

牛初乳中IGF-I提取物 对肠黏膜修复作用的研究

吕剑光, 宋 伟, 霍贵成*

(乳品科学教育部重点实验室, 东北农业大学, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘 要:目的:研究牛初乳中胰岛素生长因子-I(IGF-I)对大鼠受损肠黏膜的修复作用。方法:应用氨甲喋呤制备大鼠小肠炎模型,实验设正常对照组,MTX模型对照组(20 μ g/kg),牛初乳IGF-I提取物修复组(75 μ g/kg),IGF-I修复组(75 μ g/kg)。后2组每天灌胃给药1次,给药时间从造模后第2d开始至实验结束,共5d。第6d检测大鼠血浆二胺氧化酶(DAO)活性、血浆D-乳酸水平,光镜下观察小肠组织病理形态学改变。结果:与对照组相比,模型组大鼠血浆DAO活性和血浆D-乳酸水平明显升高($P<0.05$),小肠损伤程度明显高于对照组($P<0.05$),牛初乳中IGF-I提取物组和IGF-I组可降低血浆DAO活性及D-乳酸水平($P<0.05$),减轻小肠损伤程度($P<0.05$)。结论:牛初乳中IGF-I提取物能够明显减轻大鼠肠黏膜的损伤,同时可减轻炎症细胞的浸润,对实验性大鼠的小肠炎具有修复作用。

关键词:牛初乳,胰岛素生长因子,肠黏膜/损伤

Effect of bovine colostrum IGF-I extraction on the recovery of intestinal mucositis

LV Jian-guang, SONG Wei, HUO Gui-cheng*

(Key Lab of Dairy Science, Ministry of Education, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Objective: To study the effect of bovine colostrum insulin-like growth factor-I (IGF-I) extraction on injury of the intestine in rat. Methods: Rat model of enteritis was induced by Methotrexate (MTX). The experimental animals were randomly divided into four groups: normal group, MTX model group (20 μ g/kg), bovine colostrum IGF-I extraction recovery group (75 μ g/kg) and IGF-I recovery group (75 μ g/kg). The last two groups were administered in corresponding groups by gastric irrigation daily for 5 days, and the administered time had been from 2nd day to 5th day. Plasma diamine oxidase (DAO) and D-lactate level were measured, histological changes in intestinal tissue were observed under the light microscope. Results: Compared with normal group, the activity of DAO and D-lactate level were significantly increased ($P<0.05$), intestine injury was deeper than the normal group ($P<0.05$). The bovine colostrum IGF-I extraction recovery group and the IGF-I recovery group could less the activity of DAO and D-lactate level ($P<0.05$), and could abate intestine injury obviously ($P<0.05$). Conclusion: Bovine colostrum IGF-I extraction might reduce the damage of intestinal mucosa in rats, alleviate the infiltration of inflammatory cells, and has beneficial effect on rat enteritis.

Key words: bovine colostrum; insulin-like growth factors; intestinal mucosa/injuries

中图分类号: TS252.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2011)10-0181-03

胃肠黏膜损伤在临床上常见,严重的黏膜损伤不仅有大出血的潜在威胁,而且还会介导肠源性感染,引发全身性的病理、生理及内脏功能紊乱。因此,如何减轻黏膜损伤,促进损伤后再修复越来越受到重视。研究发现,初乳中含有大量的生长促进因子,特别是表皮生长因子(EGF)和胰岛素生长因子(IGF-

I)。EGF对小肠有明显的滋养作用,并可以提高血及组织中Gln的浓度,加强Gln的摄取,从而能够有效促进黏膜损伤的修复^[1]。IGF-I作为胃肠道的一种有效营养因子,能有效地促进细胞分裂,对黏膜损伤有较好的治疗效果,能够加速肠的修复^[2]。胃肠黏膜损伤后,可以引起内脏器官功能和组织病理学的改变,血浆中二胺氧化酶(DAO)活性及血浆D-乳酸水平升高^[3]。本文主要研究了初乳中IGF-I作为一种营养因子,其提取物对氨甲喋呤(MTX)引起大鼠肠黏膜炎后的修复效果。

收稿日期: 2010-12-07 * 通讯联系人

作者简介: 吕剑光(1984-),男,硕士研究生,研究方向: 乳品科学与工程。

基金项目: 东北农业大学生物乳制品理论技术创新团队项目(CXT007)。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验动物 健康Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (清洁级) 20只, 雄性, 体质量 (200±20) g, 购于川北医学院, 动物购进后在本校生命院动物房饲养适应一周后投入实验; 牛初乳 胎次2~5次, 榨乳时间为分娩后24h; human IGF-I Peptrotech, MTX, DAO标准品, D-乳酸标准品 sigma。

