

谷氨酰胺对内毒素血症幼鼠肠屏障的保护作用

常晓¹ 王琳琳² 连淑君² 唐清² 陈萍² 王华²

(1. 新乡医学院第一附属医院新生儿科, 河南 卫辉 453100;
2. 广西医科大学第一附属医院儿科, 广西 南宁 530021)

[摘要] **目的** 观察内毒素血症幼鼠经谷氨酰胺(Gln)干预后血浆D-乳酸、血浆及小肠二胺氧化酶(DAO)浓度变化,以探讨Gln对肠屏障功能的干预作用。**方法** 18日龄Wistar大鼠80只,随机分为内毒素血症组、Gln干预组,每组40只,各组根据注射内毒素后取标本时间分为1.5 h、6 h、24 h、72 h和7 d等5个亚组($n=8$)。Gln干预组在注射内毒素后立即予以Gln口服(2 g/kg),随后每天1次。各组分别取血浆及小肠匀浆,测定血浆DAO活性及D-乳酸、小肠匀浆DAO值。**结果** ① Gln干预组6 h、72 h血浆DAO活性明显低于内毒素组($P<0.05$)。② Gln干预组6 h、24 h、72 h及7 d的肠组织DAO活性较内毒素组均明显增高($P<0.05, P<0.01$)。③ Gln干预组6 h、24 h、72 h、7 d血浆D-乳酸含量明显低于内毒素组($P<0.01$)。**结论** Gln能降低内毒素血症大鼠肠道黏膜通透性,从而具有保护肠屏障功能。
[中国当代儿科杂志,2010,12(10):809-811]

[关键词] 谷氨酰胺; D-乳酸; 二胺氧化酶; 内毒素血症; 幼鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)10-0809-03

Effect of oral glutamine on intestinal barrier function in young rats with endotoxemia

CHANG Xiao, WANG Lin-Lin, LIAN Shu-Jun, TANG Qing, CHEN Ping, WANG Hua. Department of Neonatology, First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui, Henan 453100, China (Wang L-L, Email: ull276@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the effect of glutamine on intestinal barrier function by examining the changes of plasma D-lactic levels and diamine oxidase (DAO) levels in plasma and intestinal tissue after glutamine intervention in young rats with endotoxemia. **Methods** Eighty 18-day-old rats were randomly divided into endotoxemia and glutamine intervention groups ($n=40$ each). Endotoxemia was induced by lipopolysaccharide (LPS) injection. Plasma and small intestine homogenate were collected 1.5, 6, 24 and 72 hrs and 7 days after LPS injection. The glutamine intervention group was immediately administered with oral glutamine (2 g/kg) after LPS injection. Afterwards, glutamine was administered once daily. Plasma D-lactic and DAO levels and intestinal DAO levels were measured. **Results** Plasma DAO activity in the glutamine intervention group was significantly lower than that in the endotoxemia group 6 and 72 hrs after LPS injection ($P<0.05$). In contrast, the intestinal DAO activity in the glutamine intervention group was significantly higher than that in the endotoxemia group 6, 24 and 72 hrs and 7 days after LPS injection ($P<0.05$ or 0.01). Plasma D-lactic levels in the glutamine intervention group were significantly lower than those in the endotoxemia group 6, 24 and 72 hrs and 7 days after LPS injection ($P<0.01$). **Conclusions** Glutamine may reduce the permeability of intestinal mucosa, and thus provides protective effects on intestinal barrier function in rats with endotoxemia.

[Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12 (10):809-811]

Key words: Glutamine; D-lactate; Diamine oxidase; Endotoxemia; Young rats

谷氨酰胺(Gln)是机体含量最丰富的氨基酸,危重症,特别是烧伤、创伤、缺血再灌注损伤时,机体对Gln的需求增大,因此需要补充外源性Gln。本实验以内毒素血症幼鼠为研究对象,观察Gln干预后血浆D-乳酸、血浆及小肠组织二胺氧化酶(DAO)浓度的改变情况,以探讨Gln对肠屏障功能的干预

作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

18日龄Wistar大鼠80只(广西医科大学实验

[收稿日期]2010-01-17;[修回日期]2010-05-13
[基金项目] 广西自然科学基金(桂科自0640086)。
[作者简介] 常晓,女,硕士研究生,助教。
[通信作者] 王琳琳,教授。

动物研究中心提供),雌雄不分,体重25~40 g,随机分为内毒素血症组及Gln干预组,每组40只。两组根据注射内毒素后取标本时间分为1.5 h、6 h、24 h、72 h、7 d共5个亚组($n=8$)。

1.2 模型制备及Gln干预

模型制备^[1]:内毒素血症组幼鼠腹腔注射内毒素5 mg/kg,配比浓度为5 mg/mL,用无菌生理盐水稀释。Gln干预组于注射内毒素后即刻灌胃Gln 2 g/kg,以后每日1次,即1.5 h、6 h及24 h亚组得到Gln灌胃1次,72 h亚组灌胃3次,7 d亚组灌胃7次。Gln颗粒由重庆药友制药有限公司生产。注射内毒素后各时间点取血浆及小肠匀浆,分光光度法测定血浆DAO活性及D-乳酸水平、小肠匀浆DAO值。

