

益生菌及肠内外营养对重症急性胰腺炎大鼠肠道黏附分子及免疫屏障的影响

杨建军, 耿翔, 高志光, 秦环龙

杨建军, 耿翔, 高志光, 秦环龙, 上海交通大学附属第六人民医院普外科 上海市 200233
杨建军, 医学硕士, 主要从事普通外科研究工作。
上海交通大学昂立基金资助项目, No. KJ200501
通讯作者: 秦环龙, 200233, 上海市, 上海交通大学附属第六人民医院普外科. hlqin@sjtu.edu.cn
电话: 021-64942226 传真: 021-64368920
收稿日期: 2006-02-06 接受日期: 2006-03-03

Effects of probiotics and enteral and parenteral nutrition on intestinal mucosal addressin cell adhesion molecule-1 and immune barrier of rats with severe acute pancreatitis

Jian-Jun Yang, Xiang Geng, Zhi-Guang Gao, Huan-Long Qin

Jian-Jun Yang, Xiang Geng, Zhi-Guang Gao, Huan-Long Qin, Department of General Surgery, the Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China
Supported by Angli Fund of Shanghai Jiaotong University, No. KJ200501
Correspondence to: Huan-Long Qin, Department of General Surgery, the Sixth People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200233, China. hlqin@sjtu.edu.cn
Received: 2006-02-06 Accepted: 2006-03-03

Abstract

AIM: To investigate the effects of probiotics and enteral and parenteral nutrition (EN and PN) on peyer's patch, intestinal mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) and immune barrier of rats with severe acute pancreatitis (SAP).

METHODS: SAP model was established in 30 Sprague Dawley (SD) rats via biliary and pancreatic duct using sodium taurocholate and then were averagely divided into 3 groups: PN group, PN + EN group, and PN + EN + probiotics group. Twenty-four hours after modeling, the rats in each group were treated with the corresponding

methods for 6 days. The nutrition support in the 3 groups was isonitrogenic and isocaloric. At the 7th day, all the rats were sacrificed. The expression of CD4, CD8, MAdCAM-1 and IgA in the terminal ileum mucosa and peyer's patch were measured by immunohistochemistry. Vena cava blood and homogenated tissues of liver, lung and mesenteric lymph nodes were cultured to determine bacterial translocations.

RESULTS: The levels of CD4 and CD8 T cells, and the expression of MAdCAM-1 and IgA in the terminal ileum mucosa and peyer's node were significantly higher in PN + EN and PN + EN + probiotics group than those in PN group ($P < 0.05$). The level of CD8 T cells and the expression of MAdCAM-1 were markedly higher in PN + EN + probiotics group than those in PN + EN group ($P < 0.05$). Bacterial translocations and mortality appeared in PN group with higher rates (70.2%, 75.6%) in comparison with those in PN + EN + probiotics (27.5%, 50.0%) and PN + EN group (30.5%, 52.4%) ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). But there were no significant differences between PN + EN and PN + EN + probiotics group.

CONCLUSION: EN can increase the expression of CD4, CD8, MAdCAM-1 and IgA in the terminal ileum mucosa and peyer's patch, reduce bacterial translocations, and improve the survival rate in SAP. This effect becomes more obvious when EN is combined with probiotics. Probiotics seem to have litter effect in the protection of intestinal immune barrier.

Key Words: Probiotics; Enteral nutrition; Severe acute pancreatitis; Intestinal mucosal addressin cell adhesion molecule-1

Yang JJ, Geng X, Gao ZG, Qin HL. Effects of probiotics and enteral and parenteral nutrition on intestinal mucosal addressin cell adhesion molecule-1 and immune barrier of rats with severe acute pancreatitis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(10):953-957

背景资料

重症急性胰腺炎(SAP)是最易发生肠屏障功能受损的重症疾病之一,而肠道是机体最大的免疫器官,肠免疫屏障对预防肠源性感染发挥重要作用。近年来,已有少数研究报告益生菌、肠内营养在改善SAP肠道微生态及细菌易位和减少内源性感染方面取得了初步结果,但深入、详细的机制尚不清楚。因此采用益生菌及肠内外营养对SAP肠道黏附分子及免疫屏障进行研究,具有一定的临床指导意义。

