

文章编号: 0529-6579 (2000) 06-0218-05

谷氨酰胺促进 TPN 大鼠小肠 代偿的分子机制研究*

顾 岩¹, 谢建新², 吴肇汉³, 陈积圣¹

(1. 中山医科大学孙逸仙纪念医院外科, 广东 广州 510120;

2. 复旦大学医学院解剖学教研室, 上海 200032;

3. 复旦大学医学院附属中山医院外科, 上海 200032)

摘 要: 将 20 只短肠 SD 大鼠随机分成单纯 TPN 组及 Gln-TPN 组, 行肠粘膜上皮细胞增殖、凋亡及相关基因表达的检测, 探讨谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 促进 TPN 短肠大鼠小肠代偿的分子机制. 结果表明: 单纯 TPN 可造成大鼠小肠粘膜明显萎缩, 添加 Gln 的 TPN 可显著缓解肠粘膜萎缩. 其肠粘膜上皮细胞 PCNA 表达显著增高, 凋亡指数下降. Gln 抑制细胞凋亡的作用与 bcl-2 表达上调及 bax 表达下调密切相关.

关键词: 谷氨酰胺; 全肠外营养; 小肠

中图分类号: R605.979 **文献标识码:** A

全肠外营养 (total parenteral nutrition, TPN) 支持是短肠综合征 (short bowel syndrome, SBS) 治疗的主要手段, 促进残存小肠的代偿是 SBS 治疗中重要一环. 残存小肠只有通过代偿, 才可使肠道的营养吸收功能逐渐恢复, 从而使患者逐渐过渡到正常的经肠道进食. 但长期 TPN 本身会引起小肠萎缩, 不利于肠道结构与功能的恢复. 因此如何促进 TPN 时残留小肠的代偿适应是 SBS 治疗的一个难题. 目前研究的热点主要集中在各种辅助添加剂的使用上, 尤其是谷氨酰胺 (glutamine, Gln) 的使用. 虽然现有研究已发现 Gln 可显著促进 TPN 的短肠大鼠残存小肠的代偿, 但到目前为止, 对这种促代偿作用的分子机制尚缺乏详细和深入的探索. 本研究拟从分子营养学角度探讨短肠大鼠残存小肠对添加 Gln 的反应, 为临床 SBS 治疗提供理论指导.

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

采用 180~220 g 雄性 SD 大鼠, $\phi = 0.5\%$ 戊巴比妥钠腹腔麻醉 (40 mg/kg) 后在无菌条件下行 75% 小肠切除及上腔静脉置管术^[1]. 将大鼠随机分成 2 组: 单纯 TPN 组 ($n = 10$) 及 Gln-TPN 组 ($n = 10$). 术后当天予生理盐水静脉滴注, 术后第 1 天开始行 24 h TPN 支持, 输液量为每天 80 mL/kg, 第 2 天起改为 160 mL/kg, 共持续 6 d. 另取一组正常饮食大鼠作为对照组 ($n = 8$).

1.2 TPN 液配制

TPN 液以 50% 葡萄糖、7% Vamin 及 20% Intralipid 为基本液体配成而成. Gln-TPN 中

* 基金项目: 国家教委博士点基金资助项目 (97361); SSPC 科研基金资助

收稿日期: 2000-09-18; 作者简介: 顾岩 (1964~), 男, 博士; 研究方向: 肝胆外科; 外科营养.

含甘氨酸谷氨酰胺 (Gly-Gln, Pharmacia & Upjohn 公司惠赠) 28 g/L, 而单纯 TPN 液中以甘、丙、丝、脯氨酸替代, 使二者含氮量相等. 使用前 Gly-Gln 及甘、丙、丝、脯氨酸 (Gly-Ala-Pro-Ser) 均分别溶于蒸馏水中, 用 0.22 μm 的滤膜无菌抽滤, 在超净工作台内无菌分装入瓶, 置 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存, 临用时按配方剂量与上述基本溶液混合. 大鼠每日接受的非蛋白热卡及氮量分别为 696.5 $\text{kJ}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 及 1.4 $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 糖脂供能比为 2:1. 所有大鼠均可自由饮水.

