

谷氨酰胺对烧伤大鼠肠上皮细胞线粒体呼吸功能的影响

彭曦 陈蓉春 王裴 尤忠义 汪仕良

【摘要】目的 研究谷氨酰胺对烧伤大鼠肠上皮细胞线粒体呼吸功能的影响。**方法** 采用 30% 体表面积Ⅲ度烧伤大鼠模型,随机分成伤前对照(C)组、普通肠道营养(EN)组及谷氨酰胺强化的肠道营养(GLN)组。EN 和 GLN 组除是否给予谷氨酰胺外,其它条件均相同。分离肠上皮细胞线粒体,观察烧伤后各组线粒体呼吸控制率(RCR)、磷氧比(P/O)、肠黏膜血流量(IMBF)及肠道氧摄取率(Oext)的变化。**结果** 烧伤后各组线粒体Ⅲ态呼吸率(ST3)明显下降,Ⅳ态呼吸率(ST4)升高,RCR 显著降低。两组相比,GLN 组变化幅度较小,同时其 IMBF 和 Oext 也明显高于 EN 组。**结论** 严重烧伤后肠黏膜血流量下降,肠道 Oext 降低,肠上皮细胞线粒体呼吸功能受损,氧化磷酸化失耦联。GLN 能改善肠道血供,增加 Oext,减轻肠上皮细胞线粒体呼吸功能受抑程度。

【关键词】 谷氨酰胺; 肠道营养; 线粒体; 呼吸控制率; 烧伤

中图分类号:R644;R965 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-0603(2004)02-0093-04

Effects of enteral supplementation with glutamine on mitochondria respiratory function of intestinal epithelium in burned rats PENG Xi*, CHEN Rong-chun, WANG Pei, YOU Zhong-yi, WANG Shi-liang. * Institute of Burn Research, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China

【Abstract】Objective To investigate the effects of enteral supplementation with glutamine on mitochondria respiratory function of intestinal epithelium in burned rats. **Methods** Wistar rats inflicted with 30% total body surface area (TBSA) full thickness thermal injury were randomly divided into three groups, i. e. burn with enteral nutrition (EN), burn with glutamine treatment (GLN), and normal control (C) groups. Burned rats were infused 732.2 kJ · kg⁻¹ · d⁻¹ solution for intravenous nutrition and oral administration, in which the supply energy ratio of glucose, fat and protein was 55:30:15 respectively, glucose was 15.3% and the proportion of calorie to nitrogen was 183:1. The following indices including respiratory control rate (RCR), oxygen extraction (Oext), P/O ratio and intestine mucosal blood flow (IMBF) were measured on postburn days 1, 3, 5, 7, 10. **Results** After burn injury, the RCR, Oext, P/O ratio, and IMBF were significant decreased in both EN and GLN groups, but all above indices were markedly increased in GLN group compared to those in EN group. **Conclusion** After burn injury, the IMBF and Oext were declined, resulting in mitochondria respiratory oxidative dysfunction and phosphorylation decoupling in intestinal epithelium. GLN supplementation appears to be beneficial to improving IMBF, increasing Oext, abating the extent of mitochondria respiration dysfunction, and promoting oxidative phosphorylation.

【Key words】 glutamine; enteral nutrition; mitochondria; respiratory control rate; burns

CLC number:R644;R965 **Document code:**A **Article ID:**1003-0603(2004)02-0093-04

肠上皮细胞是构筑肠黏膜屏障的核心,具有吸收、分泌和屏障等多种功能,在维持机体的生命活动中居重要地位。但因对缺氧十分敏感,它又是烧伤损害的主要靶细胞之一,目前还缺乏有效的保护措施^[1-3]。我们以往的研究证明,与静脉营养相比,肠道

