DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.07.005
第22卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 7
2000年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2000

文章编号:1000-5404(2000)07-0623-04

论著

肠三叶因子在大鼠肠道中表达的实验研究

彭 曦,谭银玲,陶凌辉,王凤君,赵 云,王 裴,尤忠义,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 研究肠三叶因子(ITF)及其mRNA在大鼠肠道的分布规律。方法 采用原位杂交、免疫组化等手段观察了ITF及ITF mRNA在大鼠肠道的表达并使用高效液相色谱仪检测了不同肠段ITF的含量。结果 从十二指肠至结肠均有ITF及ITF mRNA表达,主要分布于肠绒毛杯状细胞,其中ITF mRNA仅在杯状细胞的基底和边缘表达,其它区域的杯状细胞则呈ITF mRNA阴性反应,同时发现部分其它部位的肠上皮细胞中亦有少量ITF及ITF mRNA表达。ITF定量分析显示,整个肠道中以十二指肠含量最高,空回肠次之,结肠含量较低,各段小肠中ITF含量差异不显著($P>0.05$),但都明显高于结肠($P<0.01$)。结论 杯状细胞是合成ITF的主要场所,ITF在肠道分布的差异可能同各肠段分泌的粘液性质不同有关。

关键词:肠三叶因子;肠道;大鼠
中图法分类号:R341.6;R394-3 文献标识码:A

Study of the expression of intestinal trefoil factor in the intestines of rats

PENG Xi, TAN Yin-lin, TAO Lin-hui, WANG Feng-jun, ZHAO Yun, WANG Pei, YOU Zhong-yi, Wang Shi-Liang (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the pattern of the expression and distribution of intestinal trefoil factor (ITF) mRNA and protein in the intestines of rats. Methods The expression of ITF mRNA and protein in the intestines of rats was observed with *in situ* hybridization (ISH) and immunohistochemistry and the content of ITF in different regions of the intestines was measured with high performance liquid chromatography (HPLC). Results IIF and ITF mRNA distributed in the whole length of the intestines from the duodenum to the colon mainly in the base and margin of the goblet cells of intestinal villi. Goblet cells of other regions were negative of ITF expresson. Occasionaly, ITF mRNA and protein were also found in other types of intestinal epithelium. The content of ITF was 369.33±65.56, 321.66±42.12, 296.45±55.23 and (186.46±30.26) ng/g in the duodenum, jejunum, ileum and colon respectively. There was no significant difference of ITF content among 3 regions of small intestine but the difference between the small intestine and the colon was statistically significant ($P<0.01$). Conclusion The main site to produce ITF is the goblet cells and the difference of ITF distribution in different regions of the intestines may be related to the different characteristics of the mucus secreted by the goblet cells.

Key words: intestinal trefoil factor (ITF); intestine; rat

肠三叶因子(Intestinal trefoil factor, ITF)属三叶肽家族,是一种新型的生长因子类多肽物质,1991年由Suemori[1]首先发现并命名。生理状况下ITF存在于哺乳动物的多种组织中,但主要分布于肠道,ITF具有很强的细胞保护作用,可明显减轻多种损伤因子介导的肠粘膜损害[2]。ITF的生理功能主要体现在两个方面:首先,ITF由于其分子结构的特殊性,可同粘液糖蛋白结合,形成牢固的复合物,对肠道粘液层起固定和支持作用,防止有害物质对肠粘膜细胞的损伤[3]。其次,ITF具有很强的促进细胞增殖与移行的能力,可促进受损区域上皮细胞重建并加快上皮细胞移行速度[4]。因而ITF在肠道的自我保护机制中占据重要地位。由于ITF发现不久,目前国内尚未见报道,国外文献又多集中于ITF与消化道溃疡和肿瘤的关系,而对ITF在不同肠段分布规律的研究不多。因此本研究将

基金项目:全军"九五"攻关项目(96L043)
作者简介:彭 曦(1968-),男,四川省成都市人,博士,主治医师,主要从事创伤营养代谢方面的研究,发表论文16篇。电话:(023)65317058
收稿日期:1999-11-20;修回日期:2000-03-28

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

对 ITF 及其 mRNA 在大鼠肠道中的分布规律进行初步研究，以期阐明 ITF 保护肠粘膜的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

含有 rITF cDNA 的质粒由美国佛罗里达大学 Thompson 博士惠赠，rITF 由丹麦 NOVO 研究院 L. Thim 教授惠赠，质粒提取盒，地高辛 cRNA 探针标记盒，内切酶 *Xho* Ⅰ，T_3 RNA 聚合酶均购自德国宝灵曼公司，三氟乙酸购自德国 MERCK 公司，PEAE-Sephadex A-50 购自 Sigma 公司，Hypersl C_4 柱由大连国家色谱中心提供，羊抗兔抗血清由深圳晶美公司提供。

