DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.07.006
第24卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 7
764 2002年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)07-0764-03

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

赵 云,王凤君,王 裴,汪仕良 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨大鼠烧伤后肠粘膜上皮细胞凋亡情况及胰高血糖素样肽-2(GLP-2)对其的影响。方法 75只Wistar大鼠随机分为烧伤组、GLP-2治疗组与正常对照组。动物于伤后6、12 h、1、3、5 d处死,检测肠粘膜上皮细胞凋亡数、Caspases-3酶活性及Bcl-2 mRNA表达的变化。结果 烧伤后6 h~5 d肠上皮凋亡细胞数较正常组明显增加,GLP-2治疗后在伤后6、12 h、1 d、3 d、5 d均明显低于烧伤组;caspase-3的活性在伤后1 d明显升高,伤后3 d到峰值,然后迅速下降至正常范围内,GLP-2组caspase-3活性只在伤后3 d明显高于伤前,而与烧伤组相比则在伤后1、3 d活性明显降低。肠粘膜Bcl-2mRNA表达在伤后12 h开始低于正常,至伤后5 d仍低于正常,GLP-2组Bcl-2基因表达在伤后1、3、5 d低于于正常组,但与烧伤组相比,GLP-2组在伤后12 h、1 d、3 d、5 d高于烧伤组。结论 GLP-2可降低烧伤后肠粘膜上皮细胞凋亡,其机制可能与降低Caspases-3酶活性,促进Bcl-2mRNA表达有关。

关键词:烧伤;肠道粘膜;胰高血糖素样多肽-2;凋亡
中图法分类号:R322.45;R644;R977.15 文献标识码:A

Effect of glucagon like peptide-2 on apoptosis of intestinal mucosa in burned rats

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

Abstract: Objective To explore the effect of glucagon like peptide-2 (GLP-2) on the apoptosis of intestinal epithelial cells in burn rat. Methods Wistar rats with 30% total body surface area III degree burns were randomly divided into 3 groups: burn group, GLP-2 treated group and normal control group. Animals were killed 0, 6, and 12 h, and 1, 3, and 5 d after burn. The apoptosis of intestinal epithelial cells, activity of caspase-3, and expression of Bcl-2 mRNA were detected. Results The apoptosis of mucosal epithelial cells was significantly increased in rats of burn and GLP-2 treated groups, but the apoptosis of GLP-2 treated group was lower than burn group at 6 h, 1, 3, and 5 d postburn. The activity of caspase-3 was increased on 1 d and reached the peak on 3 d postburn in burn group, and was lower in GLP-2 treated group than burn group on 1 and 3 d postburn. The expression of Bcl-2 mRNA was decreased in 12 h postburn in both groups, however GLP-2 treated group was higher than burn group in 12 h, and 1, 3, and 5 d postburn. Conclusion GLP-2 may protect intestinal mucosa from apoptosis in burned rats. The mechanism of protection maybe due to the inhibiting of the activity of caspase-3 and promoting the expression of Bcl-2.

Key words: burn; intestine mucosa; glucagons like peptide-2; apoptosis

肠道粘膜屏障功能的下降是导致烧(创)伤后肠道损伤,引发肠源性感染与高代谢的重要原因,探讨烧伤后肠道功能受损的机制及寻找肠道特异性保护剂成为临床救治的重要课题之一。近年来,一种特异性的肠道生长因子-胰高血糖素样肽-2(Glucagon like peptide-2, GLP-2)对肠道的作用正引起人们的关注。研究表明:由肠道L-细胞分泌的GLP-2对肠粘膜上皮细胞有促进增殖,保护肠道功能,促进肠道损伤后的修复等作用[1],但对肠上皮细胞凋亡,尤其是烧伤后肠道缺血缺氧引起的细胞凋亡的研究甚少。本实验拟通过探讨大鼠烧伤后肠粘膜上皮细胞凋亡情况及GLP-2对其的影响,为烧伤后肠道功能的保护提供新的思路。

