生长因子 TGFβ3 对小鼠小肠隐窝细胞增殖的抑制

张 宇 光
（中国医学科学院中国协和医科大学放射医学研究所，天津 300192）
C. S. Potten C. Chadwick D. Hewitt
(*Paterson Institute for Cancer Research, England*)

摘要 转移生长因子 TGFβ3 是一种多功能调节剂，不同的给药剂量、给药次数及其间隔时间以及给药后的测定时间等均影响它对细胞增殖调控的能力。当重复给予 TGFβ3，它对正常小鼠及 8 Gy γ射线全身照射小鼠小肠隐窝底部的上皮细胞的增殖均起抑制作用，且随着给药次数的增多，TGFβ3 对肠隐窝干细胞的抑制作用逐渐增强，提示它是干细胞生长的负调节因子。

关键词 小肠隐窝，细胞增殖，TGFβ3

哺乳动物小肠上皮有一些增殖迅速的细胞，这些细胞位于肠道隐窝中，其主要特征是肠粘膜上皮细胞自隐窝到绒毛顶，在组织结构和功能上表现有增殖、成熟、功能和细胞衰亡的整个过程。正常小肠隐窝细胞每 5 min 有丝分裂一次，每一细胞每天增殖分裂两次，当小鼠小肠隐窝有 250 个细胞时，其中约有 150 个细胞具有增殖特性[1]，细胞的增殖起源于隐窝干细胞[2]，照射后肠道粘膜有较强的修复能力。近 20 年来，Potten 等[3~6]对成年小鼠小肠上皮细胞动力学、放射生物学以及细胞毒药物和致癌剂对肠隐窝细胞的影响进行了大量的研究，但肠道细胞生长调控的机制还不完全清楚。有文献报道，造血系统细胞增殖调节依赖于生长刺激因子和生长抑制因子的相互作用[7]。目前，生长因子对小鼠小肠隐窝细胞增殖效应的影响方面实验的初步结果表明，内皮生长因子(EGF)、胰岛素样生长因子(IGF)、转移生长因子 α(TGF-α)可刺激隐窝上皮细胞的增殖，EGF 和 IGF 对未照射小鼠和照射后 96 h 小鼠均有刺激肠上皮增殖作用，TGFα 对照射后 96 h 小鼠有明显的刺激增殖作用(待发表)。本文主要研究 TGFβ 3 对小鼠小肠隐窝细胞增殖的影响。

1 实验材料和方法

1.1 实验动物

选用 10～12 周龄的 BDF1 雄性小鼠，Paterson 研究所动物室饲养。

1.2 照射条件

^{137}Cs γ 射线照射源，剂量率 3.39 Gy/min，8 Gy 全身照射。

1.3 试剂

TGFβ3 纽约 Oncogene Science 公司捐赠，按实验要求用生理盐水稀释到不同浓度，0.5 ml

收稿日期：初稿 1995-03-15，修改稿 1995-10-08

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

/次/只小鼠腹腔注射。

^{3}H-TdR：购于 Amersham 公司，^{3}H-TdR 925 kBq(25 μCi)溶解在 0.1 ml 生理盐水中，在小鼠处死前 40 min 腹腔注射。

牛血清白蛋白(BSA)：购于 Sigma 公司，用生理盐水配成 0.1%BSA，0.5 ml/次/只小鼠腹腔注射。

核乳胶：K 5，Ilford 公司产品。

苏木精-伊红染料：英国 BDH 化学药品公司产品。

1.4 实验模型

1.4.1 正常未照射小鼠　小鼠小肠隐窝本身具有内源性迅速增殖的能力，因此不利于生长刺激因子的发现，而多用此模型测定生长抑制因子。

1.4.2 小鼠全身 8 Gy γ 照射　照射后即刻或短时间内由于照射所致细胞急性死亡而失去增殖能力，肠上皮内源性再生被激活，故可用此模型测定生长抑制因子，事实上此模型比正常小鼠更敏感，并且对不同的调节因子均敏感。

1.5 实验分组

将小鼠分为正常未照射组，8 Gy 全身 γ 照射后 18 h 两大组，根据 TGFβ3 的浓度(1 μg/只，2.5 μg/只，5 μg/只，10 μg/只)，给药次数(1 次给药，2，4，5 次每间隔 1 h 重复给药)以及给药后取材时间(给药后 1 h、3 h、6 h、9 h、12 h、18 和 24 h)分成若干实验组。与之相对应的对照组给予(含 0.1%BSA)等体积的生理盐水。

