

[文章编号] 1000-4718(2006)09-1825-04

Gln 和 rhGH 对门脉高压症术后肠粘膜屏障及增殖细胞核抗原表达的影响

汤照峰, 凌云彪, 郝 峰, 林 楠, 许瑞云

(中山大学附属第三医院肝胆外科, 广东 广州 510630)

[摘要] 目的: 研究单独或联合应用谷氨酰胺(Gln)和重组人生长激素(rhGH)对门脉高压症术后肠粘膜屏障功能的保护作用及机制。方法: 29例门静脉高压症术后患者随机分为4组:①Gln组($n=6$),②rhGH组($n=8$),③Gln+rhGH组($n=7$)和④对照组($n=8$)。术后3d开始进行等氮、等热量的全胃肠外营养支持(TPN),持续7d。对手术前、后的尿乳糖排泄率/甘露醇排泄率(L/M)、十二指肠肠粘膜绒毛高度、陷窝深度及肠粘膜增殖细胞核抗原(PCNA)表达指数进行对比。结果: Gln+rhGH组术后L/M值升高小于对照组($P<0.05$),肠粘膜绒毛高度和陷窝深度大于对照组($P<0.05$)及术前($P<0.05$),肠粘膜上皮PCNA表达指数大于术前及其它3组($P<0.05$);对照组术后绒毛高度小于术前($P<0.05$),陷窝深度变化无显著($P>0.05$)。结论: 联合应用Gln和rhGH能降低门脉高压症术后肠壁通透性并维护肠粘膜形态学完整性,单用Gln或rhGH无此作用。这种作用可能与增加肠黏膜PCNA表达而促进肠黏膜上皮细胞增殖有关。

[关键词] 谷氨酰胺; 生长激素; 门静脉高压症; 肠粘膜屏障; 增殖细胞核抗原

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Effects of glutamine and recombinant human growth hormone on intestinal mucosal barrier and proliferating cell nuclear antigen in postoperative portal hypertension patients

TANG Zhao-feng, LING Yun-biao, HAO Zheng, LIN Nan, XU Rui-yun

(Department of Hepatobiliary Surgery, The Third Affiliated Hospital of Sun Yet-sen University, Guangzhou 510630, China, E-mail: tangzhaofeng@126.com)

[ABSTRACT] **AIM:** To investigate morphologic and functional changes of small intestinal mucosa and proliferating cell nuclear antigen in postoperative portal hypertension patients with single or combined administration of Gln and rhGH. **METHODS:** Twenty-nine portal hypertension patients with surgical treatment were prospectively randomized to four groups as follows: ① Gln group ($n=6$); ② rhGH group ($n=8$); ③ Gln+rhGH group ($n=7$) and ④ control group ($n=8$). A standard solution for TPN was given three days after operation for a week. The concentration ratio of urinary lactulose and mannitol (L/M), the villus height and crypt depth and PCNA index of small intestinal mucosa were compared. **RESULTS:** A week after TPN postoperation, the increased ratios of L/M in Gln+rhGH group were less than those in control group ($P<0.05$). The villus height and crypt depth increased in Gln+rhGH group compared with preoperation ($P<0.05$) or control group ($P<0.05$). PCNA index increased in Gln+rhGH group compared with preoperation ($P<0.05$) or other three groups ($P<0.05$). The villus height of control group decreased ($P<0.05$), whereas the crypt depth had no significant difference ($P>0.05$). **CONCLUSION:** This study suggest that Gln together with rhGH reduce the intestinal permeability and protect the mucosa integrality in postoperative portal hypertension patients, but not in single treatment.

