DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.19.024
第25卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 19
2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

文章编号:1000-5404(2003)19-1741-04

论著

大鼠烧伤后补充胰高血糖素样多肽-2对其相关基因表达的影响

赵 云,王凤君,王 裴,汪仕良 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 观察烧伤大鼠补充外源性胰高血糖素样多肽-2(Glucagons like peptide-2, GLP-2)后肠道的形态学变化以及胰高糖素原基因(PG)、胰高血糖素样多肽-2受体(GLP-2R)基因的改变,初步探讨GLP-2对肠道保护的作用机制。方法 55只Wistar大鼠随机分为烧伤组,GLP-2处理组(200 μg/kg,2次/d腹腔注射处理)与正常对照组。动物于伤后6、12 h,1、3、5 d处死,免疫组化检测细胞增殖核抗原(PCNA),观察肠道粘膜病理变化,RT-PCR法检测肠粘膜PG、GLP-2R mRNA表达的变化。结果 烧伤后6、12 h大鼠肠粘膜PCNA表达稍有增强,伤后1 d PCNA表达减弱,至伤后5 d仍低于正常;GLP-2组在伤后PCNA表达强于烧伤组;组织学观察GLP-2组肠绒毛排列较为规则,长短较为一致,未见明显的上皮脱落;与正常组相比,烧伤后大鼠PG mRNA表达伤后伤后12 h,1、3 d达高峰,给予GLP-2治疗后,PG mRNA表达无明显变化。而烧伤后大鼠GLP-2R mRNA表达下降,给予GLP-2治疗后,GLP-2R mRNA表达普遍升高。结论 烧伤后补充外源性GLP-2,能维持肠粘膜结构而不影响PG基因的表达,其对肠粘膜的保护作用可能与促进GLP-2R表达有关。

关键词:烧伤;肠道;胰高血糖素样多肽-2受体;胰高糖素原基因
中图法分类号:R644.02;R977.15;R394 文献标识码:A

Effects of GLP-2 on the mRNA expression of GLP-2R and PG in postburn rats

ZHAO Yun, WANG Feng-jun, WANG Pei, WANG Shi-liang (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of glucagon-like peptide-2(GLP-2) on the mRNA expressions of GLP-2 receptor (GLP-2R) and proglucagon gene(PG) in postburn rats. Methods A total of 55 Wistar rats were randomly divided into three groups including burn group, GLP-2-treatment group(treated with GLP-2, 200 μg/kg, *b.i.d*) and normal control group. Rats were sacrificed at 6, 12 h and 1, 3 and 5 d after burn injury. The proliferating cell nuclear antigen(PCNA) expression and the histological changes of the intestinal mucosa were determined by immunohistochemical staining. mRNA expressions of GLP-2R and PG were detected by RT-PCR at 6, 12 h and 1, 3 and 5 d after burn injury. Results The expression of PCNA in rat intestinal mucosa decreased at 1 d after burn injury, but it was stronger in GLP-2 treatment group than that in burn group. Histological observation revealed that intestinal villi in GLP-2 treatment group were regularly arranged without obvious epithelial shedding. PG mRNA expression peaked at 12 h, 1 and 3 d after burn injury. No change of PG mRNA expression was found after treatment with GLP-2. Decreased GLP-2R mRNA expression was found in postburn rats, but after treatment with GLP-2, increased GLP-2R mRNA expression was found. Conclusion GLP-2 supplementation can keep the structure of the postburn rat intestinal mucosa without affecting PG gene expression. The mechanism may probably be related to the promotion of the mRNA expression of GLP-2R of the intestinal mucosa in rats.

Key words: glucagon like peptide-2; glucagon like peptide-2 receptor; intestinal mucosa; burn

肠道是外科应激的中心器官之一,严重创(烧)伤可使肠粘膜受损,肠道的免疫、屏障功能下降,从而一方面引发炎症因子介导失控性炎症反应,另一方面导致肠源性感染、多器官功能障碍等一系列问题。因此如何促进肠粘膜的修复,维护肠道功能已成为影响临床综合救治水平的重要因素。最近,一种具有特异性的内源性肠粘膜细胞保护性多肽——胰高血糖素样多肽-2(Glucagon like peptide-2, GLP-2)正引起人们的极大关注[1]。GLP-2是胰高糖素原基因(Proglucagon gene, PG)表达的产物之一,属于胰高血糖素原衍生肽类(Proglucagon-derived peptide, PGDP),其生物学效应是通过GLP-2受体(Glucagon like peptide-2 receptor, GLP-2R)来完成,本研究观察了大鼠烧伤补充外源性GLP-2后肠道的形态学变化以及PG、GLP-2R基因的改变,旨在初步探讨GLP-2对肠道保护的作用机制。

