DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.05.023
第22卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 5
2000年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2000

文章编号:1000-5404(2000)05-0459-03

论著

过量锌对大鼠小肠粘膜粘液分泌的影响

罗治彬[1],吴嘉惠[2],徐采朴[1] (第三军医大学附属西南医院:[1]消化内科;[2]儿科,重庆 400038)

提 要:目的 为明确过量锌对小肠粘液分泌的影响及其机制。方法 通过建立常锌(ZN)、过量锌(ZE)大鼠模型,应用病理形态学手段和图像分析方法,对大鼠肠道粘膜粘液的产生、分泌和粘液屏障作定量定位研究。结果 ZE组第4周末和第7周血浆、红细胞膜和肠组织的锌含量明显高于ZN组($P<0.05$)。ZE组第4周末和第7周末粘液层厚度与ZN组差异不显著($P>0.05$);但是粘液蛋白的含量显著低于ZN组($P<0.01$)。结论 过量锌可引起粘液分泌的抑制,削弱大鼠小肠粘膜的防御能力。

关键词:过量锌;肠道粘膜;粘液分泌;图像分析;大鼠
中图法分类号:R322.45 文献标识码:A

Effects of zinc-excess on mucous secretion of intestinal mucosa in rats

LUO Zhi-bing, WU Jia-hui, XU Chai-pu (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of zinc-excess (ZE) on mucous secretion of intestinal mucosa and its mechanism in rats. Methods The rats were randomized into ZE and zine-normal (ZN) groups. The produce, secretion and barrier function of the mucous in the intestinal mucosa were quantitatively and locationally studied with pathological technique and image analysis. Results At the end of the 4th and 7th week, the zinc content in the plasma, erythrocytic membrane and tissue of the small intestine was higher in the ZE rats than in the ZN ones ($P<0.05$) but no significant difference of the thickness of the mucous layer between the 2 groups was found ($P>0.05$). Conclusion Excessive amount of zinc in the food can lead to an inhibition of mucous secretion of intestinal mucosa and weaken its defensive function in rats.

Key words: zinc/excess; intestinal mucosa; mucous secretion; image analysis; rat

锌是机体必需微量元素之一。研究表明严重过量锌可引起机体生物合成、中枢免疫系统的结构和功能严重受损,导致机体生长发育不良和免疫力下降,甚至发生反复感染。但是过量锌对肠道粘液分泌的影响,目前知之尚少,国内外也少见报道。现将我们的研究结果报告如下。

1 材料与方法

硫酸锌(分析纯,上海生化试剂二厂);Alcian Blue 8GX(AB,上海);原子吸收分光光度计(IL-AA951型,美国);电热恒温消化器(核工业北京冶金化学研究院);图像分析仪(MD-20型,德国徕卡)。

1.1 动物及分组

采用第三军医大学实验动物中心提供的新生1d的纯系同批健康Wistar大鼠8窝共60只(动物合格证:医动字第24301050号),雌雄各半,平均体重为(7.20±0.54)g(经统计学处理各组差异不显著),按随机排列表法分为ZE和ZN二组,每组30只。

1.2 动物模型的建立

1.2.1 饲料配方 样品经原子吸收分光光度计测定。正常锌饲料:在Flanagan缺锌饲料配方[1]中加入硫酸锌,使含锌量50 mg/kg饲料。过量锌饲料:在Flanagan缺锌饲料配方中加入硫酸锌,使含锌量1 500 mg/kg饲料。

1.2.2 饲养方法 动物房洁净无尘,室温控制在24℃左右,湿度50%,光照及黑夜人工控制,各12 h(光照8:00~20:00);在不锈钢笼具内饲养,食具为玻璃器皿,使用前用酸及双蒸水清洗,并定期用双蒸水冲洗。各组大鼠饲以相应的含锌饲料,自由饮用去离子水。分别记录各组每天进食量,观察其生长发育、活动情况、精神状态及大便性状,每周测一次体重。仔鼠由母鼠授乳至第4周末时,处死第一批动物(每组10只),进行第