[KEY WORDS] Glutamine; Growth hormone; Portal hypertension; Intestinal mucosa barrier; Proliferating cell nuclear antigen

门静脉高压症患者肠道血液回流受阻,防碍了消化道粘膜细胞对营养的摄取,发生粘膜水肿,肠绒毛萎缩坏死,小肠粘膜通透性增高,容易发生内毒素和细菌易位,这种潜在危险性在手术后显得尤为突出。谷氨酰胺(glutamine, Gln)和重组人生长激素(recombinant human growth hormone, rhGH)因具有促

进蛋白质合成、保护肠粘膜屏障及增强机体免疫功能等作用而被广泛用于烧伤、放化疗、肿瘤及短肠综合征的病人。已有实验研究^[1-3]提示Gln或rhGH有保护肠粘膜作用,但单独或联合应用Gln和rhGH配合全胃肠外营养支持(total parenteral nutrition, TPN)是否有助于保护门静脉高压症病人术后肠粘膜

[收稿日期] 2006-02-27

[修回日期] 2006-05-16

Tel:020-85516867-2154; E-mail:tangzhaofeng@126.com

屏障功能仍不清楚。为此,我们对 29 例门静脉高压症手术病人进行随机对照研究,观察单独或联合应用 Gln 和 rhGH 对手术后肠粘膜屏障功能的影响及机制研究。

材 料 和 方 法

1 对象

2004 年 6 月至 2005 年 4 月入住本科的 29 例乙型肝炎肝硬化门静脉高压症行手术治疗的病人为对象,其中男 19 例,女 10 例。全组年龄 18-72 岁,平均年龄为(45.3 ± 2.6)岁。按电脑随机数字法分为 4 组:Gln 组($n=6$),rhGH 组($n=8$),Gln + rhGH 组($n=7$)和对照组($n=8$)。行单纯脾切除术者 10 人,行脾切除 + 内镜套扎术(EVL)者 19 人(表 1)。

表 1 各组病例情况

Tab 1 The clinical data of patients

Group	Splenoctomy		Splenoctomy + EVL	
	Child - PughA	Child - PughB	Child - PughA	Child - PughB
Control ($n=8$)	1	2	1	4
Gln($n=6$)	1	1	1	3
rhGH ($n=8$)	1	2	2	3
Gln + rhGH ($n=7$)	1	1	2	3

2 入选标准

诊断标准符合 1995 年全国传染病及寄生虫病会议修订的乙型肝炎肝硬化门静脉高压症的诊断标准。排除标准:①肝功能 Child - Pugh 分级 C 级;②合并心血管、脑、肺、肾等重要器官严重器质性疾病;③肝硬化合并肝癌患者;④其它原因如酒精、胆汁淤积、药物所致肝硬化;⑤精神疾病或不能合作者;⑥严重的内分泌系统、免疫系统疾病;⑦术后出现严重并发症而必须中断实验者,以及未能严格遵医嘱致实验结果无效者。

3 治疗方法

试验时间为术后 3 d 开始,持续 7 d,研究期间所有患者禁食,病人在 TPN 期间内均为等热卡 30 kcal · kg⁻¹ · d⁻¹、等氮(热氮比 = 100 cal:1 g),脂肪:糖供能比为 1:2,脂肪及氨基酸使用 20% 中长链脂肪乳和 7.5% 复合氨基酸注射液。(1)Gln 组:TPN 同时添加 Gln(2 - L 丙氨酰 - L 谷氨酰胺双肽,华瑞制药公司),每 1.0 mL 中含谷氨酰胺 0.1346 g、丙氨酸 0.082 g,按 0.3 g · kg⁻¹ · d⁻¹加入 3 L 袋内中心静脉滴入,共 7 d;(2)rhGH 组:TPN 同时皮下注射 rhGH(注射用重组人生长激素,瑞士雪兰诺公司) 10 U/d,共 7 d;(3)Gln + rhGH 组:TPN 同时添加 Gln(0.3 g · kg⁻¹ · d⁻¹)中心静脉滴入,皮下注射 rhGH 10 U/d,共 7 d;(4)对照组:只进行 TPN,共 7 d。

4 观察指标

4.1 尿液乳果糖排泄率/甘露醇排泄率(L/M) 采

用电化学高效液相色谱法(HPLC)测定尿液 L/M 来判断肠粘膜通透性的高低,收集 TPN 治疗前、后尿液 L/M 进行对比。病人测试前 1 d 晚 10 时起禁食,早上 8 时排空膀胱后口服 50 mL 测试液(每 10 mL 测试液中含有乳果糖 2.0 g 及甘露醇 1.0 g)。收集口服测试液后 6 h 内的全部尿液,记录尿液总量;取其中的 20 mL,滴入 2% 硫柳汞 4 滴防腐处理,置入 -20 °C 冰箱保存待检。集中标本后 HPLC 法测定尿液 L/M。

