

谷氨酰胺对肠组织 NF-κB 及 TNF-α 的
调节与肠损伤保护作用的关系

荆科¹ 孙梅²

(1. 中国医科大学附属四院儿科, 辽宁 沈阳 110032;
2. 中国医科大学盛京医院儿科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] **目的** 本研究旨在探讨谷氨酰胺对肠损伤的保护作用是否与调节肠组织核因子-κB (NF-κB) 和肿瘤坏死因子-α (TNF-α) 的分泌有关。**方法** 24 只日龄 10 d 的 Wistar 幼鼠随机分为正常对照组, 内毒素血症组和谷氨酰胺组 ($n=8$)。正常对照组采用生理盐水 1 mL/kg 腹腔注射; 内毒素血症组给予 LPS 5 mg/kg 腹腔注射; 谷氨酰胺组给予力肽 10 mL/kg + LPS 5 mg/kg 腹腔注射。于腹腔注射后 3 h 处死幼鼠, 留取远端回肠组织。行苏木精-伊红染色, 光镜下观察肠组织病理改变, RT-PCR 检测肠组织 NF-κB mRNA 的表达, Western blot 检测肠组织 NF-κB 蛋白表达, ELISA 法检测肠组织匀浆 TNF-α 的含量。**结果** 光镜下对照组肠组织结构正常, 谷氨酰胺组和内毒素血症组均可见间质和上皮细胞水肿, 谷氨酰胺组较内毒素血症组明显减轻; 谷氨酰胺组肠组织 NF-κB mRNA 和 NF-κB 蛋白表达均较内毒素血症组明显下降 (均 $P<0.01$); 谷氨酰胺组肠组织 TNF-α 分泌较内毒素血症组明显减少 ($P<0.01$)。**结论** 谷氨酰胺减轻肠组织损伤的保护作用可能与其下调 NF-κB mRNA 和蛋白的表达, 并降低炎症介质 TNF-α 的分泌相关。

[中国当代儿科杂志, 2011, 13(8): 661-664]

[关键词] 谷氨酰胺; 核因子-κB; 肿瘤坏死因子-α; 肠道; 大鼠

[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2011)08-0661-04

Relationship between the regulation of intestinal NF-κB and TNF-α by glutamine and the protective effects of glutamine against intestinal injury

JING Ke, SUN Mei. Department of Pediatrics, Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, China (Email: jingke3185@sina.com)

Abstract: Objective To study whether the protective effects of glutamine against intestinal injury are associated with the regulation of intestinal secretion of NF-κB and TNF-α by glutamine. **Methods** Twenty-four 10-day-old Wistar rat pups were randomly intraperitoneally injected with normal sodium of 1 mL/kg (control group; $n=8$), LPS of 5 mg/kg (endotoxemia group; $n=8$) or LPS of 5 mg/kg plus glutamine of 10 mL/kg (glutamine group; $n=8$). The rats were sacrificed 3 hrs after injection. A segment of distal ileum was dissected. The pathologic changes of the small intestine were observed under an optical microscope (hematoxylin-eosin staining). The expression of intestinal NF-κB mRNA and protein were detected by RT-PCR and Western blot respectively. The TNF-α level in intestinal tissues was measured using ELISA. **Results** The structure of the small intestine in the control group remained normal. The inflammation cells infiltration and the edema of interstitial substance and epithelials were observed in the endotoxemia and glutamine groups. The pathologic changes in the glutamine group were significantly alleviated when compared with the endotoxemia group. The expression of NF-κB mRNA and protein in the glutamine group was significantly lower than that in the endotoxemia group ($P<0.01$). The secretion of TNF-α in the glutamine group was significantly lower than that in the endotoxemia group ($P<0.01$). **Conclusions** The protective effects of glutamine against intestinal injury may be associated with the down-regulation of intestinal NF-κB mRNA and protein expression and the reduction of the secretion of TNF-α.

[Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(8): 661-664]

Key words: Glutamine; NF-κB; TNF-α; Intestine; Rats

核因子-κB (nuclear factor-κB, NF-κB) 是一种能与多种细胞基因的启动子和增强子中的 κB 序列位点发生特异结合的核转录因子, 为具有多向性调节作用的蛋白质分子, 具有广泛的生物学活性^[1-2]。

[收稿日期] 2010-09-16; [修回日期] 2011-02-10
[作者简介] 荆科, 男, 博士, 副主任医师。

受感染、内毒素等多种因素刺激活化后,参与调控多种因子的基因表达,促进细胞因子、黏附分子、趋化因子等基因转录,在免疫调控、炎症、应激反应及细胞凋亡中起重要作用。NF- κ B 过度活化并导致多种炎症介质的过量表达释放则是引起脓毒症、急性呼吸窘迫综合征以及多器官功能障碍综合征发生的重要机制^[3]。谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 是肠道重要的能源物质,许多研究证实 Gln 能减轻病理状态下肠黏膜的损伤和改善肠黏膜屏障的功能^[4-5]。但 Gln 对肠黏膜的保护作用的机制并不十分清楚。本研究旨在探讨 Gln 对肠组织的保护作用是否可以通过调节 NF- κ B 的表达和降低肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的分泌而实现。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 Wistar 幼鼠 24 只,日龄 10 d,雌雄不限,体重为 15 ~ 25 g,由中国医科大学医学实验动物中心提供。许可证号:SCXK(辽)2003-0009。

1.2 实验试剂

内毒素 (Escherichia coli O₅₅:B₅;脂多糖, lipopolysaccharide, LPS) 购于 Sigma 公司。Trizol 总 RNA 提取试剂购自美国 Promega 公司。RT-PCR 试剂盒、反转录和 PCR 扩增所需要的酶及其他试剂购于大连宝生物工程公司 (日本 TaKaRa 公司)。Western blot 试剂 NF- κ B 兔抗鼠 IgG (一抗) 购于武汉博士德生物工程有限公司,碱性磷酸酶标记的山羊抗兔 IgG (二抗) 购于 Santa Cruz 公司;即用型 SABC 试剂盒及 DAB 显色剂、ELISA 检测 TNF- α 试剂盒均购于武汉博士德生物工程有限公司。PCR 引物根据 Medline 数据库自行设计,由上海英骏生物公司合成。

1.3 分组和模型

将 24 只幼鼠随机分为正常对照组 (NS 组),给予生理盐水 1 mL/kg 腹腔注射;内毒素血症组 (LPS 组),给予 LPS (5 mg/mL) 5 mg/kg 腹腔注射;谷氨酰胺组 (Gln 组),腹腔注射 LPS 5 mg/kg + 力肽 10 mL/kg (力肽,含谷氨酰胺活性成分 13.46 g/100 mL,德国费森尤斯公司生产)^[6]。每组 8 只。于腹腔注射后 3 h 处死,留取距回盲端 0.5 ~ 1 cm 左右回肠组织,于液氮速冻,并转 -70℃ 保存,另取肠组织 4% 甲醛固定,以待检测和分析。

1.4 肠组织病理改变检测

取肠组织 4% 甲醛固定,苏木精-伊红 (HE) 染色,光镜下观察。

1.5 RT-PCR 检测 NF- κ B mRNA 的表达

NF- κ B 引物序列见表 1。

表 1 NF- κ B mRNA 及 β -actin RT-PCR 引物序列

引物名称	引物序列	扩增片断 (bp)
NF- κ B	F: 5'-TGC GAA TGG AGC GAC AGG-3'	243
	R: 5'-AGG CCA AAT GAA AGG AGT GG-3'	
β -actin	F: 5'-CAC CCT GTG CTG CTC ACC GAG GCC-3'	690
	R: 5'-CCA CAC AGA TGA CTT GCG CTC AGG-3'	

按 Trizol 总 RNA 提取试剂说明书进行操作提取总 RNA,并经紫外分光光度计测定,计算提取物 RNA 浓度。并经反转录扩增 cDNA。RT-PCR 检测 NF- κ B mRNA 表达。取 cDNA 3 μ L (1 μ g), 10 $\times$ buffer 2 μ L, MgCl₂ 4 μ L, 10 mmol/L dNTPs 2 μ L, 引物 100 ng, TagDNA 多聚酶 1 U。总体系 20 μ L。循环条件: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 40 s, 退火 1 min (NF- κ B 56℃, β -actin 55℃), 72℃ 延伸 (NF- κ B 60 s, β -actin 90 s), 共 35 个循环, 72℃ 共延伸 7 min。取 PCR 扩增产物 2% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统及分析系统进行条带分析, β -actin 作为内参照标化各组 NF- κ B mRNA 含量。

