

慢性缺氧和促炎性细胞因子刺激对大鼠十二指肠 TH 和 urocortin 表达的影响

彭正午^{1,2}, 徐立¹, 刘玲², 吕颜枝¹, 周旭¹, 尹天泉², 赵慧英¹

(1 西北农林科技大学 动物医学院, 陕西 杨凌 712100; 2 第四军医大学 神经科学研究所, 陕西 西安 710032)

[摘要] **【目的】**探讨在慢性缺氧和炎性刺激影响下,大鼠十二指肠粘膜层酪氨酸羟化酶(TH)和尿皮质素(Urocortin, Ucn)的表达变化,为阐明慢性缺氧和炎性刺激影响十二指肠功能活动和应激反应机制提供形态学依据。**【方法】**建立慢性缺氧和促炎性细胞因子 rmIL-1 β 刺激的大鼠模型,采集供试大鼠十二指肠,制备切片,用荧光免疫组织化学方法观察 TH 和 Ucn 的表达变化。**【结果】**慢性缺氧引起十二指肠粘膜固有层中的 TH 阳性细胞数显著减少,这种作用与缺氧的时间呈负相关($P < 0.01$);而炎性细胞因子刺激后,十二指肠粘膜固有层中的 Ucn 阳性细胞数增加($P < 0.05$)。**【结论】**慢性缺氧刺激可能通过十二指肠中 TH 的表达减少而使其生理功能减弱;炎性细胞因子刺激引起 Ucn 表达增加,可能是因为其参与了肠对缺氧的应激反应。

[关键词] 慢性缺氧;促炎性细胞因子;十二指肠;酪氨酸羟化酶;尿皮质素

[中图分类号] Q952

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2010)09-0001-05

Effects of chronic hypoxia and pro-inflammatory cytokine stimulation on the expression of TH and urocortin in the duodenum of the rat

PENG Zheng-wu^{1,2}, XU Li¹, LIU Ling², Lü Yan-zhi¹, ZHOU Xu¹,

YIN Tian-quan², ZHAO Hui-ying¹

(1 College of Veterinary Medicine, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Neuroscience, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi 710032, China)

Abstract: **【Objective】** The study observed the alteration of tyrosine hydroxylase (TH) and urocortin (Ucn) expressions in the rat duodenum to provide morphological basis for understanding the mechanism underlying the effect of chronic hypoxia and proinflammatory cytokine stimulation on the intestinal function. **【Method】** Chronic hypoxia and IL-1 β stimulation model was established in the rat. The expressions of TH and Ucn were studied by using immunohistochemistry and image analysis. **【Result】** The number of TH immunoreactive cells decreased time-dependently following chronic hypoxia ($P < 0.01$), while the number of Ucn positive cells in duodenum increased following the pro-inflammatory cytokine stimulation ($P < 0.05$). **【Conclusion】** Chronic hypoxia might inhibit the physiological function by attenuate the expression of TH in the duodenum, and pro-inflammatory cytokine stimulation might be involved the mechanisms of stress response of intestine through increase of the Ucn expression.

Key words: chronic hypoxia; pro-inflammatory cytokine; duodenum; tyrosine hydroxylase; urocortin

* [收稿日期] 2010-03-04

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目(SJ08C105)

