文章编号:1000-5404(2007)19-1877-03

论著

精氨酸营养干预对重型颅脑损伤大鼠细胞免疫功能和蛋白代谢的影响

曾 兢,朱京慈 (第三军医大学护理系,重庆 400038)

提 要: 目的 探讨精氨酸营养干预对重型颅脑损伤大鼠免疫功能和蛋白代谢的影响。**方法** 建立重型颅脑损伤大鼠模型。40只SD大鼠,雌雄各半,分为3组:正常对照组(C组);普通肠内营养组(EN组);普通肠内营养添加Arg组(Arg组)。各组用等氮、等热卡的营养支持,3、7 d后取外周血标本。应用吞噬白色念珠菌计数法、免疫组化法、放射免疫法和ELISA法,分别测定白细胞吞噬功能、T细胞表型$CD4^+$、$CD8^+$含量、血清白介素-2(IL-2)水平、胰岛素(INS)、胰高血糖素(GIU)、皮质醇(Cor)、视黄醇结合蛋白(BPR)和前白蛋白(PA)的含量。**结果** 重型颅脑损伤后两实验组大鼠细胞免疫功能均显著下降,但Arg组的$CD4^+/CD8^+$、IL-2水平和白细胞吞噬率在各时相点都非常显著高于EN组($P<0.01$)。两实验组的PA、RBP在伤后第3天无显著性差异($P>0.05$),第7天,Arg组的PA较EN组显著升高($P<0.05$),RBP和EN组相比有增高的趋势,但无统计学意义($P>0.05$)。两实验组的INS/GLU在伤后第3天无统计学意义($P>0.05$),第7天Arg组则明显高于EN组($P<0.05$)。EN组的Cor含量在各时相点都明显高于Arg组($P<0.01$)。**结论** 经肠道补充Arg能有效改善重型颅脑损伤后大鼠免疫功能和蛋白代谢紊乱。

关键词: 精氨酸;细胞免疫;蛋白代谢;重度颅脑损伤;大鼠
中图法分类号: R329.25; R651.15; R977.4 **文献标识码**: A

Effect of arginine-enriched enteral nutrition on cellular immunological function and protein metabolism in rats with severe head injury

ZENG Jing, ZHU Jing-ci (College of Nursing, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the effect of arginine-enriched enteral nutrition on cellular immunological function and protein metabolism in rats with severe head injury. Methods The model of severe head injury was established by local impact injury. Forty SD rats were randomly divided into 3 groups: normal control group (group C), enteral nutrition group (group EN), and EN adding arginine group (group Arg). Rats in group C were not subjected to injury. In groups EN and Arg, they were fed nutritional diets containing the same nitrogen and calorie 4 h after injury. The peripheral blood samples of all rats were collected on the 3rd day and the 7th day. PMN phagocytosis rate was observed by phagocytosis Candida albicans count. $CD4^+$ cells and $CD8^+$ cells were analyzed by SABC. IL-2 level, insulin (INS), glucagon (GLU), and cortisol (Cor) concentrations were measured by RIA. Contents of PA and RBP were examined by ELISA. Results $CD4^+$, $CD4^+/CD8^+$, IL-2 levels, phagocytosis ratios were noticeably higher in group Arg than group EN ($P<0.01$) on each time point. There was no significant difference in PA and RBP contents between group EN and group Arg ($P>0.05$) on the 3rd day. The PA content of group Arg was higher than that of group EN ($P<0.05$), and RBP content of group Arg was greater than that of group EN, but had no statistical significance ($P>0.05$) on the 7th day after injury. On the 3rd day after injury, there was no significant difference in INS/GLU between group EN and group Arg ($P>0.05$), but significant difference existed on the 7th day after injury. The Cor content of group Arg was noticeably lower than that of group EN on each time point ($P<0.01$). Conclusion Arginine-enriched enteral nutrition can effectively retard immunosuppression and protein metabolism disturbance in rats with severe head injury.

