

肝细胞生长因子对重症急性胰腺炎小鼠肠黏膜屏障保护作用

孙善林 张宗兵 孔令尚 刘牧林 汪华学 何先弟 姜从桥 刘瑞林

【摘要】 目的 探讨肝细胞生长因子(HGF)对重症急性胰腺炎(SAP)小鼠肠黏膜屏障功能障碍修复作用及机制,以及肠道干细胞在黏膜损伤修复中的作用。**方法** 健康雄性昆明小鼠 60 只,按数字表法随机分成正常对照(NC)组 10 只、SAP 组 25 只和 HGF 组 25 只。酶耦联紫外分光光度法检测血清 D-乳酸水平,肠系膜淋巴结、胰腺、肝脏、脾脏及肺组织细菌培养,流式细胞仪检测肠上皮细胞增殖指数,免疫组化染色法检测小肠隐窝干细胞变化。**结果** SAP 组血清 D-乳酸值为(11.17 ± 1.90) mg/L,较 NC 组(4.87 ± 0.73) mg/L 和 HGF 组(7.30 ± 0.88) mg/L 高,差异均有统计学意义($F=78.20$, P 值均 <0.01)。胰腺、肠系膜淋巴结、肝脏、脾脏、肺脏细菌培养器官移位率 SAP 组(50%, 40/80)高与 NC 组(14%, 7/50)和 HGF 组(29%, 29/100)($\chi^2=7.427$, $\chi^2=4.112$, P 值均 <0.01)。肠黏膜上皮细胞增殖指数 SAP 组较 NC 组和 HGF 组明显下降($F=42.71$, P 值均 <0.05), HGF 组与 NC 组比较则明显升高($P<0.01$)。SAP 组小肠隐窝干细胞数(1.26 ± 0.87)个,低于 NC 组(2.16 ± 0.90)个和 HGF 组(2.50 ± 0.96)个,差异均有统计学意义($F=8.34$, P 值均 <0.01)。**结论** HGF 可促进肠黏膜上皮细胞的增殖,降低肠道通透性及肠道细菌移位率,减轻急性胰腺炎小鼠肠黏膜的损伤。

【关键词】 急性胰腺炎; 肠屏障; 肝细胞生长因子; 干细胞

Protective effect of hepatocyte growth factor on intestinal mucosal barrier following acute pancreatitis in mice Sun Shanlin*, Zhang Zongbing, Kong Lingshang, Liu Mulin, Wang Huaxue, He Xiandi, Jiang Chongqiao, Liu Ruilin. * Master of Gastrointestinal Surgery, Bengbu Medical College, Bengbu 233030, China Corresponding author: Liu Mulin, Department of Gastrointestinal Surgery, the First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233004, China, Email: liumulin66@aliyun.com

【Abstract】 Objective To investigate the repair mechanism of hepatocyte growth factor (HGF) on intestinal mucosal barrier dysfunction of the severe acute pancreatitis (SAP) mice, and to evaluate the effect of intestinal stem cell on the repair mechanism of intestinal mucosal barrier dysfunction. **Methods** All healthy male Kunming mice were divided into normal control ($n=10$), SAP ($n=25$) and HGF group ($n=25$) by random location. Serum D-lactate was detected by automatic biochemistry analyzer and ultraviolet spectrophotometry. The tissues of mesenteric lymph nodes, pancreas, liver, spleen and lung were cultured to determined bacterial translocation. Intestinal mucosal epithelial cells proliferation index (PI) was analyzed by flow cytometry (FCM). The changes of intestinal stem cells in the crypt were observed by immunohistochemistry. **Results** Compared to NC group (4.87 ± 0.73) mg/L and HGF group (7.30 ± 0.88) mg/L, serum D-lactate was significantly increased in SAP group (11.17 ± 1.90) mg/L ($F=78.20$, all P values <0.01). In comparison with NC group (14%, 7/50), organ bacterial translocation in tissues of mesenteric lymph nodes, pancreas, liver, spleen and lung were significantly increased in SAP group (50%, 40/80, $\chi^2=7.427$, $P<0.01$), but lower in HGF group (29%, 29/100) than those in SAP group (50%, 40/80, $\chi^2=4.112$, $P<0.01$). Compared to NC group, PI was significantly decreased in SAP group ($P<0.01$), but was higher in HGF group than those in SAP group, and was higher in HGF group than those in NC group. Compared to NC group (2.16 ± 0.90), intestinal stem cell was significantly decreased in SAP (1.26 ± 0.87), and was higher in HGF group (2.50 ± 0.96) than those in SAP ($F=8.34$, all P values <0.05). **Conclusions** HGF can not only significantly reduce the injury of intestinal mucosa in mice with acute pancreatitis but can also promote the proliferation of intestinal mucosal epithelial cells. Intestinal mucosal permeability of SAP mice and organ bacterial translocation are degraded significantly after using HGF.

