

· 实验研究 ·

肠三叶因子在内毒素致幼鼠肠损伤中的作用及意义

李军¹, 许玲芬¹, 孙梅¹, 李强², 高红³, 姜卫国⁴

(中国医科大学附属第二临床学院 1. 儿科; 2. 中心实验室; 3. 小儿外科, 卫生部小儿先天畸形
重点实验室; 4. 病理科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 探讨内毒素(LPS)致幼鼠肠损伤中二胺氧化酶(DAO)及肿瘤坏死因子(TNF- α)的变化及基因重组肠三叶因子(rITF)的保护作用, 为临床治疗提供实验依据。方法 Wistar 幼鼠 10 日龄 96 只分为 3 组, A 组:生理盐水对照组; B 组: LPS 组; C 组: LPS + rITF 组, 每组 32 只。以生理盐水(1 mL/kg), *Ecoli*O₅₅: B₅ (1 mL/kg), rITF(0.1 mL/只, 配制浓度 5 g/L)腹腔注射后 2, 6, 24, 72 h 断头处死动物, 取动静脉混合血, 测血 DAO 活性。留取肠组织, 免疫组化法检测 TNF- α 蛋白含量, PCR 法检测 TNF- α mRNA 表达。同时作电镜观测肠组织超微结构变化。结果 B 组血浆 DAO 活性自 LPS 作用后 2 h 即开始升高, 至 6 h 达到最高值, 较 A 组差异有显著性(1.519 $\pm$ 0.13 U/L vs 1.081 $\pm$ 0.04 U/L, P < 0.01), 72 h 仍持续高值; C 组血浆 DAO 活性较 B 组明显下降(P < 0.01 或 P < 0.05); 与 A 组 6 h 比较差异有显著性(P < 0.01), 其余各时间点差异无显著性(P > 0.05); B 组 TNF- α 积分光密度含量明显高于 A 组, 以 LPS 作用后 6 h 达高峰(37 247.64 $\pm$ 3 387.59 vs 6 191.02 $\pm$ 482.32, P < 0.01), C 组 TNF- α 含量较 B 组明显降低, 但仍高于 A 组(P < 0.01); TNF- α mRNA 在 A 组各时间点有微弱的表达, 在 B 组各时间点表达明显增强, 较 A 组差异显著(P < 0.01); 而 C 组各时间点表达明显减少, 较 B 组差异显著(P < 0.01 或 P < 0.05)。电镜下肠组织超微结构: A 组正常, B 组变化明显, C 组变化较 B 组减轻。结论 ITF 可降低血浆 DAO 活性, 抑制肠组织 TNF- α mRNA 及蛋白表达, 减轻 LPS 所致幼鼠肠损伤, 发挥保护作用。

[中国当代儿科杂志, 2006, 8(5): 425-428]

[关键词] 肠; 内毒素; 肠三叶因子; 二胺氧化酶; 肿瘤坏死因子; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)05-0425-04

Protective effects of recombinant intestinal trefoil factor against intestinal injuries induced by endotoxin in young rats

LI Jun, XU Ling-Fen, SUN Mei, LI Qiang, GAO Hong, JIANG Wei-Guo. Department of Pediatrics, Second Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Email: lijun9524@126.com)

