DOI:10.16016/j.1000-5404.1986.03.006

大鼠烫伤后小肠氨基酸吸收的变化

肖卢媛 金晓琳

(生化教研室)

提 要 烫伤体表面积37%Ⅱ°的大鼠组，于伤后第三天断头致死，其小肠外翻囊^{3}H-脯氨酸吸收比值（1.87±0.27），较对照组的吸收比值（2.35±0.49）显著降低（P<0.05），同时烫伤组小肠粘膜ATP酶活性5.61±2.27nmole/min/mg蛋白质，Na^+，K^+-ATP酶活性2.86±0.83 nmole/min/mg蛋白质，对照组小肠粘膜ATP酶活性9.63±1.04nmole/min/mg蛋白质，Na^+，K^+-ATP酶活性5.36±0.95nmole/min/mg蛋白质，两组比较不论是ATP酶或Na^+，K^+-ATP酶活性降低都非常显著（P<0.001）。对照组氨基酸吸收比值与小肠粘膜Na^+，K^+-ATP酶活性呈正相关，相关系数r=0.744，P（1）<0.025，烫伤组氨基酸吸收比值与小肠粘膜Na^+，K^+-ATP酶活性也呈正相关关系，相关系数r=0.776，P(1)<0.025，表明烫伤组氨基酸吸收比值下降，可能由于Na^+，K^+-ATP酶活性降低所致。

关键词 氨基酸转运；肠；Na^+，K^+-ATP酶；烧伤

烧伤动物表现消化道功能紊乱，营养物质吸收障碍[1]，氨基酸的肠道吸收为一主动转运过程，需要Na^+，K^+-ATP酶参与作用。鉴于烧伤或烫伤后肠道氨基酸吸收变化鲜见报道，为探讨其吸收障碍的机理，我们进行了^{3}H-脯氨酸小肠外翻囊吸收实验，以及小肠粘膜ATP酶和Na^+，K^+-ATP酶活性的测定，并观察氨基酸吸收比值与Na^+，k^+-ATP酶活性之间的相关性。

材料与方法

大鼠雄性，体重150～200g，分为两组，烫伤组大鼠以90～93℃热水烫伤背部及一侧后肢7秒钟，造成体表面积37%Ⅱ°烫伤。伤后第三天断头致死，取出一段空肠备用。对照组大鼠不经烫伤处理，饲养条件皆与烫伤组相同。

小肠外翻囊^{3}H-脯氨酸吸收实验 参照Wilson以及Mohiuddin等方法[2][3]，其中略有修改。以一不锈钢棒（长约30cm，直径1.5mm）插入小肠将其外翻，取约5cm长结扎成为外翻囊，置于含^{3}H-脯氨酸（0.1μci/ml，比放射性2.2mci/mM，北京原子能研究所产品）的Kreb's碳酸盐溶液中，囊内含相同溶液，但用相同浓度的未标记脯氨酸代替^{3}H-脯氨酸，将小肠外翻囊置37℃温育1小时，并充分通以氧气。温育后分别取囊内相当于肠浆膜侧，囊外相当于肠粘膜侧溶液0.1ml加入闪烁液，检测cpm，同时作一空白实验即取0.1ml不含^{3}H-脯氨酸的Kreb's溶液加入闪烁液，和总计数即取0.1ml含有^{3}H-脯氨酸的Kreb's溶液，加入闪烁液检测cpm，根据囊内、外的cpm，计算相对吸收比值，以表示^{3}H-脯氨酸的吸收量，计算式如下：

$$\text{相对吸收比值} = \frac{(\text{总计数}-\text{空白计数})+(\text{囊内计数}-\text{空白计数})}{(\text{囊外计数}-\text{空白计数})}$$

闪烁液 2份体积甲苯含0.4%W/Vppo，0.01%W/Vpopop，加1份体积Triton X-100。

N^+，K^+-ATP酶和ATP酶活性测定

参照Charney和董伟等方法[4][5]。反应液总体积为200μl，其中含50mM Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)，150mM NaCl，20mM KCl，50mM $MgCl_2$，0.5mM ATP，分别加入A、B、C三管中，C管内加入0.1mM哇巴因，向B、C管中各加入50μl小肠匀浆，立即置37℃水浴保温10分钟后，向各管加入50μl

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

15%三氯醋酸，再向A管加入50μl小肠匀浆，将各管以3000转/分离心10分钟，取上清液测无机磷。根据B、A两管OD之差，可算出ATP酶活性（包括Na^+，K^+-ATP酶和Mg^{2+}-ATP酶活性）。根据B、C两管OD之差可算出Na^+，K^+-ATP酶活性。酶活性以释放无机磷nmole/min/mg蛋白质表示。

蛋白质测定 按紫外分光光度法测定蛋白质[6]。以重蒸馏水稀释小肠粘膜匀浆液，用Uni-Cam SP8-100紫外分光光度计检测，在215nm和225nm波长处，分别读取OD，两者之差乘以144即求得每毫升稀释液中蛋白质μg数。

