DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.03.008
第26卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 3
2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

文章编号:1000-5404(2004)03-0205-03

论著

谷氨酰胺对烧伤大鼠肠三叶因子表达的影响

彭 曦[1],陈蓉春[2],王 裴[1],尤忠义[1],汪仕良[1] ([1]第三军医大学西南医院全军烧伤研究所,创伤烧伤复合伤国家重点实验室,重庆 400038;[2]重庆医科大学应用技术学院药理学教研室,重庆 400042)

提 要:目的 探讨谷氨酰胺对烧伤大鼠肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF)表达的影响及其可能的机制。方法 采用30%体表面积Ⅲ度烧伤大鼠模型,随机分正常对照(C)组,烧伤后普通肠道营养(EN)组及烧伤后添加谷氨酰胺的肠道营养(GLN)组。EN组用等量甘氨酸补足氮量,使两组烧伤大鼠保持等氮、等热卡,动态观察伤后两组大鼠ITF及ITF mRNA的变化。结果 正常大鼠小肠中ITF及ITF mRNA均有一定表达,烧伤后其表达一过性增加,随后明显降低。两组比较,GLN组大鼠肠组织中ITF及ITFmRNA水平明显高于EN组,同时GLN组肠粘膜受损程度也明显低于EN组。结论 严重烧伤后肠粘膜结构受损是ITF合成下降的主要原因,谷氨酰胺能保护肠粘膜,维护杯状细胞的正常结构和功能,促进ITF特别是ITF二聚体的合成和分泌。

关键词:谷氨酰胺;肠三叶因子;肠道营养;大鼠;烧伤
中图法分类号:R341.6;R644;R977.4 文献标识码:A

Effects of glutamine on the expression of intestinal trefoil factor in rats after burn injury

PENG Xi[1], CHEN Rong-chun[2], WANG Pei[1], YOU Zhong-yi[1], WANG Shi-liang[1] ([1]State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Pharmacology, College of Adult Education, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To explore the effects of glutamine on intestinal trefoil factor (ITF) and ITF mRNA expression in burned rats and the possible mechanisms. **Methods** Wistar rats inflicted with 30% total body surface area full thickness burns were randomly divided into three groups: normal enteral nutrition (EN), enteral nutrition plus glutamine (GLN), and normal control (C). The expression and content of ITF in the intestine were quantitatively and localizationally determined by *in situ* hybridization (ISH), immunohistochemistry, and high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** ITF and ITF mRNA were expressed in the whole small intestine, and most of them were localized in goblet cells of intestinal villus. After burn injury, the structure of intestinal mucosa was severely damaged, and the abilities of goblet cell synthesis and ITF secretion, especially ITF dimer, were significantly decreased. GLN could lessen the extent of ITF drop though it could not reverse this trend. Meanwhile, compared with EN, GLN could abate the intestinal mucosa injury obviously. **Conclusion** The decline of ITF synthesis may result from damaged intestine structure after severe burn. GLN can protect the intestinal mucosa, preserve the normal structure and function of goblet cells, and promote the synthesis and secretion of ITF, particularly ITF dimer.

Key words: glutamine; intestinal trefoil factor; enteral nutrition; rat; burn

业已证明,肠道是严重创伤后受损最严重的器官之一,伤后肠粘膜屏障功能受损,导致细菌、内毒素移位,引起肠源性感染和肠源性高代谢,进而可引发失控性炎症反应(systemic inflammatory response syndrom, SIRS)和多器官功能不全(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)[1]。因此,维护肠道结构和功能已成为创伤救治的重要内容之一。肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF)是一种特殊的生长因子,主要由杯状细胞分泌,能稳定肠粘液层,防止有害物质对肠粘膜的损伤,并能促进肠上皮细胞增殖与移行,修复受损肠粘膜[2]。因此ITF在肠道的自我保护机制中占据重要地位。我们以往的工作已证实与静脉营养相比,肠道营养可促进ITF的表达,减轻烧伤后肠道受损程度,但其疗效还不是十分理想[3]。我们推测可能与普通肠道营养中缺

基金项目:国家自然科学基金资助面上项目(30320020094)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30320020094)
作者简介:彭 曦(1968-),男,四川省成都市人,博士,副研究员,主要从事创伤后代谢营养方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68754149-8056
收稿日期:2003-06-22;修回日期:2003-10-15

