DOI:10.16016/j.1000-5404.2000.11.003
第22卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 22, No. 11
2000年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2000

文章编号:1000-5404(2000)11-1023-03

论著

肠三叶因子与严重烧伤后肠道损伤及修复的关系

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

提 要:目的 探讨肠三叶因子(ITF)在烧伤后的变化规律及其与肠道损伤和修复的关系。方法 Wistar大鼠48只随机分成伤前对照(C)、烧伤后(PBD)1、2、3、5及7 d共6组。采用高效液相色谱仪定量检测了肠粘膜中ITF的动态变化,同时观察了血浆内毒素(LPS)水平、肠粘膜损伤指数及肠粘膜增殖细胞核抗原(PCNA)的变化,并进行相关分析。结果 烧伤后肠杯状细胞分泌ITF的能力下降,除伤后第1天ITF含量有一过性增加外,其余各组均明显低于伤前($P<0.01$),伤后7 d仅有伤前的4%。与之对应,血浆LPS水平及肠粘膜损伤指数亦大幅上升,而肠粘膜PCNA值则明显下降。相关分析显示,ITF含量同血浆LPS水平及肠粘膜损伤指数呈显著负相关,同肠粘膜PCNA值呈显著正相关。结论 烧伤后肠道合成ITF的能力下降与伤后肠粘膜屏障功能受损、粘膜修复能力下降密切相关。

关键词:肠三叶因子;肠道;大鼠;烧伤
中图法分类号:R322.45;R644 文献标识码:A

Relationship of intestinal trefoil factor expression with intestinal damage and reparation in rats after severe burns

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

Abstract: Objective To explore the principle of intestinal trefoil factor (ITF) expression and its relationship with intestine damage and reparation in rats after severe burns. Methods Forty-eight Wistar rats were inflicted with 30% total body surface area full thickness burns and then divided into 6 groups: normal control (C), post burn day 1 (PBD1), PBD2, PBD3, PBD5, and PBD7. The levels of plasma LPS, intestinal proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and intestinal mucosa damage index (IMDI) were determined. The content of ITF in the intestinal mucosa was measured with high-performance liquid chromatography (HPLC). The relation of the measured results was analyzed. Results The ability of goblet cells to secrete ITF was constantly decreased after burn injury except that the ITF content was increased excessively in PBD1 group. The content of ITF in PBD7 group was just 4% of that in C group. The PCNA level had a remarked decline, but the levels of LPS and IMDI were significantly increased. Correlation analyses showed that the ITF content had a positive correlation to PCNA level but negative correlation to the levels of LPS and IMID. Conclusion The decline of intestinal mucosa to secrete ITF after burn might be associated with the dysfunction of mucosa-barrier and the disability of mucosa reparation.

Key words: intestinal trefoil factor; intestine; rats; burns

肠三叶因子(Intestinal trefoil factor, ITF)属三叶肽家族,是一种由杯状细胞分泌的特异分布于肠粘膜表面的多肽物质,1991年由Suemori[1]首先发现并命名。研究表明ITF具有很强的细胞保护作用,可明显减轻多种损伤因子介导的肠粘膜损害,它不仅具有一般生长因子所具有的促进细胞增殖与移行的能力,还具有独特的生理功能即能同粘液糖蛋白结合,稳定肠粘液层。因而ITF在肠道的自我保护机制中占据重要地位[2]。我们推测烧伤所致的肠道损伤可能与ITF的参

基金项目:全军"九五"攻关项目(96L043)
作者简介:彭 曦(1968-),男,四川省成都市人,博士,主治医师,主要从事创伤后营养代谢方面的研究,发表论文20篇。电话:(023)65317058
收稿日期:2000-02-18;修回日期:2000-10-20

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

与有关。由于ITF发现不久,国内尚未见报道,国外的文献又多集中于对消化道溃疡和肿瘤的研究,因此本实验以烧伤大鼠为模型,对烧伤后肠道中ITF的变化规律及其与肠道损伤和修复的关系进行初步研究,以期阐明ITF保护肠粘膜的作用机制。

1 材料和方法

1.1 烧伤模型制作

健康成年Wistar大鼠48只(第三军医大学附属大坪医院野战外科研究所动物室提供),体重190~245 g,雌雄不拘,伤前禁食12 h,1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔麻醉,背部电推剃毛后用3%硫化钠脱毛,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腹腔注入乳酸林格氏液抗休克。随机分成伤前对照(C)及烧伤后(Postburn days, PBD)1、2、3、5和7 d,简称PBD 1~7共6组,每组8只大鼠。

