

· 实验研究 ·

谷氨酰胺对内毒素血症幼年大鼠小肠上皮 细胞凋亡的作用及其机制探讨

吴秀清¹, 舒林华², 孙梅², 王虹², 高红³

(1. 沈阳市儿童医院内二科, 辽宁 沈阳 110032; 2. 中国医科大学第二临床学院儿科, 辽宁 沈阳 110004;
3. 中国医科大学第二临床学院小儿先天畸形实验室, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 通过内毒素血症幼年大鼠小肠 Bcl-2 及 Bax mRNA 表达的变化, 观察谷氨酰胺对小肠细胞凋亡的作用, 探讨谷氨酰胺对内毒素血症幼年大鼠小肠的保护机制。方法 用腹腔注射内毒素(4 mg/kg 大肠杆菌脂多糖 O55B5)方法制备 18 日龄大鼠内毒素血症模型(内毒素组); 腹腔注射同等量生理盐水为对照组; 腹腔注射内毒素同时注射 N(2)-L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(2 g/kg)为谷氨酰胺干预组。分别在注射后 2, 4, 6, 24, 72 h 取全部回肠, 半定量 RT-PCR 法测 Bcl-2, Bax mRNA 的表达。结果 正常对照和内毒素组小肠各时间点的 Bcl-2 mRNA 均无表达, 谷氨酰胺组各时间点的 Bcl-2 mRNA 表达增强。正常对照 Bax mRNA 表达较弱, 内毒素组小肠各时间点的 Bax mRNA 表达均明显增强, 而谷氨酰胺组 2 h 亚组的表达较正常明显减弱, 其余各时间点的 Bax mRNA 表达接近对照组。内毒素组 Bax, Bcl-2 mRNA 表达的比值明显高于对照组, 谷氨酰胺组 Bax, Bcl-2 mRNA 表达的比值明显低于对照组和内毒素组, 其中以 2 h 亚组的变化最显著。结论 谷氨酰胺使内毒素血症小肠 Bcl-2 基因表达增强, 明显高于正常; Bax 基因表达减弱至接近正常; Bax, Bcl-2 mRNA 表达的比值明显下降, 从而抑制细胞凋亡, 维持肠屏障结构的完整, 以对抗内毒素对肠黏膜的损害。 [中国当代儿科杂志, 2006, 8(6): 496-498]

[关键词] 谷氨酰胺; 内毒素血症; 小肠; Bcl-2; Bax; 幼年大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2006)06-0496-03

Effect of glutamine on apoptosis of the small intestine in young rats with endotoxemia and its mechanism

WU Xiu-Qing, SHU Lin-Hua, SUN Mei, WANG Hong, GAO Hong. Department of Internal Medicine, Shenyang Children's Hospital, Shenyang 110032, China (Email: wu_xiuqing@hotmail.com)

Abstract: Objective To study the effect of glutamine on intestinal epithelial apoptosis by examining changes regarding Bcl-2 and Bax mRNA expressions in the small intestine of young rats with endotoxemia and to explore the protective mechanism that glutamine may have. **Methods** A total of 120 18-day-old rats were randomly assigned into Endotoxemia, Glutamine-treated and Control groups ($n = 40$ each). The endotoxemia model was established by intraperitoneal injection of endotoxin (4 mg/kg of O55B5 Escherichia coli lipopolysaccharide). Rats in the Glutamine-treated group were intraperitoneally injected with N(2)-L-alanyl-L-glutamine (2 g/kg) along with endotoxin. Rats in the Control group were intraperitoneally injected with an equal volume of normal saline. The entire ileum was collected at 2, 4, 6, 24, and 72 hrs after injection. Bcl-2 and Bax mRNA expressions were detected by semi-quantities reverse transcriptase chain reaction. **Results** Bcl-2 mRNA was not expressed in the Control and the Endotoxemia groups but increased in the Glutamine-treated group at each time point. Bax mRNA expression was weak in the Control group, and significantly increased in the Endotoxemia group at each time point. The Glutamine-treated group showed noticeably reduced Bax mRNA expression at 2 hrs post-injection while other time points were similar to the Control group. The ratio of Bax and Bcl-2 mRNA expression at each time point in the Endotoxemia group was significantly higher than that in the Control group while the Glutamine-treated group demonstrated significantly lower ratio of Bax and Bcl-2 mRNA expression than both. **Conclusions** Glutamine treatment increased Bcl-2 mRNA expression and decreased Bax mRNA expression, as a result, the ratio of Bax and Bcl-2 mRNA expression decreased. The effects of glutamine resulted in a suppression of intestinal epithelial apoptosis and maintained the integrity of the gut barrier structure.

