

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.10.004

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210108.1415.004.html\(2021-01-10\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210108.1415.004.html(2021-01-10))

促红细胞生成素对短肠综合征大鼠适应后期 Hippo/YAP 信号通路及干细胞分化的影响^{*}

尹 光,孔文成,袁文琴,郑斯鑫,应荣超[△]

(浙江大学医学院附属杭州市第一人民医院胃肠肛外科 310000)

[摘要] **目的** 探讨促红细胞生成素(Epo)对短肠综合征(SBS)大鼠适应后期干细胞分化及 Hippo/Yes 相关蛋白(YAP)信号通路的影响。**方法** 将 16 只成功建立的 SBS 大鼠模型分为模型组和 Epo 组,每组 8 只;另选 8 只为假手术组,只行肠横断和再吻合。Epo 组隔日皮下注射 157 μ/kg Epo,每周 3 次,持续 2 个月;其余两组注射等体积生理盐水。术前、术后 7 d,药物治疗 2 个月后称量体重;苏木精-伊红(HE)染色观察肠道组织学情况;阿利新蓝染色观察肠黏膜杯状细胞情况;免疫组织化学观察肠黏膜内分泌细胞、潘式细胞情况;Western blot 检测肠组织 YAP、转录共激活因子 PDZ 结合基序(TAZ)蛋白表达情况。**结果** 术后 7 d,与假手术组比较,模型组、Epo 组体重降低($P<0.05$)。治疗 2 个月后,与假手术组比较,模型组体重降低($P<0.05$);与模型组比较,Epo 组体重增加($P<0.05$)。假手术组肠道肌层层次清晰,黏膜上皮完整清晰;模型组黏膜腺体较多,出现细胞浸润现象;Epo 组肌层层次较清晰、细胞浸润现象缓解。与假手术组比较,模型组环状肌、纵肌厚度,绒毛长度、隐窝深度均增加($P<0.05$);杯状细胞、潘式细胞相对数量,YAP、TAZ 蛋白水平降低($P<0.05$)。与模型组比较,Epo 组环状肌、纵肌厚度,绒毛长度、隐窝深度均增加($P<0.05$);杯状细胞、潘式细胞相对数量,YAP、TAZ 蛋白水平升高($P<0.05$)。**结论** Epo 在 SBS 大鼠适应后期可促进干细胞分化从而增加环状肌、纵肌厚度,绒毛长度、隐窝深度,可能是通过激活 Hippo/YAP 信号通路而实现。

[关键词] 促红细胞生成素;短肠综合征;干细胞分化;Hippo/Yes 相关蛋白信号通路
[中图分类号] R574.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)10-1638-05

Effects of erythropoietin on Hippo/YAP signaling pathway and stem cell differentiation during late adaptation period in rats with short bowel syndrome^{*}

YIN Guang, KONG Wencheng, YUAN Wenqin, ZHENG Sixin, YING Rongchao[△]

(Department of Gastroenterological and Anorectal Surgery, Affiliated Hangzhou Municipal First People's Hospital, Medical College of Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of erythropoietin (Epo) on the differentiation of stem cells and the signal pathway of Hippo/Yes-associated protein (YAP) during the late adaptation period in the rats with short bowel syndrome (SBS). **Methods** The SBS rat 157 models established by 16 rats were divided into the model group and Epo group, 8 cases in each group. The other 8 rats were selected as the sham operation group, which only conducted the intestine transection and re-anastomosis. The Epo group was subcutaneously injected by 157 μ/kg Epo on alternate day, three times per week, for continuous 2 months. The other two groups were injected by the same volume of normal saline. The body weight was measured before operation, on postoperative 7 d and in 2 months after medication treatment; hematoxylin eosin (HE) staining was used to observe the intestinal histology; Alixin blue staining was used to observe the goblet cells of intestinal mucosa; the endocrine cells and Pan cells of intestinal mucosa were observed by immunohistochemistry; and the expressions of YAP and transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ) was detected by Western blot. **Results** Compared with sham operation group, the body weight on postoperative 7 d in the model group and Epo group was decreased ($P<0.05$). In 2 months after the treatment, compared with the sham operation group, the body weight of the model group was decreased ($P<0.05$); compared with the model group, the body