营养在一定程度上能够减轻烧伤后肠黏膜线粒体受损的程度,维护正常的生理功能,但其疗效还不是十分理想^[4],推测可能与普通肠道营养中缺乏谷氨酰胺(glutamine, GLN)有关。现已知, GLN 是肠黏膜细胞重要的能源物质,能减轻肠道受损程度,促进肠黏膜修复^[5-8],因此推测 GLN 可能影响肠黏膜细胞线粒体呼吸功能。由于肠上皮细胞线粒体分离困难,烧伤后肠上皮细胞线粒体的变化以及 GLN 对它的影响尚不十分清楚,这正是本实验中所要重点研究的内容。

1 材料和方法

1.1 动物分组:健康成年 Wistar 大鼠 110 只,体重 190~260 g,雌雄不拘。按随机数字表法将动物分

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200294);国家重点基础研究发展规划项目基金资助(G1999054202)

作者单位:400038 重庆,第三军医大学附属西南医院烧伤研究所(彭曦,王裴,尤忠义,汪仕良);重庆医科大学应用技术学院药理学教研室(陈蓉春)

作者简介:彭曦(1968-),男(汉族),四川省成都市人,医学博士,副研究员,主要研究领域为创伤后代代谢营养,承担和参与多项国家、军队及省部级科研项目,参与的科研项目分获国家和军队科技进步一、二等奖,发表论文 40 余篇。

成 3 组:普通肠道营养(enteral nutrition, EN)组,谷氨酰胺强化的肠道营养(glutamine, GLN)组及正常对照(control, C)组。

1.2 烧伤模型制作:伤前动物禁食 12 h,用质量分数为 1%的戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔麻醉,背部电推剃毛,称重后置剃毛区于 92 °C 水浴中 18 s,造成总体表面积(TBSA)30% III 度烧伤(病理切片证实)。伤后按 50 ml/kg 腹腔注入乳酸林格氏液抗休克。实验分烧伤后 1、3、5、7 和 10 d 5 个时间点,每个时间点包括 GLN 和 EN 两组,每组每个时间点 10 只大鼠,共 110 只大鼠。

1.3 营养液的配制及营养素的供应量:按照糖、脂、蛋白供热比为 55:30:15 的比例配制营养液,以 732.2 kJ·kg⁻¹·d⁻¹的标准供给。GLN 组大鼠在普通营养液的基础上添加 GLN 1 g·kg⁻¹·d⁻¹,EN 组添加等量的甘氨酸。实验所用 GLN 为颗粒剂(商品名为安凯舒,含体积分数为 99.2%的 L-谷氨酰胺),由重庆药友制药有限公司提供。

1.4 肠黏膜上皮细胞线粒体的制备:肠黏膜细胞分离、线粒体制备参见文献[9]的方法,线粒体呼吸活性测定采用 Estabrood 法,测定全过程严格在低温下操作,2 h 内完成,按照下列公式计算呼吸控制率(RCR)和磷氧比(P/O)。

$$RCR = ST3/ST4$$

式中,ST3 为 III 态呼吸率,ST4 为 IV 态呼吸率。

1.5 小肠氧摄取测定:参见文献[9]方法,从大鼠腹主动脉和肠系膜上静脉各直接抽取血标本 1 ml,进行血气分析和血常规的检测,根据公式计算氧摄取(Oext)。

$$O_{ext} = \frac{SaO_2 \times Hba - SvO_2 \times Hbv}{SaO_2 \times Hba}$$

式中,SaO₂ 为动脉血氧饱和度,Hba 为动脉血血红

蛋白,SvO₂ 为静脉血氧饱和度,Hbv 为静脉血血红蛋白。

1.6 肠黏膜血流量:用微循环多普勒血流仪测定。

1.7 统计学处理:所有数据在华西医科大学 PEMS 程序包上作统计学处理,结果以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行 *t* 检验和相关分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 RCR 变化:表 1 结果显示,伤后 ST3 呈下降趋势,而 ST4 有所增加,故 RCR 无论在 GLN 组还是在 EN 组均显著降低,两组在烧伤后 1 d 最低,分别为伤前的 73.80% 和 76.80%。GLN 组 RCR 值较 EN 组高,两组分别于伤后 5 和 7 d 基本恢复正常,除烧伤后 1 d 外,两组间存在显著差异(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。