1.3 标本采集

术后第 6 天 TPN 结束后 30 min 在麻醉下剖腹. 将实验大鼠全部残存小肠取下, 置冰上按统一方法取材, 分别用于石蜡包埋切片制作及 RNA 抽提^[2].

1.4 检测方法

1.4.1 光镜检查 低倍光镜下行小肠形态学检查, 以 VIDS III 型半自动图象分析仪测量小肠粘膜厚度、绒毛高度及隐窝深度, 计算绒毛表面积^[3].

1.4.2 细胞增殖核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 测定 采用 ABC 法作免疫组织化学染色. 一抗为 1:100 (体积比) mouse 抗 rat PCNA (Dako 公司), 二抗为 1:200 (体积比) 生物素马抗 mouse (Sigma 公司). 在 QI500 图象分析仪下计数每个肠腺隐窝中 PCNA 完整阳性的细胞数, 求其均值.

1.4.3 原位末端标记 (TUNEL) 染色 应用 Boehringer Mannheim 公司原位细胞凋亡检测试剂盒进行. 以 QI500 图象分析仪计数每 100 个细胞中凋亡细胞数, 求出凋亡细胞的发生率, 以凋亡指数表示.

1.4.4 RT-PCR 测定 组织总 RNA 的提取采用 TRIzol 试剂盒 (GIBco. BRL 公司), 按操作手册操作. G3PDH、bcl-2 及 bax 引物设计参照 Schwartz 及 DeNardo 的报道由美国赛百胜公司合成^[4,5]. 以 G3PDH 作为内参照控制上样量, 在 $\rho = 2\%$ 琼脂糖凝胶上电泳, VDS 成像分析系统扫描测定光密度, 计算其 mRNA 的表达水平.

1.5 统计学处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 行 Student *t* 检验, $P < 0.05$ 认为差异显著. 所有统计分析均用 Stata 5.0 软件包在计算机上进行.

2 结 果

2.1 形态学观察

小肠粘膜在单纯 TPN 组呈明显变薄、萎缩, 在 Gln-TPN 组则呈显著代偿增生. 图像分析结果显示 Gln-TPN 组小肠绒毛高度、隐窝深度、粘膜厚度及绒毛表面积均显著高于单纯 TPN 组, $P < 0.01$, 见表 1.

表 1 各实验组大鼠小肠粘膜图像分析结果¹⁾

组别	粘膜厚度/ μm	绒毛高度/ μm	隐窝深度/ μm	绒毛表面积/ μm^2
TPN 组	373.70 $\pm$ 13.08	211.90 $\pm$ 19.18	96.18 $\pm$ 8.98	10550 $\pm$ 1155
Gln-TPN 组	416.12 $\pm$ 8.37	291.43 $\pm$ 12.44	154.18 $\pm$ 33.30	17809 $\pm$ 1247
对照组	600.02 $\pm$ 12.07	403.95 $\pm$ 16.40	158.45 $\pm$ 12.88	20313 $\pm$ 1673

1) ($\bar{x} \pm s$); 各组间 P 值均 < 0.01 .

2.2 PCNA 表达及凋亡指数测定

PCNA 阳性细胞主要分布在肠腺隐窝区, 凋亡细胞主要位于小肠绒毛顶部. Gln-TPN 组肠粘膜 PCNA 阳性细胞数显著高于单纯 TPN 组, 而凋亡指数则显著低于单纯 TPN 组, P 均 < 0.01 . 见表 2.

2.3 RT-PCR 检测

残存小肠粘膜上皮细胞 bcl-2 mRNA 的表达在 Gln-TPN 组显著高于 TPN 组, $P < 0.01$; 而 bax mRNA 的表达则相反, Gln-TPN 组低于 TPN 组, 见表 3.