实验结果

大鼠伤后第三天小肠粘膜ATP酶和Na^+ K^+-ATP酶活性以及对照组的结果如表1。

表1 两组小肠粘膜ATP酶及Na^+,K^+-ATP酶活性比较(M±SD)

	ATP酶 (nmole/min/mg蛋白质)	Na^+,K^+-ATP酶 (nmole/min/mg蛋白质)
对照组	9.63±1.04(20)	5.36±0.95(20)
烫伤组	5.61±2.27*(20)	2.86±0.83*(20)

括弧内数字为实验动物数

*表示P<0.001

大鼠烫伤后第三天两组小肠外翻囊^3H-脯氨酸的吸收结果，以及其相对应的Na^+，K^+-ATP酶活性，见列表2。

从表2看烫伤组^3H-脯氨酸的相对吸收比值，较对照组显著降低（P<0.05）。此外，表2数据还表明：对照组氨基酸吸收比值与Na^+，K^+-ATP酶活性有平行趋势，其相关系数r=0.744，相关系数的显著性单侧检验P(1)<0.025，说明对照组氨基酸吸收比值与Na^+，K^+-ATP酶活性呈正相关。烫伤组氨基酸吸收比值与Na^+，K^+-ATP酶活性之间也呈正相关，其相关系数r=0.776，P(1)<0.025。

表2 两组^3H-脯氨酸相对吸收比值及Na^+,K^+-ATP酶活性

对照组		烫伤组	
相对吸收比值	Na^+,K^+-ATP酶活性	相对吸收比值	Na^+,K^+-ATP酶活性
2.98	7.14	2.31	3.53
2.88	5.64	2.11	4.96
2.78	5.48	2.02	2.82
2.62	5.63	1.90	3.00
2.01	5.47	1.84	2.64
1.89	5.19	1.70	1.98
1.88	4.97	1.60	2.14
1.86	5.04	1.50	2.36
2.36±0.49Δ(8)	5.57±0.68(8)	1.87±0.27*(8)	2.92±0.95(8)

Δ表示M±SD

*表示P<0.05

讨论

烫伤组与对照组的小肠粘膜ATP酶活性分别为5.61±2.27，9.63±1.04 nmole/min/mg蛋白质，两组的Na^+，K^+-ATP酶活性分别为2.86±0.83，5.63±0.95nmole/min/mg蛋白质。两组ATP酶活性相比较，烫伤组降低非常显著（P<0.001），两组Na^+，K^+-ATP酶活性相比较，烫伤组降低也非常显著（P<0.001）。ATP酶包括Na^+，K^+-ATP酶和Mg^{2+}-ATP酶。从上述结果看来，在烫伤情况下测定小肠粘膜ATP酶活性也能反映Na^+，K^+-ATP酶活性变化。

Charney等报道自大鼠分离的空肠绒毛顶和隐窝细胞中Na^+，K^+-ATP酶活性分别为86±11（7），26±4（7）μM/h/mg蛋白质[4]。此结果与我们所得的结果相比较，我们的结果明显偏低，这可能由于我们所测的样品是小肠粘膜匀浆的原故。

烫伤后第三天大鼠小肠外翻囊^3H-脯氨酸吸收比值为1.87±0.27，而对照组^3H-脯

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

氨酸吸收比值为2.35±0.49。两组比较差别显著（P<0.05）。虽然此结果得自体外实验，与整体的小肠吸收功能尚有一定的距离，但至少可说明烫伤后小肠吸收功能有所下降。

对照组的^{3}H-脯氨酸小肠外翻囊相对吸收比值，与小肠粘膜Na^+，K^+-ATP酶活性之间的相关系数r=0.744，P(1)<0.025，表明两者之间呈正相关。同样烫伤组的氨基酸吸收比值与Na^+，K^+-ATP酶活性之间也呈正相关，其相关系数r=0.776，P(1)<0.025，说明烫伤组氨基酸吸收比值下降，可能由于Na^+，K^+-ATP酶活性降低，而造成膜转运氨基酸减少。

从表2看两组中氨基酸吸收比值与Na^+，K^+-ATP酶活性之间虽然都是正相关，但这两者之间设有明确的比例关系。在对照组与烫伤组的不同个体中吸收比值虽相近，但Na^+，K^+-ATP酶活性可相差甚大。如对照组与烫伤组中的吸收比值都约为1.8左右，而对照组的Na^+，K^+-ATP酶活性比烫伤组可高出约1倍。这可能由于Na^+，K^+-ATP酶是一种重要的膜酶，它不仅在物质转运上具有作用，而且在维持膜内、外钠、钾离子浓度梯度上也具有作用。同时也由于对照组小肠粘膜上皮细胞的代谢较之烫伤组的粘膜上皮细胞的代谢更为活跃旺盛的原故。

