

胰岛淀粉样多肽在生后发育期间家兔十二指肠中的表达及意义

胡 赟, 梁文妹

■背景资料

胰岛淀粉样多肽由胰岛细胞分泌, 也见于胃肠道。目前尚未见其在生后发育家兔十二指肠表达的报道。本研究较详细的观察了其在生后不同时段家兔十二指肠的定位及分布特点, 充实了有关IAPP的研究资料。

胡赟, 梁文妹, 贵阳医学院组织学与胚胎学教研室 贵州省贵阳市 550004

贵州省科学技术基金资助项目, No. 黔科通200350

贵州省教育厅自然科学基金资助项目, No. 黔教基2002314

作者贡献分布: 此课题由梁文妹设计, 并指导实验及论文的撰写, 对文章的知识性内容作批评性审阅; 研究过程、数据分析、文章起草由胡赟完成。

通讯作者: 梁文妹, 教授, 550004, 贵州省贵阳市北京路9号, 贵阳医学院组织学与胚胎学教研室, wenmeiliang@126.com
电话: 0851-6909118

收稿日期: 2009-01-16 修回日期: 2009-03-04

接受日期: 2009-03-09 在线出版日期: 2009-03-28

Expression of islet amyloid polypeptide in duodenum of rabbits during the postnatal development period

Yun Hu, Wen-Mei Liang

Yun Hu, Wen-Mei Liang, Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Supported by: the Science and Technology Foundation of Guizhou Province, No. 200350; and the Research Program of Nature Science of the Department of Education of Guizhou Province, No. 2002314

Correspondence to: Professor Wen-mei Liang, Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical University, 9 Beijing Road, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. wenmeiliang@126.com

Received: 2009-01-16 Revised: 2009-03-04

Accepted: 2009-03-09 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To investigate the expression and distribution features of islet amyloid polypeptide (IAPP) in duodenum of rabbits during the postnatal development period.

METHODS: Sixty rabbits were equally divided into the 5th, 15th, 25th, 35th, 60th, and 90th d groups. Immunohistochemical SABC staining and image analysis were performed to detect the expression of IAPP.

RESULTS: The expression of IAPP was found in the duodenum of rabbits at different postnatal development stages. Positive production was

brownish-yellow and resided in the cytoplasm. In the 5th and 15th d groups, a few IAPP positive cells scattered over epithelium mucosa cells, and the staining was weaker. During 25th to 90th d, the number of IAPP positive cells increased and staining became stronger gradually. The positive cells were mainly distributed in the connective tissue of tunica propria, and some cells scattered over epithelium mucosa cells. The result of image analysis indicated the number of IAPP positive cells increased from 35th to 90th d ($F = 24.19$, $P = 0.0001$), and the mean grey values decreased gradually from 15th d ($F = 72.42$, $P = 0.004$).

CONCLUSION: IAPP maybe involve in the development of tunica mucosa in rabbit duodenum as a nutrition factor.

Key Words: Islet amyloid polypeptide; Rabbit; Postnatal development; Duodenum

Hu Y, Liang WM. Expression of islet amyloid polypeptide in duodenum of rabbits during the postnatal development period. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 910-913

摘要

目的: 观察家兔生后发育期间十二指肠胰岛淀粉样多肽(islet amyloid polypeptide, IAPP)的表达及分布特点。

方法: 家兔60只, 分为生后5、15、25、35、60、90 d共6组, 每组10只, 应用免疫组织化学SABC法及图像分析方法检测IAPP在十二指肠的表达及分布特点。

结果: 不同发育阶段家兔十二指肠中均有IAPP的表达, 阳性产物呈棕黄色, 存在于胞质。生后5、15 d, IAPP阳性细胞散在分布于黏膜上皮细胞间, 细胞数量少且染色浅淡; 25-90 d, IAPP阳性细胞数量增多, 且细胞染色深, 主要分布于固有层结缔组织中, 少量分散存在于黏膜上皮细胞间。图像分析结果表明, IAPP阳性细胞的数量从第35天开始逐渐增多($F = 24.19$, $P = 0.0001$), 平均灰度值从第15天开始逐渐下

■同行评议者

洪天配, 教授, 北京大学第三医院内分泌科

降($F = 72.42, P = 0.004$).

