

· 论 著 ·

Notch 信号通路在小肠切除术后大鼠肠黏膜中的作用研究

罗冬梅¹, 陈国庆², 余欣¹, 吴静¹, 顾沙¹, 饶蓉¹, 王菁华¹, 李向红^{1△}

(1. 第三军医大学西南医院消化病研究所, 重庆 400038; 2. 第三军医大学新桥医院普外科, 重庆 400037)

摘要:目的 探讨小肠切除术(MSBR)后 Notch 信号通路表达与肠隐窝上皮细胞增殖之间的关系。方法 40 只雄性 SD 大鼠随机分组, 接受 MSBR 手术(70% 小肠中段切除)或假手术。手术后 7 d, 收集肠道组织标本, 行逆转录-PCR(RT-PCR)、蛋白免疫印迹法(Western blot)实验, 观察肠黏膜 Notch 信号通路蛋白(mRNA)及蛋白表达变化; 并制作组织学切片, 免疫组织化学方法进一步观察 Notch 信号通路蛋白在肠黏膜的表达变化及表达部位。培养大鼠肠道隐窝上皮细胞 IEC-6, 给予重组大鼠 Jagged-1, 噻唑蓝(MTT)实验观察重组人鼠 Jagged-1 对 IEC-6 细胞增殖的影响。结果 MSBR 手术促进了大鼠肠黏膜 Jagged-1、Notch-1、Hes-1 mRNA 及蛋白的表达; 免疫组织化学结果显示, 表达升高的 Jagged-1、NICD、Hes-1 蛋白共定位于大鼠肠道隐窝上皮细胞; 体外培养 IEC-6 细胞, MTT 实验进一步明确, Jagged-1 具有促进肠上皮细胞增殖的作用。结论 Notch 信号通路在 MSBR 术后大鼠肠黏膜中促进了肠隐窝上皮细胞的增殖, 参与了 MSBR 术后的肠适应过程。

关键词:短肠综合征; 肠适应; Notch 通路; 细胞增殖

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.13.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)13-1546-03

The Notch signaling pathway is involved in intestinal adaptation in a massive small bowel resection rat modelLuo Dongmei¹, Chen Guoqing², Yu Xin¹, Wu Jing¹, Gu Sha¹, Rao Rong¹, Wang Jinghua¹, Li Xianghong^{1△}

(1. Research Institute of Digestive Disease, Southwest Hospital, the Third Military Medical University,

Chongqing 400038, China; 2. Department of General Surgery the Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the role of Notch signaling in massive small bowel resection(MSBR)-associated crypt epithelial cell proliferation. **Methods** Male Sprague-Dawley rats were subjected to sham operation(bowel transection and reanastomosis) or 70% mid-SBR. Intestinal tissue samples were collected at 7 d after operation. The expression of Notch pathway mRNAs and proteins were analyzed by RT-PCR and Western blot. The expression of the Notch pathway proteins Jagged-1, NICD and Hes-1 also determined through immunohistochemical. Furthermore, IEC-6 cells were used to examine the function of the Jagged-1 signaling system. **Results** SBR increased crypt epithelial cell proliferation and increased expression of Jagged-1 and Hes-1 mRNA and protein along with cleaved Notch-1. Immunohistochemical staining showed that Jagged-1, cleaved Notch-1 and Hes-1 colocalized in the same crypt epithelial cell population. Recombinant Jagged-1 significantly stimulated the proliferation of IEC-6 cells. **Conclusion** The Jagged-1/Notch-1/Hes-1 signaling pathway is involved in intestinal adaptation through increase crypt epithelial cell proliferation.

Key words: short bowel syndrome; intestinal adaptation; Notch signaling pathway; cell proliferation

小肠切除术(massive small bowel resection, MSBR)后肠适应的机制已是欧美国家研究的热点, 但 Notch 信号通路在 MSBR 术后肠适应中的作用仍不明确。既往研究发现, Notch 通路调控肠隐窝上皮细胞的增殖, Notch 受体及其下游基因 Hes-1 的敲除可导致小鼠肠隐窝上皮增殖细胞数量的明显降低^[1-2]。Notch 受体首次在果蝇中被发现, 其在脊椎动物组织细胞的增殖分化中发挥着重要调控作用。有研究发现, 肝脏部分切除术后, Notch 通路表达升高并促进了肝细胞的再生, Notch 信号通路还参与了皮肤、肾脏、心脏、胰腺及支气管上皮的损伤后再生过程^[3-7]。在结肠炎动物模型中, Notch 信号通路参与了肠上皮损伤后的再生过程^[8]。但 Notch 信号通路是否参与了 MSBR 术后的肠适应过程, 尚不明确。本研究拟明确 Notch 信号通路在 MSBR 术后肠黏膜中的表达及其作用。

