文章编号:1000-5404(2010)23-2503-04

论著

谷氨酰胺联合维生素C对军事训练中暑及内毒素血症的预防作用及机制研究

牟 东,薛世祥,代剑华,赵海霞,袁 月,彭贵勇 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军消化病研究所)

【摘要】 目的 观察谷氨酰胺联合维生素C对中暑及肠源性内毒素血症的干预作用,初步探讨其作用机制。方法 对48例在高热环境下进行军事训练的士兵按照区组随机化法分为预防组(24例)和对照组(24例),预防组士兵在常规口服补液的基础上加服谷氨酰胺联合维生素C预防中暑,对照组采用相同的常规补液加服安慰剂。比较2组中暑发生率,训练前后氧化应激指标、血浆内毒素、十二指肠粘膜超微结构及十二指肠粘膜热休克蛋白70(HSP70)表达变化。结果 药物预防组和对照组中暑的发生率分别为8.3%(2/24)和33.3%(8/24),差异具有统计学意义($P<0.01$);药物预防组较对照组血清超氧化物歧化酶(SOD)水平升高,血清丙二醛(MDA)及血清内毒素降低,差异均有统计学意义($P<0.01$);透射电镜观察药物预防组十二指肠粘膜微绒毛、细胞器、内质网基本正常,对照组十二指肠粘膜多数微绒毛紊乱,细胞器、内质网均有肿胀,免疫组化结果表明药物预防组HSP70表达较对照组明显升高。结论 谷氨酰胺联合维生素C可为小肠修复提供能量来源,提高热休克蛋白对小肠粘膜的保护作用,同时减轻氧化应激反应,从而保护小肠的屏障功能,降低肠源性内毒素血症发生。可用于中暑的预防性治疗。

【关键词】 谷氨酰胺;维生素C;中暑;内毒素;热休克蛋白
【中图法分类号】 R825;R969;R977.4 【文献标志码】 A

Preventive effect of combined glutamine and vitamin C on heat apoplexy and endotoxemia in military training and its mechanism

Mu Dong, Xue Shixiang, Dai Jianhua, Zhao Haixia, Yuan Yue, Peng Guiyong (Institute of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

【Abstract】 Objective To observe the intervention effect of combined glutamine and vitamin C on heat apoplexy and enterogenous endotoxemia and its mechanism. Methods Forty-eight soldiers at military training in high temperature environment were divided into heat-apoplexy treatment group ($n=24$) and control group ($n=24$). Soldiers in heat-apoplexy treatment group were treated with combined glutamine and vitamin C plus routine oral fluid, while those in control group were given routine oral fluid and placebo. Incidence of heat apoplexy, oxidative stress index, plasma endotoxin, ultra-structure of duodenal mucosa and expression of heat shock protein 70 (HSP70) in duodenal mucosa were compared before and after training. Results The incidence of heat apoplexy was 8.3% (2/24) and 33.3% (8/24) in heat-apoplexy treatment group and control group, respectively ($P<0.01$). The level of superoxide dismutase (SOD) was higher while the serum level of malondialdehyde (MDA) and endotoxin was lower in heat-apoplexy treatment group than in control group ($P<0.01$). Transmission electron microscopy showed that the villi, orgaelles and endoplasmic reticulum of duodenal mucosa were almost normal in heat-apoplexy treatment group. However, the villi were arranged in disorder with enlarged orgaelles and endoplasmic reticulum of duodenal mucosa in control group. Immunohistochemistry showed that the expression level of HSP70 was significantly higher in heat-apoplexy treatment group than in control group. Conclusion Glutamine in combination with vitamin C can provide the energy for the repair of small intestine, increase the protective effect of HSP70 on small intestine, and reduce the incidence of oxidative stress reaction, thus protecting the barrier function of small intestine and decreasing the occurrence of enterogenous endotoxemia. It can thus be used in prevention of heat apoplexy.