作者简介:罗治彬(1968-),男,重庆市垫江县人,博士研究生,医师,主要从事肿瘤免疫方面的研究,发表论文17篇。电话:(023)68754114-73094

收稿日期:1999-06-17;修回日期:2000-03-05

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

1 时相各项指标检测; 余下仔鼠(每组 15 只)断奶分笼, 每笼 2 只(性别相同), 仍饲以相应含锌饲料, 至第 7 周末时全部处死, 进行第 2 时相各项指标检测。

1.3 检测指标

1.3.1 微量元素锌的检测 采用美国 IL-AA951 型原子吸收分光光度计测定, 均采用质量控制。饲料锌含量测定: 灰化法。血浆锌含量测定: 稀释法, 结果以 μmol/L 表示。肠组织锌含量测定: 湿化法, 结果以 mmol/g 表示。红细胞膜锌含量测定: 参照文献[2]进行, 结果以 μmol/L 表示。

1.3.2 小肠的组织学观察 大鼠处死后迅速打开腹腔, 取空肠近端(以蔡氏韧带为起点)2 cm 处肠段, 用生理盐水轻轻冲洗后置 10%甲醛磷酸缓冲液中固定, 用于常规 HE、粘液组织化学染色。

1.3.3 粘液分泌量的测定 粘液组织化学染色: AB-PAS 法。石蜡切片脱蜡、水化, 1%AB (pH2.5)染色 10 min, 0.5%PA 染色 5min, Schiff 氏试剂中染色 20 min, 苏木素复染 2 min, 水洗、透明及封片。将 AB-PAS 染色的切片置于显微镜下, 通过真彩色图像分析仪的摄像机将放大数十倍的图像输入电脑, 运用图像分析软件测定杯状细胞数、杯状细胞的面积、周长、平均光密度、直径及粘液层厚度。杯状细胞计数: 每个时相每组观察 10× 5 根肠绒毛, 每根绒毛分别测定其总面积及其相应面积内的杯状细胞数量, 求出绒毛单位面积内杯状细胞的数量。

杯状细胞的面积、周长、平均光密度及直径: 每个时相每个组分别测定 10× 5× 20 杯状细胞的面积(μm^2)、周长(μm)、直径(μm)和平均光密度。

粘液层厚度: 每个时相每个组共测定 25 根肠绒毛, 结果以 μm 表示。

1.3.4 粘液的提取及粘液蛋白定量测定 小肠粘液提取: 参考文献[3]进行提取, 4℃贮存备用。粘液蛋白定量: 将上法提取的粘液, 用 Lowry 法测定其蛋白质含量。以 BSA 为标准品(先用紫外分光光度计测定其蛋白质含量), 分光光度计(波长 650 nm)比色测定, 以 mg/L 表示。

1.4 统计学分析

用第三军医大学数学教研室编制的数理统计程序包分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 过量锌对血浆锌、红细胞膜锌和肠组织锌的影响

ZE 组 4 周(ZE4)、7 周(ZE7)时血浆锌、红细胞膜锌和肠组织锌显著高于 ZN 组($P<0.05$), 见表 1。

表 1 ZE 组大鼠 ZE4、ZE7 时血浆锌, 红细胞膜锌和肠组织锌含量($\bar{x} \pm s$)

Tab 1 Content of zinc in plasma, RBC membrane and intestine at the end of 4th and 7th week in rats($\bar{x} \pm s$)

Group	n	Plasma (C_B/μmol·L^{-1})	RBC membrane (C_B/μmol·L^{-1})	Intestine (m_B/mmol·g^{-1})
ZN4	10	34.93±4.70	4.17±0.64	2.13±0.26
ZE4	10	53.06±7.03*	6.25±1.12*	5.19±0.63*
ZN7	10	37.24±2.51	4.26±1.06	2.30±0.49
ZE7	10	74.47±11.09*	7.78±0.94*	5.87±1.19*