1.2 血浆内毒素(LPS)测定

内毒素测试中所用器材均经蒸馏水清洗、烘干,高压蒸气消毒后,用^{60}钴照射去热原,用一次性注射器从肠系膜上静脉取血约2 ml,2 000 r/min,离心10 min,吸取血浆,-20℃保存,统一检测。采用基质偶氮显色鲎试剂测定其内毒素含量,试剂盒由上海市医学化研所提供,按说明书操作,单位以U/ml表示。

1.3 PCNA免疫组织化学染色

于各时相点活杀大鼠取回肠(距回盲部10 cm)约1.0 cm,置10%甲醛液中固定,常规石蜡包埋切片。采用深圳晶美公司提供的即用型PCNA试剂盒,具体操作按说明书进行。切片在TIGER 2000型图像分析仪(重庆大学图形图像工程技术研究所研制)上测定阳性染色的吸光度值。

1.4 粘膜损害指数计分标准的判定[3]

取材、固定、包埋等步骤同上,切片HE染色。计分方法:0分:肠粘膜绒毛正常;1分:绒毛顶端上皮下出现囊状间隙,并伴有毛细血管充血;2分:上皮下间隙扩大,中度固有层水肿,中央乳糜管扩张;3分:固有层明显水肿,肠粘膜上皮层细胞变性、坏死,少数绒毛顶端脱落;4分:上皮细胞层变性、坏死、脱落,部分绒毛脱落,固有层裸露,毛细血管扩张、充血;5分:绒毛脱落,固有层崩解,出血或溃疡形成。光镜下每个时相随机计数20个视野。

1.5 肠粘膜中ITF含量测定

rITF由丹麦NOVO研究院L. Thim教授惠赠,色谱条件及标准曲线制作均按文献[4]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,采用考马氏亮蓝G-250法定量蛋白。

1.6 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检验和相关分析。

2 结果

2.1 烧伤大鼠血浆内毒素水平的改变

烧伤后血浆内毒素含量大幅上升,并有逐渐增高的趋势,伤后第7天达最高值,为伤前8.5倍,见表1。

2.2 烧伤后大鼠肠粘膜损伤指数的变化

光镜下观察发现正常对照组肠粘膜绒毛排列整齐,上皮细胞层完整,表面平滑,附有薄层粘液判定为零分。伤后肠粘膜广泛受损,损伤指数大幅上升,表现为绒毛排列紊乱,上皮细胞变性、坏死,部分脱落以至固有层裸露,见表1。

2.3 烧伤大鼠肠粘膜PCNA值的变化

光镜下观察发现,PCNA阳性细胞主要位于肠粘膜隐窝处,图像分析显示,烧伤后大鼠肠粘膜中PCNA阳性染色区域减少,吸光度值明显下降,见表1。

2.4 烧伤大鼠肠粘膜中ITF二聚体含量的变化

实验结果显示,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,仅为伤前的4%。相关分析显示,ITF含量同血浆LPS水平及损伤指数呈显著负相关($r_1=-0.837$, $P<0.05$; $r_2=-0.912$, $P<0.01$),而同肠粘膜PCNA值呈显著正相关($r=0.944$, $P<0.01$),见表1。

表1 烧伤大鼠血浆内毒素水平、肠粘膜损伤指数、PCNA值和ITF含量的变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Changes of plasma endotoxin, intestinal mucosal injury index, PCNA value and ITF content in rat after burn injury ($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Plasma LPS (U/ml)	Intestinal mucosa		
			Injury index	PCNA (D_λ)	ITF content(ω_B/ng·g^{-1})
Control	8	0.17±0.05	0	823.46±240.56	369.33±65.56
PBD1	8	0.45±0.08**	2.5±0.53**	766.51±189.72	588.16±100.3*
PBD2	8	0.43±0.04**	2.6±0.84**	466.60±171.33*	343.67±51.83
PBD3	8	0.93±0.10**	3.0±0.67**	307.32±154.92**	127.67±45.51**
PBD5	8	1.05±0.11**	2.8±0.42**	247.39±112.23**	98.67±40.25**
PBD7	8	1.45±0.11**	3.0±0.82**	311.53±132.41**	15.83±4.4**