1.3 血浆及小肠匀浆DAO和血浆D乳酸的测定

1.3.1 血浆及小肠DAO的测定方法 参考文献方法^[2],采用分光光度计法测定,全自动生化分析仪测定小肠总蛋白含量,根据DAO标准曲线求小肠DAO活性(U/mgpro)。DAO标准液以不同浓度值(2.5 mg/mL、5 mg/mL、10 mg/mL、20 mg/mL、40 mg/mL、80 mg/mL)为X,相对光密度值为Y作标准曲线,求回归方程。

1.3.2 血浆D-乳酸测定 参考文献方法^[3-4],采用分光光度计法测定,D-乳酸以不同浓度值(3 mg/L、6 mg/L、9 mg/L、12 mg/L、15 mg/L、18 mg/L)为X,相对光密度值为Y作标准曲线,求回归方程。

1.4 统计学分析

所有数据均采用SPSS 12.0软件包进行统计学处理。D-乳酸、DAO结果用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)

表示,两组间不同时间点比较采用 t 检验。死亡率比较使用卡方检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 幼鼠的行为学改变

内毒素血症组动物注射内毒素后0.5 h出现倦怠、抖动;1.5 h出现腹胀;4~6 h出现腹胀加重、腹泻、口唇紫绀、四肢凉,死亡5只;24 h出现进食减少、活动少、腹胀持续,死亡1只;72 h腹胀减轻、活动少持续、腹泻缓解;7 d恢复正常。内毒素血症组共40只,死亡6只,死亡率15%。Gln干预组动物在内毒素注射2 h出现倦怠,6 h出现腹胀、腹泻,死亡5只。24 h开始恢复,72 h症状、体征消失,无继续死亡。7 d恢复正常。Gln组动物胃肠功能障碍比内毒素血症组出现晚,表现也较内毒素血症组轻。Gln组死亡率为12.5%,比内毒素血症组低,但死亡率差异无统计学意义($\chi^2=0.105, P>0.05$)。

2.2 血浆及小肠组织DAO检测结果

Gln干预6 h、72 h组血浆DAO活性均较内毒素血症组低($P<0.05$),但7 d的血浆DAO活性比内毒素血症组高($P<0.05$)。Gln干预组6 h、24 h、72 h及7 d的肠组织DAO活性较内毒素组明显增高($P<0.05$ 或0.01)(表1,2)。

2.3 血浆D-乳酸活性检测

Gln干预1.5 h、6 h、24 h、72 h、7 d组血浆D-乳酸含量均较内毒素血症组低($P<0.01$)(表3)。

表1 血浆DAO活性 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	1.5 h	6 h	24 h	72 h	7 d
内毒素血症组	8	1.14 ± 0.30	1.38 ± 0.27	1.73 ± 0.25	1.21 ± 0.22	0.67 ± 0.19
Gln干预组	8	0.97 ± 0.17	1.13 ± 0.17	1.50 ± 0.27	0.97 ± 0.12	0.91 ± 0.22
t 值		1.389	2.157	1.764	2.684	-2.338
P 值		0.187	0.049	0.1	0.022	0.035

表2 小肠DAO活性测定 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	1.5 h	6 h	24 h	72 h	7 d
内毒素血症组	8	0.27 ± 0.04	0.24 ± 0.04	0.22 ± 0.04	0.26 ± 0.06	0.28 ± 0.04
Gln干预组	8	0.31 ± 0.05	0.30 ± 0.05	0.28 ± 0.05	0.32 ± 0.03	0.33 ± 0.02
t 值		-1.947	-3.068	-2.062	-2.947	-3.379
P 值		0.072	0.008	0.021	0.015	0.005

表3 血浆D-乳酸活性 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	1.5 h	6 h	24 h	72 h	7 d
内毒素血症组	8	4.13 ± 0.14	4.30 ± 0.13	4.24 ± 0.09	4.31 ± 0.15	4.24 ± 0.05
Gln 干预组	8	3.58 ± 0.45	2.91 ± 0.68	2.77 ± 0.79	2.61 ± 0.44	1.85 ± 0.81
t 值		3.347	5.685	5.228	10.375	8.388
P 值		0.009	0.001	0.001	0.001	0.001