[作者简介] 彭正午(1984—),男,湖南岳阳人,硕士,主要从事神经生物学研究。E-mail: pengzhengwu1446@163.com

[通信作者] 赵慧英(1966—),女,陕西韩城人,博士,教授,硕士生导师,主要从事动物神经生物学研究。

E-mail: ylzhaohy@yahoo.com.cn

慢性缺氧和炎性反应对机体各器官的功能有广泛影响。厌食是高原反应和机体感染时的常见症状,但其机制尚不清楚。消化道存在大量多巴胺能细胞,其可能通过分泌多巴胺刺激外分泌,抑制肠蠕动,调节钠的吸收以及粘膜的血流量^[1-3]。酪氨酸羟化酶(Tyrosine hydroxylase, TH)是单胺类递质合成的限速酶。已有研究报道,小肠的去神经支配会导致肠道 TH 阳性细胞大量丢失^[4],而且大鼠十二指肠基底副神经节中存在 TH 免疫阳性终末,这提示其接受去甲肾上腺素能交感神经元的直接投射^[5]。尿皮质素(Urocortin, Ucn)是促肾上腺皮质激素释放激素(CRF)家族的新成员,广泛分布于中枢神经系统、消化系统、心血管系统、生殖系统、免疫和内分泌系统等,是具有生物活性的神经肽。Ucn 对因应激引起的内分泌、自主神经、免疫和行为反应有调节作用^[6-7]。CRF 受体广泛分布于小肠,CRF 类多肽可以通过与其受体结合,调节十二指肠的收缩活动^[8]。目前,对于低压缺氧和促炎性细胞因子是否通过影响儿茶酚胺类的表达调节十二指肠的消化吸收功能,或者通过 Ucn 的表达变化调节其应激反应和动力变化,尚不清楚。为此,本试验利用低压氧舱建立大鼠慢性缺氧模型^[9],通过腹腔注射 rmIL-1 β (Recombinant Murine Interleukin-1 beta)建立炎性细胞因子刺激模型,观察慢性低压缺氧和促炎性细胞因子刺激,对大鼠十二指肠 TH 和 Ucn 表达的影响,旨在初步探明低压缺氧和促炎性细胞因子影响十二指肠功能活动的机理。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 雄性 SD 大鼠 48 只,体质量 200~220 g,购自第四军医大学实验动物中心。

1.1.2 试剂与仪器 rmIL-1 β 购自 ProSpec-Tany TechnoGene LTD 公司(产品编号:CYT-273),小鼠抗大鼠神经核蛋白 Neun 抗体购于 Millipore 公司(产品编号:MAB377x),小鼠抗大鼠 TH 抗体购于 Sigma 公司(产品编号:T2928),山羊抗大鼠 Ucn 购于 Santa Cruz 公司(产品编号:sc1825),Texas Red 结合的驴抗小鼠 IgG 购于 Molecular Probes 公司(产品编号:38474A),Alexa488-FITC 结合的鸡抗山羊 IgG 购于 Bethyl 公司(产品编号:A200-116F)。主要仪器有:低压缺氧舱(第四军医大学生理学教研室研制)、BX-51 显微镜(Olympus)、恒冷箱切片机(Leica)。

1.2 方法

1.2.1 动物处理 将动物随机分成 6 组,每组 8 只。第 1 组为空白对照组(CK),连续 3 d 每天同一时间腹腔注射生理盐水 1 mL;第 2 组为细胞因子刺激组(IL-1 β),连续 3 d 每天同一时间腹腔注射 rmIL-1 β (剂量为 1 μ g/kg,1 mL 生理盐水稀释);第 3 组为缺氧 2 周组(H2w),将动物每天置于低压氧舱中(氧的体积分数为 10%,模拟海拔为 5 500 m)缺氧 10 h,连续 2 周,在第 12,13 和 14 天缺氧处理 2 h 前,腹腔注射生理盐水 1 mL;第 4 组为缺氧 2 周+细胞因子刺激组(H2w+IL-1 β),缺氧处理方式同第 3 组,但是在第 12,13 和 14 天缺氧处理 2 h 之前,腹腔注射 rmIL-1 β (剂量为 1 μ g/kg,1 mL 生理盐水稀释);第 5 组为缺氧 3 周组(H3w),处理方式与第 3 组相似,但是缺氧处理时间为 3 周,在最后 3 d 缺氧处理 2 h 之前,腹腔注射 1 mL 生理盐水;第 6 组为缺氧 3 周+细胞因子刺激组(H3w+IL-1 β),缺氧处理办法同第 5 组,但是在最后 3 d 缺氧处理 2 h 之前,腹腔注射 rmIL-1 β (剂量为 1 μ g/kg,1 mL 生理盐水稀释)。