基金项目:重庆市院士基金资助项目(1999-08)
作者简介:赵 云(1972—),男,云南省昆明市人,硕士,技师,主要从事烧伤后代谢营养方面的研究,发表论文5篇。电话:(023)68754670
收稿日期:2001-06-26;修回日期:2002-02-25

1 材料和方法

1.1 动物模型与分组

健康Wister大鼠55只(第三军医大学实验动物中心),雌雄不拘,体重(200±20) g;按文献[2]方法致背部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治疗组(GLP-2由美国多肽公司合成,按200 μg/kg体重2次/d腹腔注射治疗),每组25只大鼠。动物分别于伤后6 h、12 h、24 h、3 d、5 d处死,每个时相点5只大鼠。另取5只正常大鼠作为正常对照组。

1.2 肠粘膜上皮细胞的提取

参照文献[3]方法加以改进。取大鼠小肠段约8 cm,用D-Hanks液冲洗后剖开,用滤纸轻轻吸去粘液及杂质。将肠段剪成小块,放入10 mmol/L的二硫苏糖醇(DTT) 30 min。将DTT倒掉,加入含1 mmol/L EDTA的D-Hanks液,4 ℃静置1 h。振荡数下,用滤网粗滤,收集滤液,再用180目滤膜过滤,弃滤液,用5 ml DMEM培养液反冲180目滤膜,由于肠上皮细胞大于180目,将留置于滤膜上,收集反冲液。4 ℃,500 r/min离心10 min。弃上清,加入1 ml胰酶,37 ℃,水浴5 min。加入1 ml DMEM培养液。4 ℃,500 r/min离心10 min,弃上清,视情况加入1或2

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

ml DMEM 培养液, 镜下细胞记数。分别取 10^6 个细胞进行流式细胞检测和 Caspases-3 的测定。

1.3　检测指标

1.3.1　Anneix V-Flous 法检测肠粘膜上皮细胞凋亡　Anneix V-Flous 试剂盒购自 Boehringer Mannheim 公司, 取 10^6 个肠上皮细胞, PBS 冲洗, 1 000 r/min 离心 5 min 沉淀后, 加入 100 μlAnneix V-Flous 标记液, 室温孵育 15 min, 上流式细胞仪记数 10 000 个细胞, 检测凋亡细胞数。

1.3.2　肠上皮细胞 Caspases-3 酶活性检测　10^6 个肠上皮细胞 1 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 加入 50 μl 细胞裂解液, 冰浴 10 min, 15 000 r/min, 4 ℃离心 3 min, 取上清加入 50 μl 反应缓冲液, 5 μl 1 mmol/L 的酶作用底物 DEVD-AFC, 37 ℃水浴 1 h, 荧光分光光度计激发波长 400 nm, 发射波长 505 nm 测定 Caspases-3 活性, 以荧光强度(F)表示。

1.3.3　RT-PCR 检测肠粘膜 Bcl-2 的表达　根据引物设计原则, 在 Gene bank 中找到大鼠 Bcl-2 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′CCT GTG CCA CCA TGT GTC CAT 3′下游: 5′GCT GAG AAC AGG GTC TTC AGA GAC 3′, 片段长度为 430 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 ℃反转录 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。

1.4　统计学方法

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

2　结果

2.1　肠粘膜上皮细胞凋亡的变化

烧伤后 6 h 肠上皮凋亡细胞数较正常组就有明显升高, 伤后 1 d 达到高峰, 以后逐渐下降, 但各时相点与正常组相比均显著升高($P<0.01$), GLP-2 治疗后凋亡数下降, 基本处于正常水平, 并在伤后 6 h、1、3、5 d 明显低于烧伤组($P<0.05\sim0.01$), 见表 1。

表 1　烧伤后大鼠肠粘膜上皮凋亡细胞数的变化(个/10^5 细胞, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of apoptotic intestinal epithelial cells in burned rats(cells/10^5 cells $\bar{x}\pm s$)