1.2 方法

1.2.1 肠粘膜 ITF mRNA 表达的检测

1.2.1.1 ITF 质粒转化 将含有 rITF cDNA 的质粒接种于菌种 DH5α 中，质粒提取按说明书操作。

1.2.1.2 ITF 质粒线性化 质粒经转化和提取后，在 Eppendorf 管内依次加入 ITF 质粒 15 μl，10× Buffer 3 μl，内切酶 *Xho* Ⅰ 3 μl(20 U/μl)；ddH_2O 9 μl，混匀后于 37 ℃ 2 h。电泳观察，如只有 1 条带，约 3.1 kb，表示酶切完全，可以终止酶切反应，如不只是 1 条带，说明酶切不完全，需延长酶切时间，必要时再加适量的内切酶，1～2 h 后再进行电泳分析，直至酶切完全为止。

1.2.1.3 探针制备及标记 按地高辛 cRNA 探针标记盒说明书进行 ITF 探针标记。

1.2.1.4 原位杂交 健康成年 Wistar 大鼠 6 只(第三军医大学野战外科研究所动物室提供)，体重 190～220 g，雌雄不拘，活杀大鼠取各部位肠段约 0.5 cm，4% 多聚甲醛固定，冰冻切片(20 μm)，其余步骤按常规操作进行[5]，原位杂交阴性对照：①杂交前切片用 RNase 20 μg/ml 37 ℃ 处理 30 min，②杂交液中不加标记探针。

1.2.2 ITF 免疫组织化学染色

1.2.2.1 ITF 抗血清的制备 新西兰大白兔 3 只，体重 2～2.5 kg，单笼饲养 1 周后用于实验。首次免疫：ITF 按 330 μg/只与 1 ml 完全福氏佐剂混合乳化后，在腹股沟及颈部作多点皮下注射。4 周后加强免疫 1 次，2 周后再进行第 2 次加强免疫，注射剂量同首次免疫。第 2 次加强免疫后 10 d 开始检测是否有抗体产生，效价稳定后，颈动脉放血，收集血清，PEAE-Sephadex A-50 纯化 IgG，测定效价，冷冻干燥。

1.2.2.2 肠组织 ITF 免疫组化染色 活杀大鼠取各部位肠段约 0.5 cm，置 10% 福尔马林液中固定。常规石蜡包埋切片，一抗工作浓度为 1∶32，其余步骤及阴性对照按常规操作进行[5]。

1.2.3 肠粘膜中 ITF 含量的测定

1.2.3.1 色谱条件 Hypersil C_4 柱，300 A，10 μm，250× 4.6 mm；流动相：A= 10% 乙腈-三氟乙酸(0.1%)，B= 60% 乙腈-三氟乙酸(0.1%)。线性梯度洗脱，10%～90%B；流速：1 ml/min，全程 40 min；检测波长：UV214 nm，灵敏度：0.005 AUFS，进样 100 μl。

1.2.3.2 标准曲线制作 配制不同浓度的 ITF 标准溶液，浓度梯度为(μg/ml)0、6.25、12.5、25、50、100，峰面积与浓度呈良好的线性关系 r= 0.998。

1.2.3.3 样品制备 取大鼠各段肠粘膜约 200～300 mg，加 2 ml 生理盐水(含 400 U 抑肽酶)，冰浴匀浆，15 000 r/min 4 ℃ 离心 20 min，取上清 100 μl 进样检测。采用考马氏亮蓝 G-250 法测定蛋白。

1.3 统计学处理

所有数据在华西医科大学 PEMS 程序包上作统计学处理，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示，进行 F 检验。

2 结果

2.1 大鼠肠道中 ITF mRNA 的表达

ITF mRNA 阳性染色主要定位于肠粘膜杯状细胞，但仅分布于杯状细胞的基底及其边缘，阳性染色区约占整个细胞的 1/10，镜下观察阳性染色的杯状细胞呈空泡状，同时发现部分其它类型的肠上皮细胞中也有少量 ITF mRNA 表达，见图 1、2。ITF mRNA 在各段小肠及结肠中的表达基本类似。