1.2.2 切片制备 各组大鼠最后一天缺氧处理完毕后,经腹腔注射戊巴比妥钠(剂量为 40 mg/kg)进行麻醉。打开胸腔后,先用 100 mL 生理盐水快速经心灌流以冲洗血液,再用预冷的多聚甲醛(40 g/L)固定液 400 mL 灌注,然后打开腹腔,在距幽门约 1.5 cm 处取一小段十二指肠,放入 200 g/L 蔗糖溶液中,4 $^{\circ}$ C 过夜。用恒冷箱切片机(-20 $^{\circ}$ C)连续切片,贴于覆有明胶的载玻片上,片厚 10 μ m,-20 $^{\circ}$ C 保存待用。

1.2.3 切片染色 (1)免疫荧光染色。将所有切片在室温下晾干,经 0.01 mol/L KPBS 漂洗 3 次(每次 5 min),用 10 g/L 小牛血清白蛋白(BSA)封闭 30 min,0.01 mol/L KPBS 漂洗 3 次(每次 5 min);部分空白对照组大鼠十二指肠切片,用山羊抗大鼠 Ucn(1:500)和小鼠抗大鼠神经核蛋白 Neun 抗体(1:1 000)孵育,其余切片用山羊抗大鼠 Ucn(1:500)和小鼠抗大鼠 TH 抗体(1:500)孵育,室温下孵育 24 h;以 0.01 mol/L KPBS 漂洗 3 次(每次 5 min),用 Texas Red 结合的驴抗小鼠 IgG (1:500)和 Alexa488-FITC 结合的鸡抗山羊 IgG (1:800)孵育切片,室温下孵育 3 h;0.01 mol/L KPBS 漂洗 3 次(每次 5 min)后,用体积分数 50%甘油封片。用 Olympus BX-51 显微镜采图。部分切片一抗用 PBS 代替,结果未见阳性细胞。

(2)HE 染色。Ucn 和 Neun 荧光双标切片采图结束后,用 0.01 mol/L KPBS 浸泡 1 h 以洗脱掉盖玻片,然后进行 HE 染色。切片用苏木素染色 3 min 后,自来水冲洗;盐酸酒精分色 20 s,用自来水冲洗;碳酸锂蓝化,自来水冲洗;伊红染色 30 s,经梯度酒精脱水,二甲苯透明后,用中性树胶封片。Olympus BX-51 显微镜采图。

1.3 数据的处理与分析

在 20 倍物镜下于粘膜层采图,每张图面积为 $(883.12\times664.94)\mu\text{m}^2$,计算面积时扣除图中无粘膜的空白部分。每例动物采图 20 张,用图像分析软件 Image-Pro Plus 6.0 测量阳性细胞数目,求平均

值。采用 SPSS 11.0 软件进行方差分析,以 $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 Ucn 和 Neun 在大鼠十二指肠的表达

Ucn 主要在十二指肠粘膜固有层表达,胞浆浓染,胞核淡染,而且与 Neun 存在大量双标细胞,细胞呈椭圆形或不规则形。HE 染色结果显示这些 Ucn 阳性细胞胞核较大,胞质较少,可能是主要分布于十二指肠固有层的免疫相关细胞。提示 Ucn 参与了肠道的神经免疫调节(图 1)。

