

缺血缺氧损伤对肠上皮细胞整合素极性及其细胞凋亡的影响

陈前, 秦环龙

陈前, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院外科 上海市 200233
陈前, 男, 1973-06-21, 上海市人, 汉族, 2004 年硕士研究生毕业, 主治医师, 主要从事胃肠外科疾病研究。
国家自然科学基金资助项目, No. 30271286
上海市科委青年科技启明星跟踪计划资助项目, No. 02QMB1406
项目负责人: 秦环龙, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院外科。
chenqian2010@sohu.com
电话: 021-64942226 传真: 021-64368920
收稿日期: 2004-08-25 接受日期: 2004-12-09

Influence of ischemia and anoxia on distribution and polarity of integrin in intestine epithelial cells

Qian Chen, Huan-Long Qin

Qian Chen, Huan-Long Qin, Department of Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai JiaoTong University, Shanghai, 200233 China Supported by National Science Foundation of China, No. 30271286; and the Fund from the Guiding Star Program of Youth Science and Technology of Shanghai Science committee, No. 02QMB1406
Correspondence to: Huan-Long Qin, Department of Surgery, Shanghai Sixth People's Hospital, Shanghai Jiaotong University, 200233 Shanghai, China. chenqian2010@sohu.com
Received: 2004-08-25 Accepted: 2004-12-09

Abstract

AIM: To study the influence of ischemia and anoxia injury on the distribution and polarity of integrin in intestine epithelial cells (IEC).

METHODS: IEC ischemia and anoxia injury model was established. The cells were divided into four groups, namely, group A (control group), group B (anoxia group), group C (ischemia group), and group D (ischemia and anoxia group). Cell apoptosis and the polarity and distribution of integrins $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ were determined by flow cytometry (FCM) and laser scanning confocal microscope (LSCM), respectively.

RESULTS: Integrins $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 5$ were expressed exclusively on the basal and lateral surfaces of IECs in group A. After ischemia and anoxia injury, integrins $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 5$ distribution moved from the basolateral to the apical membrane. Cell apoptosis was increased in group B, C and D. Integrin $\alpha 3$ was not observed in the middle and apical membrane in group C. Integrin $\beta 2$ distribution was not markedly changed in any group.

CONCLUSION: The change in the distribution of integrin is

induced by ischemia and anoxia, which is correlated with IEC apoptosis. IEC apoptosis is more sensitive to the anoxia.

Key Words: Ischemia; Anoxia; Integrin; Polarity; Apoptosis; epithelial cells

Chen Q, Qin HL. Influence of ischemia and anoxia on distribution and polarity of integrin in intestine epithelial cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(4):456-459

摘要

目的: 研究缺血缺氧损伤对肠上皮细胞(IEC)整合素极性及其分布的改变的凋亡机制。

方法: 建立缺血缺氧与 IEC 凋亡的实验模型, 实验分组: 对照组(A组), 缺氧组(B组), 缺血组(C组), 缺血缺氧组(D组); 采用流式细胞仪(FCM)检测 IEC 凋亡率, 激光共聚焦显微镜(LSCM)检测 IEC 自基底侧至顶侧 5 个平面的整合素 $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$ 染色荧光强度并定量。

结果: A 组细胞整合素 $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 5$ 荧光标记主要分布于细胞基底侧, 损伤后 B、C、D 组呈上移趋势, 其分布和极性与细胞凋亡率相一致; 整合素 $\alpha 3$ 在 C 组的中间和顶层没有阳性表达。 $\beta 2$ 分布较弥散, 无明显变化规律。

结论: 缺血缺氧损伤对 IEC 整合素分布改变呈规律性变化, 与 IEC 凋亡密切相关; 对缺氧反应更敏感。

关键词: 缺血; 缺氧; 整合素; 极性; 凋亡; 上皮细胞

陈前, 秦环龙. 缺血缺氧损伤对肠上皮细胞整合素极性及其细胞凋亡的影响. *世界华人消化杂志* 2005;13(4):456-459
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/456.asp>

0 引言

肠上皮细胞是锚着依赖性细胞, 他的存活依靠整合素黏附固定于基质蛋白, 需要整合素与其配体的结合^[1]. 如果整合素发生改变, IEC 将从其黏附的基质处脱落凋亡, 肠道结构的完整性将遭到破坏. 目前有关 IEC 从基底膜上脱落的机制尚不完全清楚, IEC 损伤时整合素受体分布、极性及含量是否改变, 知之甚少. 我们通过 IEC 体外原代培养, 观察在缺血缺氧条件下 IEC 整合素受体的改变, 以探求肠上皮脱落凋亡的机制.