Key words: arginine; cellular immunological function; protein metabolisms; severe head injury; rats

重型颅脑损伤患者有50%~70%合并继发感染[1],而营养不良、低蛋白血症是导致重型颅脑损伤患者免疫功能低下,易感性增强的重要因素[2]。因此有效改善患者营养状态,维持正常的免疫功能,对降低

作者简介:曾 兢(1973-),女,重庆市人,硕士,主管护师,主要从事创伤护理方面的研究,现在成都医学院护理系。电话:(028)68289249
通讯作者:朱京慈,电话:(023)68752361
收稿日期:2006-11-27;修回日期:2007-01-19

伤后感染率具有重要的意义。普通肠内营养可提供机体充足的能量和氮源，但由于危重患者多存在顽固的高分解代谢，对营养底物的利用和耐受程度降低，使传统的营养支持模式对改善患者的营养不良和免疫功能低下疗效不甚理想[3,4]。已有研究表明，在普通肠内营养（enteral nutrition，EN）中添加免疫营养素——精氨酸（arginine，Arg）有助于改善严重创伤、感染及大手术等应激状态下患者的免疫功能和蛋白代谢[3,5]，但对重型颅脑损伤患者的影响尚少见报道。本研究运用Arg营养干预对重型颅脑损伤大鼠进行治疗，观察大鼠细胞免疫功能和蛋白代谢的变化，以期为探求重型颅脑损伤患者理想的营养支持提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

醋酸精氨酸由浙江杭州鑫富药业股份有限公司生产（批号010201，含量>98.5%）；酪氨酸由上海康达有限公司生产（批号Q/YCBW5-200501，含量>98.5%）；普通EN（安素，整蛋白型肠内营养粉剂）由雅培制药生产（批号H20030237）。

1.2 方法

1.2.1 动物模型及分组 采用气动冲击致重型颅脑损伤大鼠模型[6]。40只健康成年SD大鼠，雌雄各半，清洁级，体质量（220±20）g，由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心提供。大鼠适应性饲养1周后，再经禁食24 h、禁水2 h后用于实验。将大鼠用随机数字表法分为3组：正常对照组（C组）、肠内营养组（EN组）、肠内营养添加Arg组（Arg组）。C组8只动物，不致伤动物，其余两组各16只，分别选择伤后3、7 d 2个时相点。

1.2.2 营养液的供给 EN组和Arg组使用相同热量的普通EN液（Ensure 1.06 kcal·ml^{-1}）。Arg组在普通EN液中添加Arg 0.8 g·kg^{-1}·d^{-1}[7,8]，EN组添加等量酪氨酸，使两组达到等氮、等热卡。伤后4 h开始灌喂，按142.97 kcal·kg^{-1}·d^{-1}标准供给。第1天给予半量71.49 kcal·kg^{-1}·d^{-1}，第2天给予全量142.97 kcal·kg^{-1}·d^{-1}，2次/d，连续3、7 d（1 kcal=4.19 kJ）。

1.2.3 检测方法 于伤后3、7 d，在无菌条件下抽取外周静脉血，检测下列指标。

1.2.3.1 白细胞吞噬功能 采用吞噬白色念珠菌计数法。取外周肝素抗凝血2 ml，分离白细胞，制备细胞悬液，调整细胞数为1×10^6/ml，取一干净玻片，滴2~3滴细胞悬液，加入等量的白色念珠菌混匀，37 ℃孵育1~2 h，取出玻片用PBS轻轻冲去多余的白色念珠菌，自然晾干后，用甲醛固定，瑞氏染色，油镜下计数吞噬白色念珠菌的白细胞。