作者简介:赵 云(1972-),男,天津市人,博士研究生,主要从事烧伤后肠道损伤及修复方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754670

收稿日期:2003-07-07;修回日期:2003-08-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组

健康Wistar大鼠55只(第三军医大学实验动物中心)，雌雄不限，体质量(200±20)g；致背部30%TBSA Ⅲ度烧伤，伤后注射林格液(40 ml/kg)抗休克。动物随机分为烧伤组和GLP-2处理组(GLP-2由美国peptides公司合成，氨基酸序列见文献[2]，纯度99%，按200 μg/kg，2次/d腹腔注射，剂量选择参考文献[3])，每组25只大鼠。动物分别于伤后6、12、24 h及3、5 d处死，每个时相点5只。正常对照组5只大鼠。

1.2 检测指标

1.2.1 免疫组化检测细胞增殖核抗原(PCNA) 取常规石蜡包埋空肠组织切片用多聚赖氨酸包被，脱蜡、水化后，PBS(0.01 mol/L，pH 7.4)冲洗5 min，3次。每张切片加入50 μl过氧化物酶阻断剂(0.3%甲醇)，并在室温孵育10 min，PBS漂洗5 min，3次，加入50 μl含10%(体积分数)山羊血清，室温孵育10 min后弃去，加入50 μl 1∶50稀释的PCNA单抗(购自美国Santa Cruz公司)，同时用羊血清代替一抗做阴性对照，4 ℃孵育过夜。PBS漂洗3次，加入50 μl生物素标记的二抗，孵育10 min，PBS漂洗3次，加入50 μl链亲和素-HRP，室温孵育10 min，PBS漂洗3次，最后加入100 μl DAB显色5 min，苏木精复染。漂洗后用中性树胶封片，Olympus显微镜下观察照像。

1.2.2 RT-PCR检测胰高糖素原基因(PG)基因表达 根据引物设计原则，在Genbank中找到大鼠PG基因全长序列，采用http://www.genome.wi.mit.edu提供的软件进行引物设计。由上海生工公司合成，序列为：上游：5′ATT CAC AGG GCA CAT TCA CC 3′下游：5′CCA GTT GAT GAA GTC TCT GG 3′。片段大小：325 bp。采用一步法提取肠粘膜总RNA，试剂盒购自华舜公司，所用器材均经0.1%DEPC水做无RNA酶处理，操作过程均在超净工作台中完成。RT-PCR采用Promega公司提供的一步法扩增试剂盒，扩增条件为：48 ℃逆转录45 min，95 ℃变性2 min，PCR循环94 ℃变性30 s，50 ℃退火1 min，68 ℃延伸1 min，共40个循环，68 ℃ 7 min后4 ℃保存，用于电泳检测。结果以灰度值表示，以正常组为对照。

1.2.3 RT-PCR检测GLP-2R基因表达 引物设计、试剂盒与方法均同PG测定，引物序列为：GLP-2R：上游：5′GTC TCT CAT CTC CCT CCT CCT G 3′，下游：5′CCA GCA CCG TGT GTT CTC CTC 3′片段大小：430 bp。

1.2.4 肠道粘膜组织学观察 取10%甲醛固定空肠组织，常规脱水、石蜡包埋、沿肠腔纵向切片，HE染色，显微镜下观察照像。

1.3 统计学方法

计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，采用配对t检验，计数资料采用χ^2检验。

2 结果

2.1 肠粘膜细胞增殖核抗原(PCNA)的变化

正常组大鼠空回肠粘膜基底部及绒毛上皮PCNA呈强阳性表达，烧伤后6、12 h PCNA表达稍有增强，伤后1 d PCNA表达减弱，伤后3 d最低，伤后5 d仍低于正常；GLP-2组在伤后早期变化基本与烧伤组一致，但伤后3、5 d，GLP-2组PCNA表达要强于烧伤组，见图1，2。



图1 烧伤组3 d后大鼠肠粘膜PCNA表达减弱 (DAB×400)

Fig 1 Decreased expression of PCNA in the intestinal mucosa in rats at 3 d after burn injury in burn group (DAB×400)