结论: IAPP作为一种营养因子, 可能对生后家兔十二指肠黏膜的生长发育起重要作用.

关键词: 胰岛淀粉样多肽; 家兔; 生后发育; 十二指肠

胡赞, 梁文妹. 胰岛淀粉样多肽在生后发育期间家兔十二指肠中的表达及意义. 世界华人消化杂志 2009; 17(9): 910-913
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/910.asp>

0 引言

IAPP又称为糖尿病相关肽(diabetes-associated peptide, DAP)或淀粉不溶素(amylin), 自从1986年被提纯以来, 已引起众多学者的关注. 除由胰岛细胞分泌外, 也可由胃肠内分泌细胞分泌^[1]. 已有研究证明, 人胎胃、小肠、结肠、直肠和阑尾均有IAPP的表达. 但现有研究中对生后不同发育阶段家兔十二指肠中是否有IAPP表达尚无定论. 本研究应用免疫组织化学及图像分析方法, 对家兔十二指肠生后发育期间IAPP的定位及分布特点进行了较详细的定性和定量分析, 为深入研究IAPP的生理作用及其对生后发育的影响提供更多的形态学依据.

1 材料和方法

1.1 材料 生后5、15、25、35、60、90 d家兔各10只, 体质量分别为 0.072 ± 0.006 、 0.151 ± 0.003 、 0.209 ± 0.021 、 0.345 ± 0.091 、 1.21 ± 0.152 、 2.001 ± 0.093 kg, 由贵阳医学院动物实验动物中心提供. 经股动脉放血处死后, 迅速取其十二指肠组织入Bouin液固定, 梯度酒精脱水, 常规石蜡包埋, 制成4 μm 厚连续切片.

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学SABC法: 显示IAPP阳性细胞. 其主要步骤为: 切片常规脱蜡至水, 甲醇-过氧化氢封闭10 min, 正常羊血清(1:50)室温30 min, 兔抗IAPP(1:2000, Peninsula Lab INC产品)4℃孵育过夜, 羊抗兔IgG(1:100)37℃孵育20 min, SABC复合物37℃孵育20 min, DAB-H₂O₂液显色, 苏木精复染, 中性树胶封片. 方法对照: 以PBS缓冲液代替IAPP抗血清, 余步骤同上.

1.2.2 图像分析: 随机选取各发育阶段家兔十二指肠切片3张, 应用BioMias图像分析系统进行检测. 在40倍物镜下, 每张切片随机选取5个视野,

计数IAPP阳性细胞数量, 并测得其平均灰度值.

统计学处理 应用SPSS11.0统计学软件对所得数据进行显著性分析. 组间比较用单因素方差分析(One-way analysis of variance, ANOVA)(mean \pm SD), $P < 0.05$ 具有统计学意义.

2 结果

2.1 免疫组织化学染色结果 生后发育不同阶段的家兔十二指肠中均有IAPP阳性细胞, 阳性产物呈棕黄色, 存在于胞质(图1). 生后5 d及15 d, IAPP阳性细胞散在于黏膜上皮细胞间, 多呈柱状, 细胞数量少且染色浅淡(图1A-B); 25 d到35 d, IAPP阳性细胞则位于固有层结缔组织中, 圆形或卵圆形, 且数量逐渐增多, 免疫染色变深(图1C-D); 60 d及90 d时IAPP阳性细胞不仅分布于固有层结缔组织中, 也分散存在于黏膜上皮细胞间, 且细胞数量多, 染色深(图1E-F). 方法对照切片上未见阳性细胞.

2.2 图像分析结果 IAPP阳性细胞数量在5 d、15 d、25 d时变化不明显($P > 0.05$), 从35 d开始, 细胞数量开始增多($F = 24.19, P < 0.05$); IAPP阳性细胞的平均灰度值在15 d、25 d时呈逐渐降低趋势($F = 72.42, P < 0.05$), 但35 d以后变化不明显($P > 0.05$, 表1).