Group	Normal	Time after burn				
		6 h	12 h	1 d	3 d	5 d
Burn	3.67±1.5	12.80±0.76 ##	16.10±1.10 ##	23.44±1.63 ##	19.94±1.51 ##	12.30±0.98 ##
GLP-2	3.67±1.5	5.20±0.81 **	13.20±1.21 ##**	2.14±0.62 **	2.70±0.41 **	7.90±1.32 #**

#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* normal; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* burn group

2.2　烧伤后肠上皮细胞 Caspase-3 活性的变化

烧伤后大鼠肠上皮细胞 Caspase-3 的活性在伤后 1 d 明显升高, 伤后 3 d 到峰值, 然后迅速下降至正常范围内。GLP-2 组 Caspase-3 活性基本在正常范围, 只在伤后 3 d 明显高于伤前, 但与烧伤组相比在伤后 1、3 d, Caspase-3 酶活性明显降低($P<0.05\sim0.01$), 见表 2。

表 2　烧伤后大鼠肠上皮细胞 Caspase-3 酶活性的改变(荧光强度, F, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of activity of caspase-3 of intestinal epithelial cells in burned rats (Fluorescent intensity, $\bar{x}\pm s$)

Group	Normal	Time after burn				
		6h	12h	1d	3d	5d
Burn	293.08±39.54	313.9±18.58	296.76±25.19	460.52±123.29 #	1152.85±224.59 ##	279.31±29.79
GLP-2	293.08±39.54	286.52±44.75	249.23±41.95	251.84±102.89 *	515.88±46.44 #**	241.83±74.60

#: $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* normal; *: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* burn group

2.3　凋亡调控因子 Bcl-2 mRNA 表达的变化

烧伤后大鼠肠粘膜 Bcl-2 mRNA 表达在伤后 6 h 即有升高, 但在伤后 12 h 开始低于正常, 伤后 1 d 最低, 只有伤前的 0.35 倍, 至伤后 5 d 仍低于正常; GLP-2 治疗组 Bcl-2 基因表达在伤后 1、3、5 d 低于于正常组, 但与烧伤组相比, GLP-2 组在伤后 12 h、1、3、5 d 高于烧伤组, 伤后 1 d 是烧伤组的 2 倍, 见图 1。

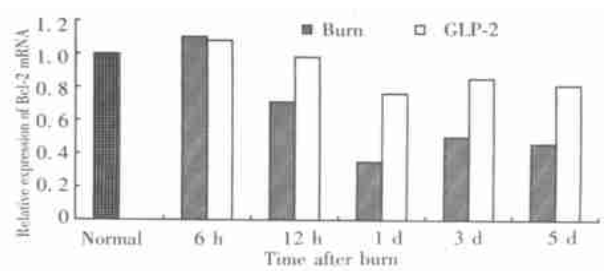


图 1　烧伤后大鼠肠粘膜 Bcl-2 mRNA 相对表达量的变化

Fig 1　Changes of relative expression of Bcl-2 mRNA in intestinal mucosa in burned rats

3　讨论

3.1　烧伤后肠粘膜细胞凋亡的情况

探讨烧伤后肠粘膜损伤机制对于全身的综合治疗是一个重要的课题。以往的研究表明烧伤后肠道损伤主要有两方面的原因: 一是严重缺血缺氧造成肠粘膜的直接损伤, 二是伤后肠道细菌移位、炎症介质释放、细胞因子级联放大效应等造成的继发性损伤。其最终结果是肠粘膜细胞稳态破坏即生长与丢失的动态平衡被打破, 细胞丢失、萎缩, 粘膜屏障受损, 功能障碍, 如未得到纠正, 则进入恶性循环。最近的研究表明, 细胞凋亡在维持肠粘膜细胞稳态中起着重要的作用[4]。正常肠粘膜是人体内更新最快的组织之一, 具有增殖能力的肠上皮干细胞从隐窝基底部沿隐窝-绒毛轴向绒毛顶端移行, 并逐渐分化成熟, 最终在绒毛顶端呈现出一系列凋亡特征, 脱落入肠腔[5]。以往对细胞凋亡的研究主要集中于肿瘤病因学与体外实验上。而对烧伤后肠道细胞凋亡涉及不多, 但近年来, 一些学者已逐渐发现在严重缺血缺氧、烧伤等病理条件下, 肠道粘膜存在细胞凋亡[6,7]。烧伤后肠粘膜细胞凋亡是多基因调控的结果, 从本研究结果可看出, 烧伤后肠粘膜细胞凋亡增加, 尤以伤后 1、3 d 最为明显, Caspase-3、Bcl-2 参与了烧伤后肠粘膜细胞凋亡的调控。以往我们的研究

