

肠外营养促进短肠大鼠小肠粘膜上皮细胞凋亡

顾 岩¹, 谢建新², 吴肇汉³

(1. 中山医科大学孙逸仙纪念医院外科, 广东 广州 510120; 2. 上海医科大学解剖学教研室, 上海 200032;
3. 上海医科大学中山医院外科, 上海 200032)

关键词: 肠外营养; 短肠综合征; 凋亡

中图分类号: R605.979 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2000)04S0-0120-03

肠外营养(parenteral nutrition, PN)是短肠综合征(short bowel syndrome, SBS)治疗的主要手段。但长期的肠外营养可导致肠粘膜的萎缩。本实验的目的即在于通过研究单纯肠外营养时短肠大鼠残存肠粘膜上皮细胞凋亡及其相关基因的表达,进一步阐明肠外营养时肠萎缩发生的机制,为临床SBS治疗提供理论指导。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组

采用180~220 g 雄性SD大鼠,经12~14 h 禁食(不禁水)后,0.5%戊巴比妥钠腹腔麻醉(40 mg/kg),在无菌条件下开腹,保留距treitz韧带7 cm及距回盲部10 cm之小肠,将中间小肠全部切除后行空回肠端端吻合,切除小肠约占全部小肠的75%。关腹后再在无菌条件下行上腔静脉置管术,以自制弹簧保护架固定,双道微量注射泵行肠外营养液持续输注。

手术成功后,取行持续PN大鼠($n = 10$)为PN组,术后当天予生理盐水,术后第1天开始PN,共持续6 d。取正常饮食大鼠($n = 8$)为对照组。

1.2 营养液配制

PN液以500 g/L葡萄糖、70 g/L Vamin及200 g/L脂肪乳剂(intralipid)为基本液体配成。其中每天每千克体重给予大鼠非蛋白热卡及氮(N)量分别为698.9 kJ及1.4 g N,糖脂供能比为2:1。术后第1天输液量为每千克体重80 mL,以后每天为160 mL。

1.3 标本采集

PN组大鼠在术后第6天PN结束后30 min,予0.5%戊巴比妥钠麻醉,剖腹。自幽门开始将全部小肠取下,置冰上,按统一方法取组织块。吻合口近端4 cm小肠,以10%福尔马林固定保存,常规石蜡包埋制作切片。吻合口远端5 cm小肠,沿肠系膜缘纵行切开,冰生理盐水冲洗,刮取肠粘膜, -70℃冰箱保存。同法取近端及远端对照组大鼠小肠标本。

1.4 检测方法

1.4.1 光镜检查 低倍光镜下行小肠形态学检查。以VIDS II型半自动图象分析仪测量小肠粘膜厚度、绒毛高度及隐窝深度,按Frankel法计算绒毛表面积。

1.4.2 细胞增殖核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)测定 采用ABC法作免疫组织化学染色^[1]。一抗为1:100小鼠抗大鼠PCNA(Dako公司),二抗为1:200生物素马抗小鼠(Sigma公司),ABC试剂工作浓度为1:100。在QI 500图象分析仪下计数每个肠腺隐窝中PCNA完整阳性的细胞数,求其均值。

1.4.3 原位末端标记(TUNEL)染色 应用Boehringer Mannheim公司原位细胞凋亡检测试剂盒进行。光镜观察同样用QI 500图象分析仪,计数每100个细胞中凋亡细胞数,求出凋亡细胞的发生率,以凋亡指数表示。

1.4.4 RT-PCR测定 组织总RNA的提取应用TRIzol试剂盒(GIBCO, BRL公司),按操作手册操作。将2 μg RNA逆转录成cDNA(Promega公司逆转录试剂盒),G3PDH、bcl-2及bax引物设计参照

收稿日期: 2000-03-16

基金项目: 国家教委博士点基金资助项目(9736);上海市卫生局科技发展基金资助项目(97429);SSPC 科研基金资助项目

作者简介: 顾 岩(1964-)男,江苏无锡人,博士,主治医师,主攻肝胆外科、外科营养。
?1994-2019 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Schwartz^[2] 及 DeNardo^[3] 的报道由美国赛百胜公司合成。以 G3PDH 作为内参照控制上样量, 在 2% (V/V) 琼脂糖凝胶上电泳, VDS 成像分析系统扫描测定光密度, 计算其 mRNA 的表达水平。

