

胰高血糖素样肽-2 对 28 日龄断奶仔猪肠上皮细胞的保护及修复效应研究

贾 刚*, 蒋荣川, 晏家友, 黄 兰, 王康宁*

(四川农业大学动物营养研究所 教育部动物抗病营养重点实验室, 雅安 625014)

摘 要: 本研究旨在探讨胰高血糖素样肽-2(Glucagon-like peptide-2, GLP-2)对 28 日龄断奶仔猪的肠黏膜上皮细胞(IEC)损伤后增殖、代谢、凋亡的影响及可能的作用机理。试验首先采用单因子设计, 分别用 1.2 和 2.4 mg · mL⁻¹ 的 β-伴球蛋白对原代培养的断奶仔猪肠上皮细胞进行攻毒, 通过测定细胞增殖、代谢及凋亡的变化而建立细胞损伤模型; 然后再采用 2×3 因子设计, 考察添加不同浓度的 GLP-2(1×10⁻⁹、1×10⁻⁸、1×10⁻⁷ mol · L⁻¹)对致敏的肠上皮细胞的影响。结果表明, 使用 β-伴球蛋白攻毒, 细胞 MTT OD 值显著降低($P < 0.05$), 细胞蛋白质沉积量和细胞总蛋白含量极显著降低($P < 0.01$), 胞外 LDH 活力极显著增加($P < 0.01$), Na⁺-K⁺-ATP 酶活力显著($P < 0.05$)或者极显著($P < 0.01$)降低, 半胱氨酸蛋白酶-3(caspase-3)酶活力极显著($P < 0.01$)升高; 使用 β-伴球蛋白攻毒的同时添加不同浓度的 GLP-2, 细胞 MTT OD 值、细胞蛋白质沉积量、细胞总蛋白含量和 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力均显著或极显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)升高, 且随着 GLP-2 浓度的增加而升高, 而胞外 LDH 活力则随着 GLP-2 浓度的增加而逐渐下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), caspase-3 酶活力极显著($P < 0.01$)降低。提示 β-伴球蛋白对断奶仔猪小肠上皮细胞的增殖和细胞完整性有不利影响, 而 GLP-2 能够减轻或者避免 β-伴球蛋白对断奶仔猪小肠上皮细胞的不利影响, 这种效应可能是通过调节细胞 Na⁺-K⁺-ATP 酶、caspase-3 等的活力变化并影响细胞代谢而实现。

关键词: 胰高血糖素样肽-2; β-伴球蛋白; 断奶仔猪; 肠上皮细胞; 增殖; 代谢

中图分类号: S828; S816.7

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2009)10-1478-09

Cytoprotection and Repairing Effects of GLP-2 on Intestinal Epithelial Cells of 28-d Weaned Piglets Injured by β-conglycinin *in vitro*

JIA Gang*, JIANG Rong-chuan, YAN Jia-you, HUANG Lan, WANG Kang-ning*

(Key Laboratory of Animal Disease-Resistance Nutrition, Ministry of Education, Animal Nutrition Institute, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: The experiment was conducted to study the effects of GLP-2 on proliferation, metabolism and apoptosis of intestinal epithelial cells after injury by β-conglycinin in 28-day-old weaned piglets and GLP-2's possible action mechanism. According to single-factor design principle, different β-conglycinin concentrations of 1.2 and 2.4 mg · mL⁻¹ were used for contracting toxic substances to primary culture epithelial cells of weaned piglets. The cell damage model was established on the investigation of the cell proliferation, metabolism and apoptosis. Then the experiment of 2×3 factorial design was adopted to study the impacts of the sensitized cultured cell with different GLP-2 concentrations of 1×10⁻⁹, 1×10⁻⁸ and 1×10⁻⁷ mol · L⁻¹. The results were as fol-

收稿日期: 2009-03-05

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划“猪抗病营养的分子作用机制”(IRTO555); 四川省应用基础研究“生物活性肽对仔猪断奶应激综合症的营养调控”(045Y029-031)

* 通讯作者: 贾 刚(1970-), 男, 四川汉源人, 副教授, 博士, 主要从事畜禽肠道营养调控技术研究, E-mail: jiagang700510@163.com; 王康宁, E-mail: wkn@sicau.edu.cn

lows; when β -conglycinin were used for counteracting toxic substances, the MTT OD significantly decreased ($P < 0.05$); the protein retention and total protein content in cell significantly decreased ($P < 0.01$); LDH activity significantly increased ($P < 0.01$); $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ enzyme activity significantly decreased ($P < 0.05$); caspase-3 activity significantly increased ($P < 0.01$). When β -conglycinin were used for counteracting toxic substances after addition of GLP-2, the MTT OD, the protein retention, total protein content and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ enzyme activity significantly increased ($P < 0.05$). LDH activity gradually decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) and caspase-3 activity significantly decreased ($P < 0.01$) along with the increase of GLP-2 concentration. The results indicated that β -conglycinin had adverse effects on intestinal epithelial cells proliferation and cell integrality *in vitro*. GLP-2 could relieve or avoid the adverse effects on intestinal epithelial cells proliferation and cell integrality by regulating $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ enzyme activity and caspase-3 activity, and consequently affecting cell metabolism.