【Key words】 Acute pancreatitis; Intestinal barrier; Hepatocyte growth factor; Stem cell

DOI:10.3760/cma.j.issn.2095-7041.2014.05.017

基金项目:安徽省卫生厅科研资助项目(2008B009)

作者单位:233030 安徽省,蚌埠医学院胃肠外科硕士研究生孙善林(现在阜阳市人民医院普外科);蚌埠医学院第一附属医院胃肠外科(张宗兵、孔令尚、刘牧林、姜从桥、刘瑞林),重症医学科(汪华学、何先弟)

通信作者:刘牧林, Email:liumulin66@aliyun.com

肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF) 是一种多功能的细胞因子, 其参与黏膜修复过程中的上皮重建和上皮细胞分裂增殖, 影响胃、肠上皮细胞迁移和增殖^[1-4]。重症急性胰腺炎 (severe acute pancreatitis, SAP) 早期就伴有肠黏膜屏障功能的显著改变, 因此, 研究肠黏膜屏障变化具有重要意义^[5]。既往研究报道, 在 SAP 患者中检测到血清 HGF 水平增高, 其在 SAP 发病中的作用受到关注^[6]。本实验旨在探讨 HGF 对急性胰腺炎小鼠肠黏膜屏障功能障碍的修复作用及机制, 以及肠道干细胞在黏膜损伤修复中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康雄性昆明小鼠 60 只 (购于安徽医科大学实验动物中心), 鼠龄 8 周, 体质量 (22 ± 2) g, 实验前实验动物禁食 12 h, 自由饮水。

1.2 主要试剂

L-精氨酸、D-乳酸锂标准品、碘化丙啶染液、RNase 均购自美国 SIGAMA 公司; HGF 购自美国 PEPROTECH 公司; 兔抗鼠 musashi-1 购自美国 CHEMICON 公司; EDTA 购自汕头金砂化工厂; Triton X-100 购自华美公司; 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (H + L) 购于北京中杉金桥公司; 硫酸肼购自上海试四赫维公司; 普通营养琼脂、SS 琼脂、血液增菌培养基均购自杭州天和公司。

1.3 分组及实验方法

60 只小鼠按数字表法随机分成 3 组: 正常对照组 (NC 组) 10 只, 重症急性胰腺炎组 (SAP 组) 25 只, HGF 治疗组 (HGF 组) 25 只。SAP 组: 参考 Mizunuma^[7] SAP 制模方法及根据预实验结果进行制模, 质量浓度 20% L-精氨酸溶液按 2 mg/g 腹腔内注射 2 次, 2 次间隔 1 h; NC 组: 腹腔内 2 次注射与 L-精氨酸溶液等量的生理盐水, 2 次间隔 1 h。SAP 组与 NC 组均于末次注射后 48 h 处死实验动物取材备用。HGF 组: 采用与 SAP 组同样方法制模, 制模后 HGF 150 μg/kg 腹腔内持续泵入, 于 48 h 后处死实验动物取材备用^[8]。实验过程中实验动物随意进食、水, 自由活动。

1.4 酶耦联法测定血清 D-乳酸

1.4.1 制作 D-乳酸标准曲线 将 D-乳酸标准溶液配成不同浓度系列, 在 340 nm 波长处读取吸光度值, 以 D-乳酸标准溶液不同浓度值为 X, 相对应吸光度光密度值为 Y, 求得标准曲线方程 $Y = aX + b$, 其中 a 为斜率, b 为 y 坐标轴截距^[9]。