吞噬率=吞噬白色念珠菌的白细胞/白细胞数×100%

1.2.3.2 外周血T淋巴细胞亚群检测 采用链霉亲和素-生物素（SABC）法，SABC试剂盒系武汉博士德生物工程公司产品。取外周肝素抗凝血2 ml，与等量PBS液混合后，缓慢的加在等量淋巴细胞分离液上，离心20 min（2 000 r/min）分离出淋巴细胞，再用PBS液离心（1 000 r/min）洗涤2次，然后再用PBS将其制备成1×10^6/ml的细胞悬液，取50 μl涂片。按SABC试剂盒操作说明进行染色，显微镜下记数200个淋巴细胞中$CD4^+$、$CD8^+$表面标志物阳性的淋巴细胞数。

1.2.3.3 血清白介素-2（interleukin-2，IL-2）、胰岛素（insulin，INS）、胰高血糖素（glucagon，GIU）、皮质醇（cortisol，Cor）测定 用放免法检测，试剂盒由解放军总医院东亚放免所提供，按说明书操作。

1.2.3.4 血清前白蛋白（prealbumin，PA）、视黄醇结合蛋白（retinol-binding protein，RBP）测定 用酶联免疫吸附实验法（enzyme linked immunosorbent assay，ELISA）检测，试剂盒由上海德波生物技术有限公司提供，按说明书操作。

1.3 统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示，用SPSS 10.0统计软件进行多个样本比较的单因素方差分析。

2 结果

2.1 重型颅脑损伤大鼠细胞免疫功能的改变

2.1.1 T淋巴细胞亚群的改变 伤后第3、7天EN组和Arg组的$CD4^+$及$CD4^+/CD8^+$值较C组非常显著下降（$P<0.01$），但$CD8^+$下降不明显（$P>0.05$）。Arg组的$CD4^+$及$CD4^+/CD8^+$值在各时相点都显著高于EN组（$P<0.01$）。见表1。

表1 大鼠T细胞亚型的比例改变（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	伤后时间（d）	$CD4^+$（%）	$CD8^+$（%）	$CD4^+/CD8^+$
C	8		44.88±0.99	27.75±1.03	1.62±0.07
EN	16	3	30.00±1.31[a]	29.25±1.17	1.03±0.05[a]
		7	36.00±1.51[a]	29.00±1.07	1.24±0.05[a]
Arg	16	3	33.13±1.25[ab]	28.38±1.06	1.17±0.06[ab]
		7	41.75±1.28[ab]	28.88±1.13	1.45±0.07[ab]

a：$P<0.01$，与C组比较；b：$P<0.01$，与EN组比较

2.1.2 血清IL-2和白细胞吞噬功能的改变 伤后第3、7天EN组和Arg组的血清IL-2水平和白细胞吞噬率明显低于伤前水平（$P<0.01$）。Arg组的IL-2水平和白细胞吞噬率在各时相点都显著高于EN组（$P<0.01$）。见表2。

表2 大鼠血清IL-2和白细胞吞噬率的变化（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	伤后时间（d）	IL-2（ng/ml）	PMN PR（%）
C	8		7.16±0.13	62.75±3.77
EN	16	3	2.84±0.42[a]	30.13±3.09[a]
		7	2.54±0.28[a]	40.50±2.93[a]
Arg	16	3	3.80±0.37[ab]	42.88±2.42[ab]
		7	4.59±0.59[ab]	50.63±1.69[ab]

a：$P<0.01$，与C组比较；b：$P<0.01$，与EN组比较

2.2 重型颅脑损伤大鼠蛋白代谢的改变

2.2.1 血清蛋白含量的改变 伤后第3天EN组和Arg组的PA、RBP含量较C组显著下降（$P<0.01$），但这两组之间无显著性差异（$P>0.05$）。伤后第7天EN组的PA和RBP含量仍显著低于C组（$P<0.01$）；Arg组的PA含量明显高于EN组（$P<0.05$），且接近正常值（$P>0.05$），该组的RBP含量和EN组相比有增高的趋势，但差异无统计学意义（$P>0.05$）。见表3。