1 材料和方法

1.1 材料 孕 14-18 d 的 SD 大鼠 20 只, 由上海实验

动物中心提供, 清洁级, 质量 300-390 g. DMEM 培养液, 胰蛋白酶(美国 GIBCO 公司); 胎牛血清 FCS (Hyclone 公司); EGF (SIGMA 公司); 胶原酶 XI 型 (GIBCO 公司); dispase 酶 (德国, 宝灵曼公司); 抗体: 羊抗大鼠 integrin ($\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 2$, $\beta 5$) mAb 一抗 (DIACLONE 公司); FITC 标记的兔抗羊的 Ig 二抗 (CALTAG 公司); 凋亡试剂: Aanxin-V/PI 试剂盒 (Sigma 公司); 人工基底膜: matrigel 人工基底膜液 (2 mL, 晶美生物有限公司); 消化酶 A 液: 1.25 g/L 胰蛋白酶、300 mg/L 胶原酶 XI 型、600 mg/L dispase 酶即配即用. 缓冲液 B 液: 50 mL/L 胎牛血清、20 g/L 山梨醇, 调 pH 值至 7.4, 分装, 4°C 保存. 培养液 C 液: 100 mL/L FCS、20 μ g/L EGF、1 mmol/L GLN、2.5 mg/L 胰岛素、1 mmol/L 丙酮酸钠、100 mg/L 肝素、100 mg/L 青霉素、50 mg/L 链霉素、甲状腺素、地塞米松加入各药品, 调 pH 值至 7.2, 分装, 4°C 保存.

1.2 方法

1.2.1 胎鼠 IEC 的分离培养 SD 孕鼠, 剖宫取胎鼠及小肠, 纵行剪开肠管, 剪成 1 mm 小块, 加入酶液 A 50 mL, 室温下消化 20 min; 吸取上层液离心, 最后将沉淀悬浮于培养液 C 中, 种植在已涂膜的培养瓶中, 在 37°C, 50 mL/L CO₂ 孵箱内培养; 2 d 后首次换液, 弃去含有非贴壁细胞的上清液, 贴壁细胞用 PBS 彻底冲洗. 每 3 d 换以新鲜培养液. 将细胞接种在布膜的玻璃细胞培养瓶中, 待其贴壁后再进行实验; 弃去培养液后, 用 Hanks 液洗细胞 3 次, 用 -20°C 的冷丙酮固定; 放入酶反应基质液, 孵育 30 min; 加入碱性磷酸酶 (AKP) 试剂, 孵育 45 min; 弃去 AKP 和酶反应基质液, 三蒸水洗 3 次; 苏木精孵育 30 min 后弃去, 三蒸水洗 3 次; 甘油透片后, 倒置光显微镜观察, 红色反应表示阳性.

1.2.2 人工基底膜的建立 取培养瓶, 于实验前滴加 matrigel 人工基底膜液 100 μ L 后, 置于培养箱中, 培养皿晾干后备用. (1) 模拟缺氧: 标本放入特制的密封仓系统 (三菱瓦司化学株式会社), 配有与其体积相应量的厌氧气体产生剂及指示剂, 封闭密封仓, 厌氧气体产生剂在 20 min 内即可置换密封仓内氧气并释放出相同体积的二氧化碳; 厌氧气体指示剂颜色由粉红变成白色即证实缺氧达到要求 (O₂ 浓度 < 1 mL/L); (2) 模拟缺血: 把正常的培养液换成同体积的无糖含钙的缓冲液 PBS 液 (配方: 117 mmol/L 氯化钠、5.3 mmol/L 氯化钾、1.8 mmol/L 氯化钙、0.8 mmol/L 硫酸镁、26 mmol/L 碳酸氢钠、1 mmol/L 磷酸二氢钠、0.1 mmol/L 酚红), 置于培养箱中; (3) 模拟缺血缺氧: 同时达到 (1) 和 (2) 的要求.