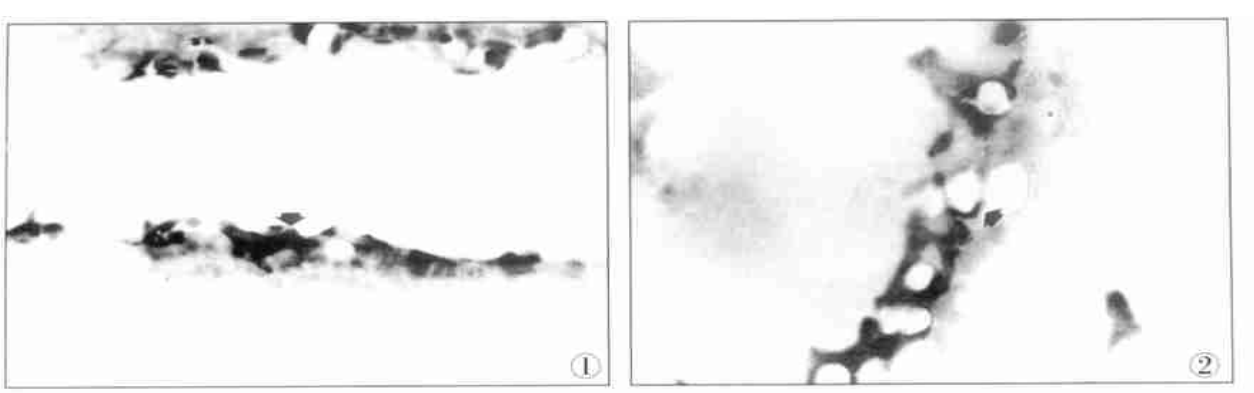


图 1 鼠肠绒毛上呈 **ITF mRNA** 阳性染色的杯状细胞及上皮细胞(⬇) (原位杂交× 100)

Fig 1 ITF mRNA positive goblet cell and epithelium in intestinal villus of rat(⬇) (ISH× 100)

图 2 **ITF mRNA** 阳性染色主要分布于杯状细胞基底部(⬆) (原位杂交× 200)

Fig 2 ITF mRNA positive staining distributed mainly in the base of the goblet cells(⬆) (ISH× 200)

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

2.2　大鼠小肠中 ITF 免疫组化染色

ITF 阳性染色区域同 ITFmRNA 的表达部位一致, 主要定位于杯状细胞, 镜下可见许多染色深浅不一的杯状细胞, 绒毛上部的杯状细胞染色较深, 下端的则染色较浅, 同 ITF mRNA 阳性染色不同的是 ITF 阳性染色不论染色深浅均为整个细胞着色, 见图 3。各肠段中 ITF 阳性染色的情况基本类似, 呈 ITF 强阳性反应的杯状细胞约占总数的 20%, 见图 4。

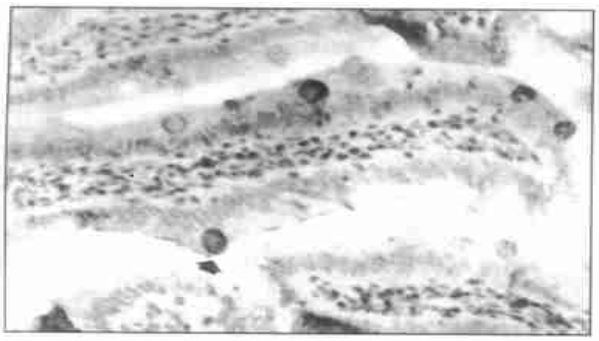


图 3　肠绒毛上呈 **ITF** 阳性染色的杯状细胞(⬆)　(S-P× 200)

Fig 3　ITF positive goblet cell in intestinal villus (⬆)　(S-P× 200)

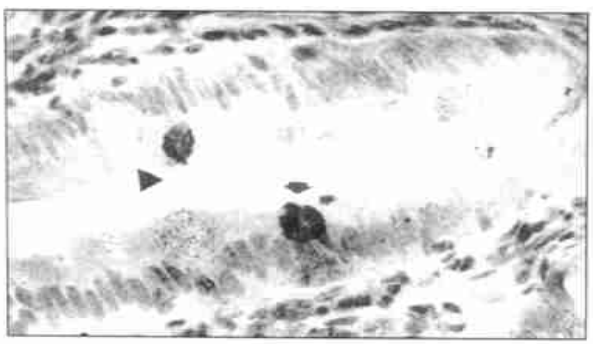


图 4　肠绒毛中呈 **ITF** 阳性(⬇)及 **ITF** 阴性(▲)的杯状细胞　(S-P× 400)

Fig 4　ITF positive (⬇) **and ITF negative** (▲) **goblet cell in intestinal villus**　(S-P× 400)