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

证实，烧伤后 6～24 h，肠道血流量、氧摄取率、细胞能荷下降最为显著，这种时间顺序说明烧伤后严重的缺血缺氧可能是引起细胞凋亡的外界刺激信号，严重缺氧的后果之一是可引起细胞线粒体损伤，而线粒体肿胀、内膜通透性改变可使细胞色素 C 和凋亡诱导因子（AIF）释放，细胞色素 C 可激活 Caspases，进入凋亡级联反应，而 AIF 可直接快速诱导凋亡[8,9]。另外，烧伤后氧自由基、炎症介质的大量产生，可通过以下途径诱导凋亡：①直接损伤 DNA 引起凋亡；②与细胞膜上的死亡因子 Fas/TNFR 上的死亡域相结合，改变其构相，从而激活天冬氨酸半胱氨酸酶（Caspases）级联反应，诱导凋亡；③可通过调节凋亡相关基因如 P53、Bcl-2 等诱导凋亡。但其机制尚需进一步研究。

3.2 胰高血糖素样肽-2 对烧伤后肠粘膜细胞凋亡的影响

烧伤后肠道是受损最严重的器官之一，由于缺血缺氧，肠粘膜屏障、免疫等功能均受到损害，从而导致肠道细菌/内毒素移位，全身性炎症反应及 MODS。因此，促进肠粘膜损伤的修复，已成为烧伤综合救治措施中的重要手段。目前的资料表明，一些生长因子（IGF、EGF 等），生长激素等对烧伤后肠粘膜修复具有促进作用。但它们的作用缺乏特异性，除了作用于肠粘膜上皮细胞外，还作用于其他组织细胞，因此在临床的应用中还存有争议。近年来一种新的具有促进肠粘膜生长及损伤后修复的多肽-胰高血糖素样多肽-2（GLP-2）正逐渐引起人们注意，它最大的特点就是具有对肠道的特异性。GLP-2 属于胰高血糖素原衍生肽类（PGDP），是胰高血糖素原（PG）基因在肠道表达产物，位置为第 125～158 氨基酸。1996 年，Drucker 等[10] 首先发现 GLP-2 对肠粘膜有特异性的促生长作用。Brubaker 等[11] 的研究也表明 GLP-2 能明显促进小鼠肠粘膜 RNA 及蛋白质合成，使肠道成熟的标志酶活性升高，证实 GLP-2 不仅促进肠上皮细胞增殖，而且也促进其分化。在炎症性肠疾病，肠道缺血/再灌注的实验研究中也证实，GLP-2 具有防止肠粘膜萎缩，减轻肠道溃疡生长，加快愈合等作用[12,13]。但 GLP-2 对肠上皮细胞作用的研究主要集中在细胞增殖及效果的观察上，对细胞凋亡作用的研究甚少。本研究中补充外源性 GLP-2 可降低烧伤后肠粘膜细胞凋亡，维护肠粘膜功能，其可能系通过降低 Caspase-3 活性、增加 Bcl-2 表达来抑制凋亡。对 GLP-2 的深入研究可能为烧伤后肠内、肠外营养治疗提供新的思路。

参考文献：

[1] Drucker D J, Boushey R P, Wang F, *et al*. Biologic properties and therapeutic potential of glucagon-like peptide-2[J]. J Parent En, 1999, 23(5): S98－100.