1.2.3 实验分组及检测指标 所有实验组在 IEC 培养 7 d

采样, 分组: A 组, 对照组; B 组, 缺氧组; C 组, 缺血组; D 组, 缺氧缺血组. 上述实验分组在各种病理环境作用 2 h 后, 进行下列指标的检测. (1) 细胞凋亡的检测: 胰酶消化成单个细胞, 悬在 Aanxin V 200 μ L 中及 PI 200 μ L 避光冰孵育; 荧光显微镜下观察后, FCM (Beckman 公司) 检测, 488 nm 激发, 515 nm 测定. (2) 整合素分布的改变: 细胞爬片致 40%, 各组按实验设计要求作用 2 h; 加 40 g/L 的多聚甲醛, 常温下固定 30 min; 弃去多聚甲醛, 以 PBS 冲洗 3 次; 0.5 mL 的 1:100 的山羊抗大鼠的整合素 mAb 一抗 37°C 孵育 1 h; 以 FITC 标记的羊抗兔二抗 (1:100) 0.5 mL 常温避光孵育 1 h; PBS 冲洗 3 次, 甘油封片后, 于激光共聚焦显微镜 (伯乐 Radiance 2 100, 中科院细胞所提供) 下观察; 逐格上移聚焦层面, 测量细胞由基底侧至顶侧染色荧光强度的变化, 随机选取 10 个视野进行分析.

统计学处理 利用 SPSS 10.0 for Windows 版统计软件进行统计分析, 各组数据采用均数 \pm 标准差 (mean \pm SD) 表示, 对各组数据进行 χ^2 检验、*t* 检验. *P* < 0.05 认为有统计学意义.

2 结果

2.1 IEC 凋亡情况 正常细胞自然凋亡率为 35.0 \pm 7.2%, 但经缺血缺氧处理后 IEC 凋亡明显增加, 其中最明显的是 D 组 (78.5 \pm 10.7%), 比 A 组高出 43.0% (*P* < 0.01), B 组 (67.0 \pm 13.1%)、C 组 (46.8 \pm 6.3%) 均比 A 组为高 (*P* < 0.01, *P* < 0.05); D、B 组和 C 组相比也有明显的差异 (*P* < 0.01).

2.2 整合素分布的影响 各组 IEC 整合素 $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 5$ 荧光标记阳性, 且位于细胞膜; A 组荧光分布呈明显的极性, 基底层和近基底层的侧层分布强, 顶层和近顶层的侧层分布弱; B、C、D 组整合素的分布有向顶侧弥漫的倾向, 基底层减少, 顶层有增加趋势. B、C、D 第 1 层的整合素分布均显著低于 A 组 (*P* < 0.01), B、D 的第 4、5 层的整合素分布均显著高于 A 组 (*P* < 0.05) (列出整合素分布趋势曲线图 1 及典型图 2). 各组 IEC 整合素 $\beta 2$ 荧光标记较弱, 在细胞膜上的分布较弥散, 极性分布不明显, 无明显规律性改变 (表 1).

表 1 整合素亚型在各层变化

分组	底层(1)	中间(2-4)	顶层(5)
B	$\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 5$	$\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 5$	$\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 5$
C	$\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 5$	无	$\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 5$
D	$\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 5$	$\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 5$	$\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 5$

与自身组比较, *P* < 0.01 或 *P* < 0.05.

