

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2019.01.016

论著·实验研究

谷氨酰胺强化肠内营养对炎症性肠病幼鼠模型 结肠黏膜细胞凋亡作用的研究

赵红梅 欧阳红娟 刘莉 段佳琪 游洁玉

(湖南省儿童医院消化内科, 湖南 长沙 410007)

[摘要] **目的** 探讨谷氨酰胺强化肠内营养对炎症性肠病(IBD)幼鼠模型肠黏膜细胞凋亡的调控及促进黏膜愈合的作用。**方法** 将80只4~5周龄Sprague-Dawley雄性大鼠随机分为空白对照组、IBD模型组、短肽组和短肽+谷氨酰胺(Gln)组, 每组20只。采用一次性结肠灌注三硝基苯磺酸建立IBD模型, 造模3 d后, 短肽组给予短肽制剂(100 mL/kg), 短肽+Gln组给予短肽制剂(100 mL/kg)+Gln(0.5 g/kg), 干预1周。实验结束后观察幼鼠的一般情况, 并留取肠黏膜, 苏木素-伊红(HE)染色观察肠黏膜组织病理情况; RT-PCR法检测肠黏膜凋亡调控基因(bax、bcl-2)及凋亡信号转导因子(Caspase-3、Caspase-9)的表达; Western blot法检测结肠黏膜IGF-1表达水平。**结果** IBD模型组一般情况均较其他组差, 短肽+Gln组一般情况优于IBD模型组和短肽组。模型组bax mRNA表达水平高于空白对照组、短肽组和短肽+Gln组($P<0.05$); bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 mRNA水平在各组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。短肽组IGF-1水平明显高于短肽+Gln组、空白对照组及IBD模型组($P<0.05$)。**结论** Gln强化肠内营养能有效改善IBD模型幼鼠的一般营养状况, 但在抑制结肠黏膜细胞凋亡及刺激结肠黏膜IGF-1合成方面并未优于专一肠内营养。

[中国当代儿科杂志, 2019, 21(1): 89-93]

[关键词] 炎症性肠病; 肠内营养; 谷氨酰胺; 细胞凋亡; 大鼠

Effect of glutamine-supplemented enteral nutrition on the apoptosis of colonic mucosal cells in young rats with inflammatory bowel disease

ZHAO Hong-Mei, OUYANG Hong-Juan, LIU Li, DUAN Jia-Qi, YOU Jie-Yu. Department of Gastroenterology, Hunan Children's Hospital, Changsha 410007, China (You J-Y, Email: yjy660111@sina.com)

Abstract: Objective To study the effect of glutamine-supplemented enteral nutrition in regulating the apoptosis of intestinal mucosal cells and promoting mucosal healing in young rats with inflammatory bowel disease (IBD). **Methods** A total of 80 male Sprague-Dawley rats aged 4-5 weeks were randomly divided into 4 groups: blank control, IBD model, short peptide, and short peptide+glutamine ($n=20$ each). The IBD model was prepared by a single colon perfusion of 3-nitrobenzene sulfonic acid. At 3 days after modeling, the rats in the short peptide group were fed with short peptide formula (100 mL/kg), and those in the short peptide+glutamine group were fed with short peptide formula (100 mL/kg) and glutamine (0.5 g/kg). The course of intervention was 1 week. General conditions were observed after the experiment and their intestinal mucosal tissue was obtained. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pathological change of the intestinal mucosa. RT-PCR was used to measure the expression of apoptosis-regulating genes (bax and bcl-2) and apoptotic signal transduction factors (Caspase-3 and Caspase-9) in the intestinal mucosa. Western blot was used to measure the expression of insulin-like growth factor-1 (IGF-1) in the colonic mucosa. **Results** The IBD model group had poorer general conditions than the other three groups (blank control, short peptide and short peptide+glutamine), and the short peptide+glutamine group had better general conditions than the IBD model and short peptide groups. The IBD model group had significantly higher mRNA expression of bax than the other three groups ($P<0.05$). There was no significant difference in the mRNA expression of bcl-2, Caspase-3 and Caspase-9 among the 4 groups ($P>0.05$). The short peptide