^{*} 基金项目:浙江省自然科学基金项目(LQ17H030001)。 作者简介:尹光(1984—),主治医师,硕士,主要从事胃肠肿瘤与营养研究。

[△] 通信作者, E-mail: 2137744796@qq.com。

weight in the Epo group was increased ($P < 0.05$). In the sham operation group, the intestinal muscular layers were clear and the epithelium of mucosa was complete and clear; in the model group, there were more mucosa glands and cell infiltration; in the Epo group, the muscular layers were clear and the phenomenon of cell infiltration was alleviated. Compared with the sham operation group, the thicknesses of circular and longitudinal muscles, the length of villi and the depth of crypt in the model group were increased ($P < 0.05$); the relative numbers of goblet cells, and Pan cells and the levels of YAP and TAZ proteins were decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the thicknesses of circular and longitudinal muscles, the length of villi and the depth of crypt in the Epo group were increased ($P < 0.05$); the relative numbers of goblet cells and Pan cells, and the levels of YAP and TAZ protein were increased ($P < 0.05$). **Conclusion** Epo during the late adaptation period in the rats with short bowel syndrome can promote the differentiation of stem cells, thus increase the thicknesses of circular and longitudinal muscles, the length of villi and the depth of crypt, which may be achieved by activating the Hippo/YAP signal pathway.

[Key words] erythropoietin; short bowel syndrome; stem cell differentiation; Hippo/Yes-associated protein signaling pathway

短肠综合征(SBS)是指肠道恶性肿瘤等导致小肠需切除,通过切除小肠缓解原有疾病,但术后残肠小于 200 cm,肠道对营养、液体和电解质的吸收减少,导致体重减轻、腹泻和营养不良等症状,影响机体健康^[1]。残肠段若从肠功能衰竭中恢复过来,肠道黏膜吸收面积增加和对营养物质吸收增加,可防止肠衰竭,进而缓解疾病,是治疗的关键^[2]。肠黏膜再生过程中包括多种细胞增殖、分化、凋亡过程,其中干细胞分化在受到外界刺激后,分化为具有特殊结构和功能的终末细胞,可修复并重建小肠黏膜上皮屏障,实现对肠道的保护^[3]。因此,促进干细胞定向分化在缓解 SBS 中具有重要意义。促红细胞生成素(Epo)可诱导祖细胞增殖分化从而治疗疾病,且在临床上已用于治疗 SBS^[4-5],但对干细胞影响尚未发现相关报道。Hippo/Yes 相关蛋白(YAP)信号通路中 YAP 水平降低导致肠道再生受损,活化 YAP 可促进肠道再生^[6]。推测 Epo 通过影响 Hippo/YAP 信号通路促进 SBS 大鼠适应后期干细胞分化,实现对 SBS 的保护。因此,剪去 80% 小肠建立 SBS 大鼠模型,观察 Epo 对 SBS 大鼠适应后期 Hippo/YAP 信号通路及干细胞分化的影响,可为临床提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级大鼠 28 只,北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号:SCXK(京)2018-0011,体重 200~220 g。饲养条件:12 h/12 h 光照/黑暗、(24±0.5)℃ 温度、(55±5)% 湿度,自由饮水饮食。本研究经本院动物伦理委员会审核并批准。

1.1.2 试剂与仪器

Epo 购自成都地奥九泓制药厂(批准文号:国药准字 S19991006,10 000 IU/mL);苏木精-伊红(HE)染色试剂盒购自上海碧云天科技有限公司(货号: C0105);阿利新蓝染液购自武汉赛维尔生物科技有限

公司(货号:G1027);一抗嗜铬粒蛋白、抗溶菌酶抗体、YAP、转录共激活因子 PDZ 结合基序(TAZ)均购自英国 Abcam 公司(货号分别为:ab15160、ab108508、ab205270、ab224239)。光学显微镜购自北京普瑞赛司仪器有限公司(型号:AxioL A1);蛋白凝胶成像仪购自上海天能科技有限公司(型号:4600)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与造模

