

文章编号 1006-8147(2022)02-0156-04

论 著

胆囊收缩素对小肠 I 细胞及胰腺细胞和小鼠胰腺消化酶储备的影响

徐晓晴¹, 邱帅¹, 陈喜娟¹, 胡立娟², 李秋菊¹, 张大鹏², 王丰²

(1.天津医科大学研究生院, 天津 300070; 2.天津市南开医院中西医结合急腹症研究所, 天津 300100)

摘要 目的:研究胰胆转流(PBD)术造成的高胆囊收缩素(CCK)血症对小鼠小肠 I 细胞群落及胰腺细胞和胰腺消化酶含量的影响。方法:40 只雄性 Balb/C 裸鼠随机分为 PBD 组及假手术(SO)组,每组 20 只,分别实施 PBD 术和假手术。20 d 后称重胰腺重量,并用酶联免疫吸附法测定血浆 CCK,用免疫组化法在十二指肠中测定 I 细胞群落,在胰腺中检测 CCK 受体和增殖细胞核抗原,以酶联免疫吸附法测定胰腺组织中胰蛋白酶原、脂肪酶、淀粉酶的含量。结果:PBD 组血浆 CCK 水平高于 SO 组($t=16.59, P<0.01$),胰腺重量也较 SO 组增加($t=2.51, P<0.05$);且 PBD 组十二指肠内的 I 细胞多于 SO 组($t=5.04, P<0.01$)。进一步的胰腺检测显示, PBD 组 CCK 受体表达增强($t=5.08, P<0.01$)、增殖细胞核抗原增多($t=8.05, P<0.01$);比较两组胰腺外分泌酶的组成, PBD 组胰腺中的胰蛋白酶原($t=4.31, P<0.01$)、脂肪酶($t=2.15, P<0.05$)的浓度增加;胰淀粉酶浓度虽然较 SO 组有增加的趋势,但差异无统计学意义($t=0.60, P=0.56$);PBD 组全胰蛋白酶含量($t=2.49, P<0.05$)、脂肪酶含量($t=2.02, P<0.05$)、淀粉酶含量($t=2.53, P<0.05$)均较 SO 组增高。结论:CCK 可刺激胰腺发育,使小肠 I 细胞增生,选择性地增加胰腺中的胰蛋白酶原和胰脂酶储备。

关键词 胰胆转流术;小鼠;胰腺;胆囊收缩素;分泌;酶学;细胞增殖;I 细胞

中图分类号 R57

文献标志码 A

Effects of cholecystokinin on the intestinal I cells, pancreatic cells and pancreatic digestive enzyme reserve in mice

XU Xiao-qing¹, QIU Shuai¹, CHEN Xi-juan¹, HU Li-juan², LI Qiu-ju¹, ZHANG Da-peng², WANG Feng²

(1. Graduate School, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. The Laboratory of Acute Abdomen Disease Associated Organ Injury and Repair, Nankai Hospital Affiliated to Nankai University, Tianjin 300100, China)

Abstract Objective: To study the effects of hypercholecystokin(CCK) inemia induced by pancreaticobiliary(PBD) on the proliferation of small intestinal I cell and pancreatic cells and the composition of pancreatic exocrine enzymes in mice. **Methods:** Forty male mice were randomly divided into PBD group and sham operation(SO) group, with 20 in each group. After 20 days, the weight of pancreas was weighed, and plasma CCK was determined by ELISA. The I cell that expressed CCK in the duodenum and the cells that expressed the CCK receptor(CCKR) and the proliferating cell nuclear antigen(PCNA) in the pancreas were determined by immunohistochemistry. The trypsinogen, lipase, and amylase were determined in the pancreas, using commercial kits. **Results:** The PBD group had higher plasma CCK levels, compared with SO group($t=16.59, P<0.01$). The pancreas was bigger in the PBD group than in the SO group($t=2.51, P<0.05$). When I cells were quantified in the duodenum, the PBD group showed significant increase, compare to the SO group($t=5.04, P<0.01$). The PBD group had greater expression of CCKR($t=5.08, P<0.01$) and also had more proliferating cells(PCNA positive)($t=8.05, P<0.01$), than the SO group. Further, when the composition of pancreatic exocrine enzymes was compared between the PBD and SO group, the concentration of pancreatic trypsinogen($t=4.31, P<0.01$) and lipase($t=2.15, P<0.05$) increased in PBD group. Although the concentration of pancreatic amylase increased compared with SO group, there was no statistical significance($t=0.60, P=0.56$). The trypsin content($t=2.49, P<0.05$), the lipase content($t=2.02, P<0.05$) and the amylase content($t=2.53, P<0.05$) in PBD group were higher than those in SO group. **Conclusion:** CCK stimulates pancreatic growth and also increases I cells population in small intestines and selectively increase the reserve of trypsinogen and lipase in pancreas.