Key words: Glucagon-like peptide-2; β -conglycinin; weaned piglets; intestinal epithelial cell (IEC); proliferation; metabolism

胰高血糖素样肽-2 (Glucagon-like peptide-2, GLP-2) 是近年来发现的一种特异性的促肠生长激素^[1], 其促生长作用具有很强的器官特异性。大量在小鼠^[2]、大鼠^[3]等试验动物和胎猪、新生仔猪^[4-6]上的研究取得了较一致的结果, 表明 GLP-2 在促进肠细胞增殖、分化, 抑制细胞凋亡中发挥重要作用。蒋荣川等^[7]的研究表明, GLP-2 可以显著影响 28 日龄断奶仔猪的肠细胞增殖及代谢, 维护细胞形态和功能的完整, 但是否能对受损的细胞发挥保护、修复功能尚不得而知。研究表明, 在仔猪断奶后的肠道适应过程中, β -伴球蛋白是植物蛋白源中诱发断奶仔猪肠道发生过敏反应的主要抗原成分, 并进而导致仔猪断奶应激综合征的发生, 因此, 植物性蛋白引起的仔猪肠道过敏损伤及随即而来的肠道修复是肠道适应的重要步骤^[8]。在小肠适应过程中, GLP-2 在仔猪肠道分泌增加^[5], 但是否能在植物蛋白抗原引起的断奶仔猪肠道过敏反应及随后的适应中发挥作用还未知。因此, 本试验拟先在 28 日龄断奶仔猪的肠上皮细胞模型上研究 GLP-2 对 β -伴球蛋白致敏的肠细胞的形态、增殖、凋亡及相关酶活力的影响, 探讨 GLP-2 对损伤的肠黏膜上皮细胞的影响特点或规律, 为以后进一步研究 GLP-2 对断奶仔猪肠道适应的调节作用提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验对象

试验动物采用 28 日龄断奶的长白 \times 大白健康仔猪, 体质量为 6.82 kg, 屠宰后立即在无菌条件下

取回肠, 放入预冷的 4 $^{\circ}\text{C}$ 清洗液中, 参考 Evans 等^[9], 姜俊^[10]的方法进行肠上皮细胞的消化分离, 分离得到的肠细胞用适量培养液悬浮。细胞培养液配方如下: DMEM 高糖培养基, 添加 5% FBS、2 mmol \cdot L⁻¹ 谷氨酰胺、2 $\mu\text{g} \cdot$ mL⁻¹ 胰岛素、20 ng \cdot mL⁻¹ EGF、100 IU \cdot mL⁻¹ 青霉素和 100 $\mu\text{g} \cdot$ mL⁻¹ 链霉素。

1.2 试验材料

1.2.1 仪器 BB5060UV 型细胞培养箱 (德国 Heraeus), Wellscan MK3 型酶联免疫分析仪 (美国 Thermo Fisher Scientific), 倒置相差多功能生物显微镜 (A200 型, 德国 Carl Zeiss Microimaging GmbH), DV-800 核酸蛋白分析仪 (美国 Beckman Coulter), BCN-1360 型生物洁净工作台等。

1.2.2 主要试剂 GLP-2 (美国 Phoenix Pharmaceuticals 公司, Purity $\geq 95\%$); 胰岛素、胶原酶 XI 型、中性蛋白酶 I 型、四甲基偶氮唑盐 (MTT), caspase-3 活性检测试剂盒 (美国 Sigma 公司); 山梨醇、DMEM 高糖培养液、胎牛血清、转铁蛋白 (美国 Gibco 公司); $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶、碱性磷酸酶 (AKP)、乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒, 考马斯亮蓝总蛋白检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所) 等。

1.3 试验设计

1.3.1 β -伴球蛋白细胞攻毒模型的建立 试验 1 采用单因子设计, 设 3 个处理, 每个处理 8 个重复, 每个重复 1 孔。 β -伴球蛋白的添加浓度参考郭林英^[11]的结果, 详见表 1。

表 1 试验 1 设计方案

处理组 Treatment	A	B	C
β -伴球蛋白浓度 β -conglycinin concentration	0	1.2	2.4
重复数 Replicate	8	8	8

表 2 试验 2 设计方案

Table 2 The design of experiment 2

组别 Group	β -伴球蛋白 β -conglycinin/(mg · mL ⁻¹)	胰高血糖素样肽-2 GLP-2/(mol · L ⁻¹)	重复数 Replicate	处理组 Treatment
1 组 Group 1	1.2	1×10^{-9}	16	B ₁
		1×10^{-8}	16	B ₂
		1×10^{-7}	16	B ₃
2 组 Group 2	2.4	1×10^{-9}	16	C ₁
		1×10^{-8}	16	C ₂
		1×10^{-7}	16	C ₃

1.4 试验方法

1.4.1 β -伴球蛋白的提取 利用大豆 β -伴球蛋白在稀盐酸缓冲溶液中溶解度不同进行分离,具体方法参照 Thanh 等^[12]的提取方法进行。

1.4.2 细胞接种 将细胞按 1×10^6 个 · mL⁻¹ 接种于预先用胶原蛋白涂抹的 24 孔细胞培养板中,5%CO₂ 37 °C 培养 48 h,待细胞贴壁后,弃去原培养液,各处理组分别加入不同浓度的 β -伴球蛋白,再培养 48 h 后测定相关指标以判断能否建立断奶仔猪肠上皮细胞的攻毒模型。试验 2 各处理组则在肠上皮细胞贴壁后加入 β -伴球蛋白,然后再加入不同浓度 GLP-2,继续培养 48 h 后,收集样品进行测定。