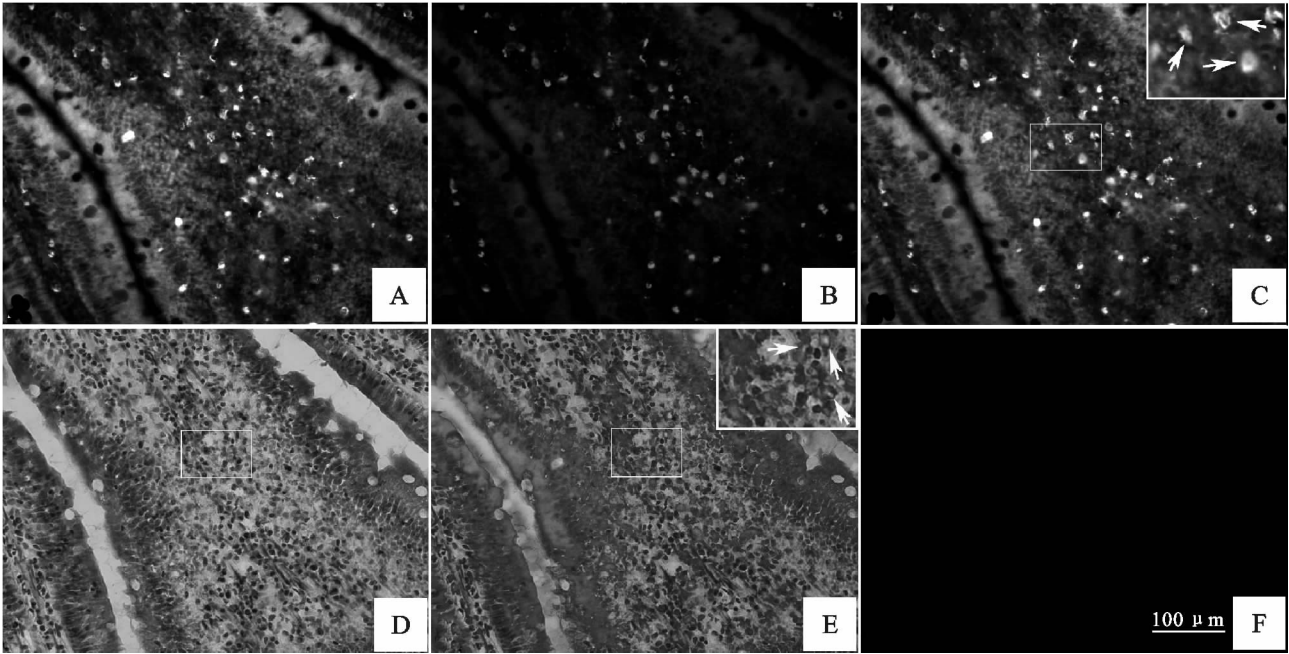


图 1 Ucn 在大鼠十二指肠的表达定位(400×)

A. Ucn 在十二指肠的表达;B. Neun 在十二指肠的表达;C. Ucn 与 Neun 双标记;D. HE 染色;E. HE 与 Ucn 的染色叠加;F. 阴性对照;方框内箭头显示 Ucn 与 Neun,或 Ucn 与 HE 染色双标细胞;Bar=100 μm

Fig. 1 Allocation of Ucn positive cells in the duodenum of SD rats (400×)
A. Expression of Ucn in the duodenum;B. Expression of Neun in the duodenum;C. The double labelling of Ucn and Neun;
D. HE staining;E. The double labelling of Ucn and HE;F. Negative control;Double labelling cells were showed by arrows in the box;Bar=100 μm

2.2 TH 和 Ucn 在大鼠十二指肠的表达

TH 和 Ucn 在正常对照组及各刺激组大鼠十二指肠的表达部位均限于粘膜固有层,慢性缺氧可以引起 TH 阳性细胞数量增加,而 rmIL-1β 刺激则引起 Ucn 阳性细胞数量增加。TH 和 Ucn 阳性细胞胞浆浓染,胞核淡染(图 2)。

2.3 不同刺激方式对大鼠十二指肠 TH 表达的影响

图 3 显示,空白对照组大鼠十二指肠的 TH 阳

性细胞数为 $(9.32\pm0.34)\times10^3\text{ mm}^{-2}$,IL-1β 组为 $(8.94\pm0.32)\times10^3\text{ mm}^{-2}$,二者差异不显著 ($P>0.05$),提示促炎性细胞因子刺激对 TH 的表达无显著影响;H2w 组 $((6.53\pm0.39)\times10^3\text{ mm}^{-2})$ 、H3w 组 $((3.06\pm0.17)\times10^3\text{ mm}^{-2})$ 与空白对照组之间存在极显著差异 ($P<0.01$),而且 H3w 与 H2w 组之间也存在极显著差异 ($P<0.01$),提示慢性低压缺氧可以明显降低十二指肠中 TH 的表达,而且与缺氧时间呈负相关 ($P<0.01$);H2w+IL-1β 组 TH