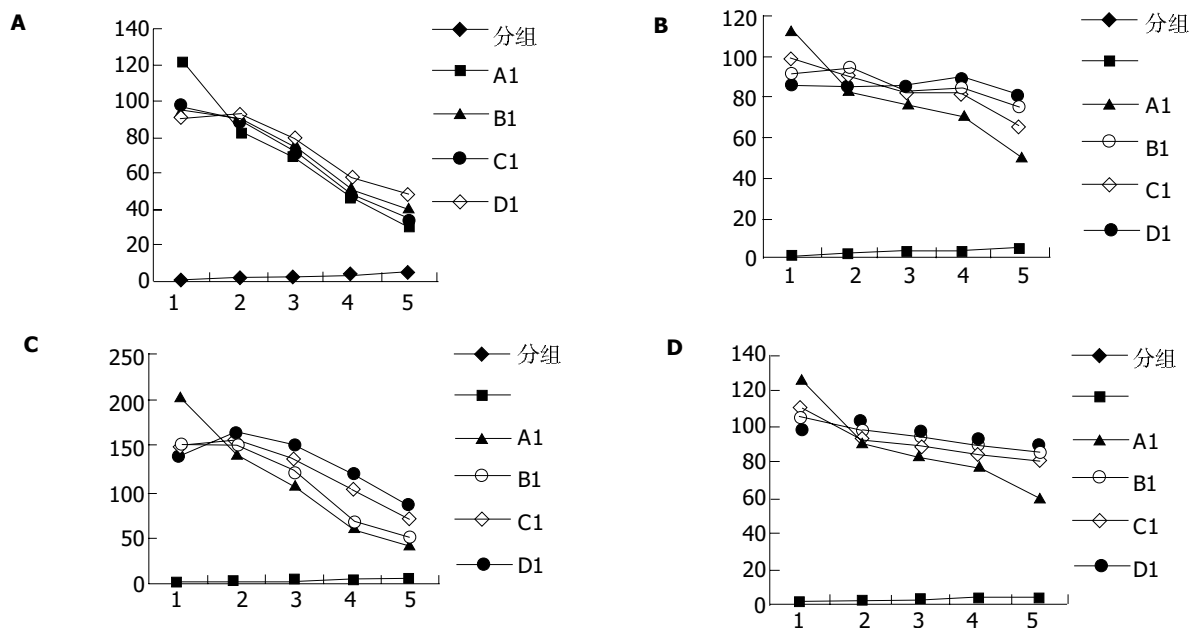


图1 整合素分布趋势曲线. A: 整合素 $\alpha 3$; B: 整合素 $\alpha 5$; C: 整合素 $\beta 1$; D: 整合素 $\beta 5$. (以细胞底端平面为基准, 以检测平面与细胞底端的相对距离为横坐标, 相应检测平面的荧光强度为纵坐标, 绘制整合素在 IEC 表面不同层面的分布曲线显示, 正常 IEC 整合素主要分布于细胞基底部, 损伤后出现向细胞侧面及顶侧分布的趋势.)

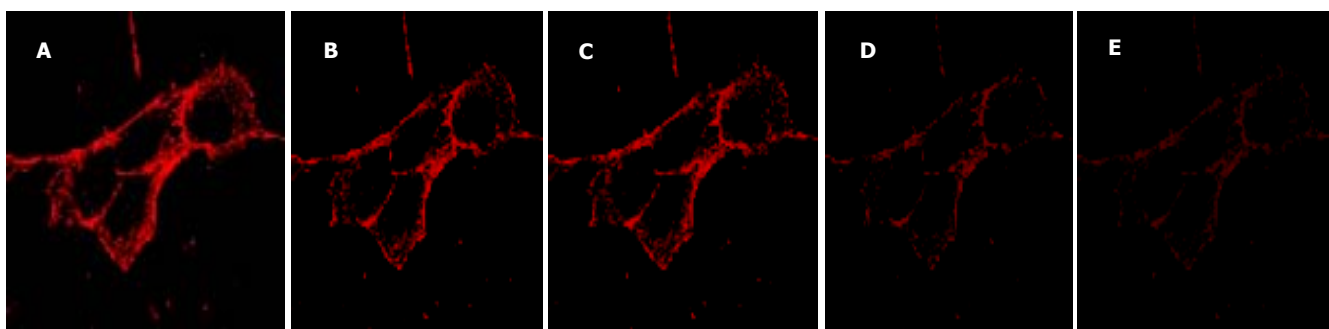


图2 A组整合素 $\beta 1$ LSCM 扫描照片(A-E 分别为底层到顶层)荧光强度逐渐由强变弱.

