

论著·实验研究

# 谷氨酰胺对内毒素血症幼年大鼠肾脏 ERK 以及 p38 表达的影响

周萍<sup>1</sup>, 吴玉斌<sup>1</sup>, 赵成广<sup>1</sup>, 滕旭<sup>2</sup>, 李丽<sup>1</sup>, 李冰<sup>3</sup>

(1. 中国医科大学附属盛京医院儿科, 辽宁 沈阳 110004; 2. 辽宁中医药大学附属医院儿科, 辽宁 沈阳 110032;  
3. 哈尔滨医科大学附属第二医院儿科, 黑龙江 哈尔滨 150086)

**[摘要]** 目的 通过观察谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 对内毒素血症幼年大鼠肾脏信号转导通路 ERK-2、p38 及其 mRNA 表达的影响, 探讨谷氨酰胺在大鼠内毒素血症中通过干预肾脏 ERK-2 以及 p38 信号转导途径来保护肾脏的机制。方法 选健康 18 日龄 Wistar 大鼠 121 只, 按腹腔注射药物不同分为: 0 h 对照组 (生理盐水,  $n = 11$ ), 内毒素组 (LPS,  $n = 55$ ), 谷氨酰胺组 (Gln,  $n = 55$ ); 后两组又分为 2, 4, 6, 24 及 72 h 共 5 个时间点, 每个时间点 11 只, 在各指定时间点分别将大鼠断头分离肾脏, 8 只用逆转录-聚合酶链反应 (RT-PCR) 方法测定 ERK-2 以及 p38 的 mRNA 的表达, 另 3 只取肾脏组织后用甲醛固定, 制成石蜡切片, 用免疫组化方法确定 ERK-2 以及 p38 蛋白质的表达。结果 LPS 组各时点 ERK-2 mRNA, p38MAPK mRNA, ERK-2, p38MAPK 表达均较对照组增强, 最高点在 6 h, 差异有显著性,  $P < 0.01$ ; Gln 组各时点 ERK-2 mRNA, p38MAPK mRNA, ERK-2, p38MAPK 表达趋势与 LPS 组一致, 但明显低于 LPS 组,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ 。结论 ERK 及 p38 在内毒素血症表达均明显增强。谷氨酰胺可使其表达下调, 从而减轻肾脏损伤。

[中国当代儿科杂志, 2009, 11(4):301-305]

**[关键词]** 内毒素血症; 谷氨酰胺; ERK-2; p38; 大鼠

**[中图分类号]** R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2009)04-0301-05

## Effects of glutamine on extracellular signal regulated kinase and p38MAPK expression in the kidney in young rats with endotoxemia

ZHOU Ping, WU Yu-Bin, ZHAO Cheng-Guang, TENG Xu, LI Li, LI Bing. Department of Pediatrics, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China (Wu Y-B, Email: wuyb1997@yahoo.com.cn)

**Abstract: Objective** Glutamine has protective effects against renal injuries. This study was designed to explore the possible mechanism underlying the protections by examining the effects of glutamine on extracellular signal regulated kinase (ERK) and p38MAPK expression in the kidney in rats with endotoxemia. **Methods** One hundred and twenty-one 18-day-old Wistar rats were randomly injected with LPS (4 mg/kg;  $n = 55$ ), LPS (4 mg/kg) + glutamine (1 mL/kg) ( $n = 55$ ), or normal saline (control group;  $n = 11$ ). The two LPS groups were subdivided into five groups sacrificed at 2, 4, 6, 24 and 72 hrs after administration ( $n = 11$  each). ERK-2 and p38MAPK mRNA and protein expression in the kidney were measured by RT-PCR and immunohistochemistry. **Results** Compared to the control group, the mRNA and protein expression of both ERK-2 and p38MAPK in the LPS group significantly increased 2, 4, 6, 24 and 72 hrs after administration ( $P < 0.01$ ), and reached a peak at 6 hrs ( $P < 0.01$ ). In the LPS + glutamine group, the trend of ERK-2 and p38MAPK expression was similar to the LPS group but their expressional levels were significantly lower than those in the LPS group at all time points ( $P < 0.05$  or  $0.01$ ). **Conclusions** Both ERK-2 and p38MAPK expression increased in young rats with LPS-induced endotoxemia. Glutamine alleviates renal injuries possibly by decreasing the expression of both.