研发前沿

益生菌、肠内营养对SAP肠屏障的保护作用;肠道黏附分子及淋巴细胞归巢在SAP时的变化。

■创新盘点

本文对SAP时肠道黏膜地址素细胞黏附分子-1(MAdCAM-1)进行研究,并初步探讨了SAP时MAdCAM-1对肠免疫屏障的影响。

摘要

目的: 观察益生菌及肠外、肠内营养对重症急性胰腺炎(SAP)大鼠肠道黏附分子MAdCAM-1及免疫屏障的影响。

方法: 经胆胰管逆行注射50 g/L牛磺胆酸钠制作SAP模型24 h后,分别给予肠外营养(PN组),肠外+肠内营养(PN+EN组),肠外+肠内营养+益生菌(益生菌组),持续6 d,7 d时处死,检测腹腔脏器组织菌群易位率,免疫组化测定末端回肠和Peyer结MAdCAM-1, CD4, CD8, IgA。

结果: 益生菌组、PN+EN组CD4、CD8 T细胞数量及IgA, MAdCAM-1表达高于PN组($P<0.05$); 益生菌组Peyer结MAdCAM-1, CD8表达高于PN+EN组($P<0.05$)。PN组菌群易位率(70.2%)、7 d死亡率(75.6%)高于益生菌组(27.5%, 50.0%)、PN+EN组(30.5%, 52.4%)($P<0.01$ 或 $P<0.05$),但后两组间差异无显著性意义。

结论: EN能增加MAdCAM-1表达,提高SAP时肠免疫屏障,减少菌群易位,提高生存率。加用益生菌后总体改善不明显。

关键词: 益生菌; 肠内营养; MAdCAM-1; 重症急性胰腺炎

杨建军, 耿翔, 高志光, 秦环龙. 益生菌及肠内外营养对重症急性胰腺炎大鼠肠道黏附分子及免疫屏障的影响. 世界华人消化杂志, 2006;14(10):953-957