*: $P<0.05$ vs normal control

2.2 过量锌对肠粘液分泌的影响

2.2.1 杯状细胞相关指标测定 粘液组织化学染色(AB-PAS 法)结果见图 1、2。

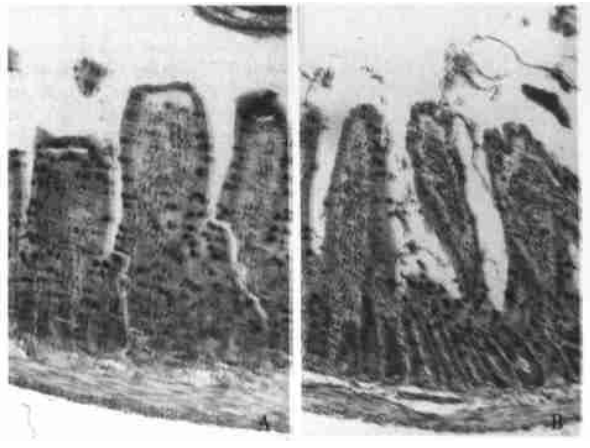


图 1 4 周后粘液组织的组化染色 (AB-PAS× 200)
ZE4 组(A)杯状细胞比 ZN4 组(B)大而且多, 染色较深; ZE4 组粘液层厚度与 ZN4 组无明显差异

Fig 1 Histochemistry of mucus tissue at the end of 4th weeks (AB-PAB× 200)
More large and deeply stained goblet cells were found in ZE4 group (A) as compared with that of ZN4 group (B); no obvious difference of the thick ness of the mucus layer was found between ZE4 and ZN4 group

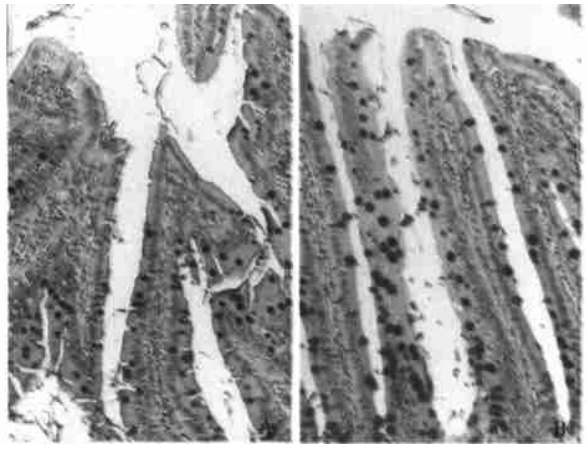


图 2 7 周后粘液组织的组化染色 (AB-PAS× 200)
ZE7 组(A)杯状细胞数显著少于 ZN7 组(B), 染色较浅; ZE7 组粘液层厚度与 ZN7 组差异不明显

Fig 2 Histochemistry of mucus tissue at the end of 7th week (AB-PAS× 200)
Fewer and light stained globet cells were found in ZE7 group (A) as compared with that of ZN7 group(B); no obvious differences was found between ZE7 and ZE7 group

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

ZE 组: ZE4 杯状细胞平均面积和平均直径均显著大于 ZN 组(ZN4, $P<0.05$); ZE7 杯状细胞计数(0.94±0.11 个/μm^2)显著低于 ZN 组(ZN7, $P<0.05$), 平均面积和平均直径与 ZN 组差异不显著($P>0.05$), 见表 2。

表 2　ZE 组大鼠 ZE4、ZE7 时杯状细胞面积、周长、直径和平均光密度变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　The changes of area, perimeter, diameter and optical density of goblet cell at the end of 4th and 7th weeks($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Area(s/μm^2)	Perimeter(l/μm)	Diameter(d/μm)	Optical density △
ZN4	10	45.57±3.96	31.49±7.59	8.39±1.66	1.20±0.15
ZE4	10	57.59±9.38 *	32.47±8.72	9.25±2.01 *	1.27±0.17
ZN7	10	56.53±0.50	33.24±9.93	9.53±2.12	1.40±0.21
ZE7	10	57.48±5.20	32.08±9.69	9.39±2.29	1.45±0.19

*: $P<0.05$ *vs* normal control; △: optical density (OD) equal to IOD divided by Area(OD= IOD÷ Area)

2.2.2　粘液层厚度　　4 周、7 周时 ZE 组粘液层厚度(1.54±0.40 μm; 1.67±0.73 μm)与 ZN 组(1.58±0.47 μm; 1.71±0.54 μm)差异不显著($P>0.05$)。