[Chin J Contemp Pediatr, 2009, 11(4):301-305]

**Key words:** Endotoxemia; Glutamine; Extracellular signal regulated kinase; p38MAPK; Rats

内毒素血症是儿科重症感染导致多器官功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) 最常见原因之一, 多脏器受累时一旦伴有肾功能障碍甚至衰竭时, 则难以救治, 死亡率甚高。肾

脏细胞的增殖和凋亡需要丝分裂蛋白激酶 (MAPK) 信号转导系统的参与, 细胞外信号调节激酶 (ERK) 和 p38 是 MAPK 信号转导系统中比较重要的两个, 国内有报道在肾脏病人中, ERK 和 p38 的升高与降

[收稿日期] 2008-07-24; [修回日期] 2008-09-03

[基金项目] 教育部科学技术研究重点项目基金资助课题 (项目编号: 03031); 辽宁省自然科学基金资助项目 (20052087)。

[作者简介] 周萍, 女, 博士研究生, 主治医师。主攻方向: 小儿肾脏疾病。现工作单位: 哈尔滨医科大学附属第二医院儿科, 邮编: 150086。

[通讯作者] 吴玉斌, 女, 教授, 中国医科大学附属盛京医院肾内科, 邮编: 110004。

低与肾脏代偿与失代偿有关<sup>[1]</sup>。细胞凋亡参与内毒素血症幼年大鼠肾损伤过程,谷氨酰胺(glutamine, Gln)可减轻肾脏细胞凋亡保护肾脏功能<sup>[2]</sup>。Gln在内毒素血症是否能通过干预肾脏 ERK 以及 p38 信号转导途径来保护肾脏,目前国内外没有相关报道。本研究旨在观察幼年大鼠内毒素血症肾脏在 Gln 干预后其 ERK 及 p38 表达的动态变化,探讨 Gln 在肾脏损伤性改变中对肾脏保护作用的机制。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物和模型制作

选健康 18 日龄 Wistar 大鼠 121 只,体重约  $28.9 \pm 5.4$  g,不分雌雄,由中国医科大学实验动物中心提供。用脂多糖(LPS)腹腔注射的方法制备幼年大鼠内毒素血症动物模型,计量为 4 mg/kg。各组按腹腔注射药物不同分成 0 h 对照组(生理盐水 1 mL/kg),LPS(4 mg/kg)2,4,6,24 及 72 h 组,Gln (LPS 4 mg/kg + Gln 1 mL/kg)2,4,6,24 及 72 h 组,各组于上述指定时间点剖开腹腔观察肾脏外观改变,无菌分离肾脏,3 只置于 4% 多聚甲醛固定 12 ~ 16 h,制成石蜡切片,用作免疫组化测定,8 只置于无 Rnase 的 Eppendorf 管中,放入 -76℃ 液氮中再置 -80℃ 冰箱冻存,留作逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)测定 ERK, p38 mRNA 用。

### 1.2 检测指标的试剂以及仪器

大肠杆菌精制内毒素(LPS, Escherichia coli O111:B4):由美国 Sigma 公司提供;力肽(含活性成分为 13.46 g/100 mL 谷氨酰胺,由德国费森尤斯公司生产)。ERK-2, p38MAPK 组化试剂盒均由武汉博士得生物医学工程公司提供。大鼠 ERK-2 以及 p38 MAPK mRNA 引物参照 GenBank,由上海博亚生物工程公司合成 Primer。ERK-2 扩增产物长度为 201 bp,序列为:上游:5'-CTC AAG CCT TCC AAC CTC-3';下游:5'-GCA GCC CAC AGA CCA AAT-3'。p38MAPK 扩增产物长度为 130 bp,序列为:上游:5'-CTC AGC GTG GAC GAA TGG-3';下游:5'-CTC AGC CGC AGG TTA GAT-3'。内参照物  $\beta$ -actin 扩增产物长度 690 bp,序列为:上游:5'-CAC CCT GTG CTG CTC ACC GAG GCC-3';下游:5'-CCA CAC AGA TGA CTT GCG CTC AGG-3'。RNA 总的提取液由华美生物工程公司提供。逆转录和 PCR 扩增所需的酶和其他试剂均购自日本 TaKaRa 公司。扩增产物用琼脂糖购自北京中山生物技术公司。