1.4.2 测算 D-乳酸浓度 活体下取尽实验小鼠眼

球血, 处死小鼠, 常温下离心 10 min (2 000 r/min, 离心半径 13.5 cm); 取上层血清 0.2 ml, 加 5.8 mol/L PCA 0.02 ml, 于旋涡震荡器上混匀后冰浴 10 min, 离心 10 min (4 °C, 3 200 r/min, 离心半径 8 cm); 留取去蛋白上清 (PFP) 约 0.1 ml, 加 5.8 mol/L KOH 调 pH 10 ~ 12, 震荡混匀后冰浴 10 min, 离心 10 min (4 °C, 3 200 r/min, 离心半径 8 cm); 留取中和去蛋白上清液 (NPFP) 0.1 ml 分作 2 管, 各 0.05 ml, 一管为空白管, 另一管为样品测定管。每管加 0.15 ml pH 9.5 含 2 g/L NAD⁺ 甘氨酸硫脲分析溶液; 样品管加 0.05 ml D-LDH, 空白管加 0.05 ml 双蒸水, 置 37 °C 水浴 90 min, 空白管调零后, 在 340 nm 处测定样品管吸光度值。根据 D-乳酸标准曲线公式计算各样品 D-乳酸浓度。

1.5 器官细菌移位率

无菌操作下取少量的肠系膜淋巴结、胰腺、肝脏、脾脏、肺组织, 匀浆, 倍比稀释后置于增菌培养基增菌, 放置 35 °C 温箱中培养, 培养 48 h 后, 转种血液琼脂平板、SS 琼脂平板各 1 块。将转种后的平板放置 35 °C 温箱中培养, 24 h 后计数并计算脏器细菌移位率 (细菌培养阳性脏器值/细菌培养脏器总值)。根据细菌生长的特点、菌落和生化反应鉴定各种细菌。

1.6 计算肠黏膜上皮增殖指数

处死小鼠后, 无菌条件下开腹, 取约 5 cm 近端回肠组织, 去除肠内容物后生理盐水冲洗 3 ~ 4 次。沿肠道纵轴剖开, 载玻片刮取肠黏膜于 400 目丝质滤网中, 研磨棒研磨并用生理盐水冲洗, 收取单细胞滤液。肠黏膜上皮细胞碘化丙啶染色^[10]: 用冷 PBS 离心洗涤 5 min (4 °C, 1 000 r/min, 离心半径 8 cm) 3 次, 用 300 μl 含 10% 小牛血清 PBS 重悬细胞, 震荡 5 min 后加入 700 μl 预冷无水乙醇, 4 °C 固定 30 min。用预冷 PBS 离心 5 min (4 °C, 1 000 r/min, 离心半径 8 cm) 洗涤 1 次后, 加入 400 μl 碘化丙啶染液, 4 °C, 过夜。应用流式细胞仪 Cellquest 软件, 外周血单核细胞调试机器, 收集 20 000 个阳性细胞, 应用 Modfit 软件自动分析得出细胞周期各期所占比例。计算肠黏膜上皮细胞增殖指数 (PI): $PI = (S + G_2/M) / (G_0G_1 + S + G_2/M)$ 。

1.7 免疫组化检测小肠隐窝干细胞

取约 5 cm 远端空肠组织, 清除肠腔内容物, 用 10% 的中性缓冲甲醛溶液固定待检。标本首先进行常规病理学检查, 然后进行兔抗鼠 Musashi-1 单抗染色免疫组化检测: 石蜡切片脱蜡和水化后, 用 PBS (pH 7.4) 冲洗 3 次; 采用微波抗原修复法完成抗原修复; 用 PBS 冲洗; 每张切片加 1 滴 3% 过氧化氢溶