1.6 Western blot 测定 NF- κ B 蛋白表达

液氮速冻肠组织解冻,裂解液裂解,提取总蛋白,并按改良 Lowry 法测定蛋白含量。取总蛋白 40 μ L, 加 5 $\times$ 样品缓冲液, 100℃ 煮沸 4 min, SDS-PAGE 电泳, 100 V 电压转印至 NC 膜上, 将 NC 膜浸泡在 1 $\times$ TBS 中 10 min, 用 5% 牛血清白蛋白封闭 1 h, 1 $\times$ TTBS 冲洗膜 2 次, 加入 NF- κ B 兔抗大鼠 IgG 抗体, 4℃ 过夜, 次日 1 $\times$ TBS 洗膜 1 次, 1 $\times$ TTBS 冲洗膜 2 次, 将 NC 膜浸泡于碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体溶液中 2 h, 1 $\times$ TBS 冲洗膜 2 次, 显色液显色。用 GIS-2020 型数码凝胶图像分析系统进行吸光度扫描分析, 测定样品灰度值。

1.7 ELISA 检测肠组织匀浆 TNF- α

采用 ELISA 法检测肠组织匀浆 TNF- α 水平, 具体操作方法参照试剂盒说明进行。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件包进行方差分析, 所有数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用 LSD 法检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组肠组织病理改变

HE 染色显示, NS 组肠绒毛完整, 上皮细胞排

列整齐,杯状细胞少见,无异常改变(图 1A);LPS 组给予 LPS 后 3 h 肠组织可见明显异常,绒毛间质可见有充血,少许炎性细胞浸润,水肿明显,肠上皮细

胞排列紊乱,细胞水肿(图 1B);Gln 组间质和上皮细胞水肿较 LPS 组明显减轻,杯状细胞明显增加(图 1C)。

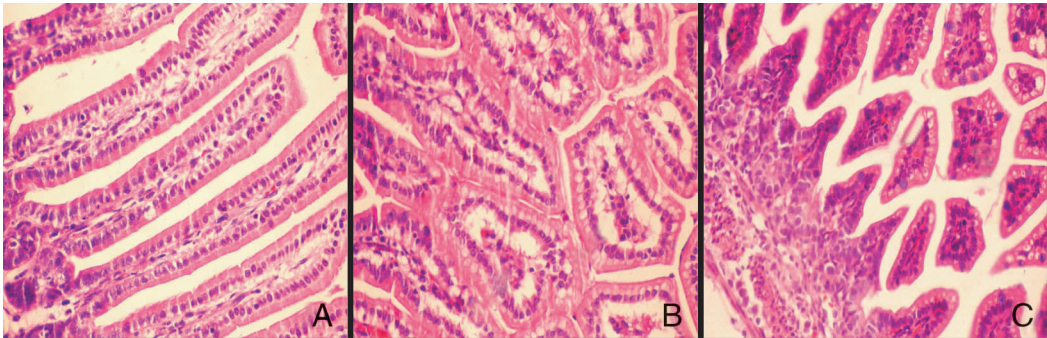


图1 各组肠组织的病理改变(HE, ×400) A: 正常组,肠组织绒毛完整,上皮细胞排列整齐;B: LPS 组,绒毛间质充血,炎性细胞浸润,上皮细胞水肿,排列紊乱;C: Gln 组,间质和上皮细胞水肿较 LPS 组明显减轻。

2.2 各组肠组织 NF-κB mRNA 的表达

3 组 NF-κB mRNA 表达差异有统计学意义 ($F=44.795, P<0.001$),其中 NS 组表达较弱,LPS 组表达明显增高,与 NS 组比较,差异有统计学意义 ($t=1.611, P<0.01$)。Gln 组 NF-κB mRNA 表达较 LPS 组明显下调 ($t=1.856, P<0.01$),与 NS 组比较,差异无统计学意义 ($t=0.245, P>0.05$)。见图 2。

