DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.04.001
第23卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 4
2001年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2001

文章编号:1000-5404(2001)04-0375-03

论著

胰高血糖素样肽-2对放射损伤小鼠肠上皮丝裂素活化蛋白激酶活性的影响

朱俊东,粟永萍,程天民 (第三军医大学预防医学系防原医学教研室、全军复合伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 观察胰高血糖素样肽-2对放射损伤小鼠肠上皮丝裂素活化蛋白激酶活性的影响,并探讨其与肠上皮增殖能力变化的关系。方法 昆明种小鼠经8 Gy ^{60}Co γ射线一次性全身照射后随机分为放射损伤对照组和胰高血糖素样肽-2处理组,检测小肠上皮增殖能力和丝裂素活化蛋白激酶活性。结果 胰高血糖素样肽-2处理后肠上皮BrdU标记阳性细胞百分率明显增加,同时丝裂素活化蛋白激酶活性显著升高,二者呈显著正相关。结论 胰高血糖素样肽-2可促进放射损伤肠上皮增殖,并可能与其激活肠上皮丝裂素活化蛋白激酶有关。

关键词:胰高血糖素样肽-2;放射损伤;肠上皮;丝裂素活化蛋白激酶;小鼠
中图法分类号:R341.43;R345.57;R818 文献标识码:A

Effect of glucagon-like peptide 2 on mitogen-activated protein kinase activity in small intestinal epithelia of mice after radiation injury

ZHU Jun-dong, SU Yong-ping, CHENG Tian-min (Department of Radiation Medicine, Institute of Combined Injury of PLA, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of glucagon-like peptide 2 (GLP-2) on mitogen-activated protein kinase (MAPK) activity in small intestinal epithelia in mice after radiation injury and its relation with the change of small intestinal epithelial proliferation. Methods Mice were given a single dose of 8 Gy of total body ^{60}Co gamma irradiation and then divided into GLP-2 and control groups. The activity of MAPK and proliferation rate in small intestinal epithelia were measured. Results The activity of MAPK in small intestinal epithelia was higher in GLP-2-treated mice than in irradiated mice, and the proliferation rate in small intestinal epithelia significantly increased in GLP-2-treated mice. These two indices were of significantly positive correlated. Conclusion GLP-2 can promote small intestinal epithelial proliferation in irradiated mice, and this may be related to activation of MAPK in small intestinal epithelia.

Key words: glucagon-like peptide 2; radiation injury; intestinal epithelia; mitogen-activated protein kinase; mice

胰高血糖素样肽-2(Glucagon-like peptide 2, GLP-2)是近年发现的对肠上皮生长和功能有重要特异调节作用的多肽,我们在以前的实验中证实GLP-2可促进放射损伤后小鼠肠上皮的修复[1],但其作用机制尚不清楚。放射损伤后肠上皮恢复快慢主要取决于残存的隐窝上皮细胞数目及其增殖分化能力,而丝裂素活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase,MAPK)是一种与细胞增殖有关的重要胞内激酶[2]。本实验观察GLP-2对放射损伤后肠上皮MAPK活性和细胞增殖能力的影响,以探讨GLP-2促进放射损伤后肠上皮修复的机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

GLP-2(APC公司,美国),溴脱氧尿苷(Bromodeoxyuridine, BrdU)(中国科学院上海生物化学研究所),髓碱性蛋白(Myelin basic protein, MBP)(Sigma公司,美国),MAPK抗体(Santa Cruz公司,美国),BrdU抗体(Neomarkers公司,英国),[γ-^{32}P] ATP(亚辉公司,北京),Protein A-Sepharose(Sigma公司,美国),S-P法免疫组织化学染色试剂盒(Zymed公司,美国)。