2.3　大鼠肠粘膜中 ITF 的含量

实验结果显示, 在整个肠道中十二指肠 ITF 的含量最高为(369.33±65.56)ng/g(n= 6), 空、回肠次之, 分别为(321.66±42.12)ng/g 和(296.45±55.23)ng/g, 而结肠中的含量最低为(186.46±30.26)ng/g, 各段小肠均明显高于结肠(P< 0.01), 但各段小肠之间相差不显著(P> 0.05)。

3　讨论

ITF 是一类较新的生长因子, 目前国内尚未见有关报道, 为了准确反映 ITF 在大鼠肠道中的分布规律, 我们从基因水平和蛋白质水平两个层面入手, 分析了 ITF mRNA 的表达及 ITF 含量在不同肠段的差异。由于构建于质粒中的 ITF 片段仅 281 bp, 如采用 cDNA 地高辛随机标记法, 由于片段太短标记效率低, 探针可靠性差。如果采用末端标记法, ITF 片段又显太长。因此, 我们采用 cRNA 地高辛标记法, 使用这种探针进行原位杂交, 其准确性和灵敏性均高于 cDNA 探针[6]。实验结果显示, 正常情况下肠粘膜中 ITF mRNA 表达量较少, 主要分布于杯状细胞, 特别是绒毛上部的杯状细胞中有较高的表达, 提示, 只有成熟的杯状细胞才能分泌 ITF, 其合成部位主要在杯状细胞的基底部。镜下仔细观察可见部分其它类型的肠上皮细胞中也有少量表达, 同时隐窝处也偶见 ITF mRNA 阳性细胞。说明杯状细胞不是合成 ITF 的唯一场所, 其生理意义有待进一步研究。

免疫组化结果显示, 生理状况下大鼠肠道有许多呈 ITF 阳性反应的杯状细胞, 其定位几乎同原位杂交显示的 ITF mRNA 表达完全一致。绒毛顶部和底部的杯状细胞着色深浅不一, 说明 ITF 的分泌量在不同的杯状细胞中存在明显差异, 这可能与杯状细胞的成熟和分化程度有关。这一点与原位杂交的结果是一致的。与原位杂交不同的是, ITF 阳性杯状细胞不论染色深浅均为整个细胞着色, 而 ITF mRNA 的表达仅在杯状细胞的基底或边缘, 说明杯状细胞中仅有很小的一个区域是合成 ITF 的, 而 90%以上的区域是储存已合成的 ITF 及粘液的。实验结果提示: ITF 同杯状细胞以及粘液的关系极为密切, 实际上 ITF 曾被命名为粘液结合肽(Mucin-associated peptide), 它能同粘液糖蛋白中的糖链特异地结合, 形成稳定的凝胶复合物, 起到稳定粘液层的作用, 能阻止多种蛋白酶以及机械应力改变等因素造成的肠粘膜损伤[7]。在应用 ITF 后可明显增加可深性粘液的分泌量, 并增加其粘度[8]。对 ITF 三维空间结构的研究显示其分子结构中有一个 8～10A 的间隙能特异地同糖蛋白的侧链结合, 对粘液糖蛋白的分子结构起支架作用, 其结合位点可随糖蛋白侧链的不同而进行调整[9]。为了准确反映各肠段中 ITF 的含量我们采用反相高效液相色谱仪对其进行了检测, 结果显示, 在整个肠道中十二指肠的 ITF 含量最高, 空回肠次之, 结肠中的含量最低, 各段小肠均明显高于结肠(P< 0.01), 而各段小肠之间相差不显著(P> 0.05)。Amiranoff 等[10] 的研究也得出了类似的结果, 我们推测 ITF 在不同肠段分布的差异可能与局部杯状细胞分泌粘液的性质不同有关, 研究表明, ITF 同羧酸化粘液的关系较密切, 而同中性粘液和硫酸化

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

粘液的关系不密切。小肠绒毛上部的杯状细胞以分泌羧酸化粘液为主[11]，这可能是小肠粘膜中 ITF 含量较高的原因。此外，十二指肠粘膜经常与胃酸、胆汁胰及胰液等刺激物接触，该处保持较高浓度的 ITF 有利于保护肠粘膜免受损伤。而结肠分泌的粘液以硫酸化粘液为主，尽管其杯状细胞的数量高于小肠，但 ITF 的含量却是肠道中最低的。另外，结肠内环境相对稳定这也可能是结肠粘膜中 ITF 含量较低的原因之一。

参考文献：

[1] Suemori S, Lynch-Devaney K, Podolshy D K. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: Tissue and cell-specific member of the trefoil protein family[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(10): 11 017—11 021.

