DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.10.004
第25卷第10期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 10
848 2003年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 200

论著

文章编号:1000-5404(2003)10-0848-03

不同营养支持对烧伤大鼠肠上皮细胞线粒体呼吸功能的影响

彭 曦,冯晋斌,尤忠义,王 裴,汪仕良 (第三军医大学附属西南医院全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 研究不同营养支持途径对烧伤大鼠肠上皮细胞线粒体呼吸功能的影响。方法 采用30%体表面积Ⅲ度烧伤大鼠模型,随机分成伤前对照(C),静脉营养(PN)及肠道营养(EN)组。EN和PN组给予相同的营养液,每天735 kJ/kg,糖、脂肪、蛋白供热比为:54.5∶31.5∶14,其中糖占15.3%(w/v),卡氮比为183∶1。分离肠上皮细胞线粒体,观察烧伤后线粒体呼吸控制率(RCR)、磷氧比(P/O)、肠道氧摄取率(Oext)及肠粘膜血流量(IMBF)的变化。结果 烧伤后无论PN还是EN组线粒体RCR、P/O、IMBF和Oext均显著降低。两组相比,EN组上述指标均明显高于PN组。相关分析显示,IMBF同RCR、Oext和P/O呈显著正相关($r_1=0.89$, $P<0.01$; $r_2=0.88$, $P<0.01$; $r_3=0.96$, $P<0.01$)。结论 严重烧伤后肠粘膜血流量下降,肠道氧摄取率降低,肠上皮细胞线粒体呼吸功能受损,氧化磷酸化失偶联。肠道营养能改善肠道血供,增加氧摄取率,减轻肠上皮细胞线粒体呼吸功能受抑程度,提高氧化磷酸化水平。

关键词:肠道营养;胃肠外营养;线粒体;呼吸控制率;烧伤
中图法分类号:R322.45; R329.25; R644.02 文献标识码:A

Effects of different nutritional support routes on intestinal epithelium mitochondria respiratory function in burned rats

PENG Xi, FENG Jin-bin, YOU Zhong-yi, WANG Pei, WANG Shi-liang (Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To compare the effects of different nutritional support routes on intestinal epithelium mitochondria respiratory function in burned rats. Methods Wistar rats inflicted with 30% TBSA full thickness of III degree burns were employed as the model and randomly divided into three groups, i.e. burn with enteral nutrition (EN), burn with parenteral nutrition (PN), and normal control (C). Burned rats were infused with 152 ml (175kcal)/kg/day solution for intravenous nutrition and oral administration with the supply energy ratio of glucose to fat and protein being 54.5∶31.5∶14, in which glucose was 15.3%(w/v) and the proportion of calorie to nitrogen was 183∶1. The following indices including respiratory control rate (RCR), oxygen extraction(Oext), P/O ratio and intestine mucosal blood flow(IMBF) were measured at a time table of post-burn day(PBD) at 1, 3, 5 and 7. Results After burn injury, the RCR, Oext, P/O ratio and IMBF significantly decreased in both PN and EN groups, but all the above indices were remarkably higher in EN group than those in PN group. Correlation analysis showed that IMBF was positively correlated with RCR, Oext and P/O ratio ($r_2=0.88$, $P<0.01$; $r_3=0.96$, $P<0.01$). Conclusion After burn injury, the IMBF and Oxet decline, mitochondria respiration function is damaged and oxidative phosphorylation is discoupled. EN is beneficial to the improvement of IMBF, increase in Oext, alleviation of mitochondria respiration dysfunction and promotion of oxidative phosphorylation.

Key words: enteral nutrition; parenteral nutrition; mitochondria; respiratory control rate; burns

肠上皮细胞是构筑肠粘膜屏障的核心,具有吸收、分泌和屏障等多种功能,在维持机体生命活动中居重要地位。但因对缺氧十分敏感,它又是烧伤损害的主要靶细胞之一。我们以往的研究发现严重烧伤后肠道能量代谢紊乱,是引发伤后肠源性高代谢的重要因素[1,2]。由于肠上皮细胞线粒体分离困难,烧伤后肠上皮细胞线粒体的变化以及不同营养支持途径对其的影响尚不清楚,这正是本实验要重点研究的内容。

基金项目:全军"九五"指令性攻关课题(96L043)
作者简介:彭 曦(1968-),男,四川省成都市人,博士,副教授,主要从事创伤代谢营养方面的研究,发表论文30篇。电话:(023)65317058
收稿日期:2002-06-10;修回日期:2003-03-05

