

谷氨酰胺对脓毒症大鼠急性肠黏膜损伤的保护作用^{*}

南京中医药大学无锡附属医院 沈丽娟 王倩^{*} 吴锡平 关云艳 孙月雯, 无锡 214071

摘要 目的:探讨谷氨酰胺对脓毒症大鼠急性肠黏膜损伤的保护作用。方法:将 SD 大鼠随机分为 3 组,即正常组(A 组)、模型组(B 组)及谷氨酰胺组(C 组),模型组及谷氨酰胺组大鼠腹腔注射 0.45 mg/mL 的脂多糖(LPS)溶液,1 mL/100g,即 4.5 mg/kg,10 min 内分 3 次注射完毕进行造模。造模 12 h 后模型组给予 25.2% (80 kcal) 百普素溶液灌胃,5 次/d,每次 4 mL;谷氨酰胺组在上述造模 12 h 后除灌注百普素溶液外,另灌胃谷氨酰胺溶液 3.75g/(kg·d)。模型组随机分为喂养 36 h 组(B1 组)和喂养 72 h 组(B2 组)。比较各组组织病理及肠组织谷氨酰胺水平。结果:①模型组肠组织谷氨酰胺浓度、绒毛长度及黏膜层厚度均低于正常组(均 $P < 0.05$);模型组肠黏膜 Chiu 氏评分与正常组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。②谷氨酰胺组肠组织谷氨酰胺浓度较模型组升高($P < 0.05$);谷氨酰胺组肠黏膜 Chiu 氏评分、绒毛长度及黏膜层厚度较模型组有不同程度改善(均 $P < 0.05$)。结论:脓毒症大鼠肠组织谷氨酰胺浓度下降,存在肠黏膜损伤,给予谷氨酰胺治疗能改善脓毒症大鼠的急性肠黏膜损伤。

关键词 脓毒症;急性肠黏膜损伤;谷氨酰胺

中图分类号 R515.3

文献标识码 A

DOI 10.11768/nkjwzzzz20180323

Effect of glutamine on septic acute intestinal mucosa injury in rats SHEN Li-juan, WANG Qian,^{*} WU Xi-ping, GUAN Yun-yan, SUN Yue-wen. Department of Intensive Care Unit, Nanjing University of Chinese Medicine Affiliated Wuxi Hospital, Wuxi 214071, China

Abstract Objective: To investigate the effect of glutamine on septic acute intestinal mucosa injury in a rat model. Methods: SD rats were divided into three groups: normal group (A), model group (B), and glutamine group (C). The group B was divided into a 36-h subgroup (B1) and a 72 h feeding subgroup (B2). The concentrations of intestinal glutamine and histopathological changes were measured. Results: Intestinal glutamine levels in subgroups B1 and B2 (1.023 ± 0.039 and 1.651 ± 0.036 , respectively) were lower than in group A (2.924 ± 0.135 , $P < 0.05$). The lengths of the villus and thicknesses of the mucosal layer in subgroups B1 and B2, and group C were significantly different from those in group A. The ultrastructural changes of intestines in group B were obvious, while those in group C were not. Intestinal glutamine levels in subgroups B1 and B2 (1.023 ± 0.039 and 1.651 ± 0.036 , respectively) were lower than in group C (2.320 ± 0.157 , $P < 0.05$). The damage of mucosa was lessened in group C. Conclusions: Treatment with glutamine can decrease intestinal mucosal injury in septic rats.

Key words Sepsis; acute intestinal mucosal injury; Glutamine

谷氨酰胺是胃肠道上皮细胞、淋巴细胞和巨噬细胞重要的代谢能量来源,病理状态下谷氨酰胺是维持肠道黏膜代谢、结构及功能的必需营养物质^[2]。危重症患者机体肌肉和血浆谷氨酰胺浓度明显下降^[2]。本研究构建脓毒症大鼠模型,给予外源性补充谷氨酰胺,探讨谷氨酰胺对脓毒症大鼠急性肠黏膜损伤的保护作用。

