

· 短篇论著 ·

丙氨酰谷氨酰胺对脓毒症大鼠心肌的作用

武岳 周军利 杜玲玲 邓津菊 张莉

烧伤脓毒症和以脓毒症为始动因素的 MODS 是造成烧伤患者死亡的主要原因,因此寻找其治疗途径尤为迫切。谷氨酰胺作为一种具有特殊作用的免疫营养素,近年来已成为研究的热点。本研究采用盲肠结扎穿孔 (CLP) 法制作大鼠脓毒症模型,观察丙氨酰谷氨酰胺对大鼠心肌是否具有保护效应,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂和仪器

丙氨酰谷氨酰胺注射液购自美国 Sigma 公司。乳酸脱氢酶 (LDH) 检测试剂盒、肌酸激酶 (CK) 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,肌钙蛋白 I (TnI) 检测试剂盒购自美国 Lifekey 生物医学公司,原位缺口末端标记 (TUNEL) 检测试剂盒购自美国罗氏公司。ELx800 型酶标仪购自美国佰腾公司,ZPM-200 型光学显微镜购自上海宙山精密光学仪器有限公司。

1.2 动物模型制作及分组

清洁级健康成年 Wistar 大鼠 42 只,雌雄各半,体质量为 (220 ± 20) g,由第三军医大学实验动物中心提供。各组大鼠经适应性饲养 1 周后,按随机数字表法分为 3 组,其中假手术组 10 只、手术组 16 只、谷氨酰胺组 16 只,分别行如下处理:(1)假手术组仅开腹翻动盲肠。(2)手术组和谷氨酰胺组按 Singleton 和 Wischmeyer^[1]报道的方法,用 4-0 丝线于靠近回盲端结扎占盲肠全长 25% 的肠段,同时保证肠道通畅。用 21 G 规格的三角针头分别于盲肠近端和末端各穿 1 个孔,挤出少量肠内容物,将盲肠放回腹腔,逐层关腹。术后即刻于腹腔内注射生理盐水,30 mL/kg。

术后 10 min 内,谷氨酰胺组大鼠尾静脉注射 0.13 g/mL 的丙氨酰谷氨酰胺 (0.75 g/kg),假手术组和手术组尾静脉注射等体积的生理盐水。术后约 40 min 大鼠苏醒,单笼饲养,自由饮水及进食。

1.3 标本采集与处理

术后 6 h,以 70 g/L 的水合氯醛溶液麻醉各组大鼠,经腹主动脉采血 2 mL,置入消毒 EP 管中,4 °C 冰箱放置凝固后,以 8000 × g 离心 5 min,取上层血清,-20 °C 保存备用。另取各组大鼠心肌组织,制作 3 μm 厚石蜡切片待检。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 血清 LDH 活力检测 取各组大鼠血清标本,按试

剂盒说明书操作,于 440 nm 波长处测定吸光度值,按以下公式计算 LDH 活力。LDH 活力 (U/L) = (实验测定管吸光度值 - 空白测定管吸光度值) ÷ (标准管吸光度值 - 空白标准管吸光度值) × 2000 (U/L)。

1.4.2 血清 CK 活力检测 取各组大鼠血清标本,按试剂盒说明书操作,于 660 nm 波长处测定吸光度值,按以下公式计算 CK 活力。CK 活力 (U/L) = (实验测定管吸光度值 - 空白测定管吸光度值) ÷ (标准管吸光度值 - 空白标准管吸光度值) × 标准品酶活力 (U/L)。

1.4.3 血清 TnI 水平检测 取各组大鼠血清标本,按试剂盒说明书操作,测定 450 nm 波长处吸光度值,据此在标准曲线上查出 TnI 浓度 (ng/mL)。

1.4.4 心肌细胞凋亡检测 取各组大鼠心肌组织,按 TUNEL 试剂盒说明书操作检测心肌凋亡细胞。于 400 倍光学显微镜下观察,每张切片随意选取 5 个视野,分别计数心肌凋亡细胞数和心肌细胞总数,按照如下公式计算细胞凋亡指数 (AI)。AI = 5 个视野中凋亡细胞数 ÷ 5 个视野中总细胞数 × 100%。