参考文献[7]建立 SBS 大鼠模型,1.0%戊巴比妥钠缓冲液腹腔注射麻醉大鼠,75%乙醇消毒擦拭皮肤,打开腹腔,剪去 80% 小肠,只留下约 10 cm 回肠末端和近端 5 cm 空肠,空肠 6-0 缝线缝合,用缝合线逐层缝合切口。手术后,将大鼠单独放置笼子,随意饮水,20 只大鼠造模,造模成功 16 只,将其分为模型组、Epo 组,每组 8 只。假手术组 8 只行肠横断再吻合,其余步骤相同。造模后 7 d 无症状,Epo 组根据人与动物用药量换算^[8],隔日皮下注射 157 U/kg Epo^[5],3 次/周,持续 2 个月;其余两组注射等体积生理盐水。

1.2.2 大鼠体重情况

分别在术前、术后 7 d,药物治疗 2 个月后称量大鼠体重。

1.2.3 HE 染色观察肠道组织学情况

体重测量结束后,1.0%戊巴比妥钠缓冲液腹腔注射麻醉大鼠,剖开腹腔,将部分肠道置于 4% 多聚甲醛中固定,部分置于-80℃ 冰箱中保存待用。经石蜡包埋沿肠腔环形切片,部分切片 HE 染色,光学显微镜下观察和拍照,记录肠黏膜环状肌、纵肌厚度,绒毛长度、隐窝深度。

1.2.4 阿利新蓝染色观察肠黏膜杯状细胞情况

部分切片常规脱蜡,阿利新蓝染液染色 10 min,蒸馏水漂洗,0.5% 中性红核染 3 min。蒸馏水漂洗、乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片,显微镜下拍照观察。

1.2.5 免疫组织化学(IHC)观察肠黏膜内分泌细

胞、潘式细胞情况

部分切片经脱蜡、水化、抗原热修复等步骤后,滴加一抗嗜铬粒蛋白、抗溶菌酶抗体,4℃过夜后,加入对应二抗,苏木精复染,水洗、脱水、透明、封片。显微镜下拍照观察细胞形态。嗜铬粒蛋白阳性标志内分泌细胞、抗溶菌酶抗体阳性标志潘式细胞。细胞相对数量=该细胞数量/隐窝中细胞总数×100%。

1.2.6 Western blot 检测肠组织 YAP、TAZ 蛋白表达水平

取出一80℃保存的部分肠道组织,蛋白裂解液裂解提取肠组织总蛋白。凝胶电泳分离蛋白质、NC膜转膜、5%脱脂奶粉室温封闭1h,对应加入一抗YAP、TAZ、GAPDH,4℃孵育过夜;加入对应二抗室温孵育1h。二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒避光显色,蛋白凝胶成像仪拍照和定量分析。目的蛋白相对表达水平=目的蛋白灰度值/GAPDH灰度值。

1.3 统计学处理

采用SPSS25.0软件进行统计学分析,计量资料均采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,3组间比较行单因素方差分析,进一步两两比较行SNK-*q*检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 3组大鼠一般情况

假手术组术后仅在第1天出现腹泻,之后恢复良好;模型组和Epo组在术后前3d均出现大便不成形、腹泻情况。

2.2 3组大鼠手术前后体重比较

术前3组大鼠体重比较差异无统计学意义($P>0.05$)。术后7d,与假手术组比较,模型组、Epo组体重降低($P<0.05$)。治疗2个月后,与假手术组比较,模型组体重降低($P<0.05$);与模型组比较,Epo组体重增加($P<0.05$),见表1。

表 1 3 组大鼠手术前后体重比较($\bar{x}\pm s,n=8,g$)

时间	假手术组	模型组	Epo 组
术前	206.82±4.51	210.62±6.26	208.58±8.47
术后 7 d	218.56±7.15	176.34±6.84 ^a	178.73±5.89 ^a
治疗 2 个月	248.59±6.71	196.76±4.86 ^a	236.48±9.51 ^b

^a: $P<0.05$,与假手术组比较;^b: $P<0.05$,与模型组比较。

2.3 3 组大鼠肠黏膜形态比较

假手术组黏膜、黏膜下层、肌层层次清晰,黏膜上皮完整清晰;模型组黏膜腺体较多,出现细胞浸润现象;Epo组肌层层次较清晰、细胞浸润现象缓解。与假手术组比较,模型组、Epo组环状肌、纵肌厚度,绒毛长度、隐窝深度均增加($P<0.05$);与模型组比较,Epo组环状肌、纵肌厚度,绒毛长度、隐窝深度均增加($P<0.05$),见图1、表2。