2.2 P/O 变化:烧伤后两组 P/O 均显著下降,两组变化趋势不尽相同,GLN 组在伤后 1 d 最低,但恢复较快,于伤后 3 d 基本恢复正常,与 C 组相比无显著差异(*P* > 0.05)。而 EN 组一直保持在较低水平,至伤后 10 d 仍显著低于对照组(*P* < 0.01)。两组相比,GLN 组下降幅度较小,在伤后 3~10 d 存在显著差异(*P* 均 < 0.01)。见表 2。

2.3 Oext 变化:烧伤后两组肠组织 Oext 均显著降低,尤其以伤后 1~3 d 最为明显。两组相比,GLN 组在各时间点均明显高于 EN 组,在伤后 7~10 d 存在显著性差异(*P* 均 < 0.01)。见表 3。

2.4 烧伤大鼠肠黏膜血流量的变化:烧伤后两组动物肠黏膜血流量的变化差异较大,EN 组一直处于较低水平,而 GLN 组除伤后第 1 d 低于伤前外,从伤后 3 d 起基本恢复正常(*P* > 0.05)。两组相比,GLN 组大鼠肠黏膜血流量在伤后 3~10 d 均明显高于 EN 组(*P* 均 < 0.01)。见表 4。

表 1 烧伤大鼠肠黏膜线粒体 RCR 的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 1 Changes of RCR in mitochondria of intestinal epithelium cells after burn injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	伤后 1 d	伤后 3 d	伤后 5 d	伤后 7 d	伤后 10 d
GLN 组	3.02 ± 0.17**	3.88 ± 0.13**△	3.99 ± 0.21△	4.23 ± 0.24△△	3.88 ± 0.24△
EN 组	3.14 ± 0.21**	3.22 ± 0.21**	3.39 ± 0.25**	3.51 ± 0.28	3.55 ± 0.21

注:与 C 组 4.09 ± 0.22 比较:***P* < 0.01;与 EN 组比较:△*P* < 0.05,△△*P* < 0.01

表 2 烧伤大鼠肠黏膜线粒体 P/O 变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 2 Changes of P/O ratio in intestinal tissue after burn injury ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	伤后 1 d	伤后 3 d	伤后 5 d	伤后 7 d	伤后 10 d
GLN 组	2.12 ± 0.24**	2.45 ± 0.20△△	2.58 ± 0.18△△	2.81 ± 0.25△△	2.55 ± 0.18△△
EN 组	2.03 ± 0.24**	2.07 ± 0.12**	2.24 ± 0.21*	2.14 ± 0.23*	2.02 ± 0.16**

注:与 C 组 2.65 ± 0.25 比较:**P* < 0.05,***P* < 0.01;与 EN 组比较:△*P* < 0.01

表 3 烧伤大鼠肠组织 Oext 变化($\bar{x} \pm s, n=10$)Tab. 3 Changes of oxygen extraction ratio in intestinal tissue after burn injury($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	伤后 1 d	伤后 3 d	伤后 5 d	伤后 7 d	伤后 10 d
GLN 组	0.28±0.03**	0.33±0.02	0.35±0.03	0.41±0.02 ^{△△}	0.38±0.04 ^{△△}
EN 组	0.26±0.03**	0.29±0.02**	0.35±0.03	0.31±0.02**	0.30±0.02**

注: C 组 0.37±0.03 比较: ** $P<0.01$; 与 EN 组比较: ^{△△} $P<0.01$

表 4 烧伤大鼠肠黏膜血流量的变化($\bar{x} \pm s, n=10$)Tab. 4 Changes of intestinal mucosal blood flow after burn injury($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	伤后 1 d	伤后 3 d	伤后 5 d	伤后 7 d	伤后 10 d
GLN 组	88.67±5.98**	138.65±12.45 ^{△△}	148.54±10.32 ^{△△}	143.23±14.21 ^{△△}	151.23±11.47 ^{△△}
EN 组	90.37±2.82**	117.25±3.77**	123.87±4.35**	124.87±5.91**	122.47±9.87**