1.5 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行 Student *t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异显著。所有统计分析均用 Stata 5.0 软件包在计算机上进行。

表 1 小肠粘膜厚度, 绒毛高度, 隐窝深度及绒毛表面积

Table 1 Mucosal thickness, villous height, crypt depth and villous surface area of intestinal segments ($\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$)

Group	Mucosal thickness	Villous height	Crypt depth	Villous surface area (μm^2)
PN	373.70 ± 13.08	211.90 ± 19.18	96.18 ± 8.98	10550 ± 1155
Control	600.02 ± 12.07	403.95 ± 16.40	158.45 ± 12.88	20313 ± 1673

There is significant difference in the intestinal mucosal thickness, villous height, crypt depth and villous surface area between PN group and control group, $P < 0.01$

隐窝深度 (crypt depth) 及绒毛表面积 (villous surface area) 均显著低于对照组, $P < 0.01$ 。

2.2 PCNA 表达及凋亡小体测定

PCNA 阳性的细胞主要分布在肠腺隐窝区, PN 组小肠粘膜上皮细胞中 PCNA 阳性细胞数显著低于正常对照组, $P < 0.01$; 凋亡细胞主要位于小肠绒毛顶部, 计数结果显示 PN 组小肠粘膜上皮细胞凋亡发生率明显高于对照组, $P < 0.01$ 。见表 2。

表 2 小肠粘膜上皮细胞 PCNA 表达与凋亡指数

Table 2 PCNA expression and apoptotic index of intestinal epithelial cells ($\bar{x} \pm s$)

group	PCNA (positive cells/ crypt lieberkuhn)	Apoptotic index (positive cells/ 100 cells)
PN	8.37 ± 2.23	22.32 ± 3.84
Control	21.22 ± 3.03	2.32 ± 1.15

There is significant difference in PCNA expression and apoptotic index between PN group and control group, $P < 0.01$

2.3 bcl-2 及 bax mRNA 表达测定

残存小肠粘膜上皮细胞 bcl-2 mRNA 的表达在 PN 组显著低于对照组; 而 bax mRNA 的表达则相反, PN 组显著高于对照组, P 均 < 0.01 , 见表 3。

3 讨论

3.1 PN 对短肠大鼠残存小肠代偿的影响

2 结果

2.1 形态学观察

光镜下 PN 组大鼠小肠肠壁较对照组明显变薄, 绒毛变短, 细胞肿胀脱落, 粘膜腺体稀疏排列。图象分析结果见表 1。由表可见 PN 组大鼠小肠粘膜厚度 (mucosal thickness)、绒毛高度 (villous height)、

表 3 小肠粘膜上皮细胞 bcl-2 及 bax mRNA 表达

Table 3 bcl-2 and bax mRNA expression of intestinal epithelial cells ($\bar{x} \pm s$)

Group	bcl-2 mRNA	Bax mRNA
PN	0.196 ± 0.03	0.427 ± 0.05
Control	0.422 ± 0.07	0.211 ± 0.03

There is significant difference in bcl-2 and bax mRNA expression between PN group and control group, $P < 0.01$

短肠综合征患者的长期存活有赖于残存小肠粘膜的适应性代偿, 由此促进营养物质的吸收, 以逐渐恢复经肠营养。大量肠道切除是残存小肠发生代偿变化的强刺激, 大鼠在小肠切除术后数天内残存小肠即可出现代偿性增生, 对营养物质的吸收能力增强, 该过程被称为小肠的代偿适应, 常在术后 2 周达到稳定状态^[4]。但单纯肠外营养本身易致小肠粘膜萎缩, 研究表明大鼠在单纯 PN 支持 3 d 后, 肠道粘膜上皮即出现明显萎缩和功能下降^[5], 因此 PN 时短肠大鼠残存小肠的最终形态学改变取决于上述两者作用之和。本研究发现 PN 6 d 后, PN 组大鼠其小肠粘膜形态学上呈明显萎缩表现。表明 SBS 时单纯持续的 PN 将导致残存小肠发生显著萎缩, 这对于肠道功能的代偿恢复极为不利。