[收稿日期] 2018-07-09; [接受日期] 2018-12-12

[基金项目] 湖南省卫计委课题(2016B040)。

[作者简介] 赵红梅, 女, 硕士, 副主任医师。

[通信作者] 游洁玉, 女, 主任医师。Email: yjy660111@sina.com。

group had a significantly higher level of IGF-1 than the short peptide+glutamine, blank control and IBD model groups ($P<0.05$). **Conclusions** Glutamine-supplemented enteral nutrition can effectively improve the general nutritional status of young rats with IBD, but it is not better than exclusive enteral nutrition in inhibiting the apoptosis of colonic mucosal cells and stimulating the synthesis of IGF-1 in the intestinal mucosa. [Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(1): 89-93]

Key words: Inflammatory bowel disease; Enteral nutrition; Glutamine; Apoptosis; Rats

炎症性肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一种反复发作的以肠道黏膜破坏为主的消化道非特异性免疫性疾病, 病因复杂、疗效欠佳, 严重影响患儿的生活质量^[1]。虽然近年来, 国内外专家认为专一肠内营养在儿童轻中度 IBD 中有诱导活动期缓解的作用, 但维持缓解及促进黏膜愈合的作用尚不明确^[2]。Fujita 等^[3]研究认为添加谷氨酰胺 (Gln) 强化肠内营养对溃疡性结肠炎动物模型的肠道黏膜修复可能具有一定的作用。因此, 探讨添加 Gln 强化肠内营养是否能促进 IBD 患儿肠黏膜愈合更具临床意义。由于肠道炎症的发生与肠道黏膜细胞过度凋亡密切相关, 目前, 公认影响肠道黏膜凋亡的基因有 bcl-2、bax, 凋亡信号转导因子有 Caspase-3、9 等, 且众多研究表明, 胰岛素样生长因子 -1 (IGF-1) 与胃肠黏膜细胞酪氨酸激酶受体结合, 能促进肠黏膜细胞生长和增殖, 保护肠黏膜的屏障功能^[4]。故本研究拟通过探讨上述凋亡基因、凋亡信号转导因子及 IGF-1 在各组间的表达变化, 进一步明确 Gln 强化肠内营养对 IBD 幼鼠模型影响的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

短肽制剂 (纽迪希亚公司, 荷兰), 谷氨酰胺 (Gln) 颗粒 (海南海神通州制药有限公司), 三硝基苯磺酸 (TNBS) (广州蓝光生物技术有限公司), BRU 抗体、SABC (小鼠) 试剂盒及 DAB 显色试剂盒 (黄) (广州威佳科技有限公司), 尿粪隐血测试盒 (联苯胺法) 及 Anti-IGF-1 抗体 51088 (广州安邦生物科技有限公司), TRIzol (广州恩轲医药科技有限公司), PCR 引物序列 (上海生工生物工程技术有限公司)。

1.2 动物建模及分组

80 只 4~5 周龄 Sprague-Dawley (SD) 雄性大鼠, 体重 50~100 g, 购自广东省医学实验动物中心。依照随机数字表法随机分为空白对照组、IBD 模

