论著

文章编号:1000-5404(2007)11-1050-03

谷氨酰胺在肝脏缺血再灌注损伤中对肠道黏膜保护作用

许永庆[1],戴朝六[1],崔 凯[2],贾昌俊[1],徐 锋[1] ([1]中国医科大学附属第二医院肝胆乳腺外科,沈阳 110004;[2]沈阳医学院奉天医院普通外科,沈阳 110024)

提 要:目的 研究谷氨酰胺预处理在大鼠肝脏缺血再灌注损伤中对肠道黏膜的保护作用并探讨其可能机制。**方法** 雄性Wistar大鼠18只分为谷氨酰胺预处理组(Gln组)和生理盐水对照组(对照组),Pringle法阻断肝门致肝脏缺血40 min,去夹再灌注1 h后检测肝功生化酶(ALT、AST、LDH)水平;采取回盲部肠系膜淋巴结(MLN)行细菌培养,检测细菌易位情况;在光、电镜下观察回肠黏膜的组织病理学变化。**结果** Gln组ALT水平[(407.88±84.06)U/L]显著高于对照组[(312.45±65.83)U/L](P<0.05),AST、LDH两组无显著差异(P>0.05);Gln组MLN细菌含量(492.27±247.52)cfu/g显著低于对照组(3 865.02±1 681.07) cfu/g(P<0.05),选取部分菌落和肠内容物细菌做菌种鉴定,二者具有一致性;镜下显示Gln组小肠黏膜损伤较对照组轻。**结论** 谷氨酰胺对肝脏缺血再灌注损伤中的肠道黏膜具有确实的保护作用。

关键词:谷氨酰胺;肝脏;缺血再灌注损伤;细菌易位;黏膜屏障

中图法分类号:R574;R657.3;R977.4 **文献标识码**:A

Protective effect of glutamine on intestinal mucosa during hepatic ischemia/reperfusion injury in rats

XU Yong-qing[1], DAI Chao-liu[1], CUI Kai[2], JIA Chang-jun[1], XU Feng[1] ([1]Department of Hepatobiliary Surgery, The Second Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110004, [2]Department of General Surgery, Fengtian Hospital, Shenyang Medical College, Shenyang 110024, China)

Abstract: Objective To investigate the protective effect of glutamine on intestinal mucosa during hepatic ischemia/reperfusion injury in rats and its possible mechanism. **Methods** Eighteen male Wistar rats were randomly receiving glutamine precondition (G group) and 0.9% NaCl solution (control group) for 3 days. The liver was subjected to warm ischemia by cross-clamping the hepatoduodenal ligament for 40 min according to Pringle's maneuver, then declamping to restore the blood flow. Blood (3 ml) was drawn from abdominal aorta to test ALT, AST, LDH levels; In 1 h after reperfusion, the lymphoid nodes of mesentery in ileocecal part was obtained for germiculture and partial ileac tissues were got to estimate mucosal injury under light microscope and scanning electron microscope. **Results** The ALT level of G group and control group was (407.29±84.27) U/L and (312.67±66.48) U/L respectively, with significant difference ($P<0.05$), but AST and LDH levels were of no significant difference between two groups ($P>0.05$). The bacterial content in lymphoid nodes of mesentery from G group was significantly lower than that from control group [(492.27±247.52) cfu/g, (3 865.02±1 681.07) cfu/g, $P<0.05$]. Partial bacterioflora and bacteria inside guts were identified as homologous. After 40-minute ischemia and 1-hour reperfusion, the gut injury in G group was milder than in control group. **Conclusion** Precondition with glutamine intravenously before operation has protective effect on intestinal mucosa during hepatic ischemia/reperfusion injury in rats.