1.2 肠上皮放射损伤动物模型制作及实验分组

健康昆明种小鼠48只,雌雄不限,体重(20±5)g,由第三军医大学实验动物中心提供。8 Gy ^{60}Co γ射线一次性全身照射小鼠,照射后随机分为两个实验组:放射损伤对照组;放射损伤+GLP-2处理组,设1、3、5 d 3个时相点,每个时相点8只动物。GLP-2溶解于无菌的0.01 mol/L PBS缓冲液中(20 μg/ml),按每天250 μg/kg的剂量分两次给予,间隔10~12 h,给药方式为腹腔注射。放射损伤对照组注射相应体积的0.01 mol/L PBS缓冲液。

1.3 实验方法及观察指标

1.3.1 肠上皮BrdU标记指数 实验动物处死前2 h,腹腔注射BrdU(50 mg/kg体重),2 h后颈椎脱臼处死动物,迅速剖开腹部,取屈氏韧带下5 cm处空肠2 cm,10%中性福尔马林液固定,按常规方法进行脱水、浸蜡包埋,5 μm厚切片,制作石蜡切片。免疫组织化学染色:采用S-P法,染色程序按试剂盒说明要求进行,以PBS代替一抗染色作为阴性对照。结果观察:光学显微镜下观察,细胞核着棕褐色为BrdU染色阳性细胞,随机选取10根完整的肠绒毛,计数每根绒毛中BrdU染色阳性的细胞,计算阳性细胞百分率。

1.3.2 肠上皮MAPK活性测定 参照文献[3]方法。取近端空肠粘膜组织约100 mg,加入1ml冰预冷的MAPK提取液[25 mmol/L Tris·HCl, pH 7.5, 20 mmol/L NaF, 2 mmol/EDTA, 0.2 mmol/L Na_3VO_4, 10 mmol/L Benzamidine, 25 μg/ml Leupeptin, 10

作者简介:朱俊东(1968-),男,湖北省罗田县人,博士,讲师,主要从事营养与肿瘤方面的研究,发表论文10篇,现在营养卫生学教研室。电话:(023)68752291

收稿日期:2000-11-21;修回日期:2001-02-03

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

mmol/ L PMSF, 0. 3(*V*/ *V*) β-巯基乙醇], 冰浴中匀浆, 离心取上清。将上清液蛋白浓度调至 200 μg/ ml, 取 0. 5 ml 与 5 μg MAPK 抗体在 4 ℃共同孵育 4 h 后, 加入 30 μl Protein A-Sepharose(100 mg/ ml)沉淀抗原抗体复合物, 用免疫沉淀缓冲液洗涤 3 次后, 重新溶于 100 μl 免疫沉淀缓冲液中, 然后加入 20 μl 激酶活性测定缓冲液(1 mg/ ml MBP, 20 mmol/ L HEPES, pH 7. 5, 10 mmol/ L $MgCl_2$, 1 mmol/ L DTT, 40 μmol/ L ATP, 7. 4× 10^4 Bq[γ-^{32}P] ATP), 在 25 ℃水浴中孵育 30 min, 取 40 μl 点样于 P81 滤纸上, 0. 5% 磷酸彻底冲洗, 80 ℃烤干后, 加入闪烁液平衡过夜, 次日在液闪测定仪上测 cpm 值。MAPK 活性以每分钟每毫克蛋白中掺入的^{32}P 的 pmol 数来表示。

1.4 统计学分析

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用统计软件进行方差分析、*t* 检验和相关性分析。

2 结果

2.1 GLP-2 对放射损伤肠上皮细胞增殖的影响

GLP-2 处理后放射损伤小鼠肠上皮细胞 BrdU 标记阳性百分率较未处理组显著增加, 表明 GLP-2 能促进放射损伤肠上皮细胞增殖, 见表 1, 图 1、2。

表 1 肠上皮 **BrdU** 标记阳性细胞百分率(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Percentage of BrdU positive cell in small intestinal epithelia(%, $\bar{x}\pm s$)

Time (d)	Radiation	Radiation+GLP-2
1	20. 2±1. 9	28. 7±1. 7 *
3	36. 5±2. 6	43. 4±1. 9 *
5	26. 4±2. 1	34. 3±2. 2 *

