文章编号:1000-5404(2005)14-1515-04

论著

食物过敏儿童肠道通透性研究

胡 燕[1],黎海芪[1],阳文琳[2],陈国民[2],瞿 平[1] (重庆医科大学:[1]儿童医院儿保科,重庆 400014,[2]附属第二医院肝炎研究所,重庆 400015)

提 要:目的 通过双糖吸收试验评价食物过敏儿童肠粘膜屏障功能。**方法** 研究对象食物过敏患儿及正常儿童各19例,平均年龄(8.1±1.7)个月。用高效液相色谱分析法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定各研究对象口服测试液2 ml/kg(每100 ml测试液含5 g乳果糖(L)和2 g甘露醇(M))后,5 h内尿中甘露醇和乳果糖的浓度,并计算乳果糖和甘露醇尿中排出率及其比值(L/M)。**结果** 食物过敏儿童5 h尿中L/M(0.18±0.06)较正常儿童(0.05±0.03)显著增高($P<0.001$)。其原因可能是患儿乳果糖透过肠粘膜被吸收入血增加,而甘露醇透过肠粘膜被吸收入血正常或略有下降。**结论** HPLC检测肠道通透性的准确性高,重复性好,是临床评价小肠粘膜屏障功能的实用方法。食物过敏儿童肠道屏障功能发生改变。

关键词: 食物过敏;肠粘膜通透性;高效液相色谱法;乳果糖;甘露醇
中图法分类号: R322.45; R333.3; R593.1 **文献标识码:** A

Preliminary study of intestinal permeability of children with food hypersensitivity

HU Yan[1], LI Hai-qi[1], YANG Wen-lin[2], CHEN Guo-min[2], QU Ping[1] ([1]Department of Primary Child Care, Children's Hospital, [2]Institute for Viral Hepatitis, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To evaluate the intestinal barrier function of the patients by two-sugar absorption test with high performance liquid chromatography (HPLC). **Methods** Nineteen children with confirmed food hypersensitivity (FH) and 19 normal children were included in this study. The average age was (8.1±1.7) months. After 8-hour fasting, subjects drank test solution (5 g lactulose and 2 g mannitol per 100 ml) at the dose of 2 ml/kg. Five-hour urinary excretion ratio of lactulose/mannitol (L/M) were measured using high performance liquid chromatography (HPLC). The condition of HPLC was as follows: Sugar-PakI column with refractive index detector; Mobile phase: pure deionized water; Flow rate: 0.5 ml/min; temperature of column: 85 ℃. **Results** HPLC chromatogram of urine sample was stable. The retention time of mannitol and lactulose was 13.86 min and 9.27 min respectively. A significant rise in 5 h urinary L/M excretion ratios was found in children with FH (0.18±0.06) as compared to that of controls (0.05±0.03) ($P<0.001$). This difference might be caused by a concomitant increase in urinary recovery of lactulose and a normal level or decrease of mannitol. **Conclusion** The determination of the L/M ratio by HPLC may be a reliable method to evaluate intestinal barrier function in clinical practice. The intestinal barrier function is damaged in the children with FH.

Key words: food hypersensitivity; intestinal permeability; high performance liquid chromatography; lactulose; mannitol

婴儿喂养过程中常可发生食物过敏,重庆地区的检出率为3.5%~5.2%[1],其症状常常表现在最初接触食物抗原的消化道,如呕吐、腹泻等。因而消化道是极易受损害的靶器官。临床上检测肠粘膜屏障功能对于监测儿童食物过敏发生及进展具有重要意义。

评估肠粘膜屏障功能的有效方法之一是检测肠道通透性。利用不被人体代谢的大分子糖类测定肠粘膜通透性,评估肠粘膜的完整性,是一种无创的诊断肠粘膜屏障功能的方法[2]。目前,用乳果糖排泄率/甘露醇排泄率比值作为肠粘膜通透性指标的方法被普遍接受,并已广泛应用于临床[3]。本研究采用高效液相色谱分析法(high performance liquid chromatography, HPLC)对食物过敏患儿及正常儿童的肠道通透性情况

