

文章编号:1005-6947(2008)08-0760-04

· 基础研究 ·

GLP-2 对实验性梗阻性黄疸小肠上皮细胞紧密连接的调控

陈振勇, 冯贤松, 杨鹏, 周有生

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 综合科, 湖北 武汉 430022)

摘要:目的 探讨类高血糖素多肽-2 (GLP-2) 对实验性梗阻性黄疸小肠上皮细胞紧密连接的调控。方法 建立梗阻性黄疸大鼠模型, 造模后 10d 随机分组, 每组 10 只。黄疸组皮下注射 0.01 mmol/LPBS 0.5 mL, 实验甲组腹腔注射 250 g/(kg·d), 实验乙组腹腔注射 125 g/(kg·d) 的 GLP-2 溶液 0.5 mL, 每天 2 次, 连续 7 d 后处死。另设正常对照组, 用免疫组化及 Western blots 检测末端回肠黏膜紧密连接蛋白 ZO-1, Occludin 及 Claudin-1, Claudin-4 的分布和表达, 并用图像分析系统对 Western blots 图像进行定量分析。结果 正常情况下 ZO-1, Occludin 和 Claudin-1 染色强阳性率分别为 70.0%, 80.0% 和 70.0%。梗阻性黄疸时 ZO-1 和 Occludin 分布不均, 染色变淡, 线条模糊。补充外源性 GLP-2 后, 实验甲组的 ZO-1, Occludin 和 Claudin-1 染色有所恢复, 且强阳性表达率分别从黄疸组的 20.0%, 30.0% 和 20.0% 升至实验甲组的 80.0%, 90.0% 和 80.0% (均 $P < 0.05$); Claudin-4 表达和分布变化不明显。实验乙组对紧密连接蛋白无影响。Western blots 图像定量分析得到相同的结果。结论 梗阻性黄疸时, 补充 GLP-2 可影响小肠黏膜上皮紧密连接蛋白的分布和表达; 提示 GLP-2 能恢复和维持小肠黏膜上皮屏障的完整性。 [中国普通外科杂志, 2008, 17(8): 760-763]

关键词: 黄疸, 梗阻性; 类高血糖素多肽-2; 紧密连接蛋白; 肠屏障功能

中图分类号: R 657.4

文献标识码: A

Effect of glucagon-like peptide-2 on modulation of intestinal epithelium tight junction in rats with obstructive jaundice

CHEN Zhenyong, FENG Xiansong, YANG Peng, ZHOU Yousheng

(Department of General Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of GLP-2 on modulation of intestinal mucosa epithelium tight junction in obstructive jaundice rats. **Methods** The obstructive jaundice model of rats was set up. At 10 days after operation, the rats were randomly divided into 4 groups: normal group, jaundice group, experiment group A and B. Each group consisted of 10 animals. The animals of jaundice group had subcutaneous injection of 0.5 ml 0.01 mmol/LPBS, experiment group A had intraperitoneal injecton of 0.5 mL 250 g/(kg·d) GLP-2; experiment group B intraperitoneal injected 0.5 ml 125 g/(kg·d) GLP-2, b. i. d × 7. Immunohistochemistry and Western-blot were used to examine the distribution and expression of tight junction proteins ZO-1, occludin and Claudin-1, -4 in the terminal ileum mucosa. Image analytical system and statistics software were used to analyze the results quantitatively. **Results** In normal group, the strong positive expression ratios of ZO-1, occludin and claudin-1 were 70.0%, 80.0% and 70.0% respectively. In jaundice group, ZO-1 and Occludin staining appeared discontinuous and vague. ZO-1, occludin and

收稿日期: 2008-05-05; 修订日期: 2008-06-21。

作者简介: 陈振勇, 男, 华中科技大学同济医学院附属协和医院主治医师, 主要从事胃肠疾病方面的研究。

通讯作者: 陈振勇 E-mail: xhcz@126.com

claudin-1 staining recovered somewhat after exogenously supplied GLP-2 in experiment group A. The strong positive expression ratios were obviously higher in experiment group A than those in the jaundice group (20.0% vs 80.0%, 30.0% vs 90.0%, 20.0% vs 80.0%, all $P < 0.05$). The distribution and expression of Claudin-4 altered insignificantly. There were no noticeable changes in the expression and quantity of tight junction proteins in experiment group B. The same outcomes were obtained by quantitative analysing Western blot images. **Conclusions** Exogenous supplemented GLP-2 in obstructive jaundice can influence the expression and distribution of the tight junction proteins ZO-1, occludin, Claudin-1 of intestinal mucosa. This suggests that GLP-2 could recover and maintain the integrity of intestinal mucosa epithelium barrier.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(8):760-763]