*: $P<0.05$ *vs* radiation group

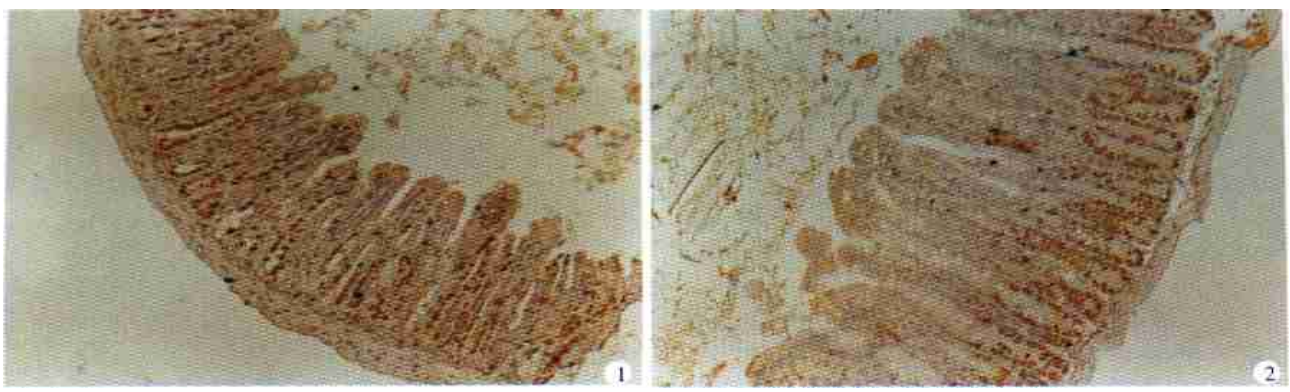


图 1 放射损伤 3 d 时肠上皮 **BrdU** 标记免疫组化染色 细胞核着棕褐色为 BrdU 染色阳性细胞, 主要位于隐窝上皮 (S-P× 100)

Fig 1 BrdU labelling/ ICC staining of small intestinal epithelia in mice 3 d after irradiation BrdU positive cell (the nuclei of epithelial cell were stained brown) mainly distribute in crypt (S-P× 100)

图 2 放射损伤+**GLP-2** 处理 3 d 时肠上皮 **BrdU** 标记免疫组化染色 较放射损伤组 BrdU 染色阳性细胞明显增多 (S-P× 100)

Fig 2 BrdU labelling/ ICC staining of small intestinal epithelia in mice 3 d after irradiation followed by GLP-2 treatment Note the significantly increased BrdU positive cells as compared with that of the irradiated mice (S-P× 100)

2.2 GLP-2 对放射损伤肠上皮 MAPK 活性的影响

实验结果显示, GLP-2 处理后放射损伤小鼠肠上皮 MAPK 活性较未处理组显著升高, 说明 GLP-2 能激活放射损伤肠上皮 MAPK, 见表 2。

表 2 肠上皮 **MAPK** 活性的变化(λ_B/ pmol·mg^{-1}·min^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of MAPK activity in small intestinal epithelia (λ_B/ pmol·mg^{-1}·min^{-1}, $\bar{x}\pm s$)

Time (d)	Radiation	Radiation+GLP-2
1	1. 77±0. 51	5. 64±0. 42 *
3	5. 88±0. 57	12. 80±1. 76 *
5	3. 74±0. 64	9. 42±0. 70 *