3 讨论

IAPP是由胰岛B细胞分泌的一种37肽, 具有抑制餐后胰高血糖分泌、抑制胃排空、抑制食欲等多种生理功能^[2]. 生理状态下, IAPP与胰岛素共存于胰岛B细胞内, 与胰岛素及其他葡萄糖调节因子一起调节体内糖的代谢, 对维持体内血糖水平稳定起重要作用^[3-4]. IAPP是2型糖尿病发生的重要病理因素之一, 可通过启动细胞内凋亡信号蛋白^[5]、氧化应激^[6]、诱导细胞膜离子样通道形成^[7]等机制引起B细胞凋亡及功能衰竭. 另有研究证实, IAPP具有与降钙素基因相关肽及降钙素相似的结构, 是降钙素家族成员之一, 能促进成骨细胞增殖及骨形成, 同时还能抑制破骨细胞的活性及骨吸收, 对骨的生长和改建具有重要的调节作用^[8].

此外, IAPP还与胃肠道的功能密切相关. 能抑制胃酸分泌, 减少肥大细胞的脱颗粒现象, 增加肠系膜淋巴管收缩的频率和幅度, 促进胃溃疡的愈合等, 对胃肠黏膜的生长和修复有重要的调节作用^[9]. IAPP能以旁分泌、自分泌方式调节胃黏膜的内分泌活动^[1], 或作为一种新的

■研发前沿

胰岛淀粉样多肽与糖尿病发生发展的相关机制一直是研究热点, 近年来逐渐深入并涉及到肥胖、骨质疏松等领域, 但这些作用机制仍不是很明确.

■相关报道

已有研究证明, 人胎胃、小肠、结肠、直肠和阑尾及大鼠胃肠道均有胰岛淀粉样多肽的表达, 而人胎小肠中仅十二指肠上皮及固有层有表达, 空肠及回肠均未见表达.

应用要点

本文的相关工作为胰岛淀粉样多肽生物学功能研究提供了实验依据。在家兔十二指肠的生后发育过程中,胰岛淀粉样多肽的表达、形态及定量结果改变与消化和内分泌功能的调节密切相关,为研究其在十二指肠生后发育中的作用提供了形态学资料。