液, PBS 冲洗; 甩去 PBS, 每张切片加 1 滴一抗工作液(兔抗鼠 Musashi-1 单抗); 加 1 滴聚合物增强剂(试剂 A); 加 1 滴酶标山羊抗兔二抗工作液(试剂 B); 每张切片加 2 滴新鲜配制的 DAB, 显微镜下观察 3~10 min; 苏木素复染; (二甲苯透明) 中性树脂封片。小肠隐窝底部胞浆内出现棕黄色或褐色颗粒者为 Musashi-1 阳性细胞。低倍镜下随机选取 20 个小肠隐窝, 计数 Musashi-1 阳性细胞数, 取其平均值。

1.8 统计学方法

应用 SPSS 17.0 统计软件分析数据。服从或者近似正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析, 两两比较采用 q 检验。计数资料的比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SAP 制模后小鼠一般情况和死亡情况

SAP 制模后可见小鼠精神萎靡, 大量饮水, 皮肤黏膜色泽苍白湿冷。SAP 组还可观察到小鼠呼吸急促, 腹胀明显, 腹泻, 肢体末端紫绀。NC 组 10 只均成活; SAP 组制模 6~48 h 内共死亡 9 只, 存活 16 只, 死亡率为 36.0% (9/25); HGF 组制模 6~48 h 内死亡 5 只, 存活 20 只, 死亡率 20.0% (5/25)。后 2 组存活小鼠胰腺病理证实造模成功。

2.2 血清 D-乳酸、肠黏膜上皮细胞增殖指数、小肠隐窝干细胞数比较

除 NC 组和 HGF 组的小肠隐窝干细胞数差异无统计学意义 ($P > 0.05$) 外, 3 组的血清 D-乳酸、肠黏膜上皮细胞增殖指数差异均有统计学意义 (P 值均 < 0.05)。见表 1。

表 1 3 组小鼠实验 48 h 血清 D-乳酸水平、肠黏膜上皮细胞增殖指数和小肠隐窝干细胞数比较

组别	例数	血清 D-乳酸 (mg/L)	肠黏膜上皮细胞增殖指数	小肠隐窝干细胞数
NC 组	10	4.87 ± 0.73	4.95 ± 2.24	2.16 ± 0.90
SAP 组	16	11.17 ± 1.90 ^a	2.84 ± 1.68 ^a	1.26 ± 0.87 ^a
HGF 组	20	7.30 ± 0.88 ^{ab}	8.82 ± 2.03 ^{ab}	2.50 ± 0.96 ^b
<i>F</i> 值	—	78.20	42.71	8.34
<i>P</i> 值	—	<0.01	<0.01	<0.01

注: NC: 正常对照; SAP: 重症急性胰腺炎; HGF: 肝细胞生长因子; 与 NC 组比较, ^a $P < 0.01$; 与 SAP 组比较, ^b $P < 0.01$

2.3 细菌培养结果

各组小鼠所取活体组织培养阳性细菌有大肠埃希氏菌、伤寒沙门氏菌、结肠炎耶尔森菌, 其中以大肠埃希氏菌为主。3 组小鼠肠系膜淋巴结、胰腺、肝脏、脾脏、肺组织细菌移位率见表 2。器官细菌移位率 SAP 组较 NC 组和 HGF 组高, 差异均有统计学意义 (P 值均 < 0.01)。

表 2 3 组小鼠各组织 48 h 细菌移位率

组别	例数	细菌移位					细菌移位率
		胰腺	MLN	肝脏	脾脏	肺脏	
NC 组	10	0	6	1	0	0	14% (7/50)
SAP 组	16	12	15	9	3	1	50% ^a (40/80)
HGF 组	20	4	16	8	1	0	29% ^b (29/100)

注: NC: 正常对照; SAP: 重症急性胰腺炎; HGF: 肝细胞生长因子; MLN: 肠系膜淋巴结; 与 NC 组比较, ^a $\chi^2 = 7.427, P < 0.01$; 与 SAP 组比较, ^b $\chi^2 = 4.112, P < 0.01$