作者简介: 胡 燕(1974-),女,重庆市人,博士,主治医师,主要从事儿童食物过敏方面的研究。电话:(023)63622764

收稿日期: 2004-03-28; **修回日期:** 2004-12-15

进行研究。

1 材料与方法

1.1 研究对象

经家长同意进入本研究的食物过敏[4]儿童共19例为试验组，平均年龄(8.4±1.6)个月。本组患儿以消化道表现为主，并在进行检测的前1个月内无其它胃肠道疾病及服用药物史，未进行排除性饮食治疗。以同一时期正常儿童共19例作为对照组，平均年龄(8.1±1.9)个月。

1.2 主要仪器及试剂

1.2.1 主要仪器 BECKMAN高效液相色谱系统：System Gold 126 Solent Module；System Gold Analog Interface Module 406信号收集装置；Waters公司的Sugar-Pak I色谱柱及2410示差折射检测器。

1.2.2 主要试剂 乳果糖标准品和甘露醇标准品(色谱纯，Sigma)；乳果糖探针(辽宁丹东制药厂)，甘露醇探针(上海政翔化学试剂研究所)；EDTA-钙盐(Sigma)叠氮钠(上海化学试剂公司)。

1.3 给药及标本采集[5]

各研究对象需禁食8 h(通常在夜间睡眠时进行禁食，次日晨开始试验)。检测前排空膀胱，定为基础尿样(0 h)。后空腹口服测试液2 ml/kg，收集5 h内尿液，分别记录0 h和0～5 h总尿量，各取10 ml作为标本，滴入叠氮钠防腐后，置-20 ℃冰箱保存待检。在标本采集过程中，口服测试液后2 h可进水，整个过程均需禁食。测试液的配制：每100 ml测试液含5 g乳果糖和2 g甘露醇。

1.4 标准溶液的配制

甘露醇标准液的配制：精确称取甘露醇，用流动相配成8 g/L贮存液，使用前稀释成800、400、200、100、50、25 mg/L的标准液。乳果糖标准液的配制：精确称取乳果糖，用流动相配成2 g/L贮存液，使用前稀释成400、200、100、50、25、12.5 mg/L的标准液。

1.5 分析方法

1.5.1 标本预处理 取待检尿样品5 ml，85 ℃孵育20 min，离心10 min(5 000 r/min)；取上清，经孔径为0.22 μm的微孔滤膜去蛋白及颗粒后，取20 μl上机待检。

1.5.2 色谱条件 泵：System Gold 126 Solent Module (BECKMAN Coulter)；色谱柱：Sugar-Pak 1(300 mm×6.5 mm，Waters)；柱温：85 ℃；流动相：50 mg/L EDTA钙盐溶液(以超纯水溶解)，脱气20 min；流速：0.5 ml/min；检测器：示差折射检测器，灵敏度为128。

1.5.3 计算方法 用GoldV810配套软件对色谱图进行积分处理，得峰面积积分值。以峰面积积分值为纵座标，进样浓度(mg/L)为横座标，建立甘露醇和乳果糖的标准曲线和回归方程。根据标准曲线公式算出标本中甘露醇和乳果糖的浓度，最后计算甘露醇和乳果糖的排出率及其比值。

1.6 统计学分析

数据以$\bar{x}\pm s$表示，用SPSS 10.0统计软件进行单因素方差分析和一元线性相关分析。

2 结果

2.1 甘露醇和乳果糖标准品色谱图

在上述色谱条件下，甘露醇和乳果糖标准品溶液、尿液样品中各组分均能实现基线分离，峰形良好。甘露醇和乳果糖的保留时间分别为13.86 min和9.27 min(图1)。

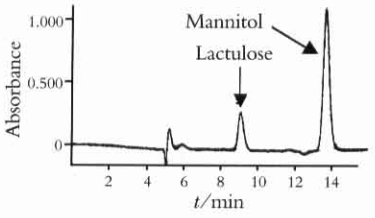


图1 甘露醇及乳果糖标准品出峰时间色谱图

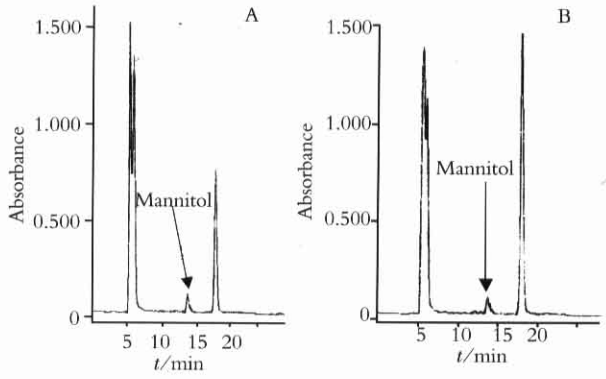
Fig 1 HPLC chromatogram of a mixture of lactulose and mannitol