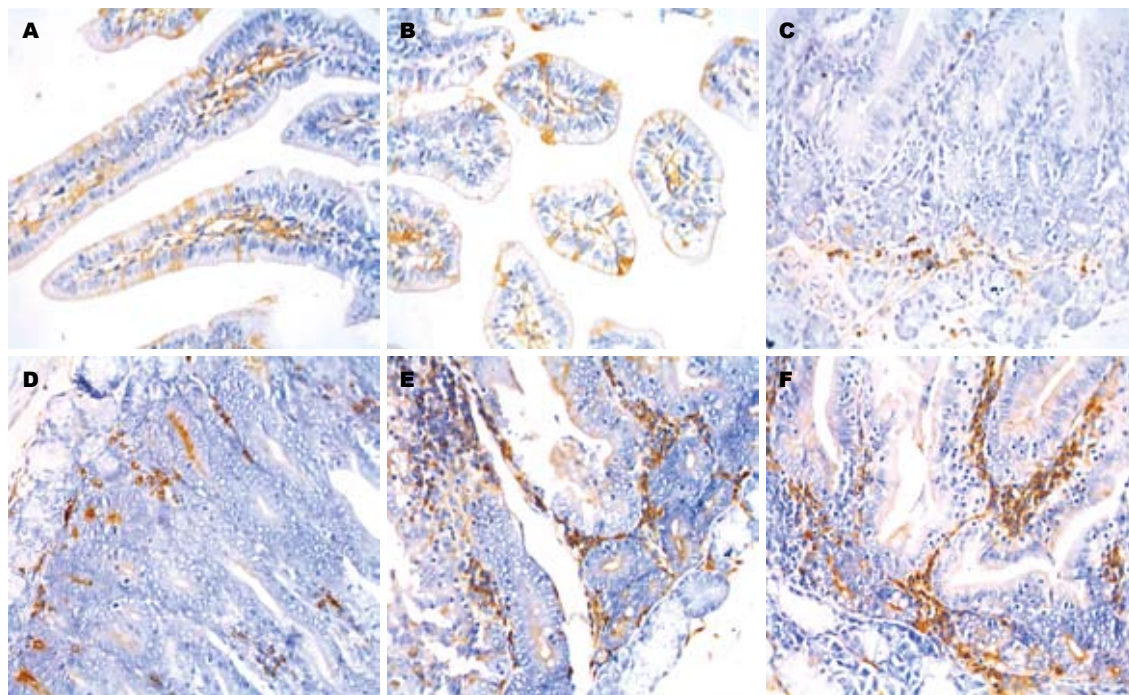


图1 生后不同发育阶段家兔十二指肠IAPP的表达(SABC, $\times 400$). A: 5 d; B: 15 d; C: 25 d; D: 35 d; E: 60 d; F: 90 d.

表1 生后各发育阶段IAPP阳性细胞的图像分析结果(mean \pm SD)

生后(d)	测量指标			
	细胞数量	P	平均灰度值	P
5	11.56 \pm 3.54		186.51 \pm 11.03	
15	10.01 \pm 4.13	0.3120	171.18 \pm 11.29 ^c	0.004
25	10.67 \pm 2.51	0.5470	152.38 \pm 26.58 ^c	0.015
35	28.37 \pm 4.27 ^a	0.0001	151.19 \pm 29.92	0.348
60	45.36 \pm 2.09 ^a	0.0001	150.41 \pm 24.93	0.111
90	52.48 \pm 6.22 ^a	0.0001	150.84 \pm 25.66	0.173

^aP<0.05, ^cP<0.05 vs 5 d组.

脑肠肽参与维持消化过程中血糖稳定的内分泌反应^[10]. 已有的研究证明, 人胎小肠中仅十二指肠上皮及固有层有IAPP的表达, 且与胎龄有关. 本研究结果表明, 生后不同发育阶段家兔十二指肠均有IAPP表达, 其定位从上皮逐渐向固有层过渡, 与胎儿十二指肠IAPP表达的结果相似. 综合以上研究结果, 我们认为在生长发育的过程中, 随着IAPP的表达由上皮向固有层迁移, IAPP逐渐参与了十二指肠消化和内分泌功能的调节过程, 与十二指肠的生长发育密切相关.

目前有关IAPP在胃肠道表达的文献报道均只涉及其分布特征方面的研究, 本研究除定性外, 还尝试应用图像分析方法测量了IAPP阳性表达强度的改变. 我们发现随生后发育时间的

延长, 兔十二指肠IAPP阳性细胞数量逐渐增多, 平均灰度值逐渐下降, 表明IAPP阳性表达的程度增强, IAPP含量增多. 我们推测这可能是对胃肠道所接受的食物刺激越来越复杂的一种适应性反应.

German *et al*^[9]的研究表明IAPP能促进胃肠黏膜的生长和修复, 在减少有害因素对胃黏膜造成损伤的同时刺激保护因素发挥作用, 从而促进胃溃疡的愈合. 综合现有文献报道及本组研究结果, 我们推测随家兔生后发育时间延长, 十二指肠分泌增加的IAPP可能作为一种营养因子, 促进小肠黏膜的生长发育, 并且通过肠-胰岛轴调节机制影响胰岛激素对糖代谢的调节, 同时对生后发育期间骨骼的构建起调节作用.