DU800型核酸/蛋白质分析仪 BECKMAN COULTER。

1.2 实验方法

1.2.1 牛初乳中IGF-I提取 初乳经离心后使之脱脂, 将脱脂乳凝乳后离心, 取上清液即得乳清, 采用强阳离子交换树脂SPFF用于捕获乳清中IGF-I, 即得IGF-I提取物^[4]。

1.2.2 模型建立 大鼠适应一周后, 腹腔内注射MTX (20μg/kg体重), 造成小肠肠炎^[5], 伤后6d处死大鼠, 进行指标分析。

1.2.3 分组及评定 实验设正常对照组, MTX模型对照组, 牛初乳IGF-I提取物修复组 (75μg/kg) 及IGF-I修复组 (75μg/kg), 每组5只大鼠。后两组从造模后第24h开始, 按剂量腹腔内注射1次/d进行干预。

1.2.4 测定方法

1.2.4.1 血浆二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)活性 向洁净试管中加入0.2mol·L⁻¹ PBS 3mL (pH7.2), 辣根过氧化物酶0.1mL (4μg), 邻联茴香胺0.1mL (500μg), 血浆0.5mL, 最后加尸胺0.1mL (175μg), 充分混匀后置37℃水浴30min。测定波长为436nm^[6]。

1.2.4.2 血浆中D-乳酸水平 以改良Brandt等方法测定血浆D-乳酸浓度^[7]。

1.2.4.3 肠道组织病理学检查 将回肠末端组织固定于中性福尔马林溶液中, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片HE染色后光镜下观察组织学变化。小肠损伤程度用Park等报道的积分法评估^[8]。0分为正常黏膜; 1分为绒毛顶部上皮产生间隙; 2分为上皮间间隙扩大; 3分为上皮部分绒毛脱落; 4分为绒毛脱落明显; 5分为绒毛消失; 6分为隐窝组织形成梗死; 7分为转化粘液质形成梗死; 8分为透壁梗死。

1.2.5 数据分析 实验数据重复测定5次(n=5), 采用SPSS13.0统计软件进行分析。计量数量以均数±标准差(±s)表示, 组间比较采用t检验, P<0.05表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 血浆DAO活性

实验中发现, 肠道损伤可使血浆DAO活性明显升高, 与对照组相比, 有显著差异 (P<0.05) (见图1)。与MTX模型组比较, 牛初乳IGF-I提取物组和IGF-I组血浆中DAO活性较低 (P<0.05)。牛初乳IGF-I提取物组同IGF-I组没有显著差异 (P>0.05)。说明牛初乳中IGF-I提取物能改善肠黏膜的损伤, 对肠黏膜的损伤有修复作用。

2.2 血浆D-乳酸水平

从本实验结果看, MTX模型组血浆中D-乳酸水

平明显高于对照组, 差异有显著性 (P<0.05)。牛初乳IGF-I提取物组和IGF-I组明显低于MTX模型组 (P<0.05)。牛初乳IGF-I提取物组同IGF-I组没有显著差异 (P>0.05) (见图2)。说明牛初乳中IGF-I提取物能降低肠黏膜的通透性。

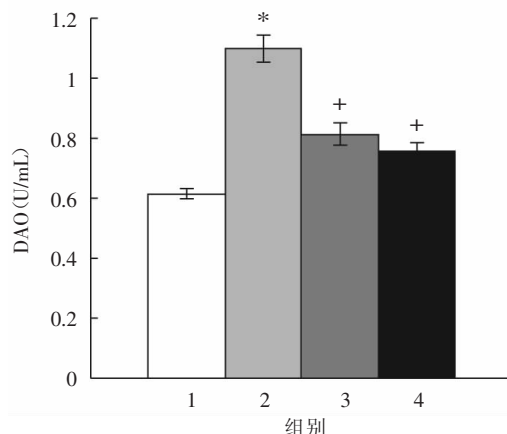


图1 牛初乳IGF-I提取物对血浆DAO活性的影响
注: “*”P<0.05, 与对照组比较; “+”P<0.05, 与MTX模型组比较; 1为对照; 2为MTX; 3为MTX-牛初乳IGF提取物; 4为MTX-IGF-I; 图2、图4同。