【Key words】 glutamine; vitamin C; heat apoplexy; endotoxin; heat shock protein

Supported by the Innovative Foundation of the Scientific Research of Third Military Medical University (2009XYY17). Corresponding author: Peng Guiyong, E-mail: pgy63@163.com

【基金项目】 第三军医大学科研创新基金(2009XYY17)
【通信作者】 彭贵勇,E-mail:pgy63@163.com

中暑是环境高热或剧烈的体力活动产生的一种急性应激反应。随着全球气候变暖,中暑的发生率逐年增加[1]。在高热环境中进行军事行动,容易发生大规模中暑,严重影响部队战斗力。目前研究认为氧化应激反应和内毒素血症是中暑及其并发症发生的重要病理生理学基础[2]。有研究显示,谷氨酰胺能有效降低肠源性内毒素血症的发生率[3],大剂量维生素C可以降低氧化应激,从而对中暑产生保护作用。为研究药物对中暑的预防作用,我们应用谷氨酰胺联合维生素C,探讨其预防中暑的效果及其机制,为临床药物预防中暑提供依据。

1 资料与方法

1.1 对象选择及预防方法

选择在高热环境下(平均温度>37 ℃)参加2009年9月军事训练士兵48例作为研究对象,年龄(21±3)岁,均为男性,按照区组随机化法分为预防组(24例)和对照组(24例)。2组在年龄之间的差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。预防组于训练同时给予口服谷氨酰胺联合维生素C(谷氨酰胺,2粒/次,3次/d,成都地奥集团;大剂量维生素C,0.5 g/次,3次/d,湖北华中药业),连续1周;对照组给予葡萄糖胶囊2粒/次,3次/d。2组正常给予口服补钠盐。诊断中暑及分级标准按2002年中华人民共和国卫生部发布中华人民共和国国家职业卫生标准GBZ 41-2002《职业性中暑诊断标准》[4]分为轻症中暑和重症中暑,其中重症中暑又分为热射病、热痉挛和热衰竭3型。本研究经医院伦理委员会审批通过,研究对象均知情同意。

1.2 试剂及仪器

SOD、MDA检测试剂盒由南京建成生物工程研究所提供,血清内毒素检测试剂盒由厦门鲎试剂公司提供,兔抗人多克隆抗体由北京博奥森生物技术有限公司提供,S-P免疫组化试剂盒及DAB试剂盒由北京中杉金桥生物技术有限公司提供。仪器为PHILIPS TECNAI-10透射电子显微镜,723紫外分光光度仪。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 监测中暑的发生率 按照《职业性中暑诊断标准》,根据高热训练中出现的症状,来判断中暑的发生率。

1.3.2 血清制备 于高热训练前后,空腹取静脉血5 ml,不加抗凝剂,血液于4 ℃冰箱静置保存2 h后,3 000 r/min,离心10 min,取上清液,即为血清,于4 ℃保存上述血清备用。

1.3.3 血清MDA含量和SOD活性测定 丙二醛MDA含量采用硫代巴比妥酸法测定,SOD活性测定采用黄嘌呤氧化酶法,严格按试剂盒使用说明书进行操作。血浆内毒素检测采用鲎实验。

1.3.4 标本的采集 通过胃镜在训练前后取部分十二指肠降段粘膜组织。标本一部分立即放入10%多聚甲醛固定,用于HSP70免疫组化检查;另一部分放入2.5%戊二醛固定,用于透射电镜检查十二指肠粘膜上皮细胞超微结构的改变。

1.3.5 免疫组化染色 将置于10%甲醛固定好的标本,常规石蜡切片,片厚4 μm,脱腊至水,加入兔抗人HSP70抗体(稀释比例为1∶200),阴性对照片以PBS代替一抗,滴加S-P免疫组化试剂盒,DAB显色。每张切片分别从上、下、左、右及中间观察5个不连续的高倍视野(×100),用Image-pro Plus 5.02图像分析(Media Cybernetics Inc,USA)测算其平均光密度作为一个标本HSP70表达的统计量。

1.3.6 超微结构的观察 将2.5%戊二醛固定,PBS漂洗后用1%锇酸固定2 h,丙酮梯度脱水,环氧树脂618包埋后半薄切片定位,超薄切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色,PHILIPS TECNAI-10透射电子显微镜观察并照相。定性观察十二指肠粘膜的微绒毛线粒体、细胞器等超微结构变化。

1.4 统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行分析,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,2组间比较采用t检验。计数资料以百分率表示,2组间比较采用χ^2检验。

2 结果

2.1 2组中暑发生率比较

在训练期间,预防组中暑发生2例(8.3%),均为轻度中暑;对照组中暑8例(33.3%),其中轻度中暑6例,热痉挛2例。药物预防组中暑发生率明显低于对照组($P<0.05$)。

