

FGFR3 在小鼠小肠发育阶段的作用

朱渝军 黄显凯

摘要 目的 探讨 FGFR3 在小鼠小肠发育阶段的作用。方法 观察同窝野生小鼠及 FGFR3 增强小鼠出生后小肠上皮形态学的变化及增生情况和 FGFR3 表达变化。结果 FGFR3 增强小鼠绒毛分布密度及绒毛高度均差于同年龄野生小鼠,但隐窝深度却是相反的。增生的细胞主要位于肠隐窝部位,FGFR3 增强突变小鼠在各时相点细胞增生均强于野生小鼠。小鼠出生后 1 天小肠即有 FGFR3 表达,7~21 天表达较多,35 天后表达减少。免疫组化检测 FGFR3 表达位于肠隐窝部位,与 Brdu 表达信号部位相重叠。结论 FGFR3 在发育阶段促进小鼠肠隐窝形成。

关键词 FGFR3 增生小肠

The Effects of FGFR3 in Development Phase of Murine Small Intestine. Zhu Yujun, Huang Xiankai. Department of General Surgery, PLA 324 Hospital, Chongqing 400020, China

Abstract Objective To investigate the effect of fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) in development phase of murine small intestine. **Methods** Wild type mice and their littermate FGFR3⁺ mice were used to observe their morphology and proliferation characteristics of epithelia of small intestine in development phase and changes of FGFR3 expression. **Results** Mutant mice had lower density and their villa were lower than those of the controls. But to the depth of crypt, the results were conversely. Cells in proliferation mainly located in intestine crypt. Mutant mice had more proliferation than the controls at every time point. Expression of FGFR3 was detected at birth (day 1), and the expression was maximal from day 7 to day 21, decreasing rapidly thereafter to reach the relatively low at day 35. And the expression of FGFR3 also located in intestine crypt, overlapping with that of Brdu. **Conclusion** FGFR3 improves formation of murine intestine crypt in development phase.

Key words Fibroblast growth factor receptor 3; Proliferation; Small intestine

正常的胃肠上皮发生是一个复杂的多步骤过程,需要来自周围间充质的诱导信号来指挥合适的建筑排列和上皮的局部分化。在鼠类,小肠隐窝的形成最早于出生后由绒毛间上皮内陷开始,在出生后 3~44 周基本完成。然而,尽管有大量的证据表明在肠发育时期在间充质来源的细胞和上皮细胞之间的信息交流对引导上皮正常发育至关重要,但许多这些信号的本质还不清楚。

近年来发现的成纤维细胞因子是对肠上皮生长和功能有重要调节作用的多肽,它们通过与其受体结合激活酪氨酸激酶活性,引起受体的自磷酸化随后进入不同的信号传递途径发挥作用^[1]。而成纤维细胞因子受体在胃肠道的生物学活性却少有报道。有研究表明^[2] FGFR3 介导的信号传导在调节与肠上皮正常发育相关的事件中可能起了重要作用。本实验通

过观察同窝野生小鼠及 FGFR3 增强小鼠出生后小肠上皮形态学的变化及增生情况和 FGFR3 表达变化,明确 FGFR3 的信号传导在调节与肠发育相关的形态形成事件中所起的作用。

材料与方法

1. 实验动物及分组: Fgfr3^{369/+} 基因工程小鼠^[3]及 C57BL/6J 小鼠,由大坪医院野战外科研究所创伤中心实验室提供。将雄性 Fgfr3^{369/+} 基因工程小鼠和雌性 C57BL/6J 小鼠交配, F1 代胎鼠或新生小鼠进行基因型鉴定,按照基因型分为野生型和突变型两组。每个时间点不同基因型各取 6 只小鼠。

2. 实验方法: (1) Fgfr3^{369/+} 基因工程小鼠的鉴定: 提取小鼠鼠尾基因组 DNA, 采用引物对进行 PCR 扩增鉴定, FGFR3 引物序列上游引物: 5' - CCG GGG GAA AGC TTG AAA A - 3', 下游引物: 5' - TGT AAA AGG GGT GGG GTG GTA G - 3'。采用 25 μl 体系, 反应条件为: 94℃ 4min; 94℃ 30s; 58℃ 30s; 72℃ 1min; 34 个循环; 72℃ 10min; 4℃ 15min。PCR 产物凝胶电泳后, 突变型小鼠可以看到两个平行的条带, 野生型小鼠只有一个条带, 以此区分。 (2) 组织学方法观察: FGFR3 增强突变小鼠与野生小鼠出生后第 1、7、14、21、28、35 天肠上皮发育过程中的组织形态学和超微结构变化: ①显微镜测量小肠绒毛高度及隐窝深度; 肠组织 HE 染色切片, 光镜下应用 MPIAS