*: $P<0.05$ *vs* radiation group

2.3 肠上皮 BrdU 阳性细胞百分率和 MAPK 活性的相关性

相关性分析表明, 肠上皮 BrdU 阳性细胞百分率与肠上皮 MAPK 活性之间呈显著正相关($r=0.89$, $P<0.01$)。

3 讨论

肠上皮放射损伤后的再生修复快慢主要取决于残存的隐窝上皮细胞数目及其增殖分化潜能。研究资料表明一些多肽生长因子如表皮生长因子(EGF)、转化生长因子 α(TGF-α)等促放射损伤肠上皮修复作用主要是通过促进肠上皮细胞增殖这一途径的[4]。GLP-2 是近年发现的一种在肠上皮损伤修复治疗中有临床应用前景的多肽, 我们在以前的实验研究中证实 GLP-2 对放射损伤肠上皮有明显促修复作用, 加快放射损伤后肠上皮再生修复进程, 但其作用机制是否与 EGF、TGF-α 等类似, 尚不清楚。本实验以 BrdU 标记指数反应细胞增殖能力, 发现 GLP-2 处理后放射损伤小鼠肠上皮隐窝上皮细胞 BrdU 标记阳性百分率较未处理组显著增加, 表明 GLP-2 可促进放射损伤后肠上皮细胞增殖, 提示 GLP-2 加快放射损伤后肠上皮再生修复进程与其促进肠上皮细胞增殖作用密切有关。

MAPK 信号通路是由一系列的蛋白激酶及其磷酸化作用构成的级联反应。大量实验证据表明 MAPK 是细胞外有丝分裂刺激信号转导的汇聚点[5]。本研究结果显示, GLP-2 处理后放射损伤肠上皮 MAPK 活性较放射损伤对照组显著增强, 且肠上皮 MAPK 活性与反应肠上皮细胞增殖能力指标 BrdU 标记阳性百分率呈显著正

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

相关，表明 GLP-2 促进放射损伤肠上皮细胞增殖的作用可能与其激活肠上皮 MAPK 活性有关。新近发现了介导 GLP-2 生物学效应的特异性受体 GLP-2R (Glucagon-like peptide 2 receptor, GLP-2R)，主要表达于肠上皮细胞上，GLP-2R 为 G 蛋白耦联受体(G protein-coupled receptor, GPCR)超家族成员，它可激活腺苷酸环化酶活性，引起细胞内 cAMP 增加，表明 GLP-2R 为 Gs 蛋白耦联受体(GsPCR)[6]。对大多数哺乳类细胞而言，Gs 蛋白耦联受体激动剂可通过 cAMP-PKA 抑制细胞 MAPK 活化，进而抑制细胞增殖[7]。但在少数细胞如 COS-7 细胞、PC12 细胞等，一些 Gs 蛋白耦联受体激动剂可通过 cAMP-PKA 途径的直接作用激活 MAPK，促进细胞增殖[8,9]。另有研究发现，一些 G 蛋白耦联受体在特异性配体作用下，其结合 G 蛋白具有多样性，在其激活 MAPK 信号转导通路中 G 蛋白耦联受体发生信号交会作用(Cross-talk)，如由 Gs 耦联受体引起细胞 cAMP-PKA 途径活化，继而 PKA 磷酸化受体，此时受体再结合 Gi 蛋白转换为 GiPCR，然后由 GiPCR 的 βγ 亚基激活 MAPK，进而促进细胞增殖[10]。因此，GLP-2 引起肠上皮细胞 MAPK 激活既有可能是 GsPCR 介导的 cAMP-PKA 途径对 MAPK 的直接活化作用，也有可能是通过受体信号的交会作用激活 MAPK，其确切机制有待进一步深入研究。