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

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

3　讨论

肠道是体内最大的储内毒素库, 由于肠粘膜屏障的存在, 生理状态下仅有少量内毒素能穿越肠粘膜进入体内。入血的内毒素经肝脏灭活, 使血中内毒素保持在很低的水平[5]。因此血浆内毒素水平是反映肠粘膜完整性的灵敏指标。实验结果显示, 烧伤后血浆内毒素水平明显高于伤前, 且伤后 1 d 就达峰值, 并伴随整个伤程高居不下, 说明伤后肠粘膜损伤发生早, 持续时间长。病理观察显示, 伤后肠粘膜广泛受损, 损伤指数大幅上升, 表现为绒毛排列紊乱, 上皮细胞变性、坏死, 部分脱落以至固有层裸露。烧伤导致肠粘膜损害的首要因素为组织严重缺血缺氧, 但也与肠道内环境的改变导致胃肠激素和生长因子分泌障碍有关[6]。目前的研究发现, 在众多的生长因子中, ITF 与肠道的关系最为密切。ITF 是一种由杯状细胞特异分泌的新型生长因子, 由于其特殊的空间构型 ITF 不仅具有一般生长因子所具有的促进细胞增殖的作用, 而且它能同粘液糖蛋白特异结合, 稳定肠粘液层。因此, ITF 被认为是肠道的特异保护因子[7]。由于 ITF 发现不久, 关于烧伤后肠道 ITF 的变化尚未见报道, 我们推测烧伤后肠粘膜受损可能同肠道合成和分泌 ITF 异常有关。实验结果显示, 正常情况下肠组织中有一定量的 ITF, 烧伤后第 1 天 ITF 含量曾有一过性增加, 可能是伤后杯状细胞应急性分泌增加所致, 随着伤情发展, 肠道组织结构严重受损, 杯状细胞合成 ITF 的能力下降, 其含量显著低于伤前, 特别是伤后 5～7 d 有一个明显的下降过程, 同伤前相比, 最大可相差 25 倍。与之相对应, 血浆 LPS 水平和肠粘膜损伤指数则明显高于伤前, 相关分析显示, ITF 含量同血浆 LPS 和肠粘膜损伤指数呈显著负相关。

肠上皮细胞增殖受抑是肠粘膜屏障完整性破坏的又一原因, 由于肠上皮细胞具有增殖周期短, 生长旺盛的特点, 因此, 肠道具有较强的自我修复能力[8]。而严重烧伤后强烈的应急反应导致肠道长时间缺血缺氧, 将严重削弱肠上皮细胞的增殖活性。实验结果显示, 烧伤大鼠肠粘膜的修复能力明显低于伤前, ITF 含量同肠粘膜细胞 PCNA 值呈显著正相关, 提示烧伤后肠粘膜细胞增殖能力降低与肠道合成 ITF 的能力大幅下降有关。

参考文献:

[1] 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.

[2] Thim L. Trefoil peptides: A new family of gastrointestinal molecules[J]. Digestion, 1994, 55(6): 353－360.

[3] Chiu C J, McArdle A H, Brown R, *et al*. Intestinal mucosal lesion in low-flow states[J]. Arch Surg, 1970, 101(4): 478－483.

[4] 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.

[5] Bosenberg A T, Mdara J L, Gumbing B, *et al*. Strenuous exercise cause systemic endotoxemia[J]. J Appl Physiol, 1988, 65(1): 106－108.

[6] 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机制的实验研究[J]. 中华外科杂志, 1999, 37(8): 507－509.

[7] Kindon H, Pothoulakis C, Thim L, *et al*. Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function-cooperative interaction with mucin glycoprotein[J]. Gastroenterology, 1995, 109(4): 516－523.

[8] Gibson P R, Anderson R P, Mariadason J M, *et al*. Protective role of the epithelium of the small intestine and colon[J]. Inflamm Bowel Dis, 1996, 39(2): 279－302.

（编辑　薛国文）

（上接 1022 页）

全身性抗肿瘤治疗化疗的免疫抑制作用弱。抗生素多药联用组其肺部真菌感染率明显增高, 其原因系大剂量长时间地广泛使用广谱抗生素, 造成机体微生态失衡, 外源性和(或)内源性真菌大量繁殖所致。并发阻塞性肺炎者, 因其难治性, 增加了抗菌素的长时间和大剂量以及广泛使用, 因此, 阻塞性肺炎组的真菌感染率明显增高。肺部真菌感染组死亡率明显高于非真菌感染组, 肺部真菌感染成为死亡原因之一。

因此, 临床上应合理使用化、放疗, 并尽可能改善和保护患者免疫功能。如何针对这类病人合理使用抗生素, 值得探讨。

关键词: 晚期肺癌; 肺部真菌感染

中图法分类号: R734.206　　文献标识码: B

参考文献:

[1] 许广润 主编. 现代呼吸疾病诊疗手册[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1998. 103－105.

[2] 吴绍熙, 郭宁如, 廖万清 主编. 现代真菌病诊断治疗学[M]. 北京: 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1996. 19－21.

[3] 赵武述, 陈　仁, 卞志强 主编. 现代临床免疫学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999. 381－395.

（编辑　冷怀明）

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