

# 谷氨酰胺对脓毒症模型大鼠心肌细胞的保护作用

柴其翔<sup>1\*</sup>, 韦四喜<sup>1</sup>, 王娅婷<sup>1</sup>, 方琴<sup>2</sup>, 王季石<sup>1#</sup> (1. 贵阳医学院附属医院血液科, 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院附属白云医院药剂科, 贵阳 550058)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)31-4378-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.31.19

**摘要** 目的: 研究谷氨酰胺(Gln)对脓毒症模型大鼠心肌细胞的保护作用。方法: 取大鼠随机分为假手术(生理盐水)组、模型(生理盐水)组和Gln低、中、高剂量(0.5、0.75、1.0 g/kg)组, 每组10只。除假手术组大鼠行假手术外, 其余各组大鼠采用盲肠结扎穿孔术复制脓毒症大鼠模型。术后10 min内各组大鼠分别尾iv相应药物, 检测术后12 h各组大鼠血清中乳酸脱氢酶(LDH)、磷酸肌酸激酶(CK)、肌钙蛋白I(Tn I)含量, 观察心肌细胞特征和凋亡指数, 检测心肌细胞中Bcl-2、p53 mRNA表达。结果: 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌细胞出现坏死的病理现象, 血清中CK、LDH、Tn I含量和凋亡指数升高, 心肌细胞中Bcl-2 mRNA表达减弱、p53 mRNA表达增强, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与模型组比较, Gln中、高剂量组大鼠心肌细胞损伤程度明显减轻, 血清中CK、LDH、Tn I含量和凋亡指数降低, 心肌细胞中Bcl-2 mRNA表达增强、p53 mRNA表达减弱, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。结论: Gln可明显改善脓毒症模型大鼠心肌细胞损伤, 其机制可能与下调p53基因表达、上调Bcl-2基因表达有关。

**关键词** 脓毒症; 谷氨酰胺; 心肌细胞; 大鼠

## Protective Effects of Glutamine on Cardiac Muscle Cell in Septic Model Rats

CHAI Qi-xiang<sup>1</sup>, WEI Si-xi<sup>1</sup>, WANG Ya-ting<sup>1</sup>, FANG Qin<sup>2</sup>, WANG Ji-shi<sup>1</sup> (1. Dept. of Hematology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China; 2. Dept. of Pharmacy, the Affiliated Baiyun Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550058, China)

**ABSTRACT** **OBJECTIVE:** To study protective effects of glutamine (Gln) on cardiac muscle cell in septic model rats. **METHODS:** Rats were randomly divided into sham operation group (normal saline), model group (normal saline) and Gln low-dose, medium-dose and high-dose groups (0.5, 0.75, 1.0 g/kg) with 10 rats in each group. In these groups, septic rat model was induced by cecal ligation and puncture except sham operation group received sham operation. They were given relevant medicine intravenously 10 min after operation, and the characteristics and apoptosis of cardiac muscle cell were observed 12 h after operation. The serum contents of CK, LDH and Tn I, and the expression of Bcl-2 and p53 mRNA were all detected. **RESULTS:** Compared with sham operation group, myocardial necrosis of model group was found, and the serum content of CK, LDH and Tn I and apoptotic index increased, and mRNA expression of Bcl-2 in cardiac muscle cell decreased while that of p53 increased, with statistical significance ( $P < 0.05$ ). Compared with model group, myocardial injury relieved significantly in Gln high-dose and medium-dose groups, and serum contents of CK, LDH and Tn I and apoptotic index decreased; mRNA expression of Bcl-2 increased in cardiac muscle cell while that of p53 decreased, with statistical significance ( $P < 0.05$ ). **CONCLUSIONS:** Gln can improve myocardial injury of septic model rats significantly, by a possible mechanism of down-regulating the expression of p53 gene and up-regulating the expression of Bcl-2 gene.