2.4 3 组大鼠肠黏膜干细胞分化情况比较

与假手术组比较,模型组杯状细胞、潘式细胞相对数量降低($P<0.05$);与模型组比较,Epo组杯状细胞、潘式细胞相对数量升高($P<0.05$),见图2、表3。

表 2 3 组大鼠肠黏膜相关指标比较($\bar{x}\pm s,n=8,\mu m$)

指标	假手术组	模型组	Epo 组
环状肌厚度	95.43±3.18	128.48±6.18 ^a	159.57±6.51 ^{ab}
纵肌厚度	194.53±6.48	223.48±8.37 ^a	380.46±13.48 ^{ab}
绒毛长度	196.18±6.18	216.48±5.58 ^a	315.41±9.5 ^{ab}
隐窝深度	83.52±16.18	124.56±16.61 ^a	164.85±18.43 ^{ab}

^a: $P<0.05$,与假手术组相比;^b: $P<0.05$,与模型组相比。

2.5 3 组大鼠肠组织 YAP、TAZ 蛋白水平比较

与假手术组比较,模型组YAP、TAZ蛋白水平降低($P<0.05$);与模型组比较,Epo组YAP、TAZ蛋白水平升高($P<0.05$),见图3、表4。

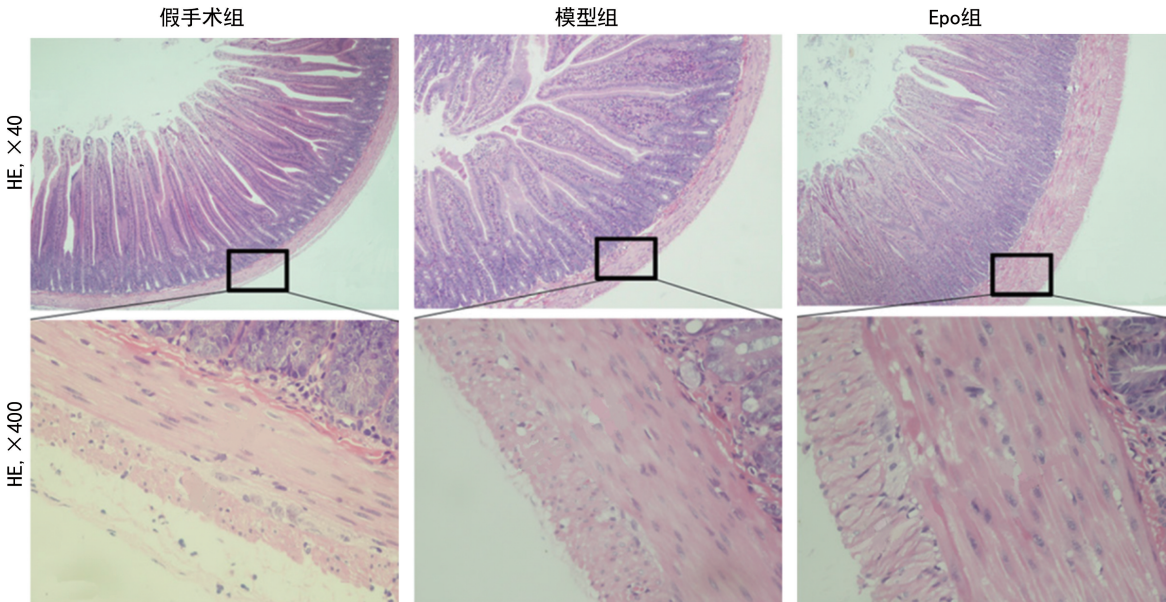