Key words: glutamine; liver; ischemia/reperfusion injury; bacterial translocation; mucosal barrier

肝脏缺血再灌注损伤(hepatic ischemia/reperfusion injury,HIRI)是肝脏外科疾病中较为常见的病理过程,其确切机制目前仍不十分清楚,多认为与氧自由基及钙离子超载有关。研究表明,在HIRI中门静脉阻断将造成肠道屏障功能受损,引起细菌易位(bacterial translocation,BT)和肠源性内毒素血症。谷氨酰胺

基金项目:辽宁省自然科学基金(20022063)
Supported by the National Science Foundation of Liaoning Province (20022063)

作者简介:许永庆(1978-),男,辽宁省营口市人,硕士,医师,主要从事肝胆外科方面的研究。电话:(024)83955232

通讯作者:戴朝六,电话:(024)83955220

收稿日期:2007-01-22;**修回日期**:2007-04-10

(glntamine，Gln)是人体含量最为丰富的条件必需氨基酸之一，近年来国内外学者就 Gln 对创伤、烧伤、感染、小肠移植等应激状态下的肠黏膜屏障功能影响的研究较多[1]，但是有关 Gln 在 HIRI 中对肠道黏膜屏障保护作用的研究报道较少。本研究通过建立 Gln 干预下的大鼠 HIRI 模型来探讨 Gln 对肠黏膜的影响。

1　材料与方法

1.1　主要仪器与试剂

OLYMPUS 光学显微镜，本院病理室提供；日立 S-450 扫描电镜，中国医科大学电镜室提供；谷氨酰胺二肽(Alanyl-Gln-tamine，Ala-Gln)：力肽，Dipeptiven，购自德国费森尤斯中国华瑞制药有限公司；API 鉴定系统，购自法国梅里埃公司。

1.2　动物分组与模型

健康雄性 Wistar 大鼠 18 只，体质量 250～300 g(由本院实验动物中心提供)，单笼喂养 1 周，常规进食水，分为 Gln 组($n=9$)和生理盐水对照组(对照组，$n=9$)，参照静脉营养模型[2]，Gln 组经静脉导管给予含 Gln 溶液(Ala-Gln + 生理盐水，浓度为 3%，相当于 2% Gln 溶液)；对照组给予同等量的生理盐水输入，不同液体均输注 3 d，维持在 48 ml/d。插管后第 4 天以 10% 水合氯醛(0.35 ml/100g)腹腔注射麻醉，取腹正中切口入腹，离断肝周韧带，主要是镰状韧带、肝胃韧带，以消除肝脏侧支循环，用无创微血管夹于肝门部夹闭门静脉、肝动脉、胆总管(Pringle's 法)，使肝脏缺血，持续 40 min 后松开血管夹，恢复肝脏血供，成功建立门静脉淤血的肝脏缺血再灌注模型后关腹。

1.3　检测指标

再灌注 1 h 后，①自腹主动脉取血 3 ml，于无菌试管中静置 20 min 后离心 10 min(3 500 r/min)，取上清置于弹头中，-20 ℃冰箱保存，待测生化酶。②在无菌条件下切取回盲部肠系膜淋巴结(MLN)2～3 枚(约 0.1 g)，电子天平称量后，在净化工作台上研磨成匀浆，加入 1 ml 无菌生理盐水，取 50 μl 匀浆在普通琼脂培养皿上涂匀，置于 37 ℃孵箱孵育 24 h，进行菌落计数，并换算成每克组织含菌量(cfu/g)，选取部分菌落与定性培养后的肠道内容物细菌行菌种鉴定。③从距离回盲瓣 5 cm 处，向近端切取 4 cm 回肠段，用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗干净，其中取 2 cm 用 10% 福尔马林液固定，标本经脱水，石蜡包埋，切片行常规 HE 染色，在光学显微镜下观察肠黏膜组织的病理学变化；另外的 2 cm 肠段以 2.5% 戊二醛液固定，光镜和电镜下观察肠黏膜组织的病理学变化。最后处死大鼠。

1.4　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 12.0 统计软件进行 t 检验。

2　结果

2.1　肝功变化

Gln 组 ALT 水平明显高于对照组($P<0.05$)，两组 AST、LDH 水平则无显著差异($P>0.05$)(表 1)。

表 1　血清生化酶水平及 MLN 菌落计数水平比较($n=9$，$\bar{x} \pm s$)