**KEYWORDS** Sepsis; Glutamine; Cardiac muscle cell; Rat

脓毒症主要是指细菌感染而引发的全身性炎症反应综合征(Systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 主要出现在烧伤、缺血性休克再灌注、严重创伤及大手术等临床疾病或者治疗中, 严重时可导致患者出现脓毒症休克、多器官功能障碍、衰竭, 甚至死亡。临床研究均证实, 脓毒症是一个综合性疾病, 发病机制比较复杂, 可能与细菌感染、炎症反应、出凝血机制异常及免疫系统紊乱等有关<sup>[1]</sup>。

国内外学者在脓毒症治疗中由传统单纯营养支持向营养治疗转变, 并提出了免疫营养、生态免疫营养等新医疗理念。

\* 医师, 硕士。研究方向: 血液病的靶向治疗。E-mail: 776734107@qq.com

# 通信作者: 主任医师, 教授, 博士生导师。研究方向: 调控血红素加氧酶对白血病的影响。E-mail: jishiwang9646@163.com

谷氨酰胺(Glutamine, Gln)是人体非必需氨基酸, 但却是人体内含量最丰富的游离性氨基酸。随着临床研究不断深入, Gln在烧伤患者营养支持中的作用已经超越传统补充氨基酸的作用; 对于严重烧伤患者或者大手术患者处于应激状态时, 机会消耗大量的蛋白质且处于氮平衡状态, 通过补充外源性Gln, 可有效增加患者胃肠道黏膜上皮的细胞数量, 并持续维持机体免疫细胞的基本功能, 提高临床治疗效果<sup>[2]</sup>。目前, Gln对于内源性脓症患者心肌的保护作用尚未发现大量报道, 故笔者以内源性脓毒症大鼠为模型, 研究Gln对脓毒症模型大鼠心肌细胞的保护作用。

## 1 材料

### 1.1 仪器

PTC-200型梯度聚合酶链反应(PCR)仪(美国Bio-Rad公司);DYY-4C型电泳仪(北京六一仪器厂);ZPM-200型光学显微镜、NDA-200ROHS型检测仪[纳优科技(北京)有限公司];Multiskan™ FC型酶标仪(美国Thermo公司)。

## 1.2 药品与试剂

Gln(美国Sigma公司,纯度:99%);总RNA提取试剂[宝生物工程(大连)有限公司];逆转录(RT)试剂盒(上海叶舟生物科技有限公司);Taq DNA聚合酶(广州东盛生物科技有限公司);凋亡测定试剂盒(美国Roche公司);乳酸脱氢酶(LDH)、磷酸肌酸激酶(CK)检测试剂盒(上海基免实业有限公司);肌钙蛋白I(Tn I)检测试剂盒(美国Lifekey公司);荧光定量试剂盒(上海开放生物科技有限公司);引物(三博远志生物技术有限公司)。

## 1.3 动物

健康SPF级SD大鼠60只,♀39只,♂21只,体质量(225±25)g,由新疆医科大学第一附属医院实验动物科学研究部提供,合格证号:SYXK(新)2011-0001。所有大鼠均在常规生活环境下自由饮食、饮水;在进入实验室前1周进入实验室进行适应性饲养。

## 2 方法

### 2.1 分组、建模与给药

取60只大鼠随机分为假手术(生理盐水)组、模型(生理盐水)组和Gln低、中、高剂量(0.5、0.75、1.0 g/kg)组,每组10只。除假手术组大鼠行假手术外,其余各组大鼠采用盲肠结扎穿孔术复制脓毒症大鼠模型。术后10 min内,Gln低、中、高剂量组大鼠分别尾iv相应的Gln,假手术组和模型组大鼠尾iv等量生理盐水。各组大鼠清醒后单笼喂养,均在常规生活环境下饮食、饮水。

### 2.2 血清中LDH、CK、Tn I含量的检测

各组大鼠分别于术后12 h采血,置于5 ml消毒EP管中,于4℃下8 000 r/min(离心半径6.5 cm)离心5 min,取上层血清,按照LDH、CK、Tn I检测试剂盒相关说明操作,使用酶标仪分别于440、660、450 nm波长处测定LDH、CK、Tn I的光密度(OD)。

