

大黄联合谷氨酰胺对大鼠肠黏膜屏障损伤后修复的实验研究

王晓锋¹, 沈耀亮¹, 郑峰¹, 叶宏伟¹, 陈德昌²

(1. 江苏省常熟市第一人民医院重症医学科, 苏州大学附属常熟医院, 江苏 常熟 215500;

2. 第二军医大学附属长征医院, 上海 200003)

【摘要】目的 观察大黄、谷氨酰胺联合应用对创伤致大鼠肠黏膜损伤的修复作用。**方法** 50 只雄性健康 SD 大鼠按随机数字表法分为正常对照组 (C 组)、单纯肠内营养组 (EN 组)、大黄肠内营养组 (R-EN 组)、谷氨酰胺肠内营养组 (G-EN 组)、大黄联合谷氨酰胺肠内营养组 (R-G-EN 组) 5 组, 每组 10 只。C 组大鼠不进行任何处理, 正常饲养。EN、R-EN、G-EN、R-G-EN 组行盲肠切除 + 胃造口置管术, 手术当时及术后 1 d 两次分别给予阿莫西林 50 mg/d + 甲硝唑 20 mg 进行干预。术后 1 d 起各组给予同一剂型等氮等热卡肠内营养液连续营养支持 7 d, 7 d 后各组大鼠腹腔麻醉开腹取肠段 1 cm (均于末段回肠 5 cm 处取标本), 光镜下观察肠黏膜形态改变 (包括绒毛高度、黏膜厚度); 采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测各组血浆瓜氨酸及 D-乳酸水平, 用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测各组肿瘤坏死因子 (TNF- α) 水平。**结果** EN 组、R-EN 组、G-EN 组、R-G-EN 组 D-乳酸、TNF- α 水平均明显高于 C 组 (均 $P < 0.01$); R-G-EN 组血浆瓜氨酸 ($\mu\text{mol/L}$: 16.13 ± 0.58 比 14.52 ± 0.28) 水平明显高于 R-EN 组 ($P < 0.05$), 血浆 D-乳酸 (mmol/L : 3.12 ± 0.56 比 3.62 ± 0.52)、TNF- α (ng/L : 2.82 ± 0.62 比 3.54 ± 0.49) 水平明显低于 G-EN 组 (均 $P < 0.05$)。EN 组肠黏膜绒毛高度 (μm : 126.50 ± 6.31 比 175.67 ± 11.91)、黏膜厚度 (μm : 223.67 ± 11.94 比 277.00 ± 14.06) 以及血浆瓜氨酸水平 ($\mu\text{mol/L}$: 13.25 ± 0.36 比 15.67 ± 0.55) 均明显低于 C 组, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$); R-EN 组、G-EN 组、R-G-EN 组上述各指标均较 EN 组明显提高 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 但 3 组间绒毛高度和黏膜厚度差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。**结论** 大黄与谷氨酰胺联合应用能保护胃肠黏膜, 减轻炎症反应水平, 提高血浆瓜氨酸水平, 更有助于胃肠手术后大鼠胃肠黏膜屏障功能的修复。

【关键词】 肠内营养; 大黄; 谷氨酰胺; 血浆瓜氨酸; 中西医结合疗法

A research on effects of rhubarb combined with glutamine on repair of gut mucosal barrier injury in rats
WANG Xiao-feng*, SHEN Yao-liang, ZHENG Feng, YE Hong-wei, CHEN De-chang. *Department of Critical Care Medicine, Changshu First People's Hospital, Changshu 215500, Jiangsu, China

Corresponding author: CHEN De-chang, Changzheng Hospital Affiliated to the Second Military University, Shanghai 200003, China, Email: 18918590002@163.com