动物手术台(动物夹,止血钳,剪刀,镊子等必备手术器械)。

日本产 OLYMPUS 光学显微镜以及摄像系统及日本产 MetaMorph/BX41 型图像数据分析系统。

### 1.3 方 法

#### 1.3.1 RT-PCR 半定量测定 ERK-2 及 p38MAPK mRNA 的表达

(1)肾脏组织总蛋白提取:按 TRIZOL 总 RNA 提取试剂说明书采用硫氢酸胍-酚-氯仿一步法提取肾脏总的 RNA,取 1 mL,以无菌 DEPC 水调整为  $2.0 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  浓度。

(2)第一链 cDNA(互补 DNA)的合成:在  $20 \mu\text{L}$  的反应体系中,分别加入样本 RNA( $2.5 \mu\text{g}$ )  $2 \mu\text{L}$ ,  $25 \text{ mmol MgSO}_4$   $4 \mu\text{L}$ , RT buffer ( $2 \times$ )  $10 \mu\text{L}$ , dNTPs (各  $10 \text{ mmol/L}$ )  $1 \mu\text{L}$ , Amv ( $22 \text{ U}/\mu\text{L}$ )  $1 \mu\text{L}$ ,寡核苷酸引物(oligod Primer)  $1 \mu\text{L}$ , RNA 酶抑制剂( $40 \text{ U}/\mu\text{L}$ )  $0.5 \mu\text{L}$ , DEPC 水  $0.5 \mu\text{L}$ ,混匀后置于下列温度反应: $65^\circ\text{C}$  1 min,  $30^\circ\text{C}$  5 min, 15 ~ 30 min 匀速升温,  $65^\circ\text{C}$  30 min,  $98^\circ\text{C}$  5 min,  $5^\circ\text{C}$  5 min,即完成 cDNA 的合成。

(3)PCR 扩增 ERK-2:在  $22 \mu\text{L}$  反应体系中,加入 cDNA  $3 \mu\text{L}$ , DEPC  $16.7 \mu\text{L}$ , PCR buffer  $2.5 \mu\text{L}$ , dNTPs  $2 \mu\text{L}$ , TaqDNA 聚合酶( $5 \text{ U}/\mu\text{L}$ )  $0.2 \mu\text{L}$ ,上游引物  $0.3 \mu\text{L}$ ,下游引物  $0.3 \mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件: $94^\circ\text{C}$  3 min,  $94^\circ\text{C}$  40 s,  $51.5^\circ\text{C}$  1 min,  $72^\circ\text{C}$  1 min,  $72^\circ\text{C}$  7 min, 35 个循环。

(4)PCR 扩增 p38MAPK:在  $22 \mu\text{L}$  反应体系中,加入 cDNA  $3 \mu\text{L}$ , DEPC  $17.1 \mu\text{L}$ , PCR buffer  $2.5 \mu\text{L}$ , dNTPs  $2 \mu\text{L}$ , TaqDNA 聚合酶( $5 \text{ U}/\mu\text{L}$ )  $0.2 \mu\text{L}$ ,上游引物  $0.1 \mu\text{L}$ ,下游引物  $0.1 \mu\text{L}$ 。PCR 扩增条件: $94^\circ\text{C}$  3 min,  $94^\circ\text{C}$  40 s,  $53^\circ\text{C}$  1 min,  $72^\circ\text{C}$  1 min,  $72^\circ\text{C}$  7 min, 35 个循环。

(5)扩增产物的分析:扩增产物行 2% 琼脂淀粉凝胶电泳,溴化乙锭染色后于紫外灯下观察扩增产物并拍照,用 Kodak 1D 型凝胶成像系统及分析系统进行扩增产物条带分析。ERK-2, p38MAPK mRNA 表达水平以其与  $\beta$ -actin 690 bp 的密度比值,半定量计算 ERK-2, p38MAPK mRNA 含量。

#### 1.3.2 免疫组化方法测定 MAPK、p38 蛋白质表达

(1)程序:将石蜡切片经常规脱蜡至水。3% 过氧化氢室温 5 ~ 10 min,以灭活内源性酶。蒸馏水洗 3 次。热修复抗原:将切片浸入  $0.01 \text{ M}$  枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0),微波炉加热至沸腾后断电 5 min,再煮 1 min,冷却后 PBS(pH 7.2 ~ 7.6)洗涤 1 ~ 2 次。滴入 5% BSA 封闭液,室温 20 min,甩去多余液体,

