增加和功能增强[5]，还能显著增加旷置小肠粘膜细胞重量并增强肠道吸收功能[6]。短肠大鼠使用HGF后残余小肠对氨基酸及糖的吸收均有明显的增加，DNA及蛋白质合成也增加使小肠上皮细胞的数量和粘膜体积维持在较高的水平，粘膜的葡萄糖转运蛋白1(SGLT1)和葡萄糖载体5(GLUT5)基因表达也明显增高[7]。

作者既往研究结果表明HGF对移植小肠粘膜形态、氨基酸吸收功能及粘膜双糖酶活性有较强的维护作用。本研究观察了HGF对移植小肠粘膜细胞增殖和凋亡的影响。HGF作用后移植肠粘膜细胞处于增生活跃状态，其增殖指数明显高于对照组移植小

维普资讯 http://www.cqvip.com



肠并较移植前基准增高，表明该组肠粘膜细胞的合成速度较快。细胞增生的数量大，则相应的凋亡的细胞数量也增加从而维持动态平衡，而该组凋亡细胞的数量却增加不明显，凋亡程度较移植前基准无明显加重，表明HGF不仅促进肠粘膜细胞增殖，对粘膜细胞的凋亡也有较强的抑制作用，使移植肠粘膜细胞的数量维持在较高的水平。

HGF对肝细胞的增殖和凋亡的作用较为明确。基因工程技术使小鼠基因突变肝细胞表达大量HGF，肝部分切除后，突变小鼠的肝脏增生加快[8]。HGF还可引起Bcl-xL的强烈表达从而阻断Fas及其配体的激活后的信号转导，减轻肝细胞凋亡及肝功能损害[9]。

HGF可通过其受体c-Met与上皮或内皮细胞结合，导致细胞分裂或分化增加，或细胞分离，运动能力增加。在包括小肠在内的许多器官均发现有HGF的存在，其受体c-Met也在小肠有较强的表达[10]。HGF可能通过外分泌、内分泌及旁分泌多种途径作用于其位于肠上皮细胞膜上的受体，但对受体磷酸化后细胞内复杂的信号转导过程目前尚缺乏了解。

本研究结果表明肝细胞生长因子(HGF)能明显促进移植肠上皮细胞增殖并抑制其凋亡。

## 参 考 文 献

[1] Kato Y, Yu D, Lukish JR,et al.Influence of luminal hepatocyte growth factor on small intestine mucosa mass in vivo [J].J Surg Res,1997;71:49-53.

[2] Soin AS, Friend PJ, Richard JK, et al. A modification to improve technical success rate of small bowel transplantation in rats[J]. Transplantation Proc, 1996;28(5):2722.

[3] Schroeder P, Scheizer E, Blomer A, et al. Glutamine prevents mucosal injury after small bowel transplantation[J]. Transplantation, 1992;24:1104-1107.

[4] Abu Eliragd, Tzakis A, Todo S, et al. Monitoring and treatment of intestinal allograft rejection in human[J].Transplant Proc,1993;25(12):1202-1203.

[5] Dignass AU, Lynch-Devaney K, Podolsky DK, et al. Hepatoocyte growth factor/scatter factor stimulates intestinal epithelial cell proliferation and migration[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1994;202:701-709.

[6] Kato Y, Yu D, Lukish JR, et al. Hepatocyte growth factor enhances intestinal mucosal cell function and mass in vivo[J]. J Pediatr Surg, 1997;32:991-994.

[7] Kato Y, Yu YD, Schwartz MZ, et al. Hepatocyte growth factor up-regulates SGLT1 and SGLT5 gene expression after massive small bowel resection[J]. J Pediatr Surg, 1998;33:13-15.

[8] Shiota G, Wang TC, Nakamura T, et al. Hepatocyte growth factor in transgenic mice:effects on hepatocyte growth ,liver regeneration and gene expression[J].Hepatology, 1994;19:962-964.

[9] Kosai K, Matsumoto K, Nagata S, et al. Abrogation of Fas-induced fulminant hepatic failure in mice by hepatocyte growth factor[J]. Biochem Biophys Res Commun,1998;244(3):683-690.

[10] Di-Renzo MF, Narsimhan RP, Olivero M, et al. Expression of the Met/HGF receptor in normal and neoplastic human tissues [J]. Oncogen, 1991;6:1997-2003.

（上接第387页）

## 参 考 文 献

[1] Tabilio A, Pelicci PG, Vinci G, et al. Myeloid and megakaryocytic properties of K562 cell lines[J]. Cancer Research, 1983; 43:4569-4574.

[2] Zhang Y, Jiang JK, Liu XS, et al. Differentiation and Apoptosis in K562 Erythroleukemia Cell Induced by Matrine [J]. Natural Medicine, 1998;52(4):295-299.

[3] 汪 宁. 细胞骨架刚性的调控与癌症的抑制[M]. 肿瘤分子生物学研究进展，第1版. 北京：军事医学科学出版社，1996;53-56.

[4] 胡金麟. 细胞流变学[M]. 第1版，北京：科学出版社，2000;40-69.

[5] 张丽萍，蒋纪恺，谭荣安，等. 苦参碱对K562细胞株端粒酶活性和细胞周期的影响[J]. 中华肿瘤杂志，1998;20(5):328-329.

[6] Rommelarer H, Deve MD, Neirynck K, et al. Prefoldin Recognition Motifs in the Nonhomologous Proteins of the Actin and Tubulin Families[J].J Bio Chem, 2001; 276(44):41023-41028.

[7] Hovens CM, Kaye AH. The tumour suppressor protein NF2/merlin: the puzzle continues [J]. J Clin Neurosci, 2001; 8(1):4-7.

[8] Louvet-Valles S. ERM proteins: from cellular architecture to cell signaling [J]. Bio Cell, 2000;95(5):305-316.