阳性细胞数为 $(6.09 \pm 0.34) \times 10^3 \text{ mm}^{-2}$,与 H2w 组之间无显著差异($P>0.05$),但是与其他试验组差异极显著($P<0.01$);H3w+IL-1 β 组 TH 阳性细胞数为 $(3.46 \pm 0.18) \times 10^3 \text{ mm}^{-2}$,与 H3w 组之间

也无显著差异($P>0.05$),但是与其他试验组存在极显著差异($P<0.01$)。提示慢性低压缺氧和促炎性细胞因子刺激对 TH 的表达无协同作用。

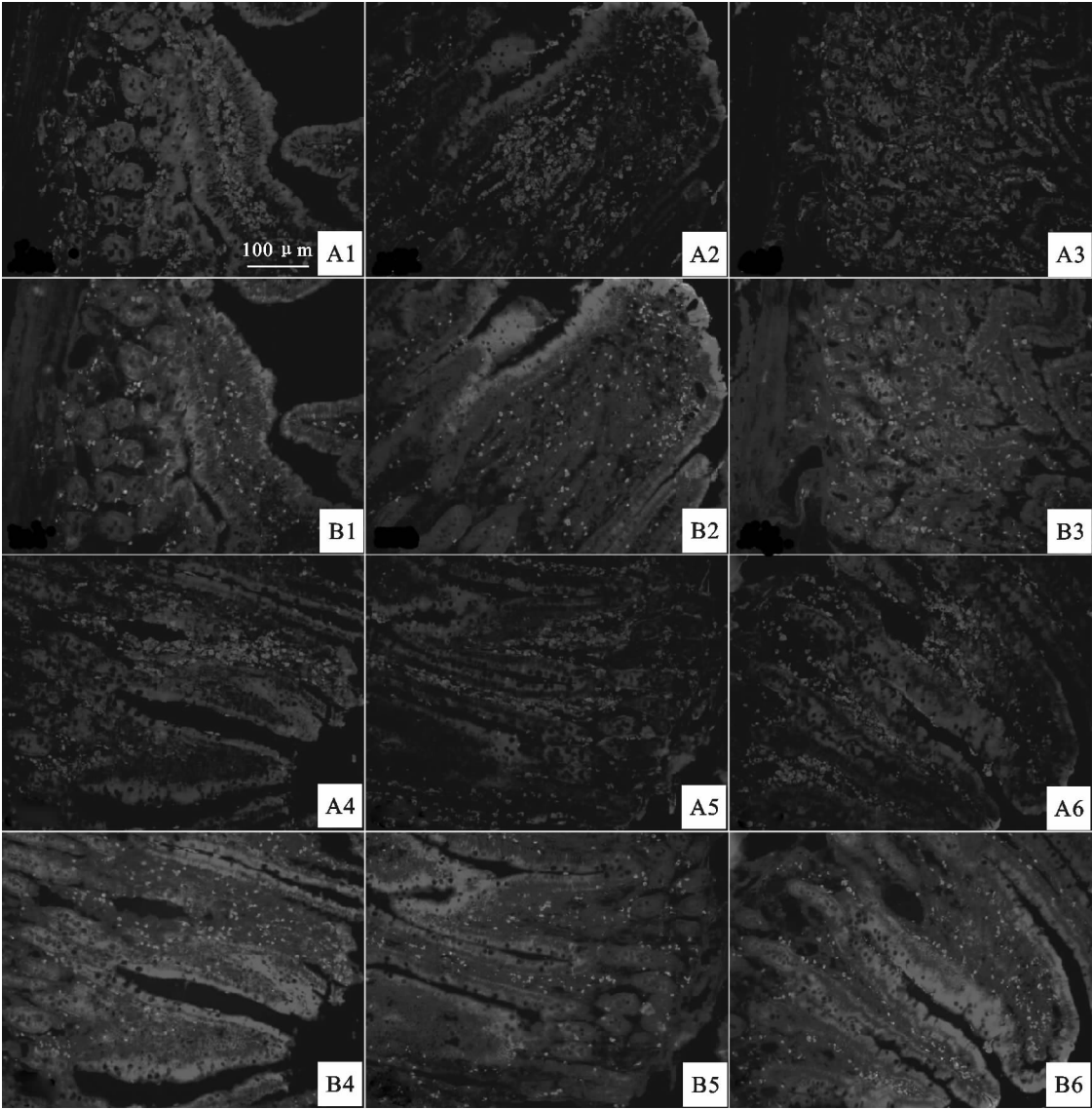


图 2 TH(红)和 Ucn(绿)在大鼠十二指肠中的表达(200 $\times$)