材料与方法

实验动物与环境 雄性 SD 大鼠 30 只,6 个月龄,体重 140 ~ 160 g。由上海市西普尔-必凯实验

动物有限公司提供,合格证号 SYXK(沪)2008-0016,合格证书编号 2008001624801。大鼠饲养和实验均在南京凯基生物科技发展有限公司实验室内进行,实验动物许可证 SYXK(军)2007-030。大鼠接收后放入实验环境中分笼饲养,保持环境温度 20 ~ 25℃,湿度 40 ~ 70%。饲以实验动物用配合饲料,自由进食饮水。通过实验动物伦理委员会审批。

药物及配制 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS, Escherichia coli 055: B5, 编号 2880 美国 Sigma 公司),LPS 溶于生理盐水中,配制成 0.45 mg/mL 的 LPS 溶液。百普素(PEPTI-2000 variant)粉剂,由短肽链乳清蛋白、中链甘油三酯和麦芽糖糊精等组成,125 g/袋(荷兰 Nutricia 公司),配制成 25.2% 百普素溶液。L-谷氨酰胺:L-Glutamin(美国 Sigma 公司),配制成 0.375 mg/mL 的 L-谷氨酰胺溶液。冷

^{*}基金项目:江苏省无锡市科技局科研项目(No:CSZ00N1119);江苏省无锡市卫计委面上项目(No:YGZXM1525)

^{*}通信作者:王倩,E-mail:panda55@163.com

冻干燥剂(德国 Christ 公司),异硫氰酸苯酯(phenylisothiocyanate, PITC)(美国 Sigma 公司),甲醇和乙腈(德国 Merck 公司,色谱纯),谷氨酰胺标准品(美国 Sigma 公司)三乙胺、乙酸钠、无水乙醇、磷酸氢二钠、磷酸、醋酸等其他试剂均为国药分析纯。

仪器 天平、代谢笼,光学显微镜(日本 Olympus 公司)DX45 显微镜及其自带的计算机图像分析系统(DP2-BSW),透射电子显微镜(JEM-1011,日本),超薄切片机(LKB-1,瑞典)。酶标仪(BioTek 公司,型号 Elx800),孵箱(上海精宏实验设备有限公司,型号 THZ-312),冰箱,转移脱色摇床(海门市其林贝尔仪器制造有限公司,型号 TS-8 型)。1525 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),2489 紫外检测器(美国 Waters 公司),XBridge C18 5 μ m,4.6 $\times$ 250mm 色谱柱,Empower2 色谱工作站。

方法

动物分组 30 只大鼠随机分为正常组(A 组)、模型组(B 组)、谷氨酰胺组(C 组),每组大鼠 10 只。B 组又分为喂养 36 h 组(B1 组)、72 h 组(B2 组),每组 5 只。

制作动物模型 实验前适应性喂养大鼠 1 周,适应性喂养(饲料由南京凯基生物科技发展有限公司实验室提供,400 kcal/100g,给予大鼠喂养饲料 20g/(100g $\cdot$ d)。A 组大鼠腹腔注射生理盐水,B 组与 C 组大鼠腹腔注射 4.5 mg/kg LPS 溶液,10 min 内分 3 次注射完毕^[3]进行造模,大鼠出现心率加快(为造模前心率 2 倍),血压下降,精神萎靡、少动、竖毛,口鼻分泌物增多等为造模成功的标志^[4]。B 组造模成功后 12 h 给予 25.2% (80 kcal) 百普素溶液灌胃,5 次/d,每次 4 mL。C 组造模成功后 12 h 给予灌注百普素,2 h 后给予灌注谷氨酰胺溶液,5 次/d,总量 3.75g/(kg $\cdot$ d)。

标本收集 A 组:腹腔注射生理盐水,适应性喂养 72 h,从大鼠眼眶静脉丛取血后处死,取回肠做病理及生化检测。B1 组:腹腔注射 LPS 溶液,百普素喂养 36 h 后,5 只大鼠眼眶静脉丛取血后处死,取回肠做病理及生化检测。B2 组:腹腔注射 LPS 溶液,百普素喂养 72 h 后,5 只大鼠眼眶静脉丛取血后处死,取回肠做病理及生化检测。C 组:腹腔注射 LPS 溶液,百普素 + 谷氨酰胺喂养 72 h 后,从大鼠眼眶静脉丛取血后处死,取回肠做病理及生化检测。