型组、短肽组、短肽 +Gln 组, 每组 20 只。IBD 模型制备参考文献^[5], 大鼠禁食 24 h 后按 100 mg/kg 一次性结肠灌注 TNBS 乙醇 (50%) 溶液 0.5 mL。24 h 后小鼠即可能出现厌食、少动、腹泻、黏液血便等症状, 2~3 d 后出现急性结肠炎病理改变。病理显示病变部位以结肠为主, 可累及小肠, 肉眼见肠腔扩张, 与周围黏连, 黏膜水肿、溃疡, 有点状和片状出血; 镜下可见溃疡和炎性渗出物, 炎症累及肠壁全层, 伴肉芽肿形成, 病理改变与人类克罗恩病相似。空白对照组给予同剂量生理盐水灌肠。造模后 3 d 开始, 短肽组每日分两次给予短肽制剂 (100 mL/kg), 干预 1 周; 短肽 +Gln 组每日分两次给予短肽 (100 mL/kg) +Gln (0.5 g/kg) 混合液, 干预 1 周。每天记录饮食、体重、大便情况及毛色。7 d 后依次将大鼠处死后留取结肠、小肠组织标本, 肉眼观察结肠黏膜的大体情况, 即结构是否完整、黏膜表面有无异常物质。并取结肠远、中、近不同节段的组织进行固定、切片、苏木素-伊红 (HE) 染色。

1.3 RT-PCR 法检测 bcl-2、bax 及 Caspase-3、9 mRNA 的表达水平

每组取 10 只大鼠结肠黏膜组织进行 RT-PCR 检测。按照 TRIzol 法对收集的组织样本进行总 RNA 的提取。紫外分光光度计法检测总 RNA 样本的纯度和浓度。按照 Takara 反转录试剂盒方法将总 RNA 中的 mRNA 反转录成 cDNA。cDNA 样本按 10 倍稀释后作为荧光定量 PCR 的模板。bcl-2 上游引物: 5'-CCACCTGTGGTCCATCTGAC-3', 下游引物: 5'-GGTGCAGCTGACTGGACATC-3', 片段长度: 94 bp; Bax 上游引物: 5'-GGAGATGAACTGGACAGCAATATGG-3', 下游引物: 5'-TAGCAAAGTAGAAGAGGGCAACCA-3', 片段长度: 154 bp; Caspase-3 上游引物: 5'-GGTGGAGGCTGACTTCCTGT-3', 下游引物: 5'-GCGCGTACAGCTTCAGCAT-3', 片段长度: 119 bp; Caspase-9 上游引物: 5'-ATTGAGCAGGCAGGATCTGG-3', 下游引物: 5'-TGGCCTGTGTCC-TCTAAGCA-3', 片段长度: 119 bp。冰上配制

10 μ L 反应体系: 2 $\times$ PowerUp SYBR Green 5 μ L, 上下游引物各 0.3 μ L, Template cDNA 2 μ L, ddH₂O 2.4 μ L。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 55 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min, 16 $^{\circ}$ C hold; 最后 10 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法分析目的基因的相对表达水平。

1.4 Western blot 检测结肠黏膜 IGF-1 表达水平

每组取 10 只大鼠结肠黏膜组织进行 Western blot 检测。取冻存的新鲜肠黏膜组织 200 mg, 在液氮预冷的研钵中研碎, 加入组织细胞裂解液(含蛋白酶抑制剂), 冰上放置 20 min, 13000 r/min 低温下离心 15 min, 取上清。用 Bradford 法进行蛋白定量后分装, 放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱保存。采用免疫印迹法测定总蛋白中 IGF-1 含量, 首先 SDS-PAGE 进行蛋白分离, 再低温下(4 $^{\circ}$ C)转移到 PDVF 膜上进行免疫杂交, 用 50 g/L 牛奶封闭液封闭非特异性抗原位点, PBST 清洗后, 滴加兔抗鼠 IGF-1 多克隆抗体(稀释比 1:500, 北京四正柏生物科技有限公司)一抗溶液 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 然后加入山羊抗兔 IgG H&L (HRP) (稀释比 1:5000, 英国 Abcam 公司)二抗溶液孵育 1~2 h, 用 ECL 化学发光法显色并测定分析。经 Alphamager 2200 分析软件分析, 计算出 IGF-1 的相对表达水平, 结果以 IGF-1/GADPH 灰度比值表示。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计学分析, 计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物存活情况及干预后的一般情况