4 参考文献

- Mulder H, Lindh AC, Ekblad E, Westermark P, Sundler F. Islet amyloid polypeptide is expressed in endocrine cells of the gastric mucosa in the rat and mouse. *Gastroenterology* 1994; 107: 712-719
- Gebre-Medhin S, Olofsson C, Mulder H. Islet amyloid polypeptide in the islets of Langerhans: friend or foe? *Diabetologia* 2000; 43: 687-695
- Yan LM, Tatarek-Nossol M, Velkova A, Kazantzis A, Kapurniotu A. Design of a mimic of nonamyloidogenic and bioactive human islet amyloid polypeptide (IAPP) as nanomolar affinity inhibitor of IAPP cytotoxic fibrillogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 2046-2051
- Knight JD, Williamson JA, Miranker AD. Interaction of membrane-bound islet amyloid polypeptide with soluble and crystalline insulin. *Protein Sci* 2008; 17:

- 1850-1856
- 5 Zhang S, Liu J, Dragunow M, Cooper GJ. Fibrillogenic amylin evokes islet beta-cell apoptosis through linked activation of a caspase cascade and JNK1. *J Biol Chem* 2003; 278: 52810-52819
- 6 Konarkowska B, Aitken JF, Kistler J, Zhang S, Cooper GJ. Thiol reducing compounds prevent human amylin-evoked cytotoxicity. *FEBS J* 2005; 272: 4949-4959
- 7 Quist A, Doudevski I, Lin H, Azimova R, Ng D, Frangione B, Kagan B, Ghiso J, Lal R. Amyloid ion channels: a common structural link for protein-misfolding disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 10427-10432
- 8 Naot D, Cornish J. The role of peptides and receptors of the calcitonin family in the regulation of bone metabolism. *Bone* 2008; 43: 813-818
- 9 German SV, Zhuikova SE, Komarov FI, Kopylova GN, Kuper GJ, Luk'iantseva GV, Samonina GE, Smirnova EA, Umarova BA. [Pancreatic hormone amylin and integrity of the gastric mucosa] *Vestn Ross Akad Med Nauk* 2001; 34-38
- 10 Guidobono F. Amylin and gastrointestinal activity. *Gen Pharmacol* 1998; 31: 173-177

■同行评价

本文选题较好, 设计合理, 结果可靠, 具有较好的学术价值。

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

•消息•

世界华人消化杂志修回稿须知

本刊讯 为了保证作者来稿及时发表, 同时保护作者与世界华人消化杂志的合法权益, 本刊对修回稿要求如下。

1 修回稿信件

来稿包括所有作者签名的作者投稿函。内容包括: (1)保证无重复发表或一稿多投; (2)是否有经济利益或其他关系造成的利益冲突; (3)所有作者均审读过该文并同意发表, 所有作者均符合作者条件, 所有作者均同意该文章代表其真实研究成果, 保证文责自负; (4)列出通讯作者的姓名、地址、电话、传真和电子邮件; 通讯作者应负责与其他作者联系, 修改并最终审核复核稿; (5)列出作者贡献分布; (6)来稿应附有作者工作单位的推荐信, 保证无泄密, 如果是几个单位合作的论文, 则需要提供所有参与单位的推荐信; (7)愿将印刷版和电子版版权转让给本刊编辑部。

2 稿件修改

来稿经同行专家审查后, 认为内容需要修改、补充或删除时, 本刊编辑部将把原稿连同审稿意见、编辑意见寄回给作者修改, 而作者必须于15 d内将修改后的稿件及光盘寄回编辑部, 同时将修改后的电子稿件上传至在线办公系统; 逾期寄回的, 作重新投稿处理。

3 版权

本论文发表后作者享有非专有权, 文责由作者自负。作者可在本单位或本人著作集中汇编出版以及用于宣讲和交流, 但应注明发表于《世界华人消化杂志》××年; 卷(期); 起止页码。如有国内外其他单位和个人复制、翻译出版等商业活动, 须征得《世界华人消化杂志》编辑部书面同意, 其编辑版权属本刊所有。编辑部可将文章在《中国学术期刊光盘版》等媒体上长期发布; 作者允许该文章被美国《化学文摘》、《荷兰医学文摘库/医学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、《中国生物学文摘》等国内外相关文摘与检索系统收录。(常务副总编辑: 张海宁 2009-03-28)