1 材料与方

1.1 一般材料 选取 SD 雄性大鼠 40 只, 体质量 180~200 g, 购于第三军医大学大坪医院实验动物中心。大鼠 5 只一组饲养于动物笼中, 饲养环境恒温(23℃), 自由进食。大鼠分组: 70% 中段小肠切除(MSBR 手术组)或假手术组(小肠中部切断后再单纯吻合)。7 d 后处死大鼠, 获取肠标本。丢弃吻合口两侧 2 cm 肠管后, 获取屈氏韧带至回盲部之间小肠, 冷生理

盐水冲洗肠管后, 玻片刮取肠黏膜, -80℃ 保存。

1.2 方法

1.2.1 手术步骤 MSBR 手术组, 苯巴比妥钠麻醉大鼠(40 mg/kg 体质量), 4-0 丝线结扎肠系膜血管, 切除屈氏韧带远端 10 cm 及回盲部近端 10 cm 之间的小肠, 6-0 线行空回肠端吻合。假手术组, 仅于小肠中点单纯性切断后再行端端吻合。术后第 1 天, 大鼠自由进水, 第 2 天起自由进食。术后未应用抗菌药物。

1.2.2 细胞及细胞培养 IEC-6 肠上皮细胞系(CRL-1592TM)购于美国 ATCC 公司。细胞培养于 DMEM 培养基(10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素), 培养过夜使细胞贴壁。重组大鼠 Jagged-1 干预实验中, 重组大鼠 Jagged-1(599-JG-100, R & D, USA)添加于 IEC-6 培养基并培养 48 h。实验结束后, 收集 IEC-6 细胞用于逆转录-PCR(RT-PCR)及蛋白免疫印迹法(Western blot)实验。

1.2.3 RT-PCR 实验 Trizol 法提取总 RNA, 并逆转录为 cDNA 模板。RT-PCR 引物序列同文献[9]。反应条件如下: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 1 min 行 34 循环; 72℃ 5 min。柯达 212 影像系统照相并行半定量分析。

1.2.4 Western blot 实验 组织蛋白裂解液 RIPA 提取空肠

黏膜总蛋白,Bradford 法测定总蛋白浓度。凝胶电泳每孔上样 50 μg 总蛋白,聚偏氟乙烯(PVDF)膜蛋白转膜,5%脱脂奶粉室温封闭 1 h,4 ℃ 孵育一抗过夜,抗体如下:Jagged-1(sc-6011,SantaCruz,CA,USA),NICD-1(ab-52301,Abcam,UK),Hes-1(sc-13844,SantaCruz,CA,USA),GAPDH(sc-32233,Santa Cruz,CA,USA)。TBST 洗膜后室温孵育二抗 1 h,之后 TBST 洗膜,ECL 化学发光、照相并进行半定量分析。

1.2.5 免疫组织化学方法 取 MSBR 手术组及假手术组大鼠空肠,4%多聚甲醛固定后,制作 5 μm 厚组织学切片。甲醇配制 0.3%双氧水室温处理切片 20 min,去除内源性过氧化物酶;磷酸盐缓冲液(PBS)洗片,枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)微波抗原修复 20 min,自然冷却。5%BSA 室温封闭 20 min,4 ℃ 孵育一抗过夜;一抗具体如下:Jagged-1,NICD-1,Hes-1,PCNA(sc-56,SantaCruz,CA,USA)。37 ℃ 二抗孵育 20 min,PBS 清洗后,SABC(博士德,武汉)37 ℃ 孵育 20 min,DAB 显色。苏木素轻度复染。光学显微镜观察结果。

1.2.6 肠黏膜形态学观察 处死大鼠时,取 0.5 cm 空肠,固定于 4%多聚甲醛 48 h 后,切取 5 μm 厚组织切片,并行苏木精-伊红(HE)染色。微刻度标尺测量绒毛高度及隐窝深度。每个标本平均观察 7 个不同的视野。

