

· 论 著 ·

## GLP-2 对 SAP 大鼠肠黏膜屏障的保护作用\*

陈霞<sup>1</sup>, 赵宏贤<sup>2</sup>, 王忠琼<sup>1</sup>, 李昌平<sup>1</sup>

(1. 泸州医学院附属医院消化内科, 四川泸州 646000; 2. 泸州医学院组胚教研室, 四川泸州 646000)

**摘要:**目的 探讨胰高血糖素样肽-2(GLP-2)在重症急性胰腺炎(SAP)肠黏膜屏障中的保护作用。方法 SD大鼠30只,随机分为3组:假手术组、SAP组、GLP-2组。采用胰管逆行注射3%牛磺胆酸钠溶液制作SAP模型。GLP-2组在制作SAP模型后,皮下注射GLP-2 0.1 mg/kg,连续注射3 d。3 d后处死大鼠。透射电子显微镜观察小肠黏膜改变,检测各组血浆二胺氧化酶(DAO)及内毒素(ET)水平。结果 SAP组大鼠小肠黏膜出现明显病理损害;与SAP组相比较,GLP-2组小肠黏膜损伤显著减轻。SAP组DAO及ET水平明显高于假手术组( $P < 0.05$ );与SAP组比较,GLP-2组DAO及ET水平明显低于SAP组( $P < 0.05$ )。结论 GLP-2对SAP大鼠肠黏膜屏障功能具有一定保护作用。

**关键词:**胰高血糖素样肽-2;肠黏膜;胺氧化酶;内毒素

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.31.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)31-3127-02

## Protective effects of GLP-2 on intestinal mucosal barrier in rats with severe acute pancreatitis\*

Chen Xia<sup>1</sup>, Zhao Hongxian<sup>2</sup>, Wang Zhongqiong<sup>1</sup>, Li Changping<sup>1</sup>

(1. Department of Digestive Disease, Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China;

2. Department of Histology and Embryology, Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**Abstract:** Objective To explore the protective effects of glucagon like peptide-2 (GLP-2) on intestinal mucosal barrier in rats with severe acute pancreatitis (SAP). **Methods** 30 rats were randomly divided into 3 groups: control group (sham operation group), severe acute pancreatitis model group (SAP group), GLP-2 group (SAP rats treated with GLP-2). The SAP rat models were established via retrograde injection of 3% sodium taurocholate to the pancreatic duct. Rats in GLP-2 group were peritoneally injected with GLP-2 with dose of 0.1 mg/kg per day for 3 days. Three days later, the severity of intestinal mucosal damage was investigated by transmission electron microscope (TEM). Plasma concentration of diamine oxidase (DAO) and endotoxin (ET) in each rat were determined. **Results** Compared with control group, the intestinal mucosa of rats in SAP group injured significantly. GLP-2 treatment attenuated AP-induced mucosal injury. Compared with control group, the concentration of DAO and ET in SAP group increased significantly ( $P < 0.05$ ); Compared with SAP group, the concentration of DAO and ET in GLP-2 group decreased significantly ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** GLP-2 has a protective effects on intestinal barrier in rats with severe acute pancreatitis.

**Key words:** glucagon like peptide-2; intestinal mucosal; amine oxidase; endotoxins

肠道不仅负责营养素的消化和吸收,同时也具有重要的屏障功能。肠屏障功能已成为判断危重患者预后的重要指标之一。肠黏膜屏障功能障碍是重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)时诱发全身炎症反应、多脏器功能衰竭的关键环节<sup>[1]</sup>。胰高血糖素样肽-2(glucagon like peptide-2, GLP-2)目前已成为医学领域一种倍受推崇的肠道保护因子,被广泛应用于各种原因引起的肠道损伤修复及代偿的研究<sup>[2-4]</sup>。然而GLP-2对SAP肠屏障功能障碍的防治作用还没有得到重视。本研究建立大鼠SAP模型,探讨SAP时二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)、内毒素(endotoxin, ET)水平变化以及GLP-2对SAP大鼠肠黏膜屏障功能的保护作用。

## 1 材料及方法

**1.1 材料** 健康纯系雄性SD大鼠30只,体质量250 g左右(泸州医学院动物科提供,许可证号:川实动管质第17号);牛磺胆酸钠购于美国Sigma公司;GLP-2多肽片段购于北京博奥森生物技术有限公司;萤试剂盒购于厦门市萤试剂实验厂有限公司;DAO试剂盒购于上海杰美基因医药科技公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验动物分组及模型制作** 健康纯系SD大鼠30只,适应性喂养1周后,随机分为3组:(1)假手术组(10只),麻醉后开腹,胰管逆行注射生理盐水1 mL/kg,缝合腹腔;(2)SAP组(10只),胰管逆行注射3%牛磺胆酸钠溶液1 mL/kg;(3)GLP-2组(10只),制作SAP模型后,皮下注射GLP-2 0.1 mg/kg,连续注射3 d。所有动物手术后均经皮下注射生理盐水5 mL以补充血容量。自由饮水、进食。