Abstract: Objective This study aimed to investigate the protective effects of recombinant intestinal trefoil factor (rITF) against intestinal injuries and the possible mechanism by examining the changes of diamine oxidase (DAO) and TNF- α and the intestinal ultrastructural changes in lipopolysaccharide (LPS) induced intestinal injuries. **Methods** Ninety-six ten-day-old Wistar rats were randomly injected with either normal saline (1 mL/kg, Control group), LPS (1 mL/kg) or LPS (1 mL/kg) + rITF (0.1 mL) intraperitoneally. At 2, 6, 24 and 72 hrs after administration plasma DAO activity was determined using absorption spectrometry; and the intestinal protein and mRNA expression of TNF- α were measured using immunohistochemistry and RT-PCR methods. The intestinal ultrastructural changes were observed by electron microscopy. **Results** The plasma DAO activity in the LPS group began to increase at 2 hrs, peaked at 6 hrs and remained at significantly higher levels until 72 hrs after administration compared with the Control group (P < 0.01). The plasma DAO activity in the LPS + rITF group decreased noticeably compared with the LPS group at all time points (P < 0.01 or 0.05). A significant difference in the plasma DAO activity was only observed at 6 hrs after administration between the LPS + rITF and the Control group. The expression of TNF- α protein in the LPS group significantly increased at each time point, peaking at 6 hrs after LPS administration, with the IODT of TNF- α of 37 247.64 $\pm$ 3387.59 vs 6 191.02 $\pm$ 482.32 (P < 0.01) compared with the Control group. rITF treatment decreased the expression of TNF- α protein although it remained significantly higher than in the Control group (P < 0.01). The TNF- α mRNA was weakly expressed in the Control group but strikingly increased after LPS injection (P < 0.01). Compared with the LPS group, the TNF- α mRNA expression in the LPS + rITF group decreased at all time points (P < 0.01 or 0.05). Vacuole changes of mitochondrium,

[收稿日期] 2006-01-26; [修回日期] 2006-03-06

[作者简介] 李军, 女, 博士, 副教授。主攻方向: 小儿消化系统疾病。

cell nucleus condense, break and depletion of part of microvilli, and widen and disrupted tight junction were observed in the LPS group. The ultrastructural changes of intestinal tissues were improved in the LPS + rITF group. **Conclusions** rITF can decrease the plasma DAO activity and inhibit the expression of TNF- α , resulting in a protective effect against intestinal injuries induced by LPS in young rats. [Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8 (5): 425-428]

Key words: Intestine; Endotoxin; Intestinal trefoil factor; Diamine oxidase; Tumor necrosis factor- α ; Rats

感染在儿科临床中常见,危重者常伴发胃肠功能障碍,发病机制与内毒素和肠黏膜屏障功能密切相关,近年来倍受人们的关注。肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF)是近年发现的新型表皮生长因子,对肠黏膜屏障具有保护作用,在胃肠道损伤修复及胃肠先天性免疫中有重要的作用^[1],但多局限于成年动物烧伤及溃疡性结肠炎的研究。本研究试图应用内毒素致肠损伤模型^[2],探讨 ITF 对幼鼠肠损伤的保护作用。

1 对象与方法

1.1 研究对象及分组

10 日龄 Wistar 幼鼠,体重 18~30g,96 只,由中国医科大学第二临床学院动物室提供。分为 3 组,其中 A 组:生理盐水组(1 mL/kg);B 组:内毒素组 *EcoliO*₅₅:B₅(LPS 1mL/kg, Sigma 公司,用生理盐水配制成 5 g/L)。C 组:内毒素 + 三叶因子组(LPS 1 mL/kg + rITF 0.1 mL/只),rITF[基因重组肠三叶因子(recombinant intestinal trefoil factor)由北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室提供,配制浓度 5 g/L]。每组 32 只。3 组幼鼠腹腔注射后放回母鼠笼内继续喂养,至 2,6,24,72 h 分别断头处死动物,留取动静脉血、肠组织待测。

1.2 测定方法

1.2.1 血标本的采集与检测 于实验的各时间点分别断头处死动物,留取动静脉血,肝素抗凝,离心分离血浆, -70℃ 保存待测 DAO。采用黎君友^[3]改良的分光光度法测定血浆中 DAO 活性。所用试剂均购于 Sigma 公司。

1.2.2 留取近回盲部肠组织约 1~2 cm 分别放入 4% 多聚甲醛溶液和 2.5% 戊二醛中固定,备做免疫组化和电镜术观察肠组织超微结构。

1.2.3 采用 SABC(Strept Avidin-Biotin Complex)法检测肠组织 TNF- α 蛋白表达,组织取材后常规脱水、石蜡包埋切片、孵育、抗原热修复、DAB 显色后封片;采取日本产 OLYMPUS 摄像系统和日本产的 MetaMorph/BX41 图像数据分析系统测定积分光密度值(Integrated OD Total, IODT)。所用组化试剂均购于武汉博士德生物工程有限公司。