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/953.asp>

0 引言

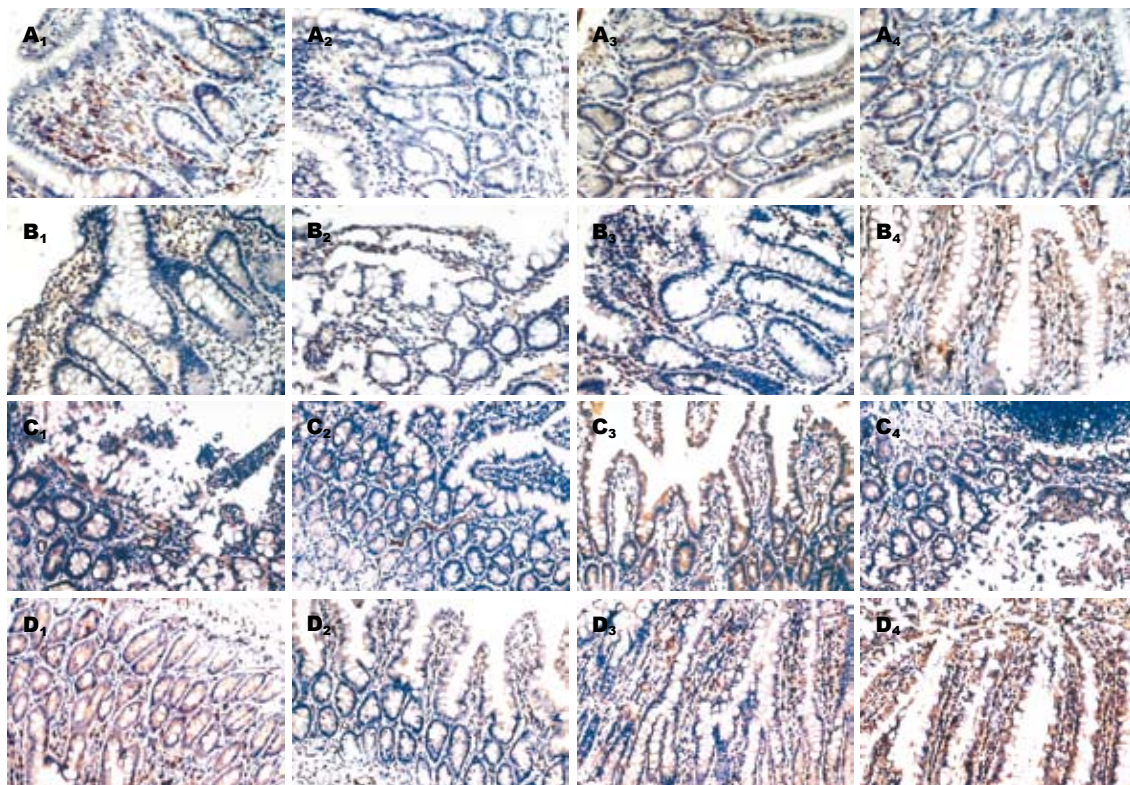
重症急性胰腺炎(SAP)由于病程长、病情重,易发生肠屏障功能障碍,导致肠道菌群或内毒素易位,从而影响预后。近年,采用益生菌及肠内营养来保护SAP时肠屏障功能逐渐受到学者关注,并取得初步肯定的意见。本研究对SAP大鼠实施益生菌及肠外、肠内营养,观察他们对肠道黏膜地址素细胞黏附分子-1(MAdCAM-1)表达及免疫屏障的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ SD大鼠(复旦大学医学院动物中心提供,清洁级); 50 g/L牛磺胆酸钠(Sigma公司); 益生菌(上海交通大学昂立生命技术研究所提供,主要成分为植物乳杆菌及其代谢产物,活性为 10^6 cfu/mL); 200 g/L Intralipid(SSPC); 85 g/L复

方氨基酸(Novamin, SSPC); 水乐维他(SSPC); 安达美(SSPC); 百普素(Nutricia公司); 山羊抗大鼠MAdCAM-1多克隆抗体(Santa Cruz公司); 小鼠抗大鼠IgA多克隆抗体(Santa Cruz公司); 小鼠抗大鼠CD4、CD8单抗(Serotec公司); 二抗为Envision(即用型, Dako公司); 电动玻璃匀浆仪(宁波新芝生物科技股份有限公司); 心脑血管浸出液(Oxid公司)。选择♂ SD大鼠82只,体质量250-300 g。禁食不禁水12 h, 20 g/L盐酸氯胺酮(100 mg/kg)ip麻醉后,将大鼠固定于仰卧位,颈部和腹部去毛,1 g/L新洁而灭酞消毒,按Aho法^[1]建立SAP模型,正中切口打开腹腔,于十二指肠内侧找到片状分布的胰腺及胆管,将4.5号针头经系膜对侧肠壁逆行插入胆管,结扎胆管末端和针头,无创血管夹夹闭肝门处胆管,均匀缓慢推注50 g/L牛磺胆酸钠(1 mL/kg),推注时间约5 min, 10 min后松开血管夹和结扎线,8字缝合肠壁处穿刺点。在距盲肠约40 cm小肠处荷包埋入另一硅胶管,外径为12 mm,并将其沿腹壁皮下潜行至颈背部肩胛间引出,经该管给予肠内营养液及益生菌。旁正中切口剪开颈部皮肤,钝性分离出颈外静脉,经颈外静脉置入外径为12 mm的硅胶管,皮下隧道潜行至颈背部引出,经该管给予肠外营养液。颈外静脉插管及空肠造瘘管穿过螺旋式弹簧圈与我们自行设计的360°旋转式输液装置相连接^[2]。肠外营养液及肠内营养液以微量输液泵24 h均匀输入。