1.2.7 噻唑蓝(MTT)实验 IEC-6 细胞平铺于 96 孔板,给予重组大鼠 Jagged-1 48 h 后 MTT 法检测细胞增殖情况。具体如下:移除 IEC-6 上清液,每孔加入 20 μL MTT 试剂,37 ℃ 孵育 4 h。移除上清,每孔加入 100 μL formazan 溶解液轻微震荡 10 min。读取 570 nm 吸光度(A)值。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间均数比较采用 Student's *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 空肠形态学变化 术后 7 d,取大鼠空肠行组织学观察。与假手术组相比,MSBR 手术组空肠黏膜绒毛高度明显升高($P < 0.01$),隐窝深度明显增加($P < 0.01$),见图 1。MSBR 手术组肠绒毛高度是假手术组的约 1.5 倍,这说明本研究中 MSBR 手术引起了明显的肠适应。

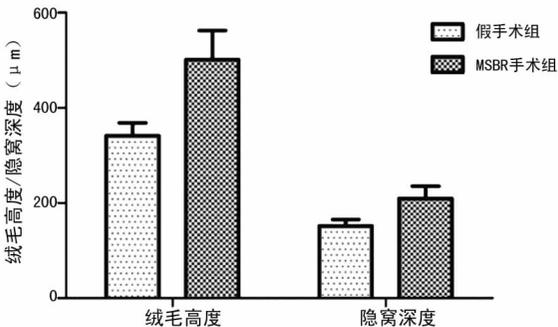
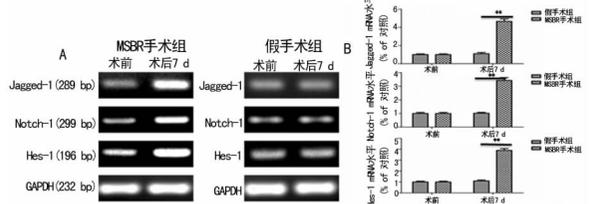


图 1 两组大鼠术后 7 d 肠绒毛高度及隐窝深度的变化

2.2 MSBR 术后肠黏膜 Jagged-1、Notch-1 和 Hes-1 mRNA 表达变化 为明确 Notch 信号通路是否参与了 MSBR 术后肠适应过程,作者首先应用 RT-PCR 方法筛查了 Notch 通路的相关基因。结果发现,与假手术组比较,MSBR 手术组术后 7 d 大鼠肠黏膜 Jagged-1、Notch-1、Hes-1 mRNA 均升高明显($P < 0.01$)见图 2。这提示,Notch 信号通路很可能参与了 MSBR 术后大鼠肠黏膜的适应过程。

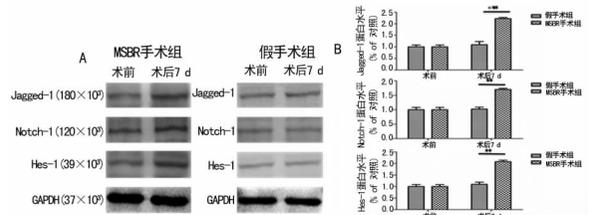
2.3 MSBR 术后肠黏膜 Jagged-1、NICD-1 和 Hes-1 蛋白表达变化 利用 Western blot 实验,作者进一步研究了大鼠肠黏膜

Jagged-1、Hes-1 及 Notch-1 受体的活性片段 NICD-1 的蛋白表达变化。研究发现,与假手术组大鼠相比,MSBR 手术组大鼠肠黏膜 Jagged-1 蛋白水平升高明显($P < 0.05$),见图 3。为了进一步明确 Notch 信号通路的激活,作者检测了 Notch-1 的活性片段 NICD 及其下游 Hes-1 蛋白的表达变化,结果显示:与假手术组相比,MSBR 手术组大鼠肠黏膜 NICD 及 Hes-1 蛋白均升高明显($P < 0.05$),见图 3。这提示,Notch 信号通路参与了 MSBR 术后大鼠肠黏膜的适应过程。