图2 烧伤后3 d，GLP-2组PCNA表达稍强于烧伤组 (DAB×400)

Fig 2 Enhanced PCNA expression in the intestinal mucosa in rats at 3 d after burn in GLP-2 group (DAB×400)

2.2 烧伤后大鼠肠粘膜胰高糖素原基因(PG)mRNA表达的变化

与正常组相比，烧伤后大鼠PG mRNA表达伤后6 h降低，但伤后12 h即开始升高，伤后3 d达高峰，为伤前4.6倍，伤后5 d又迅速降低至正常的0.6倍，给予GLP-2治疗后，PG mRNA表达除第3 d外，基本变化与烧伤组一致，见图3。

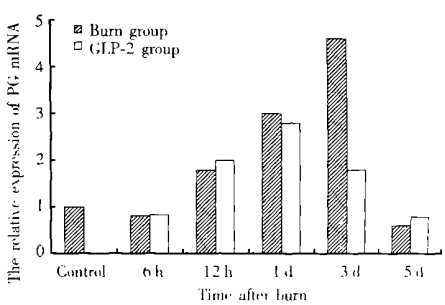


图3 烧伤后大鼠肠粘膜PG mRNA相对表达量的变化

Fig 3 Changes of the relative expression of PG mRNA in intestinal mucosa after treatment with GLP-2 in burned rats

2.3 烧伤后大鼠肠粘膜GLP-2R mRNA表达的变化

与正常组相比，烧伤后大鼠GLP-2R mRNA表达下降，伤后6 h为伤前0.4倍，伤后3d降至最低仅为伤前的0.1倍，而给予

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

GLP-2 治疗后, GLP-2R mRNA 表达普遍升高, 见图 4。

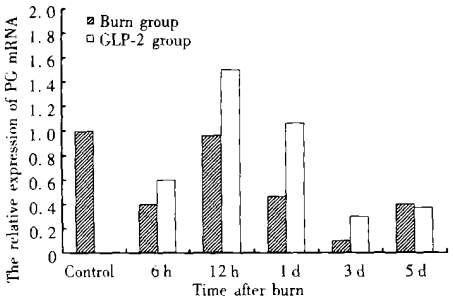


图 4　烧伤后大鼠肠粘膜 GLP-2R mRNA 相对表达量的变化

Fig 4　Changes of the relative expression of GLP-2R mRNA in intestinal mucosa after treatment with GLP-2 in burned rats

2.4　烧伤后肠粘膜病理学观察

正常大鼠肠绒毛排列整齐, 上层细胞完整, 呈柱状, 刷状缘清楚。烧伤后大鼠空肠粘膜变薄, 绒毛变短、肿胀且排列不规则, 上皮细胞部分脱落, 间质血管扩张充血, 可见中性粒细胞侵润。而 GLP-2 组在伤后 6~12 h, 变化基本同烧伤组, 但伤后 1 d 后 GLP-2 组损伤比烧伤组有所减轻, 伤后 3 d 最为明显, 绒毛排列较为规则, 长短较为一致, 未见明显的上皮脱落, 见图 5, 6。



图 5　烧伤组 3 d 后, 肠粘膜结构破坏, 部分绒毛断裂, 固有层水肿, 粘膜坏死　(HE×100)

Fig 5　Intestinal mucosa injured including part of the villi broken, swelling of lamina propria and necrosis of mucosa　(HE×100)



图 6　GLP-2 处理组病变较烧伤组减轻　(HE×100)

Fig 6　Pathological changes of the intestinal mucosa abated in GLP-2 treatment group (compared with those in burn group)　(HE×100)

3　讨论

随着人们对肠道在严重烧伤后作用的认识, 如何促进肠道损伤修复已成为影响临床综合救治水平的重要因素。近年来, 一种新的胃肠肽—胰高血糖素样多肽-2(GLP-2)对肠道特异性的保护作用引起学者的极大关注[3,4], GLP-2 是胰高血糖素原基因(PG)表达的产物之一。