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

乏谷氨酰胺(glutamine, GLN)有关[4],本实验旨在观察谷氨酰胺强化的肠道营养对肠道合成和分泌 ITF 的影响,以期阐明 GLN 保护肠道组织结构,维护肠道功能的作用机制。并为临床合理使用谷氨酰胺提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

rITF cDNA 质粒由美国佛罗里达大学 Thompson 博士惠赠,rITF(二聚体)由丹麦 NOVO 研究院 L. Thim 教授惠赠,质粒提取盒,地高辛 cRNA 探针标记盒,内切酶 xhoI, T3 RNA 聚合酶均购自德国宝灵曼公司,三氟乙酸购自德国 MERCK 公司,PEAE-Sephadex A-50 购自 Sigma 公司,Hypersil C4 柱由大连国家色谱中心提供,羊抗兔抗血清由武汉博士德公司提供,实验所用谷氨酰胺为颗粒剂(商品名:安凯舒,含 99.2% L-谷氨酰胺),由重庆药友制药有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制作及分组 健康成年 Wistar 大鼠 110 只,体质量 205~260 g,雌雄不拘,(第三军医大学大坪医院动物所提供)伤前禁食 12 h,1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔麻醉,背部电推剃毛,称重后置剃毛区于 92 ℃水浴中 18 s,造成 30%TBSA Ⅲ度烧伤(病理切片证实)。伤后按 50 ml/kg 腹腔注入乳酸林格液抗休克。随机将动物分成 3 组:烧伤后普通肠道营养(enteral nutrition, EN)组,50 只;谷氨酰胺强化的肠道营养(glutamine, GLN)组,50 只;正常对照(control, C)组,10 只。

1.2.2 时相设置 实验分烧伤后(PBD)1、3、5、7、10 d 5 个时相点(每时相点包括 GLN 和 EN 两组,每组每时相 10 只大鼠,共 110 只大鼠)。

1.2.3 营养素的供应 烧伤大鼠不论 GLN 或 EN 组均按每天 732.2 kJ/kg 的标准供给,其中糖、脂、蛋白的供热比为 50∶35∶15。GLN 组按每公斤体重每天添加 1.0 g GLN,EN 组采用等量的甘氨酸。

1.2.4 肠粘膜 ITF mRNA 表达的检测 质粒转化、目的片段回收及 ITF 探针标记均按宝灵曼公司相应的说明书操作。伤后各时相点活杀大鼠取一段回肠约 1 cm,4%多聚甲醛固定,冰冻切片(20 μm),其余步骤参见文献[5],制片在 TIGER2000 型图像分析仪上测定阳性染色的吸光度值。

1.2.5 ITF 免疫组织化学染色 ITF 抗血清的制备及纯化参见文献[5]。大鼠活杀后取一段回肠约 1 cm,置 10%福尔马林液中固定。常规石蜡包埋切片,一抗工作浓度为 1∶32,其余步骤及阴性对照按常规进行操作,图像处理同上。

1.2.6 肠粘膜中 ITF(二聚体)含量测定 色谱条件及标准曲线制作均按文献[5]的方法进行,取大鼠回肠粘膜约 200~300 mg,加 2 ml 生理盐水(含 400 U 抑肽酶),冰浴匀浆,15 000 r/min 4 ℃离心 20 min,取上清 100 μl 进样检测。采用考马斯亮蓝 G-250 法定蛋白。

1.3 统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,所有数据在华西医科大学 PEMS 程序包上作 t 检验。

2 结果

2.1 烧伤大鼠肠粘膜中 ITF mRNA 表达的变化

图像分析显示,烧伤后 ITF mRNA 有一过性表达增加,随着时间延长,特别是烧伤 3 d 以后肠粘膜 ITF mRNA 的表达量明显下降。同 EN 组相比,GLN 组大鼠肠粘膜 ITF mRNA 的表达有所增加,两组在伤后 5~10 d 存在非常显著差异($P<0.01$)(表 1)。

表 1 烧伤大鼠肠粘膜 ITF mRNA 原位杂交图像分析(D_λ, $n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Image analysis of ITF mRNA expression in goblet cells of rat intestinal villus after burn injury by *in situ* hybridization (D_λ, $n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Group	PBD1	PBD3	PBD5	PBD7	PBD10
GLN	452.23±88.23	345.88±89.32	388.23±42.13△△	305.60±45.12△△	438.23±66.20**△△
EN	441.30±55.48	321.12±62.31	268.10±51.20**	214.00±33.45**	257.30±57.69**
C	396.23±49.68	—	—	—	—