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

1　材料和方法

1.1　动物分组

健康成年 Wistar 大鼠 72 只, 体质量 205～255 g, 雌雄不拘, 将动物分成 3 组, 静脉营养(Parenteral nutrition, PN)组, 肠道营养(Enteral nutrition, EN)组及伤前对照(Control, C)组。对照组 8 只大鼠, PN、EN 组各 32 只大鼠, 分烧伤后 1、3、5 、7 d(Post burn days, PBD)4 个时相点, 每组每时相 8 只大鼠。烧伤模型及肠道营养和静脉营养模型的制作参见文献[3]。

1.2　营养液的配制

按糖、脂、蛋白供热比 54.5∶31.5∶14 的比例配制营养液。其中糖占 15.3%(w/v), 卡氮比为 183∶1, 糖、脂供热比为 1.73∶1。在层流台上将各种营养成分混匀后分装, 4 ℃保存, 用前复温至 37 ℃。

1.3　营养素供应量

烧伤大鼠不论 PN 或 EN 组均采用同一营养液, 按每天 732.2 kJ/kg 即 152 ml/kg 的标准供给。

1.4　肠粘膜上皮细胞分离及线粒体的制备

参见 Malcolm[4] 的方法并加以改进。具体方法如下: 首先用超纯水配制 5 种实验介质, 冷藏备用。A 液(118 mmol/L NaCl; 25 mmol/L $NaHCO_3$; 4.7 mmol/L KCl; 1.18 mmol/L KH_2PO_4; 1.9 mmol/L $MgSO_4$; pH 7.4); B 液(A＋0.25% BSA＋5 mmol/L EGTA); C 液(A＋0.25% BSA); D 液(250 mmol/L Sucrose; 5 mmol/L Tris; 2 mmol/L EGTA; pH 7.4); E 液(25 mmol/L Sucrose; 75 mmol/L mannitol; 100 mmol/L KCl; 10 mmol/L K_2HPO_4; 1 mmol/L EGTA; 0.1% BSA; pH 7.5)。动物活杀后速取小肠, 用 4 ℃ A 液洗出肠内容物, 以 B 液充满肠腔(结扎两端), 置 37 ℃A 液中 12 min, 其间 A 液中持续充入混合气(95% O_2, 5% CO_2 混合气饱和)并振荡 60～70 次/min。放掉 B 液, 以 C 冲洗 1 次, 置冰板上, 肠腔重新注满 C 液。用玻棒轻轻振打以使肠粘膜细胞落入肠腔, 将细胞悬液离心(500 r/min, 3 min, 4 ℃)沉淀为肠粘膜细胞, C 液洗 1 次, D 液洗两次后在冰浴中轻柔匀浆, 离心(4 ℃, 1 700 r/min, 10 min), 取上清, 再离心(4 ℃, 9 000 r/min, 8 min), 沉淀即为线粒体。再次以 D 液悬浮并制成蛋白浓度为 10～15 mg/ml 的线粒体悬液, 蛋白定量用 Lowry 法。线粒体呼吸活性测定采用 Estabrood 法[5]。测定全过程严格在低温操作, 2 h 内完成, 测定Ⅲ态呼吸率(ST3)和Ⅳ态呼吸率(ST4)计算呼吸控制率 RCR＝ST3/ST4 和磷氧比 ADP/O。

1.5　小肠氧摄取测定

参考文献[6]的大动物模型, 在大鼠腹主动脉和肠系膜上静脉直接抽血各 1 ml, 进行血气分析和血常规检测。据公式计算氧摄取(Oext)。

$$Oext = (SaO_2 \times Hba - SvO_2 \times Hbv) / SaO_2 \times Hba$$

1.6　肠粘膜血流量

采用微循环多普勒血流仪测定。

1.7　统计学分析

所有数据在华西医科大学 PEMS 程序包上作统计学处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行 t 检验和相关分析。

2　结果

2.1　肠粘膜细胞线粒体呼吸控制率的变化

伤后 ST3 呈下降趋势, 而 ST4 有所增加, 故无论 PN 组还是 EN 组 RCR 均显著降低, 两组在 PBD 1～3 最低, 分别为伤前的 33.74%、29.58%。EN 组降低程度较 PN 组小, 除 PBD1 外均存在显著差异, 见表 1。

表 1　肠粘膜线粒体 RCR 的变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Changes of RCR in intestinal epithelium mitochondria after burn injury($\bar{x} \pm s$)