A: PCR 电泳图;B:PCR 电泳分析图。

图 2 MSBR 术后大鼠肠黏膜上皮 Notch 信号通路 mRNA 表达升高



A: Western blot 图;B:Western blot 分析图。

图 3 MSBR 术后大鼠肠黏膜 Notch 信号通路蛋白 Jagged-1、NICD-1、Hes-1 表达升高

2.4 免疫组织化学观察肠黏膜 Jagged-1、NICD、Hes-1 表达变化 作者进一步利用免疫组织化学方法观察肠黏膜 Notch 信号通路蛋白表达变化及蛋白的定位。结果显示,MSBR 手术组大鼠肠黏膜上皮表达 Jagged-1、NICD、Hes-1 细胞明显增多;而且,NICD 阳性染色细胞分布于整个隐窝上皮至隐窝顶部。然而,在假手术组,NICD 阳性染色细胞仅局限于部分隐窝上皮细胞,见图 4。这进一步说明,Notch 信号通路在 MSBR 术后肠隐窝上皮细胞中被激活,而且很可能参与了隐窝上皮细胞的增殖。

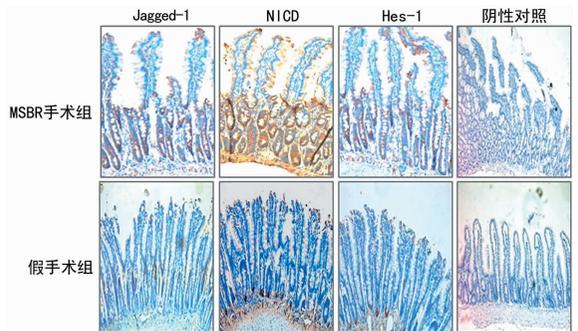


图 4 MSBR 术后大鼠肠隐窝上皮细胞 Notch 信号通路蛋白表达升高(免疫组织化学×100)

2.5 重组大鼠 Jagged-1 促进肠隐窝上皮细胞 IEC-6 的增殖 为明确 Notch 信号通路表达升高是否具有促进肠隐窝上皮细胞增殖的作用,本研究观察了重组大鼠 Jagged-1 对大鼠肠隐窝上皮细胞 IEC-6 增殖的影响。MTT 实验显示,Jagged-1 明显促进了 IEC-6 细胞的增殖,见图 5。Notch 通路的激活具有促进肠隐窝上皮细胞增殖的作用。

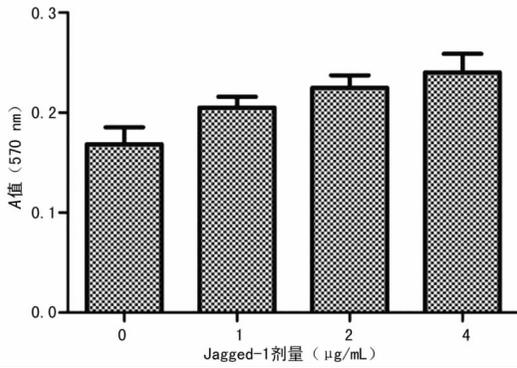


图 5 重组 Jagged-1 促进大鼠肠隐窝上皮细胞的增殖

3 讨论

本研究发现,MSBR 术后大鼠肠黏膜 Jagged-1、Notch-1、Hes-1 mRNA 及蛋白表达均明显升高,说明 Notch 信号通路参与了大鼠肠黏膜上皮细胞的增殖。

MSBR 术后肠黏膜的适应是一个复杂的过程,各种生长因子、细胞因子及肠道营养素均参与其中,这些因素均促进了肠隐窝上皮细胞的增殖^[10]。研究发现,Notch 信号通路在维持肠隐窝上皮细胞的增殖方面发挥重要作用。在哺乳动物中,有 4 种跨膜 Notch 受体(Notch1-4),2 种 Jagged 配体(Jagged-1、Jagged-2)和 3 种 Delta 配体(DLL1、DLL3、DLL4)。配体与 Notch 受体胞外片段结合后,促进 Notch 受体胞内片段发生酶切而形成活性片段 NICD,NICD 随后进入细胞核并形成转录激活复合体,激活 Notch 通路的下游基因 Hes 和 Hey^[11]。基因敲除 Notch 信号通路的信号分子可导致肠隐窝上皮增殖细胞的减少,Notch 信号通路的阻断剂具有同样的作用^[12]。与之相反,激活肠黏膜 Notch 信号通路则可促进肠隐窝上皮细胞的增殖。上述研究提示,Notch 信号通路很可能在 MSBR 术后肠隐窝上皮细胞的增殖中发挥重要的调控作用。