注: 与 C 组 (139.88±8.32)mV 比较: ** $P<0.01$; 与 EN 组比较: ^{△△} $P<0.01$

3 讨论

严重烧伤后肠道损害发生早、损伤重、持续时间长,其中肠黏膜能量代谢紊乱是引起肠道损害的重要原因之一^[10,11]。因此,如何改善烧伤后肠黏膜能量代谢状况是维护肠黏膜组织结构和屏障功能的重要一环。实验结果显示:严重烧伤后肠上皮细胞线粒体 ST3 降低,而 ST4 则增加,使 RCR 明显降低, P/O 在烧伤早期即下降,变化趋势与 RCR 相同。这表明线粒体的电子传递功能与氧化磷酸化功能均遭破坏,使 ATP 生成减少,而热能释放增多。由此我们推测线粒体呼吸功能受损可能与烧伤后全身高代谢反应及生物能量生成不足、浪费增多有关,这也可能是引发肠源性高代谢的重要原因^[12,13]。

线粒体是细胞有氧氧化的主要细胞器,良好的血供、组织内气体弥散和交换无异常以及线粒体 O₂ 利用无障碍是维持其正常生理功能的前提。实验结果显示,烧伤后肠黏膜血流量明显降低,肠道水肿明显,阻碍氧和营养物进入细胞及氧气在组织内的弥散,是线粒体呼吸功能受抑的重要原因。有报道,肠道单纯缺血、缺氧早期,线粒体呼吸功能轻微受损,机体代偿性增加氧摄取以维持细胞氧需求。当氧供进一步减少、增加氧摄取也难以满足细胞氧耗时,则发生病理性氧供依赖性耗氧,同时乏氧代谢加强,乳酸堆积而致细胞酸中毒,最终使线粒体呼吸功能损害,细胞氧摄取率下降^[14,15]。因此,缺血、缺氧是线粒体损害的主要原因之一,而线粒体功能紊乱又干扰了细胞氧的合理利用,两者互为因果,形成恶性循环。实际上,烧伤后组织器官受损的首要因素就是缺血、缺氧性损害。尽管积极的抗休克能够保证全身大循环血流动力学稳定,但是肠道的血供却不能有效恢复,肠上皮细胞线粒体长时间处于缺氧状态,其呼吸功能受损是必然的。

我们发现,谷氨酰胺强化的肠道营养能有效增

加肠黏膜血流量和氧摄取,改善肠黏膜组织氧合,减轻线粒体呼吸功能抑制程度,增加有氧代谢和 ATP 生成。其机制与谷氨酰胺能降低烧伤动物应激程度,使舒缩血管神经递质异常分泌状况得到改善,促进肠黏膜血流量恢复,有利于维持细胞正常的代谢有关^[16-19]。谷氨酰胺是肠道的基本能源物质,对维护肠黏膜细胞正常的组织结构和生理功能至关重要。我们通过电镜观察发现,谷氨酰胺能减轻烧伤大鼠肠上皮细胞线粒体受损程度,较烧伤对照组病理改变明显减轻,多以水肿、脱颗粒、嵴突减少等为主,未发现嵴断裂、胞浆溶解、质膜破裂以及线粒体空化等坏死性病变(另文报道)。由于使用谷氨酰胺的烧伤动物肠黏膜上皮细胞线粒体组织结构得到了有效保护,其生理功能明显优于普通肠道营养支持的动物。

参考文献:

- 1 王甲汉,张会堂,杨宗城,等. 严重烧伤休克期切痂对肠黏膜损伤的影响[J]. 中国危重病急救医学,2000,12(12):736-738.
- 2 李鸣真. 肠道细菌和内毒素的易位[J]. 中国危重病急救医学,1998,10(12):764-767.
- 3 汪亚玲,李超,李志伟,等. 肠内营养加肠外营养支持对危重患者胃肠道的保护作用[J]. 中国危重病急救医学,2001,13(4):236.
- 4 彭曦,冯晋斌,汪仕良,等. 不同营养支持途径对烧伤大鼠肠上皮细胞线粒体呼吸功能的影响[J]. 第三军医大学学报,2003,25(14):764-767.
- 5 彭曦,尤忠义,汪仕良,等. 谷氨酰胺保护严重烧伤病人肠黏膜屏障功能的研究[J]. 肠外与肠内营养,2001,8(4):205-207.
- 6 Houdijk A P, Leeuwen P A. Glutamine-enriched enteral nutrition in multiple trauma patients [J]. Nutrition, 2000, 16(1): 70-71.
- 7 Boelens P G, Houdijk A P, Henk J M, et al. Glutamine-enriched enteral nutrition decreases infectious complications in trauma patients [J]. Am J Clin Nutr, 2002, 76(1): 253-254.
- 8 Li J Y, Lu Y, Hu S, et al. Preventive effect of glutamine on intestinal barrier dysfunction induced by severe trauma [J]. World J Gastroenterol, 2002, 8(1): 168-171.
- 9 彭曦,冯晋斌,尤忠义,等. 严重烧伤对大鼠肠上皮细胞线粒体呼吸功能的影响[J]. 基础医学与临床,2003,23(2):154-156.
- 10 王水明,刘友生. 血小板激活因子在烧伤合并内毒素血症早期肠黏膜损害中的作用[J]. 中国危重病急救医学,2000,12(2):

- 93-95.
- 11 李志军, 汤日波, 张万祥. 肠道屏障功能损害与 SIRS/MODS 的发生及其防治[J]. 中国危重病急救医学, 2000, 12(12): 756-768.
 - 12 彭曦, 汪仕良, 陶凌辉, 等. 烧伤后清洁肠道与肠源性高代谢的实验研究[J]. 中华烧伤杂志, 2001, 17(4): 207-209.
 - 13 王涛, 黎洁良, 陆连荣, 等. 丙氨酰谷氨酰胺对创伤后肠黏膜屏障的修复作用研究[J]. 中国危重病急救医学, 1998, 10(3): 170-173.
 - 14 Velasco N, Hernandez G, Wainstein C, et al. Influence of polymeric enteral nutrition supplemented with different doses of glutamine on gut permeability in critically ill patients [J]. Nutrition, 2001, 17(12): 907-911.
 - 15 姜小国, 胡森. 线粒体功能障碍与脓毒性休克及其预后有关[J]. 中国危重病急救医学, 2002, 14(10): 624.
 - 16 Savy G K. Glutamine supplementation: heal the gut, help the patient[J]. J Infus Nurs, 2002, 25(1): 65-69.
 - 17 Neri A, Mariani F, Piccolomini A, et al. Glutamine-supplemented total parenteral nutrition in major abdominal surgery [J]. Nutrition, 2001, 17(12): 968-969.
 - 18 Wilmore D W. The effect of glutamine supplementation in patients following elective surgery and accidental injury [J]. J Nutr, 2001, 131(9 Suppl): 2543S-2549S.
 - 19 Hammarqvist F, Sandgren A, Andersson K, et al. Growth hormone together with glutamine - containing total parenteral nutrition maintains muscle glutamine levels and results in a less negative nitrogen balance after surgical trauma [J]. Surgery, 2001, 129(5): 576-586.

(收稿日期: 2003-06-30 修回日期: 2004-01-02)

(本文编辑: 李银平)

• 经验交流 •

危重病患者高位前路颈内静脉穿刺置管术的临床应用

任万陆 周丽媛

【关键词】 颈内动脉穿刺置管术; 危重病

中图分类号: R459.7 文献标识码: B 文章编号: 1003-0603(2004)02-0096-01

颈内静脉穿刺置管术是抢救危重病患者的的重要手段, 它既可以测量中心静脉压, 同时也是输血、补液、各种治疗用药以及肠外营养的通路。颈内静脉穿刺入路有十几种, 孰优孰劣, 各家报道不一。近 2 年我院采用高位前路颈内静脉穿刺置管术对 200 例危重病患者进行抢救, 取得了良好效果, 现报道如下。