病理检测 所有大鼠颈椎脱臼处死,取小肠,10% 福尔马林固定,常规取材,脱水,石蜡包埋。切片经 HE 染色。光学显微镜观察:肠壁绒毛有无水

肿,黏膜上皮细胞有无变性、坏死,黏膜固有层有无充血、水肿、炎细胞浸润,黏膜下层、肌层、浆膜层有无充血、水肿、炎细胞浸润。按 Chiu 氏 6 级评分^[5]评价,根据病变由轻到重的程度,依次评为 1~5 分,无明显病变为 0 分。用图像分析软件测量肠壁绒毛长度、黏膜层厚度(日本产 olympus DX45 显微镜及其自带的计算机图像分析系统 DP2-BSW),求出每只动物平均绒毛长度与黏膜层厚度的比值(绒毛长度/黏膜层厚度),黏膜层平均厚度,并进行组间分析。

谷氨酰胺检测 取回肠组织 0.1 g 加生理盐水 0.5 mL 置于匀浆器 4 $^{\circ}$ C 匀浆,然后取 0.5 mL 匀浆液采用高效液相色谱(HPLC^[6])法(Waters 系统)检测肠组织谷氨酰胺浓度。加等量乙腈摇匀,2500r/min,4 $^{\circ}$ C 离心 20 min,取上清液。衍生方法:分别取处理过的样品 40 μ L,加 40 μ L 衍生剂(异硫氰酸苯酯:超纯水:三乙胺:无水乙醇=1:1:1:7),室温反应 30 min,冻干机冻干,加 200 μ L 稀释液(流动相 A:B=10:90),充分复溶后,用 0.45 μ m 真空过滤器过滤,取 20 μ L 进样。流动相为 25 mmol/L 磷酸盐缓冲(pH5.5):乙腈=90:10,流速:1.0 mL/min;柱温:30 $^{\circ}$ C;检测波长:254 nm,进样量:20 μ L。色谱条件:C18 色谱柱(250mm $\times$ 4.6mm,5 μ m)。

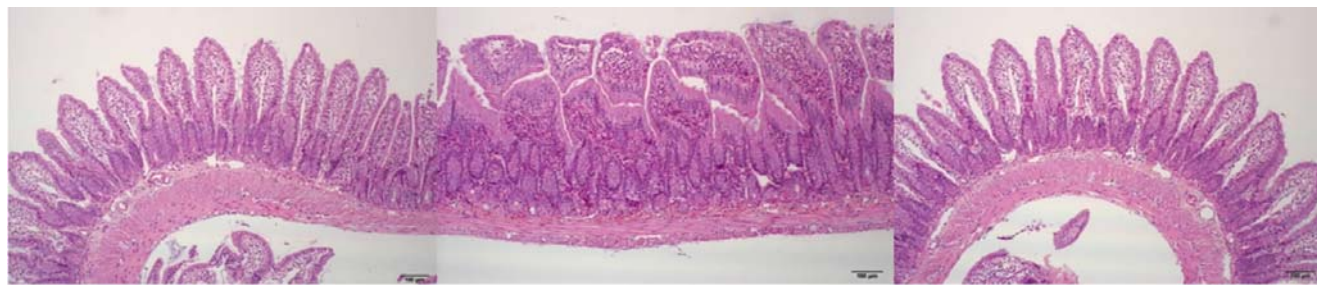
统计学处理 采用 SPSS 21.0 统计学软件。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,多组比较采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验或者 Dunnett S T3 检验,采用 Pearson 相关性分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结果

组织病理结果 A 组小肠各层次结构清晰。黏膜层表面被单层柱状上皮,向肠腔突起形成细长的绒毛,排列整齐,均无异常。固有层内有肠腺,间质无水肿。黏膜下层为疏松结缔组织,肌层较厚,浆膜为间皮,单层扁平状。A 组 Chiu 氏 6 级评分为 0 分,见图 1。

