DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.03.020
第23卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 3
2001年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2001

文章编号:1000-5404(2001)03-0293-03

论著

胰高血糖素样肽-2对放射损伤小鼠肠上皮恢复的影响

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 探讨胰高血糖素样肽-2对放射损伤小鼠肠上皮恢复的影响。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,检测小肠粘膜组织DNA和蛋白含量,光镜和扫描电镜观察肠上皮形态结构变化。结果 放射损伤后小肠粘膜组织DNA和蛋白含量降低,肠绒毛高度下降、数量减少,部分绒毛顶端有糜烂缺损;胰高血糖素样肽-2处理可使肠粘膜组织DNA和蛋白含量增加,肠绒毛增长、数量增多,糜烂发生不明显。结论 胰高血糖素样肽-2可促进放射损伤小鼠肠上皮的恢复。

关键词:胰高血糖素样肽-2;放射损伤;肠上皮;小鼠
中图法分类号:R341.43;R818—33 文献标识码:A

Effects of glucagon-like peptide 2 on recovery of small intestinal epithelia from radiation injury in mice

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

Abstract: Objective To investigate the effects of glucagon-like peptide 2 (GLP-2) on recovery of small intestinal epithelia from radiation injury in mice. Methods Mice received a single 8 Gy dose of total body irradiation from ^{60}Co gamma ray followed by treatment with GLP-2 or vehicle. DNA and protein content in small intestinal mucosa were measured, and small intestine was processed for histological examination with light microscope and scanning electron microscope. Results Small intestinal mucosal DNA and protein content, villus height, and villus number significantly decreased in irradiated mice, partial villus tips were ulcerated. GLP-2 administration caused increase in DNA and protein content, villus height, and villus number as compared with irradiated control group. Meanwhile, the villus tips were lack of ulceration. Conclusion GLP-2 can promote recovery of small intestinal epithelia from radiation injury in mice.

Key words: glucagon-like peptide 2; radiation injury; intestinal epithelia; mice

小肠在维持机体正常生命活动中居重要地位,促进放射损伤肠上皮修复对放射损伤治疗具有重要意义。既往研究资料表明一些多肽生长因子,如表皮生长因子(Epidermal growth factor, EGF)、胰岛素样生长因子Ⅰ(Insulin-like growth factor Ⅰ, IGF-Ⅰ)等对放射损伤肠上皮修复有促进作用[1,2],但由于这些生长因子的作用具有广泛性,临床应用于促肠上皮损伤修复治疗时需慎重考虑它们对肠外组织细胞的作用是否会导致机体发生不良反应。胰高血糖素样肽-2(Glucagon-like peptide 2, GLP-2)是近年发现的对肠上皮增殖和功能有重要调节作用的多肽,并且可能是肠上皮特异性的调节因子[3]。本实验观察胰高血糖素样肽-2对放射损伤肠上皮恢复的影响,为肠上皮损伤的促修复治疗措施研究提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康昆明种小鼠56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。

1.2 肠上皮放射损伤动物模型制作及实验分组

8 Gy ^{60}Co γ射线一次性全身照射昆明种小鼠,照射动物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。另取8只动物不照射作为正常对照。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。正常对照组和放射损伤对照组注射相应体积的0.01 mol/L PBS缓冲液。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 小肠粘膜组织DNA和蛋白含量测定 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10 cm,用等渗盐水冲洗干净肠内容物,纵行剪开肠管,刮取肠粘膜组织置入盛有2 ml冰预冷的0.01 mol/L Tris HCl (pH 7.2)缓冲液的离心管中,在冰浴中用内切式组织匀浆机匀浆,4 ℃ 2 000× g 5 min离心后,取上清液留作DNA和蛋白含量分析。DNA和蛋白含量测定分别采用荧光分光光度法[4]和Bradford法[4]。

1.3.2 显微测量小肠绒毛高度及隐窝深度 取1.5 cm左右长的空肠,等渗盐水冲洗干净肠腔内容物,用10%中性福尔马林固定液于4 ℃固定,常规方法脱水、浸蜡包埋,5 μm厚组织切片,进行常规HE染色。每只动物选取1张切片,在带目镜测微尺的显微镜下随机选取10根结构完整的肠绒毛,测量其绒毛高度及隐窝深度。

1.3.3 扫描电镜观察 取2 cm左右长的空肠,用等渗盐水冲洗干净肠腔内容物,纵行剪开肠管,在小硬纸片上小心展平小肠,放入3%戊二醛固定液中,4 ℃固定。常规方法制备扫描电镜用标本,扫描电子微镜下观察小肠绒毛的变化。