3 讨论

整合素是由 α 和 β 亚单位组成的异二聚体跨膜糖蛋白, 整合素因其 α 和 β 亚单位的不同组合而出现不同的亚型, α 亚基质量在 120-180 ku 之间, β 亚基质量 90-110 ku 之间. 整合素主要功能是通过与相应的配体结合介导细胞与基质的黏附、信号传导、个体发育、分化、凋亡等病理生理过程. 同大多数体细胞一样, 在 IEC 表面也分布着多种整合素受体. 与 IEC 表面有关的整合素有 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 、 $\alpha 5$ 、 $\beta 1$ 、 $\beta 4$ 、 $\beta 5$ ^[2]. 不同整合素在 IEC 的分布亦有不同, 如 $\alpha 2\beta 1$ 分布于隐窝处, $\alpha 3\beta 1$ 分布于绒毛底部, $\alpha 5\beta 1$ 位于隐窝及绒毛的底部, $\alpha 7\beta 1$ 则局限隐窝顶部及绒毛底部, 而 $\alpha 6\beta 4$ 则均一地分布于整个 IEC 表面^[3-4]. 近年来随着研究的深入, 人们发现整合素还与 IEC 的凋亡密切相关^[5], 整合素可能是 IEC 黏附于基底膜以维持细胞生存的主要方式, 而且已引起了学者们的关注. 有研究发现 IEC 经整合素 $\alpha 4$ 封闭后, 其分化、增生、Bcl-2、

Bcl-X、Bax、Bak 家族基因表达均明显受抑制^[6]. 如犬经 iv 整合素 α , β 单抗 1.0 mg/kg 持续 2 wk, 可诱导出现消化道出血^[2]. 还有学者发现, 整合素调控着肠上皮的凋亡, $\alpha 5\beta 1$ 似有抗凋亡作用^[7]. 最近 Levy *et al*^[8] 的一项研究发现丁酸 (NaBT) 可以使 Caco-2 细胞表面整合素 $\beta 1$ 的表达下降, 导致细胞从基底膜脱落并发生凋亡.

有关整合素在细胞膜上的表达检测, 国内外较为常用的办法是采用免疫组化、免疫荧光等技术, 此二者不能较为精确地反应表达量, 更无法检测极性分布改变、空间结构变化. 近年来已有采用激光共聚焦显微镜 (LSCM) 研究整合素的报道. Gailit *et al*^[9] 利用 LSCM 观察体外培养的肾小管上皮细胞整合素 $\alpha 3$ 呈极性分布, 基底层和近基底层的侧层分布强, 顶层和近顶层的侧层分布弱; 在接受亚致死剂量的氧损伤后, 细胞整合素 $\alpha 3$ 的极性分布丧失, 由基底层和近基底层向顶层和近顶层的侧层弥散; 并且导致黏附于

基质的细胞数量减少. Wu *et al*^[6]在体研究发现, 肾小管上皮细胞正常情况下整合素 $\beta 1$ 呈极性分布, 缺血再灌注损伤后, 也向顶侧弥散; Beck *et al*^[2]发现, 在体的缺血再灌注损伤模型未发现整合素 $\alpha 3$ 的顶层的侧层分布. 以上实验结果提示, 缺氧、氧损伤后整合素的极性分布丧失, 是导致上皮细胞黏附性改变的基础; 同时, 也说明了 LSCM 能够很好地观察整合素的三维结构改变.

我们研究发现, IEC 在实验因素刺激下整合素 $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 5$ 发生了极性和分布的改变, 并与细胞凋亡、脱落密切相关. 其具体表现在, A 组 $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 5$ 整合素在细胞膜上呈极性分布, 主要位于近基底膜侧; 缺血缺氧后 B, C, D 组有向顶侧弥散的趋势, 各层面的定量均存在差异, 尤以第 1 层和第 5 层改变最为明显 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 整合素极性分布的明显改变趋势由大到小依次是缺血缺氧组、缺氧组、缺血组, 且此三组之间也有差异 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); 无论缺血缺氧还是单纯缺血或缺氧损伤与 A 组相比较, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 5$ 在底层表达均明显下降, 中间层和顶层均增加表达, 说明有整体从基底向顶层移动的现象. 缺血组 $\alpha 3$ 在中间层及顶层没有出现阳性表达, 说明其对缺血损伤可能不敏感. 缺氧组、缺血缺氧组顶层各整合素亚型都发生变化, 并都参与了细胞损伤作用, 说明 IEC 对缺氧尤为敏感. $\beta 2$ 整合素在细胞膜上的分布较均匀, 缺血缺氧后改变不明显; 这可能与整合素 $\beta 2$ 功能有关, 或其本身没有直接参

与细胞脱落、凋亡, 只是其他某些亚型在 IEC 凋亡中起着重要调节作用.