### 2.3 心肌组织凋亡细胞的检测

各组大鼠取血后处死,取心肌组织,清洗、除去残留血液,置于10%福尔马林中进行固定。将心肌组织放在10%多聚赖氨酸包被载玻片上后,干燥,采用石蜡包埋切片,染色,400倍视野显微镜下对各组细胞的形态学特征进行分析,并计算细胞凋亡指数(细胞凋亡阳性数/总细胞数×100%)。

### 2.4 心肌细胞中Bcl-2、p53 mRNA表达的检测

采取RNAiso Plus方法提取各组大鼠心肌组织中细胞总RNA,RT采用cDNA,引物序列:Bcl-2上游引物为5'-CTGTACGGCCCCAGCATGCG-3',下游引物为5'-GCTTTGTTT-CATGGTACATC-3';p53上游引物为5'-GTTCCGAGAGCTGAATGAGG-3',下游引物为5'-TTTTATGGCGGGACGTAGAC-3';β-actin(内参)上游引物为5'-GATGATATCGCCGC-

GCTCGTCGTCGAC-3',下游引物为5'-AGCCAGGTCCAG-ACGCAGGATGGCATG-3'。RT-PCR反应条件:将心肌组织在94℃中进行3 min预变性,行1个循环;PCR反应则在95℃中进行5 s、60℃中进行30 s,行40个循环;离解反应主要在95℃中进行15 s、60℃中进行30 s、95℃中进行15 s,行1个循环。采集扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳半定量检测法,以Bcl-2、p53扩增条带OD值与内参OD值的比值进行评估。

## 2.5 统计学方法

采用SPSS13.0软件进行统计学分析。数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,计量资料行方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 血清中CK、LDH、Tn I含量比较

与假手术组比较,模型组大鼠血清中CK、LDH、Tn I含量均增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,Gln中、高剂量组大鼠血清中CK、LDH、Tn I含量均降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );其余各组比较差异无统计学意义。各组大鼠血清中CK、LDH、Tn I含量测定结果见表1。

表1 各组大鼠血清中CK、LDH、Tn I含量测定结果( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Tab 1 Serum contents of CK, LDH and Tn I in rats of each group( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

组别	CK	LDH	Tn I
假手术组	315.46 ± 7.37	286.82 ± 16.41	1.32 ± 0.26
模型组	788.31 ± 5.49*	764.31 ± 12.35*	4.38 ± 0.38*
Gln低剂量组	612.34 ± 5.29	588.13 ± 12.01	3.06 ± 0.28
Gln中剂量组	561.79 ± 6.62 <sup>#</sup>	531.07 ± 11.84 <sup>#</sup>	2.87 ± 0.32 <sup>#</sup>
Gln高剂量组	528.35 ± 4.59 <sup>#</sup>	390.15 ± 10.72 <sup>#</sup>	2.63 ± 0.28 <sup>#</sup>

注:与假手术组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$

Note: vs. sham operation group, \* $P < 0.05$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P < 0.05$

### 3.2 心肌细胞变化和凋亡指数测定结果

镜下,假手术组大鼠心肌组织细胞无明显病理变化;模型组大鼠心肌细胞纤维出现断裂现象,心肌间质明显水肿,心肌细胞发生空泡性病变,心肌细胞明显坏死;Gln低、中、高剂量组大鼠心肌细胞可见不同程度的与模型组相似的病理变化,但程度较轻,其中高剂量组程度最轻。假手术组、模型组和Gln低、中、高剂量组大鼠心肌细胞的凋亡指数分别为(7.86 ± 0.71)%、(34.05 ± 3.57)%、(28.12 ± 4.28)%、(22.24 ± 5.15)%、(19.44 ± 1.42)%。其中与假手术组比较,模型组大鼠心肌细胞的凋亡指数增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,Gln低、中、高剂量组大鼠心肌细胞的凋亡指数降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 3.3 心肌细胞中Bcl-2、p53 mRNA表达的测定结果

