

# 早期肠内免疫营养对烫伤大鼠免疫功能的影响

郭光华 蔡晨 范骏 张红艳 李国辉



**【摘要】** 目的 了解早期肠内免疫营养对烫伤大鼠全身及肠道免疫功能的影响。方法 将健康 SD 大鼠分为标准营养组(EN 组)和免疫营养组(EIN 组), 每组 32 只。将两组大鼠制成烧伤总面积 30% TBSA 的Ⅲ度烫伤模型, 于伤后 1、4、7、10 d 检测其外周血 T 淋巴细胞亚群、肠黏膜增殖细胞核抗原(PCNA)表达水平、浆细胞数量及肠黏液分泌型免疫球蛋白 A(S-IgA)含量的变化。另取 8 只健康大鼠检测上述指标作为正常参考值。结果 (1)与正常值比较, 伤后 EN 组 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 降低但 CD8<sup>+</sup> 升高, 与各项指标大部分时相点比较, 差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。伤后 10 d 与 EN 组(CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 为  $1.26 \pm 0.10$ ) 比较, EIN 组 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 为  $1.86 \pm 0.25$ ) 升高而 CD8<sup>+</sup> 下降( $P < 0.01$ )。 (2) 伤后 4、7、10 d, EIN 组肠黏膜 PCNA 表达水平、浆细胞数量及肠黏液 S-IgA 含量较 EN 组明显升高( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论 烫伤后早期给予肠内免疫营养, 可以提高全身及肠道免疫功能, 效果优于标准肠内营养。

**【关键词】** 烧伤; 肠道营养; 免疫; 谷氨酰胺; 精氨酸

The influence of early enteral immunonutrition on immunological function of body and intestine in severely scalded rats GUO Guang-hua, CAI Chen, FAN Jun, ZHANG Hong-yan, LI Guo-hui. Burn Center, the First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, P. R. China

Corresponding author: GUO Guang-hua, Email: guogh2000@hotmail.com, Tel: 0791-8692572

**【Abstract】** Objective To investigate the influence of early enteral immunonutrition on immunological function of body and intestine in severely scalded rats. Methods Sixty-four healthy adult SD rats were subjected to 30% TBSA full-thickness scald and randomly divided into enteral nutrition group (EN, n=32) and enteral immunonutrition group (EIN, n=32). Another 8 healthy rats were enrolled as normal controls. The changes in CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T lymphocyte subsets, the PCNA expression in intestinal mucosa, the amount of plasmocytes in lamina propria of small intestine and the content of s-IgA in small intestine were determined on 1, 4, 7 and 10 post-burn days (PBD). Results (1) CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and the ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> were remarkably declined, while CD8<sup>+</sup> was obviously raised after scald in EN group, and there were statistically significant differences at most of time-points when compared with those in control group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> and the ratio of CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> on 7 and 10 PBD in EIN group were obviously higher (increased from 4 PBD on, and it was  $1.86 \pm 0.25$  on 10 PBD) than those in EN group (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> was  $1.26 \pm 0.10$  on 10 PBD), while CD8<sup>+</sup> in EIN group was evidently lower than that in EN group ( $P < 0.01$ ). (2) The level of PCNA expression in intestinal mucosa, the amount of plasmocytes in lamina propria of small intestine and the content of s-IgA in small intestine in EIN group were increased significantly compared with EN group on 4, 7, 10 PBD ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). Conclusion Early enteral immunonutrition can improve immunological function of body and intestine after severe scald, with better results than enteral nutrition.

**【Key words】** Burns; Enteral nutrition; Immunity; Glutamine; Arginine

严重烧伤导致机体免疫功能紊乱或受抑, 患者易并发感染及多器官功能衰竭。免疫营养学理论指出: 特殊营养物质可调节机体免疫系统, 干预并改善免疫功能。本实验将肠内免疫营养液应用于烫伤大

鼠模型, 并应用标准肠内营养液的大鼠比较, 观察早期肠内免疫营养对严重烫伤大鼠全身和肠道免疫功能的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器和试剂来源

FACS Calibur 流式细胞仪(美国 BD 公司), DFM-96 型多管放射免疫计数器(合肥众成机电技术公司); 肠内免疫营养液(士强, 荷兰纽迪希亚公

基金项目: 江西省自然科学基金(0340078)

作者单位: 330006 南昌大学第一附属医院烧伤科(郭光华、范骏、张红艳、李国辉); 安徽医科大学第一附属医院烧伤科(蔡晨)

通讯作者: 郭光华, Email: guogh2000@hotmail.com, 电话: 0791-

8692572

中华烧伤杂志 2007 年 8 月第 23 卷第 4 期

Q2xvdWRWZAJzaW9uLQo?