2.2 分析方法的评价

试验结果表明甘露醇和乳果糖分别在25～800 mg/L和12.5～400 mg/L范围内与积分峰面积呈线性关系。回归方程分别为：YM(mg/L)=15.532X+5.856；RM2=0.999 3；YL(mg/L)=15.73X+9.503；RL2=0.993 7。其中YM为甘露醇浓度，YL为乳果糖浓度，X为峰面积；RM2和RL2分别为二者的相关系数。甘露醇和乳果糖排出量的平均日内变异系数分别为2.51%和3.03%($n=4$)；日间变异系数分别为3.53%和5.52%；甘露醇的加样回收率在93%～98%，乳果糖的加样回收率在91%～97%。本方法测定甘露醇的最大检出限为25 mg/L，乳果糖为12.5 mg/L。

2.3 样本色谱图

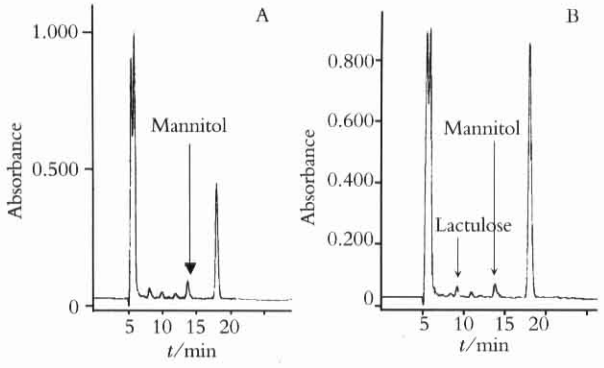
图2、3显示了正常儿童和患儿检测前后尿样中甘露醇和乳果糖排出情况。由图可见，样品中甘露醇和乳果糖与其它成分能够较好分离。图2显示正常儿童和患儿在禁食后均可有少量甘露醇排出；图3显示口服测试液5 h后，正常儿童只有甘露醇排出，而患儿乳果糖和甘露醇均有排出。



A: Normal children; B: Children with food hypersensitivity

图2 儿童基础尿样色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of baseline urine sample



A: Normal children; B: Children with food hypersensitivity

图 3　儿童口服测试液后 5 h 尿样色谱图

Fig 3　HPLC chromatogram of urine sample in 5 h

2.4　食物过敏患儿及正常儿童肠道通透性比较

结果以甘露醇(M)和乳果糖(L)在尿中的排出率及乳果糖排出率/甘露醇排出率的比值表示。表 1 显示与正常儿童相比,食物过敏患儿乳果糖尿中排出率显著增高($P<0.01$),甘露醇尿中排出率值下降,且有显著性意义($P<0.01$);L/M 比值在食物过敏儿童中显著增加($P<0.01$)。

表 1　5 h 内甘露醇及乳果糖尿中排出率及比值(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Five-hour urinary excretion ratios of lactulose, mannitol and lactulose/mannitol (%, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	Lactulose	Mannitol	Lactulose/mannitol
Patients	19	1.92 ±0.78	11.36 ±3.37	0.18 ±0.06
Normal children	19	0.75 ±0.39 *	15.61 ±4.92 *	0.05 ±0.03 *

*: $P<0.01$, *vs* patients

3　讨论

3.1　双糖排出率/单糖排出率比值评价肠粘膜通透性

目前用双糖排出率/单糖排出率比值评价肠粘膜通透性的方法已被广泛接受,较常用的是乳果糖和甘露醇排出率比值。这两种糖可满足理想探针的多数要求[6]:口服安全无异味,易被儿童接受;不被机体代谢,口服后可以原形从尿中排泄,故尿排出量可反映肠道的吸收量。其中甘露醇是单糖($C_6H_{14}O_6$,分子量 182),分子较小(直径 <0.4 nm),主要通过肠粘膜细胞膜上的水溶性微孔主动地被吸收;而乳果糖是双糖($C_{12}H_{22}O_{11}$,分子量 342),分子较大(直径 >0.52 nm),必须经肠粘膜细胞间的紧密连接处被动穿过肠壁及粘膜破损处被动地吸收。双糖探针可克服单糖标记物中不相干的可变因素的混淆作用,因此,即使有时在规定的时间内尿量的收集不完全,得到的结果依然是可靠有效的[6]。故本研究采用乳果糖/甘露醇(L/M)的排出比率来反应肠通透性改变,以间接评价肠道屏障功能状况。