表3 大鼠血清PA和RBP含量的改变（mg/L，$\bar{x}\pm s$）

组别	n	伤后时间（d）	PA	RBP
C	8		220.35±28.50	36.39±5.78
EN	16	3	81.45±13.84[a]	24.55±1.77[a]
		7	126.85±23.94[a]	28.42±1.11[a]
Arg	16	3	85.55±29.23[a]	24.99±1.67[a]
		7	182.83±53.86[b]	31.63±2.51

a：$P<0.01$，与C组比较；b：$P<0.05$，与EN组比较

2.2.2　血清代谢激素含量的改变　　伤后第 3 天 EN 组和 Arg 组的 INS 含量、INS/GLU 值显著低于 C 组($P<0.01$),而 GLU、Cor 含量则显著增高($P<0.01$)。第 3 天这两组的 GLU 含量差异无统计学意义($P>0.05$),但 Arg 组的 Cor 含量显著低于 EN 组($P<0.01$)。伤后第 7 天 EN 组的 GLU 和 Cor 含量都显著高于 Arg 组($P<0.05$, $P<0.01$)。EN 组和 Arg 组的 INS 含量在各时相点无显著性差异($P>0.05$),而 Arg 组的 INS/GLU 值在第 7 天明显高于 EN 组($P<0.05$)。见表 4。

表 4　大鼠血清的 INS、GLU 和 Cor 含量的改变($\bar{x}\pm s$)

组别	n	伤后时间(d)	INS (mU/L)	GLU (ng/L)	INS/GLU	Cor (μg/L)
C	8		11.32±1.75	64.06±7.44	0.177±0.020	12.64±1.29
EN	16	3	2.12±1.02[a]	96.63±12.13[a]	0.023±0.013[a]	53.35±4.20[a]
		7	4.83±0.98[a]	110.74±14.61[a]	0.045±0.012[a]	20.37±2.24[a]
Arg	16	3	3.51±1.48[a]	86.91±7.68[a]	0.042±0.020[a]	29.81±4.39[ab]
		7	6.45±1.56[a]	88.27±8.26[ab]	0.074±0.022[ac]	17.87±1.02[ac]

a:$P<0.01$,与 C 组比较;b:$P<0.01$,c:$P<0.05$,与 EN 组比较

3　讨论

重型颅脑损伤后机体在 72 h 内即发生免疫功能低下,细胞免疫和体液免疫同时受损,相比之下,细胞免疫受损的程度更为严重。临床研究显示,重型颅脑损伤后肠内营养可维持肠黏膜结构的完整性,促进消化吸收功能恢复,减轻伤后高分解代谢,但在控制感染方面还存在不足[9]。本研究结果显示,给予重型颅脑损伤大鼠 EN 后,第 3 天的 $CD4^+$ 细胞数量、$CD4^+/CD8^+$ 值、IL-2 水平以及白细胞吞噬率显著低于正常水平,第 7 天虽比第 3 天有所改善,但较正常对照组仍存在显著差距,可见普通 EN 在恢复机体免疫功能方面作用有限,这可能与重型颅脑损伤引起的高分解代谢,严重酸碱失衡和水电介质紊乱,使机体对营养底物利用和耐受程度降低,导致普通肠内营养支持还不能有效改善机体免疫功能有关。本研究结果显示,Arg 组细胞免疫值在伤后各时相点显著低于正常对照组,却始终高于 EN 组。说明 Arg 对重型颅脑损伤机体细胞免疫功能的改善有一定促进作用。其机制可能与以下因素有关:Arg 可刺激 T 淋巴细胞增殖,提高 $CD4^+$、$CD3^+$、$CD4^+/CD8^+$ 值;增强巨噬细胞吞噬功能和自然杀伤细胞对靶细胞的溶解作用[10];增加脾内单核淋巴细胞对 IL-2 的分泌活性;使 IL-2 受体增多,出现时间提前,从而加快 T 细胞增殖、分化和成熟等[11]。