3 讨论

Gln 是体内含量最丰富的非必需氨基酸,约占体内总游离氨基酸的 50%。在体内可以提供氨基和氮,参与合成氨基酸、嘌呤、嘧啶、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD)、氨基甲酰磷酸和尿素等。Gln 同时又为小肠黏膜细胞和其他快速分裂细胞提供能源^[5]。正常人或动物不会发生 Gln 的缺乏,故 Gln 被看作是一种非必需氨基酸。但在严重创伤等应激状态下,血液和组织中的 Gln 浓度可显著下降,出现供给不足。本研究结果显示,Gln 干预组血浆 DAO 在注射内毒素 6 h、72 h 时较内毒素血症组值降低,差异有统计学意义,本研究还显示,Gln 干预组小肠组织 DAO 在 6 h、24 h、72 h、7 d 时较内毒素血症组高,差异有统计学意义。Gln 干预组 7 d 的血浆 DAO 较内毒素血症组高,可能为内毒素血症 7 d 后,肠道经历了损伤最严重的时期,血浆 DAO 值出现下降,从而使 Gln 干预组值相对较高。Gln 干预组在每个观察时间点血浆 D-乳酸则较内毒素血症组降低。

血浆 D-乳酸和 DAO 可以作为肠道损伤的早期指标,监测肠黏膜的屏障功能。以上结果提示,内毒素血症时,Gln 可以降低肠黏膜通透性,增强肠黏膜细胞间的紧密连结,从而减少细菌易位,达到维护肠黏膜屏障功能。而正常肠屏障功能对减少内毒素血症引起的全身炎症反应综合征(SIRS)及多器官功能障碍综合征(MODS)的发生有很重要的意义。Gln 的这种保护作用可能与下列因素有关:① Gln 是小肠代谢的条件必需氨基酸和氧化供能底物^[6],是合成三磷酸腺苷(ATP)、一磷酸腺苷(AMP)等重要能源物质的重要来源;② Gln 是抗氧化物质谷胱甘肽的前体,可促进谷胱甘肽合成,减轻肠黏膜的氧自由基损害^[7];③ Gln 能够抑制肠道黏膜细胞的过度凋亡^[8];④ Gln 可转变为葡萄糖胺,抑制戊糖循环途径,降低细胞内 NADPH (NO 合成过程中一种重要的辅酶)的浓度,从而抑制 NO 的合成^[9];⑤ Gln 可以增强机体免疫功能,调节内源性细胞因

子、炎症介质的产生^[10-11];⑥ Gln 可以改善肠道血供,增加氧摄取率,减轻肠上皮细胞线粒体呼吸功能受抑程度^[12]。

综上所述,Gln 对肠屏障功能具有保护作用,但是其作用机制还需要进一步实验探索。

[参 考 文 献]

[1] 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): G569-576.

[2] 黎君友,于燕,郝军,晋桦,许惠君. 分光光度法测定血和小肠组织二胺氧化酶活性[J]. 氨基酸和生物资源,1996,18(4): 28-30.

[3] 王凤君,赵云,王裴,汪仕良,刘敬,周新. 胰高血糖素样肽-2 对严重烧伤大鼠肠黏膜屏障功能的影响[J]. 世界华人消化杂志,2002,10(7):796-799.

[4] Brandt RB, Siegel SA, Waters MG, Bloch MH. Spectrophotometric assay for D-lactate in plasma[J]. Anal Biochem, 1980, 102(1):39-46.

[5] 狄桂启. 谷胺酰胺的肠道保护作用研究进展[J]. 医学理论与实践,2007, 20(12):1393-1395.

[6] De-Souza DA, Greene LJ. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients: effect of glutamine[J]. Crit Care Med, 2005, 33(5):1125-1135.

[7] 马欣,李玉成. 谷胺酰胺与心肌缺血再灌注损伤[J]. 中国动脉硬化杂志, 2007, 15(11):873-875.

[8] Deniel N, Marion-Letellier R, Charlione R, Tron F, Leprince J, Vaudry H, et al. Glutamine regulates the human epithelial intestinal HCT-8 cell proteome under apoptotic conditions[J]. Mol Cell Proteomics, 2007, 6(10):1671-1679.

[9] Kosenko E, Llansola M, Montoliu C, Monfort P, Rodrigo R, Hernandez-Viadol M, et al. Glutamine synthetase activity and glutamine content in brain: modulation by NMDA receptors and nitric oxide[J]. Neurochem Int, 2003, 43(4-5):493-499.

[10] Yeh SL, Lai YN, Shang HF, Lin MT, Chiu WC, Chen WJ. Effects of glutamine supplementation on splenocyte cytokine mRNA expression in rats with septic peritonitis[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(12):1742-1746.

[11] Kessel A, Toubi E, Pavlotzky E, Mogilner J, Coran AG, Lurie M, et al. Treatment with glutamine is associated with down-regulation of Toll-like receptor-4 and myeloid differentiation factor 88 expression and decrease in intestinal mucosal injury caused by lipopolysaccharide endotoxaemia in a rat[J]. Clin Exp Immunol, 2008, 151(2):341-347.

[12] 吕尚军,彭曦,孙勇,张勇,尤忠义. 不同营养途径给予谷氨酰胺对烧伤大鼠肠上皮细胞线粒体呼吸功能的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(24):2401-2405.

(本文编辑:王庆红)