2.2 氧化应激指标及内毒素的变化

对照组高温训练前后比较,血清SOD无明显变化,血清MDA($P<0.05$)及内毒素($P<0.01$)明显升高;药物预防组高温训练前后比较,血清SOD明显的升高($P<0.01$),血清MDA及内毒素无明显变化($P>0.05$);高温训练前2组士兵血清SOD、MDA、内毒素无明显差异($P>0.05$),而高温训练后药物预防组血清MDA($P<0.05$)及内毒素($P<0.01$)明显低于对照组,血清SOD明显高于对照组($P<0.01$)。提示谷氨酰胺联合维生素C能够抑制高热引起的MDA及内毒素升高,增加高热环境中机体血清SOD的含量(表1)。

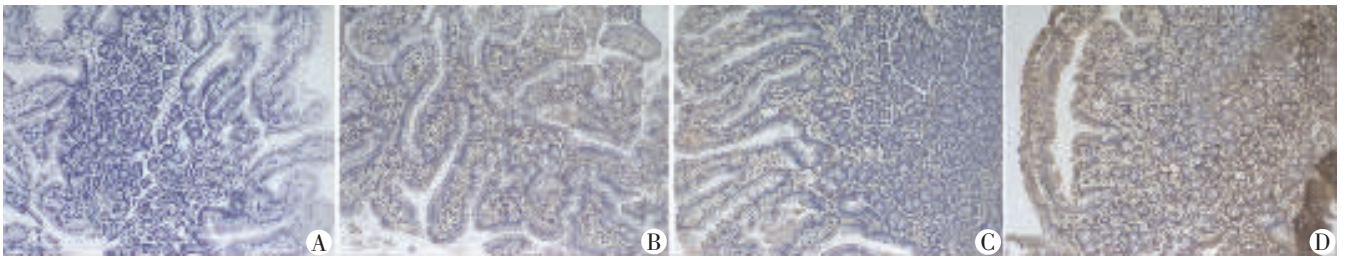
表1 谷氨酰胺联合维生素C对各组血清SOD活性和MDA及内毒素含量的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	n	SOD(U/ml)	MDA(U/ml)	内毒素(EU/ml)
药物预防组	24			
高温训练前		88.81±10.40	4.84±2.01	1.49±0.24
高温训练末		110.97±7.01^{bd}	4.05±1.11^{c}	1.57±0.29^{d}
对照组	24			
高温训练前		87.29±8.22	4.63±1.37	1.56±0.28
高温训练末		88.26±12.22	5.94±2.85^{a}	2.30±0.29^{b}

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与训练前比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与对照组高温训练末比较

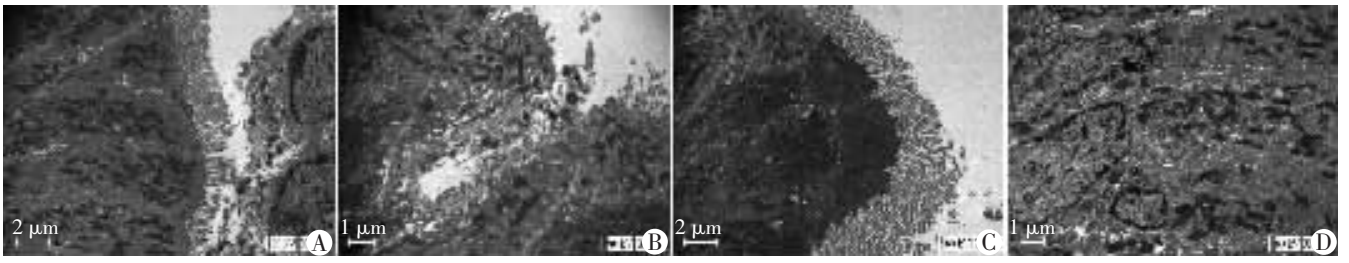
2.3 免疫组化染色观察HSP70的表达

高温训练后对照组HSP70的光密度值(0.159±0.010)较训练前(0.169±0.013)无明显差异($P>0.05$),而药物预防组HSP70的光密度值(0.220±0.016)较训练前(0.166±0.013)明显升高($P<0.01$),训练后药物预防组HSP70的光密度值显著高于对照组($P<0.01$,图1),说明谷氨酰胺联合维生素C可以诱导HSP70的表达增强。



A:阴性对照组;B:训练前对照组;C:训练后对照组;D:训练后药物预防组

图 1 免疫组化染色观察各组热休克蛋白 70 的表达 (S-P ×100)