**1.2.2 病理学观察** 取各组大鼠胰腺,4%多聚甲醛固定,常规脱水后石蜡包埋,切片,HE染色,光镜观察胰腺病理改变。取各组大鼠回肠相同部位,4%多聚甲醛固定,HE染色,光镜观察小肠黏膜组织病理改变。2.5%戊二醛固定的回肠标本,常规制成电镜标本,透射电镜观察。

**1.2.3 血浆DAO及ET活性检测** 各组大鼠心脏取血,按试剂说明书检测DAO和ET的活性。

**1.2.4 统计学处理** 用SPSS 14.0统计软件对数据进行分析,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较用 $t$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差

\* 基金项目:四川省卫生厅科研课题(070267)。

异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 SAP 模型制作情况** SAP 组和 GLP-2 组均造模成功。肉眼可见胰腺局部或弥漫性水肿,胰腺被膜下有出血斑,腺体可见出血,胰腺形态、轮廓不规则;组织切片 HE 染色观察,胰腺炎症细胞浸润明显,充填于腺泡之间,腺泡数量减少、杂乱,胰岛细胞数量减少。

**2.2 小肠黏膜光镜及透射电镜观察** (1)假手术组小肠黏膜结构正常,黏膜上皮游离面微绒毛完整、排列整齐;上皮细胞无肿胀及空泡变性、线粒体无肿胀、线粒体脊明显;细胞核规则,呈圆形或卵圆形。上皮细胞排列紧密、规则,细胞侧面紧密连接与桥粒清晰可见。(2)SAP 组小肠黏膜损伤严重,黏膜上皮游离面微绒毛数量明显减少、排列不规则,微绒毛倒伏、断裂现象明显;上皮细胞肿胀,空泡变性明显,线粒体肿胀、断裂明显,线粒体脊减少或消失;细胞核皱缩、不规则,断裂现象可见;上皮细胞排列较紧密,细胞侧面紧密连接与桥粒亦可可见。(3)与 SAP 组比较,GLP-2 组小肠黏膜损伤程度明显减轻,黏膜上皮游离面微绒毛数量较正常、排列相对规则,微绒毛倒伏、断裂现象不明显;上皮细胞无肿胀,空泡变性显著减少,线粒体肿胀不明显;细胞核较规则,呈圆形或卵圆形。上皮细胞排列紧密、规则,细胞侧面紧密连接与桥粒较清晰,见封 2 图 1~3。

**2.3 血浆 DAO 及 ET 活性的测定** 与假手术组比较,SAP 组 DAO 及 ET 水平明显升高( $t=23.403, P<0.05; t=3.435, P<0.05$ );GLP-2 组 DAO 及 ET 水平与 SAP 组相比明显降低( $t=14.872, P<0.05; t=2.157, P<0.05$ ),见表 1。

表 1 各组血浆 DAO 及 ET 水平的测定( $\bar{x}\pm s$ )

组别	DAO( $\mu\text{mol/mL}$ )	ET(EU/mL)
假手术组	0.175 $\pm$ 0.052	0.024 $\pm$ 0.011
SAP 组	0.889 $\pm$ 0.081*	0.041 $\pm$ 0.020*
GLP-2 组	0.310 $\pm$ 0.093*▲	0.028 $\pm$ 0.018▲

\*:  $P<0.05$ ,与假手术组比较;▲:  $P<0.05$ ,与 SAP 组比较。

## 3 讨 论

肠道正常屏障功能的维持依赖于肠黏膜结构和功能的完整。SAP 时肠道结构不可避免受到损伤,黏膜通透性增加,屏障功能受损<sup>[5-6]</sup>。多种因素介导了 SAP 时肠黏膜损伤,如缺血后的再灌注带来的氧自由基、炎症介质和细胞因子等均可诱发严重的肠黏膜损伤<sup>[7]</sup>。本实验结果显示 SAP 引起的黏膜上皮损伤主要表现在细胞损伤,而细胞侧面的细胞连接,如紧密连接、中间连接、桥粒等损伤不明显,提示 SAP 引起的黏膜通透性改变主要是上皮细胞肿胀变性等损伤导致的跨膜通透性改变,而非侧面细胞连接损伤导致的细胞间通透性改变。