图 1 3 组大鼠肠黏膜形态学情况

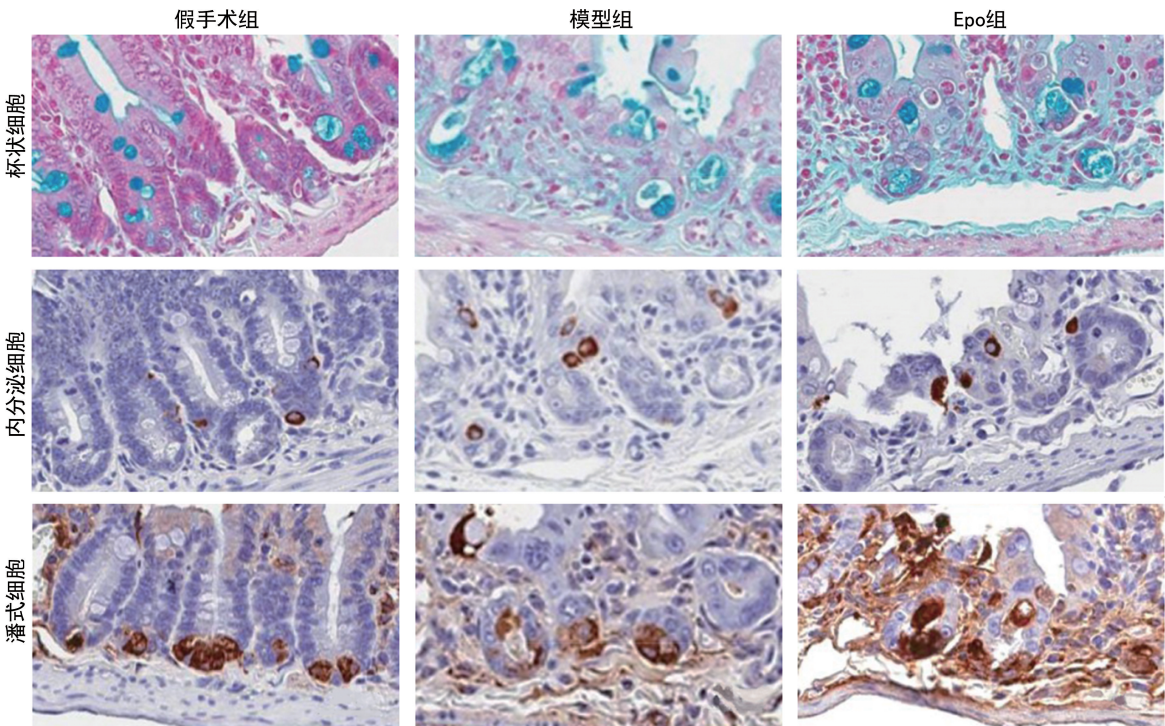


图 2 3 组大鼠肠黏膜干细胞分化情况(IHC,×400)

表 3 3 组大鼠肠黏膜干细胞分化情况比较 ($\bar{x}\pm s, n=8, \%$)			
指标	假手术组	模型组	Epo 组
杯状细胞/隐窝细胞	4.38±0.18	0.53±0.01 ^a	1.23±0.12 ^b
内分泌细胞/隐窝细胞	1.01±0.09	1.04±0.12	1.03±0.11
潘式细胞/隐窝细胞	4.14±0.85	0.38±0.03 ^a	3.14±0.64 ^b

^a: $P<0.05$,与假手术组相比;^b: $P<0.05$,与模型组相比。

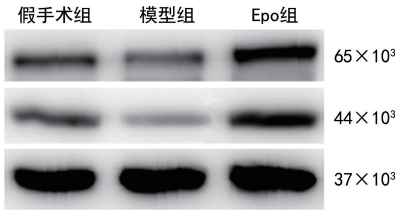


图 3 大鼠肠组织 YAP、TAZ 蛋白表达水平

表 4 3 组大鼠肠组织 YAP、TAZ 蛋白水平比较 ($\bar{x}\pm s, n=8$)			
指标	假手术组	模型组	Epo 组
YAP	0.36±0.05	0.25±0.03 ^a	0.86±0.15 ^b
TAZ	0.29±0.04	0.09±0.02 ^a	0.72±0.11 ^b