3 讨论

HGF 在 20 世纪 80 年代从完全分化的干细胞中被识别、提纯和克隆。HGF 是一种高效的多效细胞因子, 是成熟肝细胞 DNA 合成的最强的刺激物, 同时也能够促进小肠上皮细胞增殖, 加速损伤黏膜的修复^[2]。另外, HGF 还具有增强其他生长因子的功能, 促细胞迁移、刺激血管生成作用而调节肠道炎症反应^[11-12]。HGF 也可降低肠道通透性和细菌移位到肠系膜淋巴结, 从而改善肠屏障功能, 以减少肠道移植后并发感染的发生率^[13]。本实验通过血清 D-乳酸变化观察肠道通透性和通过细菌培养研究细菌移位率, 结果显示: HGF 可降低肠道通透性和细菌移位率。皮下注射 HGF 后, HGF 使炎症胰腺内产生的活性氧减少, 胰腺的活性氧代谢产物 MDA 水平降低, 而清除氧自由基的相关酶如超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶活性增高, 从而减轻炎症的进一步发展。也有研究报道, 其可能增加血浆中抗炎因子 IL-10 产生和释放, 减轻胰腺炎症反应, 其机理可能是 HGF 诱导前列腺素 E2 和 IL-10 的产生, 增加组织血流量、促进上皮与血管再生、修复, 以及同时减少诱发胰腺炎的淀粉酶、脂肪酶、IL-6 的水平, 从而保护胰腺降低对胰腺的损害^[14]。

还有研究报道, HGF 通过 HGF 受体 (c-Met) 发挥生物学作用, 大鼠、小鼠、兔等多种动物及人的肠黏膜和胰腺均有 HGF 和 c-Met 的表达与分布, 胰腺炎时肠黏膜损伤, 黏膜下基质细胞分泌 HGF, 其作为“干细胞巢”组成成分之一, 与小肠隐窝细胞上其受体 c-Met 结合可促进小肠干细胞及祖细胞增殖^[15-16]。在哺乳动物的组织中, 干细胞在肠黏膜损伤修复过程中是必不可少的, 在维护肠黏膜屏障完整性方面发挥着重要作用。小肠干细胞具有强大的分裂能力, 其分裂方式有两种, 即非对称性分裂和对称性分裂。具体采用何种方式可能取决于干细胞的生存环境, 即“干细胞巢”的情况而定。目前多用 Musashi-1、DCAMKL-1、TERT 和经典 Wnt 信号靶基因 Lgr5 等作为推测干细胞的标志^[17-21]。本实验结果显示, SAP 时小肠干细胞数比正常对照组明显减

少,可能是因为 SAP 时肠黏膜坏死、脱落、小肠隐窝严重破坏致使小肠干细胞数量减少。在肠黏膜保护剂 HGF 的作用下小肠隐窝干细胞数量明显增加,提示 HGF 可能通过促进小肠干细胞的对称性分裂重建严重受损的肠黏膜。当肠黏膜严重破坏时小肠干细胞通过对称性分裂产生更多的隐窝重建严重受损的肠黏膜,而当小肠干细胞达到一定数量时其对称性分裂受到抑制转变成非对称性分裂,再通过短暂增殖细胞产生大量的分化终末细胞来完成对受损黏膜的修复。

