DOI:10.16016/j.1000-5404.1996.01.003

香猪烧伤后肠道补充谷氨酰胺对谷氨酰胺酶活力的影响*

余 斌 汪仕良 尤忠义 赵 云 黎 鳌 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所)重庆,630038

提 要 用小型香猪30%总体表面积(TBSA)烧伤模型,观察了烧伤后肠道补充谷氨酰胺对肠系膜淋巴结、脾脏组织谷氨酰胺酶活力的影响。动物随机分为补充谷氨酰胺组($n=7$)和不补充谷氨酰胺组($n=7$)。谷氨酰胺组动物补充谷氨酰胺0.64 g·kg^{-1}·d^{-1},不补充谷氨酰胺组供给等量的复合氨基酸溶液。结果显示:伤后第10天,补充谷氨酰胺组淋巴结、脾脏组织中谷氨酰胺酶的活力比正常动物有非常显著的增加;相反,不补充谷氨酰胺组却非常显著降低。提示烧伤后谷氨酰胺的补充能明显增强淋巴细胞的功能。

关键词 灼伤;膜淋巴结;脾脏;谷氨酰胺酶;小香猪
中图法分类号 R644

严重烧伤时,机体存在严重的免疫功能抑制,而谷氨酰胺(GLN)是淋巴细胞分化和发挥其功能所必须的重要能源物质[1],新近的研究表明谷氨酰胺的缺乏是烧伤后免疫抑制的重要原因,本研究采用贵阳小香猪烧伤模型,观察了肠道补充谷氨酰胺对肠系膜淋巴结和脾脏组织中谷氨酰胺酶活力的影响。

1 材料和方法

1.1 动物选择

贵州小型香猪,雌性,体重23.40±3.76 kg,由贵阳中医学院动物所提供。

1.2 动物模型制作

伤前10 d,动物在腹腔麻醉下行肠系膜下静脉、门静脉插管;胃造口并放置空肠管;髂动、静脉插管。术后用自制的固定架将动物固定于猪代谢笼内,并将插管的三通开关用酒精纱布包裹,固定在猪身上。

1.3 动物分级及处理

术后10 d,选择体重基本恢复,插管通畅、无感染的动物,随机分为补充谷氨酰胺组($n=7$)和不补充谷氨酰胺组($n=7$)。动物麻醉后俯卧固定于手术台上,背部剃毛,用8%的凝固汽油燃烧45 s,造成30%总体表面积(TBSA)Ⅱ度背部烧伤,伤后立即将动物放回代谢笼内,静脉插管输液抗休克。伤后2 h开始,给煮熟饲料约1000 ml,6 h后重复一次,伤后第2天改为正常喂养,2次/日。同时由空肠置管补充谷氨酰胺:0.64 g·kg^{-1}·d^{-1},不补充谷氨酰胺组补充等量的复方氨基酸溶液。

1.4 肠系膜淋巴结和脾脏组织谷氨酰胺酶活力的测定

伤后10 d,动物活杀后取肠系膜淋巴结和脾脏组织,放入液氮中保存。

1.4.1 标本处理 取组织约200 mg,用5 ml匀浆液(150 mmol/L $K_2HPO_4-KH_2PO_4$ pH 6.8,1 mmol/L EDTA,50 mmol/L Tris/HCL)匀浆,部份用Lowry氏法测定蛋白质含量。

1.4.2 酶反应 取10 μl 0.1 mol/L GLN加入20 μl 0.5 mol/L $K_2HPO_4-KH_2PO_4$,37℃,混匀15 min后再加入20 μl匀浆液,37℃,置30 min,再加入100 μl冷96%甲醇,并置冰上冷却,18000×g离心5 min后取上清20 μl用于谷氨酰胺和谷氨酸的高效液相测定。

1.4.3 计算 在本实验条件下,37℃,pH6.8,以每分钟谷氨酰胺分解量来计算酶的活力,并结合组织蛋白质的测定结果计算每毫克蛋白谷氨酰胺酶的活力,表示为1 U=1 μmol GLN·min^{-1}·mg^{-1} protein。

1.5 动物血和肌肉组织中谷氨酰胺浓度测定

烧伤后第1、4、7、10天各时相点抽取空腹髂动脉血标本,伤后10 d取下肢肌肉标本,用高效液相色谱法测定谷氨酰胺浓度[2]。

1.6 统计学处理

数据用$\bar{x}\pm s$表示,采用第三军医大学研制的数理统计程序处理,以$P<0.05$为相差显著,$P<0.01$为相差非常显著。

2 结果

2.1 肠系膜淋巴结、脾脏组织中谷氨酰胺酶活力的变化(表1)

表1 肠系膜淋巴结、脾脏中谷氨酰胺酶活力的变化(U)

Tab 1 Changes of glutaminase activities in mesenteric lymph node and spleen on PBD10 (U)

Group	Lymph node	Spleen
Normal control	14.57±4.68	9.73±2.60
Gln	26.87±5.72#*	17.82±5.27#*
Non-Gln	9.46±2.70#	5.77±2.11#