Key words: Jaundice, Obstructive; GLP-2; Tight Junction Proteins; Intestinal Barrier

CLC number: R 657.4

Document code: A

梗阻性黄疸时小肠黏膜屏障发生改变。尽管目前已有多种恢复肠道黏膜屏障的方法,但其中仍有不少未知之处。类高血糖素多肽-2(GLP-2)作为一种肠道特异性生长调控因子,可以促进肠黏膜生长和受损的肠黏膜修复^[1]。本实验通过建立梗阻性黄疸动物模型,研究外源性补充GLP-2对肠上皮紧密连接蛋白成分的影响,探讨GLP-2保护肠黏膜屏障的内在机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料

包括GLP-2的磷酸盐缓冲液(PBS,美国多肽公司),单克隆兔抗ZO-1抗体、闭锁蛋白(Occludin)抗体(美国Zymed Laboratories公司),壳聚素(Claudin-1, Claudin-4)抗体(Sigma公司),四甲基异硫罗丹明(TRITC)-山羊抗兔IgG(北京中山生物技术有限公司),TranswellTM聚碳酸酯膜(美国Costar公司)。另备S-P免疫组织化学染色试剂盒(即用型ElivisionTM plus广谱试剂盒,福州迈新生物技术公司)及OLYMPUS BX41图像采集系统(Image-Pro plus, USA)。

1.2 实验方法

1.2.1 模型制备 健康Wistar大鼠,雌雄不限,体重250~330g,由同济医学院实验动物中心提供。共分4组,每组10只,即正常组、黄疸组和实验甲、乙组。后3组术前禁食16~18h,采用10%水合氯醛腹腔注射麻醉,开腹结扎并切断胆总管。术后10d随机分组。黄疸组术后10~16d接受0.01mmol/L PBS液0.5mL,腹部皮下注射2次/d;实验甲组接受250g/(kg·d)的GLP-2溶液0.5mL,实验乙组接受同量GLP-2液125g/(kg·d)腹腔注射,每天2次,连续7d,注射完毕后24h放血处死动物。距回盲部10cm处环形切

取回肠组织。

1.2.2 免疫组化技术检测回肠ZO-1, Occludin和Claudin-1, -4的表达 采用常规S-P法测定,实验步骤按试剂盒说明书进行。阴性对照用PBS代替一抗。反应终浓度抗ZO-1及Occludin抗体均为1:200, Claudin-1, Claudin-4抗体为1:800,随机选取每一种切片染色清晰者5~8张,于光镜下(40×)随机选取3个视野,并在高倍镜下观察。细胞中出现棕褐色颗粒为阳性。≥75%的细胞染色判为(+++), 50%~<75%染色为(++), 10%~≤50%为(+), ≤10%为(-)。

1.2.3 免疫印迹(Western blots)分析 另取黏膜组织100mg,加入1mL裂解液和10mL缓冲液,组织粉碎,匀浆,冰浴30min;4℃离心,取上清液,用紫外可见分光光度仪测定蛋白浓度,并用蒸馏水将各样本统一稀释为5μg/μL, -70℃保存。各取样本10μL及5μL的预染Marker,加入上样缓冲液;混合后100℃煮沸蛋白变性5min,分别经7.5%和12%SDS-PAGE凝胶电泳分离1h或2h。电转30min;取出硝酸纤维膜,染色1min,用含5%脱脂奶粉的TBS-T洗膜数次,封闭液中封闭1h。分别加一抗ZO-1, Occludin和Claudin-1, Claudin-4抗体,均以1:1000稀释;以β-actin(武汉博士德产品)为内参,1:2000稀释,4℃孵育过夜。加入1:2000的二抗[四甲基异硫罗丹明(TRITC)-山羊抗兔IgG]室温下孵育1h。将膜放入显色液中,震荡孵育5~10min,暗室下胶片显影,扫描。以β-actin蛋白进样对照。采用Adobe Photoshop软件定量测量平均光密度(OD)值。

1.3 统计学处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用简明医学统计软件进行分析。组内多样本计量资料用四格表确切概

率检验;样本均数的组间比较采用精确概率 q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 末端回肠 ZO-1 蛋白和 Occludin 蛋白的表达

正常组 ZO-1 均匀分布于小肠上皮细胞的边缘和细胞膜顶端,沿绒毛下方连续分布,呈强阳性表达(70.0%)。而黄疸组 ZO-1 分布不均,染色变淡,边缘粗糙有毛刺状突起,强阳性表达率下降为 20.0% ($P = 0.03$)。实验甲、乙组的 ZO-1 染色向细胞边缘集中明显,但细胞中间仍有间断染色;强阳性表达率分别为 80.0% 和 60.0%,相比黄疸组,实验甲组明显升高 ($P = 0.01$),乙组变化不明显 ($P = 0.08$);但实验甲、乙两组间没有差异 ($P = 0.24$) (表 1)。

