DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.007
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
768 2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)07-0768-03

肠道营养促进烧伤大鼠肠三叶因子表达的实验研究

彭 曦,谭银玲,陶麟辉,王凤君,赵 云,汪仕良 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 探讨肠道营养对烧伤大鼠肠三叶因子(ITF)及其mRNA表达的影响。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。采用原位杂交、免疫组化和高效液相色谱等手段检测了烧伤后大鼠肠组织中肠三叶因子(ITF)及ITF mRNA的变化,并观察了两组大鼠肠道受损情况。结果 正常大鼠小肠中ITF及ITF mRNA均有一定表达,它们主要分布于肠绒毛杯状细胞中。烧伤后肠道组织结构受损,ITF mRNA表达明显降低,肠杯状细胞分泌ITF的能力大幅下降,特别是ITF二聚体的含量远远低于伤前($P<0.01$)。两组比较,尽管肠道营养不能逆转烧伤后ITF下降的趋势,但能明显抑制其下降幅度,同时EN组肠粘膜受损程度也明显低于PN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,与静脉营养相比肠道营养可减轻肠粘膜受损程度,降低ITF特别是ITF二聚体的下降幅度。

关键词:肠三叶因子;肠道营养;静脉营养;大鼠;烧伤
中图法分类号:R394.3;R459.3;R644 文献标识码:A

Experimental study on the improvement of intestinal trefoil factor expression by enteral nutrition in burned rats

PENG Xi, TAN Yin-ling, TAO Lin-hui, WANG Feng-jun, ZHAO Yun, WANG Shi-liang (Institute of Burns Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract Objective To explore the mechanism and effects of enteral nutrition on intestinal trefoil factor (ITF) as well as ITF mRNA expression in burned rats. Methods Wistar rats were inflicted with 30% total body surface area full thickness burns and randomly divided into three groups: burned and enteral nutrition (EN), burned and parenteral nutrition (PN), and normal control(C). The expression and content of ITF in intestine were determined with in situ hybridization (ISH), immunohistochemical technique and high performance liquid chromatography (HPLC). Results ITF and ITFm RNA were expressed in whole small intestine and mostly located in goblet cells of intestinal villus. After burn injury, the structure of intestinal mucosa was severely damaged and the ability of goblet cell to synthesize and secrete ITF, especially the content of ITF dimer were significantly decreased. EN could lessen the extent of ITF drop though it could not reverse this trend. Meanwhile, as compared with PN, EN could abate intestinal mucosa injury obviously. Conclusion There is a correlation between the declined ability of intestine synthesis and secretion of ITF and the damage of intestine structure postburn. EN is beneficial to minimizing intestine injury, promoting intestinal mucosa reparation, and abating ITF drop.

Key words intestinal trefoil factor (ITF); enteral nutrition (EN); Parenteral nutrition (PN); rat; burn

肠三叶因子(Intestinal trefoil factor, ITF)是一种由杯状细胞分泌的特异分布于肠粘膜表面的小分子多肽物质[1]。由于其空间结构的特殊性,ITF可同粘液糖蛋白结合,稳定肠粘液层,防止有害物质对肠粘膜的损伤。此外,它还具有促进肠上皮细胞增殖与移行的能力[2,3]。因而ITF在肠道的自我保护机制中占据重要地位。由于ITF发现不久,关于不同营养支持途径对烧伤大鼠ITF合成和分泌的影响尚未见报道。因此本实验在改进烧伤大鼠营养模型的基础上,比较了不同营养支持途径对肠道合成和分泌ITF的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

含有rITF cDNA的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*Xho*Ⅰ,T_3 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 C_4柱由大连国家色谱中心提供,羊抗兔抗血清由深圳晶美公司提供。

1.2 方法

1.2.1 动物模型制作及分组 健康成年Wistar大鼠88只,体重195~255 g,雌雄不拘,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%TBSAⅢ度烧伤(病理切片证实)。伤后按50 ml/kg腹腔注入乳酸林格氏液抗休克。随机将动物分成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。其中大鼠静脉营养模型制作参见文献[4],肠道营养模型除未予静脉置管外,其余步骤与静脉营养模型相同。

1.2.2 时相设置 实验分烧伤后1、2、3、5、7 d (PBD1、PBD2、PBD3、PBD5和PBD7)5个时相点,每个时相点16只大鼠。其中PN组于伤后2 h开始以微量泵静脉泵入营养液,速度为1~2 ml/h,自由饮水。EN组也于伤后2 h开始灌喂营养液,每天计划量分4~6次喂完,不限饮水。

1.2.3 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153 g/L,卡氮比为183∶1,糖、脂供