表 2 残存小肠粘膜上皮细胞
PCNA 表达与凋亡指数变化¹⁾

组别	PCNA ²⁾	凋亡指数 ³⁾
TPN 组	8.37 ± 2.23	22.32 ± 3.84
Gln-TPN 组	15.27 ± 3.38	10.00 ± 2.24
对照组	21.22 ± 3.03	2.32 ± 1.15

1) ($\bar{x} \pm s$); 2) 单位为视野中的个数;

3) 单位为每 100 个细胞中的凋亡个数;

各组间 P 值均 < 0.01 .

表 3 残存小肠粘膜上皮细胞 bcl-2 及
bax mRNA 表达测定¹⁾

组别	bcl-2 mRNA	bax mRNA
TPN 组	0.196 ± 0.03	$0.427 \pm 0.05 *$
Gln-TPN 组	0.279 ± 0.05	0.381 ± 0.06
对照组	0.422 ± 0.07	0.211 ± 0.03

1) 与 Gln-TPN 组相比 $P > 0.05$, 其余组间 P 值均 < 0.01 .

3 讨 论

TPN 是 60 年代后期迅速发展起来的一种营养治疗方法, 它对于包括 SBS 在内的那些因结构或功能上的原因而不能应用胃肠道的患者的治疗具有重要意义. 但 TPN 本身并不利于肠道结构与功能的维持. Liboshi 等发现大鼠在 TPN 支持 3 d 后, 肠道粘膜上皮即出现明显萎缩和功能下降^[6], 这在本研究中也达到证实. 造成小肠萎缩的原因目前认为除与腹腔内缺乏各种营养物质刺激外, 还与常规 PN 液中缺乏 Gln 密切相关. Gln 是肠粘膜上皮细胞代谢活动的主要能源物质, 并是维持肠道粘膜完整性所不可缺少的特殊氨基酸. 肠道是消耗 Gln 的主要场所, 肠粘膜上皮细胞对 Gln 的摄取要远远超过任何一种其它物质. 本研究显示 TPN 所造成的小肠萎缩在加用 Gln 后得到了显著改善, 表明外源性添加 Gln 具有显著的促进短肠大鼠小肠代偿的作用.

PCNA 是保存良好的 DNA 多聚酶 σ 的辅酶蛋白, 为细胞 DNA 合成所必需, 它能够识别增殖细胞的核, 是反映细胞增殖程度的一项客观指标. 本实验对 PCNA 的研究结果发现单纯 TPN 时小肠上皮细胞 PCNA 表达显著降低, 表明其 DNA 合成处于抑制状态. 而添加 Gln 后其 PCNA 的表达明显增高, 表明促进 DNA 的合成是 Gln 促进残存小肠粘膜增生及形态结构的重建的重要机制之一. 在每一细胞的生命过程中, 除增殖分裂外, 同时也存在细胞死亡, 这种在基因控制下的细胞主动死亡过程被称为凋亡, 为机体维持恒定状态所必需. 作为体内更新最为迅速的肠粘膜上皮细胞, 其细胞周期仅 12 h, 同样也存在着凋亡^[7]. 这种凋亡主要发生于隐窝干细胞, 意义在于去除偶发的超过维持稳态所需的干细胞或去除由于 DNA 复制错误而产生的损伤干细胞. 正常情况下这种凋亡稳定在一个低水平状态, 以维持绒毛的结构和功能. 本研究中正常对照大鼠小肠的凋亡指数仅为 2.32 ± 1.15 , 是各组大鼠中最低者. 而单纯 TPN 组凋亡指数明显增高, 为对照组 10 倍, 差异极为显著. 说明 TPN 时小肠粘膜的萎缩不仅仅是由于增生受抑制, 凋亡的增加也同样起着

重要的作用。而体外给予 Gln 可使小肠粘膜上皮细胞凋亡发生显著下降, 表明 Gln 作为辅助添加剂的使用不仅促进了粘膜细胞的增生, 同时也抑制了细胞的凋亡。二者在小肠的代偿过程中均起着重要的作用。