3.2 肠萎缩发生的机制

传统的观点普遍认为肠粘膜上皮细胞的增生抑制是 PN 导致小肠粘膜萎缩的主要原因, 但增生

仅仅是细胞生命过程中的一个方面,其另一方面,即凋亡同样在细胞的生命过程中起着重要的作用。国内外目前尚无对 PN 与小肠粘膜上皮细胞凋亡关系的研究报道。

PCNA 是 DNA 合成所必需的一种 DNA 多聚酶 δ 的辅酶蛋白,能够客观地反映细胞的增殖程度。本研究发现 PN 组 PCNA 阳性细胞数显著低于其它各组,证实 PN 时残存小肠粘膜上皮细胞确实处于显著的增生抑制状态,增生抑制是导致肠萎缩的重要原因之一。

凋亡是一种在基因控制下的细胞主动死亡过程,为细胞生命过程中不可缺少的组成部分,是机体维持恒定状态所必需。作为体内是更新最迅速的小肠上皮细胞,其细胞周期仅 12 h,同样也存在着细胞凋亡^[6]。正常情况下凋亡稳定在一个低水平状态,以维持绒毛的结构和功能。已有研究发现化疗、放疗及缺血再灌注损伤等均可导致小肠粘膜上皮细胞凋亡增加^[7]。本研究发现,凋亡细胞在 PN 组明显高于对照组 ($P < 0.05$),说明单纯 PN 时粘膜的萎缩伴有明显的细胞凋亡增加,凋亡同样是造成小肠萎缩的重要原因之一。小肠粘膜的凋亡又可分为增殖区凋亡和非增殖区凋亡,非增殖区凋亡参与绒毛细胞数的调节和形态结构的维持,而增殖区凋亡主要是消除受损 DNA 细胞,维持干细胞的稳定。我们的研究发现 PN 时凋亡细胞主要分布于绒毛的顶部,也即主要位于非增殖区,这更直接反映了凋亡与粘膜萎缩之间存在密切的关系。

3.3 凋亡相关基因的调控

细胞凋亡受基因编码控制,并涉及到某些基因的活化。bcl-2 原癌基因是目前研究最为明确的凋亡拮抗基因^[8]。其基本生物学功能为延长细胞生命期限,增加细胞对多种凋亡刺激因子的抗性。bax 是 bcl-2 家族成员之一,其蛋白可与 bcl-2 蛋白结合成杂二聚体,抑制 bcl-2 功能的发挥,两者数量比决定着细胞受到凋亡刺激因素后的生与死。本研究发现 bcl-2 mRNA 表达在 PN 组显著低于对照组,而 bax mRNA 表达则正好相反,两者间差异极

为显著。这进一步从分子水平说明 PN 时短肠大鼠残余小肠上皮凋亡细胞的增加与基因调控失常,也就是 bcl-2 的低表达及 bax 的高表达密切相关。细胞丢失的增加,如同细胞产生减少一样,在 PN 所致的肠粘膜的萎缩中起着重要作用。

本研究结果表明凋亡与 PN 时短肠大鼠肠粘膜萎缩密切相关,因此寻找一种能够有效减少细胞凋亡的方法对于临床短肠综合征治疗将具有重要的意义。

参考文献:

- [1] 蔡文琴,王伯纭.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,1994.121~134.
- [2] Schwartz-cornil I, Chevallier N, Belloc C, *et al*. Bovine leukemia virus-induced lymphocytosis in sheep is associated with reduction of spontaneous B cell apoptosis [J]. J Gen Virol, 1997, 78(pt 1): 153.
- [3] DeNardo S J, Gumerlock P H, Winthrop M D, *et al*. Yttrium-90 chimeric L6 therapy of human cancer in nude mice and apoptosis-related messenger RNA expression [J]. Cancer Res, 1995, 55(23 suppl): 3837s.
- [4] Vanderhoof J A, Kollman K A, Griffin S, *et al*. Growth hormone and glutamine do not stimulate intestinal adaptation following massive small bowel resection in the rat [J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1997, 25(3): 327.
- [5] Liboshi Y, Nezu R, Kennedy M. Total parenteral nutrition decreases luminal mucous gel and increased permeability of small intestine [J]. JPEN, 1994, 18(4): 346.
- [6] Potten C S. A comprehensive study of the radiobiological response of the murine small intestine [J]. Int J Radiat Biol, 1990, 58(6): 925.
- [7] Noda T, Jwakini R, Fujimoto K, *et al*. Programmed cell death induced by ischemia-reperfusion in rat intestinal mucosa [J]. Am J Physiol, 1998, 274(2 pt1): G270.
- [8] Korsmeyer S J. Bcl-2 initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death [J]. Blood, 1992, 80(4): 879.

(编辑 关淡庄)