Key words pancreatobiliary diversion; mouse; pancreas; cholecystokinin; secretions, enzymology; cell proliferation; I cells

食糜进入十二指肠和近段空肠后,食糜中的脂肪和蛋白分解物会刺激肠黏膜中的 I 型内分泌细胞释放胆囊收缩素(cholecystokinin, CCK)。循环中的

CCK 可刺激胰腺腺泡细胞向胰液中分泌消化酶,也使胃排空暂停并使胆囊收缩和十二指肠壶腹舒张,使胰液进入肠腔^[1]。届时,胰液中的蛋白酶会抑制 I 细胞的 CCK 分泌,使 CCK 的上述效应停止。而当这些食糜离开上段小肠后,新一轮的胃排空和 CCK 分泌开始, CCK 介导的效益再度出现;如此循环往复

基金项目 国家自然科学基金(81572318)

作者简介 徐晓晴(1994-),女,硕士在读,研究方向:胰腺癌基础研究;通信作者:王丰, E-mail: fengwangpi@163.com。

直至胃内容被全部排空^[2]。除调节消化吸收外,CCK还促进胰腺的正常生长,也参与胰腺癌的发生、发展^[3-7]。饮食或手术可提高CCK的基础分泌水平和血浓度,持续高循环水平的CCK经受体(CCKR)介导使其靶细胞长期处于活跃状态^[8],而CCK的长期刺激能否改变胰腺中消化酶的构成还不清楚。胰胆转流术(pancreatobiliary diversion,PBD)因将胰胆汁引流到远端小肠,移除了胰蛋白酶对近段小肠CCK分泌的抑制,从而造成慢性高CCK血症。PBD是CCK研究的重要模型^[3-7],过去仅在大鼠和仓鼠体内实现,近期,小鼠的PBD模型成功建立^[9]。本实验溯源小鼠PBD对十二指肠I细胞的分泌状态、胰腺细胞及消化酶含量影响。

1 材料与方法

1.1 动物分组及处置 雄性 Balb/C 裸鼠 40 只购自北京华阜康生物科技,4 周龄,体重 14~16 g。饲养于 SPF 级动物房,12 h/12 h 昼夜循环光照,自由摄食、饮水。在适应期结束后,随机分为胰胆转流术组(PBD 组, $n=20$)和假手术组(SO 组, $n=20$)。术前三溴乙醇麻醉小鼠,PBD 组手术经上腹部正中切口开腹暴露十二指肠,以胆总管(含主胰管)汇入十二指肠处为标志,在其近口侧 4 mm 和远口侧 4 mm 两处横断十二指肠,封闭游离肠段一端,另一端与末端回肠行断侧吻合,十二指肠剩余部游离端用端端吻合再建。SO 组则横断十二指肠和回肠的两处,进行再吻合^[9]。PBD 组或 SO 组术后 20 d 麻醉下处死小鼠;PBD 组剩余小鼠 15 只,而 20 只 SO 组鼠则全部存活。取内眦血分离血浆后颈脱位处死小鼠,开腹取十二指肠,放入 10%多聚甲醛中固定;取胰腺称重,将一部分放入 10%多聚甲醛固定,余部置-80℃保存。

1.2 酶联免疫吸附法测定 用上海信帆公司的 CCK 放免检测盒。取冻存的胰腺组织放入 PBS 液中,机械研磨制成匀浆,离心($5\,000\times g$, 10 min)取上清。用检测试剂盒测定胰蛋白酶原、胰脂酶和胰淀粉酶。小鼠胰脂肪酶酶联免疫吸附测定试剂盒(E-EL-M2448c)产自武汉伊莱瑞特生物科技公司,胰蛋白酶测试盒(A080-2)产自南京建成生物工程研究所,淀粉酶 ELISA 检测试剂盒(LP-M06531)产自上海岚派生物科技有限公司。