本研究采用 HPLC 法测量甘露醇和乳果糖的日内变异系数 <5% 和日间变异系数 <10%,说明本方法的精密度较高。同时,甘露醇和乳果糖的加样回收率可达 90% 以上,接近 100%,提示本方法有较高的准确度。甘露醇和乳果糖的最大检出限分别为 25、12.5 mg/L,低于尿样品中含二者的浓度,因此,本方法即使在测定低浓度样品时也较为可靠。

3.2　食物过敏患儿的肠道通透性

儿童食物过敏症状常表现为呕吐和腹泻,这可能与食物过敏引起小肠形态学改变有关。这种形态学改变多为炎性反应和绒毛结构变化。研究表明速发型 IgE 介导的食物过敏表现为粘膜水肿,肠粘膜上皮细胞脱落,基底膜破坏等;而迟发型细胞介导的食物过敏则表现为绒毛萎缩,隐窝增生等[7]。

本组食物过敏患儿多为肠内症状型,其 5 h 尿中乳果糖的排出率较正常儿童显著增加[(1.92 ± 0.78)% *vs* (0.75 ± 0.39)%];甘露醇的排出率较正常儿童下降[(11.36 ±3.37)% *vs* (15.61 ±4.92)%] ($P<0.01$);乳果糖排出率/甘露醇排出率也较正常儿童明显增加[(0.18 ±0.06)% *vs* (0.05 ±0.03)%] ($P<0.01$)。这与国外学者研究结果相似[8,9]。从影响肠道通透性大小的因素可知,任何使肠粘膜遭到破坏,结构完整性丧失的因素均可导致肠道通透性的改变。本研究证实了食物过敏患儿的肠道通透性明显高于正常同龄儿童。因本研究中对象多为速发型、肠内症状型食物过敏,且尚未经排除性饮食治疗,推测其形态学改变可能为肠细胞脱落增加,导致细胞间隔增大,使大分子物质的通透性增加,即乳果糖被吸收入血而致尿中排出增多;测试结果还显示甘露醇(小分子物质)的通透性正常或略有下降(5 h 尿标本),提示可能有肠粘膜细胞膜受损及轻度小肠绒毛萎缩,致使小肠吸收面积减少。

3.3　肠道通透性检测的临床意义

食物过敏患者虽然发生机制临床表现各不相同,但其共同特征是对食物抗原的肠通透性增加。肠通透性的增加意味着肠道粘膜屏障功能受损。同时,其它大分子物质的吸收也会相应增加,它们还可诱导大量无害抗原的非特异性肠道通透性增加,从而导致多食物过敏的发生,因此形成了恶性循环。

近期研究显示,食物过敏患者虽然常伴有肠道通透性增加,但肠道通透性增加不是食物过敏发生的根本原因[10]。因此,肠道通透性试验不能作为诊断食物过敏的依据,而只能反映肠粘膜受损的程度。但是,异常的肠道通透性常可帮助儿科医生考虑有无食物过敏的发生及预测是否伴有其它系统症状。同样,在治疗食物过敏的同时还应注意保护其胃肠粘膜功能,早期发现肠道屏障功能损害,并予以及时相应治疗(如应用谷氨酰胺二肽和表皮生长因子等),可能对减少食

物过敏肠外症状以及其它种类食物过敏的发生有一定帮助。此外，在食物过敏治疗过程中，监测肠通透性可能有利于了解肠粘膜屏障功能恢复情况，以调整治疗方案（如采用排除性饮食治疗的疗程等）。

参考文献：

[1] 胡 燕，黎海芪. 0～24个月儿童食物过敏的流行病学研究[J]. 中华儿科杂志，2000，38(7)：431－434.

[2] Travis S, Menzies I. Intestinal permeability: functional assessment and significance[J]. Clin Sci (Lond), 1992, 82(2): 471－488.

[3] 孙 梅，刘跃武，刘 卫，等. 术后患者肠道吸收乳果糖、甘露醇的变化与创伤程度的关系[J]. 中华外科杂志，1999，37(5)：298－300.

[4] 胡 燕，黎海芪. 儿童食物过敏的诊断方法[J]. 中国儿童保健杂志，2000，8(3)：190－192.