1.4.3 细胞观测计数 细胞培养过程中,利用倒置显微镜的透射明场相差相衬法(PH)直接观察细胞形态以判断细胞生长情况;加入 GLP-2 后 48 h,各处理组分别取 4 孔进行细胞计数;弃去培养液,用细胞清洗液清洗细胞 2~3 次,每孔加入 500 μ L 混合酶消化液(300 U · mL⁻¹ XI 型胶原酶和 0.1 mg · mL⁻¹ I 型中性蛋白酶)消化细胞 30 min,制成细胞悬液,吹打均匀,用移液器吸取 20 μ L 细胞悬液,加入血细胞计数板,在显微镜下进行细胞计数。

1.4.4 样品收集及测定指标 加入 β -伴球蛋白和 GLP-2 培养细胞 48 h 后,各处理组分别取 4 孔进行 MTT 染色,并测定 540 nm 处的吸光值(MTT OD 值),其值反映活细胞数量及细胞代谢的活跃程

1.3.2 GLP-2 对致敏的断奶仔猪肠上皮细胞的影响 试验 2 采用 2×3 因子设计,试验设 6 个处理,每个处理 16 个重复,每个重复 1 孔,GLP-2 的添加浓度参考蒋荣川等^[7]的结果,详见表 2。

度;细胞贴壁培养 48 h 后,收集各处理的培养上清液和裂解液,分别测定细胞蛋白沉积量、细胞总蛋白含量、上清液中的乳酸脱氢酶(LDH)、AKP 酶活力以及裂解液中的 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力和 caspase-3 的活力来反映细胞的增殖、完整性及凋亡情况^[13-16]。

酶活定义单位如下:Na⁺-K⁺-ATP 活力,规定每小时每毫克组织蛋白的组织中 ATP 酶分解 ATP 产生 1 μ mol 无机磷的量为一个 ATP 酶活力单位,即微摩尔磷 · 毫克蛋白⁻¹ · 小时⁻¹(μ mol Pi · mg prot⁻¹ · h⁻¹);AKP 活力:每克组织蛋白在 37 °C 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个单位;LDH 活力:1 000 mL 组织液 37 °C 与基质作用 15 min,在反应体系中产生 1 μ mol 丙酮酸为 1 个单位;caspase-3 活性:当底物饱和时,在 37 °C 剪切 1 nmol Ac-DEVD-pNA 产生 1 nmol pNA 的 caspase-3 的酶量。

1.5 试验数据处理

试验结果以平均数 ± 标准差表示。试验 1 采用 SPSS 13.0 对试验数据进行单因素方差分析,结合 Duncan 法进行多重比较;试验 2 用 SPSS 13.0 统计软件进行 GLM 方差分析并进行多重比较。

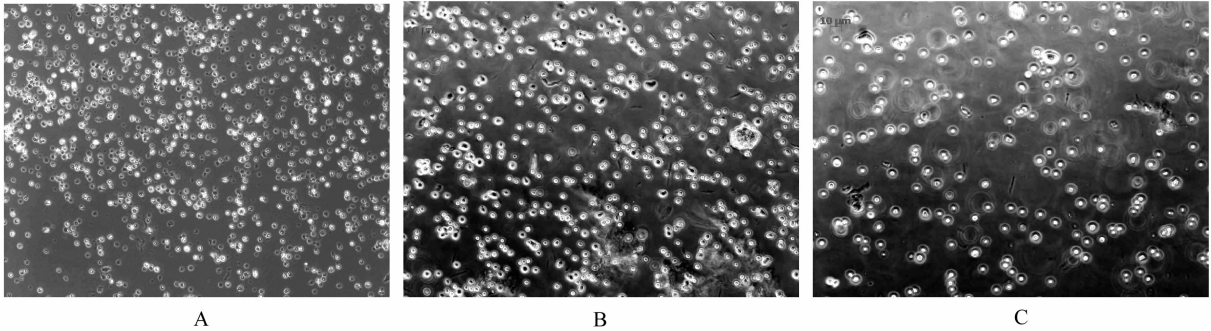
2 结果

2.1 β -伴球蛋白对断奶仔猪肠细胞攻毒模型的建立

2.1.1 细胞形态观察 β -伴球蛋白对断奶仔猪肠上皮细胞的增殖及形态影响如图 1 所示,断奶仔

猪的肠上皮细胞大小在 5~10 μm 左右,向培养液中添加 β -伴球蛋白后,细胞密度(数量)降低,细胞贴壁性能下降,边缘清晰度降低,表明细胞形态的完整

性受到损伤,这种不利影响随着培养液中 β -伴球蛋白的浓度增加而增加。



A、B、C 分别为表 1 中各处理对应的 IEC 形态

A、B、C The IEC morphology of treatments in table 1

图 1 不同浓度 β -伴球蛋白对断奶仔猪肠上皮细胞增殖及形态的影响(10 \times /23,20 \times /0.4)

Fig. 1 The effects of different β -conglycinin levels on proliferation and morphology of IEC of weaned piglet

2.1.2 β -伴球蛋白对细胞增殖的影响 β -伴球蛋白对断奶仔猪肠上皮细胞增殖、代谢的影响见表 3。添加 β -伴球蛋白组细胞数量极显著降低($P < 0.01$),MTT OD 值显著($P < 0.05$)降低,这提示活

细胞数量减少;细胞蛋白质沉积量和细胞总蛋白含量极显著降低($P < 0.01$),且随着培养液中的 β -伴球蛋白浓度的增加而降低。结果表明: β -伴球蛋白抑制了 28 日龄断奶仔猪肠上皮细胞的增殖及代谢。

表 3 不同浓度 β -伴球蛋白对断奶仔猪肠上皮细胞增殖及蛋白质代谢的影响

Table 3 Effects of different β -conglycinin levels on proliferation and protein metabolism of weaned piglet's IEC