1.2 方法 将实验动物随机分为3组,造模成功后前24 h均给予生理盐水2 mL/h,肠外营养组(PN组): 2-6 d给予PN支持,肠外营养+肠内营养组(PN+EN组): 2-6 d给予PN+EN支持,益生菌组: 2-6 d给予PN+EN支持,同时经空肠造瘘管滴入益生菌10 mL/d。实验组均于第7 d处死取末端回肠组织进行免疫组化。正常对照组同样予以颈外静脉插管,禁食不禁水24 h处死,取末端回肠组织进行免疫组化。PN液均采用500 g/L GS、200 g/L Intralipid、复方氨基酸(Novamin)作为基本营养成分,各组均等氮、等热量,每天提供非氮热量1 003 kJ/kg(约240 kCal/kg),供氮459 mg,加入RI比例为糖(g):胰岛素(U)=4:1,维生素和微量元素由水乐维他和安达美,肠内营养由短肽标准型高能营养多聚合剂(百普素)。PN组热氮量100%由PN液提供,微量输液泵保持输液速度约33 mL/h, 80 mL/d静脉输入。PN+EN组,80%的热氮量由PN提供,64 mL/d静脉输入,20%由EN提供,百普素用温水按1 g:



■应用要点
对探讨益生菌、肠内营养对SAP时肠屏障的保护机制,具有一定意义.为临床SAP应用益生菌、肠内营养提供一定理论依据.

图 1 末端回肠黏膜免疫组化图片. A: CD4; B: CD8; C: MAdCAM-1; D: IgA. A₁, B₁, C₁, D₁: 正常对照组; A₂, B₂, C₂, D₂: PN组; A₃, B₃, C₃, D₃: PN+EN组; A₄, B₄, C₄, D₄: 益生菌组.

4 mL稀释成16 mL,再用生理盐水将后者以1:2稀释至24 mL,1 mL/h经空肠造瘘管滴入,每日EN供能200.6 kJ/kg(48 kCal/kg).益生菌组在前组的基础上经空肠造瘘管分三次滴入益生菌10 mL/d. PN液配方(含量/L): 500 g/L Glucose: 330 mL; 85 g/L Novamin: 450 mL; 200 g/L Intralipid: 170 mL; 水乐维他: 10 mL; 安达美: 10 mL; 100 g/L KCl: 10 mL; 100 g/L NaCl: 10 mL; RI: 40 U; 肝素: 400 U; 非蛋白热卡: 4350 kJ; 总氮量: 5740 mg. 观察大鼠一般情况、反应灵敏度、活动度及死亡情况. 所有组织标本用100 g/L中性缓冲甲醛固定; 采用石蜡包埋,5 μm厚连续切片,经脱腊、水化及0.01 mol/L(pH 6.0)柠檬酸盐缓冲液抗原修复后滴加抗体. 一抗分别为山羊抗大鼠MAdCAM-1多克隆抗体,小鼠抗大鼠IgA多克隆抗体,小鼠抗大鼠CD4, CD8单抗(Serotec 公司),二抗为Envision. 阴性对照: 用PBS代替一抗. 0.4 g/L DAB+0.3 mL/L H₂O₂显色8 min左右,镜下控制显色程度,即时终止; 水洗3 min,复染(苏木素衬染30 s,水洗,盐酸乙醇蓝化2 s,水洗,微波蓝化),常规树脂封片; 阳性为棕黄色或棕褐色,并呈颗粒状,背景呈紫蓝色. 使用HPIAS 1000高清晰度彩色图文病理报告分析系统,光密度法测定每视野相应

细胞CD4, CD8, MAdCAM-1, IgA密度,并计算阳性显色面积占测量窗内的百分比. 取腔静脉血1 mL,肠系膜淋巴组织、肝脏中叶、肺脏右叶组织匀浆后分别倒入心脑浸出液管中35℃增菌培养,18-24 h后置于伊红美蓝平板35℃培养,18-24 h后计数鉴定. 菌群易位率 = 培养阳性的样本数/检测的总样本数×100%.

统计学处理 所得数据用mean±SD表示,采用SAS6.12软件包进行χ²检验、方差分析, P<0.05认为有统计学意义.