[2] Playford R J. Trefoil peptides-what are they and what do they do [J]? J R Coll Physicians Lond, 1997, 31(1): 37—41.

[3] Thim L. A new family of growth factor-like peptides: trefoil′ disul-phide loop structures as a common feature in breast cancer associated peptide (pS2), pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP) and frog skin peptides (spasmolysins)[J]. FEBS Lett, 1989, 250(1): 85—90.

[4] Hoffmann W, Hauser F. The P-domain or trefoil motif: a role in renewal and pathology of mucous epithelia[J]? Trends Biochem Sci, 1993, 18(7): 239—243.

[5] 蔡文琴，王伯云主编. 实用免疫细胞化学与核酸分子杂交技术[M]. 成都：四川科学技术出版社，1994. 406—426.

[6] Boyle W J, Brenner D A. Molecular and cellular biology of the small intestine[J]. Curr Opin Gastroenterol, 1995, 11(1): 121—127.

[7] Kindon H, Pothoulakis C, Thim L, *et al*. Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function-cooperative interaction with mucin glycoprotein[J]. Gastroenterology, 1995, 109(3): 516—523.

[8] Mashimo H, Wu D C, Podolsky D K, *et al*. Impaired defense of intestinal mucosa in mice lacking intestinal trefoil factor[J]. Science, 1996, 274(2): 262—265.

[9] Podolsky D K. Healing the epithelium solving the problem from two sides[J]. J Gastroenterol, 1997, 32(1): 122—126.

[10] Amiranoff B, Rio M C. While the trefoil peptides protect the digestive mucosa, one of them suppresses gastric tumors *in vivo* demonstration[J]. Medicine Sciences, 1997, 13(1): 93—94.

[11] Uchida K, Kado S, Onoue M, *et al*. Relationship between the nature of mucus and crypt multiplicity in aberrant crypt foci in the rat colon[J]. Jpn J Cancer Res, 1997, 88(9): 807—814.

（编辑 汪勤俭）

（上接622页）

粪便外溢，而拒绝或勉强与患者发生性行为均能加重患者自卑心理。

3 性功能障碍的治疗对策

3.1 手术技巧

手术损伤程度与术后性功能降低有直接关系，因此对较早期患者应积极施行保留植物神经的直肠癌根治术。尽量减轻会阴污染，一期缝合会阴创口，减少疤痕。对阴道后壁切除者，我们采用吸收线再造阴道，效果满意。

3.2 建立良好医患关系

性是一个敏感而又极其隐私的问题，医护人员在接触病人时应使病人感到平易近人而愿意倾诉自己的焦虑担忧。且应于恢复期，相对隔离环境，对患者及配偶就相关问题进行指导交流。

3.3 适应体象改变

首先逐步教会患者进行人工肛门管理：选用低渣，无刺激食物；少吃易产气及高纤维易阻塞造瘘口的食物；定时进食促使粪便成型；全身情况良好无造口并发症患者，可行造口灌洗，方法为[1]：术后1月，每隔24～48 h定时用温开水500～1 000 ml灌洗，连续10次左右可养成反射性定时排便习惯；选用良好造口器材，避免紧身裤，减少造口摩擦。较好解决了粪便溢漏，及造口周围皮肤刺激反应。并建议造口者互访，通过现身说法使患者适应体象改变后的生活方式。对于合并卵巢，子宫乃至阴道后壁切除者，应向患者及配偶讲解有关女性生殖系统的解剖知识，消除其把生殖功能与性功能混为一体的错误认识。

3.4 配偶教育

首先应谅解患者配偶因患者体象改变而引起的异常行为，耐心讲解配偶态度对患者心理的巨大影响，鼓励其积极配合患者进行造口的护理，敦促其配偶之间的互相理解，配合。建议术后3月，局部手术创伤恢复较满意，就可行房事。为避免担心性生活中粪便外溢，经济条件好的可选用性交专用造口袋，为减轻患者不适，动作应缓和，并可采用人工润滑剂，可望达到满意性生活。

4 结论

通过上述措施，术后3月随访，患者基本达到满意性生活。恢复正常性生活，极有利于女性Mile's术后患者正视现实，提高生活质量。

关键词：性功能障碍；结肠造口术；直肠癌
中图法分类号：R735.37 文献标识码：B

参考文献：

[1] 喻德洪. 结肠造口130例临床分析[J]. 中国肛肠病杂志，1996, 16(4): 13—16.

[2] 张艾莉. 女性直肠癌Mile's术后性功能障碍[J]. 中国实用外科杂志，1999, 19(6): 332—333.

（编辑 刘 鹏）

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