项目 Item	β -伴球蛋白浓度 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) β -conglycinin concentrations		
	0	1.2	2.4
细胞数量 / ($\times 10^6$ 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$) Cell quantity	1.415 \pm 0.174 ^{aA}	0.743 \pm 0.056 ^{bB}	0.508 \pm 0.035 ^{cB}
MTT OD 值 MTT OD value	0.193 \pm 0.044 ^{aA}	0.123 \pm 0.017 ^{bA}	0.125 \pm 0.024 ^{bA}
细胞蛋白质沉积量 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) Protein retention	1.503 \pm 0.181 ^{aA}	0.888 \pm 0.068 ^{bB}	0.433 \pm 0.079 ^{cC}
细胞总蛋白量 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) Total protein	1.688 \pm 0.290 ^{aA}	1.018 \pm 0.080 ^{bB}	0.588 \pm 0.019 ^{cC}

同行数据不同肩注小写字母表示差异显著($P < 0.05$),不同大写字母表示极显著($P < 0.01$)。下表同

In the same row, values with different small superscripts mean significant difference($P < 0.05$),different capital letter superscripts mean significant difference ($P < 0.01$). The same as below

2.1.3 β -伴球蛋白对细胞完整性相关酶活力的影响 β -伴球蛋白对断奶仔猪肠道上皮细胞代谢和完整性的影响详见表 4。添加 β -伴球蛋白使细胞 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力极显著($P < 0.01$)降低,caspase-3 酶活力极显著($P < 0.01$)上升,且随着培养液中的 β -伴球蛋白浓度的增加而上升,这提示细

胞凋亡增加;胞外 LDH 活力和 AKP 活力极显著升高($P < 0.01$),且 LDH 活性随 β -伴球蛋白浓度的增加而升高,这提示细胞受到损伤加强,细胞结构完整性降低。结果表明: β -伴球蛋白能抑制 28 日龄断奶仔猪肠上皮细胞的代谢,破坏细胞的完整性,使细胞凋亡增加。

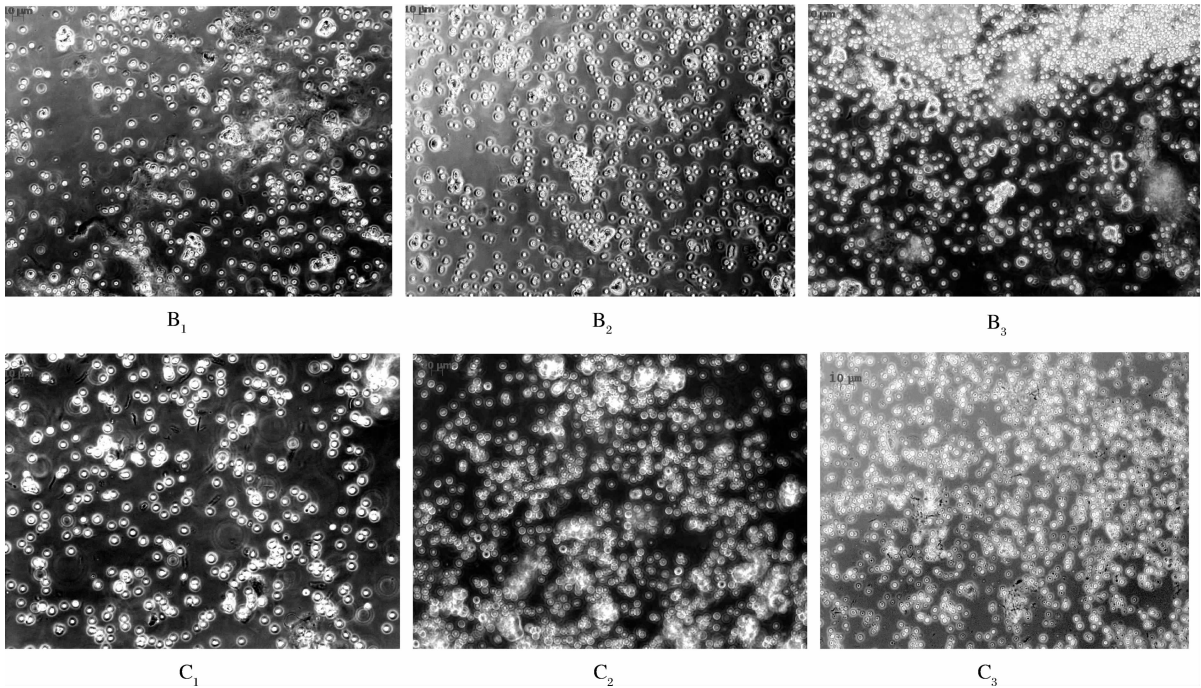
表 4 不同浓度 β -伴球蛋白对断奶仔猪肠上皮细胞代谢和完整性的影响Table 4 Effects of different β -conglycinin levels on cell metabolism and integrity of weaned piglet's IEC

项目 Item	β -伴球蛋白浓度 / ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) β -conglycinin concentrations		
	0	1.2	2.4
$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活力 / ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ protein}$)	$0.165 \pm 0.019^{\text{aA}}$	$0.094 \pm 0.011^{\text{bB}}$	$0.064 \pm 0.018^{\text{bB}}$
$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ activity			
AKP 活力 / ($\text{IU} \cdot \text{mL}^{-1}$)	$1.362 \pm 0.050^{\text{aA}}$	$2.157 \pm 0.204^{\text{bB}}$	$2.364 \pm 0.136^{\text{bB}}$
AKP activity			
胞外 LDH 活力 / ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	$119.961 \pm 4.506^{\text{aA}}$	$215.339 \pm 5.900^{\text{bB}}$	$432.645 \pm 1.703^{\text{cC}}$
LDH activity			
半胱氨酸蛋白酶-3 活力 / ($\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	$3.291 \pm 36^{\text{aA}}$	$7.776 \pm 29^{\text{bB}}$	$9.437 \pm 24^{\text{cC}}$
Caspase-3 activity			