本研究提示,应用 HGF 后可减轻急性胰腺炎小鼠肠黏膜的损伤,促进肠黏膜上皮细胞的增殖,降低肠道通透性及肠道细菌移位率,从而减轻急性胰腺炎小鼠肠黏膜的损伤。

参 考 文 献

- [1] Hanawa T, Suzuki K, Kawauchi Y, et al. Attenuation of mouse acute colitis by naked hepatocyte growth factor gene transfer into the liver[J]. *Gene Med*, 2006, 8(5):623-635.
- [2] Yanai R, Yamada N, Inui M, et al. Correlation of proliferative and anti-apoptotic effects of HGF, insulin, IGF-1, IGF-2, and EGF in SV40-transformed human corneal epithelial cells[J]. *Exp Eye Res*, 2006, 83(1):76-83.
- [3] Hoshiko S, Kawaguchi M, Fukushima T, et al. Hepatocyte growth factor activator inhibitor type 1 is a suppressor of intestinal tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(8):2659-2670.
- [4] Katz MS, Thatch KA, Schwartz MZ. Gene alterations and intestinal mucosal changes following growth factor and omega-3 exposure in a rat model of inflammatory bowel disease [J]. *J Pediatr Surg*, 2013, 48(2): 345-352.
- [5] 孔令尚,刘牧林,张宗兵,等. 胰高血糖素样肽-2 对急性胰腺炎小鼠肠道淋巴细胞归巢影响的实验研究[J]. *中国危重病急救医学*, 2009, 21(2):103-106.
- [6] Ueda T, Takeyama Y, Hori Y, et al. Hepatocyte growth factor increases in injured organs and functions as an organotrophic factor in rats with experimental acute pancreatitis[J]. *Pancreas*, 2000, 20(1):84-93.
- [7] Mizunuma T, Kawamura S, Kishino Y. Effects of injecting excess arginine on rat pancreas[J]. *J Nutr*, 1984, 114(3): 467-471.
- [8] 李可洲,李 宁,黎介寿,等. 肝细胞生长因子改善移植小肠的黏膜屏障功能[J]. *肠外与肠内营养*, 2002, 9(4):205-207.
- [9] Brandt RB, Siegel SA, Water MG, et al. Spectrophotometric assay

for D-Lactate in plasma[J]. *Analytical Biochemistry*, 1980, 102(1):39-46.

- [10] 李可洲,李幼生,鲍扬,等. 短链脂肪酸对 TPN 大鼠小肠黏膜结构及细胞增殖作用的研究[J]. *肠外与肠内营养*, 1999, 6(3):144-146.
- [11] Marc G, Celeste C, Steven E, et al. The effect of hepatocyte growth factor on gut mucosal apoptosis and proliferation, and cellular mediators after severe trauma[J]. *Surg*, 2005, 138(3): 482-489.
- [12] Katz MS, Thatch KA, Schwartz MZ. Hepatocyte growth factor and omega-3-enriched feeds have a synergistic effect on mucosal mass in an animal model of inflammatory bowel disease[J]. *J Pediatr Surg*, 2012, 47(1): 194-198.
- [13] 李可洲,李 宁,黎介寿,等. 肝细胞生长因子对移植小肠通透性及细菌移位的作用[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2007, 25(1): 532-535.
- [14] Ikizceli I, Yurumez Y, Avsarogullari L, et al. Effect of interleukin-10 on pancreatic damage caused by organophosphate poisoning[J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2005, 42(3): 260-264.
- [15] Timmapuri SJ, Otterburn DM, Arafat H, et al. Hepatocyte growth factor increases glucagon immunoreactivity in jejunal cells during intestinal adaptation[J]. *J Pediatr Surg*, 2006, 41(1):150-154.
- [16] Jeschke MG, Bolder U, Finnerty CC, et al. The effect of hepatocyte growth factor on gut mucosal apoptosis and proliferation, and cellular mediators after severe trauma[J]. *Surg*, 2006, 139(6):854-855.
- [17] May R, Sureban SM, Hoang N, et al. DCAMKL-1 and LGR5 mark quiescent and cycling intestinal stem cells respectively[J]. *Stem Cells*, 2009, 27(10):2571-2579.
- [18] May R, Riehl TE, Hunt C, et al. Identification of a novel putative gastrointestinal stem cell and adenoma stem cell marker, doublecortin and CaM kinase-like-1, following radiation injury and in adenomatous polyposis coli/multiple intestinal neoplasia mice [J]. *Stem Cells*, 2008, 26(3):630-637.
- [19] Haegebarth A, Clevers H. Wnt signaling, lgr5, and stem cells in the intestine and skin[J]. *Am J Pathol*, 2009, 174(3):715-721.
- [20] Davies PS, Dismuke AD, Powell AE, et al. Wnt-reporter expression pattern in the mouse intestine during homeostasis[J]. *BMC Gastroenterol*, 2008, 2(8):57.
- [21] Barker N, Van Es JH, Kuipers J, et al. Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5[J]. *Nature*, 2007, 449(7165):1003-1007.

(收稿日期:2014-01-30)

(本文编辑:张萍)