A:对照组,观察微绒毛变化;B:对照组,观察内质网的变化;C:药物预防组,观察微绒毛变化;D:药物预防组,观察内质网的变化

图 2 训练后各组十二指肠粘膜透射电镜观察

2.4 透射电镜超微结构观察结果

经戊二醛固定,透射电镜观察可见训练后对照组十二指肠肠粘膜微绒毛稀疏、变短、参差不齐,细胞器、内质网均有肿胀(图 2A、B);而药物预防组肠粘膜微绒毛高而密,整齐排列,仅少数内质网轻度肿胀,高尔基体和内质网等结构、分布均正常(图 2C、D)。提示高热环境可引起十二指肠粘膜超微病理的明显改变,谷氨酰胺联合维生素 C 可预防高热对小肠粘膜的超微病理影响。

3 讨论

热应激时,肠粘膜上皮细胞旁路开放增加,上皮细胞的阻力减少,从而明显增加肠粘膜的通透性,而加之由于皮肤散热所需血液灌注量增加,小肠血流量也随之减少,导致组织缺氧,ATP 的耗竭,酸中毒,氧化应激反应增加,造成肠道屏障损害。氧化应激中最重要的酶是 SOD 和 MDA,SOD 作为机体中一种重要的抗氧化酶,它可消除体内过剩的超氧阴离子,阻止自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸,防止发生脂质过氧化,从而达到对机体组织的保护作用,而 MDA 的含量可间接反映机体细胞受自由基攻击的严重程度和组织细胞的脂质过氧化程度,随着氧化应激的增加,进一步破坏肠道屏障功能障碍[2,5]。内毒素(endotoxin,ET)是革兰阴性细菌(GNB)细胞壁外膜的最外层脂多糖(LPS)成分,通常在肠道中含量较高,血液中含量较少。由于热应激破坏肠道的粘膜屏障功能,最终使肠道潜在内毒素大量移位入血,因而形成肠源性内毒素血症(intestinal endotoxemia)。目前认为内毒素及其所介导的炎性介质诱导全身炎症反应,参与远隔器官的损伤及多器官功能障碍综合征(MODS)的发生和发展,是造成中暑症状的重要原因,也严重影响中暑的预后[6]。HSP 作为一种有高度保守性的应激蛋白,对保护机体免遭应激损害起着重要的作用。近年研究显示 HSP 是主要的分子伴侣之一,它能增加肠上皮紧密连接蛋白的表达及维持肠上皮细胞的自稳性,从而提高肠上皮细胞对应激原的耐受性,保护肠粘膜屏障功能[7]。另外,HSP70 能够干扰氧化应激,热休克预处理可以诱导纹状体 HSP70 过量表达从而减少氧化应激和能量消耗[8]。

目前针对中暑用药比较多,如内毒素抗体、内毒素拮抗剂、中药等,有研究发现通过预防性给予脂多糖结合蛋白(LBP)抗体能保护小剂量内毒素的损害,但不能改善大剂量内毒素造成的损伤[9]。杀菌性/通透性增加蛋白(BPI)是一种内毒素拮抗剂,具有较强的杀菌能力和中和内毒素作用的能力,能有效地降低革兰阴性菌感染及脓毒性休克的死亡率,但其有效性和安全性尚不十分肯定,且价格高昂,因此临床用于中暑肠源性内毒素血症使用受到限制[10]。预先给予山莨菪碱,可以使动物血浆内毒素含量明显降低,其作用机制可能与在细胞膜水平上抑制宿主细胞与内毒素的结

合,并能增强巨噬细胞系统清除内毒素的能力有关,但缺点是由于它会减慢胃肠蠕动从而增加内毒素进入肠道屏障的发生率[11]。中药热毒平治疗中暑的主要作用机制为拮抗中暑内毒素血症,但其缺点是热毒平对肠道产毒菌的生长抑制较弱,不能起到早期预防的作用[12]。葛根素可减少组织的过氧化脂质含量,提高SOD活性,降低NOS活性,减轻自由基反应对组织的损害,但以葛根提取物应用时,葛根素在体内的分布广,体内滞留时间延长,容易造成蓄积毒性。寻找疗效明显、毒副反应低、价格低廉的预防中暑的药物,是值得研究的课题。