B1 组 1 只绒毛顶端上皮出现囊状间隙,伴随毛细血管充血,Chiu 氏评分为 1 分,其它 4 只无异常。黏膜层细长的绒毛,排列整齐,顶端上皮细胞无明显变性,无明显坏死。固有层腺体和间质,黏膜下层、肌层无明显病变。Chiu 氏评分为 0 分,见图 1。

B2 组中 2 只绒毛较绒毛顶端上皮抬高与固有膜剥离,中央乳糜管扩张,Chiu 氏评分为 2 分。2 只绒毛顶端上皮出现囊状间隙,Chiu 氏评分为 1 分,1 只无明显病变,Chiu 氏评分为 0 分,见图 1。



注:图中由左到右依次为 Chiu 氏评分 0 分、1 分、2 分

图1 小肠黏膜层(HE×200)

C 组中 6 只绒毛上皮间间隙轻度扩大,伴随毛细血管充血,Chiu 氏评分为 1 分,2 只中央乳糜管扩张,Chiu 氏评分为 2 分。2 只无明显病变,Chiu 氏评分为 0 分,见图 1。

肠黏膜损伤在 B2 组与 C 组明显,同时 C 组损伤较 B2 组小,见表 1。

表1 4组肠黏膜损伤 Chiu 氏评分比较 (分, $\bar{x} \pm s$)

组别	例	Chiu 氏评分
A 组	10	$0.1 \pm 0.4^{* \Delta}$
B1 组	5	0.2 ± 0.4
B2 组	5	$1.4 \pm 1.1^{\Delta}$
C 组	10	$1.0 \pm 0.7^{*}$

注:与 B2 组比较, $^{*}P < 0.05$,与 C 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$

测量结果 B1 组、B2 组、C 组肠黏膜绒毛长度及黏膜层厚度与 A 组比较,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$),见表 2。

表2 4组肠黏膜形态学比较

($\times 10^{-2} \mu\text{m}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	例	绒毛长度	黏膜厚度	绒毛长: 黏膜厚
A 组	10	284.628 ± 15.432	539.551 ± 44.936	0.528
B1 组	5	$239.816 \pm 15.380^{*}$	$430.450 \pm 39.059^{*}$	0.557
B2 组	5	$260.060 \pm 30.508^{*}$	455.820 ± 50.956	0.571
C 组	10	$259.583 \pm 17.210^{*}$	$449.319 \pm 33.750^{*}$	0.578

注:与 A 组比较, $^{*}P < 0.05$

肠组织谷氨酰胺水平 B1 组、B2 组肠组织谷氨酰胺浓度低于 A 组和 C 组(均 $P < 0.05$);B1 组、B2 组间也存在差异,见表 3。

表3 4组肠组织谷氨酰胺浓度水平比较 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	例	组织谷氨酰胺
A 组	10	2.924 ± 0.135
B1 组	5	$1.023 \pm 0.039^{\Delta *}$
B2 组	5	$1.651 \pm 0.036^{\Delta * \#}$
C 组	10	2.320 ± 0.157

注:与 A 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$,与 C 组比较, $^{*}P < 0.05$,与 B1 组比较, $^{\#}P < 0.05$

讨 论

脓毒症时,肠上皮细胞凋亡增加,细胞数量减少,肠上皮细胞功能障碍,肠黏膜屏障破坏,存在肠功能障碍。继而肠道菌群失调,肠道免疫功能受抑,导致肠腔内毒素入血,引起炎症介质释放增多,使肠黏膜屏障进一步受损,大量细菌和毒素易位,引起体内促炎性和抗炎性炎症介质平衡失调,导致恶性循环,加重全身炎症反应综合征,最终造成多器官功能障碍综合征^[7]。故改善脓毒症时肠功能障碍显得尤为重要。