**: $P<0.01$, *vs* C; △△: $P<0.01$, *vs* EN

2.2 烧伤大鼠肠粘膜中 ITF 免疫组化染色的变化

ITF 阳性染色呈棕黄色,主要分布于杯状细胞,镜下可见染色深浅不一的杯状细胞。图像分析显示,烧伤后 ITF 表达明显降低,从伤后 7 d 起 GLN 组 ITF 阳性染色的吸光度值明显高于 EN 组(表 2)。

表 2 烧伤大鼠肠粘膜 ITF 免疫组化图像分析(D_λ, $n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Image analysis of ITF-positive goblet cells in rat intestine after burn injury by immunohistochemistry (D_λ, $n=10$, $\bar{x}\pm s$)

Group	PBD1	PBD3	PBD5	PBD7	PBD10
GLN	710.56±112.40	325.20±88.45**	330.45±78.30**	507.89±102.50△	688.80±78.65△
EN	689.21±95.00	387.28±112.30**	308.45±70.20**	323.40±87.00**	525.33±98.20
C	652.30±95.45	—	—	—	—

**: $P<0.01$, *vs* C; △△: $P<0.01$, *vs* EN

2.3 烧伤大鼠肠粘膜 ITF(二聚体)含量的变化

与正常对照组相比,ITF(二聚体)在伤后第 1 天有一过性增加,随后逐渐降低,从第 3 天起大幅下降,伤后 7 d 降至最低点。GLN 组在伤后 5~10 d 显著高于 EN 组($P<0.01$)(表 3)。

表 3 烧伤大鼠肠粘膜中 ITF(二聚体)含量的变化(ng/g, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Tab 3 Changes of content of ITF dimer in rat intestine after burn injury (ng/g, $\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Group	PBD1	PBD3	PBD5	PBD7	PBD10
GLN	602.45±87.00**	325.45±45.60**	359.32±40.20△△	385.10±65.23△△	458.69±47.88△△
EN	623.10±102.45**	289.50±43.00**	244.23±36.56**	198.23±42.00**	389.54±52.36
C	483.56±78.20	—	—	—	—

**: $P<0.01$, *vs* C group; △△: $P<0.01$, *vs* EN group

3 讨论

营养支持是烧伤救治的重要环节,合理的营养支持在降低患者过高的代谢率,维护免疫功能,降低感染

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

率和病死率以及改善预后等方面都有重要意义[6]。研究表明, 谷氨酰胺对危重患者而言是一种必需氨基酸, 缺乏谷氨酰胺的营养支持是不完善的, 营养效果会大打折扣[7]。以往的研究证明, 肠道营养有利于维护肠道组织结构, 减轻肠道损害, 但疗效仍不能令人满意, 可能与普通肠道营养中缺乏谷氨酰胺有关。谷氨酰胺能减轻肠道损害, 被喻为肠粘膜保护剂, 但作用机制还未完全搞清, 特别是与 ITF 这种特殊生长因子的关系还未见报道, 这也是本实验的研究重点。

实验结果显示, 正常情况下肠粘膜中有一定量的 ITF mRNA 表达, 主要分布于杯状细胞, 特别是绒毛上部的杯状细胞中有较高表达, 提示, 只有成熟的杯状细胞才能分泌 ITF。同对照组相比, 烧伤早期 ITF 表达有一过性增加, 随着伤情加重, ITF mRNA 表达明显下降。图像分析的结果表明, 尽管补充谷氨酰胺不能完全逆转 ITF mRNA 下降的趋势, 但下降幅度明显低于普通肠道营养组, 伤后 5～10 d 两组存在非常显著差异($P<0.01$)。免疫组化结果显示, 正常情况下大鼠肠道有较多的 ITF 阳性细胞, 其定位同 ITF mRNA 完全一致。主要分布于肠绒毛杯状细胞中, 而且绒毛顶部和底部的杯状细胞着色深浅不一, 说明 ITF 的分泌量在不同的杯状细胞中存在明显差异, 并与其成熟度有关。实验结果显示, 烧伤大鼠肠粘膜中 ITF(二聚体)的含量显著低于伤前, 特别是伤后 5～7 d 有一个明显的下降过程, 同伤前相比, 最大下降幅度可达 60%, 两组相比, Gln 组明显高于 EN 组。提示补充谷氨酰胺能明显抑制 ITF 特别是 ITF 二聚体的下降幅度, 说明谷氨酰胺改变的不仅是 ITF 的总量, 更为重要的是改变了 ITF 的构成比例。生理状况下, 肠道分泌的 ITF 有两种形式, 单体和二聚体, 其中只有二聚体才有生物活性, 形成二聚体的 ITF 自身稳定性增强, 能同粘液糖蛋白的糖链紧密结合, 稳定肠粘液层[8]。谷氨酰胺促进 ITF 表达的机制可能与其能减轻肠道损害, 维护杯状细胞的结构和功能有关, 而相对较多的 ITF 反过来又增强了肠道的抗损伤能力, 形成良性循环。我们的研究结果提示, 谷氨酰胺保护肠粘膜屏障的作用机制是多方面的, 一方面谷氨酰胺是肠道的重要能源物质, 为肠道提供了大量的碳源和氮源, 对维护肠粘膜细胞的生长、增殖和分化具有重要意义, 另一方面谷氨酰胺能促进肠粘膜合成和分泌 ITF, 维护肠粘膜的结构和功能, 并能加速受损组织的修复。这也许就是谷氨酰胺强化的肠道营养较普通肠道营养能显著减轻肠道损伤, 促进修复的作用机制。