肠道在危重疾病发展过程中不是一个被动“牺牲品”,而是积极参与某些病理过程,对危重疾病病理生理的发生、发展、转归有重要影响。早期保护肠屏障功能,有效防治肠屏障功能障碍(intestine barrier functional disturbance,IBFD)的发生,对改善 SAP 的预后具有重要价值。GLP-2 是胰高血糖素原(proglucagon,PG)基因的表达产物之一,是目前肠道保护研究的热点,它是由 33 个氨基酸残基组成的单链多肽,其氨基酸序列为 PG 的第 126~158 位,相对分子质量约为 3 900,羧基末端为天冬氨酸,其氨基酸序列在哺乳动物具有高度的保守性,主要由

肠道内分泌细胞合成和分泌<sup>[8]</sup>。近期有研究显示 GLP-2 可减轻 SAP 肠黏膜通透性,减少细菌移位,促进淋巴细胞归巢至小肠,保护肠道免疫屏障功能<sup>[9-10]</sup>。本研究应用 GLP-2 于胰腺炎大鼠后,观察到小肠黏膜损伤程度显著减轻,黏膜上皮微绒毛、细胞质、细胞器等损伤都有不同程度的修复,在一定程度上保护了 SAP 肠黏膜结构上的完整性。

血浆中 DAO 是肠黏膜细胞的标志酶,存在于小肠黏膜绒毛上,其活性与肠黏膜细胞的核酸和蛋白质合成密切相关。肠黏膜细胞受损、坏死后该酶释放入血导致血浆和肠腔 DAO 活性增高而肠黏膜内 DAO 活性降低<sup>[11]</sup>。DAO 在外周血中活性稳定,可以反映肠黏膜屏障的完整性和损伤程度<sup>[12]</sup>。本研究发现 SAP 组大鼠血浆 DAO 水平明显高于假手术组,GLP-2 组大鼠 DAO 水平较 SAP 组明显降低。同时本研究组织切片观察显示 GLP-2 组小肠黏膜上皮游离面微绒毛数量较正常、排列相对规则,绒毛倒伏、断裂现象不明显。由此推测 GLP-2 可减轻肠黏膜上皮绒毛的损伤,减少 DAO 的释放,从而起到保护肠黏膜屏障的作用。

SAP 时,由于体液丢失及感染等造成全身血容量减少及血液重新分布,肠黏膜缺血及以后的再灌注引起肠黏膜的损伤,呕吐与禁食等原因引起的肠黏膜营养状态下降共同造成了肠黏膜屏障的损害,导致肠黏膜通透性增高,肠道 ET 易侵入体内形成肠源 ET 血症。ET 血症又能反过来进一步增加肠黏膜通透性,促使肠道中的细菌和 ET 不断侵入体内形成恶性循环。大量研究发现 SAP 时血浆 ET 水平升高,促进 SAP 时多器官功能衰竭的进展<sup>[13-14]</sup>。本研究中 GLP-2 组大鼠血清中 ET 水平较 SAP 组明显下降,提示 GLP-2 可减轻 SAP 时的 ET 血症,降低肠黏膜通透性。

SAP 时,DAO 及 ET 在血中的水平升高,可作为反映肠黏膜屏障受损的有效指标。GLP-2 作为一个肠道保护因子,在结构和功能上能有效保护肠黏膜屏障,降低肠黏膜的通透性,防止病理状态下肠屏障功能进一步损害。

## 参考文献:

- [1] Furuya T, Soeno T, Komatsu M. Strategy for bacterial translocation in acute pancreatitis[J]. Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi, 2004, 101(5): 502-509.
- [2] Dubé PE, Forse CL, Bahrami J, et al. The essential role of insulin-like growth factor-1 in the intestinal tropic effects of glucagon-like peptide-2 in mice[J]. Gastroenterology, 2006, 131(2): 589-605.
- [3] Yazbeck R. Teduglutide, a glucagon-like peptide-2 analog for the treatment of gastrointestinal diseases, including short bowel syndrome[J]. Curr Opin Mol Ther, 2010, 12(6): 798-809.
- [4] Koopmann MC, Chen X, Holst JJ, et al. Sustained glucagon-like peptide-2 infusion is required for intestinal adaptation, and cessation reverses increased cellularity in rats with intestinal failure[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010, 299(6): G1222-1230.
- [5] Basil J, Mmori C, Paul C, et al. Early increase in intestinal permeability in patients with severe acute pancreatitis: correlation with endotoxemia, organ failure, (下转第 3131 页)