Group	PBD0	PBD1	PBD3	PBD5	PBD7
PN	4.09±0.22	2.84±0.19**	2.71±0.14**	3.17±0.15**	3.26±0.21**
EN	4.09±0.22	3.16±0.26**	3.06±0.24**#	3.68±0.25**#	3.81±0.28*#

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* PBD0; #: $P<0.05$ *vs* PN group

2.2　烧伤后线粒体磷氧比(P/O)的变化

烧伤后两组大鼠 P/O 值均显著下降, 在 PBD1 和 PBD7 较低, 两组组比, EN 组下降幅度较小, 在 PBD3、PBD7 两组存在显著差异, 见表 2。

表 2　烧伤后肠上皮细胞线粒体 P/O 变化($\bar{x} \pm s$)

Tab 2　Changes of P/O ratio in intestinal tissue after burn injury ($\bar{x} \pm s$)

Group	PBD0	PBD1	PBD3	PBD5	PBD7
PN	2.65±0.25	1.88±0.22**	1.84±0.15**	2.08±0.11*	1.83±0.14**
EN	2.65±0.25	2.03±0.24**	2.17±0.22**#	2.21±0.17*	2.34±0.21*#

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* PBD0; #: $P<0.05$ *vs* PN group

2.3　烧伤后肠组织氧摄取率(Oext)变化

烧伤后肠组织氧摄取率两组均显著降低, 尤其以 PBD1 最为明显, 分别为伤前的 59.46%、37.84%。两组相比, EN 组各时相点均明显高于 PN, 见表 3。

表 3　肠组织氧摄取率变化(%, $\bar{x} \pm s$)

Tab 3　Changes of oxygen extraction in intestinal tissue after burn injury(%, $\bar{x} \pm s$)

Group	PBD0	PBD1	PBD3	PBD5	PBD7
PN	0.37±0.03	0.15±0.02**	0.19±0.02**	0.25±0.03**	0.26±0.02*
EN	0.37±0.03	0.23±0.03**##	0.29±0.02**##	0.35±0.03*##	0.34±0.02##

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* PBD0; ##: $P<0.01$ *vs* PN group

2.4　烧伤后肠粘膜血流量的变化

烧伤后两组动物肠粘膜血流量均显著低于伤前($P<0.01$), 随后有逐渐恢复的趋势。两组相比, EF 组大鼠肠粘膜血流量在伤后所有时相均明显高于 PN 组($P<0.01$), 见表 4。

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

表4 烧伤大鼠肠粘膜血流量(IMBF)的变化(mV, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4 Changes of intestinal mucosal blood flow (IMBF) in intestinal tissue after burn injury(mV, $\bar{x}\pm s$)

Group	PBD0	PBD1	PBD3	PBD5	PBD7
PN	139.88±8.32	67.75±2.49**	90.13±6.12**	102.25±9.69**	91.11±36.17**
EN	139.88±8.32	90.37±2.82*##	117.25±3.77*##	123.87±4.35*##△△	124.87±5.91*##

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* PBD0; ##: $P<0.01$ *vs* PN group

2.5 相关分析

相关分析显示,IMBF同RCR、Oext和P/O呈显著正相关($r_1=0.89$, $P<0.01$; $r_2=0.88$, $P<0.01$; $r_3=0.96$ $P<0.01$)。

3 讨论

Willmore等曾提出肠道是外科应激的中心器官。严重烧伤后肠道损害发生早、损伤重、持续时间长,并有可能引发多器官功能不全和全身炎症反应综合征。其中肠粘膜能量代谢紊乱是引起肠道损害的重要原因之一[7]。因此,如何改善烧伤后肠粘膜能量代谢状况是维护肠粘膜本身结构和屏障功能的重要一环。

实验结果显示:严重烧伤后肠上皮细胞线粒体ST3降低,而ST4则增加,使RCR明显降低,P/O在烧伤早期即下降,变化趋势与RCR相同。RCR和P/O显著降低表明线粒体的电子传递功能与氧化磷酸化功能均遭破坏,使ATP生成减少,而热能释放增多。由此我们推测线粒体呼吸功能受损可能与烧伤后全身高代谢反应及生物能量生成不足、浪费增多有关,是形成肠源性高代谢的机制之一。线粒体是细胞有氧氧化主要细胞器,其功能活动有赖于O_2的充足供给和合理利用,包括良好的血液灌流、组织内气体弥散和交换的顺利进行及线粒体O_2利用无障碍。