基金项目: 重庆市自然科学基金 (CSTC - 2006BB5056)

作者单位: 400020 重庆, 解放军 324 医院普外科 (朱渝军); 重庆, 第三军医大学大坪医院创伤科 (黄显凯)

500 多媒体彩色病理图文分析系统测定肠黏膜绒毛高度(μm);②HITACHI S3400N 扫描电镜观察小肠绒毛。(3)肠上皮增生能力检测:用溴脱氧尿苷(BrdUrd,美国 Sigma 公司)标记 7、14、21、28、35 天两组小鼠小肠上皮 S 期细胞[方法:按 $100\mu\text{g/g}$ (体重)剂量腹腔注射,2h 后取材],免疫组化(SABC 法)检测其阳性表达情况。石蜡切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化;3% 过氧化氢 37°C 10min;0.1% 胰蛋白酶 37°C 20min;非免疫性动物血清封闭液 37°C 15min;一抗(Fgfr3 抗体,美国 Sigma 公司,抗体稀释液稀释 1000 倍) 4°C 过夜;生物素标记的二抗, 37°C 15min;SA/HRP, 37°C 15min;PBS 5min $\times$ 2;DAB 液(1ml 蒸馏水中加 D、A、B 液各 1 滴)显色, RT 5 ~ 10min;苏木素复染、脱水、透明、中性树胶封片。光学显微镜下见到细胞核着棕褐色者为阳性染色细胞。(4)免疫组化(SABC 法)检测两组小鼠小肠组织 FGFR3 的表达情况:石蜡切片,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化;3% 过氧化氢 37°C 10min;微波炉中抗原修复 10min;非免疫性动物血清封闭液 37°C 15min;一抗(BrdU 抗体,美国 Santa Cruz 公司,抗体稀释液稀释 100 倍) 4°C 过夜;生物素标记的二抗, 37°C 15min;SA/HRP, 37°C 15min;PBS 5min $\times$ 2;DAB 液(1ml 蒸馏水中加 D、A、B 液各 1 滴)显色, RT 5 ~ 10min;苏木素复染、脱水、透明、中性树胶封片。光学显微镜下见到细胞核着棕褐色者为阳性染色细胞。(5)提取 1、7、14、21、28、35 天两组小鼠小肠组织 RNA,通过 RT-PCR 扩增后进行凝胶电泳半定量检测 FGFR-3 在各时相的表达水平:用 TRIzol 法(Invitrogen Trizol,美国 Invitrogen 公司)提取小肠总 RNA,分光光度仪测定波长 260 nm 和 280nm 处的吸光度(A)值,按 A_{260}/A_{280} 判定总 RNA 纯度。以 $1\mu\text{g}$ 总 RNA 反转录(PrimeScriptTM Reverse Transcriptase,大连 TaKaRa 公司),采用 $10\mu\text{l}$ 体系,反应条件如下: 37°C 15min; 85°C 5s。后取 $1\mu\text{l}$ cDNA 进行 PCR 反应,按 $25\mu\text{l}$ 体系配混合液,以环孢素 A 结合蛋白(cyclophilinA)为内参对照,引物序列为上游引物:5'-CGA GCT CTG AGC ACT GGA GA-3',下游引物:5'-TGG CGT GTA AAG TCA CCA CC-3';FGFR3 引物序列为上游引物:5'-GCT CCC TGT CCT GCC TCG TG-3',下游引物:5'-TGT AAA AGG GGT GGG GTG GTA G-3'。反应条件为: 94°C 5min 预热; 94°C 30s 变性; 62°C 30s 退火; 72°C 30s 延伸;35 个循环; 72°C 充分延伸 5min。后取 PCR 产物 $25\mu\text{l}$,经 20g/L 琼脂糖凝胶电泳后,采用 quantity one 软件成像后比较。

结 果

1. 两组小鼠出生后各时间点小肠上皮发育过程中的形态变化:显微镜下观察小肠绒毛发现突变小鼠绒毛高度在出生后各时间点均低于同年龄野生小鼠,见图 1;但隐窝深度却是相反的,见图 2。