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。

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:2000-11-22;修回日期:2001-03-04

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

2 结果

2.1 小肠粘膜蛋白和 DNA 含量变化

放射损伤后 1、3 d 时肠粘膜组织中 DNA 和蛋白含量显著低于正常组水平，5 d 时基本恢复至正常水平；GLP-2 处理各组 DNA 和蛋白含量较同一时相点未处理组显著增加，表明 GLP-2 有促进肠粘膜组织恢复的作用，见表 1。

表 1 各组小肠粘膜蛋白和 DNA 含量变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 DNA and protein content in jejunal mucosa($\bar{x}\pm s$)

Group		n	DNA(μg/cm)	Protein(mg/cm)
Normal		8	192.7±39.8	2.21±0.15
Radiation	1 d	8	134.4±46.3*	1.48±0.16*
	3 d	8	140.9±49.2*	1.78±0.13*
	5 d	8	189.4±39.6	2.08±0.19
Radiation+GLP-2	1 d	8	174.2±42.0△	1.83±0.18△
	3 d	8	203.7±54.4△	2.17±0.20△
	5 d	8	233.3±40.8△	2.33±0.17△

*: $P<0.05$ *vs* normal; △: $P<0.05$ *vs* radiation group in the same time phase

2.2 小肠绒毛高度及隐窝深度变化

小肠绒毛高度及隐窝深度在放射损伤后 1 d 时下降不明显，3 d 时绒毛高度显著下降，而隐窝深度显著加深，5 d 时又基本恢复正常；GLP-2 处理后 3、5 d 时较未处理组绒毛高度显著增加，见表 2，图 1、2。

2.3 小肠绒毛扫描电镜观察

扫描电镜观察可见正常小鼠肠上皮绒毛数量较多，表面纹理柔和，无缺损。放射损伤 1d 时肠绒毛仍较致密，有少许糜烂；3 d 时绒毛稀少，部分绒毛顶部有块状糜烂缺损，基底部有沟裂形成；5 d 时基本恢复接近正常。GLP-2 处理 3 d 时绒毛即变得较致密，糜烂不明显；5 d 时绒毛多且粗大，纹理柔和，见图 3、4。

表 2 各组小肠绒毛高度和隐窝深度变化(μm, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of villus height and crypt depth in jejunum(μm, $\bar{x}\pm s$)

Group		n	Villus height	Crypt depth
Normal		8	382.2±22.9	121.2±14.2
Radiation	1 d	8	357.4±28.8	119.7±14.5
	3 d	8	253.8±28.6*	177.2±15.7*
	5 d	8	387.4±19.7	136.2±14.5
Radiation+GLP-2	1 d	8	354.9±26.5	109.6±10.9
	3 d	8	340.8±25.2△	151.4±11.4
	5 d	8	475.2±23.0△	152.5±16.3