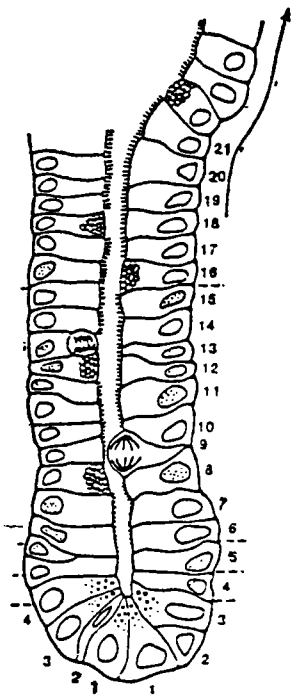

Fig 1. Diagrammatic representation of longitudinal section through a crypt of the small intestine

1.6 病理标本制备

取小鼠小肠，Carnoy's 固定液固定 30 min，保存于 70% 乙醇中，将小肠切成 10 段 1 cm 的肠段，用 3M 外科纸胶布捆扎在一起，石蜡包埋，切成 3 μm 的组织切片，脱蜡，水合，浸泡核乳胶，置 4 ℃冰箱中的双层黑盒内曝光 5 d，制备放射自显影标本，显影、定影后苏木精-伊红染色观察。

1.7 评分

每实验组 4 只小鼠，每只小鼠取 10 段小肠，每组 4 只小鼠的肠段包埋成一个蜡块，切成 3 μm 的组织切片，则每一载玻片提供 40 个小肠横切面，选择具有良好隐窝腔的纵切面(>17 个细胞)，从隐窝底部中央细胞开始，按细胞位置依次向上计数未标记细胞、标记细胞、未标记的有丝分裂细胞、标记的有丝分裂细胞，直到隐窝与绒毛连接处，如图 1 所示。每只小鼠需计数 50 个半隐窝，并将计数结果直接输入计算机中[8]。

1.8 数据分析

通过计算机终端的隐窝程序处理软件(PRO GRAM CRYPTS 6.1 B，1984 年出版，Paterson 肿瘤研究所)，对每组 4 只小鼠的 200 个半隐窝局部计数分析，计算出隐窝每一细胞位置标记细胞出现频率和细胞有丝分裂活性，从而绘制出一系列细胞标记指数曲线和细胞有丝分裂指数曲线。通过 Minitab 统计学软件(9.1 版本，1992 年 Minitab 公司出版)进行结果分析及显著性检验。

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

2 结 果

从实验结果可见，对正常未照射小鼠一次给予 TGF β 3 在 1～10 μg/只剂量范围内，小肠隐窝上皮细胞总的标记指数升高，而细胞有丝分裂指数无明显变化，以 2.5 μg/只 给药组为 例，见图 2，重复 2 次给予 TGF β 3 时，在给药后 1 h 即可见肠隐窝细胞标记指数下降(见图 3)，当重复 5 次给予 TGF β 3 时，尤以隐窝底部小肠隐窝细胞标记指数下降明显(即干 细胞 区和早期增殖细胞区)，而对隐窝上部呈弱刺激作用(见图 4 和表 1)当小鼠受 8 Gy 全身 γ 照射后 18 h，一次给予 TGF β 3，在给药后 1 h 即可见细胞标记指数下降，3 h 作用较明显(见图 5)，重复多次给药对隐窝细胞的标记指数下降更为明显，由此可见给予 TGF β 3 的次数以及给药后不同时间，对小肠隐窝上皮细胞增殖的影响也不同。

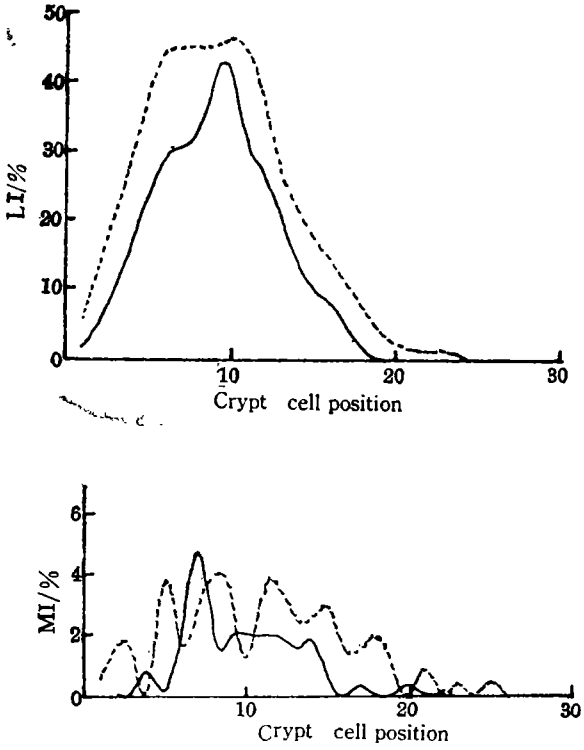

Fig 2. The data showing the effects of 2.5 μg injection of TGF β 3 into unirradiated mice analysed at 12 h. Labelling index changes on the upper panel and mitotic index changs are in the lower (—) saline (···)TGF β 3