1.2.4 TNF- α mRNA 表达 按 TRIZOL 总 RNA 提取试剂说明书操作。提取总 RNA 后行 RT-PCR,扩增产物经 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳分析后,紫外灯下观察 RT-PCR 产物并拍照,用 Kodak ID 型凝胶成像系统输入计算机,以该软件进行扩增产物的半定量分析。TNF- α 扩增片断为 393 bp,引物:上游 5'-TATGTGTCGGGACTAAATGAC-3';下游 5'-TTCCAC-CACAAACTGCTC-3'; β -actin:上游 5'-GATTGCT-CAGGACATYYCTG-3';下游 5'-GATTGCTCAGGACAT TT-3'。TNF- α 引物和内参照 β -actin 引物均由北京奥科生物工程有限公司合成。反转录和 PCR 扩增所需要的酶及其他试剂均购自大连宝生物工程有限公司。

1.3 统计学处理

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,SPSS13.0 统计软件进行方差分析,组间比较采用 LSD 法检验,相关分析采用 Pearson 分析法, $P < 0.05$ 提示差异有显著性。

2 结果

2.1 症状观察

B 组动物在腹腔注射 LPS 后 0.5 h 即出现懒动,随之出现口唇、皮毛青紫、呼吸急促、精神萎靡、吃奶少;1~2 h 出现腹泻,腹胀明显,至 6 h 上述症状明显加重;成活鼠 24 h 观察其体重不增或明显下降,临床症状部分缓解。LPS 后 72 h 观察青紫消失、呼吸正常,部分体重可恢复至 LPS 干预前,死亡率约 20%。而 C 组上述临床症状较 B 组轻,而且出现的时间较 B 组晚,体重下降少或无明显下降,死亡率约 10%,A 组鼠活泼、吃奶好、体重增加明显,无死亡。

2.2 组织肉眼观察

B 组动物在腹腔注射 LPS 后 2 h 可见肠管、肠系膜轻度充血肿胀,6 h 时可见充血肿胀明显,有胃潴留,部分肠管扩张,肠腔内有出血;24 h 仍有胃潴留及肠管充血,72 h 上述症状有好转。C 组以上症状较 B 组轻,A 组无明显变化。

2.3 血浆 DAO 活性变化

内毒素作用后 2 h 血浆 DAO 活性增加,与 A 组比较差异有显著性($P < 0.05$);6,24 h 血浆 DAO 活

性明显增加,并于6 h达到高峰,至72 h虽有所下降,但仍较A组有显著增高($P < 0.01$);C组较B组血浆DAO活性明显下降,其中2,6,24 h组较B组差异有显著性($P < 0.01$),72 h与B组比较($P < 0.05$)。C组与A组比较6 h差异有显著性($P < 0.01$),其余各时间点差异无显著性($P > 0.05$)。见表1。

2.4 肠组织 TNF- α mRNA/ β -actin 表达的动态变化

内毒素作用后2 h可见TNF- α mRNA表达明显增加,至6 h达高峰,24,72 h均维持高值($P < 0.01$)。而C组TNF- α mRNA表达较B组明显下降,其2,6,24 h组与B组比较($P < 0.01$),72 h组与B组比较($P < 0.05$)。见表2,图1。

2.5 肠组织 TNF- α 蛋白表达的动态变化(积分光密度值)

内毒素作用后2 h即可见TNF- α 蛋白表达明显增加,TNF- α 蛋白表达于小肠上皮细胞胞浆内,至6 h达高峰,24 h仍持续高值,72 h虽有所下降,但仍高于A组($P < 0.01$)。C组较B组各时间点TNF- α 蛋白表达明显减少($P < 0.01$)。见表3,图2。

2.6 相关分析结果

血DAO与肠组织TNF- α 蛋白经Pearson分析 $r = 0.727, P < 0.01$ 。

2.7 肠组织电镜结果

LPS作用后2 h即有改变,至6 h,24 h细胞损伤达到高峰,72 h有所恢复;肠三叶因子组肠组织损伤较内毒素组减轻,其绒毛排列有好转,断裂、缺失减少。见图3。