谷氨酰胺是肠粘膜上皮首要的能量来源[2]。它为肠粘膜提供细胞蛋白、核酸合成的底物,能促进胃肠激素的分泌,有利于胃肠粘膜的生长和修复。此外有研究证明谷氨酰胺可降低肠道通透性,减少肠内细菌及毒素入血,从而保护肠粘膜。最近研究认为谷氨酰胺通过增强氨基己糖生物合成途径中SP1基因和HSF-1的O-糖基化,并移位到细胞核,最后转录激活,诱导HSP70的表达增强[13]。维生素C是一种重要的自由基清除剂,能参与体内糖代谢氧化还原过程,在生物氧化及还原过程和细胞呼吸中起重要作用。实验研究表明,大剂量维生素C可明显减轻缺血再灌注引起的线粒体功能障碍。因此有效地消灭及清除氧自由基,可以增强机体的抵抗力,减轻氧化应激反应,增强肠粘膜屏障防御功能,降低肠源性感染的发生。

本研究尝试在常规口服补液的基础上加用谷氨酰胺联合维生素C,用于高热训练中暑的早期预防。研究显示药物预防组对中暑的预防效果明显优于对照组。药物预防组较对照组SOD水平升高,MDA水平降低,血清内毒素降低,透射电镜观察药物预防组十二指肠粘膜微绒毛、细胞器、内质网基本正常,对照组十二指肠粘膜多数微绒毛紊乱,细胞器、内质网均有肿胀,免疫组化结果表明药物预防组热休克蛋白(HSP70)表达较对照组明显升高。证明了谷氨酰胺联合维生素C可有效用于高热训练中暑及其肠源性内毒素血症的早期预防。上述实验结果提示谷氨酰胺联合维生素C可从多个环节对中暑起预防作用:①保护肠粘膜作用,促进小肠粘膜的修复,减少内毒素的吸收,预防肠源性内毒素血症产生。②抑制自由基,降低氧化应激反应,减少组织及细胞的损伤。③提高热休克蛋白(HSP)表达,抑制细胞因子的产生,保护细胞组织免受内毒素损伤。提示谷氨酰胺联合维生素C可作为预防中暑的药物制剂。

参考文献:

[1] 林晓静,李亚洁,罗炳德,等.高温复合脂多糖应激大鼠血浆TNF-α、IL-6含量的变化规律[J].第三军医大学学报,2006,28(5):431-434.

[2] Lambert G P. Intestinal barrier dysfunction, endotoxemia, and gastrointestinal symptoms: the 'canary in the coal mine' during exercise-heat stress? [J]. Med Sport Sci, 2008, 53: 61-73.

[3] Singleton K D, Wischmeyer P E. Oral glutamine enhances heat shock protein expression and improves survival following hyperthermia [J]. Shock, 2006, 25(3): 295-299.

[4] 中华人民共和国卫生部. GBZ41-2002 职业性中暑诊断标准[S].北京:中国标准出版社,2002.

[5] Fasina Y O, Bowers J B, Hess J B, *et al*. Effect of dietary glutamine supplementation on Salmonella colonization in the ceca of young broiler chicks[J]. Poult Sci, 2010, 89(5): 1042-1048.

[6] Lambert G P. Stress-induced gastrointestinal barrier dysfunction and its inflammatory effects[J]. J Anim Sci, 2009, 87(14 Suppl): E101-E108.

[7] Dokladny K, Ye D, Kennedy J C, *et al*. Cellular and molecular mechanisms of heat stress-induced up-regulation of occludin protein expression: regulatory role of heat shock factor-1 [J]. Am J Pathol, 2008, 172(3): 659-670.

[8] Wang J L, Ke D S, Lin M T. Heat shock pretreatment may protect against heatstroke-induced circulatory shock and cerebral ischemia by reducing oxidative stress and energy depletion [J]. Shock, 2005, 23(2): 161-167.

[9] Xu Z, Qian G S, Li Q, *et al*. Screening of mimetic peptides for CD14 binding site with LBP and antiendotoxin activity of mimetic peptide *in vivo* and *in vitro* [J]. Inflamm Res, 2009, 58(1): 45-53.

[10] 刘宏华,王惠珍,邹飞.抗内毒素治疗研究进展[J].广东医学,2007,28(11):1867-1868.

[11] 唐文春,张尽延,徐小波,等.山莨菪碱对小鼠热应激的保护作用[J].工业卫生与职业病,2006,32(2):80-82.

[12] 梁雪兰,杨光,罗炳德,等.热毒平抗中暑内毒素血症信号转导机制研究[J].辽宁中医药大学学报,2008,10(10):154-156.

[13] Hamiel C R, Pinto S, Hau A, *et al*. Glutamine enhances heat shock protein 70 expression *via* increased hexosamine biosynthetic pathway activity[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2009, 297(6): C1509-C1519.

(收稿:2010-07-12 修回:2010-08-18)

(编辑 张 维)