4.2 小肠粘膜绒毛高度及陷窝深度观察 所有入选病人术前 2 - 3 d、术后第 10 - 13 d 分别进行胃镜检查,以胃镜活检钳取十二指肠降段粘膜标本 2 处,标本包括粘膜全层及部分粘膜下层,包埋并制成切片。每个病人取 2 张切片,用 CMIAS 系列多功能真彩色病理图像分析系统进行分析。显微镜下每个切片取 3 个点进行绒毛高度及陷窝深度测量。所选取部位至少有相邻 3 条形态完整、分化完好的绒毛,分别取其平均值作为绒毛高度及陷窝深度(图 1)。

4.3 肠粘膜增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)表达 按上述方法取小肠标本,10% 中性甲醛固定,常规石蜡包埋,切片。PCNA 试剂盒购自北京中山试剂公司,用 SP 法显示 PCNA。二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,双蒸水洗;加 1 滴过氧化物酶阻断液,10 min;加 I 抗,37 °C 1 h,转入 4 °C 冰箱过夜;加 1 滴生物素标记的 II 抗,10 min;加 1 滴链亲和素 II 抗过氧化物酶液,10 min;加 2 滴新鲜配制的 AEC,显微镜下观察 3 - 10 min,阳性显色为棕红色;自来水冲洗,苏木素复染,0.1% HCl 分化;自来水返蓝。以 PBS 替代 I 抗作阴性对照。每个病人取 4 张不连续切片,每张切片沿肠隐窝区随机选取 20 个隐窝(垂直、完整),光镜下计数每个隐窝内 PCNA 完整阳性的细胞数和细胞总数,PCNA 表达指数 = 阳性细胞数/总细胞数 × 100%。

5 统计学处理

采用统计软件 SPSS V11.0 for Windows 进行统计分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。4 组间比较以单因素随机对照设计与方差分析(One - way ANOVA)的方法进行,两组间比较以 t 检验进行。

结 果

1 手术前、后肠粘膜通透性的变化

手术前测得每一个病人尿液 L/M 均高出正常参考值范围(0.019 - 0.036),经方差分析方法证明在手术前任何两组间的 L/M 平均值差别均无统计意义($P > 0.05$)。术后经过 7 d 的 TPN,第 8 d 再次测定尿液 L/M,每组病人尿液 L/M 均显著高于手术前($P < 0.05$),Gln + rhGH 组 L/M 升高的幅度显著小于对照组($P < 0.05$)。术后其它两组 L/M 升高的幅度无

显著差异($P > 0.05$)(表2)。

表2 Gln、rhGH 对患者手术前后肠粘膜通透性(L/M值)的影响

Tab 2 Effect of Gln or (and) rhGH on intestinal permeability (L/M ratio) before and after operation ($\bar{x} \pm s$)

Group	L/M ratio of preoperation	L/M ratio of postoperation
Control ($n=8$)	0.0410 \pm 0.0015	0.0749 \pm 0.0051 *
Gln ($n=6$)	0.0425 \pm 0.0034	0.0638 \pm 0.0041 *
rhGH ($n=8$)	0.0409 \pm 0.0029	0.0681 \pm 0.0040 *
Gln + rhGH ($n=7$)	0.0401 \pm 0.0031	0.0567 \pm 0.0033 **

* $P < 0.05$ vs preoperation; ** $P < 0.05$ vs control.