*: $P<0.05$ *vs* normal; △: $P<0.05$ *vs* radiation group in the same time phase

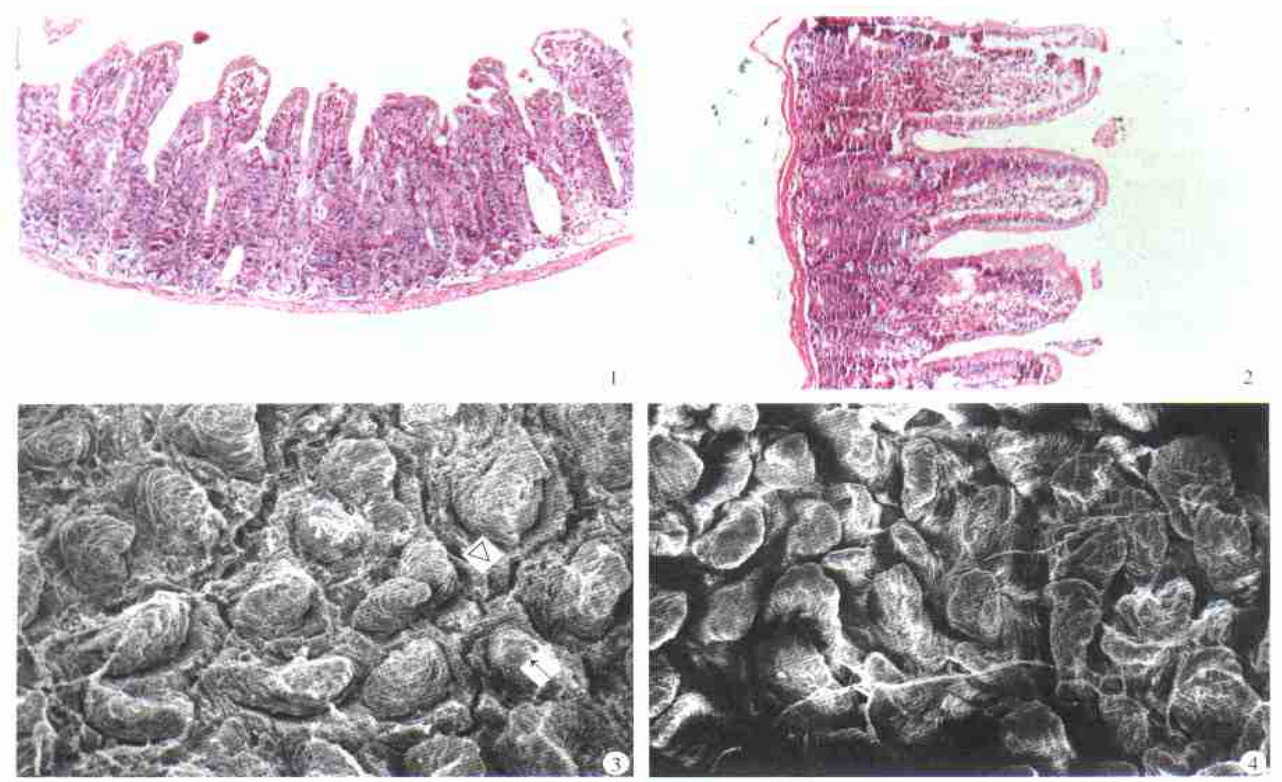


图 1 放射损伤后 3 d 小鼠空肠光镜观察 绒毛缩短，隐窝加深，上皮细胞排列疏松 (HE× 100)

Fig 1 Light microscopy of jejunum from mice 3 d after irradiation Note the decreased villus height and increased crypt depth as well as the dispersed distribution of intestinal epithelial cells (HE× 100)

图 2 放射损伤+GLP-2 处理后 3 d 小鼠空肠光镜观察 较放射损伤组，绒毛变长、粗大，上皮细胞排列紧密 (HE× 100)

Fig 2 Light microscopy of jejunum from mice 3 d after irradiation followed by GLP-2 treatment Note the increased villus height and the thick villus as well as the tight distribution of intestinal epithelial cells as compared with the irradiated mice (HE× 100)

图 3 放射损伤后 3 d 小鼠空肠扫描电镜观察 绒毛稀少，基底部有沟裂形成，部分绒毛顶部有糜烂缺损 (SEM× 150)

Fig 3 Scanning electron microscopy of jejunum from mice 3 d after irradiation Note the decreased villus number and groove formation in the villus basement as weel as the ulceration of partial villus tips (SEM× 150) →: Ulceration; △: Groove

图 4 放射损伤+GLP-2 处理 3 d 后小鼠空肠扫描电镜观察 较放射损伤组绒毛数量增多，糜烂不明显 (SEM× 150)

Fig 4 Scanning electron microscopy of jejunum from mice 3 d after irradiation followed by GLP-2 treatment Note the increased villus number and lack of ulceration in villus tips as compared with the irradiated mice (SEM× 150)

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

3 讨论

小肠是电离辐射高度敏感组织之一，射线照射可导致肠上皮结构破坏。同时肠上皮具有较强的自我修复能力，只要肠上皮干细胞不被射线全部破坏，肠上皮经过一定时间仍可恢复正常形态结构。本实验结果显示 8 Gy 射线照射后 1、3 d 小肠粘膜组织中 DNA 和蛋白含量显著降低，5 d 时基本恢复正常；小肠绒毛高度在照射后 1 d 时稍有下降，3 d 时显著低于正常水平，而 5 d 时有明显恢复，隐窝深度在照射后 1、5 d 变化不明显，3 d 时显著加深。扫描电镜观察发现放射损伤后 1 d 绒毛仍较为致密，糜烂不明显，而 3 d 时绒毛稀少，基底部有沟裂形成，部分绒毛顶端有糜烂缺损，5 d 时绒毛增多，但纹理仍较紊乱。上述结果表明 8 Gy 射线照射后 1、3 d 时由于肠上皮增殖抑制、变性坏死，导致肠粘膜 DNA 和蛋白丢失，肠绒毛缩短、数量减少，部分顶端发生糜烂等，5 d 时由于肠上皮自我修复作用，损伤的肠上皮明显恢复。