2.2 添加 GLP-2 对损伤的仔猪肠上皮细胞的影响

2.2.1 细胞形态观察 从图 2 可知,随着 GLP-2 浓度升高,不规则肠细胞数量减少,细胞密度(数量)

明显增加,凋亡细胞和受损伤的细胞明显减少,细胞局部长成铺路石状,已初步具备单层柱状上皮细胞典型特征。



B_1 、 B_2 、 B_3 、 C_1 、 C_2 、 C_3 分别为表 2 中各处理对应的 IEC 形态

B_1 、 B_2 、 B_3 、 C_1 、 C_2 、 C_3 IEC morphology of treatments in table 2

图 2 不同浓度 GLP-2 对致敏的断奶仔猪肠上皮细胞增殖及形态的影响(10 \times /23,20 \times /0.4)

Fig. 2 Effects of different GLP-2 levels on sensitized IEC proliferation and morphology of weaned piglet

2.2.2 GLP-2 对致敏细胞存活及增殖的影响

如表 5 所示:肠上皮细胞数量随着 GLP-2 浓度的升高而极显著($P < 0.01$)增加,低 GLP-2 添加组则随培养液中的 β -伴球蛋白浓度的升高而显著($P < 0.05$)降低;细胞 MTT OD 值随 β -伴球蛋白浓度上升而显著($P < 0.05$)降低(但高浓度 GLP-2 组无显著差异),而随 GLP-2 浓度升高而上升($P < 0.01$);

细胞蛋白质沉积量与 β -伴球蛋白呈极显著($P < 0.01$)负相关,但随着 GLP-2 浓度增加而极显著($P < 0.01$)增加;在有 GLP-2 存在的条件下,细胞总蛋白含量受 β -伴球蛋白的影响不显著($P > 0.05$),但随着 GLP-2 浓度增加而极显著($P < 0.01$)增加。结果表明:添加 GLP-2 可以减轻或避免 β -伴球蛋白对断奶仔猪肠上皮细胞增殖的不利影响。

表 5 不同浓度 β -伴球蛋白和 GLP-2 对断奶仔猪肠上皮细胞增殖及蛋白质代谢的影响Table 5 Effects of different β -conglycinin and GLP-2 levels on proliferation and metabolism of weaned piglet's IEC

项目 Item	B ₁	B ₂	B ₃	C ₁	C ₂	C ₃	P 值 P-Value		
							β -conglycinin	GLP-2	β -conglycinin ×GLP-2
细胞数量/($\times 10^6$ 个 \cdot mL ⁻¹) Cell quantity	1.048 $\pm 0.119^{bAB}$	1.385 $\pm 0.096^{cC}$	1.723 $\pm 0.130^{dD}$	0.810 $\pm 0.101^{aA}$	1.225 $\pm 0.152^{cBC}$	1.628 $\pm 0.096^{dD}$	0.003	0.000	0.492
MTT OD 值 MTT OD value	0.205 $\pm 0.048^{bA}$	0.253 $\pm 0.061^{bA}$	0.263 $\pm 0.112^{bA}$	0.123 $\pm 0.006^{aA}$	0.117 $\pm 0.021^{aA}$	0.258 $\pm 0.071^{bA}$	0.021	0.033	0.199
蛋白质沉积量/(mg \cdot mL ⁻¹) Protein retention	1.048 $\pm 0.104^{bB}$	1.321 $\pm 0.040^{cC}$	1.868 $\pm 0.142^{dD}$	0.638 $\pm 0.040^{aA}$	1.025 $\pm 0.068^{bB}$	1.663 $\pm 0.104^{dD}$	0.000	0.000	0.191
细胞总蛋白含量/(mg \cdot mL ⁻¹) Total Protein	1.572 $\pm 0.019^{aA}$	1.647 $\pm 0.068^{aAB}$	1.948 $\pm 0.087^{bC}$	1.626 $\pm 0.019^{aA}$	1.674 $\pm 0.010^{aAB}$	1.852 $\pm 0.068^{bBC}$	0.889	0.001	0.193

2.2.3 GLP-2 对致敏细胞的代谢和完整性的影响

从表 6 可知,细胞 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力随 β -伴球蛋白浓度升高而极显著($P < 0.01$)下降,当 β -伴球蛋白为 1.2 mg \cdot mL⁻¹时,细胞 Na⁺-K⁺-ATP 酶活力与 GLP-2 浓度呈极显著正相关($P < 0.01$);细胞外 LDH 活力随 β -伴球蛋白浓度升高而呈极显著($P < 0.01$)上升,而随 GLP-2 浓度增加而极显著($P < 0.01$)降低;胞外 AKP 活力随 β -伴球蛋白浓度

升高而上升,但差异不显著($P > 0.05$),而随着 GLP-2 浓度增加而降低($P < 0.05$);caspase-3 酶活力随 β -伴球蛋白浓度升高而呈显著或极显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)上升,而随 GLP-2 浓度增加而极显著($P < 0.01$)降低。结果表明:添加 GLP-2 可以减轻或避免 β -伴球蛋白对断奶仔猪肠上皮细胞代谢和完整性的不利影响,抑制细胞凋亡。