【Abstract】Objective To investigate the effects of rhubarb combined with glutamine on repair of gut mucosal barrier injury after gastrointestinal surgery in rats. **Methods** Fifty male healthy Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into five groups: control (C group), enteral nutrition (EN group), rhubarb with EN (R-EN group), glutamine with EN (G-EN group) and rhubarb combined with glutamine and EN (R-G-EN group) groups (each $n=10$). The rats of C group received no treatment and were fed normally. Cecectomy and gastrostomy were performed in EN, R-EN, G-EN and R-G-EN groups, and in 24 hours after surgery, they were interfered with the use of amoxicillin 50 mg/d and metronidazole 20 mg twice a day. From the first day after operation, each group was treated with the same prescription of enteral isocaloric and isonitrogenous nutrition for consecutive 7 days. Seven days later, under anaesthesia, laparotomy was performed, and a specimen of 1 cm intestinal segment was taken from the terminal 5 cm long ileum for all the groups; under the light microscope, the morphological examination of intestinal mucosal epithelial tight junctions (including villus height and mucosal thickness) was carried out. For each group, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the levels of plasma citrulline and D-lactate, and the serum concentration of TNF- α was detected by utilizing double antibody ABC-ELISA. **Results** The levels of D-lactate and TNF- α in EN, R-EN, G-EN and R-G-EN groups were obviously higher than those in C group (all $P < 0.01$). The level of plasma citrulline ($\mu\text{mol/L}$: 16.13 ± 0.58 vs. 14.52 ± 0.28) of R-G-EN group was remarkably higher than that in R-EN group ($P < 0.05$), and its levels of serum D-lactate (mmol/L : 3.12 ± 0.56 vs. 3.62 ± 0.52) and TNF- α (ng/L : 2.82 ± 0.62 vs. 3.54 ± 0.49) were markedly lower than those of G-EN group (both $P < 0.05$). The mucosal villus height (μm : 126.50 ± 6.31 vs. 175.67 ± 11.91), mucosal thickness (μm : 223.67 ± 11.94 vs. 277.00 ± 14.06) and the level of plasma citrulline ($\mu\text{mol/L}$: 13.25 ± 0.36 vs. 15.67 ± 0.55) in EN group were obviously lower than those of C group (all $P < 0.01$); the above indexes of R-EN, G-EN and R-G-EN groups were higher than those of EN group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but in the comparisons of the villus height and mucosal thickness among the three groups there were no statistical significant differences (all $P > 0.05$). **Conclusion** The application of rhubarb combined with

glutamine can protect gut mucosa, reduce the level of inflammatory reaction and elevate the level of plasma citruline, that is beneficial to the repair of gut mucosal barrier injury and its functional recovery after gastrointestinal surgery in rats.

【Key words】 Enteral nutrition; Rhubarb; Glutamine; Plasma citruline; Integrated traditional Chinese and western medicine therapy

胃肠道是人体最大和最复杂的器官之一,近些年研究表明,胃肠道不仅仅是一个营养消化器官,而且在内分泌、免疫以及屏障功能等方面具有重要作用^[1-2]。一旦胃肠功能衰竭,一方面内环境平衡破坏,营养代谢障碍;另一方面肠黏膜屏障受损,引起肠源性感染和内毒素血症,后者可能是促进多器官功能障碍综合征(MODS)发生发展的重要因素^[3-4]。既往研究证实,大黄、谷氨酰胺具有改善胃肠功能障碍、保护胃肠黏膜屏障的作用^[5]。本研究旨在通过建立肠黏膜屏障损伤动物模型,观察联合应用大黄、谷氨酰胺对肠黏膜屏障的保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组: 50 只 SD 雄性大鼠,体质量 200~220 g,由苏州大学医学院动物中心提供,动物合格证号: SCXK(沪)2012-0003。用随机数字表法将大鼠分为正常对照组(C组)、单纯肠内营养组(EN组)、大黄肠内营养组(R-EN组)、谷氨酰胺肠内营养组(G-EN组)、大黄+谷氨酰胺肠内营养组(R-G-EN组)5组,每组均为 10 只大鼠。

1.2 动物模型建立: C组不进行任何处理,给予大鼠专用饲料(苏州大学医学院动物中心提供)喂养。其余 4 组大鼠适应性喂养 2 d 后,术前禁食 12 h、不禁水,给予戊巴比妥注射液 40 mg/kg 腹腔麻醉,参照赵明利^[6]介绍的方法进行部分盲肠切除+胃造口置管术,造瘘管一端置于十二指肠内,另一端经皮下隧道置于大鼠颈背部中央区域固定,以免大鼠啃咬。术后大鼠停止自由进食,可自由饮水,手术当时及术后 1 d 两次分别给予阿莫西林 50 mg、甲硝唑 20 mg 加生理盐水 1 mL 充分混匀后由胃造瘘管注入以改变大鼠肠道正常菌群。

本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.3 营养液配置及标本采集: 肠内营养为瑞代营养液(华瑞制药公司提供),按 731.5 kJ·kg⁻¹·d⁻¹ 供给,各组等氮等热卡;大黄(上海香山中医医院提供)碾磨成粉加生理盐水 1 mL 混匀,按 50 mg/kg 由造瘘管注入,每天 3 次;谷氨酰胺(华瑞制药公司提供)按 0.3 g·kg⁻¹·d⁻¹ 加到肠内营养液中。肠内营养液采用微量输液泵输注,24 h 内输注完毕,连续喂养 7 d。正常对照组于入组后第 8 天,其余 4 组于连续

喂养 7 d(第 8 天)腹腔麻醉后采集相关标本。

1.4 血液标本获取及指标观察: 取下腔静脉血,离心后分离血浆备用。

1.4.1 血浆瓜氨酸、D-乳酸水平测定: 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血浆中瓜氨酸和 D-乳酸水平,试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司,操作步骤严格按试剂盒说明书进行。