不洗。滴入稀释16倍的一抗,37℃ 60 min, PBS洗 2 min × 3次。滴入生物素化山羊抗小鼠 IgG 37℃, 20 min, PBS洗3次 × 2 min。滴入 SABC 37℃ 20 min, PBS洗4次 × 5 min。DAB显色,充分水洗,苏木素复染,充分水洗,酒精脱水,二甲苯透明,封片。

(2)图像分析:取3张组化染色片(阳性者表现为胞浆内棕黄色颗粒),在三张切片上随机选取8个视野照相,采用日本产 OLYMPUS 摄像系统和 MetaMorph/BX41 型图像数据分析系统测定积分吸光度值,进行数据分析。

1.3.3 病理分析 取大鼠左肾切开置于10%福尔马林中固定,石蜡包埋,苏木精-伊红染色法光镜下观察肾脏结构改变。

1.3.4 电镜观察的标本处理 低温下横断皮质髓质,取肾组织1 mm<sup>3</sup>置于2.5%戊二醛中固定。固定后的组织经0.1 mol/L磷酸缓冲液中充分漂洗,用1% OsO<sub>4</sub>后固定2 h,漂洗后的组织经酒精梯度脱水,环氧树脂 Epon812 浸透包埋,半薄片定位肾小球,超薄切片,醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,于透射电镜下观察。

#### 1.4 统计学处理

所有数据均以均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,差异比较采用 SPSS 11.0 医学数据分析软件系统进行分

析, Dunnett *t* 检验及制作统计图,  $P < 0.05$  为差异有显著性。

## 2 结果

### 2.1 脓毒症大鼠肾脏 ERK-2 mRNA, p38MAPK mRNA, ERK-2, p38MAPK 表达的动态变化

从表1, 2中可以看出, 0 h ERK-2 mRNA, p38MAPK mRNA, ERK-2, p38MAPK 基本都处于弱表达,随着脓毒症的进展,两者表达逐渐升高,在6 h达到高峰,明显高于对照组,以后开始下降,但到72 h仍明显高于对照组,  $P < 0.01$ 。Gln 组 ERK-2 mRNA, p38MAPK mRNA, ERK-2, p38MAPK 表达趋势与 LPS 组一致,但各时点明显弱于 LPS 组,  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ 。

### 2.2 免疫组化

LPS 组 6 h 及 24 h 组肾小球及肾小管上皮细胞可见大量棕黄色 p38MAPK 及 ERK-2 颗粒沉积。Gln 组 6 h 及 24 h 组肾小球及肾小管上皮细胞可见仅有少量棕黄色 p38MAPK 及 ERK-2 颗粒沉积(图1)。

### 2.3 病理改变及电镜观察

Gln 组各时点病理改变较 LPS 组均有减轻,见图2。电镜观察见图3。

表1 脓血症幼年大鼠肾脏 ERK-2 mRNA 及 p38MAPK mRNA 的变化

( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

时点	ERK-2 mRNA		两组比较 <i>t</i> 值	p38MAPK mRNA		两组比较 <i>t</i> 值
	LPS 组	Gln 组		LPS 组	Gln 组	
0 h	84.43 ± 8.24			105.44 ± 11.57		
2 h	86.25 ± 9.47	85.50 ± 7.01 <sup>b</sup>	3.17	108.17 ± 13.49	107.47 ± 11.99	2.09
4 h	90.27 ± 8.96 <sup>a</sup>	88.37 ± 8.59 <sup>a,c</sup>	6.58	113.33 ± 15.24 <sup>a</sup>	110.27 ± 10.85 <sup>c</sup>	6.14
6 h	95.19 ± 9.17 <sup>a</sup>	93.67 ± 9.88 <sup>a,b</sup>	3.16	125.27 ± 18.33 <sup>a</sup>	121.34 ± 11.36 <sup>a,c</sup>	6.21
24 h	92.14 ± 8.54 <sup>a</sup>	90.39 ± 9.10 <sup>a,c</sup>	3.63	118.33 ± 16.92 <sup>a</sup>	114.68 ± 10.77 <sup>a,c</sup>	6.30
72 h	88.17 ± 7.88 <sup>a</sup>	86.53 ± 8.68 <sup>a,b</sup>	2.84	115.37 ± 15.37 <sup>a</sup>	113.71 ± 10.45 <sup>a,c</sup>	9.52
时点比较 <i>F</i> 值	53.124	40.982		55.896	43.916	

a: 与 0 h 比较,  $P < 0.01$ ; b: 与 LPS 组相同时点比较,  $P < 0.05$ ; c: 与 LPS 组相同时点比较,  $P < 0.01$