2 肠粘膜绒毛高度及陷窝深度变化

TPN 治疗 7 d 后, Gln + rhGH 组病人的十二指肠粘膜绒毛高度及陷窝深度均显著大于对照组 ($P < 0.05$), 其余两组与对照组比较无显著差异。Gln + rhGH 组在 TPN 治疗后绒毛高度显著大于手术前 ($P < 0.05$), 陷窝深度显著大于手术前 ($P < 0.05$); 对照组术后绒毛高度显著小于术前 ($P < 0.05$), 陷窝深度无显著变化 ($P > 0.05$); Gln 组和 rhGH 组手术后与手术前的绒毛高度及陷窝深度没有显著差异 ($P > 0.05$), 见表 3、图 1。

表3 4组患者肠粘膜绒毛高度及陷窝深度比较

Tab 3 Comparison of intestinal mucosal villus height and crypt depth in the four groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	Villus height (μm)		Crypt depth (μm)	
	Preoperation	Postoperation	Preoperation	Postoperation
Control ($n=8$)	352.4 \pm 13.6	336.2 \pm 11.6#	115.0 \pm 6.2	111.3 \pm 3.9
Gln ($n=6$)	366.5 \pm 16.9	359.7 \pm 13.5	122.3 \pm 6.6	124.0 \pm 4.2
rhGH ($n=8$)	345.1 \pm 15.6	350.5 \pm 15.8	112.9 \pm 6.0	113.4 \pm 4.2
Gln + rhGH ($n=7$)	359.7 \pm 17.5	377.6 \pm 14.6**	117.7 \pm 7.5	126.1 \pm 7.2**

* $P < 0.05$ vs control; # $P < 0.05$ vs preoperation.

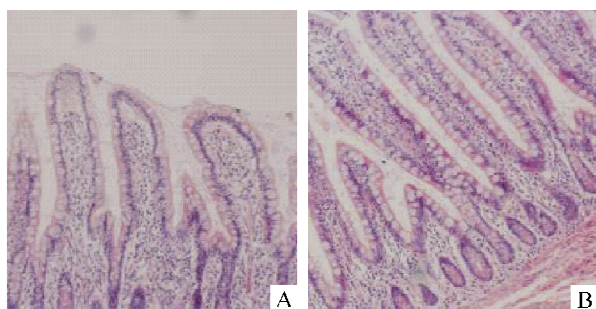


Fig 1 Villi of small intestine of Gln + rhGH group (HE staining, $\times 200$). A: preoperation; B: postoperation.

图1 Gln + rhGH 组治疗前后小肠绒毛

3 肠粘膜 PCNA 表达的变化

PCNA 阳性的细胞主要分布于肠隐窝区, 胞核呈棕红色, PCNA 表达指数显示 Gln + rhGH 组经 TPN 治疗后明显大于术前及其它 3 组 ($P < 0.05$)。术前 4 组肠粘膜上皮 PCNA 表达指数均无明显差异 ($P >$