2.2.3　粘液的蛋白质含量测定　　4 周时 ZE 组粘蛋白含量(128.57±37.22 μg/ml); 7 周时粘液蛋白含量(55.00±8.16 μg/ml); 均显著低于 ZN 组(208.55±38.24 μg/ml, 225.66±45.72 μg/ml; $P<0.01$)。

3　讨论

3.1　过量锌对大鼠生长发育的影响

本研究采用过量锌饲料饲养动物七周, 发现过量锌大鼠从第 4 周开始出现进行性食欲减退, 活动减少, 嗜睡、呆滞或狂躁不安, 毛发紊乱, 体重增长缓慢, 腹泻等; 第七周时, 动物嗜睡, 咬尾, 发育停滞, 饲料效价明显降低, 血浆、红细胞膜和肠组织锌含量明显高于正常组, 死亡率高达 22.86%, 与文献[4, 5] 报道相符。表明我们所复制的常锌、过量锌大鼠模型是成功的。

3.2　过量锌对粘液分泌及其成分的影响及其机制

ZE 组大鼠, 在早期杯状细胞数量变化不显著, 面积、直径都显著大于 ZN 组, 粘液蛋白含量显著低于 ZN 组; 晚期杯状细胞的数量和粘液蛋白含量进一步降低。这提示: 过量锌对杯状细胞的损害使其蛋白质合成和分泌能力削弱, 而早期杯状细胞的面积、直径增大应属于一种代偿机制。由于金属硫蛋白(MT)[6]、非特异结合蛋白(NSB)及其它保护性机制的调节作用[7], 在早期机体对过量锌有一定耐受性; 而持续过量锌摄入, 超过机体的调节极限时, 就表现为过量锌的毒性作用, 杯状细胞的有丝分裂和蛋白质合成严重受抑, 粘液层厚度虽然无明显变化, 但粘液成分已经发生改变, 粘液蛋白质成分降低。

杯状细胞改变和粘液蛋白质含量的降低, 粘液稠度降低, 肠道粘液动力系统对病原微生物的清洁作用和交联作用削弱, 粘膜表面粘液屏障结构及其微生态环境改变, 病原微生物易于在粘膜定植、穿透粘液层而直接接触肠粘膜, 机会感染率增加[8,9], 但目前尚缺乏直接依据, 有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Flanagan P R. A model to produce pure zinc deficiency in rats and its use to demonstrate that dietary phytate increase the excretion of endogenous zinc[J]. J Nutr, 1984, 114(3): 493—502.

[2] 张裕曾, 陈　琢, 刘　芸. 大白鼠红细胞膜和红细胞中钙锌测定方法探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 1995, 5(4): 216—218.

[3] Mantle M, Allen A. Isolation and characterization of the native glycoprotein from pig small-intestinal mucus[J]. Biochem J, 1981, 195(2): 267—275.

[4] Folwaczny C. Zinc and diarrhea in infants[J]. J Trace Elem Med Biol, 1997, 11(2): 116—122.

[5] Fosmire G J. Zinc toxicity[J]. Am J Clin Nutr, 1990, 51(2): 225—227.

[6] Durliat M, Muller J P, Andre M, *et al*. Expression of the Xenopus laevis metallothionein gene during ontogeny[J]. Int J Dev Biol, 1999, 43(6): 575—578.

[7] Lioumi M, Ferguson C A, Sharpe P T, *et al*. Isolation and characterization of human and mouse ZIRTI, a member of the IRT1 family of transporters, mapping within the epidermal differentiation complex[J]. Genomics, 1999, 62(2): 272—280.

[8] Johansson M H, Bieberich C, Kase-Sjostrom A, *et al*. Differential effects on T cell and NK cell development by tissue-specific expression of H-2D(d) transgene[J]. Eur J Immunol, 2000, 30(2): 525—533.

[9] Kagnoff M F. Mucosal immunology: New frontiers[J]. Immunol Today, 1996, 17(2): 57—59.

(编辑　张大春)

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