2 结果

实验组大鼠造模24 h后均出现不同程度萎靡不振,对外界刺激反应度下降,其中以PN组最为明显. 益生菌组死亡率明显低于PN组(50.0% vs 75.6%, P<0.05), PN+EN组(52.4%)与PN组相比差异无统计学意义,但总体优于PN组. PN+EN组与益生菌组相比差异无统计学意义.

2.1 菌群易位率 PN+EN组、益生菌组低于PN组(70.2%),其中益生菌组最低(27.5%, P<0.01), PN+EN组(30.5%)与益生菌组相比差异无统计学意义.

2.2 末端回肠黏膜免疫组化 实验组CD4, CD8, MadCAM-1, IgA表达均低于正常对照组

■名词解释

肠道相关淋巴组织(GALT):按解剖及功能分为诱导部位和效应部位,前者主要为Peyer淋巴结,后者主要为肠固有层和上皮内淋巴细胞。幼稚淋巴细胞于Peyer淋巴结处接触抗原,增殖、成熟、分化为效应或记忆淋巴细胞,后者返回血流进而归巢到肠固有层、上皮内等效应部位发挥免疫作用。

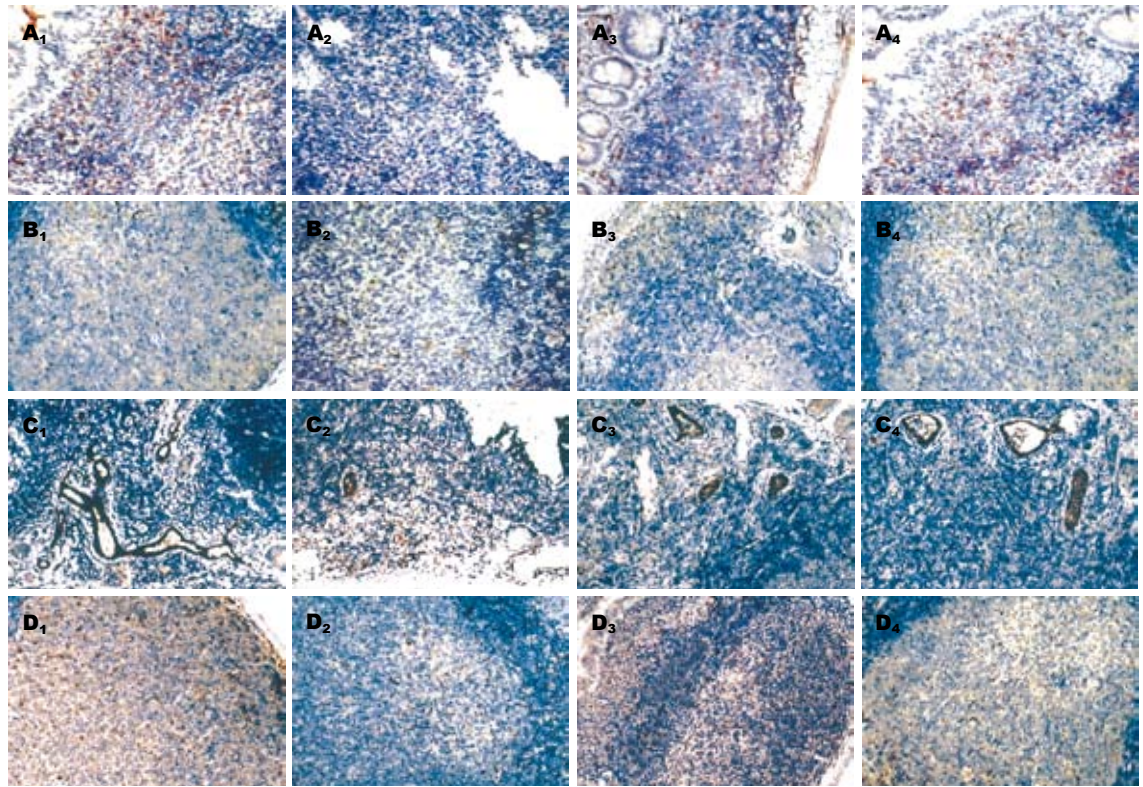


图2 Peyer结免疫组化图片. A: CD4; B: CD8; C: MAdCAM-1; D: IgA. A₁, B₁, C₁, D₁: 正常对照组; A₂, B₂, C₂, D₂: PN组; A₃, B₃, C₃, D₃: PN+EN组; A₄, B₄, C₄, D₄: 益生菌组.