^a: $P<0.05$,与假手术组比较;^b: $P<0.05$,与模型组比较。

3 讨 论

SBS 中肠黏膜受多种信号通路影响,持续经历增殖、分化和凋亡等过程。其中干细胞可分化为所有细胞,包括吸收性细胞(如肠上皮细胞)、分泌性细胞(杯状细胞、内分泌细胞、潘式细胞)^[9]。分泌性细胞中促进杯状细胞生成可增加肠黏膜黏液量,减少共生细菌易位^[10-11];潘氏细胞分泌的防御素等抗微生物肽具有抵抗病原微生物、重塑肠道微生物群落、保护肠道干

细胞等功能^[12]。因此,促进干细胞分化可缓解 SBS。Epo 是一种含唾液酸的酸性糖蛋白激素,在肝硬化大鼠模型中术前 Epo 治疗可促进肝细胞再生,从而提高肝切除术后的生存率^[13];在大鼠肝缺血再灌注模型中 Epo 预处理,可减少小肠黏膜损伤和炎症反应,延缓上皮细胞坏死、炎症浸润、毛细血管出血等症状,从而减轻肠黏膜屏障损伤^[14]。本研究发现,与假手术组比较,模型组大鼠出现腹泻、体重减轻症状,杯状细胞、潘式细胞相对数量下降;环状肌、纵肌厚度,绒毛长度、隐窝深度均增加,与冯登宇等^[15]研究结果类似,提示 SBS 后虽然肠道自身出现适应性,通过增加环状肌、纵肌厚度,增加绒毛长度和隐窝深度缓解 SBS 对机体的损害,但肠道菌群紊乱严重,仍出现腹泻症状;干细胞分化受限,营养物质等吸收减少,机体自身调节能力有限,造成体重减轻,疾病加重。治疗 2 个月 后,与模型组比较,Epo 组体重增加($P<0.05$),杯状细胞、潘式细胞相对数量增加,环状肌、纵肌厚度,绒毛长度、隐窝深度均增加($P<0.05$)。提示 Epo 可在自身调节基础上通过促进干细胞分化进一步增加环状肌、纵肌厚度,增加绒毛长度、隐窝深度,增加肠黏膜吸收面积和对营养物质吸收,从而实现对 SBS 大鼠的保护。

Hippo/YAP 信号通路最初在研究果蝇组织生长中发现,异常表达表型与海马相似而命名^[16]。上游机械信号、细胞应激、细胞极性等刺激可诱发 Hippo 信号通路发挥作用,Hippo 信号通路中激酶级联反应可活化其他因子从而促进效应分子 YAP/TAZ 发挥作用,活化的 YAP/TAZ 与细胞质中 14-3-3 蛋白结合,YAP/TAZ 滞留在细胞质中无法进入细胞核,而丧失

辅助因子^[17-18]。当 Hippo 信号通路被抑制时,YAP/TAZ 无法活化或与下游因子结合,进而阻止 YAP/TAZ 发挥其作用^[19]。同时 Hippo/YAP-TAZ 信号通路又不是独立的,与转化生长因子(TGF)超家族 TGF- β /Smads,Wnt/ β -链蛋白(β -Catenin)和表皮生长因子受体(EGFR)/丝裂原相关蛋白激酶等信号转导途径级联,共同调节细胞增殖、细胞分化等过程^[20]。本研究发现,与假手术组比较,模型组肠组织 YAP、TAZ 蛋白水平降低,提示 SBS 大鼠肠道中可能由于菌群紊乱、炎症浸润、细胞坏死等现象,导致 YAP、TAZ 蛋白表达受到抑制,对肠道干细胞的分化作用减弱,干细胞分化受限,绒毛长度增长、隐窝深度变深受到限制,肠道黏膜吸收面积和对营养的吸收有限,从而加重疾病。与模型组比较,Epo 组 YAP、TAZ 蛋白水平升高,提示 Epo 作用于机体后,可缓解 YAP、TAZ 蛋白减少现象,高表达 YAP、TAZ 蛋白促进干细胞分化,增加肠道黏膜面积,实现对疾病的保护。