1.4.2 肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平测定: 采用双抗体夹心 ABC-ELISA 检测血浆 TNF-α 水平,试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,操作步骤严格按试剂盒说明书进行。

1.5 肠黏膜形态观察: 处死大鼠后距末段回肠 5 cm 处取回肠段约 1 cm,生理盐水冲洗,10% 甲醛水溶液固定后石蜡包埋,切片后苏木素-伊红(HE)染色,显微镜下测量绒毛高度和黏膜厚度。每只大鼠分别测量 6 个绒毛,取均值。

1.6 统计学方法: 计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用两样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析;计数资料比较采用 χ^2 检验校正公式;采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆瓜氨酸水平(表 1): 与 C 组比较,EN 组、R-EN 组血浆瓜氨酸水平明显降低($P < 0.01$ 和 $P < 0.05$);与 EN 组比较,R-EN 组、G-EN 组、R-G-EN 组血浆瓜氨酸水平均明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);G-EN 组、R-G-EN 组血浆瓜氨酸水平高于 R-EN 组(均 $P < 0.05$);而 G-EN 组、R-G-EN 组血浆瓜氨酸水平组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠血浆瓜氨酸、D-乳酸、TNF-α 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	血浆瓜氨酸 (μmol/L)	D-乳酸 (mmol/L)	TNF-α (ng/L)
C 组	10	15.67±0.55	2.82±0.48	0.75±0.52
EN 组	10	13.25±0.36 ^a	4.21±0.38 ^a	4.68±1.82 ^a
R-EN 组	10	14.52±0.28 ^{bc}	3.18±0.62 ^{ad}	3.21±0.38 ^{ad}
G-EN 组	10	15.53±0.35 ^{de}	3.62±0.52 ^{ac}	3.54±0.49 ^{ac}
R-G-EN 组	10	16.13±0.58 ^{de}	3.12±0.56 ^{ad}	2.82±0.62 ^{ad}

注:与 C 组比较,^a $P < 0.01$,^b $P < 0.05$;与 EN 组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$;与 R-EN 组比较,^e $P < 0.05$;与 G-EN 组比较,^f $P < 0.05$

2.2 血浆 D-乳酸、TNF- α 水平 (表 1):与 C 组比较, EN 组、R-EN 组、G-EN 组、R-G-EN 组 D-乳酸、TNF- α 水平均明显升高 (均 $P < 0.01$); 与 EN 组比较, R-EN 组、G-EN 组、R-G-EN 组 D-乳酸和 TNF- α 水平明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); G-EN 组血浆 D-乳酸、TNF- α 水平略高于 R-EN 组, 但明显高于 R-G-EN 组 (均 $P < 0.05$); 而 R-EN 组、R-G-EN 组血浆 D-乳酸、TNF- α 水平组间比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

2.3 肠黏膜形态变化 (表 2):与 C 组比较, EN 组大鼠肠黏膜绒毛高度、黏膜厚度明显降低 (均 $P < 0.01$); 与 EN 组比较, R-EN 组、G-EN 组、R-G-EN 组肠黏膜绒毛高度、黏膜厚度均明显增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); R-EN 组、G-EN 组、R-G-EN 组绒毛高度、黏膜厚度比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

表 2 各组大鼠肠黏膜形态参数指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	绒毛高度 (μm)	黏膜厚度 (μm)
C 组	10	175.67 $\pm$ 11.91	277.00 $\pm$ 14.06
EN 组	10	126.50 $\pm$ 6.31 ^a	223.67 $\pm$ 11.94 ^a
R-EN 组	10	162.33 $\pm$ 10.86 ^{ac}	254.17 $\pm$ 11.03 ^{ac}
G-EN 组	10	160.50 $\pm$ 11.59 ^{ad}	254.00 $\pm$ 10.88 ^{ad}
R-G-EN 组	10	158.17 $\pm$ 19.40 ^{bc}	265.67 $\pm$ 12.30 ^{bc}

注: 与 C 组比较, ^a $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$; 与 EN 组比较, ^c $P < 0.01$, ^d $P < 0.05$