基金项目:全军"九五"指令性攻关课题专项基金资助(96L043)
作者简介:彭 曦(1968-),男,四川省成都市人,博士,主治医师,主要从事创伤营养代谢方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)65310758
收稿日期:2000-03-23;修回日期:2000-12-25

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

热比为 1.73∶1。在层流台上将各种营养成份混匀后分装, 4 ℃保存, 用前复温至 37 ℃。

1.2.4　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。伤后第 1 天摄入标准量的 1/3, 第 2 天摄入 1/2, 第 3 天起摄入全量。

1.2.5　肠粘膜 ITF mRNA 表达的检测　　质粒转化、目的片段回收及 ITF 探针标记均按相应说明书操作。于伤后各时相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]。原位杂交阴性对照: ①杂交前切片用 RNase 20 μg/ml 37 ℃处理 30 min; ②杂交液中不加标记探针。切片在 TIGER2000 型图像分析仪上测定阳性染色的吸光度值。

1.2.6　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。

1.2.7　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]报道的方法进行, 取大鼠肠粘膜约 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 法测定蛋白。

1.3　统计学处理

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。

2　结果

2.1　烧伤大鼠肠粘膜中 ITF mRNA 表达的变化

ITF mRNA 阳性反应呈深蓝色, 主要定位于肠粘膜上皮细胞特别是杯状细胞中, EN 组的染色强度明显高于 PN 组, 见图 1、2。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 PN 组相比, EN 组大鼠肠粘膜 ITF mRNA 的表达有所增加, 两组在伤后 3~7 d 差异非常显著($P < 0.01$), 见表 1。

表 1　烧伤大鼠肠粘膜 ITF mRNA 原位杂交图像分析(D_{460}, $\bar{x} \pm s$)

Tab 1　Changes of ITF mRNA in rat intestinal mucosa after burn injury(D_{460}, $\bar{x} \pm s$)

	PBD1(n=8)	PBD2(n=8)	PBD3(n=8)	PBD5(n=8)	PBD7(n=8)
PN	442.00±94.68	294.00±107.58	189.83±54.87**	141.67±25.08**	143.17±28.59**
EN	428.00±48.48	288.00±50.43	304.50±45.68△△	248.00±37.99△△	292.67±46.54*△△
C	320.50±74.17				

PBD: Day after burn;　*: $P < 0.05$,　**: $P < 0.01$ *vs* C group;　△△: $P < 0.01$ *vs* PN group

2.2　烧伤大鼠肠粘膜中 ITF 免疫组化染色的变化

ITF 免疫组化阳性反应呈棕黄色, 主要定位于杯状细胞, 镜下可见染色深浅不一的杯状细胞, 总体印象是粘膜顶端的染色较深, 粘膜下端的染色较浅, 见图 3、4。图像分析结果显示, 从伤后 5 d 起 EN 组 ITF 阳性染色的吸光度值明显高于 PN 组, 见表 2。