A,B. 分别为 TH 和 Ucn 在各组大鼠十二指肠的免疫细胞化学表达结果;1~6. 分别代表第 1~6 试验组;Bar=100 μm

Fig. 2 Expression of TH (red) and Ucn (green) in the duodenum of SD rats (200 $\times$)

A,B. Microphotographs of TH (red) and urocortin (green) expressions in the rat duodenum in each group;
1—6 is group 1 to group 6;Bar=100 μm

2.4 不同刺激方式对大鼠十二指肠 Ucn 表达的影响

由图 3 可知,空白对照组大鼠十二指肠的 Ucn 阳性细胞数为 $(3.33 \pm 0.20) \times 10^3 \text{ mm}^{-2}$,与 H2w 组($(3.78 \pm 0.38) \times 10^3 \text{ mm}^{-2}$)、H3w 组($(3.51 \pm 0.32) \times 10^3 \text{ mm}^{-2}$)之间无显著差异($P>0.05$),而且 H2w 与 H3w 组之间也无显著差异($P>0.05$),

提示慢性低压缺氧对 Ucn 的表达无显著影响;IL-1 β 组大鼠十二指肠的 Ucn 阳性细胞数为 $(4.45 \pm 0.23) \times 10^3 \text{ mm}^{-2}$,与空白对照组存在显著差异($P<0.05$);H2w+IL-1 β 组 Ucn 阳性细胞数为 $(5.35 \pm 0.26) \times 10^3 \text{ mm}^{-2}$,与 H2w 组存在显著差异($P<0.05$);H3w+IL-1 β 组 Ucn 阳性细胞数为 $(4.22 \pm 0.37) \times 10^3 \text{ mm}^{-2}$,与 H3w 组存在显著差

异($P<0.05$),提示促炎性细胞因子刺激可以明显上调十二指肠中 Ucn 的表达;IL-1 β 、H2w+IL-1 β 、H3w+IL-1 β 组之间不存在显著差异($P>0.05$),但是它们与缺氧处理组(H2w 和 H3w)及空白对照组之间均存在显著差异($P<0.05$),提示慢性低压缺氧和促炎性细胞因子刺激对 Ucn 的表达无协同作用。

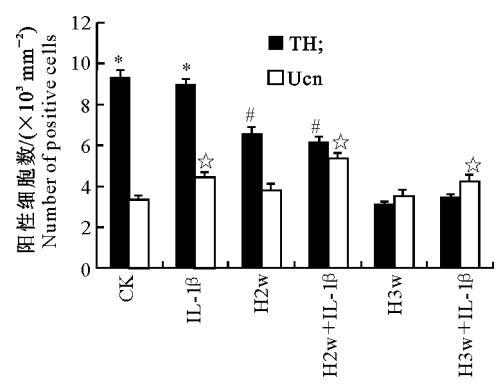


图 3 各组十二指肠 TH 和 Ucn 阳性细胞数量的比较
* . 与 H2w、H2w+IL-1 β 、H3w 和 H3w+IL-1 β 组
差异极显著($P<0.01$); # . 与空白对照组、
IL-1 β 、H3w 和 H3w+IL-1 β 组差异极显著($P<0.01$);
☆ . 与空白对照组、H2w 和 H3w 组差异显著($P<0.05$)
Fig. 3 Comparison of TH and Ucn immunoreactive
cells in the rat duodenum among different groups
* . $P<0.01$ vs. H2w, H2w+IL-1 β , H3w and H3w+IL-1 β group;
. $P<0.01$ vs. control, IL-1 β , H3w and H3w+IL-1 β group;
☆ . $P<0.05$ vs. control, H2w and H3w groups