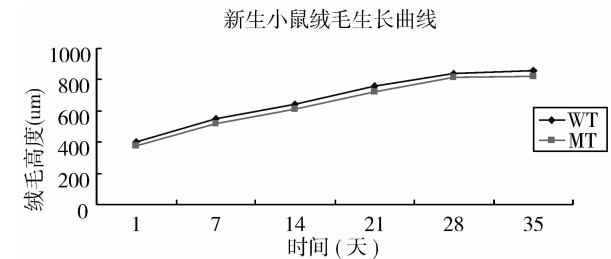


图 1 新生小鼠空肠绒毛生长曲线

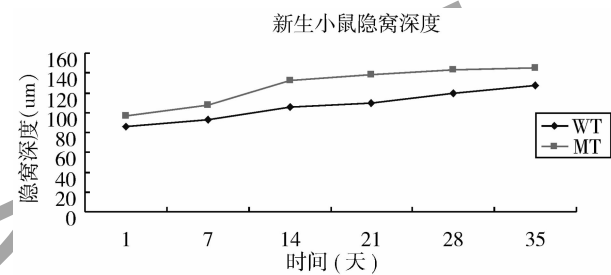


图 2 新生小鼠空肠隐窝深度生长曲线

2. Fgfr3 增强突变小鼠与野生小鼠出生后各时间点小肠上皮增生水平:增生的细胞主要位于肠隐窝部位,出生后 7 ~ 21 天,增生明显,35 天增生明显减弱。FGFR3 增强突变小鼠在各时相点表达均强于野生小鼠,见封三彩图 2 ~ 彩图 5(均为 DAB 染色, $\times 400$)。

3. Fgfr3 增强突变小鼠与野生小鼠出生后小肠 FGFR3 表达水平:小鼠小肠出生后 1 天即有 FGFR3 表达,7 ~ 21 天表达较多,35 天后表达减少,见表 1。免疫组化检测出生后第 14 天两组小鼠小肠组织 FGFR3 的表达情况。如封三彩图 6、彩图 7 所示,FGFR3 表达位于肠隐窝部位,与 BrdU 表达信号部位相重叠。

表 1 FGFR3 出生后表达相对水平

组别	时间(天)					
	1	7	14	21	28	35
WT	73.68 $\pm$ 10.32	108.96 $\pm$ 16.91	123.31 $\pm$ 19.83	110.44 $\pm$ 15.30	71.90 $\pm$ 8.37	42.12 $\pm$ 5.25
MT	105.91 $\pm$ 9.12	158.61 $\pm$ 18.08	230.65 $\pm$ 26.76	147.62 $\pm$ 17.18	103.09 $\pm$ 9.46	70.36 $\pm$ 6.32

讨 论

在消化道发育期间,正在发育的肠的间充质来源

的细胞和上皮细胞之间的交流对指导正常的上皮发育模式至关重要。但是,许多在胃肠道发育中调节形

态形成事件的信号的本质还鲜为人知。以前的研究已经证实通过 FGFR3 传导信号在其他一些组织调节发育过程中起到重要作用^[4]。这些观察报告和我们证明了的 FGFR3 在未分化肠上皮中发育时期特异性的表达都强烈支持以下假说,即成纤维细胞生长因子通过 FGFR3 传导信号是一个细胞间的交流通路,它可能在正常肠发育中对调节形态形成事件起到重要作用。

已经观察到的 FGFR3 表达在发育中的时期特异性的改变证实这个受体的一个主要功能是调节隐窝形成。在本实验中,我们证明 FGFR3 严格在肠隐窝表达,而未分化上皮就在肠隐窝中表达,与之前的报道一致^[2],在乳鼠的肠(出生后 7~21 天)发育时期,我们发现 FGFR3 表达增加,而且也具备形成小肠的隐窝以及隐窝数目增加的特点,另外在这一时期,Brdu 表达信号也明显增强。突变小鼠隐窝深度大于野生小鼠间接表明 FGFR3 促进隐窝形成。通过 FGFR3 传导信号可能潜在地调节许多与隐窝形成有关的一些进程,包括上皮组织内陷入周围的间充质,在隐窝形成过程中上皮细胞的空间重排,上皮干细胞和母代细胞的命运,新生隐窝的细胞复制,隐窝分裂或谱系定型和分化。许多证据表明在调节肠上皮细胞和其他细胞类型的细胞增生中存在 FGFR3 的激活。例如,体外的应用培育的 Caco2 细胞表达 FGFR3 的研究表明调节其受体影响这些细胞的增生反应^[2]。细胞表面的 FGFR3 不在全部转化-增生细胞群表达,而是局限在下半部分的隐窝的小部分复制细胞亚群表达。这个部位由上皮干细胞和未分化的母代细胞占据,最终不同的上皮细胞谱系都是由它们转化来的。这表明 FGFR3 在隐窝形态形成中就调节干细胞的命运或增生起到严格限制的作用。