肠道氨基酸吸收过程中需有氨基酸载体系统和Na^+，K^+-ATP酶参与。目前已知转运氨基酸的载体系统主要有5个[7]，这5个系统的转运过程大多数都是Na^+-依赖的，即氨基酸转运过程中伴有Na^+的同向转运[8]。在粘膜面侧Na^+与载体结合，同时增强载体对氨基酸的亲和力。Na^+通过顺跨膜浓度梯度，易化扩散入粘膜上皮细胞，而氨基酸则为逆跨膜浓度主动转运入细胞。在浆膜面侧Na^+，K^+-ATP酶将Na^+泵出胞外，并消耗ATP。而氨基酸则与载体结合易化扩散进入血液。

Na^+，K^+-ATP酶活性受很多因素的影响，不少文献报道红细胞内Ca^{2+}浓度增高时，可抑制红细胞膜上Na^+，K^+-ATP酶活性，而Ca^{2+}浓度降低时Na^+，K^+-ATP酶活性又能可逆地恢复，故Ca^{2+}有调节Na^+，K^+-ATP酶活性的功能[9][10]。cAMP也有调节Na^+，K^+-ATP酶活性的作用[11]。此外，在体外细胞培养液中，如果增加介质中K^+浓度可使Na^+，K^+-ATP酶含量减少[12]。

动物在烫伤情况下小肠粘膜细胞的Na^+，K^+-ATP酶活性降低，其机理可能是首先引起某些激素水平变化，进而影响第二信使cAMP或Ca^{2+}以及K^+浓度的改变。究竟何种因素起主要作用，尚待研究阐明。

参考文献

1. Nesterenko VS, et al. Changes in small intestine function after irradiation and thermal iniury. Radiobiology 1983; 23(3):404

2. Wilson TH, et al. The use of everted small intestine for study of the transference of substances from the mucosal to serosal surface. J Physiol 1945; 123:116

3. Mohiuddin M, et al. Changes in absorption of glucose and proline following irradiation to the exteriorized ileum. Rad Res 1978; 74:186

4. Charney AN, et al. (Na, K) - stiulated adenosine triphosphatase in isolated intestinal villus tip and crypt cells. BBA 1974; 367:265

5. 董伟，等。人红细胞膜（Na, K）-ATP酶的研究。生物化学与生物物理进展 1983; 3:31

6. Waddell WT. Simple ultraviolet spectrophotometric method for determination of protein. J Lab Clin Med 1956; 48:311

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

7. Shotwell MA, et al. The regulation of Neutral amino acid transport by availability in animal cells. TIBS 1983; 8(9):314

8 钱永巍。国外医学分子生物学分册 1982; 2:73

9. Yingst DT, et al. Sensitivity and reversibility of Ca- dependent inhibition of the (Na-K) - ATpase of human red blood cells. BBA 1985; 813:282

10. Brown AM, et al. Inhibition of the Na pump by cytoplasmic calcium in intact red cells. Biochem abs 1985; 13(2):1700～M13

11. Lingham RB, et al. Modulation of Na, K- ATpase activity in rat brain by adenosine 3′, 5′-monophosphate. Biochem abs 1985; 13(2):1699～M13

12. Cook JS, et al. Regulation of turnover of Na, K-ATpase in cultured cells. In Regulation and Development of Membrane Transport processes. ed by James S. Graves, 1985; P. 3～19

Changes of Amino Acid Absorption through Small Intestines in Rats with Burn Injury

Xiao Luyuan and Jin Xiaolin

(Department of Biochemistry, Third Military Medical College)

37% TBSA third degree burns was inflicted to rats and they were decapitated on the third day postburn. The ^{3}H-proline absorption ratio of the everted small intestine of the burn group (1.87 ± 0.27) was significantly lower than that of the control group (2.35 ± 0.49). In the burn group, the ATPase activity of the small intestinal mucosa was 5.61 ± 2.27 nmole/min/mg protein, and the Na^{+}-K^{+}-ATPase activity was 2.86 ± 0.83 nmole/min/mg protein, while they were 9.63 ± 1.04 nmole/min/mg protein and 5.36 ± 0.95 nmole/min/mg protein in the control group respectively. Thus, it was apparent that the two activities decreased markedly in the rats with burn injury.

It was found that the amino acid absorption ratio was positively correlated with the activity of Na^{+}-K^{+}-ATPase of the small intestine mucosa in the burn group as well in the control group. The relative coefficient was 0.744 p(1) 0.025 in the control, and 0.776 p(1) 0.025 in the burn group. It suggests that the decrease of amino acid absorption ratio in the burn group is likely due to the decreased activity of Na^{+}-K^{+}-ATPase activity.

Key words: Amino acid transport; Intestine; Na^{+}-K^{+}-ATPase; Burn

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