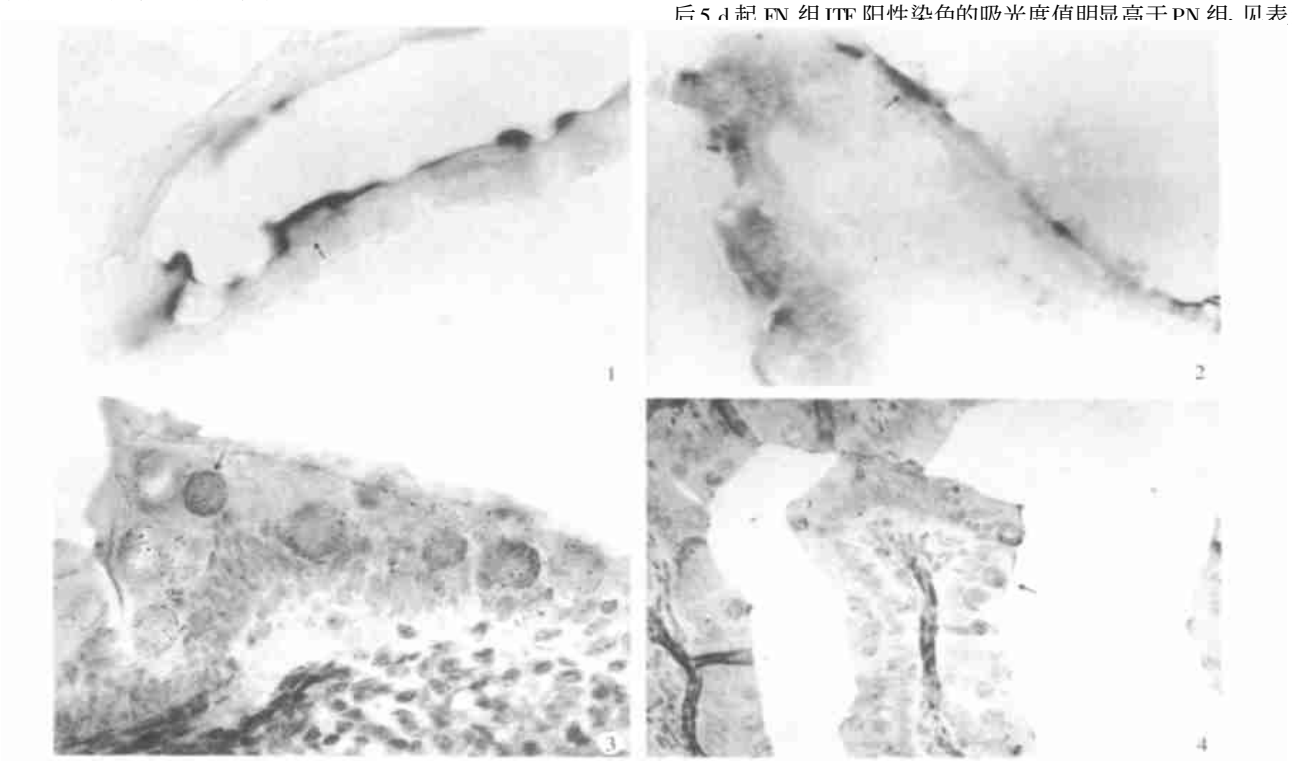


图 1　PBD3 EN 组大鼠肠上皮细胞 ITF mRNA 阳性染色(↑)　(原位杂交×400)

Fig 1　ITF mRNA expression in epithelium of EN rat intestinal villus at PBD3(↑)　(ISH×400)

图 2　PBD3 PN 组大鼠肠上皮细胞 ITF mRNA 阳性染色(↑)　(原位杂交×400)

Fig 2　ITF mRNA expression in epithelium of PN rat intestinal villus at PBD3(↑)　(ISH×400)

图 3　PBD5 EN 组大鼠肠绒毛上呈 ITF 阳性染色的杯状细胞(↑)　(S-P×400)

Fig 3　ITF positive goblet cell in intestinal villus of EN group at PBD5(↑)　(S-P×400)

图 4　PBD5 PN 组大鼠肠绒毛上呈 ITF 阳性染色的杯状细胞(↑)　(S-P×100)

Fig 4　ITF positive goblet cell in intestinal villus of PN group at PBD5(↑)　(S-P×100)

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

表 2 烧伤大鼠肠粘膜 ITF 免疫组化图像分析(D_{460}, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Changes of ITF immuohistochemical reaction in rat intestinal mucosa postburn(D_{460}, $\bar{x}\pm s$)

	PBD1(n=8)	PBD2(n=8)	PBD3(n=8)	PBD5(n=8)	PBD7(n=8)
PN	527.18±143.88	467.65±112.25	416.25±133.66	227.75±125.33**	202.00±88.13**
EN	502.36±119.45	556.33±206.54	522.33±113.67	487.80±133.25△	452.75±109.33△
C	557.33±112.75				

**: $P<0.01$ *vs* C group; △: $P<0.05$ *vs* PN group

2.3 烧伤大鼠肠粘膜 ITF 含量的变化

ITF 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, 两组相比, EN 组在伤后 3~7 d 显著高于 PN 组($P<0.01$), 见表 3。

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

Tab 3 Changes of ITF content of intestinal mucosa in burned rats(ng/g, $\bar{x}\pm s$)

	PBD1(n=8)	PBD2(n=8)	PBD3(n=8)	PBD5(n=8)	PBD7(n=8)
PN	588.16±100.30*	343.67±51.83	127.67±45.51**	98.67±40.25**	15.83±4.40**
EN	555.83±209.43	362.17±50.91	258.83±45.72**△△	258.00±66.07**△△	129.16±46.16**△△
C	369.33±65.56				

*: $P<0.05$ **: $P<0.01$ *vs* C group; △△: $P<0.01$ *vs* PN group

3 讨论

营养支持是烧伤救治的重要一环, 烧伤病人的营养支持依靠静脉和胃肠两条途径, 二者各有利弊及适应症[6,7]。为探讨不同营养支持途径对创伤后肠道损伤和修复的影响, 我们采用完全相同的营养液进行肠道和静脉营养效果的对比研究。