1 病例与方法

1.1 病例: 200 例危重病患者中男 112 例, 女 88 例; 年龄 22~95 岁; 普外科 106 例, 泌尿科 24 例, 血管外科 14 例, 脑系科 10 例, 骨科 12 例, 妇产科 5 例, 内科 26 例, ICU 3 例; 右颈内静脉穿刺 191 例, 左颈内静脉穿刺 9 例。

1.2 穿刺置管方法: 患者仰卧位, 头低 25°, 肩部垫起, 头后仰使颈部充分伸展, 面部略转向对侧, 操作者站在患者头侧, 以左手食指和中指于胸锁乳突肌的中点前缘(相当甲状软骨上缘)水平触及颈总动脉搏动, 并向内侧推开颈总动脉, 在颈总动脉外缘处进针, 针干与身体冠状面呈 30°~40°角, 针尖指向锁骨切迹或与中线呈 15°夹角, 进针深度 2~4 cm, 即可进入颈内静脉。如果进针深度过深, 那

么有可能穿中椎动脉, 应加以避免。如果未穿中颈内静脉, 针尖退至皮下, 改变方向, 指向与中线呈 45°夹角方向进针, 常常能够进入颈内静脉。穿刺针与中线夹角不应超过 45°。

2 结果

本组患者穿刺置管一次成功率 91% (182 例), 2 次成功率 7% (14 例), 3 次成功率 2% (4 例), 无一例失败, 成功率 100%。进针深度 (3.18±0.67) cm。未见气胸、血胸、颈部巨大血肿、神经损伤、空气栓塞等并发症的发生。

3 讨论

因颈内静脉穿刺置管较锁骨下静脉穿刺置管出现的并发症较少, 且相对较轻, 所以, 经颈内静脉穿刺置管的应用日趋广泛。颈内静脉是硬脑膜乙状窦的直接延续, 于颅底出颈静脉孔成为颈内静脉, 与颈动脉及迷走神经共同被包裹在颈动脉鞘内。颈内静脉起始部位位于颈动脉后方稍外侧, 然后降至该动脉的前外侧, 在胸锁关节后方与锁骨下静脉汇合成无名静脉。颈内静脉穿刺有多种入路, 按位置高低可分为高位和低位。在胸锁乳突肌前缘进针称为前路, 在胸锁乳突肌胸骨头与胸锁乳突肌胸骨头交点进针称为中路, 在胸锁乳突肌后缘进针称为后路^[1]。本组患者采用高位前路穿刺置

管, 操作上应注意: 在甲状软骨上缘水平触摸颈动脉搏动, 然后在颈动脉旁进针, 针尖指向锁骨切迹。该法穿刺点定位比较容易, 穿刺目标明确, 因而, 穿刺成功率比较高。

如何避免并发症是经皮中心静脉穿刺置管术安全应用的重要问题。因为本方法进针点位置比较高, 所以无一例并发症发生, 与 Latto 等^[2]报告的结果一致。由于在颈动脉旁进针, 动脉位置明确, 所以不易穿刺到颈总动脉。只有 3 例在早期由于进针深度过深而穿刺到椎动脉, 经局部压迫未见血肿, 后来严格控制进针深度未再发生。

高位前路颈内静脉穿刺置管术具有成功率高、并发症少的特点, 是中心静脉穿刺置管的较好入路之一。但无论采用何种入路, 操作者都应熟悉周围解剖并具有熟练的操作技术。

参考文献:

- 1 Michael Rosen, 主编. 何孔源, 译. 中心静脉插管术[M]. 第 1 版. 北京: 中国医药科技出版社, 1990. 109.
- 2 Latto I P, Hughes J A, Falconer R J, et al. AN assessment of an alternative method of internal jugular vein catheterisation[J]. Anaesthesia, 1992, 47(12): 1047-1050.

(收稿日期: 2003-12-10)

(本文编辑: 李银平)

作者单位: 300050, 天津市天和医院

作者简介: 任万陆 (1967-), 男 (汉族), 天津市人, 主治医师。