1.5 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 LDH、CK 活力与 TnI 水平

术后 6 h,手术组大鼠血清 LDH、CK 活力及 TnI 水平较假手术组明显升高 (P 值均小于 0.01),谷氨酰胺组血清 LDH、CK 活力以及 TnI 水平较手术组明显降低 (P 值均小于 0.01)。见表 1。

表 1 术后 6 h 大鼠血清乳酸脱氢酶、肌酸激酶活力与肌钙蛋白 I 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数	乳酸脱氢酶 (U/L)	肌酸激酶 (U/L)	肌钙蛋白 I (ng/mL)
假手术组	10	286 ± 15 ^a	317 ± 7 ^a	1.33 ± 0.27 ^a
手术组	16	766 ± 11	798 ± 5	4.27 ± 0.29
谷氨酰胺组	16	532 ± 11 ^a	563 ± 7 ^a	2.98 ± 0.41 ^a
F 值		32.51	25.12	4.13

注:与手术组比较,^a $P < 0.01$

2.2 心肌细胞凋亡情况

术后 6 h,手术组大鼠心肌中可见较多凋亡细胞 (棕黄色颗粒),AI 为 2.98 ± 0.35,较假手术组 (0.21 ± 0.16) 明显增加。谷氨酰胺组 AI 为 1.48 ± 0.26,心肌凋亡细胞较手术组明显减少 ($F = 1.52, P < 0.01$)。见图 1。

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2012.04.026

基金项目:甘肃省技术与开发专项计划(1004TCYA044)

作者单位:730000 银川,宁夏医科大学临床学院(武岳);甘肃省人民医院烧伤科(周军利、杜玲玲、邓津菊、张莉)

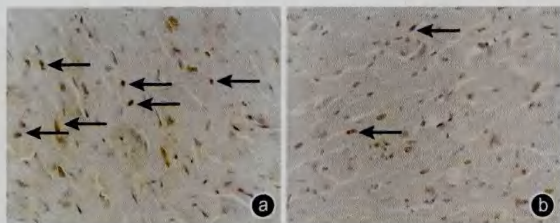


图 1 手术组和谷氨酰胺组大鼠术后 6 h 心肌细胞凋亡情况原位缺口末端标记 $\times 400$ 。a. 手术组心肌凋亡细胞较多 (\leftarrow); b. 谷氨酰胺组心肌凋亡细胞 (\leftarrow) 少于手术组

3 讨论

脓毒症是烧(创)伤、休克、大手术后及其他临床危重症的主要并发症之一,进一步发展可导致脓毒性休克及 MODS^[2]。尽管近年来在脓毒症的防治方面取得许多进展,但脓毒症病死率仍居高不下。脓毒症发病机制复杂,临床救治困难,涉及感染、炎症、免疫、凝血及组织损害等一系列基本问题,并与机体多系统、多器官病理生理改变密切相关^[3]。脓症患者易出现心肌损害,近 50% 脓症患者出现不同程度心肌抑制,病死率可高达 70% ~ 90%^[4]。脓毒症的主要危害是通过直接或间接激活心脏血管内皮细胞,促使其释放大量的细胞因子^[5],导致心肌细胞脂质过氧化和氧自由基生成增多,进一步引起心脏血管内皮细胞以及心肌细胞结构和功能的损伤。

LDH、CK 均为目前常用的心肌损害相关酶学检查指标,其血清含量变化可反映药物对心肌是否具有保护作用。本研究结果显示,手术组和谷氨酰胺组大鼠 LDH 和 CK 活力明显高于假手术组,而谷氨酰胺组的 LDH 和 CK 活力明显低于手术组,表明丙氨酰谷氨酰胺能够明显减轻脓毒症引起的心肌组织损伤。有研究表明,与心肌型肌酸激酶同工酶相比,血清 TnI 水平可以更好地预测脓毒性休克患者的心肌损害情况^[6]。本实验中,手术组和谷氨酰胺组大鼠 TnI 水平明显高于假手术组,而谷氨酰胺组的 TnI 水平明显低于手术组。提示脓毒症大鼠心肌组织受到损害,而丙氨酰谷氨酰胺能够明显减轻这一损伤。