3 讨论

胃肠功能障碍常常被认为是多器官功能衰竭的始动因子,发病机制与内毒素血症和肠屏障功能密切相关。肠黏膜屏障在阻止肠腔中细菌、毒素进入机体并维持机体内环境稳定上起重要作用。

内毒素(LPS)能降低上皮细胞的抵抗力、促进细胞凋亡的产生并疏松紧密连接而增加上皮细胞通透性,损伤肠黏膜屏障,引起肠炎症改变^[4,5]。内毒素血症可通过缺氧、炎症介质释放、自由基增多使肠黏膜屏障受损,大量细菌移位,最终造成多器官功能衰竭,甚至死亡。在一定条件下还可激发细胞因子和其他炎性介质如TNF- α , IL-8, IL-1 β , IL-6的连锁反应,在介导败血症休克中有重要作用,其过量产生可引起多器官功能衰竭或死亡^[6,7]。

在我们的实验中证明,伴随肠组织损伤和黏膜

屏障受损同时,肠组织TNF- α 蛋白含量及其mRNA表达增加,于LPS作用后6 h达高峰,并持续至72 h。TNF- α 不仅能改变肠上皮细胞的形态结构和屏障功能,诱导肠上皮细胞的凋亡,还能引起胃肠组织损伤。研究表明肠损伤时肠道缺血缺氧血清TNF- α 的多少与肠黏膜损伤的程度直接相关,应用抗TNF- α 抗体,可减轻组织损伤^[8]。因此,TNF- α 含量的多少与肠损伤密切相关。

本实验中LPS作用下可见血DAO活性的升高,至LPS作用72 h,肠损伤有恢复时,血DAO活性亦有所下降,证明血DAO活性与肠损伤有一定相关性。DAO是人类和所有哺乳动物肠黏膜上皮细胞中具有高度活性的细胞内酶。当肠黏膜上皮细胞受到损伤后,胞内释放DAO增加,进入肠细胞间隙、淋巴管和血流,使血浆DAO升高。在外周血中DAO活性稳定,是反映黏膜上皮成熟度和完整性的血浆标志物,DAO升高程度反映肠黏膜缺血缺氧损伤的程度,并与肠组织损伤相关^[9]。并且血DAO与肠组织TNF- α 蛋白表达有一定相关性。因此在临床上血浆DAO活性高低可作为监测肠损伤的指标之一。

ITF是三叶肽家族成员之一,由肠黏膜上皮杯状细胞分泌,广泛存在于胃肠道与黏液中黏蛋白结合,形成稳定的凝胶复合物,附着在肠上皮顶端,抵抗胃肠道胃酸,蛋白酶和机械损伤,从而增强了胃肠道黏膜屏障的防御能力,并可促进细胞迁移、增殖和抗凋亡^[10]。在肠道的自我保护和损伤后修复中占有重要地位。口服和皮下注射ITF能使大鼠胃溃疡指数下降,并随剂量增加保护作用增强,且不影响胃酸分泌^[11]。敲除编码小鼠ITF基因后,1/2死于结肠炎,当给予口服重组ITF后肠黏膜损伤明显减轻^[12],并可抑制IL-8和环氧酶-2的生成,在幼鼠肠损伤中的也有一定的保护作用^[13~14]。本实验中,给与外源性ITF可使大鼠临床症状有缓解,组织肉眼损伤减轻,血DAO活性降低,使肠组织TNF- α 蛋白及mRNA表达降低,肠组织的超微结构细胞损伤有所改善,细胞紧密连接基本完整,增强了肠黏膜的防御能力,并发挥其修复作用,证明ITF对内毒素致幼鼠肠损伤具有一定的保护作用。