谷氨酰胺是一种非必需氨基酸,它由体内合成,是胃肠道上皮细胞、淋巴细胞和巨噬细胞重要的代谢能量来源。研究表明,谷氨酰胺作为小肠黏膜细胞的第一能量来源和结肠黏膜细胞的第二能量来源,在体内可以维护肠黏膜屏障的正常功能;还能帮助肝脏和肾脏清除体内废物、促进胰腺生长、增加蛋白质合成、减少肌肉分解、促进伤口愈合、维持谷胱甘肽的功能以及抑制细胞因子、炎性介质的产生,提高机体免疫力等^[8~10]。谷氨酰胺也是一种条件必需氨基酸,在创伤、感染等应激状态下机体血浆及肌肉中谷氨酰胺浓度明显下降^[11]。研究显示,危重患者机体肌肉和血浆谷氨酰胺浓度明显下降^[12]。本研究显示,脓毒症大鼠肠组织谷氨酰胺浓度低于正常组($P < 0.05$),与上述研究结果一致,提示外源性补充谷氨酰胺可能有保护肠黏膜屏障功能的作用。

病理状态下谷氨酰胺是维持肠道黏膜结构、代谢及功能的必需营养物质^[1],需从体外补充。研究显示,补充谷氨酰胺可以降低内毒素血症大鼠 TLR4, MyD88, TRAF6 mRNA 水平,保护肠黏膜屏障功能^[12]。同时大量研究证实,补充谷氨酰胺可降低肠黏膜通透性,维护肠道黏膜结构,增强黏膜免疫功能,减少肠道细菌易位,可防止肠源性败血症的发生^[13,14]。本研究表明谷氨酰胺可以改善脓毒症大鼠急性肠功能障碍,防止多器官障碍综合征的发生。

(下转第 260 页)

研究表明炎症反应能够加速慢性肾脏病患者动脉粥样硬化,从而导致其脑血管病发病率和病死率增加^[5]。血管炎症可以诱发脑出血已在人和动物模型研究中得到证实^[6]。血清 P 水平升高可诱导血管平滑肌细胞发生炎症反应,增加基质金属蛋白酶 II、IX 和组织蛋白酶 S 的表达,从而降解细胞外基质、破坏血管壁的完整性。此外,高血清磷水平可诱导血管平滑肌细胞凋亡、内皮细胞氧化应激和炎症反应,因此,血清 P 诱导的炎症反应可能参与了动脉粥样硬化小血管的破裂,引发脑出血。

血管钙化在维持性血液透析患者并发脑出血中也起到了重要的作用。血清 P 水平升高可诱导血管钙化,其可能机制^[7,8]有:诱导平滑肌细胞的表型变化向成骨样细胞转化;引起平滑肌细胞凋亡;促使血管壁细胞外基质降解和囊泡释放。动脉血管钙化可引起血管壁张力增高,从而诱发血管壁破裂导致脑出血^[9,10]。

本研究提示,在临床工作中,要严格控制血液透析患者的血压水平,选择合适的抗凝方法,注重改善其营养状况,提高其血小板水平,也要控制患者的血清 P 水平。本研究的样本量较小,血清 P 水平在脑出血与非脑出血患者中的改变以及其与维持性血液透析患者并发脑出血的因果关系有待进一步的临床试验证实。