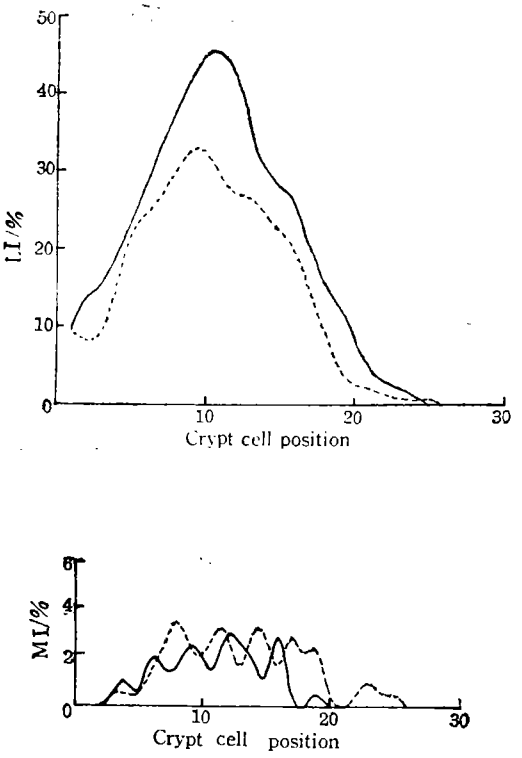

Fig 3. The data showing the inhibitor effects of 2 injections (2.5 μg × 2) of TGF β 3 into unirradiated mice analysed at 1 h. For further details see Fig. 2 (—) saline (···) TGF β 3

3 讨 论

TGF β 3 对细胞生长是一 多 功 能 调 节 剂。近来已逐渐明，确它对细胞的作用取决于 细胞类型，TGF β 可刺激间质细胞增生，然而对许多上皮组织系统呈生 长 负 调 节 作用[9]。本实验也可见 TGF β 3 对小肠上皮细胞增殖的抑制作用，重复多次给予 TGF β 3 对正常小鼠肠隐窝底部有明显的抑制作用，细胞标记指数下降在给药后 1 h 即可见，9～12 h 最明显，此时对细胞有丝分

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Tab 1. The labelling index (LI) changes of small intestinal crypts after administered TGFβ3 to unirradiated mice (2.5μg×5, 1hr apart, killed at 1～24 h)

Sample /h	Overall LI/%		Bottom LI/%		Top LI/%	
	Saline	TGFβ3	Saline	TGFβ3	Saline	TGFβ3
1	21.5	23.5	22.2	22.1	9.4	11.4
3[1]	21.6	19.0	20.6	16.9	6.3	13.7
6[1]	19.8	16.6	17.8	16.2	9.2	12.7
9	26.0	21.4	18.4	13.8	11.2	21.2
12	29.2	23.5	29.0	14.9	10.1	25.4
15	27.3	29.3	29.9	19.9	10.4	26.9
18	27.7	27.3	31.8	26.8	5.3	12.6
24	23.7	25.6	22.0	21.9	8.6	11.8

Bottom: cell position(CP) 1～8　Top: cell position 17～24　[1] Bottom CP 1～7, Top CP 15～21

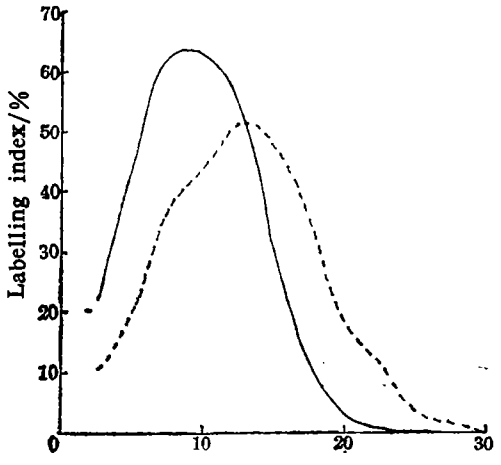

Fig 4. The data showing the labelling index changes of 5 injections (2.5μg×5) of TGFβ3 into unirradiated mice analysed at 12 h
(—) saline (···) TGFβ3

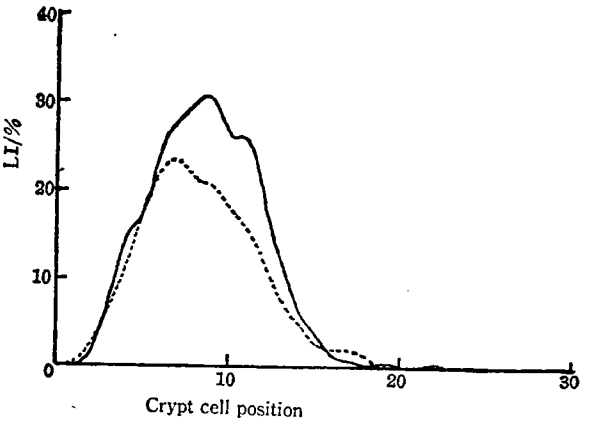

Fig 5. The data showing the labelling index changes of 2.5μg injection of TGFβ3 into 18h post-irradiated mice analysed at 3 h
(—) saline (···) TGFβ3