GLP-2 是高血糖素原基因在肠上皮 L 内分泌细胞表达翻译后的进一步处理加工而形成的特异产物，哺乳动物 GLP-2 分子的氨基酸组成高度同源，而且介导 GLP-2 生物学效应的 GLP-2 受体 GLP-2R cDNA 序列也具有高度同源性，主要表达于肠上皮细胞中[5,6]。近年研究发现，GLP-2 对正常小鼠肠上皮生长有明显促进作用，但对其它重要组织器官如心、肝、肾等组织细胞增殖无明显影响，长时间处理亦未见这些组织器官发生异常病理变化，且对全肠外营养及非甾体性抗炎药物诱导的肠粘膜损伤有防止作用[7~9]。以上资料提示 GLP-2 可能是特异的肠上皮生长调控因子。本实验显示 GLP-2 处理的放射损伤小鼠，其小肠粘膜 DNA 和蛋白含量、肠绒毛高度及数量较未处理组明显增加，绒毛顶端糜烂发生不明显，3 d 时即基本恢复正常，表明 GLP-2 对放射损伤小鼠肠上皮的恢复有明显促进作用。既往研究资料表明多肽生长因子 EGF、TGF-α、IGF-I 等可促进肠粘膜损伤后的再生修复，但由于这些生长因子作用的非肠上皮组织特异性。可能引起机体发生不良反应，因此在肠上皮损伤治疗的临床应用方面受到限制。基于 GLP-2 对肠上皮生长调控作用的特异性和本实验研究结果，推测 GLP-2 对包括放射损伤在内的各种因素引起的肠上皮损伤促修复治疗中具有较好的临床应用前景，值得进一步展开深入研究。

参考文献：

[1] Mckenna K J, Ligato S, Kauffman G L Jr, *et al*. Epidermal growth factor enhances intestinal mitotic activity and DNA content after acute abdominal radiation[J]. Sugery, 1994, 115(5): 626—632.
[2] Howarth G S, Fraser R, Frisby C L, *et al*. Effects of insulin-like growth factor-I administration on radiation enteritis in rats[J]. Scand J Gastroenterol, 1997, 32(11): 1 118—1 124.
[3] Crucker D J, Boushey R P, Wang F, *et al*. Biologic properties and therapeutic potential of glucagon-like peptide 2[J]. JPN J Parenter Enteral Nutr, 1999, 23(5 Suppl 1): S98—100.
[4] 颜子颖，王海林 译. 精编分子生物学实验指南[M]. 北京：科学出版社，1998. 332—333, 833—834.
[5] Drucker D J. Glucagon-like peptides[J]. Diabetes, 1998, 47(2): 159—169.
[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] Erucker D J, Ehrlich P, Asa L, *et al*. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93(15): 7 911—7 916.
[8] Chance W T, Foley-Nelson T, Thomas I, *et al*. Prevention of parenteral nutrition-induced gut hypoplasia by coinfusion of glucagon-like peptide 2 [J]. Am J Physiol, 1997, 273(2 Pt 1): G559—G563.
[9] Boushey R P, Yusata B, Drucker D J, *et al*. Glucagon-like peptide 2 decreases mortality and reduces the severity of indomethacin-induced murine enteritis[J]. Am J Physiol, 1999, 277(5 Pt 1): E937—947.

（编辑　郭建秀）

文章编号：1000-5404(2001)03-0295-01

经验与短篇

胃泌素测定对指导大肠癌术后治疗的意义

Significance of gastrin determination in postoperative treatment of colorectal cancer

孙念绪，蔡志民，林武华　（第三军医大学附属西南医院普通外科，重庆 400038）

胃泌素促进大肠癌生长的作用受到人们的关注，为探讨大肠癌与胃泌素的关系，我们进行了研究，现将结果报告如下。

1 材料与方法

收集 1992 年以来我科经手术根治性切除的大肠癌 54 例，男性 41 例，女性 13 例，平均年龄 43.6 岁。本组直肠癌 36 例，结肠癌18例。全组病人无消化性溃疡及H2受体阻滞剂应用

作者简介：孙念绪(1954—)，男，河北省肃宁县人，副主任医师，副教授，主要从事胃肠道肿瘤方面的研究，发表论文 30 余篇。电话：(023) 65387301

收稿日期：2000-01-15；修回日期：2000-09-15

（下转 299 页）

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