司),肠内标准营养液(能全力,荷兰纽迪希亚公司),CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup> 双色荧光标记单克隆抗体(法国 Immunotech 公司),增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)试剂盒(北京中山生物技术有限公司),羊抗鼠 IgA 抗体(美国 Sigma 公司),分泌型免疫球蛋白 A(S-IgA)放射免疫试剂盒(北京中国原子能科学研究院)。

### 1.2 动物分组及标本的处理

SD 大鼠 72 只,体质量(200 ± 25)g,雌雄不限,由安徽医科大学实验动物中心提供(皖医实动准第 01 号)。将大鼠适应性饲养 1 周后,取 64 只分为 2 组:标准营养组(EN 组)32 只、免疫营养组(EIN 组)32 只。伤前 2 d,2 组大鼠背部剃毛,禁食 12 h 后在清醒状态下固定,将其背部及侧腹部浸入 100 °C 水中 12 s 造成 30% TBSA III 度烫伤(经病理切片证实),伤后立即经腹腔注射乳酸林格液(40 ml/kg)抗休克,之后单笼饲养。设伤后 1、4、7、10 d 为观察时相点,每时相点 8 只,经腹腔注射 10 g/L 戊巴比妥钠(30 mg/kg)麻醉,取材待检。剩余 8 只大鼠不烧伤,同法麻醉取材,将其检测值作为正常参考值。

### 1.3 营养支持

EN、EIN 组分别灌喂等体积条件下热量相等的肠内营养液(5225 kJ/L)能全力和士强,成分含量见表 1。能全力和士强均于 4 °C 保存,使用前复温至 37 °C。伤后 2 h 开始给大鼠灌喂营养液,标准量为 732.2 kJ · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>即 140 ml · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>。伤后 1 d 摄入标准量的 1/3,伤后 2 d 摄入标准量的 1/2,伤后 3 d 起摄入全量。每天的计划量分 4~6 次喂完,大鼠自由饮水。

表 1 不同营养液的成分含量

主要营养成分	营养液种类	
	能全力	士强
蛋白质(g/L)	50	75
谷氨酰胺(g/L)	5	13
精氨酸(g/L)	2.0	8.9
脂肪(g/L)	48.6	41.7
碳水化合物(g/L)	125	145
氮(g/L)	6	12
膳食纤维(g/L)	15	9
ω-6 脂肪酸:ω-3 脂肪酸	5.00:1.00	3.45:1.00
维生素 E (mg/L)	16.9	49.2
维生素 C (mg/L)	62.5	133.0
热量(kJ)	5225	5225
渗透压(mmol/L)	400	380

注:能全力为肠内标准营养液,士强为肠内免疫营养液

### 1.4 主要检测指标

#### 1.4.1 外周血 T 淋巴细胞亚群 于无菌条件下

抽取大鼠静脉血,流式细胞仪检测 T 淋巴细胞各亚群的分布。

#### 1.4.2 肠组织 PCNA 表达水平和浆细胞数量

距大鼠回盲部 0.5 cm 处取回肠 1 cm,以 4 °C 等渗盐水洗净,置于 100 g/L 多聚甲醛中固定,常规石蜡包埋、切片。采用链霉卵白素-过氧化物酶法检测肠组织 PCNA 表达水平和浆细胞数量,浆细胞数量以光学显微镜下每根肠绒毛中的阳性细胞数表示。

#### 1.4.3 肠黏液中 S-IgA 的含量

在回肠切口上方取小肠 10 cm,纵向剖开,以 4 °C 等渗盐水洗净后,平铺在冰面上,轻轻刮取肠黏液约 0.1 mg,与 1 ml 等渗盐水混匀,4 °C 下离心半径 8 cm,3000 r/min 离心 10 min,取上清液置 -80 °C 冰箱中保存,按试剂盒说明书操作检测肠黏液中 S-IgA 的含量。每样本复孔数为 2,每孔重复测定 3 次。