1.3 免疫组织化学法检测 石蜡包埋十二指肠和胰腺组织,制成 4 μm 厚切片。免疫组化的工具和试剂包括 ABC 免疫组织化学染色试剂盒(PK-6200, Vector laboratories, Burlingame, CA, USA)、DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒(DA1015, solarbio, 北京)、CCK 抗体(DF8515, Affinity, USA)、CCK1R 抗体(orb156289,

biorbyt, CA, USA)和增殖细胞核抗原(PCNA)抗体(#AB92552, Abcam, 北京)。以抗 CCK 抗体的免疫组化来标示 I 细胞^[10-11],每张切片选取 5 个连续视野观察,两名研究人员在未知分组情况的条件下用 Image J 调节照片的色彩阈值量化十二指肠中的 I 细胞阳性区域,计算肠道 CCK 阳性区域在总视野面积中的占比;在胰腺组织中计数表达 CCKR 或 PCNA 的细胞数目。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 22.0 统计软件,符合正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。两组间均数比较采用两独立样本均数 t 检验,多组间比较采用完全随机设计资料的单因素方差分析,不符合正态分布的计量资料,则采用相应的非参数秩和检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组胰腺 I 细胞增殖及血浆 CCK 水平 如表 1 所示,PBD 组胰腺重量明显大于 SO 组($P<0.05$),差异有统计学意义;且 PBD 组的 CCK 血浆水平也高于 SO 组($P<0.01$),差异有统计学意义。

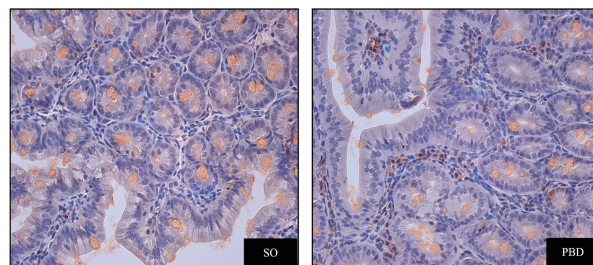
2.2 两组 I 细胞区域比较 如图 1 所示,PBD 组 I 细胞区域占比明显高于 SO 组($P<0.01$),差异有统计学意义(表 1)。

表 1 PBD 对小鼠的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 The effect of PBD on mice($\bar{x}\pm s$)

指标	SO 组($n=20$)	PBD 组($n=15$)	t	P
胰腺重量(mg)	273.81 \pm 19.43	364.82 \pm 32.93	2.51	<0.05
血浆 CCK(pmol/L)	1.83 \pm 0.05	3.85 \pm 0.13	16.59	<0.01
I 细胞区域占比(%)	5.54 \pm 1.24	14.42 \pm 3.72	5.04	<0.01
CCKR 阳性细胞(%)	24.41 \pm 3.16	49.68 \pm 3.90	5.08	<0.01
PCNA 阳性细胞(%)	13.26 \pm 1.67	44.62 \pm 3.92	8.05	<0.01

注:SO 组:假手术组;PBD 组:胰胆转流术组;CCK:胆囊收缩素;CCKR:胆囊收缩素受体;PCNA:增殖细胞核抗原



注:SO:假手术组;PBD:胰胆转流术组;棕色为 I 细胞阳性区域

图 1 两组 I 细胞免疫组化结果(400 \times)

Fig 1 Immunohistochemical of I cells in two groups(400 \times)

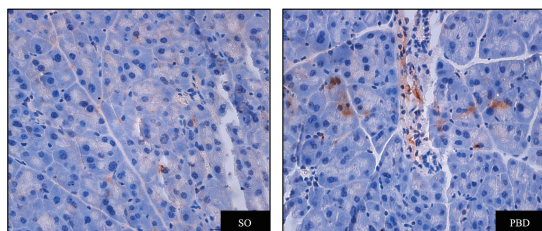
2.3 两组 CCKR 受体比较 如图 2 显示,PBD 组 CCKR 的表达明显较 SO 组增强($P<0.01$),差异有统计学意义(表 1)。

2.4 两组 PCNA 比较 如图 3 所示,PBD 组的 PC-

NA 阳性率明显高于 SO 组($P<0.01$), 差异有统计学意义(表 1)。

2.5 两组消化酶含量比较 如表 2 所示, 与 SO 组相比, PBD 组胰蛋白酶原和胰脂酶的浓度升高(均

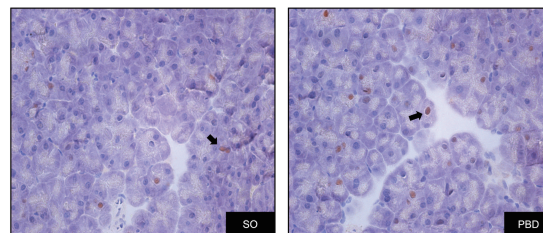
$P<0.05$); 而淀粉酶的水平虽有所上升, 但差异无统计学意义($P=0.56$)。上述结果与胰腺重量进行整合计算消化酶在胰腺中的总量时, 发现与 SO 组相比, PBD 组的结果均高于 SO 组(均 $P<0.05$)。