本研究还发现,MSBR 术后大鼠肠黏膜 Jagged-1、Notch-1、Hes-1 mRNA 及蛋白表达均明显升高。生理条件下,Jagged-1 配体主要定位于肠隐窝上皮,为其调控肠隐窝上皮的增殖提供了基础^[13]。既往研究发现,Jagged-1 可促进肝部分切除术后肝细胞的再生^[14]。重组大鼠 Jagged-1 还可促进人多发性骨髓瘤和人结肠癌细胞的增殖^[15-16]。本研究发现 MSBR 术后大鼠肠黏膜 Jagged-1 mRNA 及蛋白表达均明显升高,并激活了肠黏膜的 Notch 信号通路,引起 Notch-1 及 Hes-1 mRNA 及蛋白表达的升高。免疫组织化学检测进一步明确,Notch 信号通路在肠黏膜上皮细胞中表达升高,而且 Jagged-1、NICD、Hes-1 共定位于肠隐窝上皮细胞。

为了进一步明确 Notch 信号通路在肠黏膜上皮细胞中的作用,作者研究了重组大鼠 Jagged-1 对肠隐窝上皮细胞 IEC-6 增殖的影响。结果显示,Jagged-1 明显促进了 IEC-6 细胞的增殖。此研究结果表明,Notch 信号通路具有促进肠隐窝上皮细胞增殖的作用。综上所述,MSBR 术后肠黏膜 Notch 信号通路表达升高并促进了肠隐窝上皮细胞的增殖,从而参与了 MSBR 术后肠黏膜的适应过程。

参考文献:

[1] Riccio O, van Gijn ME, Bezdek AC, et al. Loss of intestinal crypt progenitor cells owing to inactivation of both Notch1 and Notch2 is accompanied by derepression of CDK inhibitors p27Kip1 and p57Kip2 [J]. *EMBO Rep*, 2008,9(4):377-383.

[2] Murata K, Hattori M, Hirai N, et al. Hes1 directly controls cell proliferation through the transcriptional repression of p27Kip1 [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(10):4262-4271.

[3] Adolphe C, Wainwright B. Pathways to improving skin regeneration [J]. *Expert Rev Mol Med*, 2005, 7(20):1-14.

[4] Kobayashi T, Terada Y, Kuwana H, et al. Expression and function of the Delta-1/Notch-2/Hes-1 pathway during experimental acute kidney injury [J]. *Kidney Int*, 2008, 73(11):1240-1250.

[5] Croquelois A, Domenighetti AA, Nemir M, et al. Control of the adaptive response of the heart to stress via the Notch1 receptor pathway [J]. *J Exp Med*, 2008, 205(13):3173-3185.

[6] Siveke JT, Lubeseder-Martellato C, Lee M, et al. Notch signaling is required for exocrine regeneration after acute pancreatitis [J]. *Gastroenterology*, 2008, 134(2):544-555.

[7] Ma XB, Jia XS, Liu YL, et al. Expression and role of Notch signalling in the regeneration of rat tracheal epithelium [J]. *Cell Prolif*, 2009, 42(1):15-28.

[8] Okamoto R, Tsuchiya K, Nemoto Y, et al. Requirement of notch activation during regeneration of the intestinal epithelia [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 296(1):G23-G35.

[9] Chen G, Sun L, Yu M, et al. The jagged-1/notch-1/Hes-1 pathway is involved in intestinal adaptation in a massive small bowel resection rat model [J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(9):2478-2486.

[10] Botsios DS, Vasiliadis KD. Factors enhancing intestinal adaptation after bowel compensation [J]. *Dig Dis Sci*, 2003, 21(3):228-236.

[11] Baron M. An overview of the Notch signalling pathway [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2003, 14(1):113-119.

[12] van Es JH, van Gijn ME, Riccio O, et al. Notch/gamma-secretase inhibition turns proliferative cells in intestinal crypts and adenomas into goblet cells [J]. *Nature*, 2005, 435(744):959-963.

[13] Sander GR, Powell BC. Expression of notch receptors and ligands in the adult gut [J]. *J Histochem Cytochem*, 2004, 52(4):509-516.

[14] Köhler C, Bell AW, Bowen WC, et al. Expression of notch-1 and its ligand jagged-1 in rat liver during liver regeneration [J]. *Hepatology*, 2004, 39(4):1056-1065.

[15] Jundt F, Pröbsting KS, Anagnostopoulos I, et al. Jagged1-induced Notch signaling drives proliferation of multiple myeloma cells [J]. *Blood*, 2004, 103(9):3511-3515.

[16] Reedijk M, Odorcic S, Zhang H, et al. Activation of notch signaling in human colon adenocarcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2008, 33(6):1223-1229.