模型组于第 3 天和第 4 天死亡 3 只, 其余组幼鼠模型均成活。空白对照组进食量平均每天 114 g, 总体重平均增长 96.8 g, 大便质硬, 毛发有光泽, 肠段有弹性, 肠黏膜光滑。IBD 模型组平均每天进食 36 g, 平均体重增长 18.2 g, 持续黏液血便, 毛发无光泽, 肠段易断裂, 肠黏膜有破损。短肽组平均每天进食 66 g, 平均体重增长 30.4 g, 4~5 d 半稀便, 6~7 d 逐渐成形, 毛发部分无光泽, 肠黏膜有破损、质脆; 短肽 + Gln 组平均每天进食

72 g, 平均体重增长 37.7 g, 3 d 后大便为成形软便, 毛发大部分有光泽, 肠黏膜出现较多透明无内含物的片段, 肉眼观察其壁较薄。

2.2 干预 1 周后各组结肠黏膜的组织病理学变化

空白对照组结肠黏膜细胞完整; IBD 模型组可见炎性细胞浸润, 腺体破坏; 短肽组可见炎性细胞浸润, 腺体散在破坏; 短肽 + Gln 组结肠黏膜表面可见透明物质, 散在炎性细胞浸润, 腺体少许破坏, 毛细血管增生。见图 1。

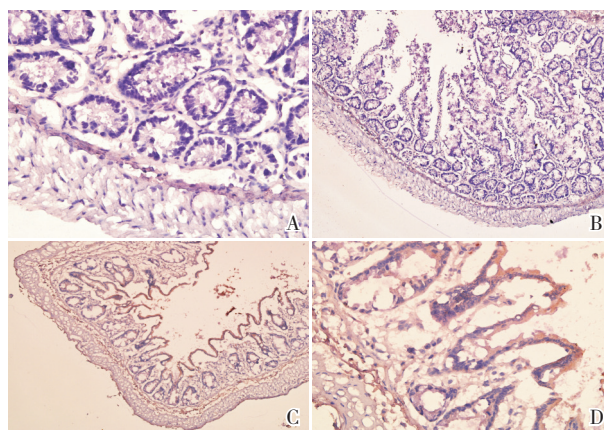


图1 不同组别干预1周后肠黏膜组织病理学改变

A: 空白对照组结肠黏膜细胞完整; B: IBD 模型组炎性细胞浸润, 腺体破坏; C: 短肽组炎性细胞浸润, 腺体散在破坏; D: 短肽 + Gln 组散在炎性细胞浸润, 腺体少许破坏, 毛细血管增生。

2.3 各组结肠黏膜凋亡调控基因及信号转导因子的表达

凋亡调控基因 bax mRNA 在 IBD 模型组表达水平高于空白对照组、短肽组和短肽 + Gln 组 ($P < 0.05$)。另一凋亡调控基因 bcl-2 及信号转导因子 Caspase-9、Caspase-3 mRNA 在 IBD 模型组高水平表达, 而在短肽组及短肽 + Gln 组表达稍低, 但差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.4 各组结肠黏膜 IGF-1 表达变化

用 Western blot 方法检测各组结肠黏膜 IGF-1 相对表达水平, 其中 IBD 模型组为 1.1 ± 0.6 , 空白对照组为 1.2 ± 0.6 , 短肽 + Gln 组为 1.3 ± 0.6 , 短肽组为 2.1 ± 0.4 。各组 IGF-1 相对表达水平比较差异有统计学意义 ($F = 5.130, P = 0.014$), 其中短肽组明显高于短肽 + Gln 组、空白对照组及 IBD 模型组 ($P < 0.05$)。见图 2。

表1 不同组别结肠凋亡调控基因及信号转导因子表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	bax mRNA	Caspase-3 mRNA	bcl-2 mRNA	Caspase-9 mRNA
空白对照组	10	1.02 ± 0.23	1.01 ± 0.15	1.15 ± 0.31	1.02 ± 0.23
IBD 模型组	10	1.65 ± 0.19 ^a	1.21 ± 0.61	1.89 ± 0.12	1.23 ± 0.28
短肽组	10	0.82 ± 0.28 ^b	0.71 ± 0.39	1.36 ± 0.53	0.66 ± 0.36
短肽 +Gln 组	10	0.56 ± 0.16 ^b	0.76 ± 0.27	0.94 ± 0.61	0.96 ± 0.23
F 值		4.649	1.909	0.220	1.894
P 值		0.015	0.166	0.882	0.169