#: $P<0.01$ *vs* normal control; *: $P<0.01$ *vs* non-Gln group; PBD: post burn day

* 全军"八五"攻关项目

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

2.2 动脉血中谷氨酰胺浓度的变化(表2)

表2 动脉血中谷氨酰胺浓度的变化(μmol/L)

Tab 2 Changes of arterial glutamine concentration after burns (μmol/L)

Group	Preburn	PBD1	PBD4	PBD7	PBD10
Gln	633.86±43.75	774.56±82.45#*	856.30±50.48#*#	843.95±70.25#*#	860.33±67.30#*#
Non-Gln		586.79±48.07	573.94±35.38	486.34±64.20##	427.58±44.70##

#, $P<0.05$, ##: $P<0.01$ *vs* normal control; *: $P<0.01$ *vs* non-Gln group; PBD: post burn day

2.3 肌肉组织内谷氨酰胺浓度的变化(表3)

表3 肌肉组织内谷氨酰胺浓度的变化

Tab 3 Changes of glutamine concentration in skeletal muscle on PBD10 (mmol/L)

Normal control	Gln group	Non-Gln group
17.46±1.22	20.78±1.43##	13.44±2.08#*#

#, ##, * same as in Tab 2

3 讨论

烧伤后机体的免疫系统受到明显的抑制,不仅淋巴细胞的增殖、分化,巨噬细胞的吞噬功能严重降低而且各种免疫抗体的产生也受到严重的影响。其原因比较复杂,新近的研究发现,烧伤后谷氨酰胺的严重缺乏,也是烧伤后免疫抑制的重要原因。有人用淋巴细胞和腹腔巨噬细胞进行的体外培养试验表明,培养液中谷氨酰胺浓度低于正常血液中的浓度时,淋巴细胞的增殖、分化明显受到抑制,巨噬细胞的吞噬功能也明显下降,而提高培养液中谷氨酰浓度后,淋巴细胞的增殖明显增加,巨噬细胞的吞噬功能也明显加强[3]。

谷氨酰胺是淋巴细胞、巨噬细胞等免疫细胞的主要能源物质,谷氨酰胺在这些细胞内酵解,分解为多种中间产物,它们是淋巴细胞等合成DNA、RNA的物质基础。正常情况下,淋巴细胞内的谷氨酰胺酶活力很高,有大量的代谢中间产物储存,这主要是为了适应淋巴细胞在机体需要时能快速增殖的功能[1,4]。本研究检测了肠系膜淋巴结和脾脏组织中的谷氨酰胺酶活力,结果发现补充谷氨酰胺组伤后第10天,淋巴细胞和脾脏组织谷氨酰胺酶活力明显降低,补充谷氨酰胺组谷氨酰胺酶活力却明显增加(表1)。不补充谷氨酰胺组谷氨酰胺酶活力的明显降低可能与严重烧伤后出现的谷氨酰胺严重缺乏有关,我们的实验证实伤后10 d,不补充谷氨酰胺的动物血和肌肉组织中的谷氨酰胺量明显下降,肌肉组织释放谷氨酰胺量也明显降低。而补充谷氨酰胺组血中的谷氨酰胺浓度明显高于伤前水平,肌肉组织中的谷氨酰胺含量也与正常组织差别不明显(表2,3)。上述结果提示烧伤后谷氨酰胺的缺乏可明显地减少淋巴细胞对谷氨酰胺的利用,从而降低淋巴细胞的功能,增加内毒素血症和感染发生的机会和程度;烧伤后及时补充谷氨酰胺能满足淋巴细胞对谷氨酰胺的需求,从而得到促进其功能的作用,对减轻烧伤后免疫功能的抑制,提高机体的免疫力有重要的意义。

参考文献

1 Grawford J, Cohen HJ. The essential role of L-glutamine in lymphocyte differentiation *in vitro*. J Cell Physiol, 1985; 124:275

2 尤忠义,余 斌,赵 云等.反相高效液相色谱法测定血浆、组织中的谷氨酸和谷氨酰胺浓度.第三军医大学学报,1995; 17(2):127

3 Wu GY, Field CJ, Marliss EB. Glutamine and glucose metabolism in rat splenocytes and mesenteric lymph node lymphocytes. Am J Physiol, 1991; 260(1 Pt 1): E141

4 Ardawi MS. Maximal activity of phosphate-dependent glutaminase and glutamine metabolism in septic rats. J Lab Clin Med, 1991; 118(1): 26

(收稿:1995-04-07;修回:1995-12-25)

(编辑 刘 鹏)

Effects of oral feeding of L-glutamine on glutaminase activity in mesenteric lymph nodes and splenic tissue after severe burns in miniswines

Yu Bin, Wang Shiliang, You Zhougyi, Zhao Yun, Li Ao (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract After the miniswines were inflicted with 30% TBSA full thickness burns, the effets of L-glutamine on the glutaminase activity were observed. The animals were randomized eauqlly into glutamine

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

group, receiving 0.64 g·kg^{-1}·day^{-1} and non-glutamine group receiving compound amino acids. The glutaminase activity was determined on the 10th day postburn in the mesenteric lymph nodes and splenic tissue and found to be greatly increased in the glutamine group and significantly suppressed in the non-glutamine group, which indicates that oral feeding of L-glutamine can improve the functions of lymphocytes postburn.