[Chin J Contemp Pediatr, 2006, 8(6): 496-498]

Key words: Glutamine; Endotoxemia; Small intestine; Bcl-2; Bax; Young rats

[收稿日期] 2006-04-24; [修回日期] 2006-07-04

[作者简介] 吴秀清, 女, 博士, 主任医师。主攻方向: 小儿胃肠功能障碍。

各种病因所致的胃肠功能障碍在临床上很普遍,常是诱发其他器官功能障碍的原因,治疗难度大。我们的前期研究^[1]通过幼年大鼠内毒素血症时小肠上皮细胞凋亡及 Caspase-3 的表达变化证实,细胞凋亡是内毒素血症时肠屏障功能破坏的主要原因之一。因此,抗凋亡药物应该能保护肠黏膜屏障的完整性,从而减轻胃肠功能障碍。有报道^[2]谷氨酰胺能保护肠道外营养及缺血再灌注肠细胞免于凋亡,减少肠黏膜萎缩。本实验以 Bcl-2, Bax 的 mRNA 表达为观察指标,对谷氨酰胺在内毒素血症幼年大鼠小肠中的作用进行研究,从细胞凋亡角度探讨谷氨酰胺对肠道的保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 分组与内毒素血症模型制备 18 日龄清洁级 Wistar 大白鼠,不分雌雄,体重 22~40 g。参照文献^[3]制备内毒素血症模型,随机分为内毒素组、谷氨酰胺组和对照组,每组 40 只,各分为 5 个亚组。内毒素组腹腔注射内毒素 4 mg/kg,配比浓度为 4 mg/mL,用生理盐水溶解。谷氨酰胺组腹腔注射内毒素同时腹腔注射 N(2)-L-丙氨酰-L-谷氨酰胺 2 g/kg,浓度 20%,含 L-谷氨酰胺 13.46%。对照组腹腔注射生理盐水 1 mL/kg。每组动物分别于注射后 2, 4, 6, 24, 72 h 5 个时间点各随机取 8 只,10% 水合氯醛 4 mL/kg 腹腔注射麻醉,在无菌操作下断头处死,取全部回肠,用冰盐水灌洗清除小肠内容物,为防止人为污染破坏 RNA,立即放入去 RNA 酶的试管中,液氮速冻, -80℃ 冰箱保存。

1.1.2 药品与试剂 内毒素(大肠杆菌脂多糖 LPS), Sigma 公司产品。N(2)-L-丙氨酰-L-谷氨酰胺,德国 Fresenius 公司产品。总 RNA 提取系统试剂由河南华美生物工程公司提供。Bax, Bcl-2, 内参 β -actin 引物由上海生工生物工程技术有限公司合成, Takara 试剂盒由大连宝生物工程有限公司提供。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 的提取 取 100 mg 回肠组织标本剪碎、研磨后置于离心管中,加 1 mL 冰冻的 RNA 提取液,用高速匀浆器在冰浴中进行匀浆。按说明书方法提取总 RNA。

1.2.2 半定量 RT-PCR 法检测小肠的 Bcl-2, Bax 表达 逆转录合成 cDNA 第一链, PCR 扩增,进行扩增产物的半定量分析,以 β -actin 为内对照。Bcl-2 及 Bax 的 mRNA 表达水平分别用两者 PCR 电泳结

果扫描值与 β -actin 的 PCR 电泳结果扫描值的比值来确定。

1.3 统计学分析

用 SPSS11.0 统计软件包分析,所有资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较分别采用方差分析和校正 t 检验。

2 结果

2.1 注药后表现

内毒素组大鼠注药后 0.5 h 出现倦怠、抖动; 1 h 后出现腹泻、腹胀、呼吸快; 4~6 h 出现口唇、四肢青紫,周身凉,腹胀加重,血气示严重酸中毒, 4 h 内死亡 5 只, 4~6 h 内死亡 4 只; 24 h 吃奶减少, 腹泻、腹胀持续,体重不增,活动少,增加死亡 3 只; 72 h 腹胀减轻,呼吸快缓解,吃奶减少、腹泻、活动少持续,体重下降明显,无继续死亡,总死亡率为 20%。谷氨酰胺组大鼠注药后 2 h 出现倦怠; 4 h 出现胃肠功能障碍; 死亡 2 只; 6~24 h 最重,死亡 4 只; 24 h 后开始恢复,仍死亡 3 只; 72 h 症状、体征消失,但体重不增或增加较少,无继续死亡,总死亡率为 15%。对照组未见异常, 3 d 内体重增长良好。