与 ZO-1 相似,正常组 Occludin 连续分布于小肠上皮细胞的边缘,主要定位于细胞膜和细胞质,

呈强阳性表达(80.0%)。黄疸组 Occludin 染色散乱,强阳性表达率下降为 30.0% ($P = 0.03$)。实验甲、乙组染色有所恢复,强阳性表达率分别为 90.0% 和 50.0%,实验甲组与与黄疸组相比差异有显著性 ($P = 0.01$),乙组没有变化 ($P = 0.24$);但实验甲、乙两组间没有差异 ($P = 0.07$) (表 1)。

2.2 末端回肠 Claudin-1, Claudin-4 蛋白的表达

正常组大多数黏膜上皮表达 Claudin-1,主要集中在细胞膜。黄疸组 Claudin-1 的表达被扰乱,染色强度降低,强阳性表达率为 20.0% ($P = 0.03$)。与黄疸组相比,实验甲组 Claudin-1 的染色强阳性表达率升至 80.0% ($P = 0.01$),实验乙组变化不明显 ($P = 0.08$),实验甲、乙两组间差异无显著性 ($P > 0.05$)。Claudin-4 的染色强阳性率正常组为 60.0%,黄疸组 50.0%,实验甲组 60.0%,乙组 40.0%,4 组间差异均无显著性 ($P = 0.32$) (表 2)。

表 1 小肠黏膜 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达的变化

组别	例数	ZO-1 蛋白染色分析		强阳性率(%)	Occludin 蛋白染色分析		强阳性率(%)
		(-)~(+)	(++)~(+++)		(-)~(+)	(++)~(+++)	
正常组	10	3	7	70.0 ¹⁾	2	8	80.0 ¹⁾
黄疸组	10	8	2	20.0	7	3	30.0
实验甲组	10	2	8	80.0 ¹⁾	1	9	90.0 ¹⁾
实验乙组	10	4	6	60.0 ²⁾	5	5	50.0 ²⁾

注:与黄疸组比较,1) $P < 0.05$, 2) $P > 0.05$

表 2 小肠黏膜-1, Claudin-4 蛋白的表达

组别	例数	Claudin-1 染色分析		强阳性率(%)	Claudin-4 染色分析		强阳性率(%)
		(-)~(+)	(++)~(+++)		(-)~(+)	(++)~(+++)	
正常组	10	3	7	70.0 ¹⁾	4	6	60.0
黄疸组	10	8	2	20.0	5	5	50.0
实验甲组	10	2	8	80.0 ¹⁾	4	6	60.0
实验乙组	10	4	6	60.0 ²⁾	6	4	40.0 ³⁾

注:与黄疸组比较,1) $P < 0.05$, 2) $P > 0.05$; 3)4 组间比较, $P > 0.05$

2.3 紧密连接蛋白的 Western blots 图片

以 β -actin 为内参,ZO-1 蛋白条带在 280 kD 左右,Occludin 蛋白条带在 380 kD (图 1), Claudin-1 蛋白条带在 240 kD 左右, Claudin-4 在 300 kD (图 2)。

2.4 Western blot 图像定量处理结果

用图像分析仪测定条带的平均 OD 值。黄疸

组的 ZO-1, Occludin 和 Claudin-1 的 OD 值较正常组均有明显下降(均 $P < 0.05$),实验甲组的数据较黄疸组升高明显 ($P < 0.05$)。实验乙组尽管数据有所恢复,但与黄疸组差异无显著性 ($P > 0.05$)。Claudin-4 的 OD 值,各组间变化不明显 ($P > 0.05$) (表 3)。

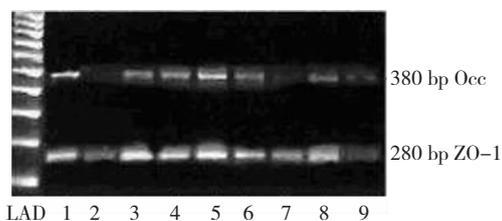


图1 ZO-1和Occludin的Western blots结果

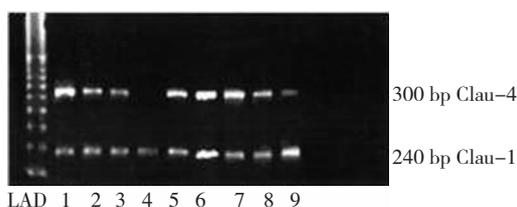


图2 Claudin-1, Claudin-4的Western blots结果

表3 Western blots 图像分析结果(OD值, $\bar{x} \pm s$)