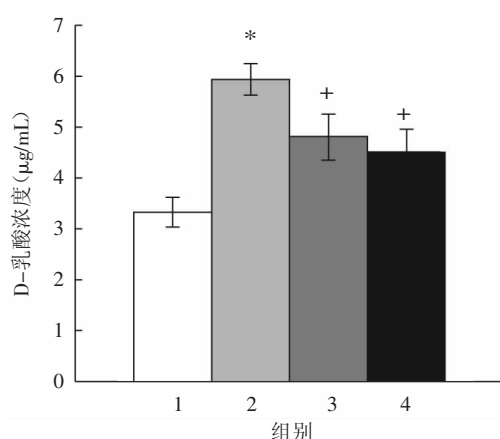


图2 牛初乳IGF-I提取物对血浆D-乳酸水平的影响

2.3 肠黏膜组织形态学观察

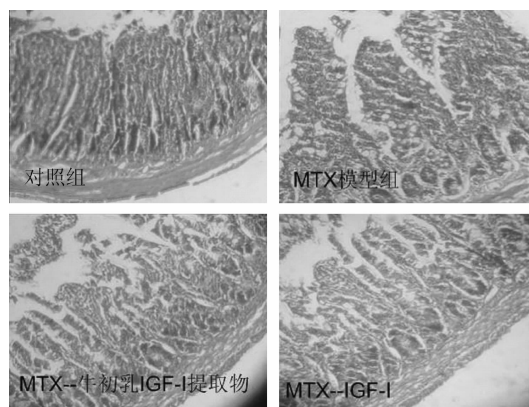


图3 大鼠肠道组织学变化 (HE, ×200)

由图3光镜检查发现, 对照组肠黏膜细胞排列基本整齐, 结构完整, 无组织坏死、缺失及水肿。MTX模

型组出现部分肠绒毛脱落、炎细胞浸润。牛初乳IGF-I提取物组和IGF-I组病理损伤较MTX模型组明显减轻,黏膜缺失少见,小部分腺体不完整,炎症细胞浸润少。各组小肠损伤程度积分比较见图4。

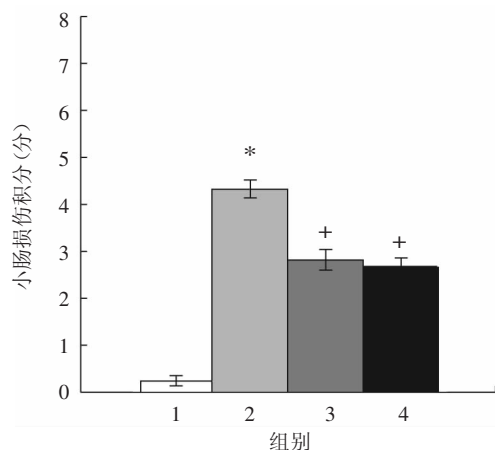


图4 小肠黏膜病理评分

3 讨论

氨甲喋呤(methotrexate, MTX)为经典的抗叶酸类抗肿瘤药,在杀死生长、增殖快速肿瘤细胞的同时,对正常组织细胞,尤其对胃肠道黏膜细胞有损伤,可直接抑制肠上皮细胞DNA的合成^[9]。通过MTX诱导的鼠小肠炎模型的研究,发现MTX不利于肠上皮的更新,直接抑制肠上皮的更新,直接抑制肠上皮细胞DNA的合成。导致肠隐窝细胞有丝分裂减弱和肠绒毛缩短,直至肠隐窝形态丧失、绒毛皱缩脱落^[10]。本文实验结果表明,SD大鼠注射MTX后,大鼠粪便变稀,体重下降;大鼠黏膜广泛缺失,肠微毛萎缩,间隙变宽,断裂,凌乱,杯状细胞缺失;肠上皮细胞核受损,核膜破坏,消失,线粒体肿胀;肠绒毛间质大量炎细胞浸润和消肿,呈典型肠黏膜炎症反应。

IGF-I在牛初乳中大量存在,是牛初乳中最重要的促生长因子。IGF-I可以明显减轻化学药物或缺血再灌注等原因所致的肠黏膜细胞的过度凋亡而对肠黏膜具有保护效应^[11]。本实验结果显示,牛初乳IGF-I提取物修复组和IGF-I修复组均可显著改善肠黏膜充血、水肿糜烂等现象,降低大鼠肠黏膜损伤程度。