参考文献

- 1 王新德. 各类脑血管疾病诊断要点[J]. 中华神经科杂志,1996,29(6):379-380.
- 2 徐叶,黄思思,何睿瑜,等. 血清骨桥蛋白水平与急性脑出血患者病情及预后的关系[J]. 内科急危重症杂志,2017,23(3):189-200.
- 3 Wannamethee SG, Sattar N, Papcosta O, et al. Alkaline phosphatase, serum phosphate, and incident cardiovascular disease and total mortality in older men[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33(5): 1070-1076.
- 4 Eriguchi R, Taniguchi M, Ninomiya T, et al. Hyporesponsiveness to erythropoiesis-stimulating agent as a prognostic factor in Japanese hemodialysis patients: the Q-Cohort study[J]. JNephrol, 2015, 28(2): 217-225.
- 5 Bihl JC, Zhang C, Zhao Y, et al. Angiotensin-(1-7) counteracts the effects of Ang II on vascular smooth muscle cells, vascular remodeling and hemorrhagic stroke: role of the NFκB inflammatory pathway. Vasc Pharmacol[J]. Vasc Pharmacol, 2015, 73(4): 115-123.
- 6 Sturgeon JD, Folsom AR, Longstreth WT Jr, et al. Hemostatic and inflammatory risk factors for intracerebral hemorrhage in a pooled cohort[J]. Stroke, 2008, 39(8): 2268-2273.
- 7 Yamada S, Tokumoto M, Tatsumoto N, et al. Phosphate overload directly induces systemic inflammation and malnutrition as well as vascular calcification in uremia[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 306(12): F1418.
- 8 Palioian NJ, Giachelli CM. A current understanding of vascular calcification in CKD[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2014, 307(8): F891-F900.
- 9 石丽丽. 高通量滤器干预维持血液透析患者后血清钙、磷、甲状旁腺激素的变化分析[J]. 内科急危重症杂志, 2017, 23(3): 250-251.
- 10 张林, 刘静, 谢宜. 维持性血液透析患者继发 Wernicke 脑病 12 例临床分析[J]. 内科急危重症杂志, 2015, 21(3): 217-218.

(2017-07-26 收稿 2018-01-29 修回)

(上接第 255 页)

参考文献

- 1 Wischmeyer PE. Glutamine: role in gut protection in critical illness[J]. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2006, 9(5): 607-612.
- 2 Ruiz P, Tryphonopoulos P, Island E, et al. Citrulline evaluation in bowel transplantation[J]. Transplant Proc, 2010, 42(1): 54-56.
- 3 Shen LJ, Guan YY, Wu XP, et al. Serum citrulline as a diagnostic marker of sepsis-induced intestinal dysfunction[J]. Clin Res Hepatol Gastroenterol, 2015, 39(2): 230-236.
- 4 何艳, 秦雪梅, 鲁卫华, 等. 脓毒症大鼠肠道瞬时感受器电位香草酸受体 1 及降钙素基因相关肽的表达及作用[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2016, 21(1): 38-41.
- 5 Chiu CJ, Meardle AH, Brown R, et al. Intestinal mucosa lesion in low flow states[J]. Arch Surg, 1970, 101(4): 478-483.
- 6 Moller SE. Quantification of physiological amino acids by gradient ion exchange high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr, 1993, 613(2): 223-230.
- 7 Rowlands BJ, Soong CV, Gardiner KR, et al. The gastrointestinal tract as a

barrier in sepsis[J]. British Medical Bulletin, 1999, 55(1): 196-211.

- 8 Yoshida S, Kaihira A, Ishibashi N, et al. Glutamine supplementation in cancer patients[J]. Nutrition, 2001, 17(9): 766-768.
- 9 Wilmore DW. The effect of glutamine upplementation in patients following elective surgery and accidental injury[J]. J Nutr, 2001, 131(9): 2543.
- 10 翁方中, 周瑞祥. 重症肺部感染患者应用谷氨酰胺和生长激素免疫营养治疗的临床观察. 内科急危重症杂志, 2013, 19(3): 160-167.
- 11 李宁, 赖万强. 谷氨酰胺对免疫功能的影响[J]. 医学综述, 2010, 16(6): 823-826.
- 12 王辉, 范婵娟, 张佳莹, 等. 谷氨酰胺对内毒素血症大鼠肠黏膜屏障的作用[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(2): 355-356.
- 13 王爱丽, 牛琼, 刘成霞, 等. 谷氨酰胺对大鼠肠缺血再灌注损伤的作用[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(9): 1703-1707.
- 14 季艳梅, 王爱民, 郭学珍, 等. 重组人生长激素和谷氨酰胺的强化营养对老年脓毒症患者应激和免疫状态的临床疗效[J]. 内科急危重症杂志, 2013, 19(5): 288-289.

(2017-03-16 收稿 2018-04-17 修回)