2.2 Bcl-2 mRNA 的表达

图 1 可见,正常对照和内毒素组小肠各时间点的 Bcl-2 mRNA 均无表达,而谷氨酰胺组各时间点的 Bcl-2 mRNA 均有表达。半定量值比较(见表 1)显示,内毒素组各亚组之间及其与对照组之间差异均无显著性,谷氨酰胺组各亚组之间差异无显著性,但其各亚组的表达明显高于对照组和内毒素组 ($P < 0.01$),差异均有非常显著意义。

2.3 Bax mRNA 的表达

图 2 可见,正常对照 Bax mRNA 表达较弱,内毒素组小肠各时间点的 Bax mRNA 表达均明显增强,谷氨酰胺组 2 h 亚组的表达明显减弱,其余各时间点的 Bax mRNA 表达接近对照组,但比内毒素组弱。半定量值比较(表 2)显示,内毒素组 Bax mRNA 表达明显高于对照组 ($P < 0.01$),注射内毒素后 2 h 上升明显, 24 h 之内一直处于高表达状态,至 72 h 出现明显回落,但仍高于正常。谷氨酰胺组 2 h 亚组的 Bax mRNA 表达明显下降,低于内毒素组、对照组和同组中的其他亚组 ($P < 0.01$),其余各亚组之间差异无显著性,但其值均明显低于内毒素组相对应的值 ($P < 0.01$),而与对照组差异无显著性。

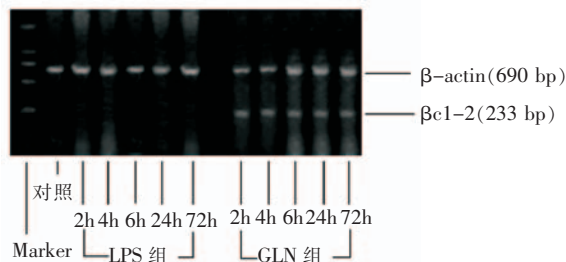


图 1 Bcl-2 mRNA 的 PCR 表达

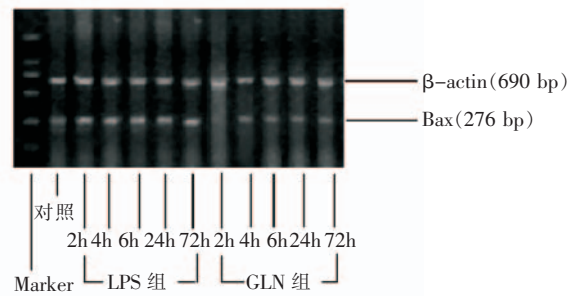


图 2 Bax mRNA 的 PCR 表达

表 1 Bcl-2 mRNA 的表达 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

时间	2 h	4 h	6 h	24 h	72 h
对照组	0.33 ± 0.06	0.33 ± 0.06	0.33 ± 0.06	0.33 ± 0.06	0.33 ± 0.06
LPS 组	0.34 ± 0.04	0.31 ± 0.05	0.34 ± 0.06	0.36 ± 0.05	0.39 ± 0.06
GLN 组	0.99 ± 0.17	0.98 ± 0.16	0.97 ± 0.18	0.97 ± 0.14	0.94 ± 0.17

表 2 Bax mRNA 的表达 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

时间	2 h	4 h	6 h	24 h	72 h
对照组	0.98 ± 0.18	0.98 ± 0.18	0.98 ± 0.18	0.98 ± 0.18	0.98 ± 0.18
LPS 组	1.70 ± 0.23	1.84 ± 0.22	1.69 ± 0.23	1.73 ± 0.21	1.41 ± 0.19 ^a
GLN 组	0.36 ± 0.08	0.98 ± 0.21 ^b	0.94 ± 0.21 ^b	0.94 ± 0.20 ^b	0.93 ± 0.20 ^b

a 与同组 2,4,6,24 h 各亚组比较, $P < 0.05$; b 与同组 2 h 亚组比较, $P < 0.01$

2.4 Bax, Bcl-2 mRNA 表达的比值

内毒素组 Bax, Bcl-2 mRNA 表达的比值明显高于对照组 ($P < 0.05$), 其变化的趋势为: 注射内毒素后 2 h 明显升高, 4 h 达高峰, 6 h 出现明显回落,