2.3 Western blot 检测肠组织 NF-κB 蛋白表达

3 组 NF-κB 蛋白表达差异有统计学意义 ($F=21354.75, P<0.001$),其中 NS 组表达较弱,LPS 组明显增强,与 NS 组比较,差异有统计学意义 ($t=21.006, P<0.01$)。Gln 组 NF-κB 蛋白表达明显弱于 LPS 组 ($t=15.624, P<0.01$),但仍高于 NS 组 ($t=5.383, P<0.01$)。见图 3。

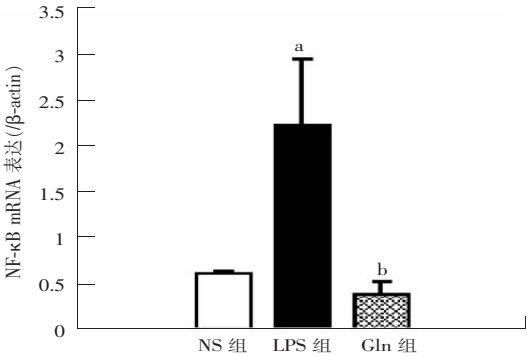
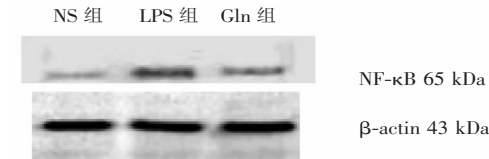
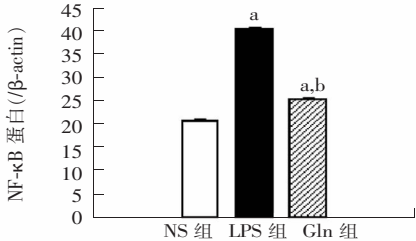


图2 各组肠组织 NF-κB mRNA 表达($n=8$) a:与 NS 组比较, $P<0.01$; b:与 LPS 组比较, $P<0.01$ 。



肠组织 NF-κB 蛋白表达(Western blot)



肠组织 NF-κB 蛋白表达 a:与 NS 组比较, $P<0.01$; b:与 LPS 组比较, $P<0.01$ 。

图3 各组肠组织 NF-κB(P65) 蛋白表达($n=8$)

2.4 肠组织 TNF-α 水平

3 组肠组织中 TNF-α 表达差异有统计学意义 ($F=13.129, P<0.001$),其中 LPS 组肠组织 TNF-α 水平较 NS 组明显增高 ($t=144.223, P<0.01$);Gln

组 TNF-α 水平较 LPS 组明显降低 ($t=160.471, P<0.01$)。Gln 组与 NS 组比较差异无统计学意义 ($t=16.249, P>0.05$)。见图 4。