注: CCKR: 胆囊收缩素受体; SO: 假手术组; PBD: 胰胆转流术组; 棕色为 CCKR 阳性区域

图 2 两组 CCKR 的表达(400×)

Fig 2 The expression of CCKR in two groups(400×)



注: PCNA: 增殖细胞核抗原; SO: 假手术组; PBD: 胰胆转流术组; 箭头标示棕色颗粒为 PCNA 阳性

图 3 两组 PCNA 的表达(400×)

Fig 3 The expression of PCNA in two groups(400×)

表 2 两组胰腺消化酶比较($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 The concentrations of pancreatic digestive enzyme in two groups($\bar{x} \pm s$)

指标	SO 组(n=20)	PBD 组(n=15)	t	P
胰蛋白酶原浓度(U/μg)	8.88±0.99	18.64±2.27	4.31	<0.01
胰脂肪酶浓度(ng/g)	24.95±1.43	29.96±1.90	2.15	<0.05
胰淀粉酶浓度(U/ng)	1.19±0.14	1.32±0.16	0.60	0.56
全胰蛋白酶含量(10^4 U/pancreas)	7.43±1.01	12.44±1.91	2.49	<0.05
全胰脂肪酶含量(ng/pancreas)	7.19±0.73	9.61±0.98	2.02	<0.05
全胰淀粉酶含量(10^3 U/pancreas)	0.74±0.53	1.28±0.74	2.53	<0.05

注: SO: 假手术组; PBD: 胰胆转流术组

3 讨论

大鼠和仓鼠的 PBD 是 CCK 研究的经典模型^[3-7]。近期, PBD 模型在鼠体内成功建立^[9]。这一模型的建立, 使 PBD 可以和一些常见小鼠的模型(如转基因鼠和裸鼠)结合, 以深入研究 CCK 在一些生理、病理状态下的调节作用^[12-13]。在众多的 PBD 研究中, “PBD 后 I 细胞是否有反应性增生”这一问题在此前一直未被涉及。本实验结果中, PBD 术后 20 d 小鼠所表现出的高 CCK 血症及其在胰腺中引发的各种改变, 其起因仅来自 I 细胞的高分泌状态, 也来自 I 细胞群落的代偿性增生, 说明代偿的快速和高效。

研究显示, 由 PBD 导致的高 CCK 血症对胰腺生长具有刺激作用, 但在这些研究中, CCKR 的结果却缺如^[4-5]。此次 PBD 对胰腺生长的刺激作用与其对胰腺 CCKR 表达的刺激同时发生, 说明该受体介导了 PBD 对胰腺细胞增殖的刺激。

Axelson 等^[4]报道, 早期 PBD 手术可使胰蛋白酶浓度升高, 但不提高胰淀粉酶的分泌能力; Hara 等^[4]同样报告了 PBD 可降低胰淀粉酶活性, Fölsch 等^[1]的研究中, 胰蛋白酶和胰淀粉酶水平可提高。本研

究中发现高 CCK 血症能够增加胰腺中胰蛋白酶原和脂肪酶的浓度, 但不显著影响淀粉酶。CCK 能选择性地增加胰腺蛋白酶和脂肪酶的丰度但不显著改变淀粉酶的丰度, 这一结果提示胰腺中不同的消化酶是以一种分隔的方式储备的^[15]。这一分隔既可发生在细胞水平, 也可发生在亚细胞水平。例如, 不同的腺泡细胞可富含不同的消化酶, 而富含胰蛋白酶和脂肪酶的细胞又较富含淀粉酶的细胞更容易对 CCK 的刺激做出反应。抑或, 不同的消化酶可在同一细胞中富集于不同的分泌颗粒中, 当 CCKR 被激活后, 细胞优先把富含胰蛋白酶和脂肪酶的分泌颗粒排放到细胞外。值得注意的是, CCK 对胰蛋白酶和脂肪酶的刺激与食糜中的蛋白和脂肪刺激 I 细胞 CCK 分泌是一致的, 促使其在进食后状态完成 CCK 分泌的正反馈。

本研究利用小鼠 PBD 造成的高 CCK 血症发现, CCK 能选择性地增加胰腺中胰蛋白酶原和胰脂肪酶的储备, 并证实持续的 CCK 高分泌伴随着 I 细胞群落的增大。在后续的研究中, 鉴于内源性 CCK 的异常表达与胰腺生长及消化酶分泌相关, 将进一步用以研究与饮食及肥胖相关的胰腺癌发展机制。

参考文献:

- [1] FÖLSCH U R, CANTOR P, WILMS H M, et al. Role of cholecystokinin in the negative feedback control of pancreatic enzyme secretion in conscious rats[J]. *Gastroenterology*, 1987, 92(2): 449–458.
- [2] OWYANG C, LOUIE D S, TATUM D. Feedback regulation of pancreatic enzyme secretion. Suppression of cholecystokinin release by trypsin[J]. *J Clin Invest*, 1986, 77(6): 2042–2047.
- [3] HARA H, OHYAMA S, HIRA T. Luminal dietary protein, not amino acids, induces pancreatic protease via CCK in pancreaticobiliary-diverted rats[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 278(6): G937–G945.
- [4] AXELSON J, JANSEN C, STERNBY B, et al. Pancreatic growth after pancreatico-biliary diversion does not increase the capacity to secrete amylase[J]. *Eur Surg Res*, 1999, 31(2): 187–195.
- [5] GASSLANDER T, AXELSON J, HAKANSON R, et al. Cholecystokinin is responsible for growth of the pancreas after pancreatico-biliary diversion in rats[J]. *Scand J Gastroenterol*, 1990, 25(10): 1060–1065.
- [6] WATANAPA P, FLAKS B, OZTAS H, et al. Inhibitory effect of a cholecystokinin antagonist on pancreatic carcinogenesis after pancreaticobiliary diversion[J]. *Br J Cancer*, 1993, 67(4): 663–667.
- [7] CHU M, REHFELD J F, BORCH K. Chronic endogenous hypercholecystokininemia promotes pancreatic carcinogenesis in the hamster[J]. *Carcinogenesis*, 1997, 18(2): 315–320.
- [8] GIBBONS C, FINLAYSON G, CAUDWELL P, et al. Postprandial profiles of CCK after high fat and high carbohydrate meals and the relationship to satiety in humans[J]. *Peptides*, 2016, 77: 3–8.
- [9] CHEN X, QIU S, LI Q, et al. Pancreatobiliary diversion in the mouse[J]. *Eur Surg Res*, 2020, 61(4/5): 130–135.
- [10] KATO T, HARADA N, IKEGUCHI-OGURA E, et al. Gene expression of nutrient-sensing molecules in I cells of CCK reporter male mice[J]. *J Mol Endocrinol*, 2021, 66(1): 11–22.
- [11] FAKHRY J, WANG J, MARTINS P, et al. Distribution and characterisation of CCK containing enteroendocrine cells of the mouse small and large intestine[J]. *Cell Tissue Res*, 2017, 369(2): 245–253.
- [12] HINGORANI S R, PETRICIOIN E F, Maitra A, et al. Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse[J]. *Cancer Cell*, 2003, 4(6): 437–450.
- [13] WANG F, KUMAGAI-BRAESCH M, HERRINGTON M K, et al. Increased lipid metabolism and cell turnover of MiaPaCa2 cells induced by high-fat diet in an orthotopic system[J]. *Metabolism*, 2009, 58(8): 1131–1136.
- [14] HARA H, OHYAMA S, HIRA T. Endogenous cholecystokinin plays a role in down-regulation of pancreatic amylase independent of dietary carbohydrate in rats[J]. *Regul Pept*, 2001, 99(2/3): 103–110.
- [15] WILLIAMS J A. Cholecystokinin (CCK) regulation of pancreatic acinar cells: physiological actions and signal transduction mechanisms[J]. *Compr Physiol*, 2019, 9(2): 535–564.

(2021-09-07 收稿)

·读者·作者·编者·

《天津医科大学学报》对缩略语的使用说明

文题原则上不能使用缩略语,文中应尽量减少缩略语。公认的缩略语在文中可以直接使用。未公布的名词术语,请按照如下规则进行缩写:原词过长且在文中出现3次以上者,可在第一次出现时写出全称,并在括号内写出缩略语。不超过5个汉字的名称不宜使用缩略语,以免影响文章的可读性。

缩略语	中文名称	缩略语	中文名称
ADA	美国糖尿病协会	MRI	磁共振成像
CT	电子计算机体层扫描	MtDNA	线粒体 DNA
ELISA	酶联免疫吸附试验	OR	优势比
HE	苏木素-伊红	PCR	聚合酶链反应
HIV	人类免疫缺陷病毒	PET	正电子发射断层摄影术
HbA _{1c}	糖化血红蛋白	Real-time PCR	实时定量聚合酶链反应
HR	风险比	RT-PCR	反转录聚合酶链反应
ICU	重症监护治疗病房	WHO	世界卫生组织

本刊编辑部