72 h 下降更显著, 但仍高于正常。谷氨酰胺组 Bax, Bcl-2 mRNA 表达的比值明显低于对照组和内毒素组 ($P < 0.01$), 其中以 2 h 亚组的变化最显著。见表 3。

表 3 Bax 和 Bcl-2 mRNA 的表达的比值 (n=8, $\bar{x} \pm s$)

时间	2 h	4 h	6 h	24 h	72 h
对照组	3.01 ± 0.46	3.03 ± 0.46	3.05 ± 0.41	3.02 ± 0.43	3.04 ± 0.47
LPS 组	5.08 ± 0.58 ^{a,c}	6.00 ± 0.72 ^c	5.12 ± 0.93 ^{a,c}	4.89 ± 0.76 ^{b,c}	3.72 ± 0.63 ^b
GLN 组	0.37 ± 0.12	1.02 ± 0.23 ^d	1.00 ± 0.30 ^d	0.97 ± 0.13 ^d	0.99 ± 0.17 ^d

a 与同组 4 h 亚组比较, $P < 0.05$; b 与同组 4 h 亚组比较, $P < 0.01$; c: 与同组 72 h 亚组比较 $P < 0.01$; d 与同组 2 h 亚组比较, $P < 0.01$

3 讨论

谷氨酰胺^[4] 是中性氨基酸, 是肠道的特殊营养素。本文对腹腔注射内毒素后幼鼠的观察证实, 内毒素血症可引起严重胃肠功能障碍, 重者死亡。而在谷氨酰胺干预组, 其发生胃肠功能障碍的时间延迟, 死亡率也有所下降, 这说明谷氨酰胺对减轻胃肠功能障碍及降低死亡率可能有作用。Bcl-2 是调节胃肠道细胞凋亡的一个基因家族^[5]: 其中 Bcl-2 抑制凋亡, Bax 促进凋亡, 本文内毒素组 Bax, Bcl-2 mRNA 表达的比值变化趋势证明, 内毒素血症时肠细胞发生了凋亡。干预的结果显示, 谷氨酰胺使内毒

素血症小肠 Bcl-2 基因表达增强, 明显高于对照组; 同时使内毒素血症造成的明显增加的 Bax 基因表达减弱, 除 2 h 点明显低于正常外, 其余各时间点都接近正常; 使 Bax, Bcl-2 mRNA 表达的比值明显下降, 且明显低于正常。由此可见, 谷氨酰胺可能通过调节小肠中 Bcl-2, Bax 基因的变化抑制细胞凋亡, 从而起到维持肠上皮细胞结构完整的作用。本文还发现, 谷氨酰胺对内毒素血症小肠的保护作用不仅是使内毒素造成的 Bax 表达增强恢复至正常, 而且还使内毒素作用不明显的 Bcl-2 表达明显上调, 结果造成 Bax, Bcl-2 的比值显著低于正常, 从而抑制细胞凋亡, 以对抗内毒素对肠黏膜的损害, 对肠屏障功能起到保护作用。在感染和败血症时, 体内 (下转第 501 页)

(5%),现在 WAS 患者的存活时间已延长至 11 岁以上,部分病人达到 20 岁以上,生活质量明显提高。但 30 岁后发生恶性肿瘤,尤其是淋巴瘤的机会突增,干细胞移植明显改善感染和出血,但对预防恶性肿瘤的发生效果并不满意。

[参 考 文 献]

- [1] Andreu N, Pujol-Moix N, Martinez-Lostao L, Oset M, Muniz-Diaz E, Estivill X, et al. Wiskott-Aldrich syndrome in a female with skewed X-chromosome inactivation [J]. *Blood Cells Mol Dis*, 2003, 31(3): 332-327.
- [2] Sullivan KE. Recent advances in our understanding of Wiskott-Aldrich syndrome[J]. *Curr Opin Hematol*, 1999, 6(1): 8-14.
- [3] 蒋利萍,徐西华,杨锡强,刘恩梅,王莉佳,刘宇隆,等. 两种新型 Wiskott-Aldrich 综合征蛋白基因突变的鉴定[J]. *中华儿科杂志*, 2003, 41(8): 590-593.
- [4] Symons M, Derry JM, Karlak B, Jiang S, Lemahieu V, McCormick F, Francke U, Abo A. Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization[J]. *Cell*, 1996, 84(5): 723-734.
- [5] Kolluri R, Tolias KF, Carpenter CL, Rosen FS, Kirchhausen T. Direct interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with the GTPase CDC42 [J]. *Proc Acad Sci USA*, 1996 (11): 5615-5618.