凋亡是细胞的程序性死亡,在脓毒症发病过程中起着至关重要的作用。Lancel 等^[7]报道,内毒素可以诱导脓毒症大鼠心肌细胞中 ATP、磷酸肌酸、糖原生成减少,激活凋亡通路,从而引起细胞凋亡。本研究结果显示,谷氨酰胺组大鼠心肌细胞 AI 较手术组明显减少,提示丙氨酰谷氨酰胺通过抑制心肌细胞凋亡,从而发挥对心肌的保护作用。目前营养的观念正逐步由营养支持向营养治疗转变,谷氨酰胺作为一种免疫营养素,已被证实对脓毒症中肝、肾等脏器具有保护作用^[8,9]。丙氨酰谷氨酰胺通过何种具体机制来抑制心肌细胞凋亡,还有待进一步研究。

参考文献

- [1] Singleton KD, Wischmeyer PE. Effects of HSP70. 1/3 gene knock-out on acute respiratory distress syndrome and the inflammatory response following sepsis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290(5):L956-L961.
- [2] 姚咏明, 盛志勇. 脓毒症防治学. 北京: 科学技术文献出版社, 2008;13-25.
- [3] 盛志勇, 姚咏明. 脓毒症与多器官功能障碍综合征. *中华急诊医学杂志*, 2003, 12(10):653-654.
- [4] Flierl MA, Rittirsch D, Huber-Lang MS, et al. Molecular events in the cardiomyopathy of sepsis. *Mol Med*, 2008, 14(5/6):327-336.
- [5] 陈艳明, 王士雯. 脓毒症时心功能损害机制的研究进展. *心脏杂志*, 2009, 21(1):122-123.
- [6] Lodha R, Arun S, Vivekanandhan S, et al. Myocardial cell injury is common in children with septic shock. *Acta Paediatr*, 2009, 98(3):478-481.
- [7] Lancel S, Petillot P, Favory R, et al. Expression of apoptosis regulatory factors during myocardial dysfunction in endotoxemic rats. *Crit Care Med*, 2005, 33(3):492-496.
- [8] Hu YM, Pai MH, Yeh CL, et al. Glutamine administration ameliorates sepsis-induced kidney injury by downregulating the high-mobility group box protein-1-mediated pathway in mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2012, 302(1):F150-F158.
- [9] Sena JI, Guimarães SB, Vasconcelos PR. Metabolic changes induced by pre-administration of L-alanyl-glutamine and omega-3 in Wistar rats subjected to sepsis. *Acta Cir Bras*, 2010, 25(6):529-534.

(收稿日期:2011-12-16)

(本文编辑:罗勤 梁光萍)

手术联合支具治疗小儿烧伤后手掌侧瘢痕挛缩

侯春胜 雷晋

瘢痕防治是现代医学的难题^[1,2]。小儿手掌侧深度烧伤导致的瘢痕增生挛缩易继发屈肌腱短缩,对手功能、外形及发育影响较大,且其治疗观察是一个漫长过程。2001 年 4 月—2011 年 4 月,我们采用手术联合支具治疗小儿烧伤后

手掌侧瘢痕挛缩 114 例(162 只患手),疗效较好。

1 对象与方法

1.1 临床资料

本组患儿中男 80 例(共计 122 只患手)、女 34 例(共计 40 只患手),烧伤时年龄为 3 个月 ~ 12 岁,就诊时年龄为 6 个月 ~ 28 岁。根据就诊时间以及伤情,将患儿分为 A1 组 44 例(共计 62 只患手),伤后 1 年内就诊,入院时手部创面已

DOI:10.3760/cma.j.issn.1009-2587.2012.04.027

作者单位:030009 太原,太钢总医院山西省烧伤救治中心

通信作者:雷晋,Email:leijinld@163.com,电话:0351-3015439