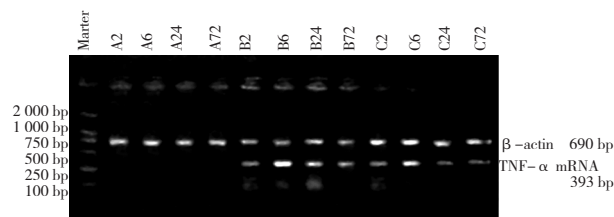


图1 肠组织TNF- α mRNA表达扩增产物RT-PCR电泳

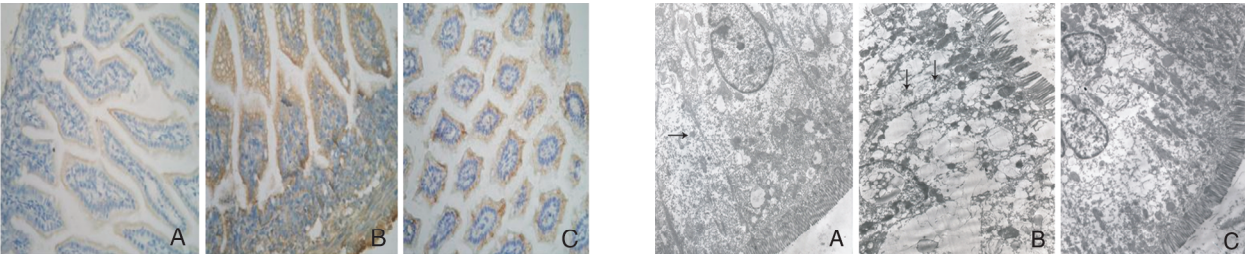


图2 肠组织 TNF- α 免疫组化蛋白表达 (400 $\times$) A: 肠组织免疫组化 TNF- α 蛋白极少表达; B: LPS 作用后 6 h 肠组织免疫组化 TNF- α 蛋白表达明显增强, 染色呈棕黄色, 定位于小肠上皮细胞胞浆内; C: rHTF 作用后 6 h 肠组织免疫组化 TNF- α 蛋白表达较图 B 降低, 染色呈浅棕黄色。

图3 肠组织超微结构变化 (TEM $\times$ 5 000) A: 正常肠上皮细胞绒毛排列整齐, 紧密连接完整 (箭头所示), 结构完整; B: LPS 作用下线粒体呈空泡样改变, 微绒毛排列不整、部分断裂、缺失, 部分紧密连接断裂 (箭头所示), 细胞核浓缩, 染色质边聚; C: rHTF 作用下线粒体空泡样改变好转, 微绒毛排列有好转, 断裂、缺失减少。

表1 血浆二胺氧化酶活性的变化 (U/L) (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

	2 h	6 h	24 h	72 h
对照组	1.089 $\pm$ 0.03	1.081 $\pm$ 0.04	1.127 $\pm$ 0.07	1.118 $\pm$ 0.04
LPS 组	1.221 $\pm$ 0.15 ^b	1.519 $\pm$ 0.13 ^a	1.352 $\pm$ 0.19 ^a	1.268 $\pm$ 0.06 ^a
三叶素组	1.077 $\pm$ 0.04 ^c	1.313 $\pm$ 0.13 ^{a,c}	1.104 $\pm$ 0.10 ^c	1.163 $\pm$ 0.05 ^d

与对照组相比 a $P < 0.01$, b $P < 0.05$; 与 LPS 组相比 c $P < 0.01$, d $P < 0.05$

表2 肠组织 TNF- α mRNA/ β -actin 表达的变化 (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

	2 h	6 h	24 h	72 h
对照组	0.109 $\pm$ 0.02	0.118 $\pm$ 0.01	0.126 $\pm$ 0.03	0.125 $\pm$ 0.02
LPS 组	0.974 $\pm$ 0.12 ^a	1.686 $\pm$ 0.13 ^a	1.221 $\pm$ 0.11 ^a	0.897 $\pm$ 0.12 ^a
三叶素组	0.791 $\pm$ 0.11 ^{a,b}	1.177 $\pm$ 0.08 ^{a,b}	0.832 $\pm$ 0.10 ^{a,b}	0.782 $\pm$ 0.09 ^{a,c}

与对照组相比 a $P < 0.01$; 与 LPS 组相比 b $P < 0.01$, c $P < 0.05$

表3 各组肠组织 TNF- α 蛋白表达的动态变化 (积分光密度值) (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