- [6] 朱敬先,林元珠,王曙霞. Wiskott-Aldrich 综合征 1 例[J]. *中国皮肤性病杂志*, 2004, 18(4): 244-245.
- [7] Saurat JH. Eczema in primary immune-deficiencies. Clues to the pathogenesis of atopic dermatitis with special reference to the Wiskott-Aldrich syndrome[J]. *Acta Derm Venereol Suppl (Stockh)*, 1985, 114: 125-128.
- [8] Schurman SH, Candotti F. Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2003, 15(4): 446-453.
- [9] Ariga T, Nakajima M, Yoshida J, Yamato K, Nagatoshi Y, Yanai F, et al. Confirming or excluding the diagnosis of Wiskott-Aldrich syndrome in children with thrombocytopenia of an unknown etiology[J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2004, 26(7): 435-440.
- [10] Litzman J, Jones A, Hann I, Chapel H, Strobel S, Morgan G. Intravenous immunoglobulin, splenectomy, and antibiotic prophylaxis in Wiskott-Aldrich syndrome[J]. *Arch Dis Child*, 1996, 5(5): 436-439.
- [11] 中华医学会儿科学分会免疫分组. 第六届全国小儿免疫学术研讨会会议纪要[J]. *中华儿科杂志*, 2003, 41(6): 419-421.
- [12] 惠小阳. 长春新碱、免疫球蛋白、甲基强的松龙对伴 WAS 的难治性血小板减少症的长期治疗[J]. *国外医学儿科学分册*, 2000, 27(5): 273-274.
- [13] Wada T, Jagadeesh GJ, Nelson DL, Candotti F. Retrovirus-mediated WASP gene transfer corrects Wiskott-Aldrich syndrome T-cell dysfunction[J]. *Hum Gene Ther* 2002, 13(9): 1039-1046.

(本文编辑:吉耕中)

(上接第 498 页)

各器官对谷氨酰胺的摄取发生变化,肠道摄取谷氨酰胺明显减少^[6],进而使肠上皮的增生和分化减低^[7],抑制肠上皮生长,引起肠黏膜萎缩,破坏肠屏障,造成胃肠功能障碍。有学者认为^[4]补充谷氨酰胺能防止感染引起的并发症。本文从细胞凋亡角度再次证明了谷氨酰胺对内毒素幼年大鼠小肠的有益作用,因此,在小儿严重感染时可使用谷氨酰胺辅助治疗。本文谷氨酰胺组死亡率降低不明显,可能与下列因素有关:①谷氨酰胺不是抗炎药物,不能抑制其他炎症因子的损害作用;②本实验中没有连续使用谷氨酰胺进行治疗以维持稳定的血药浓度,致使药物作用时间短暂,保护作用未能持续。

[参 考 文 献]

- [1] 吴秀清,王虹,孙梅,吕庆杰,周卓. 幼年大鼠内毒素血症时小肠上皮细胞凋亡及 Caspase-3 的表达[J]. *中国当代儿科杂志*, 2005, (2): 167-170.

- [2] Evans ME, Jones DP, Ziegler TR. Glutamine prevents cytokine-induced apoptosis in human colonic epithelial cells[J]. *J Nutr*, 2003, 133(10): 3065-3071.
- [3] Alscher KT, Phang PT, McDonald TE, Walley KR. Enteral feeding decreases gut apoptosis, permeability, and lung inflammation during murine endotoxemia[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2001, 281(2): G569-G576.
- [4] Fürst P. New Developments in Glutamine Delivery[J]. *J Nutr*, 2001, 131(9 Suppl): 2562S-2568S.
- [5] Deng W, Wang DA, Gosmanova E, Johnson LR, Tigyi G. LPA protects intestinal epithelial cells from apoptosis by inhibiting the mitochondrial pathway[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2003, 284(5): G821-G829.
- [6] Karin AM, Pan M, Lin CM, Strange R, Souba WW. Glutamine metabolism in sepsis and infection[J]. *J Nutr*, 2001, 131(9 Suppl): 2535S-2538S.
- [7] Papaconstantinou HT, Chung DH, Zhang W, Ansari NH, Hellmich MR, Townsend CM Jr, et al. Prevention of mucosal atrophy: role of glutamine and caspases in apoptosis in intestinal epithelial cells[J]. *J Gastrointest Surg*, 2000, 4(4): 416-423.

(本文编辑:吉耕中)