细胞表面的 FGFR3 只在下部的隐窝表达,与反映增生信号的 Brdu 处在同一部位,表明 FGFR3 的激活可能刺激细胞的增生,另外的报告提供证据表明 FGFR3 的激活能调节细胞的分化^[5]。FGFR3 激活对一种特定细胞类型增生和(或)分化的最终效应有赖于特别的生理的或发育的内容。比如,Iwata^[6]等人最近证实在鼠胚胎中导入定向的,持续激活的 FGFR3 导致在短暂的时间(胚胎 14~15 天)发生增强的生长板软骨细胞增生而在整个骨发育时期呈分化抑制。

FGFR3 在肠发育过程中通过什么机制来发挥作用还不清楚。FGFR3 能激活一些下游的信号传导通

路,包括 STAT1/3,PI-3 激酶依赖的,PLC- γ 依赖的和 Ras/Raf/mitogen 激活蛋白酶依赖的信号传导级联^[7,8]。然而,确定在体内哪种下游信号传导通路被 FGFR3 介导的信号传导激活以及这些信号传导事件对上皮发育的关系仍需要进一步的研究。

不仅有许多种类的受体形式存在,而且它和许多的 FGFs 的结合不具有唯一特异性,都使理解 FGFR3 在调节组织形态形成中的作用变得更复杂,并且它和其他的 FGF 受体的配体结合特性有重叠^[9]。因此,其他的 FGFRs 也可能在出生后发生的肠形态形成事件中发挥作用。例如,FGFR2 IIIb (KGF 受体),和它的特异性的配体 FGF7 (KGF) 和 FGF10,都被证实在整个胃肠道中表达^[10]。在体外,表明 FGFR2 IIIb 与肠损伤后的上皮再生和促进一种人结肠上皮细胞系分化成杯状细胞有关^[11]。这些数据表明 FGFR2 IIIb 也可能调节肠上皮发育的有关事件。然而,目前对在出生后胃肠道发生的上皮形态形成时期中的发育时相特异性的,局部的和细胞特异性的 FGFR1、FGFR2 和 FGFR4 的表达都还不清楚。因此,对出生后肠形态形成过程中的每一个关于这些受体的表达的系统都需要评估它们是否可能调节这个发育时期中出现的形态形成事件。

既然我们的结果表明 FGFR3 表达于肠隐窝,可能参与调节位于隐窝部分的上皮干细胞和未分化的母代细胞的增生并促进隐窝形成,因此,需要研究来确定体内直接控制这个信号传导通路的生物效应以便更精确地理解在肠发育过程中 FGFR3 介导的信号传导的重要功能和确定调节这些过程的潜在的分子机制。

参考文献

- 1 Katoh M, Katoh M. FGF signaling network in the gastrointestinal tract [J]. *Int J Oncol*, 2006,29(1):163-168
- 2 Vidrich A, Buzan JM, Ilo C, *et al*. Fibroblast growth factor receptor-3 is expressed in undifferentiated intestinal epithelial cells during murine crypt morphogenesis [J]. *Dev Dyn*, 2004,230(1):114-123
- 3 Chen L, Adar R, Yang X, *et al*. Gly369Cys mutation in mouse FGFR3 causes achondroplasia by affecting both chondrogenesis and osteogenesis. *J Clin Invest*. 1999,104(11):1517-1525
- 4 Pringle NP, Yu WP, Howell M, *et al*. Fgfr3 expression by astrocytes and their precursors: evidence that astrocytes and oligodendrocytes originate in distinct neuroepithelial domains. *Development*, 2003,130:93-102
- 5 Oh LY, Denninger A, Colvin JS, *et al*. Fibroblast growth factor receptor 3 signaling regulates the onset of oligodendrocyte terminal differentiation. *J Neurosci*, 2003,23:883-894