	2 h	6 h	24 h	72 h
对照组	5 815.56 $\pm$ 396.79	6 191.02 $\pm$ 482.32	5 923.85 $\pm$ 370.64	5 568.50 $\pm$ 292.18
LPS 组	21 846.94 $\pm$ 2 125.29 ^a	37 247.64 $\pm$ 3 387.59 ^a	31 317.32 $\pm$ 2 593.46 ^a	18 829.76 $\pm$ 1 368.39 ^a
三叶素组	18 692.26 $\pm$ 1 905.79 ^{a,b}	28 264.69 $\pm$ 2 358.69 ^{a,b}	16 037.78 $\pm$ 1 593.67 ^{a,b}	9 304.84 $\pm$ 845.73 ^{a,b}

a 与对照组相比 $P < 0.01$; b 与 LPS 组相比 $P < 0.01$

【参 考 文 献】

[1] Viswanathan VK, Hecht G. Innate immunity and the gut [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2000, 16: 546-551.

[2] Szabo C, Hasko G, Zingarelli B, Nemeth ZH, Salzman AL, Kvetan V, et al. Isoproterenol regulates tumor necrosis factor, interleukin-10, interleukin-6 and nitric oxide production and protects against the development of vascular hyporeactivity in endotoxaemia [J]. Immunology, 1997, 90(1): 95-100.

[3] Li JY, Lu Y, Hu S, Sun D, Yao YM. Preventive effect of glutamine on intestinal barrier dysfunction induced by severe trauma [J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(1): 168-171.

[4] Qureshi FG, Leapheart C, Cetin S, Li J, Grishin A, Watkin S, Ford HR, Hackam DJ. Increased expression and function of integrins in enterocytes by endotoxin impairs epithelial restitution [J]. Gastroenterology, 2005, 128(4): 1012-1022.

[5] Alscher KT, Phang PT, McDonald TE, Waller KR. Enteral feeding decreases gut apoptosis, permeability, and lung inflammation during murine endotoxemia [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 281(2): G569-576.

[6] Adams JK, Tepperman BL. Colonic production and expression of IL-4, IL-6 and IL-10 in neonatal suckling rats after LPS challenge [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 280(4): G755-G762.

[7] Li N, Liboni K, Fang MZ, Samuelson D, Lewis P, Patel R, Neu J. Glutamine decreases lipopolysaccharide-induced intestinal in-

flammation in infant rats [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2004, 286(6): G914-G921

[8] Bhola M, Goto M, Chen HY, Myers T. Effect of polyclonal anti-TNF α antibody on endotoxic shock in suckling rats [J]. Biol Neonate, 2000, 78(3): 207-211.

[9] Peng X, Yan H, You Z, Wang P, Wang S. Effect of enteral supplementation with glutamine granules on intestinal mucosal barrier function in severe burned patients [J]. Burn, 2004, 30(2): 135-139.

[10] Taupin DR, Kinoshita K, Podolsky DK. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(2): 799-804.

[11] Babyatsky MW, deBeaumont M, Thim L, Podolsky DK. Oral trefoil peptides protect against ethanol and indomethacin-induced gastric injury in rats [J]. Gastroenterology, 1996, 110(2): 489-497.

[12] Renes IB, Verburg M, Van Nispen DJ, Buller HA, Dekker J, Einerhand AW. Distinct epithelial responses in experimental colitis: implications for ion uptake and mucosal protection [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 283(1): G169-G179.

[13] 陈丽萍, 张丙宏, 李艳, 麦根荣, 刘仲熊. 肠三叶因子对新生鼠缺氧肠损伤模型白细胞介素 8、丙二醛的影响及意义 [J]. 中华医学杂志, 2003, 9(5): 306-309.

[14] 付春花, 张丙宏, 严彩霞, 陈丽萍, 麦根荣. 肠三叶因子对新生大鼠坏死性小肠结肠炎的保护作用 [J]. 中国当代儿科杂志, 2005, 7(1): 20-24.

(本文编辑: 吉耕中)

• 428 •