表2 脓血症幼年大鼠肾脏 ERK-2 及 p38MAPK 蛋白的变化

( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

时点	ERK-2		<i>t</i> 值	p38		<i>t</i> 值
	LPS 组	Gln 组		LPS 组	Gln 组	
0 h	11 963 ± 1 124			11 178 ± 1 856		
2 h	26 318 ± 3 756 <sup>a</sup>	26 301 ± 3 078 <sup>a,b</sup>	8.68	22 138 ± 2 069 <sup>a</sup>	22 129 ± 2 096 <sup>a,b</sup>	6.47
4 h	28 506 ± 3 072 <sup>a</sup>	28 497 ± 4 013 <sup>a,b</sup>	9.92	38 968 ± 4 213 <sup>a</sup>	38 956 ± 3 654 <sup>a,b</sup>	5.49
6 h	33 867 ± 4 273 <sup>a</sup>	33 856 ± 2 985 <sup>a,b</sup>	12.56	42 107 ± 4 574 <sup>a</sup>	42 093 ± 4 587 <sup>a,b</sup>	12.96
24 h	32 587 ± 2 983 <sup>a</sup>	32 577 ± 3 654 <sup>a,b</sup>	9.35	40 326 ± 3 296 <sup>a</sup>	40 314 ± 4 239 <sup>a,b</sup>	6.32
72 h	29 715 ± 3 654 <sup>a</sup>	29 703 ± 3 980 <sup>a,b</sup>	11.12	37 677 ± 2 865 <sup>a</sup>	37 667 ± 3 098 <sup>a,b</sup>	10.54
时点比较 <i>F</i> 值	172.326	88.638		154.256	132.568	

a: 与 0 h 比较,  $P < 0.01$ ; b: 与 LPS 组相同时点比较,  $P < 0.01$

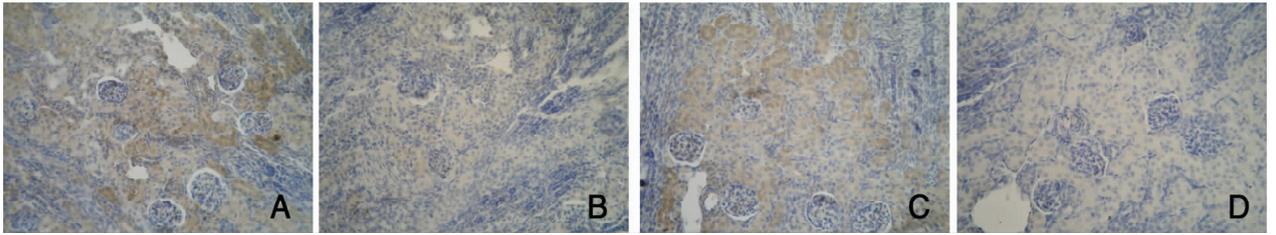


图1 免疫组化光镜图( $\times 400$ ) A:LPS 6 h组 p38MAPK 棕黄色颗粒沉积; B:Gln 6 h组 p38MAPK 少量棕黄色颗粒沉积; C:LPS 6 h组 ERK-2颗粒沉积; D:Gln 6 h组 ERK-2 颗粒沉积。

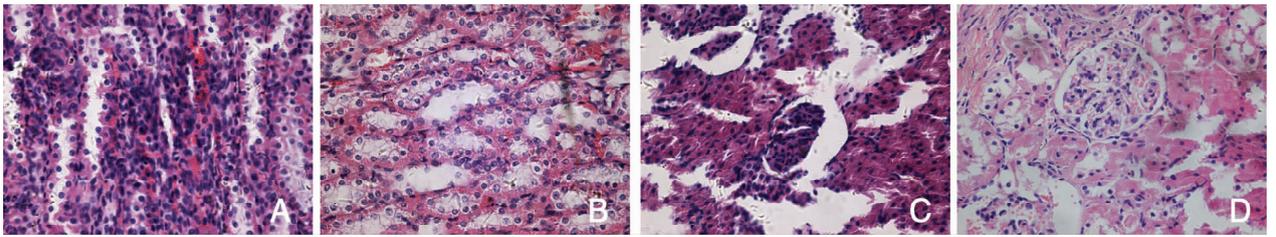


图2 病理切片图( $\times 400$ ) A:LPS 6 h组肾小管炎症细胞明显增加; B:Gln 6 h组肾小管大致正常,少量炎症细胞浸润; C:LPS 24 h组肾小球内系膜细胞明显增多,系膜基质弥漫; D:Gln 24 h组基本正常,系膜细胞轻度增加。