表 6 不同浓度 β -伴球蛋白和 GLP-2 对断奶仔猪肠上皮细胞代谢和完整性的影响Table 6 Effects of different β -conglycinin and GLP-2 levels on metabolism and integrity of weaned piglet's IEC

项目 Item	B ₁	B ₂	B ₃	C ₁	C ₂	C ₃	P 值 P-Value		
							β -conglycinin	GLP-2	β -conglycinin ×GLP-2
Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶活力/(U \cdot mg ⁻¹) Na ⁺ -K ⁺ -ATP activity	0.119 $\pm 0.026^{aAB}$	0.203 $\pm 0.049^{bB}$	0.344 $\pm 0.060^{cC}$	0.094 $\pm 0.018^{aA}$	0.102 $\pm 0.005^{aA}$	0.136 $\pm 0.013^{aAB}$	0.000	0.000	0.002
胞外 LDH 活力/(U \cdot L ⁻¹) LDH activity	125.860 $\pm 4.506^{bB}$	81.613 $\pm 1.703^{aA}$	73.746 $\pm 2.950^{aA}$	175.025 $\pm 4.506^{dD}$	158.309 $\pm 9.012^{dC}$	135.693 $\pm 5.900^{cB}$	0.000	0.000	0.003
AKP 活力/(IU \cdot mL ⁻¹) AKP activity	1.917 $\pm 0.043^{bB}$	1.787 $\pm 0.180^{bAB}$	1.438 $\pm 0.065^{aA}$	1.972 $\pm 0.236^{bB}$	1.754 $\pm 0.147^{bAB}$	1.482 $\pm 0.124^{aA}$	0.766	0.000	0.865
半胱氨酸蛋白酶-3 活力/(U \cdot μ L ⁻¹) Caspase-3 activity	6.269 $\pm 152^{aA}$	4.312 $\pm 24^{bB}$	3.384 $\pm 45^{cC}$	7.064 $\pm 139^{dD}$	5.040 $\pm 87^{cE}$	3.381 $\pm 32^{cC}$	0.000	0.000	0.000

3 讨论

3.1 β -伴球蛋白对 28 日龄断奶仔猪肠上皮细胞的影响

β -伴球蛋白造成的免疫损害主要在肠道,它能引起肠细胞增殖和凋亡发生变化。Li 等^[17]、Lalles^[18]等在仔猪、犊牛上的研究表明大豆抗原蛋

白能够引起小肠上皮细胞损伤,降低肠道消化酶的活性,从而引起仔猪、犊牛腹泻;Dreau 等^[19]报道大豆抗原诱发仔猪肠道超敏反应及迟发型变态反应与小肠上皮细胞发生细胞免疫应答而造成小肠细胞结构损伤、功能变化并引起小肠绒毛损伤有关;Lovati 等^[20]发现用 β -伴大豆球蛋白处理人的 Hep G2 细胞 12 h 后,随着 β -伴球蛋白的添加量的升高, Hep

G2 细胞的总蛋白沉积量和单个细胞蛋白沉积量降低。本研究观察到 β -伴球蛋白攻毒引起细胞 MTT OD 值降低,细胞蛋白质沉积量和细胞总蛋白含量降低,这说明活细胞数量减少,而且细胞蛋白质代谢受到抑制;培养液中 AKP、LDH 活力增加,表明细胞受到损伤加强, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶的活力降低,caspase-3 活力升高都表明细胞凋亡增加。这与前人的结果一致,充分说明 β -伴球蛋白抑制了断奶仔猪小肠上皮细胞的增殖,对细胞的代谢强度有不同程度的抑制,并导致细胞结构和功能受损,细胞凋亡增加。因此,在培养液中添加 β -伴球蛋白可以造成细胞损伤。

3.2 GLP-2 对 β -伴球蛋白致敏的 28 日龄断奶仔猪肠上皮细胞的影响

Boushey 等^[21]报道,添加 GLP-2 可以减轻吡喹酮引起的肠道炎症及对肠道的损伤,保护大鼠肠绒毛和隐窝细胞的形态完整;朱俊东等^[22]发现 GLP-2 可以促进放射损伤小鼠的肠上皮增殖,并可促进受损的肠黏膜恢复;赵云等^[23]的研究发现 GLP-2 可降低大鼠烧伤后肠黏膜上皮细胞凋亡,并可促进受损肠黏膜细胞增殖;Boushey 等^[24]用化学药物诱导荷瘤小鼠肠道炎症后添加 GLP-2 可以有效降低化学治疗引起的肠道炎症的发病率和死亡率,降低肠隐窝细胞凋亡率和增加细胞存活率;Cameron 等^[25]则报道,对于用辣根过氧化酶诱发的肠道超敏反应及迟发型变态炎性反应,GLP-2 可以通过强化肠道黏膜屏障作用,抑制肠道对抗原的摄入、减轻对抗原挑战的分泌应答而保护肠道;Burrin 等^[26]给予 TPN 饲喂的早产猪 GLP-2 后发现,GLP-2 是通过减少蛋白质合成代谢中的降解作用和降低细胞凋亡而促进早产仔猪肠道的发育与生长,Burrin 等^[27]更进一步发现 GLP-2 对肠黏膜细胞的成活、增殖具有剂量依赖关系,隐窝细胞数量线性升高,细胞凋亡线性下降,而细胞增殖和蛋白质合成加强则见于高剂量添加组。这些研究结果均表明:GLP-2 对于大鼠、胎猪、新生仔猪等的肠道具有很强的细胞保护及修复功能,但对断奶仔猪则尚不明确。