组别	ALT(U/L)	AST(U/L)	LDH(U/L)	MLN 细菌含量(cfu/g)
Gln 组	407.88 ± 84.06	1 160.02 ± 618.87	5 621.43 ± 1 878.34	492.27 ± 247.52
对照组	312.45 ± 65.83[a]	790.34 ± 342.21	5 827.53 ± 1 832.89	3 865.02 ± 1 681.07[a]

a：$P<0.05$，与 Gln 组比较

2.2　细菌易位

Gln 组 MLN 细菌含量均显著低于对照组，二者有统计学差异($P<0.05$)(表 1)。

2.3　菌种鉴定

定性地选取部分 MLN 菌落和肠内容物细菌做菌种鉴定，多为大肠杆菌、鲍曼不动杆菌、铜绿假单孢菌、阴沟肠杆菌、肺炎克雷伯菌等，二者具有一致性。

2.4　形态学变化

光镜观察到 Gln 组小肠黏膜上皮较完整，轻微变薄，黏膜固有层轻度水肿，有炎性细胞浸润，黏膜下血管充血不明显(图 1)；而对照组黏膜上皮呈灶性脱落，明显变薄，固有层水肿，肠壁有较多炎性细胞浸润，黏膜下血管充血明显，隐窝结构不清楚(图 2)。扫描电镜结果显示 Gln 组小肠绒毛宽大，排列整齐密集，无广泛性溃疡(图 3)；而对照组绒毛杂乱，排列无规律，绒毛发生溃疡，具有普遍性(图 4)。

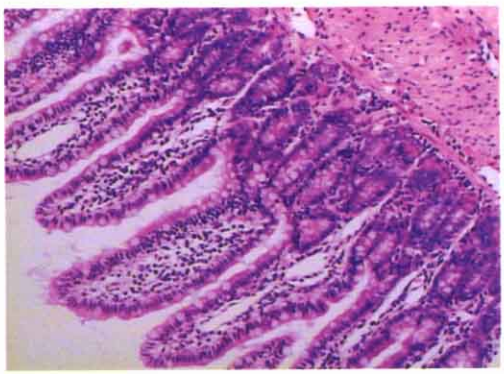


图 1　光镜下观察 Gln 组小肠黏膜较完整，轻度水肿　(HE × 100)

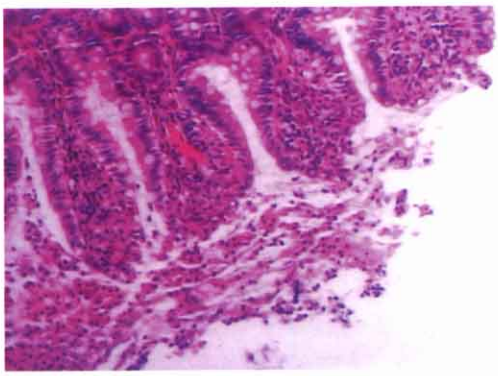


图 2　光镜下观察对照组黏膜上皮呈灶性脱落　(HE × 100)