[5] Willems D, Cadranel S, Jacobs W. Measurement of urinary sugars by HPLC in the estimation of intestinal permeability: evaluation in pediatric clinical practice[J]. Clin Chem, 1993, 39(5): 888－890.

[6] 董红林. 肠道通透性试验及其临床意义[J]. 世界华人消化杂志，2000，8(5)：562－563.

[7] Heyman M, Andriantsoa M, Crain Denoyelle A M, *et al*. Effect of oral or parenteral sensitization to cow's milk on mucosal permeability in guinea pigs[J]. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1990, 92(3): 242－246.

[8] Schrander J J, Unsalan Hooyen R W, Forest P P, *et al*. [^{51}Cr]EDTA intestinal permeability in children with cow's milk intolerance[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1990, 10(2): 189－192.

[9] van Elburg R M, Uil J J, Kokke F T, *et al*. Repeatability of the sugar-absorption test, using lactulose and mannitol, for measuring intestinal permeability for sugars[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1995, 20(2): 184－188.

[10] Majamaa H, Isolauri E. Evaluation of the gut mucosal barrier: evidence for increased antigen transfer in children with atopic eczema[J]. J Allergy Clin Immunol, 1996, 97(4): 985－990.

（编辑 刘洪娥）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2005)14-1518-01

急性毒鼠强中毒患者血清中与心肌有关的酶学变化分析

Changes of myocardial enzymes in human serum during acute tetramine poisoning

刘秋慧，李飞飞，李 莉 （郑州大学第一附属医院急救中心，郑州 450052）

毒鼠强是一种高效剧毒的灭鼠药，又称"四二四"、"没鼠命"、"三步倒"、"王中王"等，化学名为：四亚甲基二砜四胺中毒后除了对中枢神经系统损伤外，还对其它组织有不同程度的损害，引起多脏器损害。我院急救中心2002年4月至2004年3月收治的急性毒鼠强中毒32例，均出现心肌酶变化，现就其临床意义分析报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例选择

选择我院急救中心2002年4月至2004年3月收治的急性毒鼠强中毒32例，男8例，女24例，年龄15～67岁，平均年龄(37.27±12.86)岁。全部病例均为口服中毒，中毒前无心脏病史。31例患者在中毒后30 min至28 h就诊，1例误诊为脑外伤42 h转入我科。

1.2 诊断及中毒程度

23例有明确的口服毒鼠强病史及典型的中毒表现，9例无明确的口服毒鼠强病史，经对呕吐物或血液进行鉴定明确诊断。根据临床表现并结合文献[1]，我们将急性毒鼠强中毒分为：轻度中毒仅表现为头晕、头痛、恶心、呕吐及肢体乏力，偶有全身不自主震颤，无意识障碍；中度中毒表现为阵发性四肢抽搐并轻度意识障碍，用镇静剂可迅速得到控制；重度中毒表现为频繁的阵发性四肢抽搐、惊厥及昏迷，用镇静剂后仍有阵发性四肢抽搐。

1.3 治疗及观察方法

全部病例均收住EICU进行心电监测，观察心率、心电图及心功能变化。轻度中毒者给予彻底洗胃、导泻及对症治疗，中重度中毒者除给予以上治疗及应用营养心肌药物外，酌情应用鲁米那肌肉注射和安定静脉滴注，配合血液灌流。入院后抽取静脉血，使用日立7600-020全自动生化分析仪，采用速率A法检测血清心肌酶，试剂盒为上海科华-东菱诊断用品有限公司生产。同时选择同期门诊健康体检者20例作为对照组。

1.4 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示，采用统计软件SPSS 10.0行t检验。

2 结果

2.1 不同程度急性毒鼠强中毒与对照组心肌酶的比较

32例急性毒鼠强中毒患者血清心肌酶均有不同程度增高，病情越重，增高越明显。轻度中毒与对照组无明显差异，中、重度中毒者血清心肌酶明显增高，并且随着病情加重而增高，特别是肌酸磷酸激酶增高最为显著。本组1例误诊为脑外伤42 h者，入院后

（下转1528）

作者简介：刘秋慧(1959－)，女，河南省郑州市人，副主任医师，主要从事急性中毒和危重病方面的研究。电话：(0371)65165981，E-mail：liuqiuhui121@sina.com

收稿日期：2004-12-16；修回日期：2005-04-18