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。烧伤早期 ITF 的表达有一过性增加, 随着伤情的加重, ITF mRNA 表达明显下降, 显著低于伤前。图像分析显示, 尽管肠道营养不能逆转 ITF mRNA 表达下降的趋势, 但下降幅度明显低于静脉营养组, 伤后 3~7 d 两组存在显著性差异($P<0.01$)。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。与原位杂交不同的是, ITF 阳性的杯状细胞不论染色深浅均为整个细胞着色, 而 ITF mRNA 的表达仅位于杯状细胞的边缘, 说明杯状细胞中仅有很小的一个区域是合成 ITF 的, 而 90%以上的区域是储存已合成的 ITF 及粘液的。烧伤后 ITF 下降的速度不及 ITF mRNA 变化明显, 提示烧伤后杯状细胞中 ITF 含量的变化不完全同于其 mRNA 的变化。烧伤后 ITF(二聚体)的含量低于伤前, 特别是伤后 5~7 d 有一个明显的下降过程, 同伤前相比, 最大可相差 25 倍。同静脉营养相比, 肠道营养能明显抑制 ITF 下降的幅度, 伤后 3~7 d EN 组明显高于 PN 组。说明不同营养支持途径改变的不仅是 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。Thim 等[8]研究发现 ITF 可根据周围组织中氧化还原电位的不同而分别以单体或二聚体的形式存在。由于只有二聚体才能同粘液糖蛋白稳定结合, 因此 ITF 二聚体含量的变化比 ITF 总量的变化更具意义。我们的结果显示, 肠道营养较静脉营养能显著减轻伤后 ITF 特别是二聚体形式 ITF 的下降幅度, 这可能是肠道营养在维护粘膜结构, 保护肠粘膜屏障等方面优于静脉营养的机制之一。

参考文献:

[1] Wong W M, Poulsom R, Wright N A. Trefoil peptides[J]. Gut, 1999, 44(6): 890-895.

[2] Matsuoka Y, Pascall J C, Brown K D, *et al*. Quantitative analysis reveals differential expression of mucin (MUC2) and intestinal trefoil factor mRNAs along the longitudinal axis of rat intestine[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1 489(2-3): 336-344.

[3] Suemori S, Lynch-Devaney K, Podolshy D K. Identification and characterization of rat intestinal trefoil factor: Tissue and cell-specific member of the trefoil protein family[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(10): 11 017-11 021.

[4] 彭 曦, 汪仕良, 谭银玲, 等. 烧伤大鼠静脉营养模型的建立及应用[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(1): 23-25.

[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): 716-718.

[6] Hansbrougy J F. Enteral nutritional support in burn patients[J]. Gastrointest Endosc Clin N Am, 1998, 8(3): 645-653.

[7] Archer S B, Brnett R J, Fischer J E. Current uses and abuses of total parenteral nutrition[J]. Adv Surg, 1996, 29(1): 165-189.

[8] Thim L. Trefoil peptides: a new family of gastrointestinal molecules[J]. Digestion, 1994, 55(3): 353-360.

(编辑 陈聪连)

(上接 764 页)

然而不少文献指出桩钉并不能增加根管治疗牙的抗根折强度[2,3], 而一旦发生根折, 那么只能将此牙拔除。保留更多的牙体组织是提高抗根折强度的有效方法[3]。因此, 我们在牙体预备设计中体现了尽量保存牙体组织的原则, 使桩钉与唇侧核仅通过切端倒"凹"字形的凹沟相连。增强了固位力: 若单纯大量磨改反𬌗牙的牙冠后, 即以 PFM 全冠修复治疗, 则冠的固位往往不足, 尤其是预备后的牙体唇舌径薄, 影响固位。我们在牙体唇侧制备了与牙冠正常倾斜度一致的铸造核, 有效地增加了唇舌径, 并且也可在唇面向切端方向适当延长, 增加切龈距, 提高固位力。注意事项: 我们认为以下情况不宜应用本方法: ①牙列严重拥挤, 反𬌗牙已被邻牙严重挤向腭侧。②反𬌗牙的下颌牙已超过上颌牙冠的 1/2。③反超𬌗过大者。

关键词: 前牙反𬌗; 修复; 桩核

中图法分类号: R783.1 文献标识码: B

参考文献:

[1] 徐君伍 主编. 口腔修复学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 167.

[2] Sonthi S, Douglas N, Steven M, *et al*. An *in vitro* study of the fracture resistance and the incidence of vertical root fracture of pulpless teeth restored with six post-and-core systems[J]. J Prosthet Dent, 1999, 81(3): 262-269.

(编辑 冷怀明)

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