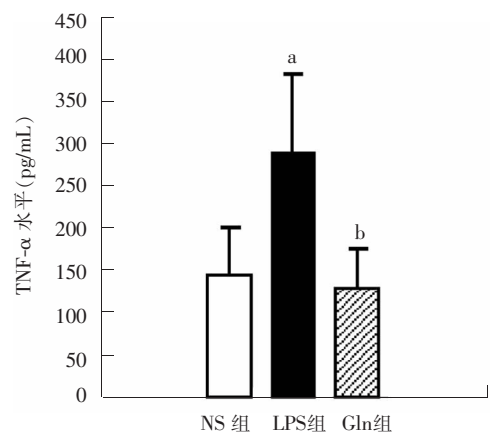


图4 各组肠组织 TNF-α 水平 (n = 8) a: 与 NS 组比较, P < 0.01; b: 与 LPS 组比较, P < 0.01

3 讨论

感染是儿科常见病之一,其危重症常伴发胃肠功能障碍,胃肠功能障碍常常被认为是多器官功能衰竭的始发因子^[7],发病机制与 LPS 和肠黏膜屏障功能密切相关,当肠黏膜的屏障功能破坏,肠道内细菌及毒素大量入血及组织中,引起内毒素血症,内毒素血症又可促进细胞因子、炎性介质的释放,加重肠黏膜屏障的损坏,加速危重症的发展过程,因此胃肠功能障碍是导致全身炎症反应综合征和多器官功能衰竭的重要因素之一^[8-9]。Gln 被认为是一种条件必需氨基酸,是体内含量最为丰富的氨基酸,是快速分裂细胞如黏膜上皮细胞、淋巴细胞等的主要能源物质,是许多生物活性物质如核苷酸等的前质。有资料表明对于重症感染的病人,在全胃肠外营养中给予 Gln 营养支持后,可减轻肠黏膜的损伤和改善肠黏膜的屏障功能,肠源性细菌易位的发生率明显下降,使多脏器功能障碍综合征得到明显改善^[10-11]。以往的实验对 Gln 的作用多集中在营养支持方面的作用,对 Gln 能减轻肠损伤的机理并没有清楚的阐述。本研究显示对内毒素血症幼鼠给予 Gln 能明显下调 NF-κB mRNA 和蛋白的表达,同时肠组织 TNF-α 水平也同步下降,肠黏膜损伤明显减轻。有研究表明,在体内 LPS 形成 LPS-LBP-CD14 复合物后与 TLR(Toll 样受体,Toll-like receptor)4 结合的亲和力明显增强,并使 TLR4 激活,通过信号转导作用,激活 NF-κB,NF-κB 激活并向核内移位,促

进促炎介质合成和释放,如 TNF-α 释放明显增加,导致肠组织损伤,使肠黏膜结构破坏和屏障功能降低,导致细菌移位,并可导致肠源性内毒素血症,诱发多器官功能衰竭^[12]。本研究表明 Gln 对 NF-κB 的表达有明显的下调作用,并减少了 TNF-α 的分泌,减轻肠组织的病理损伤。提示 Gln 可能阻抑了某些信号的转导,使信号转导不能传导到细胞内,NF-κB 不能被激活,因而炎症介质的合成释放受到抑制,使肠黏膜免遭损伤。因此,本研究结果提示 Gln 阻抑 NF-κB 的激活,减少炎症介质的释放,可能是其减轻肠黏膜损伤,保护肠屏障功能的主要作用之一。

[参 考 文 献]

[1] 林青,朱玲. NF2κB/IκB 信号通路在基因调控中作用的研究进展[J]. 国际检验医学杂志,2007,28(6):539-542.

[2] 张方,李子玲,施毅,赵明,辛晓峰,钱桂生. LPS 致大鼠肺泡巨噬细胞 NF-κB 促进 TNF-α 分泌[J]. 中国病理生理杂志,2007,23(7):1412-1414.

[3] Ritchie MH, Fillmore RA, Lausch RN, Oakes JE. A role for NF-kappaB bindingmotifs in the differential induction of chemokine gene expression in human corneal epithelial cells[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45 (7): 2299-2305.

[4] 吴秀清,舒林华,孙梅,王虹,高红. 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[J]. 中国当代儿科杂志,2006,8(6):496-498.

[5] 常晓,王琳琳,连淑君,唐清,陈萍,王华. 谷氨酰胺对内毒素血症幼鼠肠屏障的保护作用[J]. 中国当代儿科杂志,2010,12(10):809-811.

[6] 李军,许玲芬,孙梅. 谷氨酰胺对内毒素血症诱导幼鼠肠损伤的保护作用[J]. 中国优生与遗传杂志,2006,14(3):30-32.

[7] Deitch EA. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure[J]. Arch Surg, 1990, 125(3):403-404.

[8] Soderholm JD, Perdue MH. Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2001, 280(1):G7-G13.

[9] 王茂贵. 小儿胃肠道特点、黏膜屏障与胃肠功能障碍[J]. 中国实用儿科杂志,2001,14(1):2-5.

[10] Ardawi MS. Effects of epidermal growth factor and glutamine-supplemented parenteral nutrition on the small bowel of septic rats[J]. Clin Sci, 1992, 82(5):573-580.

[11] Noguchi Y, James JH, Fischer JE, Hasselgren PO. Increased glutamine consumption in small intestinal epithelial cells during sepsis in rats[J]. Am J Surg, 1997, 173(3):199-205.

[12] da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopoly-saccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex transfer from CD14 to TLR4 and MD-2[J]. J Biol Chem, 2001, 276(24):21129-21134.

(本文编辑:王霞)