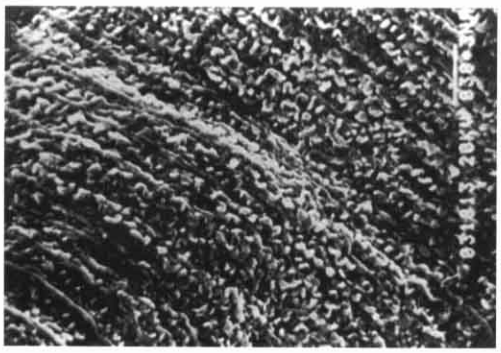


图3 扫描电镜观察 Gln 组小肠绒毛宽大，排列整齐，无广泛性溃疡 （×350）

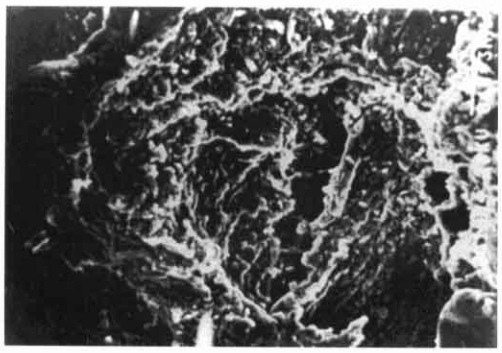


图4 扫描电镜观察对照组绒毛杂乱，排列无律，溃疡具有普遍性 （×350）

3 讨论

一般认为 HIRI 包括 3 个部分：肝缺血、门静脉淤血以及肝动脉血和门静脉淤血的再灌注，其中门静脉淤血所致的再灌注损伤在 HIRI 过程中起主要作用[3]。门静脉淤血导致肠黏膜上皮组织处于缺血、缺氧和低灌流状态，而后者对此种病理环境非常敏感，会出现屏障功能受损，肠内的正常菌群可经受损黏膜入血，引起细菌易位和肠源性内毒素血症，血循环中的细菌和内毒素再作用于肠黏膜，导致其通透性继续增高，进而出现全身炎症反应综合征（SIRS）和多器官功能衰竭（MODS），形成恶性循环[4]。本实验证实了阻断肝门血流最终造成肠黏膜损伤及细菌易位，一方面在于肠道血流量减少引起了由氧自由基介导的肠道损伤，导致肠黏膜的分泌功能下降，增加了细菌在肠黏膜表面的黏附性，使其在肠腔内过度生长和定植，另一方面通过激活的肠道抗原表达细胞释放 TNF 和 IL 等细胞因子，引起急性肠黏膜损伤[5]；此外，大鼠肠上皮结构因门脉血流动力学的紊乱而发生变化，浆细胞减少，分泌型 IgA（sIgA）合成降低，令肠道免疫机能下降，也是细菌易位的主要原因。

近年来，Gln 因其独特的生理功能逐渐成为各学科领域的研究热点，它不仅是组织细胞分裂增殖的合成原料和体内重要的抗氧化分子——谷胱甘肽（GSH）的前体，还是肠黏膜等快速增殖细胞的燃料，是肠道修复的最重要的营养物质[6]。补充外源性 Gln 后，镜下观察大鼠的肠黏膜上皮充血、水肿、溃疡明显减轻，而且 MLN 检出的细菌数量也较对照组显著减少。这种作用机制可能在于 Gln 通过促进肠黏膜细胞分裂增殖，加快上皮增生与修复，抑制了其通透性的增加[7]；通过影响肠道菌群的构成，来控制革兰阴性杆菌的过度增殖，抑制肠道菌群失调[8]；有研究证实，Gln 对维持肠道相关淋巴组织（GALT）的功能有重要意义，这与其促进肠黏膜淋巴组织分泌 sIgA，降低细菌附着力，减灭易位至肠壁和 MLN 的细菌有关[9]。

本实验证实了 Gln 对 HIRI 的肠黏膜确有保护作用，转氨酶的评价却未能提示肝细胞的保护作用，这可能与给药剂量、时间及方法等因素有关，有待于完善更全面的肝功能评价系统，在此不作深入探讨。

目前少见到有关 Gln 对人体产生毒副作用的报道，但是关于给药时机、给药途径及给药剂量等应用问题尚没有可信的统一标准，相信随着研究的深入，Gln 会在 HIRI 的肠道防护方面有着良好的应用前景。

参考文献：

[1] Tazuke Y, Wasa M, Shimizu Y, *et al*. Alanyl-glutamine-supplemented parenteral nutrition prevents intestinal ischemia-reperfusion injury in rats[J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2003, 27(2): 110-115.

[2] 彭 曦，汪仕良，谭银玲，等. 大鼠静脉输液装置的设计和制作[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(7): 532-533.

[3] Van-As A B, Lotz Z, Tyler M, *et al*. Reperfusion injury associated with portal venous and hepatic arterial perfusion in liver transplantation [J]. Transplantation, 2002, 74(2): 158-163.

[4] Spindler-Vesel A, Wraber B, Vovk I, *et al*. Intestinal permeability and cytokine inflammatory response in multiply injured patients[J]. J Interferon Cytokine Res, 2006, 26(10): 771-776.

[5] Wang X, Andersson R, Soltesz V, *et al*. Bacterial translocation after major hepatectomy in patients and rats[J]. Arch Surg, 1992, 127(9): 1101-1106.

[6] Grimble R F. Immunonutrition[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2005, 21(2): 216-222.

[7] 沈通一，秦环龙. 谷氨酰胺对肠屏障功能保护作用的研究进展[J]. 肠外与肠内营养, 2003, 10(3): 177-180.

[8] Denno R, Rounds J D, Faris R, *et al*. Glutamine-enriched total parenteral nutrition enhances plasma glutathione in the resting state[J]. J Surg Res, 1996, 61(1): 35-38.

[9] Lai Y N, Yeh S L, Lin M T, *et al*. Glutamine supplementation enhances mucosal immunity in rats with Gut-Derived sepsis[J]. Nutrition, 2004, 20(3): 286-291.

（编辑 汪勤俭）