4 参考文献

- 1 Stupack DG, Cheresch DA. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci* 2002;115:3729-3738
- 2 Beck R, Nebe B, Guthoff R, Rychly J. Inhibition of lens epithelial cell adhesion by the calcium antagonist Mibefradil correlates with impair integrin distribution and organization of the cytoskeleton. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001;239:452-458
- 3 Goncalves I, Hughan SC, Schoenwaelder SM, Yap CL, Yuan Y, Kachson SP. Integrin alpha IIb beta 3-dependent calcium signals regulate platelet-fibrinogen interactions under flow: Involvement of phospholipase C gamma2. *J Biol Chem* 2003;278:34812-34822
- 4 Nebe B, Holzhausen C, Rychly J, Urbaszek W. Impaired mechanisms of leukocyte adhesion in vitro by the calcium channel antagonist mibefradil. *Cardiovasc Drugs Ther* 2002;16:183-193
- 5 Nebe B, Kunz F, Peters A, Rychly J, Noack T, Beck R. Induction of apoptosis by the calcium antagonist mibefradil correlates with depolarization of the membrane potential and decreased integrin expression in human lens epithelial cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2004;242:597-604
- 6 Wu X, Davis GE, Meininger GA, Wilson E, Davis MJ. Regulation of the L-type calcium channel by alpha 5b1 integrin requires signaling between focal adhesion proteins. *J Biol Chem* 2001;276:30285-30292
- 7 Matlin KS, Haus B, Zuk A. Integrins in epithelial cell polarity: using antibody to analyze adhesive function and morphogenesis. *Methods* 2003;30:235-245
- 8 Levy P, Robin H, Bertrand F, Kornprobst M, Capeau J. Butyrate-treated colonic Caco-2 cells exhibit defect integrin-mediated signaling together with increased apoptosis and differentiation. *J Cell Physiol* 2003;197:336-347
- 9 Gailit J, Clarke C, Newman D, Tonnesen MG, Mosesson MW, Clark RA. Human fibroblasts bind directly to fibrinogen at RGD sites through integrin alpha(v)beta3. *Exp Cell Res* 1997;232:118-126

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

《世界胃肠病学杂志(英文版)》第二次荣获 我国期刊界的最高政府奖项—国家期刊奖百种重点期刊

本刊讯 由中华人民共和国新闻出版总署举办的第三届国家期刊奖评选结果已经揭晓, 由世界胃肠病学杂志社出版的《世界胃肠病学杂志(英文版)》荣获第二届国家期刊奖百种重点期刊之后, 第二次获得此项殊荣.

第三届国家期刊奖颁奖大会于 2005-02-28 在北京举行. 中共中央宣传部、国家新闻出版总署和国家科技部有关方面负责同志出席了颁奖大会. 新闻出版总署署长暨第三届国家期刊奖评委会主任石宗源同志在颁奖大会上做了“坚持正确导向, 促进期刊繁荣”的重要讲话. 国家期刊奖是经中共中央宣传部批准, 由国家新闻出版总署于 1999 年开始主办的我国期刊界的最高政府奖项, 每两年评选一次, 至今已举办了三届.

第三届国家期刊奖评选活动于 2004-08 开始. 所有参评期刊经过评选工作办公室的参评资格、学术质量、出版规范、编校质量和广告内容审查后, 由专家组和评选工作委员会进行了认真、严格的评选, 于 2004-12-21 产生初评入围期刊名单, 并在《中国新闻出版报》等新闻媒体上进行了为期一个月的公示, 接受全社会的监督, 最终从推荐参评的 976 种期刊中评出获本届国家期刊奖百种重点期刊科技类期刊 100 种.

获第三届国家期刊奖百种重点期刊的期刊是我国 9000 余种期刊的优秀代表, 反映了我国期刊业近年来坚持正确舆论导向、促进期刊事业繁荣发展所取得的最新成果. (世界胃肠病学杂志社 2005-03-10)