注: a 示与空白对照组比较, $P < 0.05$; b 示与 IBD 模型组比较, $P < 0.05$ 。

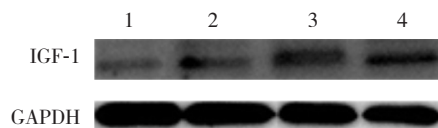


图2 Western blot 法检测各组结肠黏膜 IGF-1 表达
1: IBD 模型组; 2: 空白对照组; 3: 短肽 +Gln 组; 4: 短肽组。

3 讨论

动物实验研究的基本保障是获得满意模型, 本研究通过预实验获得了造模经验, 大大提高了动物模型成功率。尽管 IBD 动物模型的研究已近 1 个多世纪的历史, 但目前仍未得到十分理想的 IBD 动物模型, 不同的制作方法、不同的动物可制作出不同的动物模型, 这本身也说明了 IBD 病因的多样性和发病机制的复杂性。有学者认为化学药物如 TNBS 诱导的 IBD 动物模型制作相对简单、成本低, 在 IBD 的实验研究中应用最广泛, 且由 TNBS 诱导的结肠炎动物模型主要是 Th1 细胞介导的反应, 与人类克罗恩病十分相似^[6], 故本研究选择了此方法进行造模。但对于幼鼠造模的难度相对较大, 容易死亡, 精确计算好药物剂量, 选择合适的灌肠管径, 操作轻柔是保证造模成功, 减少幼鼠死亡的关键步骤。因此, 建议动物模型的建立必须进行预实验探索研究对象的特性才能保证理想模型的获得。

营养状态的改善是 IBD 疗效评价的重要指标之一。Akobeng 等^[7]认为肠内营养治疗对儿童 IBD 的安全性及有效性尚存争议。本组实验通过 Gln 强化肠内营养干预 IBD 幼鼠模型, 与其他组进行比较, 结果发现 Gln 干预组幼鼠毛发光泽度好, 体重增长较快, 解剖后观察肠道黏膜溃疡面浅, 表面有透明物质覆盖, 明显改善了该组幼鼠的营养状态, 本组中无 1 例幼鼠模型死亡, 说明该方

案安全可靠。因此, 可认为 Gln 强化肠内营养在 IBD 治疗中能改善营养状态及体重数据, 且安全可靠, 与 Fujita 等^[3]报道一致。

诱导炎症活动期缓解是 IBD 患儿治疗的初级目标, 本研究通过 Gln 强化肠内营养对凋亡调控基因及相关因子表达的影响, 减轻了肠道的炎症反应, 达到了诱导缓解的目的。IBD 炎症活动期常表现为肠黏膜细胞的凋亡过度, Bcl-2 和 Bax 是公认的凋亡调控基因, Caspase-9、Caspase-3 是凋亡信号转导因子^[8]。本研究通过 Gln 强化肠内营养对肠道黏膜凋亡调控基因及信号转导因子的影响来观察活动期炎症的控制效果从而诱导缓解。通过 1 周干预后, IBD 模型组细胞凋亡调控基因和信号转导因子表达水平显著高于其他模型组, 提示 IBD 模型组肠道黏膜细胞凋亡活动活跃, 仍处于炎症活动期; 而 Gln+ 短肽组 bax 的表达量明显低于短肽组、IBD 模型组及空白对照组, 提示凋亡受抑, 在 Caspase-9、Caspase-3 的表达也存在一定差异, 提示 Gln 强化的肠内营养在抑制肠道细胞凋亡诱导炎症活动期缓解有显著作用。与崔培林等^[9]报道的 Gln 在急性重症胰腺炎导致的肠黏膜受损患者中能有效抑制肠黏膜细胞的凋亡作用机制相似。