($P<0.05$). 其中PN组低于PN+EN组、益生菌组($P<0.05$), 而后两组间比较差异无统计学意义, 但总体上益生菌组数值高于PN+EN组(图1).

2.3 Peyer结免疫组化 实验组CD4, CD8, MadCAM-1, IgA表达均低于正常对照组($P<0.05$). PN组CD4、IgA表达低于PN+EN组、益生菌组($P<0.05$), 而后两组间比较差异无统计学意义($P>0.05$), 但总体上益生菌组数值高于PN+EN组. PN组CD8, MAdCAM-1表达低于PN+EN组($P<0.05$), 后者又低于益生菌组($P<0.05$)(图2).

3 讨论

重症急性胰腺炎易造成肠屏障功能受损, 导致肠道菌群或内毒素易位, 继发感染和炎症介质的过度激活, 发生系统炎症反应乃至多器官功能衰竭. 因此, 维护SAP时的肠屏障功能尤其是免疫屏障显得更加重要. 近年来对SAP患者采用EN或益生菌日渐增多, 不少研究认为EN或益生菌能够减少SAP感染性并发症和降低死亡率, 改善预后^[3-6]. 而就益生菌及EN对SAP肠免疫屏障尤其是黏附分子影响的研究尚不多. 黏附分子MAdCAM-1是肠道淋巴细胞归巢的主要地址素, 正常情况下选择性表达于肠黏膜固有层和Peyer结高内皮静脉(HEV)的内皮细胞, 对淋

巴细胞向肠道的定向迁移以及肠免疫屏障的维护起重要作用^[7]. 不同的营养途径对肠黏膜免疫屏障有重要影响. 有研究发现予以禁食鼠TPN 24 h后, Peyer结的MAdCAM-1表达即明显下降, 并且肠相关淋巴结(GALT)细胞数量明显减少; 而恢复EN 12 h后, MAdCAM-1表达和GALT细胞数量又开始逐渐上升. 因此有学者认为EN能够提高MAdCAM-1的表达, 维持GALT细胞数量, 此外EN还能刺激Th2细胞因子IL-4、IL-10生成, 而后者与B细胞的增殖、分化及IgA的合成分泌密切相关^[8-9]. 临床亦发现术前接受EN的结肠癌患者末端回肠GALT细胞数量明显高于TPN者^[10]. 动物实验中有报道EN联合使用益生菌能够减轻急性胰腺炎(AP)的病理评分^[11]. 临床亦发现益生菌能够减少AP的继发感染率^[6].

我们发现SAP大鼠PN 1 wk后, 出现Peyer结、肠黏膜MAdCAM-1表达下降, 并伴有GALT萎缩, CD4、CD8 T细胞数量减少, IgA分泌降低. 而PN+EN组或益生菌组MAdCAM-1表达明显优于PN组, CD4、CD8 T细胞数量及IgA表达亦高于PN组. 益生菌组总体水平高于PN+EN组, 尤其是Peyer结MAdCAM-1、CD8表达高于PN+EN组($P<0.05$). 提示SAP大鼠在PN期间地址素MAdCAM-1表达下降, 引起T、B等

淋巴细胞肠道归巢减少, 继而导致肠黏膜免疫屏障功能下降, 而EN、益生菌能够改善地址素MAdCAM-1表达, 促进肠道淋巴细胞归巢及淋巴组织的增生, 从而对肠免疫屏障具有维护作用. 从腹腔脏器细菌易位率和死亡率分析, PN组细菌易位率和死亡率明显升高, PN+EN组第7 d死亡率较PN组无统计学意义($P=0.064$), 但总体有下降趋势, 而益生菌组死亡率明显优于PN组($P<0.05$). 此外, 使用EN或益生菌后细菌易位率都有明显改善. 但益生菌组与PN+EN组细菌易位率及死亡率相比差异无统计学意义.