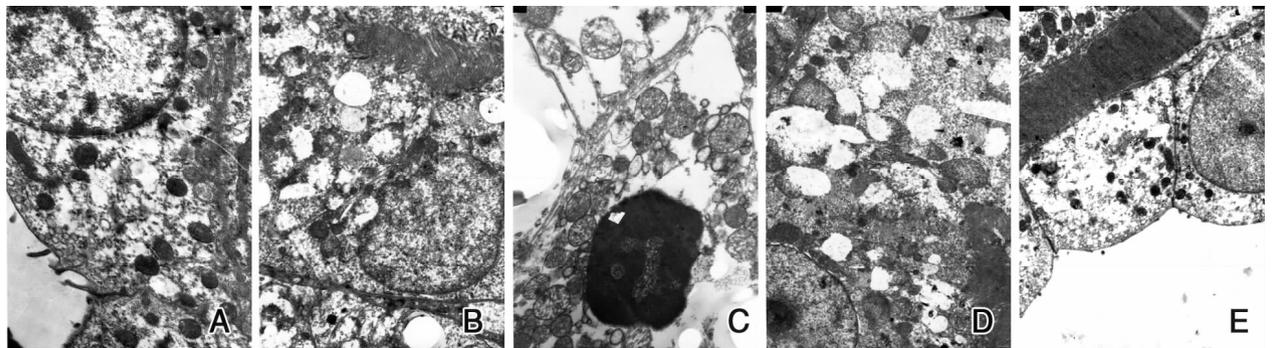


图3 电镜图片( $\times 8000$ ) A:对照组正常肾小球滤过屏障,远端肾小管细胞表面微绒毛(短的)细胞连接完整、细胞质内线粒体完整; B:LPS注射后6 h近端小管微绒毛可见,核形不规则,胞质内大量线粒体呈空泡变性,嵴溶解,外膜破损; C:LPS注射后24 h近端小管上皮细胞内核膜模糊,异染色质浓缩为凋亡的中期; D:应用Gln后6 h近端小管绒毛可见,线粒体外膜破损,局部细胞质溶解; E:应用Gln 24 h远端小管细胞连续存在,个别线粒体外膜模糊,可见粗面内质网。

### 3 讨论

革兰阴性细菌是与机体组织长期共生的微生物。LPS即革兰阴性菌内毒素(endotoxin)是革兰阴性细菌的细胞壁组成成分,机体在受到革兰阴性细菌的感染时,LPS作用于细胞膜受体,通过细胞内信号传递级联使基因表达发生变化<sup>[3,4]</sup>。

参与LPS所介导的信号转导下游通路主要有核转录因子 $\kappa B$ (NF- $\kappa B$ )信号转导通路和MAPKs信号转导通路。到目前为止,在哺乳动物细胞中已至少发现有3条MAPK通路:ERK通路,c-jun氨基末端激酶(c-jun N-terminal kinase, JNK)通路和

p38MAPK通路<sup>[5]</sup>。LPS与细胞膜上相应受体作用后,启动胞内信号传递链,引起NF- $\kappa B$ , p38, ERK活化,启动基因转录,表达和释放多种细胞因子,发挥其毒性作用<sup>[6]</sup>。本实验中,随着脓血症的进展,在24 h内ERK-2和p38MAPK表达均呈增强之势,24 h之后转为下降,可能机体正在进行代偿性肾脏细胞的肥大增生。

Gln是人体内最丰富的非必需氨基酸,在应激条件下,被认为是一种必需氨基酸,占全身游离氨基酸的一半以上。机体对抗手术、创伤、感染和禁食时,免疫的激活可能增加能量代谢和对蛋白分解,Gln作为快分裂(rapid replication)的肠上皮细胞和免疫细胞的主要能量来源与蛋白合成的中间物,机