实验结果显示,烧伤后肠粘膜血流量明显降低,肠道水肿明显,阻碍氧和营养物进入细胞及氧气在组织内的弥散,是线粒体呼吸功能受抑的重要原因。有报道,肠道单纯缺血缺氧早期,线粒体呼吸功能轻微受损,机体代偿性增加氧摄取以维持细胞氧需求。当氧供进一步减少,增加氧摄取难以满足细胞氧耗时,则发生病理性氧供依赖性耗氧,同时乏氧代谢加强,乳酸堆积而致细胞酸中毒,最终使线粒体呼吸功能损害,细胞氧摄取率下降。因此,缺血缺氧是线粒体损害的主要原因之一,而线粒体功能紊乱又干扰了细胞氧的合理利用。两者互为因果,形成恶性循环。

尽管肠道营养不能改变烧伤后肠上皮细胞线粒体呼吸功能受损,氧化磷酸化失偶联的趋势,但其变化幅度明显小于静脉营养组。以往的组织形态学观察发现烧伤后肠上皮细胞线粒体明显肿胀,部分空泡化,膜破裂,嵴变短脱颗粒等变化,而肠道营养能减轻线粒体的损伤[8]。烧伤后线粒体损害的实质为缺血缺氧性损害。尽管积极的抗休克能够保证全身大循环血流动力学稳定,但是肠道的血供却不能有效恢复。与胃肠外营养相比肠道营养由于能有效刺激肠粘膜,特别是对肠道神经系统(ENS)的刺激,降低伤后应激程度,使舒缩血管的神经递质异常分泌的状况得到改善,促进肠粘膜血流量的恢复,有利于维持细胞正常的代谢[9,10]。相关分析显示,IMBF同RCR、Oext和P/O呈显著正相关($r_1=0.89$, $P<0.01$; $r_2=0.88$, $P<0.01$; $r_3=0.96$, $P<0.01$)。

目前营养支持的研究已从维持氮平衡、保持瘦组织含量,深入到维护细胞代谢、改善器官功能、促进患者康复。肠道营养能有效增加肠粘膜血流量和氧摄取,改善肠粘膜组织氧合,减轻线粒体呼吸功能受抑程度,增加有氧代谢和ATP生成,这些都是肠道营养在维护肠粘膜结构和功能方面优于静脉营养的重要原因。

参考文献:

[1] 朱 云,汪仕良,尤忠义,等. 枯否细胞在早期肠道营养降低严重烧伤高代谢中的作用[J]. 中华外科杂志, 1996,34(9):566-568

[2] 彭 曦,汪仕良,陶凌辉,等. 烧伤后清洁肠道与肠源性高代谢的实验研究[J]. 中华烧伤杂志,2001,17(4):207-209.

[3] 彭 曦,汪仕良,尤忠义,等. 不同营养支持途径对烧伤大鼠肠三叶因子表达的影响[J]. 中华外科杂志,2001,39(1):64-67.

[4] Watford M, Lund P, Krebs H A. Isolation and metabolic characteristics of rat and chicken enterocytes[J]. Biochem J,1979,178(3):589-596

[5] Lessin M S, Schwartz D L, Wesselhoeft C W, *et al*. Multiple spontaneous small bowel anastomosis in premature infants with multisegmental necrotizing enterocolitis[J]. J Pediatr Surg, 2000, 35(2): 170-172

[6] Jeppesen P B, Hoy C E, Mortensen P, *et al*. Differences in essential fatty acid requirements by enteral and parenteral routes of administration in patients with fat malabsorption[J]. Am J Clin Nutr, 1999,70(1): 78-84

[7] Kaufman S S, Lyden E R, Brown C R, *et al*. Disaccharidase activities and fat assimilation in pediatric patients after intestinal transplantation[J]. Transplantation, 2000, 69(3): 362-365.

[8] 彭 曦,汪仕良,王风君,等. 不同营养支持途径对严重烧伤后大鼠肠粘液成分的影响[J]. 肠外与肠内营养,2001,8(3):157-160.

[9] 彭 曦,冯晋斌,汪仕良,等. 早期肠道营养改善烧伤后肠道血液灌流的实验研究[J]. 中华外科杂志,1999,37(8):507-509.

[10] 彭 曦,冯晋斌,汪仕良,等. 烧伤大鼠小肠肌间神经丛中一氧化氮合酶的组织化学研究[J]. 中华烧伤杂志,2000,16(6):343-345

(编辑 薛国文)

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