- 6 Iwata T, Chen L, Li C, *et al.* A neonatal lethal mutation in FGFR3 uncouples proliferation and differentiation of growth plate chondrocytes in embryos. *Hum Mol Genet*, 2000, 9:1603 - 1613
- 7 Hart KC, Robertson SC, Donoghue DJ. Identification of tyrosine residues in constitutively activated fibroblast growth factor receptor 3 involved in mitogenesis, Stat activation, and phosphatidylinositol 3 - kinase activation. *Mol Biol Cell*, 2001, 12: 931 - 942
- 8 Kong M, Wang CS, Donoghue DJ. Interaction of fibroblast growth factor receptor 3 and the adapter protein SH2 - B. A role in STAT5 activation. *J Biol Chem*, 2002, 277: 15962 - 15970
- 9 Ornitz DM, Itoh N. Fibroblast growth factors. *Genome Biol*, 2001, 2:

Reviews 3005

- 10 Han DS, Li F, Holt L, *et al.* Keratinocyte growth factor - 2 (FGF - 10) promotes healing of experimental small intestinal ulceration in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2000, 279: G1011 - G1022
- 11 Iwakiri D, Podolsky DK. Keratinocyte growth factor promotes goblet cell differentiation through regulation of goblet cell silencer inhibitor. *Gastroenterology*, 2001, 120: 1372 - 1380

(收稿:2009 - 10 - 26)

(修回:2009 - 12 - 03)

不同病因导致的应激性胃黏膜损伤及其血液 ET、TNF - α 的改变

张宏亮 徐 杨 范 晓

摘 要 目的 探讨不同病因导致的应激性胃黏膜损伤改变及其血液中 ET、TNF - α 的浓度变化及二者的关系。方法 通过建立急性甲胺磷中毒及急性心肌梗死动物模型,采用胃黏膜溃疡指数评定是否发生胃黏膜损伤,应用放射免疫分析法测定应激性胃黏膜损伤时血液中 ET、TNF - α 的变化。结果 (1)成功建立大鼠急性甲胺磷中毒及急性心肌梗死动物模型。(2)急性甲胺磷中毒及急性心肌梗死两种应激状态下胃黏膜发生了损伤。(3)不同病因所致应激性胃黏膜损伤时血液中 ET、TNF - α 浓度增加。结论 (1)临床危重疾病的应激状态下胃黏膜发生了损伤,胃黏膜溃疡指数增加。(2)不同病因所致的应激性胃黏膜损伤时血液中 ET、TNF - α 浓度增加,表明 ET、TNF - α 在应激性胃黏膜损伤时有重要作用。

关键词 应激 溃疡指数 内皮素 肿瘤坏死因子

Study of the Changes of Endothelin, Tumor Necrosis Factor in Different Stress - related Gastric Mucosal Disease. Zhang Hongliang, Xu Yang, Fan Xiao. The Second Xiangya Hospital of Central South University, Emergency Department, Hunan 410011, China

Abstract Objective To observe the changes of Endothelin, Tumor Necrosis Factor in different stress; and to explore the correlation between the changes of Endothelin, Tumor Necrosis Factor and the occurrence of stress - related gastric mucosal disease. **Methods** The models of the acute methamidophos poison and the acute myocardial infarction in rats were made. The gastric ulcer index was counted and the content of blood plasma Endothelin and blood serum Tumor Necrosis Factor were checked. **Results** Models of the acute methamidophos poison and the acute myocardial infarction in rats were set up successfully. The gastric ulcer index of rats in the stress groups increased. The blood plasma Endothelin and blood serum Tumor Necrosis Factor in the stress group were significantly higher than those in the control group. **Conclusion** The gastric mucosal disease under different stress was observed with the gastric mucosal ulcer index. The blood plasma Endothelin and blood serum Tumor Necrosis Factor under different stress were increased, suggesting they play an important role in this phenomenon.

Key words Stress; Ulcer index; Endothelin; Tumor necrosis factor

应激是生活中常见的致病因素,机体在应激状态下,如严重创伤、中毒、急性心肌梗死等,可发生急性胃黏膜损伤或应激性溃疡(stressulcer, SU)并出血。

SU 的病理生理过程涉及机体神经内分泌失调、体液因子改变、胃黏膜屏障功能削弱及胃黏膜损伤因素作用相对增强等诸多方面。在体液因子改变的方面,内皮素(ET)和肿瘤坏死因子(TNF - α)引起了越来越多研究者的注意。ET 是一种强烈的血管张力调节因子, TNF - α 是一种具有多种生物学活性的细胞因