综上所述,Epo 可激活 Hippo/YAP 信号通路,促进干细胞分化,实现对 SBS 大鼠的保护。但 Hippo/YAP 下游信号通路众多,具体通过哪些下游信号通路调控干细胞分化尚不清楚,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] HAROLD J, BOUTTE J, DEBORAH C, et al. Short bowel syndrome[J]. *Gastroint Motil Disord*, 2018, 24(3): 343-351.
- [2] 刘瑾. 组织工程治疗儿童短肠综合征的研究进展[J]. *国际儿科学杂志*, 2019, 46(9): 678-682.
- [3] LUDIKHUIZE M C, MEERLO M, GALLEGÓ M P, et al. Mitochondria define intestinal stem cell differentiation downstream of a FOXO/Notch axis[J]. *Ssrn Elect J*, 2019, 15(6): 777391-777398.
- [4] 李呈轶, 陈思宇, 赵栩进, 等. 乳鼠心脏 Sca-1~+ 干细胞定向分化的诱导研究[J]. *山西医科大学学报*, 2019, 50(8): 1029-1036.
- [5] 曹振杰, 吴学军, 孙雪花, 等. 促红细胞生成素在短肠综合征治疗中作用[J]. *中华实用诊断与治疗杂志*, 2013, 27(12): 1217-1219.
- [6] 顾远, 张雷, 余发星. Hippo 信号通路在肠道稳态、再生及癌变过程中的作用及机制[J]. *遗传*, 2017, 39(7): 588-596.
- [7] DAI L N, YAN J K, ZHANG T, et al. Butyrate promotes the adaptation of intestinal smooth muscle cells through the yes-associated protein (YAP) pathway in a rat model of short bowel syndrome[J]. *Am J Transl Res*, 2019, 11(1): 453-462.
- [8] 贾长恩. 医学科研基本思路方法与程序[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 156-156.
- [9] SUKHOTNIK I, CORAN A G, POLLAK Y, et al. Activated notch signaling cascade is correlated with stem cell differentiation toward absorptive progenitors after massive small bowel resection in a rat[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2017, 313(3): G247-255.
- [10] 崔勇鹤, 孙少明, 李占武, 等. 肠道上皮细胞在肠道免疫屏障中的维护及炎性肠病发生机制[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2019, 27(2): 82-84.
- [11] 成海燕, 张亚姝, 迟宏罡. IL-22 及肠道干细胞在肠黏膜屏障中的作用[J]. *广东医学*, 2016, 37(20): 3133-3135.
- [12] 李朋. 潘氏细胞与新生儿坏死性小肠结肠炎的研究进展[J]. *国际儿科学杂志*, 2019, 46(5): 311-314.
- [13] SUK S W, CHOI Y S, HONG S A, et al. Pre-operative erythropoietin treatment improves survival following major hepatic resection in a cirrhotic rat model[J]. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 2018, 42(4): 347-352.
- [14] 吴鹏俐, 石清明, 阳德飞, 等. 促红细胞生成素对大鼠肝缺血再灌注后肠损伤的保护作用及其作用机制研究[J]. *重庆医学*, 2019, 48(12): 1981-1985.
- [15] 冯登宇, 朱峰, 顾立立, 等. 大鼠回肠 J 型储袋肛管吻合模型的建立及优化[J]. *肠外与肠内营养*, 2018, 25(4): 238-242.
- [16] 李军最, 黄克, 李兴艳, 等. lncRNA 和 Hippo-YAP 通路调控脂肪干细胞成骨分化机制的研究进展[J]. *广西医科大学学报*, 2018, 35(10): 1459-1463.
- [17] HUANG X, TANG F, WENG Z P, et al. MiR-591 functions as tumor suppressor in breast cancer by targeting TCF4 and inhibits Hippo-YAP/TAZ signaling pathway[J]. *Cancer Cell Int*, 2019, 24(19): 108-117.
- [18] WEI C R, WANG Y, LI X Q. The role of Hippo signal pathway in breast cancer metastasis[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11(6): 2185-2193.
- [19] CAO X L, ZHAO B. Quantitative real-time PCR to measure YAP/TAZ activity in human cells[J]. *Methods Mol Biol*, 2019, 1893(12): 137-152.
- [20] 顾客, 田慧, 李傲楠, 等. HIPPO-YAP/TAZ 信号通路与干细胞分化相关信号通路交叉作用的研究进展[J]. *牙体牙髓牙周病学杂志*, 2018, 28(11): 667-672.