本试验结果表明,给 β -伴球蛋白致敏的断奶仔猪肠上皮细胞培养液中添加 GLP-2 能够显著改善细胞增殖和蛋白质代谢,GLP-2 的添加浓度为 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时这种效应最佳;添加 GLP-2 还能减轻细胞损伤、抑制细胞凋亡,且作用效果与 GLP-2

浓度间存在剂量依赖关系,当 GLP-2 的添加浓度为 $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,caspase-3 的活力在高、低 β -伴球蛋白组没有显著差异,这提示,GLP-2 抑制细胞凋亡的能力可能有限或与其剂量有关。综合本试验及前人的研究结果推测,GLP-2 对断奶仔猪肠道受到抗原攻击而发生的肠道适应有明显的作用效果,但这个推测与 Petersen 和 Nielsen 等^[28-29]的研究结果存在一定差异,他们认为 GLP-2 不能显著改善仔猪断奶后肠黏膜的营养状况,改进仔猪肠道消化和吸收的能力也有限。由于本试验的结果来自于细胞模型,其结果受动物的整体性、系统性影响相对较小,因此本试验结果尚需动物原位试验验证。

3.3 GLP-2 对致敏的断奶仔猪肠上皮细胞可能的作用机理

细胞应激反应或凋亡信号能引起细胞膜的超极化或去极化,造成线粒体肿胀,ROS 产生,ATP 缺乏, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶抑制,细胞色素 C 释放,细胞色素 C 能与 Apaf-1、caspase-9 前体、ATP/dATP 形成凋亡体,然后激活 caspase-3,进而引发半胱氨酸蛋白酶级联反应,导致细胞凋亡。Petersen 等^[5, 28]和 Walsh 等^[30]的研究发现,GLP-2 抑制肠黏膜细胞凋亡也可能是通过多种信号转导途径介导的,包括抑制 caspase-8 和 caspase-9 的活性、减少细胞色素 C 的释放以及抑制 caspase-3 的裂解等。Burrin 等^[31]的研究表明,给全胃肠外营养饲喂的新生仔猪注射 GLP-2 能在 1 h 内迅速抑制 caspase-3 的活性并正向调节 Bcl-2 的丰度,同时在 4~8 h 内增加细胞凋亡抑制器活力。赵云等^[23]发现 GLP-2 可降低大鼠烧伤后肠上皮细胞凋亡,其机制可能与降低 caspase-3 酶活性,增加 Bcl-2 mRNA 表达,并促进受损肠黏膜细胞的增殖有关。

本试验结果表明,添加不同浓度的 β -伴球蛋白, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 活性显著降低,caspase-3 酶活性极显著上升,显微镜下不规则细胞明显增多,细胞边缘模糊,凋亡细胞增加;而伴随 GLP-2 添加剂量的上升, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活显著升高,caspase-3 酶活性极显著下降,细胞生长状态改善,细胞增殖加强,活细胞数量增多,局部可呈现肠上皮细胞典型的铺路石样特征,这与 Walsh 等、Burrin 等^[30-31]和赵云等^[23]的报道一致,表明 GLP-2 促进受损肠道黏膜上皮细胞形态恢复和功能正常可能是通过细胞色素 C 诱导的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 caspase-3 途径实现的。

4 结 论

β -伴球蛋白对体外原代培养的断奶仔猪小肠上皮细胞增殖和细胞完整性有不利影响;添加 GLP-2 能够剂量依赖性地减轻或避免 β -伴球蛋白对断奶仔猪小肠上皮细胞的不利影响,表明 GLP-2 具有细胞保护和修复功能;添加 GLP-2 后增强肠上皮细胞的增殖和细胞代谢强度,抑制细胞凋亡可能是通过增强 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活,抑制细胞 caspase-3 的活力来实现的。

参考文献:

- [1] DRUCKER D J, EHRLICH P, ASA S L, et al. Induction of intestinal epithelial proliferation by glucagon-like peptide 2 [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(15): 7911-7916.
- [2] BENJAMIN M A, MCKAY D M, YANG P C, et al. Glucagon-like peptide-2 enhances intestinal epithelial barrier function of both transcellular and paracellular pathways in the mouse [J]. *Gut*, 2000, 47 (1): 112-119.
- [3] MARTIN G R, WALLACE L E, SIGALET D L. Glucagon-like peptide-2 induces intestinal adaptation in parenterally fed rats with short bowel syndrome [J]. *Am J Physiol, Gastrointest Liver Physiol*, 2004, 286 (6): 964-972.
- [4] BURRIN D G, PETERSEN Y, STOLL B, et al. Glucagon-like peptide 2: a nutrient-responsive gut growth factor [J]. *Journal of Nutrition*, 2001, 131 (3): 709-712.
- [5] PETERSEN Y M, HARTMANN B, HOLST J J, et al. Introduction of enteral food increases plasma GLP-2 and decreases GLP-2 receptor mRNA abundance during pig development [J]. *Journal of Nutrition*, 2003, 133(6): 1781-1786.
- [6] STEPHENS J, STOLL B, COTTRELL J, et al. Glucagon-like peptide-2 acutely increases proximal small intestinal blood flow in TPN-fed neonatal piglets [J]. *Am J Regulatory Integrative Comp Physiol*, 2006, 290(2): 283-289.
- [7] 蒋荣川,贾 刚,王康宁. 胰高血糖素样肽-2 对体外培养的断奶仔猪小肠黏膜上皮细胞形态、增殖及其酶活力的影响[J]. *动物营养学报*, 2008, 20(6): 699-705.
- [8] BURKS AW JR, BROOKS J R, SAMPSON H A. Allergenicity of major component protein of soybean determined by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) and immunoblotting in children with atopic dermatitis and positive soy challenges [J]. *Journal Allergy Clin. Immunol*, 1988, 81(6): 1135-1142.
- [9] EVANS G S, FLINT N, SOMERS A S, et al. The development of a method for the preparation of rat intestinal cell primary cultures [J]. *J Cell Science*, 1992, 101(Pt1): 219-231.
- [10] 姜 俊. 谷氨酰胺对鲤鱼肠上皮细胞增殖和分化的影响[D]. 雅安:四川农业大学, 2005.
- [11] 郭林英. 大豆 β -伴球蛋白提取物对鲤鱼肠上皮细胞增殖及其功能的影响[D]. 雅安:四川农业大学, 2006.
- [12] THANH V H, SHIBASAKI K. Heterogeneity of beta-conglycinin [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 439 (2): 326-338.
- [13] 赵梅兰,曹晓哲,王德文,等. 电磁脉冲辐照对培养大鼠小脑神经细胞内 LDH 和培养上清中 LDH、CHE、 K^+ 和 Na^+ 浓度的影响[J]. *军事医学科学院院刊*, 2003, 23(6): 413-418.
- [14] HE Y, CHU S H, WALKER W A. Nucleotide supplements alter proliferation and differentiation of cultured human (Caco-2) and rat (IEC-6) intestinal epithelial cells [J]. *Journal of Nutrition*, 1993, 123 (6): 1017-1027.
- [15] 徐瑞成,张 敏. $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶抑制引起的细胞凋亡和杂合性细胞死亡[J]. *细胞生物学杂志*, 2004, 26 (5): 467-470.
- [16] VOSS O H, BATRA S, KOLATTUKUDY S J, et al. Binding of caspase-3 prodomain to heat shock protein 27 regulates monocyte apoptosis by inhibiting caspase-3 proteolytic activation [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(34): 25088-25099.
- [17] LI D F, NELSEN J L, REDDY P G, et al. Interrelationship between hypersensitivity to soybean proteins and growth performance in early-weaned pigs [J]. *J Anim Sci*, 1991, 69(10): 4062-4069.
- [18] LALLES J P, TOULLEC R, BOUCHEZ P, et al. Antigenicity and digestive utilization of four soya products by the preruminant calf [J]. *Livestock Production Science*, 1995, 41(1) : 29-38.
- [19] DREAU D, LALLES J P, PHILOUZE-ROME V, et al. Local and systemic immune responses to soybean protein ingestion in early-weaned pigs [J]. *J Anim Sci*, 1994, 72(8): 2090-2098.
- [20] LOVATI M R, MANZONI C, CORSINI A, et al. 7s globulin from soybean is metabolized in human cell cultures by a specific uptake and degradation system

- [J]. *Journal of Nutrition*, 1996, 126(11): 2831-2842.
- [21] BOUSHEY R P, YUSTA B, DRUCKER D J. Glucagon-like peptide 2 decreases mortality and reduces the severity of indomethacin-induced murine enteritis [J]. *The American Physiological Society, Am J Physiol*, 1999, 277(5pt 1): E937-947.
- [22] 朱俊东, 栗永萍, 谭春华. GLP-2 和 EGF 对放射损伤后小鼠小肠上皮消化吸收和屏障功能恢复的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2002, 18(5): 594-595.
- [23] 赵 云, 王凤君, 王 裴, 等. 胰高血糖素样肽-2 对烧伤大鼠肠黏膜细胞增殖的影响 [J]. *中华烧伤杂志*, 2003, 19(4): 209-212.
- [24] BOUSHEY R P, YUSTA B, DRUCKER D J. Glucagon-like peptide (GLP)-2 reduces chemotherapy associated mortality and enhances cell survival in cells expressing a transfected GLP-2 receptor [J]. *Cancer Research*, 2001, 61(2): 687-693.
- [25] CAMERON H L, YANG P C, PERDUE M H. Glucagon-like peptide-2-enhanced barrier function reduces pathophysiology in a model of food allergy [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 284(6): G905-912.
- [26] BURRIN D G, STOLL B, JIANG R, et al. GLP-2 stimulates intestinal growth in premature TPN-fed pigs by suppressing proteolysis and apoptosis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 279(6): G1249-1256.
- [27] BURRIN D G, STOLL B, GUAN X F, et al. Glucagon-like peptide 2 dose-dependently activates intestinal cell survival and proliferation in neonatal piglets [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(1): 22-32.
- [28] PETERSEN Y M, ELNIF J, SCHMIDT M, et al. Glucagon-like peptide 2 enhances maltase- glucoamylase and sucrase-isomaltase gene expression and activity in parenterally fed premature neonatal piglets [J]. *Pediatric Research*, 2002, 52(4): 498-503.
- [29] NIELSEN T T, SANGILD P T, ELNIF J, et al. Effects of GLP-2 treatment and antibiotics on gut structure and function during pig weaning diarrhea [C]// *Proceedings of the 9th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs*, 2003: 161-163.
- [30] WALSH N A, YUSTA B, DaCAMBRA M P, et al. Glucagon-like peptide-2 receptor activation in the rat intestinal mucosa [J]. *Endocrinology*, 2003, 144(10): 4385-4392.
- [31] BURRIN D G, STOLL B, GUAN X F, et al. GLP-2 rapidly activates divergent intracellular signaling pathways involved in intestinal cell survival and proliferation in neonatal piglets [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 292(1): E281-E291.