0.05)(见表 4、图 2)。

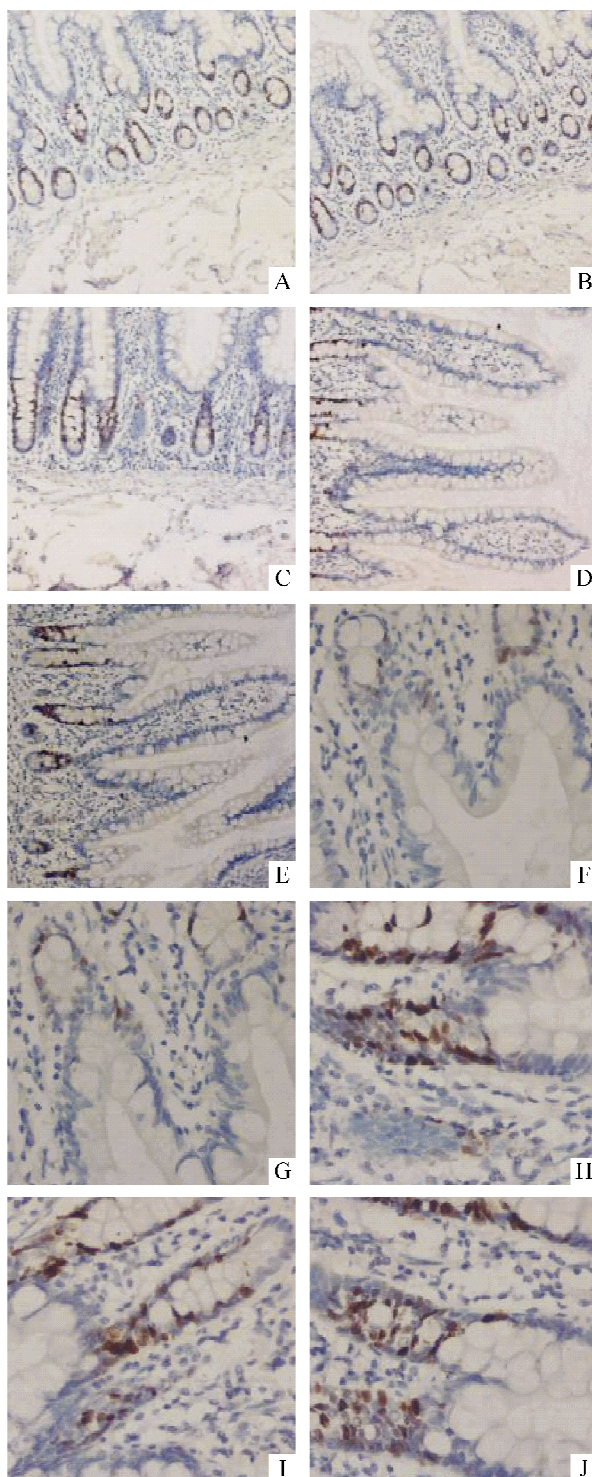


Fig 2 PCNA expression of intestinal mucosa in different groups. Brown nucleus are seen in PCNA positive cells (A - E: DAB staining, $\times 200$; F - J: DAB staining, $\times 300$). A, F: preoperation; B, G: control; C, H: Gln; D, I: rhGH; E, J: Gln + rhGH.

图2 不同组肠粘膜 PCNA 的表达

讨 论

本研究检测了 29 例门静脉高压症患者术前的

表 4 4 组病人手术前后肠粘膜上皮 PCNA 表达指数的变化
 Tab 4 Changes of PCNA index of intestinal epithelial cells in four groups(% , $\bar{x} \pm s$)

Group	PCNA index of preoperation	PCNA index of postoperation
Control(<i>n</i> = 8)	16.02 ± 2.06	15.65 ± 2.56
Gln (<i>n</i> = 6)	16.78 ± 1.15	20.21 ± 3.42
rhGH(<i>n</i> = 8)	15.96 ± 2.12	21.20 ± 2.32
Gln + rhGH(<i>n</i> = 7)	16.20 ± 1.87	24.08 ± 1.85 ^{*#}

^{*} *P* < 0.05 vs preoperation; [#] *P* < 0.05 vs another three groups.

L/M 值均高出正常范围,提示门静脉高压症患者肠粘膜通透性已经明显受损。4 组患者各自术前与术后第 8 d 的 L/M 值相比差异显著(*P* < 0.05),提示门脉高压症患者术后的肠粘膜通透性进一步增加,肠粘膜屏障功能受到严重破坏^[4]。

虽然已经有许多证据证明 Gln^[5]、rhGH^[6] 对维持肠粘膜具有保护作用,本研究中经过 7 d TPN,Gln 组的 L/M 值与单纯 TPN 组的 L/M 值差异无显著,肠粘膜绒毛高度和陷窝深度与术前以及对照组比较无显著性差异,说明在 TPN 的基础上单独加用 Gln 并不足以明显降低门脉高压症患者肠粘膜通透性和维护肠粘膜的完整性^[7]。这一结果与其它研究^[8]认为 Gln 能显著改善肠粘膜屏障功能的结果存在差别。我们认为,一方面可能同 Gln 治疗作用与剂量间存在相关性有关;另一方面,可能与其他作者的研究病种不同有关。肠上皮细胞表面有丰富的生长激素(GH)受体和胰岛素样生长因子(IGF-1)受体,GH 可提高肠粘膜细胞谷氨酰胺酶的活性,增加其对谷氨酰胺的摄取和利用,还能够上调应激状态下肠粘膜细胞蛋白质 mRNA 的转录以促进蛋白质的合成^[9]。肝硬化患者的蛋白分解伴随着明显的 GH 抵抗现象,IGF-1 和胰岛素样生长因子结合蛋白-3(IGFBP-3)浓度降低。患者术后 IGF-1 产生进一步受到影响,使蛋白质的合成受到更加明显的抑制^[10],本实验结果表明即使补充 Gln 仍不能促进肠粘膜的有效修复。外源性补充 GH 可以克服肝硬化患者 GH 抵抗现象,使 IGF-1 及 IGFBP 水平升高,改善负氮平衡。术后联合应用 Gln 与 rhGH 组的 L/M 值相对于对照组的 L/M 值有显著性差异(*P* < 0.05),肠粘膜绒毛高度和陷窝深度与术前以及对照组比较有显著性差异(*P* < 0.05),说明 Gln 与 rhGH 发挥协同作用,在一定程度上保护了肠粘膜屏障。