3 讨 论

生理研究表明,低压性缺氧对胃、肠功能有明显的抑制作用。缺氧可造成消化腺分泌减少、胃肠蠕动减慢、胃排空时间延长,并引起胃肠道粘膜中生长抑素的表达升高^[10]。另一方面,机体感染时免疫细胞会产生大量的促炎性细胞因子,如 IL-1 β 、IL-6 等,其对摄食有很强的抑制作用^[11]。TH 和 Ucn 在十二指肠均有表达^[12],本试验观察到 Ucn 与 Neun 在十二指肠存在大量双标细胞,说明神经细胞对十二指肠功能的调节有重要作用,肠神经系统可能通过表达 Ucn 以调控十二指肠的功能。同时,本试验观察到慢性低压性缺氧可以引起十二指肠 TH 表达下调,且随着缺氧时间的延长,TH 表达显著减少。究其原因,一方面是缺氧导致血氧浓度降低,血液中化学成分含量发生变化,进而使粘膜层细胞本身受刺激而抑制 TH 的表达,而且这种抑制作用的强度与刺激时间呈负相关;另一方面,缺氧也有可能通过刺激机体消化中枢传递信号,反馈性地调节十二指肠 TH 的表达,从而实现对十二指肠消化机能的调

节。

本试验发现,rmIL-1 β 可以刺激 Ucn 在十二指肠表达上调,其原因可能是,rmIL-1 β 直接刺激粘膜层 Ucn 细胞,引起 Ucn 表达升高;也可能是 rmIL-1 β 通过抑制下丘脑与摄食有关的中枢神经元而抑制摄食^[13],从而调节十二指肠 Ucn 的表达。同时,笔者发现,低压缺氧对十二指肠 Ucn 的表达无显著影响,而腹腔注射 rmIL-1 β 对十二指肠 TH 的表达也无显著影响,说明机体可能通过不同方式调节十二指肠的功能。

本试验结果表明,慢性低压缺氧可以引起十二指肠 TH 表达下调,但对 Ucn 的表达无明显影响,提示缺氧可能通过抑制十二指肠多巴胺能的细胞活性来调节十二指肠功能,而不是通过 Ucn 来调节的。本试验同时还发现,rmIL-1 β 可以刺激 Ucn 在十二指肠表达上调,但是对 TH 的表达无显著影响,说明机体感染可能通过释放促炎性细胞因子调节 Ucn 的细胞活性,从而调节十二指肠功能,而且这种调节并不是通过调节 TH 阳性细胞活性来实现的。

[参考文献]

[1] 田岳民,陈 昕,王 伟,等.多巴胺能细胞在大鼠消化道不同部位分布的比较 [J].首都医科大学学报,2007,28(2):225-228.
Tian Y M, Chen X, Wang W, et al. The comparison of distribution of dopaminergic cells and different expression of gene TH and DAT among the gastrointestinal tract of rat [J]. Journal of Capital Medical University, 2007, 28(2): 225-228. (in Chinese)
[2] Finkel Y, Eklof A C, Granquist L, et al. Endogenous dopamine modulates jejunal sodium absorption during high-salt diet in young but not in adult rats [J]. Gastroenterology, 1994, 107: 675-679.
[3] Haskel Y, Hanani M. Inhibition of gastrointestinal motility by MPTP via adrenergic and dopaminergic mechanisms [J]. Dig Dis Sci, 1994, 39: 2364-2367.
[4] Fatima J, Houghton S G, Sarr M G. Development of a simple model of extrinsic denervation of the small bowel in mouse [J]. J Gastrointest Surg, 2007, 11(8): 1052-1056.
[5] Hayakawa T, Kuwahara S, Maeda S, et al. Fine structural survey of tyrosine hydroxylase immunoreactive terminals in the myenteric ganglion of the rat duodenum [J]. J Chem Neuroanat, 2008, 36: 191-196.
[6] Skelton K H, Owens M J, Nemeroff C B. The neurobiology of urocortin [J]. Regul Pept, 2000, 93: 85-92.
[7] Turnbull A V, Rivier C. Corticotropin-releasing factor (CRF) and endocrine responses to stress: CRF receptors, binding protein, and related peptides [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1997, 215: 1-10.
(下转第 12 页)