DAO是肠黏膜细胞的标志酶,约95%存在于哺乳动物小肠绒毛上层,是小肠黏膜上皮细胞内高活性的结构酶。在其他组织中则含量少、活性低^[12]。生理状况下血浆中DAO活性很低,在肠黏膜受损时,由肠黏膜细胞释放的DAO大量入血,使血中浓度大幅上升。因此,血浆DAO活性是反映肠黏膜结构完整性较理想的指标。实验结果显示,大鼠注射MTX伤后6d仍明显高于伤前。牛初乳IGF-I提取物修复组及IGF-I修复组大鼠DAO活性均明显低于MTX模型组,说明牛初乳IGF-I提取物修复组和IGF-I修复组对大鼠的肠黏膜损伤具有明显的修复效果。

D-乳酸是肠道内细菌发酵产生的一种物质,哺乳动物组织不产生D-乳酸,且缺乏代谢该物质的酶系统,不能代谢该物质。在肠黏膜屏障正常时,血浆

D-乳酸极低,只有当肠黏膜屏障受破坏时,D-乳酸透过肠过肠黏膜屏障入血,使血浆D-乳酸快速升高。因此,血浆D-乳酸水平可间接反映肠黏膜屏障功能,可作为肠道黏膜损伤指标之一。本结果显示,大鼠注射MTX伤后6d仍明显高于伤前。牛初乳IGF-I提取物修复组及IGF-I修复组大鼠D-乳酸水平均明显低于MTX模型组,说明牛初乳IGF-I提取物修复组和IGF-I修复组能降低肠黏膜的通透性,对大鼠的肠黏膜屏障损伤具有明显的修复效果。

总之,使用牛初乳中IGF-I提取物能够明显减轻大鼠小肠组织的损伤,同时可减轻炎细胞的浸润,对实验性大鼠小肠炎具有修复作用。

参考文献

- [1] 董光龙,王俊义,王为忠,等.表皮生长因子减少腹部辐射肠外营养大鼠肠道细菌移位[J].第四军医大学学报,2000,21(1): 76-79.
- [2] Gordon S, Howarth. Insulin-like Growth Factor-I and the Gastrointestinal System: Therapeutic Indications and Safety Implications [J]. J Nutr, 2003, 133: 2109-2122.
- [3] 吕艺,黎君友,晋桦,等.肠缺血-再灌注大鼠肠源性细胞因子TNF- α 和IL-6表达的变化及其机制[J].河北医学,2000,6(1): 1-5.
- [4] Sylvie F GAUTHIER, Yves POULIOT, Jean-Louis MAUBOIS. Growth factors from bovine milk and colostrum: composition, extraction and biological activities[J]. Lait, 2006, 86: 99-125.
- [5] Igor Sukhotnik, Dan Shteinberg, Shani Ben Lulu, et al. Transforming growth factor- α stimulates enterocyte proliferation and accelerates intestinal recovery following methotrexate-induced intestinal mucositis in a rat [J]. Pediatr Surg Int, 2008, 24: 1303-1311.
- [6] 黎君友,于燕,郝军,等.分光光度法测定血和小肠组织二胺氧化酶活性[J].氨基酸和生物资源,1996,18(4): 28-30.
- [7] Richard B Brandt, Stephen A Siegel, Michael G Waters, et al. Spectrophotometric Assay for D-Lactate in Plasma [J]. Analytical Biochemistry, 1980, 102: 39-46.
- [8] Park PO, Hagund U, Bulkley GB, et al. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion [J]. Surgery, 1990, 107: 574-578.
- [9] 王利,孟瑞锋,盛光耀,等.大剂量甲氨喋呤在治疗儿童急性淋巴细胞白血病中应用观察[J].实用诊断与治疗杂志,2006,20(5): 351-352.
- [10] Xian CJ, Couper R, Howarth GS, et al. Increased expression of HGF and c-met in rat small intestine during recovery from methotrexate-induced mucositis [J]. Br J Cancer, 2000, 82: 951-954.
- [11] Baregamian N, Song J, Jeschke MG, et al. IGF-I protects intestinal epithelial cells from oxidative stress induced apoptosis [J]. Surg Res, 2006, 136: 31-37.
- [12] Hua JS, Zheng PY, Fong TK, et al. Helicobacter pylori acquisition of metronidazole resistance by natural transformation in vitro [J]. World J Gastroentero, 1998(4): 385-387.