PG 主要表达于胰腺 A 细胞及肠道的 L 细胞, 其在肠道主要产生胰高血糖素原衍生肽类, 其中氨基酸序列 78~107 位为 GLP-1, GLP-2 位于 126~158 位, 是由 33 个氨基酸组成的单链多肽, 在哺乳动物中具有高度保守性, 在体内主要由肠道 L 细胞分泌, 被二酰肽肽酶分解后由肾脏排出[5]。1996 年, Drucker 等[2] 首先报道了 GLP-2 具有促进肠粘膜增殖与生长的功能, 进一步的研究发现, GLP-2 具有增加小肠重量、肠壁厚度、绒毛高度、促进肠道损伤后肠粘膜修复, 细胞增殖以及抗凋亡的作用[6~8]。本研究进一步证实烧伤后腹腔给予 200 μg/kg, 2 次/d 的 GLP-2 后, 能够减轻肠粘膜损伤; 与烧伤组相比, GLP-2 治疗组肠绒毛排列较规则, 长短一致, 腺体较丰富, 无明显的粘膜萎缩, PCNA 表达增加, 提示 GLP-2 能促进肠粘膜的增殖。尽管目前对 GLP-2 的促肠粘膜修复作用较肯定, 但其分子机制尚不清楚。1999 年 Munroe 等率先成功地克隆了 GLP-2 受体(GLP-2R)基因, 并证明 GLP-2 R 是 G 蛋白偶联受体超家族成员。GLP-2R 主要表达于胃肠道, 其分布密度高低依次为空肠、十二指肠、回肠、结肠、胃, 而其它组织则无可检测的 GLP-2 R 表达。GLP-2 R 仅对 GLP-2 有激动反应, 对其它相关 PGDP 肽类则无反应, 其激动反应表现为刺激腺苷酸环化酶活性, 诱导大量 CAMP 产生, 故推测 GLP-2 对肠道的作用是通过特异性 GLP-2R 所介导的 CAMP 依赖性信号转导途径而实现的[9]。

本实验中, 我们检测了大鼠烧伤后肠粘膜中 PG、GLP-2R 基因的表达, 结果表明 PG mRNA 表达除第 3 天外基本变化与烧伤组一致。说明给予外源性的 GLP-2 后, PG 基因的表达未受影响。但 PG 基因的表达产物较多, 因此 PG mRNA 表达的水平尚不能代表 GLP-2 的变化。因此我们还利用 RT-PCR 检测了 GLP-2 受体 mRNA 表达的变化。它对于解释 GLP-2 的作用机制有重要意义, 结果显示, 烧伤后外源性补充 GLP-2 可能促进 GLP-2R 表达以发挥其肠道保护的生物学效应。但 GLP-2 与 GLP-2R 结合后的作用机制尚不清楚, Yusta 等[10] 研究结果提示, GLP-2 R 可能与丝裂原信号途径偶联而介导肠粘膜上皮细胞增殖。另有研究资料表明, GLP-2 明显促进肠粘膜上皮细胞增殖, 并伴有磷

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

酸化型细胞外信号调节激酶(Extracellular signal-regulated kinase, ERK)蛋白水平的增加,且 GLP-2 的促肠粘膜上皮细胞作用能分别被特异性的酪氨酸蛋白激酶抑制剂、磷脂酸肌醇 3-激酶(PhOS-phatidylinositide 3-kinase, PI3-K)抑制剂、丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)抑制剂所阻断。由此可见,GLP-2 的分子作用机制中所涉及的信号转导途径是极为复杂的,既有 CAMP 依赖性蛋白激酶途径,也有 PI3-K和 MAPK 途径参与。最新的研究也表明,GLP-2 通过抑制 caspase-3、caspase-8、caspase-9 酶活性而抑制细胞凋亡是多种信号转导途径介导的[11]。因此,对于 GLP-2 作用的分子机制,仍需进一步深入研究。

参考文献:

[1] Burrin D G, Stoll B, Guan X. Glucagon-like peptide 2 function in domestic animals[J]. Domest Anim Endocrinol, 2003, 24(1): 103—122.
[2] Drucker D J, Erlich P, Asa S L, *et al*. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2[J]. Proc Natl Acad Sci, 1996, 93(15): 7911—7916.
[3] Drucker D J. Minireview: the glucagon-like peptides[J]. Endocrinology, 2001, 142(2): 521—527.
[4] Gordon D. GLP-2 cloning may lead to therapy for intestinal deficiency diseases[J]. Gastroenterology, 1999, 116(4): 786—789.
[5] Holst J J. Enteroglucagon[J]. Annu Rev Physiol, 1997, 59: 257—271.
[6] Benjamin M A, McKay D M, Yang P C, *et al*. Glucagon-like peptide-2 enhances intestinal epithelial barrier function of both transcellular and paracellular pathways in the mouse[J]. Gut, 2000, 47(1): 112—119.
[7] 赵 云, 王凤君, 王 裴, 等. 胰高血糖素样肽-2 对大鼠烧伤后肠粘膜上皮细胞凋亡的影响[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(7): 764—766.
[8] 赵 云, 王凤君, 王 裴, 等. 胰高血糖素样肽-2 对烧伤后大鼠肠粘膜细胞增殖的影响[J]. 中华烧伤杂志, 2003, 19(4): 209—212.
[9] Brubaker P L, Drucker D J. Structure-function of the glucagon receptor family of G protein-coupled receptors: the glucagon, GIP, GIP-1, and GLP-2 receptors[J]. Receptors Channels, 2002, 8(3-4): 179—188.
[10] Yusta B, Huang L, Munroe D, *et al*. Enteroendocrine localization of GLP-2 receptor expression in humans and rodents[J]. Gastroenterology, 2000, 119(3): 744—755.
[11] Yusta B, Boushey R P, Drucker D J. The glucagon-like peptide-2 receptor mediates direct inhibition of cellular apoptosis *via* a cAMP-dependent protein kinase-independent pathway[J]. J Biol Chem, 2000, 275(45): 35345—35352.

(编辑 刘洪娥)

个案与短篇

文章编号: 1000-5404(2003)19-1744-01

输卵管原发性乳头状腺癌 1 例

A case report of primary oviductal papillary adenocarcinoma

刘小艳, 龙 玲, 常 青 (第三军医大学附属西南医院妇产科, 重庆 400038)

患者, 女, 52 岁, 因"月经紊乱 4 年, 阴道流血半年, B 超显示盆腔包块 2 d"至某县医院就诊。查体: 生命体征平稳, 心肺无阳性发现, 腹软, 未扪及肿块。妇检: 阴道通畅, 内见淡黄色液体; 宫颈肥大, 宫体大小正常; 左侧扪及约 7 cm× 4 cm× 3 cm 囊性包块, 表面光滑, 可活动, 无压痛, 右侧附件未见异常。B 超: 左侧盆腔探及 6.7 cm× 3.4 cm× 3.1 cm 卵圆形包块, 囊前壁及右侧壁探及 4.7 cm× 2.0 cm 实性中等回声。考虑"左侧卵巢浆液性囊腺瘤"。于 2002 年 2 月 5 日在当地医院持续硬膜外麻醉下行剖腹探查术。术中见左侧输卵管壶腹部腊肠样增粗, 约 5 cm× 4 cm× 4 cm, 浆膜完整, 右侧输卵管充血水肿; 双侧卵巢、子宫均未见异常, 取病变输卵管组织作快速冰冻病理检查, 报告为良性肿瘤, 遂行双侧输卵管切除术。术后病理报告为"左侧输卵管原发性乳头状腺癌"。患者拒绝进一步治疗, 切口拆线后自动出院。

作者简介: 刘小艳(1979—), 女, 四川省绵阳市人, 护士, 主要从事妇科护理方面的研究。电话: (023)68754000—73145

收稿日期: 2003-02-18; 修回日期: 2003-06-20

讨论

输卵管原发性乳头状腺癌是女性生殖系统中罕见的恶性肿瘤, 发病率约占女性生殖系统恶性肿瘤的 0.18%~1.6%[1]。该病病因不明, 可能与输卵管炎症及不育史有关, 多发于一侧。大体病理观察为输卵管腊肠样增粗似慢性炎; 镜下瘤组织呈乳头状、腺管状结构, 乳头被覆单层或多层异形上皮, 呈柱状或立方状, 无纤毛, 细胞大小不等, 核深染, 可见核分裂像[2,3]。临床表现主要为: ①阴道排液, 量多少不等, 阴道不规则流血; ②下腹持续性疼痛, 间歇性绞痛; ③下腹部包块。前二者称为"二联症", 三者均有则称为"三联症"。但由于输卵管原发性乳头状腺癌在临床诊断中罕见, 医生警惕性和认识程度不够, 误诊率极高, 即使在剖腹探察时也常难以确定性质。据统计术前确诊率仅约为 0.5%~6.5%[4]。本例虽在术中作快速冰冻切片检查, 但因取材部位的偏差及病理医师对此类罕见疾病诊断经验的缺乏, 以致术中未能及时明确诊断。林秋华等[5] 提出, 凡遇以下情况时应高度警惕本病: ①出现典型二联症或三联症时; ②阴道长期不规则流血; ③阴道长期"白带"或分泌物过多; ④长

(下转 1747 页)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net