### 1.5 统计学处理

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,以 SPSS 13.0 统计软件行 *t* 检验。

## 2 结果

### 2.1 外周血 T 淋巴细胞亚群的变化

与正常值比较,EN 组大鼠伤后 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 逐渐降低 (*P* < 0.01);CD8<sup>+</sup> 逐渐升高 (*P* < 0.01)。与正常值比较,EIN 组大鼠伤后 1、4、7 d CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 明显降低 (*P* < 0.01),伤后 10 d 开始回升 (*P* > 0.05);而 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 的差异大部分时相点无统计学意义 (*P* > 0.05)。与 EN 组大鼠比较,伤后 7、10 d EIN 组 CD3<sup>+</sup> 和 CD4<sup>+</sup> 显著升高 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01),但 CD8<sup>+</sup> 显著降低 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01);伤后 4、7、10 d CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 显著升高 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。见表 2。

### 2.2 肠黏膜 PCNA 水平的变化

对各组大鼠肠黏膜阳性染色区域的图像分析结果显示,PCNA 水平正常值为 8115 ± 102,EN 组伤后 1、4、7、10 d 分别为 707 ± 84、470 ± 56、503 ± 66、546 ± 78,后 3 个时相点显著低于正常值 (*P* < 0.01);EIN 组伤后 1、4、7、10 d 的水平分别为 741 ± 69、583 ± 93、626 ± 90、673 ± 88,后 3 个时相点显著低于正常值 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。与 EN 组比较,EIN 组伤后 4、7、10 d PCNA 水平显著升高 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。

### 2.3 肠组织浆细胞数量的变化

大鼠肠组织浆细胞数量正常值为每根肠绒毛 (29 ± 9) 个,EN 组伤后 1、4、7、10 d 分别为 (18 ± 6)、

表 2 各组大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	鼠数(只)	CD3 <sup>+</sup> (%)	CD4 <sup>+</sup> (%)	CD8 <sup>+</sup> (%)	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>
标准营养组					
伤后 1 d	8	61.2 ± 4.9 <sup>a</sup>	42.1 ± 3.4	25.5 ± 3.3	1.67 ± 0.18 <sup>b</sup>
伤后 4 d	8	60.0 ± 4.5 <sup>b</sup>	40.7 ± 4.6 <sup>a</sup>	26.7 ± 3.1 <sup>a</sup>	1.49 ± 0.12 <sup>b</sup>
伤后 7 d	8	58.0 ± 4.4 <sup>b</sup>	35.6 ± 2.8 <sup>b</sup>	27.8 ± 2.6 <sup>b</sup>	1.39 ± 0.08 <sup>b</sup>
伤后 10 d	8	56.1 ± 2.6 <sup>b</sup>	35.6 ± 2.8 <sup>b</sup>	28.3 ± 1.9 <sup>b</sup>	1.26 ± 0.10 <sup>b</sup>
免疫营养组					
伤后 1 d	8	61.3 ± 6.2	42.1 ± 4.6	25.3 ± 2.9	1.69 ± 0.27 <sup>b</sup>
伤后 4 d	8	62.3 ± 4.2	42.7 ± 3.7	25.4 ± 2.3 <sup>a</sup>	1.70 ± 0.22 <sup>bc</sup>
伤后 7 d	8	63.1 ± 4.3 <sup>c</sup>	43.5 ± 2.8 <sup>d</sup>	24.7 ± 2.3 <sup>c</sup>	1.77 ± 0.14 <sup>bd</sup>
伤后 10 d	8	63.9 ± 4.7 <sup>d</sup>	44.2 ± 3.5 <sup>d</sup>	24.0 ± 2.2 <sup>d</sup>	1.86 ± 0.25 <sup>d</sup>

注:8 只健康大鼠外周血 T 淋巴细胞亚群 CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 值(正常值)分别为(67.0 ± 4.4)%、(46.1 ± 4.3)%、(22.9 ± 2.2)%、2.02 ± 0.17;与正常值比较,a: P < 0.05, b: P < 0.01;与标准营养组比较,c: P < 0.05, d: P < 0.01