本研究结果提示, 对重症患者, 应积极采用谷氨酰胺强化的肠道营养, 减轻肠道损害, 加快肠道修复, 最终达到降低并发症, 改善预后的目的。

参考文献:

[1] 彭　曦, 汪仕良, 尤忠义, 等. 清洁肠道对烧伤后肠源性高代谢的影响[J]. 第三军医大学学报, 2002, 24(7): 767－768.

[2] Taupin D R, Kinoshita K, Podolsky D K. Intestinal trefoil factor confers colonic epithelial resistance to apoptosis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(2): 799－804.

[3] 彭　曦, 汪仕良, 王风君, 等. 肠道营养和静脉营养对严重烧伤所致肠道损害的影响[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(10): 1161－1163.

[4] Houdijk A P, Leeuwen P A. Glutamine-enriched enteral nutrition in multiple trauma patients[J]. Nutrition, 2000, 16(1): 70－71.

[5] 彭　曦, 谭银玲, 陶麟辉, 等. 肠三叶因子在大鼠肠道中表达的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(7): 623－626.

[6] Boucher J, Eurengbiol H, Farges M C, *et al*. Modulation of immune response with ornithine A-ketoglutarate in burn injury: an arginine or glutamine dependency[J]? Nutrition, 1999, 15(10): 773－777.

[7] Wischmeyer P E, Lynch J, Liedel J, *et al*. Glutamine administration reduces Gram-negative bacteremia in severely burned patients: a prospective, randomized, double-blind trial versus isonitrogenous control[J]. Crit Care Med, 2001, 29(11): 2075－2080.

[8] Yamachika T, Werther J L, Bodian C, *et al*. Intestinal trefoil factor: a marker of poor prognosis in gastric carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2002, 8(5): 1092－1099.

(编辑　王　红)

(上接 200 页)

气应及时更换气管插管。

2.2.2　呼吸机管道脱开或呼吸机管路连接不牢固　这是一种常见的和严重的情况, 最为多见的是呼吸机管道与气管插管连接处, 脱开后可因自主呼吸停止或减弱造成窒息死亡。呼吸机管路要衔接紧密, 必要时需更换管路。对于机械通气的病人, 护士应 24 h 守护在病人身旁。

2.3　氧浓度常见报警原因

空氧混合器故障或某个气体模块损坏, 以及氧电池消耗。应立即更换氧电池或拔出接头。

2.4　电源报警常见原因

墙上电源或插座板故障或后备电池不足、烧毁保险管, 机内电源故障, 应更换保险管或作对应处理[2]。为防止呼吸机故障引起的并发症, 医护人员应了解所用的各种呼吸机的性能、特点和使用方法。定期对仪器进行检测和维修, 在应用呼吸机前应正确连接呼吸机管路, 并连接模拟肺检查呼吸机状况, 无故障后方可应用于病人, 并合理设置呼吸及条件和报警限, 一旦出现呼吸机报警应真正找出报警原因并及时清除。

关键词: 呼吸机; 机械通气; 报警
中图法分类号: R852.81　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 苏鸿熙. 重症加强护理[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996. 264.

[2] 许业珍 江朝光. 重症加强护理学[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2001. 195－210.

(编辑　张大春)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net