黏膜愈合是 IBD 治疗的终极目标。本研究发现, 单一肠内营养和 Gln 强化肠内营养都能通过上调 IGF-1 而达到促进肠道黏膜愈合的目的。IGF-1 属于胰岛素样生长因子家族^[10], 众多研究表明, IGF-1 与胃肠黏膜细胞酪氨酸激酶受体结合, 促进肠黏膜细胞生长和增殖, 维护肠绒毛的高度及肠神经的发育, 保护肠黏膜的屏障功能^[4]。曾有学者认为 Gln 能有效促进肠道黏膜的修复, 尤其是对缺血性肠黏膜损伤修复作用显著^[11], 另有学者通过急性胰腺炎动物模型实验证实 Gln 是通过上调 IGF-1 高表达而达到修复损伤黏膜及维护肠道屏

障功能^[8]。本组研究显示 IGF-1 在短肽组及短肽 + Gln 组的表达水平均高于其他组,通过大体标本观察肠黏膜的修复显著好于对照组,提示单一肠内营养及短肽 + Gln 强化的肠内营养制剂都能显著上调 IGF-1 的表达发挥肠黏膜修复及屏障功能维护的作用,与前两位学者的结论一致。

综上所述, Gln 强化肠内营养对 IBD 幼鼠模型有促进体重增长及维持营养状态的积极作用,对肠道黏膜细胞凋亡的抑制及上调 IGF-1 高表达方面也表现出了较强优势。故认为 Gln 强化肠内营养在 IBD 的治疗中是安全有效的,而且在诱导急性期缓解及促进肠道黏膜愈合方面更具优势。

[参 考 文 献]

- [1] 游洁玉. 极早发型炎症性肠病的特点与治疗[J]. 中国当代儿科杂志, 2018, 20(5): 341-345.
- [2] Sairenji T, Collins KL, Evans DV. An update on inflammatory bowel disease[J]. Prim Care, 2017, 44(4): 673-692.
- [3] Fujita T, Sakurai K. Efficacy of glutamine-enriched enteral nutrition in an experimental model of mucosal ulcerative colitis[J]. Br J Surg, 2005, 82(6): 749-751.
- [4] Guan J, Harris P, Brimble M, et al. The role for IGF-1-derived small neuropeptides as a therapeutic target for neurological disorders[J]. Expert Opin Ther Targets, 2015, 19(6): 785-793.
- [5] Morris GP, Beck PL, Herridge MS, et al. Hapten induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon[J]. Gastroenterology, 1989, 96(3): 795-811.
- [6] Oh SY, Cho KA, Kang JL, et al. Comparison of experimental mouse models of inflammatory bowel disease[J]. Int J Mol Med, 2014, 33(2): 333-340.
- [7] Akobeng AK, Elawad M, Gordon M. Glutamine for induction of remission in Crohn's disease[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2016, 8(2): CD007348.
- [8] Han T, Li XL, Cai DL, et al. Effects of glutamine-supplemented enteral or parenteral nutrition on apoptosis of intestinal mucosal cells in rats with severe acute pancreatitis[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2013, 17(11): 1529-1535.
- [9] 崔培林, 吕栋, 王燕斌, 等. 谷氨酰胺对急性胰腺炎大鼠肠黏膜胰岛素样生长因子表达及肠黏膜屏障的影响[J]. 山东医药, 2014, 54(1): 14-17.
- [10] Frater J, Lie D, Bartlett P, et al. Insulin-like growth factor 1(IGF-1) as a marker of cognitive decline in normal ageing: a review[J]. Ageing Res Rev, 2017, 9(42): 14-27.
- [11] Xue H, Sufit AJ, Wischmeyer PE. Glutamine therapy improves outcome of in vitro and in vivo experimental colitis models[J]. Parenter Enteral Nutr, 2011, 35(2): 188-197.

(本文编辑: 万静)