XWLC-05 细胞的增殖,诱导其凋亡并参与细胞周期调控。那么在实际临床工作中如何就宣威肺腺癌患者利用反义存活蛋白寡核苷酸进行治疗,其他药物的搭配如何使用值得进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 王巍炜,李高峰,洪志鹏,等.宣威昆明两地区肺腺癌中存活蛋白表达的比较研究[J].医学研究,2010,39(7):61-62.
- [2] Liao L,Li ZY. Correlation between gene silencing activity and structural features of antisense oligodeoxynucleotides and targetRNA[J]. In Silico Bio,2007,7(4/5):527-534.
- [3] 许文平,林宗明,张建平,等.丛生蛋白反义核苷酸对裸鼠人膀胱癌模型的肿瘤抑制作用[J].复旦学报:医学版,2008,38(5):747-750.
- [4] Sohn DM, Kim SY, Baek MJ, et al. Expression of survivin and clinical correlation in patients with breast cancer[J]. Biomed Pharmacother,2006,60(6):289-292.
- [5] 刘敏,李萍,兰显国,等. survivin 和 VEGF 在涎腺腺样囊性癌中的表达及临床意义[J]. 重庆医学,2010,39(10):1231-1232.
- [6] Vallbohmer D, Peter JH, Oh D, et al. survivin, a potential biomarker in the development of Barrett's adenocarcinoma [J]. Surgery,2005,138(4):701-704.
- [7] 陈轩,王子卫,张可. 生存素基因 mRNA 和蛋白在胃癌中表达及其意义[J]. 重庆医学,2008,37(13):1453-1455.
- [8] 王巍炜,李高峰,洪志鹏,等. 宣威昆明两地区肺腺癌中 survivin 表达的比较研究[J]. 医学研究杂志,2010,39(7):61-62.
- [9] 邓开,王洪林. survivin 基因在肿瘤中的研究进展[J]. 重庆医学,2008,37(10):1111-1113.
- [10] 王凯忠,赵慧,付鑫,等. 凋亡抑制因子 survivin 在肺癌组织中的表达及临床意义[J]. 中国实验诊断学,2009,13(7):901-904.
- [11] Shen C, Duck A, Polat B, et al. Triplex forming oligodeoxy-nucleotides targeting survivin inhibitor proliferation and induce apoptosis of human lung carcinomars cells[J]. Cancer Gene Ther,2003,10(5):403-410.
- [12] 李尊岭,邵淑红,谢书阳,等. CT120 反义寡核苷酸抑制肺腺癌细胞 A549 的生长[J]. 基础医学与临床,2009,29(4):400-404.
- [13] Zheng X, Koropatnick J, Li M, et al. Reinstalling antitumor immunity by inhibiting tumor-derived immunosuppressive molecule IDO through RNA interference. [J]. Immunol,2006,177(8):5639-5646.
- [14] 王志成,王海霞,郭德玉,等. survivin 反义核酸抑制胶质瘤细胞增殖的实验研究[J]. 重庆医学,2008,37(22):2570-2574.
- [15] 蒋碧佳,曾锦荣. survivin 抗凋亡机制及其与肺癌的关系[J]. 中国呼吸与危重监护杂志,2010,9(4):443-446.

(收稿日期:2011-06-09 修回日期:2011-09-13)

(上接第 3128 页)

- failure, and mortality[J]. J Gastrointest Surg,1999,3(3):252-262.
- [6] Flint RS, Windsor JA. The role of the intestine in the pathophysiology and management of severe acute pancreatitis[J]. HPB,2003,5(2):69-85.
- [7] Sakhawat H, Rahman B, Ammori J, et al. Intestinal hypoperfusion contributes to gut barrier failure in severe acute pancreatitis[J]. J Gastrointest Surg,2003,7(1):26-36.
- [8] 陈吉,吴国豪. 胰高血糖素样肽 2 与肠道保护[J]. 中华胃肠外科杂志,2005,8(6):548-550.
- [9] Kouris GJ, Liu Q, Rossi H, et al. The effect of glucagon-like peptide 2 on intestinal permeability and bacterial translocation in acute necrotizing pancreatitis[J]. Am J Surg,2001,181(6):571-575.
- [10] Kong LS, Liu ML, Zhang ZB. Influence of glucagon-like peptide-2 on intestinal lymphocyte homing in mice with acute pancreatitis[J]. Zhongguo Wei Zhong Bing Ji Jiu Yi Xue,2009,21(2):103-106.
- [11] Zhang J, Yuan C, Hua G, et al. Early gut barrier dysfunction in patients with severe acute pancreatitis: attenuated by continuous blood purification treatment[J]. Int J Artif Organs,2010,33(10):706-715.
- [12] Wang YL, Zheng YJ, Zhang ZP, et al. Effects of gut barrier dysfunction and NF-kappaB activation on aggravating mechanism of severe acute pancreatitis [J]. J Dig Dis,2009,10(1):30-40.
- [13] 唐晋,宋孟龙,程飞,等. 大承气汤治疗 SAP 大鼠的实验研究[J]. 重庆医学,2010,39(3):1051-1052,1055.
- [14] Windsor JA, Fearon KC, Ross JA, et al. Role of serum endotoxin and antiendotoxin core antibody levels in predicting the development of multiple organ failure in acute pancreatitis[J]. Br J Surg,1993,80(8):1042-1046.

(收稿日期:2011-06-29 修回日期:2011-08-14)