组别	ZO-1	Occludin	Claudin-1	Claudin-4
正常组	0.2522 ± 0.0186	0.5528 ± 0.0201	0.3232 ± 0.0173	0.6534 ± 0.0306
黄疸组	0.2157 ± 0.0219 ¹⁾	0.5170 ± 0.0212 ¹⁾	0.2831 ± 0.1245 ¹⁾	0.6389 ± 0.0241
实验甲组	0.2473 ± 0.0155 ²⁾	0.6021 ± 0.0458 ²⁾	0.3254 ± 0.0266 ²⁾	0.6502 ± 0.1508
实验乙组	0.2214 ± 0.0321 ³⁾	0.5279 ± 0.0573 ³⁾	0.3016 ± 0.1041 ³⁾	0.6428 ± 0.2090 ⁴⁾

注:与正常组比较,1) $P < 0.05$;与黄疸组比较,2) $P < 0.05$, 3) $P > 0.05$; 4) 各组间比较, $P > 0.05$

3 讨论

笔者前期的实验证实^[2],梗阻性黄疸时肠黏膜通透性的变化与肠上皮紧密连接蛋白的一系列改变有关。梗阻发生时与肠黏膜通透性密切相关的紧密连接蛋白ZO-1, Occludin和Claudin-1,首先从位置上发生改变,正常情况下这些蛋白分布于细胞边缘,沿细胞膜分布;胆道梗阻时分布散乱,细胞质内也有零星分布。从数量上看,梗阻发生时,这些蛋白染色强度均下降,与文献报道一致^[3]。

使用生长激素、L-精氨酸、谷氨酰胺、蛙皮素和神经降压素等^[4]均可使受损的肠黏膜屏障恢复。GLP-2是近年来发现的一种具有特异性促进肠黏膜生长与损伤后修复的、有33个氨基酸残基的多肽,是肠道中与营养相关的一种激素,由肠道L细胞受肠内营养素刺激产生^[1]。

GLP-2对小肠具有多种生理功能,包括维持生长、屏障功能、消化、吸收及血流动力学等,其机制较复杂,涉及到独特的信号机制和多重的间接介质。GLP-2的生理功能系通过GLP-2受体来实现。GLP-2受体是一种G蛋白偶联受体,信号通过复杂的G蛋白家族影响cAMP和细胞分裂素活化蛋白激酶,导致细胞增殖和抗凋亡效应。包括小肠内分泌细胞、上皮肌纤维母细胞和肠神经元存在GLP-2受体表达^[5]。

本研究发现,GLP-2能改变小肠上皮紧密连接蛋白的数量和分布。梗阻发生时紧密连接蛋白ZO-1, Occludin和Claudin-1从数量和分布上均发生改变。外源性给予大剂量的GLP-2,能纠正破坏的紧密连接蛋白,分布有所恢复,阳性表达

率接近正常。而小剂量的GLP-2不产生明显的效果。说明GLP-2发挥生理功能需要一定的药物浓度支持。而且GLP-2对Claudin-4不产生作用,提示Claudin-4在小肠上皮紧密连接中具有另外的作用和机制。

GLP-2能促进小肠上皮细胞增殖,抑制细胞凋亡,加快肠上皮形态结构修复,进而促进肠黏膜屏障功能恢复。虽然GLP-2能有效和特异性地刺激肠黏膜上皮生长的作用已被确认,但其作用机制所涉及的信号传导通道很复杂,如cAMP依赖的蛋白激酶途径等^[6]。因而更深一层的机制还待进一步研究。

参考文献:

- [1] Xiaowen L, David W, Jens J, *et al.* Synergistic effect of supplemental enteral nutrients and exogenous glucagon-like peptide 2 on intestinal adaptation in a rat model of short bowel syndrome [J]. *Am J Clin Nutr*, 2006, 84(6): 1142 - 1150.
- [2] 陈振勇, 冯贤松, 周有生. 梗阻性黄疸大鼠肠黏膜上皮紧密连接蛋白和MLCK的研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2008, 17(2): 140 - 144.
- [3] Yang R, Harada T, Li J, *et al.* Bile modulates intestinal epithelial barrier function via an extracellular signal related kinase 1/2 dependent mechanism [J]. *Intensive Care Medicine*, 2005, 31(5): 709 - 717.
- [4] 田延锋, 李勇. 梗阻性黄疸对肠黏膜屏障功能的影响及药物干预[J]. *河北医科大学学报*, 2007, 28(2): 151 - 153.
- [5] Dubé PE, Brubaker PL. Frontiers in glucagon-like peptide-2: multiple actions, multiple mediators [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 293(2): E460 - 465.
- [6] Martin GR, Wallace LE, Hartmann B, *et al.* Nutrient-stimulated GLP-2 release and crypt cell proliferation in experimental short bowel syndrome [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2005, 288(3): G431 - G438.