重型颅脑损伤后机体应激产生高分解代谢,机体呈负氮平衡状态,出现低蛋白血症[1]。本研究结果显示,EN 组在伤后第 3 天 PA 及 RBP 含量和正常值相比显著下降,到第 7 天虽有上升趋势,但仍低于正常水平。可见创伤后传统的营养干预措施,并不能有效控制低蛋白血症和瘦肉组织群过度分解。而添加了 Arg 的实验组,在伤后 PA 及 RBP 含量显著高于 EN 组。提示 Arg 强化的肠内营养比普通肠内营养更能有效改善重型颅脑损伤后机体高分解状态下蛋白质过度分解。可能与 Arg 增加机体内氮潴留,促进内脏蛋白质合成,控制蛋白质更新及改善机体的氮平衡等有关[5]。

本研究结果显示,损伤后大鼠体内合成代谢激素 INS 含量明显降低,分解代谢激素 GLU 及 Cor 含量明显增高,以致 INS/GLU 值大幅下降,说明这几种代谢激素在重型颅脑损伤机体的高代谢反应中扮演重要的角色。Arg 组 INS/GLU 值在伤后第 3 天和 EN 组无统计学意义,但第 7 天显著高于 EN 组,且 Arg 组各时相点 Cor 含量都显著低于 EN 组。可见 Arg 可改善重型颅脑损伤后机体代谢激素分泌紊乱。Arg 影响机体激素分泌的机制较复杂,一方面可能是 Arg 可促进胰腺分泌胰岛素;另一方面 Arg 维护肠黏膜屏障功能,减少细菌、内毒素移位,减轻内毒素对免疫细胞的刺激,降低细胞因子和炎症介质的释放,进而降低机体应激程度[3,5]。

综上,Arg 营养干预可提高重型颅脑损伤机体的细胞免疫功能,改善蛋白代谢和代谢激素分泌紊乱。这不仅为重型颅脑损伤患者的临床免疫营养治疗提供了实验依据,也为临床营养护理提供新的思路。

参考文献:

[1] 毛伯镛,刘艳辉. 重型颅脑损伤患者的代谢改变及营养支持[J]. 创伤外科杂志, 2003, 5(6): 401-402.

[2] 刘开俊,郑国寿,宋先舟, 等. 颅脑损伤后蛋白质代谢和免疫功能的变化及意义[J]. 创伤外科杂志, 2004, 6(4): 260-262.

[3] 李　宁,朱维铭. 营养免疫学及其临床相关问题[J]. 中国普通外科杂志, 2002, 11(8): 449-451.

[4] 邓诗琳,曹丽萍. 必须重视抗炎免疫营养素对危重患者应用的研究[J]. 中华烧伤杂志, 2003, 19(3): 195-196.

[5] 刘　坚, 苏宜香. 精氨酸及其代谢产物在肠外与肠内营养中的免疫作用研究进展[J]. 肠外与肠内营养, 1998, 5(2): 110-113.

[6] 刘海鹏,尹志勇,王正国, 等. 颅脑局部冲击伤——一种新的颅脑损伤模型[J]. 中华实验外科杂志, 1999, 16(1): 91.

[7] 彭　曦,尤忠义,颜　洪, 等. 盐酸精氨酸和醋酸精氨酸对烧伤家兔免疫功能及酸碱平衡影响的对比研究[J]. 中华烧伤杂志, 2005, 21(4): 262-265.

[8] 筱泽洋太郎. 不可缺少的氨基酸——精氨酸[J]. 日本医学介绍, 1996, 17(1): 9-10.

[9] 曾劲松,徐俊法,郭义君. 重型颅脑损伤早期肠内营养支持的临床研究[J]. 创伤外科杂志, 2002, 4(1): 24-25.

[10] Daly J M, Reynolds J, Thom A, *et al*. Immune and metabolic effects of arginine in the surgical patient[J]. Ann Surg, 1988, 208(4): 512-523.

[11] Kung S P, Wu C W, Lui W Y. Arginine modulated cyclosporine-induced immune suppression in rats transplanted with gastric cancer cells[J]. *In Vivo*, 2001, 15(1): 39-44.

(编辑　陈聪连)