本实验表明, EN能够提高肠黏膜MAdCAM-1表达, 增加CD4, CD8细胞数量及IgA的分泌, 从而增强肠黏膜免疫屏障, 对预防SAP肠源性感染发挥重要作用. 加用益生菌后虽总体改善不明显, 但Peyer结MAdCAM-1, CD8表达高于PN+EN组. 如提高益生菌使用剂量、时间或加用其他治疗SAP方法, 可能会得到意想不到的效果.

4 参考文献

- Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1980; 15: 411-416
- 沈通一, 秦环龙, 佟大年. 肠外肠内营养对腹腔感染大鼠肠上皮紧密连接和屏障功能的影响. *中华普通外科杂志* 2005; 20: 174-176
- Qin HL, Su ZD, Hu LG, Ding ZX, Lin QT. Effect of early intrajejunal nutrition on pancreatic pathological features and gut barrier function in dogs with acute pancreatitis. *Clin Nutr* 2002; 21: 469-473
- Louie BE, Noseworthy T, Hailey D, Gramlich LM, Jacobs P, Warnock GL. 2004 MacLean-Mueller prize enteral or parenteral nutrition for severe pancreatitis: a randomized controlled trial and health technology assessment. *Can J Surg* 2005; 48: 298-306
- Mangiante G, Colucci G, Canepari P, Bassi C, Nicoli N, Casaril A, Marinello P, Signoretto C, Bengmark S. Lactobacillus plantarum reduces infection of pancreatic necrosis in experimental acute pancreatitis. *Dig Surg* 2001; 18: 47-50
- Olah A, Belagyi T, Issekutz A, Gamal ME, Bengmark S. Randomized clinical trial of specific lactobacillus and fibre supplement to early enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *Br J Surg* 2002; 89: 1103-1107
- Fujimori H, Miura S, Koseki S, Hokari R, Komoto S, Hara Y, Hachimura S, Kaminogawa S, Ishii H. Intravital observation of adhesion of lamina propria lymphocytes to microvessels of small intestine in mice. *Gastroenterology* 2002; 122: 734-744
- Ikeda S, Kudsk KA, Fukatsu K, Johnson CD, Le T, Reese S, Zarzaur BL. Enteral feeding preserves mucosal immunity despite *in vivo* MAdCAM-1 blockade of lymphocyte homing. *Ann Surg* 2003; 237: 677-685
- Genton L, Kudsk KA, Reese SR, Ikeda S. Enteral feeding preserves gut Th-2 cytokines despite mucosal cellular adhesion molecule-1 blockade. *JPEN* 2005; 29: 44-47
- Okamoto K, Fukatsu K, Ueno C, Shinto E, Hashiguchi Y, Nagayoshi H, Hiraide H, Mochizuki H. T lymphocyte numbers in human gut associated lymphoid tissue are reduced without enteral nutrition. *JPEN* 2005; 29: 56-58
- Muftuoglu MA, Isikgor S, Tosun S, Saglam A. Effects of probiotics on the severity of experimental acute pancreatitis. *Eur J Clin Nutr* 2006; 60: 464-468

■同行评价

重症急性胰腺炎是临床上病死率高的疾病之一, 该文章从基础着手, 建立SAP动物模型, 研究益生菌及不同营养途径对SAP肠黏附分子及免疫屏障的影响, 设计具有一定的科学性, 结论具有一定的说服力.

电编 李琪 编辑 潘伯荣

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2006年版权归世界胃肠病学杂志社

•消息•

第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议

本刊讯 第二次全国中晚期消化肿瘤学术会议将于2006-08在哈尔滨举行, 现将征文通知公布如下:

1 稿件要求及截稿日期

全文3 000字及摘要800字各1份, 电脑打印(附软盘), 2006-06-15截稿.

2 联系方式

哈尔滨市哈尔滨医科大学二院消化内科 刘冰熔 教授, 电话: 13313695959.