3 讨论

中药大黄具有攻积泻火、荡涤肠胃、清热解毒、凉血化瘀等功效, 对危重患者胃肠功能具有保护作用^[7-10]。本课题组既往研究发现, 大黄具有促进胃肠道蠕动、清除氧自由基、抑制 TNF- α 水平、增加胃肠黏膜血流量、维护肠黏膜屏障完整性等作用^[10-12]。谷氨酰胺是人体血浆和组织中含量最丰富的游离氨基酸^[13], 肠黏膜主要以谷氨酰胺为燃料, 在创伤、烧伤、感染等应激状况下, 体内谷氨酰胺消耗增加, 自身合成的谷氨酰胺不能满足代谢需要, 体内谷氨酰胺耗竭反过来又会造成肠黏膜萎缩、通透性增加, 肠道细菌和毒素突破肠黏膜造成细菌移位^[14-16]。吕尚军等^[17]采用不同营养支持途径给予烧伤致肠黏膜屏障功能损伤大鼠谷氨酰胺后发现, 外源性补充谷氨酰胺可以减轻胃肠黏膜屏障的损伤, 提高肠黏膜屏障功能和减少细菌移位。本实验采用盲肠切除 + 胃造口置管术联合阿莫西林 + 甲硝唑术后使用改变大鼠肠道正常菌群, 影响了大鼠肠黏膜的结构和功能, 使大鼠黏膜屏障遭到破坏, 有

效形成了肠黏膜屏障损伤动物模型。该模型成熟稳定, 能有效造成肠黏膜屏障损伤, 动物存活时间有保障, 便于采集标本; 同时该模型也贴近临床外科胃肠手术患者情况。

研究发现, 血浆瓜氨酸水平主要与肠黏膜上皮细胞数量与功能相关, 因此可以作为监测肠道功能的一项敏感的指标^[18-20]; 血浆 D-乳酸水平可以及时反映肠黏膜上皮细胞通透性变化及肠黏膜屏障功能的损伤程度^[21-22]; TNF- α 是一种重要的炎症介质, 可增加肠上皮细胞膜的通透性, 降低肠上皮细胞屏障的跨上皮电阻^[23]。因此, 血浆中 3 种物质的水平检测, 可以从不同角度反映肠黏膜损伤程度。

本研究发现, R-EN 组、G-EN 组、R-G-EN 组肠黏膜绒毛高度和黏膜厚度以及血浆瓜氨酸、D-乳酸、TNF- α 水平均与 EN 组有明显差异, 表明大黄、谷氨酰胺具有改善胃肠功能障碍、保护胃肠黏膜屏障的作用; R-G-EN 组与 R-EN 组血浆瓜氨酸水平相比有明显差异, 显示大黄与谷氨酰胺联合应用较单独应用大黄强化的肠内营养在提高血浆瓜氨酸水平、维持肠黏膜上皮细胞数量与功能方面更具优势。R-G-EN 组与 G-EN 组相比血浆 D-乳酸、TNF- α 水平有明显差异, 显示大黄与谷氨酰胺联合应用较单独应用谷氨酰胺强化的肠内营养在维持肠黏膜上皮细胞通透性、降低炎症反应水平方面更具优势。R-G-EN 组与 R-EN 组和 G-EN 组相比均存在不同优势, 这可能与大黄与谷氨酰胺联合使用时两种不同药物发挥各自作用甚至协同作用有关, 进一步相关研究有待展开。

综上所述, 大黄联合谷氨酰胺强化的肠内营养更有利于保护肠黏膜上皮细胞通透性, 维持肠黏膜上皮细胞数量和功能^[24-26], 降低炎症反应水平, 因而更有利于大鼠肠黏膜损伤后的修复。

参考文献

- [1] Reintam A, Parm P, Kitus R, et al. Gastrointestinal failure score in critically ill patients: a prospective observational study. Crit Care, 2008, 12 (4): R90.
- [2] Lam SW, Nguyen NQ, Ching K, et al. Gastric feed intolerance is not increased in critically ill patients with type II diabetes mellitus. Intensive Care Med, 2007, 33 (10): 1740-1745.
- [3] 次秀丽, 王宝恩, 张淑文, 等. 肿瘤坏死因子和内毒素致大鼠肠黏膜屏障损伤的中药治疗研究. 中国危重病急救医学, 1999, 11 (5): 262-265.
- [4] 侯杰, 郭应军, 王国军, 等. 合理应用大黄及其复方开启危重患者肠道功能的研究. 中国中西医结合急救杂志, 2006, 13 (3): 185-186.
- [5] 常晓, 王琳琳. 大黄及谷氨酰胺治疗胃肠功能障碍的研究进展. 医学综述, 2006, 12 (23): 1464-1465.
- [6] 赵明利. 益生元对胃肠手术后肠黏膜屏障功能保护作用的基

- (收稿日期: 2013-10-09)

(本文编辑:李银平)

欢迎订阅 欢迎投稿

国家级杂志《中国中西医结合急救杂志》

中文核心期刊 中国科技论文统计源期刊 影响因子排第一

本刊已加入万方数据独家合作体系,本刊 2009 年以后的杂志在中国知网上无法查询,请登陆万方数据(<http://www.wanfangdata.com.cn>) 或万方医学网(<http://med.wanfangdata.com.cn>) 查询或下载。本刊有电子中文杂志,网址为 <http://www.cccm-em120.com>,可在线阅读本刊各年度的期刊文章,并可下载。

(本刊编辑部)