Key words burns; msesenteric lymph node; splenic tissue; glutaminase; miniswine

几种理化因素诱导的细胞微核形成及其自动化检测的研究*

The studies on the micronucleus formation induced by several chemical and physical factors and their micronucleus automatic measurement

曹 佳 程天民** (第三军医大学预防医学系分子毒理室) 重庆,630038

微核(Micronuclei,简称MN)测试是用于评价外来化合物和环境污染物致突变性的一个重要试验,已在国内外得到了广泛应用。本研究选择了具有不同诱变机理的10种化合物、物理因子,采用电镜超微结构观察、BrdU掺入、DNA荧光原位杂交、抗着丝粒抗体染色、流式仪自动检测等多种技术手段,对整体动物红细胞、离体的人淋巴细胞、大鼠原代肝细胞、小鼠NIH3T3细胞的MN率变化规律,MN形成进机理行了系统研究,并研究了大样本细胞MN自动化检测的新技术,以及放烧复合伤时MN率的特殊变化规律。主要结果如下:(1)在0.5～5 Gy γ-射线照射人离体外周血淋巴细胞后,定量研究了第一个细胞周期各阶段MN形成情况,发现M期MNCF和NNF产量最高。另外,间期的S和G_2期细胞有可能直接形成MN。细胞原位固定显微形态学观察和电镜超微结构观察,也发现支持间期细胞核以核芽突方式形成MN的证据。(2)电镜观察发现5 Gy γ-射线诱导的人外周血培养淋巴细胞MN均具有双层核膜结构,MN内主要由低电子密度的常染色质组成,边缘有部分异染色质,个别MN内还有核仁样结构。提示经培养后增殖分裂的人淋巴细胞内,部分MN具有一定的结构和功能。而γ-射线诱导的小鼠骨髓红细胞MN虽具有双层核膜结构,但MN内全部由电子密度较高的异染色质组成。这提示MN结构和功能因所处细胞类型不同而有异。(3)使用抗着丝粒抗体染色和着丝粒主要卫星DNA探针荧光原位杂交方法。研究了染色体断裂剂CP、HQ、MMC和非整倍体毒剂COL、COM和AA的MN的染色体组成情况,发现两类毒剂诱导的MN的染色体组成完全不同。非整倍体毒剂COL、COM和AA约50%～70%MN由整条染色体组成,其中又约10%～30%由2条以上染色体组成,而染色体断裂剂则70%～80%以上的MN由染色体断片组成。(4)5 Gy γ-射线诱导的小鼠骨髓红细胞MN的DNA含量定量测定与染色体随机断裂和重接的模拟研究表明,当采用65% 1个Frag,22% 2个Frags,7% 3个Frags和6%LC混合分布模型时,可与MN的DNA实测分布值吻合较好。因此γ-射线诱导的小鼠骨髓红细胞MN,可看成是以染色体随机断裂和重接的方式形成的。(5)对小鼠红细胞MN的双染色双激光流式细胞仪检测方法进行了重要改进。使用RNA特异染料TO以区分PCE和NCE,使用DNA特异染料HO33342检出MN,首次实现了对化合物诱导的小鼠外周血红细胞MN的流式仪自动化检测。在对5个化合物及工业有害化合物的实际测定中,证实该方法与人工镜检相关性$r>0.95$,分选MN真实性在95%左右,而速度比人工检测提高了40～100倍,使该方法基本达到实用化程度。(6)使用两步染色流式细胞仪MN检测新技术,证实含有丰富代谢酶的大鼠原代培养肝细胞,可用于对间接致癌、致突变物活化后所形成MN的检测。但流式仪制样时空白对照易产生MN高背景值,有必要进一步寻找降低MN背景噪声的新方法。(7)小鼠放烧复合伤体内骨髓MNT研究表明:单纯烧伤(10%和20%)后不引起骨髓fMPCE升高,但放射复合烧伤(10%烧伤+1,3,5 Gy,20%烧伤+1,3,5 Gy)后MN率均明显低于单放组,且20%放烧复合组又明显低于10%组。同时发现放射复合烧伤后,PCE%成比例地增加,因此fMPCE降低的原因,可能是复合烧伤后刺激新生红细胞增加,或加速红细胞成熟所致。提示放烧复合伤早期以骨髓fMPCE作为放射剂量辅助指标时,有可能导致放射剂量低估,应予以注意。

关键词 微核;形成机理;流式细胞仪;γ-射线;放烧复合伤;自动化检测

中图法分类号 R329.24

(收稿:1995-12-29;修回:1996-01-22)

(编辑 沈锡庚、王 红)

* 德国研究技术部资助项目,全军"八五"青年基金资助项目,总后回国启动基金资助项目

** 防原医学教研室 重庆,630038

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