综上所述，GLP-2 可能是通过肠上皮细胞上的 GLP-2R 信号传导系统激活肠上皮 MAPK，促进放射损伤小鼠肠上皮细胞增殖，进而加快放射损伤肠上皮修复进程。

参考文献：

[1] 朱俊东，粟永萍，程天民. 胰高血糖素样肽-2 对放射损伤小鼠肠上皮恢复的影响[J]. 第三军医大学学报，2001，23(3)：293－295.
[2] 李田昌，胡大一，唐朝枢. 丝裂素活化蛋白激酶与细胞内信息传递[J]. 生理科学进展，1996，27(4)：258－260.
[3] 李田昌，庞永政，苏静怡，等. 丝裂素活化蛋白激酶活性测定[J]. 基础医学与临床，1996，16(2)：78－80.
[4] Goke M, Kanai M, Lynch-Devaney K, *et al*. Rapid mitogen-activated protein kinase activation by transforming growth factor alpha in wounded rat intestinal epithelial cells[J]. Gastroenterology, 1998, 114(4): 697－705.
[5] 张　璐，姜　勇，张　琳. 丝裂素活化蛋白激酶信号转导通路研究进展[J]. 国外医学：病理生理与临床医学分册，1999，19(2)：84－87.
[6] Munroe D G, Gupta A K, Kooshesh F, *et al*. Prototypic G protein-coupled receptor for the intestinotrophic factor glucagon-like peptide 2[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96(4): 1 569－1 573.
[7] Cook S J, McCormick F. Inhibition by cAMP of ras dependent activation of rat[J]. Science, 1993, 262(5 136): 1 069－1 072.
[8] Faure M, Voyno-Yasenetskaya T A, Bourne H R. cAMP and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins stimulate the mitogen-activated protein kinase pathway in COS-7 cells[J]. J Biol Chem, 1994, 269(11): 7 851－7 854.
[9] Vossler M R, Yao H, York R D, *et al*. cAMP activates MAP kinase and Elk-1 through a B-Raf-and Rap1-dependent pathway[J]. Cell, 1997, 89(1): 73－82.
[10] Daaka Y, Luttrell L M, Lefkowitz R J. Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A[J]. Nature, 1997, 390(6 655): 88－91.

（编辑　郭建秀）

文章编号：1000-5404(2001)04-0377-01

经验与短篇

李斯特菌病并免疫性肝功能衰竭、肝性脑病抢救成功 1 例

Experiences on successfully rescuing a case of listeriosis complicated with immune liver function failure and hepatic encephalopathy

赵文利，孔祥英，刘力健　（第三军医大学附属西南医院儿科，重庆 400038）

患儿，女，5 月，因反复发热伴全身密集红色丘疹 10 d 入院。于 1999 年 8 月 19 日无明显诱因出现发热，肛温 40.2 ℃，无畏寒，发现颜面部鲜红、米粒大丘疹，次日波及四肢和躯干，皮疹稍高出皮面，压之褪色，无搔痒，口服欣可诺、非那根，病情无好转，收入外院予西力欣、丁胺卡那霉素、赛根啶及非那根治疗 1 周，体温降至 38 ℃，皮疹基本消退，于 8 月 27 日出院，次日院外予头孢噻肟钠、赛诺金后，当日傍晚又出现全身丘疹，性状同前，体温升至 39.4 ℃，于 8 月 29 日住入我院。出生时有窒息史，本次发病前因继发性癫痫服用鲁米那至出现皮疹后停药。其父无过敏史，其母易患荨麻疹。查体：体温 39.4 ℃，皮疹同上，淋巴结未扪及，前囟 1 cm×1 cm、平软，双侧瞳孔等大等圆，对光反射灵敏，心肺无特殊，腹软，肝右肋下 2 cm 可扪及，质软缘锐无触痛，余(－)。辅助检查：血 WBC 18.2×10^9/L，N 54%，Hb 98 g/L，异型淋巴细胞 0.15～0.13，ALT 69.0 IU/L，AST 154 IU/L，GGT 510 IU/L，ALB 35.26 g/L，A/G 1.34，TB 24.3 μmol/L，DB 12 μmol/L；B 超：肝脏回声密集；骨髓相：单核系比例 16.5%；CT 示：轻度脑萎缩。抗“O”、血沉正常，HBV 标志物、Anti-EBV IgM、Anti-CMV IgM 和嗜异凝集试验阴性，9 月 3 日血培养：李斯特氏菌。确诊为李斯特氏菌病。入院初予克林霉素、双黄连(用后皮疹增加次日停用)、扑尔敏治疗。确诊后予妥布霉素、丽珠克毒星治疗，辅以丙种球蛋白 2.5 g/d，连续 5 d。患儿皮疹消退，体温、骨髓相正常。但调整治疗以来，患儿开始拒奶、烦躁、

（下转 380 页）

作者简介：赵文利(1973－)，女，重庆市人，硕士研究生，医师，主要从事茶碱治疗哮喘的机制方面的研究。电话：(023)68753765
收稿日期：2000-07-05；修回日期：2001-01-04

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