体对 Gln 的需求有明显增加。如果不能及时得到外源性补充,会大大增加发生 MODS 的危险<sup>[7]</sup>。Gln 在脓血症中可以通过多种途径保护机体免受毒素的损害<sup>[8]</sup>。用 Gln 喂养的幼猪能通过保持小肠的形态和功能,可能通过调节生长激素缓解埃希大肠杆菌内毒素血症引起的生长抑制<sup>[9]</sup>,或者通过增加细胞的谷胱甘肽还原酶,减轻氧化应激反应,保护肠黏膜上皮细胞<sup>[10-12]</sup>。给肥胖大鼠喂以一段时间的 Gln 后,肥胖大鼠的巨噬细胞中 TNF- $\alpha$  含量降低且与 Gln 浓度成反比,提示 Gln 可以减少 TNF- $\alpha$  的合成<sup>[13]</sup>。Gln 已被用于预防多柔比星引起的心肌损害<sup>[14]</sup>。已有作者指出细胞凋亡参与内毒素血症幼年大鼠肾脏损伤过程, Gln 可减轻肾脏细胞凋亡保护肾脏功能<sup>[2]</sup>。

本实验中观察到 Gln 组 ERK-2 mRNA, p38MAPK mRNA, ERK-2, p38MAPK 在各时点表达虽然比 0 h 对照组增强,但均较 LPS 组减弱,提示 Gln 可能是通过对 MAPK 信号转导系统的抑制,限制多种转录因子磷酸化,减少了肾脏细胞的损伤。本研究中亦做了同期的病理和肾脏细胞超微结构观察,也证实 Gln 组肾脏组织的损伤明显减轻,而且恢复较快,提示这种抑制可能是有益的。

#### [参 考 文 献]

[1] 段惠军,李英,张涛,刘茂东,史永红.高糖对系膜细胞外调节蛋白激酶表达及细胞外基质合成的影响[J].中国中西医结合肾病杂志,2008,9(1):47-49.  
[2] 韩梅,吴玉斌.谷氨酰胺对内毒素血症幼年大鼠肾脏细胞凋亡超微结构的影响[J].中国现代医学杂志,2008,18(6):725-728.

[3] Diks SH, Richel DJ, Peppelenbosch MP. LPS signal transduction; the picture is becoming more complex [J]. *Curr Top Med Chem*, 2004, 4(11):1115-1126.  
[4] Palsson-McDermott EM, O'Neill LA. Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4 [J]. *Immunology*, 2004, 113(2):153-162.  
[5] Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation [J]. *Physiol Rev*, 2001, 81(2):807-869.  
[6] Dunn KL, Espino PS, Drobic B, He S, Davie JR. The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling [J]. *Biochem Cell Biol*, 2005, 83(1):1-14.  
[7] 刘茹,郑军,纪庆红.谷氨酰胺药物的临床应用进展[J].中国药事,2008,22(4):346-347.  
[8] Oehler R, Roth E. Regulative capacity of glutamine [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2003, 6(3):277-282.  
[9] Yi GF, Carroll JA, Allee GL, Gaines AM, Kendall DC, Usry JL, et al. Effect of glutamine and spray-dried plasma on growth performance, small intestinal morphology, and immune responses of *Escherichia coli* K88<sup>+</sup>-challenged weaned pigs [J]. *J Anim Sci*, 2005, 83(3):634-643.  
[10] Evans ME, Jones DP, Ziegler TR. Glutamine prevents cytokine-induced apoptosis in human colonic epithelial cells [J]. *J Nutr*, 2003, 133(10):3065-3071.  
[11] 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抑制探讨[J].中国当代儿科杂志,2006,8(6):496-498.  
[12] 饶小平,朱缘绮,连惠红.谷氨酰胺对失血性休克兔肠屏障功能保护作用的研究[J].中国当代儿科杂志,2006,8(1):66-70.  
[13] Blanc MC, Moinard C, Béziel A, Darguv S, Cynober L, De Bandt JP. Arginine and glutamine availability and macrophage functions in the obese insulin-resistant Zucker rat [J]. *J Cell Physiol*, 2005, 202(1):153-159.  
[14] Cao Y, Kennedy R, Klimberg VS. Glutamine protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *J Surg Res*, 1999, 85(1):178-182.

(本文编辑:吉耕中)