(16 ± 6)、(14 ± 6)、(16 ± 6)个,各时相点显著低于正常值(P < 0.05 或 P < 0.01)。EIN 组伤后 1 d 浆细胞数量为每根肠绒毛(18 ± 6)个,明显低于正常值(P < 0.05);伤后 4、7、10 d 其数量已逐渐回升,分别为(22 ± 5)、(23 ± 6)、(24 ± 6)个,与正常值比较,差异无统计学意义(P > 0.05),但这 3 个时相点的浆细胞数量与 EN 组比较显著升高(P < 0.05)。

#### 2.4 肠黏液中 S-IgA 含量的变化

大鼠肠黏液中 S-IgA 含量正常值为(64 ± 12) μg/ml, EN 组伤后 1、4、7、10 d 各为(49 ± 8)、(42 ± 9)、(37 ± 10)和(44 ± 9) μg/ml,各时相点显著低于正常值(P < 0.05 或 P < 0.01)。EIN 组伤后 1 d 肠黏液中 S-IgA 含量为(49 ± 10) μg/ml,明显低于正常值(P < 0.05);伤后 4、7、10 d 其含量已逐渐回升,分别为(53 ± 10)、(54 ± 12)、(56 ± 12) μg/ml,与正常值比较,差异无统计学意义(P > 0.05),与 EN 组比较则显著升高(P < 0.05)。

### 3 讨论

严重烧伤等应激状态下机体常伴有多种炎性细胞因子的释放、持续性高代谢、营养不良和免疫功能低下,易并发严重感染甚至多器官功能衰竭。研究表明,合理的肠道营养支持不仅纠正和预防了患者的营养不足,还能以特定方式刺激免疫细胞增强应答功能,维持正常、适度的免疫反应,调控细胞因子的产生和释放,维护肠黏膜的屏障功能等<sup>[1,2]</sup>。诸如谷氨酰胺、精氨酸、ω-3 脂肪酸、核苷酸及生长激素等多种具有特殊药理作用的营养素,都显示正性免疫调节的治疗作用,因而形成免疫营养新概念。从营养配方中可知,士强较之能全力的谷氨酰胺、精氨酸、ω-3 脂肪酸等营养素的含量高,两者应用效果的比较是典型的肠内免疫营养制剂与标准肠内营养制

剂的比较。

严重烧伤导致机体免疫功能紊乱或受抑的演变过程为:早期发生剧烈的炎性反应释放大量细胞因子和炎性介质→中期抗炎反应导致免疫功能抑制→末期免疫系统无反应<sup>[3]</sup>。本研究中 EN 组和 EIN 组外周血 T 淋巴细胞各亚群在伤后各时相点的变化表明,EN 组烫伤后机体的免疫功能受到抑制,EIN 组伤后情况与正常值比较差异不大,说明肠内免疫营养支持较之标准肠内营养能更有效地改善烫伤大鼠免疫功能。谷氨酰胺作为核酸生物合成的前体和主要能源,可促进淋巴细胞、巨噬细胞的增殖和分化。给予外源性谷氨酰胺可明显提高危重患者的淋巴细胞总数及循环中的 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 值,增强机体免疫功能。补充足够的谷氨酰胺,有利于改善严重烧伤患者应激状态下的免疫应答,缩短病程,降低病死率<sup>[4,5]</sup>。机体免疫功能的紊乱与烧伤后体内精氨酸不足也有密切关系。彭曦等<sup>[6]</sup>观察到,补充精氨酸后烧伤家兔的淋巴细胞转化率、白细胞趋化率、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 值、血清免疫球蛋白含量较正常值明显改善,提示经肠道补充精氨酸能有效提高烧伤后免疫功能。

严重烧伤后肠道屏障功能损害的表现表现为肠黏膜萎缩,肠黏膜上皮细胞增殖和移行的速度明显降低,肠组织浆细胞数量减少,肠黏液 S-IgA 水平降低,肠黏膜通透性增加,细菌和内毒素移位,发生肠源性感染,并进一步引发多器官功能衰竭。本研究中 EN 组和 EIN 组肠黏膜 PCNA 水平、浆细胞数量和 S-IgA 含量在伤后各时相点的变化表明,肠内免疫营养较之标准肠内营养更能有效保护烫伤大鼠肠黏膜。一方面,谷氨酰胺作为肠黏膜上皮细胞的能量底物,能促进肠黏膜细胞增殖、加强细胞间的紧密连接、增强肠道淋巴细胞功能、调节 S-IgA 含量,同时可增加肠