肠上皮干细胞是肠粘膜受损伤后修复的主要细胞来源,促进肠上皮干细胞增殖即可维护肠粘膜的机械屏障功能,防止或减少肠道细菌易位。在细胞分裂周期中,PCNA 最能反映细胞的增殖活性,是判

断细胞增殖状况的最好的分子学指标之一^[11]。PCNA 是 DNA 聚合酶 δ(DNApolδ)的附属蛋白,能极大地促进 DNApolδ 的合成活性。本结果发现,Gln 和 rhGH 联合应用更有利于维护肠粘膜屏障功能。此作用可能与其增加肠粘膜上皮 PCNA 表达,从而促进肠粘膜上皮细胞增殖有关,但确切机制有待更深入研究。

[参 考 文 献]

[1] De - Souza DA, Green LJ. Intestinal permeability and systemic infections in critically ill patients; effect of glutamine[J]. Crit Care Med, 2005, 33(5): 1125 - 1135.
 [2] 蒋朱明,江华谷. 氨酰胺双肽对手术后患者结局影响的临床随机对照研究荟萃分析[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(23): 1610 - 1614.
 [3] 赵敏,孟醒. 谷氨酰胺对脂多糖血症大鼠热休克蛋白 70 和肿瘤坏死因子-α 表达的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21(8): 1587 - 1589.
 [4] 张珂,吴刚,李志伟,等. 肠内营养在维护门静脉高压症术后患者肠道粘膜屏障功能中的作用[J]. 中国临床营养杂志, 2003, 11(2): 96 - 99.
 [5] Byrne TA, Wilmore DW, Iyer K, et al. Growth hormone, glutamine, and an optimal diet reduces parenteral nutrition in patients with short bowel syndrome; a prospective, randomized, placebo - controlled, double - blind clinical trial [J]. Ann Surg, 2005, 242(5): 655 - 661.
 [6] Zhou Y, Wu XT, Yang G, et al. Clinical evidence of growth hormone, glutamine and a modified diet for short bowel syndrome; meta - analysis of clinical trials[J]. Asia Pac J Clin Nutr, 2005, 14(1): 98 - 102.
 [7] Karel WE, Hulsewe, Bernadette, et al. Does glutamine - enriched parenteral nutrition really affect intestinal morphology and gut permeability[J]. Clin Nutr, 2004, 23(5): 1217 - 1225.
 [8] Lee CH, Chin WC, Chen SC, et al. Effects of glutamine - containing total parenteral nutrition on phagocytic activity and anabolic hormone response in rats undergoing gastrectomy[J]. World J Gastroenterol, 2005, 11(6): 817 - 822.
 [9] Matarese LE, Abu - Elmagd K. Can growth hormone and glutamine reduce parenteral nutrition requirements in patients with short - bowel syndrome [J]. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2006, 3(4): 194 - 195.
 [10] Carroll PV, Jackson NC, Russell - Jones DL, et al. Combined growth hormone/insulin - like growth factor 1 in addition to glutamine - supplemented TPN results in net protein anabolism in critical illness[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2004, 286(1): 151 - 157.
 [11] Marunis MJ. On the road to repair: PCNA encounters SUMO and ubiquitin modifications[J]. Mol Cell, 2002, 10(3): 441 - 442.