细胞凋亡受基因编码控制。bcl-2 基因是作用最明确的凋亡拮抗基因。其基本生物学功能为延长细胞生命期限, 增加细胞对多种凋亡刺激因子的抗性。bax 是 bcl-2 家族成员之一, 其蛋白可与 bcl-2 蛋白结合成杂二聚体, 抑制 bcl-2 功能的发挥, 二者数量比决定着细胞受到凋亡刺激因素后的生与死^[8]。本研究发现 bcl-2 mRNA 表达在 TPN 组显著低于 Gln-TPN 及对照组, 而 bax mRNA 表达则正好相反, 差异极为显著。这进一步说明 TPN 所致的凋亡增加与凋亡相关基因 bcl-2 的低表达及 bax 的高表达相关, 而 Gln 可改变这种基因调控失常, 通过上调 bcl-2 及下调 bax 表达来发挥其抑制细胞凋亡的作用。

本研究结果表明 Gln 促进肠道代偿的作用与其促进肠粘膜上皮细胞增生及抑制凋亡密切相关。但这种作用仅能达到使肠道部分代偿的目的。因此在本研究基础上进一步寻找一种能够有效促进细胞增生、减少细胞凋亡的方法对于临床短肠综合征治疗将具有更重要的意义。

参考文献:

- [1] 顾岩, 谢建新, 吴肇汉. 肠外营养促进短肠大鼠小肠粘膜上皮细胞凋亡[J]. 中山医科大学学报, 2000 (4S): 120 ~ 122.
- [2] 顾岩, 谢建新, 吴肇汉. 生长激素对短肠大鼠残留小肠形态及生长代谢的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2000(4): 311 ~ 312.
- [3] FRANKEL W L, ZHANG W, AFONSO J, et al. Glutamine enhancement of structure and function in transplanted small intestine in the rat[J]. JPEN, 1993, 17: 47 ~ 55.
- [4] SCHWARTZ-CORNIL I, CHEVALLIER N, BELLOC C, et al. Bovine leukaemia virus-induced lymphocytosis in sheep is associated with reduction of spontaneous B cell apoptosis[J]. J Gen Virol, 1997, 78: 153 ~ 156.
- [5] DeNARDO S J, GUMERLOCK P H, WINTHROP M D, et al. Yttrium-90 chimeric L6 therapy of human cancer in nude mice and apoptosis-related mRNA expression[J]. Cancer Res, 1995, 55: 5837s ~ 5839s.
- [6] LIBOSHI Y, NEZU R, KENNEDY M. Total parenteral nutrition decreases luminal mucous gel and increased permeability of small intestine[J]. JPEN, 1994, 18(4): 346 ~ 350.
- [7] POTTEN C S. A comprehensive study of the radiobiological response of the murine small intestine[J]. Int J Radiat Biol, 1990; 58(6): 925 ~ 973.
- [8] OLTVAI Z N, MILLIMAN C L, KORSMEYER S. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog bax, that accelerates programmed cell death[J]. J Cell, 1993, 74(4): 609 ~ 619.

The Molecular Basis of the Adaptation of the Remnant Small Intestine in Short Bowel Rats with Glutamine-Coinfused TPN

GU Yan^{*}, XIE Jian-xin, WU Zhao-han, CHEN Ji-sheng

Abstract: To understand the underlying mechanism of the adaptation of the remnant small intestine in rats receiving glutamine, 20 parenterally fed, short bowel SD rats were randomized divided into simple TPN group and Gln-TPN group, the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), the occurrence of the apoptosis and related gene expression were determined. Our results show that Atrophy of the remnant small intestine was occurred in TPN group, however it was significantly alleviated in Gln-TPN group with increasing of PCNA expression and decreasing of the rate of apoptosis. Up-regulation of apoptosis - related bcl-2 gene and down-regulation of bax gene plays an important part in decreasing of cell apoptosis.

Keywords: glutamine; total parenteral nutrition; small intestine

* Surgery Center, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China