裂的影响不明显，这可能与 TGFβ3 主要作用于细胞周期的 S 期，抑制 DNA 合成有关，随着给药次数的增多，对细胞的抑制作用逐渐增强。小鼠全身 8 Gy γ 照射后 18 h，一次给予 2.5 μg TGFβ3，在给药后 1 h 即可见 TGFβ3 对隐窝细胞的抑制作用，并主要作用于隐窝底部，表明它主要作用于隐窝干细胞和早期增殖细胞区，此结果与 Molineux 等[10]报道 TGFβ 对造血系统的调控结论一致，属干细胞生长抑制因子，因此可暗示 TGFβ 可作为细胞生长抑制剂，用于病人接受特定细胞周期细胞毒药物治疗中预防正常组织干细胞损伤。

实验中发现，多次给予 TGFβ 后，可见肠道细胞结构明显破坏，出现肠道出血和小鼠自身状况减弱，这可能由于 TGFβ 使细胞丧失了增殖活性，导致肠道微环境恶化，因此，给予 TGFβ 的量和次数应慎重考虑。近来许多文献报道 TGFβ 可抑制肝脏、乳腺、子宫内膜的 DNA 合

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

成[11~13]，退行性肿瘤 TGF β 表达增强[14]，子宫内膜细胞的原代培养和肝细胞体内体外实验均证明 TGF β 可导致细胞程序化死亡(Apoptosis)[15~16]，表明 TGF β 可能具有肿瘤治疗的前景。

TGF β 是一多功能调节因子，可作用于多种组织系统，TGF β 给予的浓度、次数和给予时间对各组织的效应有很大的差异，有待进一步系统地研究。

参 考 文 献

1 Potten C S. Int. J. Radiat. Biol., 1990, 58: 925
2 Cheng H, Leblond C P. Am. J. Anat., 1974, 141: 537
3 Potten C S, Hendry J H. Int. J. Radiat. Biol., 1975, 27: 413
4 Hendry J H, Potten C S, Ghaffor A et al. Radiat. Res., 1989, 118: 364
5 Ijiri K, Potten C S. Br. J, Cancer, 1983, 47: 175
6 Potten C S, Hendry J H, Moore J V, Chwalinski S. Cytotoxic Insult to Tissue: Effects on Cell Lineages, 1983, pp 105
7 Keller J R, McNiece I K, Sill K T et al. Blood, 1990, 75: 596
8 Potten C S, Hendry J H. In "Cell clones Manual of Mammalian Cell Techniques," 1985, pp: 50
9 Lamprecht S A, Schwartz B, Glicksman A. Anticancer Res., 1989, 9: 1877
10 Migdalska K, Molineux G, Demuynck H et al. Growth Factors, 1991, 4: 239
11 Carr B I, Hayaski I, Branum E L, Moses H L. Cancer Res., 1986, 46: 2330
12 Coletta A A, Wakefield A M, Howell F V et al. J. Clin. Invest., 1991, 87: 277
13 Rotello R J, Lieberman R C, Purchio A F et al. Proc. Natl Acad. Sci, USA, 1991, 88: 3412
14 Kyprianou N & Isaaca J T. Mol. Endocrinol., 1989, 3: 1515
15 Oberhammer F, Bursch W, Parzefall et al, Cancer Res., 1991, 51: 2478
16 Bursch W, Oberhammer F, Jirtle R L et al. Br. J. Cancer, 1993, 67: 531

TH E EFFECTIVE OF PROLIFERATION IN THE SMALL INTESTINAL CRYPTS OF THE MOUSE FOLLOWING IN VIVO ADMINISTRATION OF GROWTH FACTOR TGFβ3

Zhang Yuguang

(Institute of Radiation Medicine, CAMS, Tianjin 300192)

C. S. Potten C. Chadwick D. Hewitt

(Paterson Institute for Cancer Research, England)

ABSTRACT Transforming growth factor β3 (TGFβ3) is a multifunctional regulator of cell growth. In epithelial tissue TGFβ3 was found to be a negative regulator of growth, it inhibits the proliferation in the small intestinal crypts of the mouse following in vivo administration. Various doses and dosing regimens were tested, TGFβ3 was an effective inhibitor of proliferation in unirradiated and after irradiated 18 hours recipients in all multiple doses cases, TGFβ3 tended to have its strongest inhibitory effects in the lower regions of the crypt.

KEYWORDS Intestinal crypt, Cell proliferation, TGF β3

(C)1994-2022 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net