[2] 黎 鳌, 杨宗城, 肖光夏. 实验烧伤外科学[M]. 重庆: 重庆大学出版社, 1996. 35.

[3] Johannes G, Julie M, Cecilia M, *et al*. New isolation technique to study apoptosis in human intestinal epithelial cells[J]. Am J Path, 1998, 153(1): 53－62.

[4] Watson A J. The role of apoptosis in intestinal disease[J]. J Gastroenterol, 1997, 32(3): 414－423.

[5] Potten C S, Booth C, Pritchard D M. The intestinal epithelial stem cell: the mucosal governor[J]. Int J Exp Pathol, 1997, 78(4): 219－243.

[6] 袁建成, 李艳萍, 秦孝建 等. 细胞凋亡在严重烧伤大鼠肠粘膜屏障损伤中的作用[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(6): 715－717.

[7] Wolf S E, Ikeda H I, Matin S, *et al*. Cutaneous burn increases apoptosis in the gut epithelium of mice[J]. J Am Coll Surg, 1999, 188(1): 10－16.

[8] Susin S A, Zamzami N, Kroemer G. Mitochondria as regulators of apoptosis: doubt no more[J]. Biochim Biophys Acta, 1998, 1 366(2): 151－165.

[9] Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, *et al*. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis[J]. FEBS Lett, 2000, 476(1): 118－123.

[10] Drucker D J, Ehrlich P, Asa S L, *et al*. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagons-like peptide 2[J]. Proc Natl Acad Sci, 1996, 93(4): 7 911－7 916.

[11] Brubaker P L, Izzo A, Hill M, *et al*. Intestinal function in mice with small bowel growth induced by glucagons-like peptide-2[J]. Am J Physiol, 1997, 272(6): 1 050－1 058.

[12] Chance W T, Foley-Nelson T, Thomas I, *et al*. Prevention of parenteral nutrition induced gut hypoplasia by coinfusion of glcagon like peptide-2[J]. Am J Physiol, 1997, 273(8): 559－563.

[13] Boushey R P, Yusta B, Drucker D J. Glucagon-like peptide-2 decrease mortality and reduces the severity of indomethacin-induced murine enteritis[J]. Am J Physiol, 1999, 273(5): 937－947.

（编辑 陈聪连）

（上接 763 页）

抽有回血，未引起重视，继续推注，使药液外渗，虽采取局部封闭，冰敷，仍造成局部皮肤红斑、溃疡，经溃疡贴换药，15 d 后创面逐渐好转。

3 讨论

长春瑞滨注射液是一种新型半合成长春碱类抗癌药，对血管毒性较为明显，易引起静脉炎。原因可能是药物化学性刺激血管内皮细胞、血小板或/及嗜酸性粒细胞，导致组织胺和 5－HT 等介质释放，血管通透性增加，引起静脉炎症，一旦渗漏至血管外，常可因化学性炎症而导致局部红斑、肿痛，甚至组织坏死和溃疡。采用皮质激素和普鲁卡因封闭疗法，是利用普鲁卡因阻断局部炎症区上传的不良神经刺激，局麻止痛，激素稳定生物膜，阻止溶酶体酶的释放，抑制致炎、致痛、致敏物质的释放，减少炎症扩散，促进炎性物质吸收；冷敷可减缓渗漏区的血液循环，从而减轻水肿和炎症反应[1]。

通过对上述 18 例晚期肺癌用长春瑞滨的治疗，说明预防化疗药的静脉渗漏和及时处理是重要的，必须在临床工作中引起重视。

关键词：长春瑞滨；静脉炎
中图法分类号：R543.6；R979.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] 刘开云. 静注长春新碱发生渗漏时的护理[J]. 中华护理杂志, 1988, 23(10): 619.

[2] 药晋红, 胡 牧, 张 平. 静脉留置套管针与静脉炎[J]. 实用护理杂志, 1997, 13(7): 365.

（编辑 陈聪连）

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