与假手术组比较,模型组大鼠心肌细胞中Bcl-2 mRNA表达降低、p53 mRNA表达增强,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与模型组比较,Gln低、中、高剂量组大鼠心肌细胞中Bcl-2 mRNA表达增强、p53 mRNA表达减弱,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。各组大鼠心肌细胞中Bcl-2、p53 mRNA表达的测定结果见表2。

表2 各组大鼠心肌细胞中 Bcl-2、p53 mRNA 表达的测定结果  
( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Tab 2 mRNA expression of Bcl-2 and p53 in cardiac muscle cells of rats in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	Bcl-2 mRNA	p53 mRNA
假手术组	1.02 ± 0.00	0.35 ± 0.14
模型组	0.02 ± 0.04*	2.63 ± 0.26*
Gln 低剂量组	0.31 ± 0.02 <sup>#</sup>	1.51 ± 0.09 <sup>#</sup>
Gln 中剂量组	0.37 ± 0.03 <sup>#</sup>	1.05 ± 0.00 <sup>#</sup>
Gln 高剂量组	0.40 ± 0.04 <sup>#</sup>	1.00 ± 0.05 <sup>#</sup>

注:与假手术组比较,\* $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$

Note: vs. sham operation group, \* $P<0.05$ ; vs. model group, <sup>#</sup> $P<0.05$

### 3 讨论

Gln 化学名称为 2-氨基-5-羧基戊酰胺,分子质量为 146.15。Gln 是一种人体内含量最丰富的非必需氨基酸,占游离氨基酸含量的 50% 左右。在正常状态下,人体血浆中 Gln 含量为 680~800 μmol/L,肌肉组织中 Gln 含量为 20~30 mmol/L,与其他氨基酸相比含量相对较高。相关报道发现,在人体氨基酸成分中 Gln 又具有一定特殊性,Gln 化学分子式为 C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,由于其含有 2 个氨基,因此在蛋白代谢、氨转运方面可发挥重要作用,可为体内物质合成提供充足的氮源,再加之其自身含有 5 个碳原子,可持续提供碳链,提高机体内物质的氧化功能<sup>[9]</sup>。目前,Gln 是临床医学界公认的具有特殊功效的免疫营养物质之一,可有效保护肠道黏膜的完整性,并促进机体内蛋白质合成,抑制高分解代谢,提升机体免疫能力,促进机体创伤面快速恢复。虽然在正常人体内 Gln 并非必需氨基酸,但是对于危重患者则是一种必要氨基酸物质,近年来临床学者尝试从营养免疫学、生理学、营养学等领域研究 Gln 的营养生理功能。

有研究表明,脓毒症可引发心肌缺血再灌注损伤,促使心肌细胞中大量生成自由基,导致心肌细胞内钙超出正常载荷,在大量中性粒细胞浸润、线粒体损伤等因素作用下增加心肌膜的通透性,从而促进心肌细胞凋亡,最终损伤机体的心肌组织<sup>[4-5]</sup>。本研究结果显示,Gln 可改善脓毒症模型大鼠心肌细胞损伤,并减少心肌酶(LDH、CK)释放,以此来抑制心肌细胞凋亡,与文献报道<sup>[6]</sup>一致。

临床研究发现,脓毒症发病中 p53 基因可诱导心肌细胞凋亡,在机体处于正常状态时,p53 基因无法发挥调节功能,但是机体处于应激状态或者心肌细胞受到损伤时,p53 基因便会被

激活,其使组织受损细胞进入细胞周期实现分裂,以此来激活凋亡程序而促使心肌细胞凋亡<sup>[7]</sup>。在心肌细胞凋亡中,Bcl-2 蛋白家族可通过各种途径发挥抑制细胞凋亡作用,因此在治疗中可以通过下调 p53 基因表达、上调 Bcl-2 基因表达,从而维持机体处于正常状态<sup>[8]</sup>。本研究结果显示,Gln 能有效抑制脓毒症模型大鼠心肌细胞凋亡,其机制可能与下调 p53 基因表达、上调 Bcl-2 基因表达有关。

随着临床药理学研究不断深入,在各类烧伤、严重创伤及大手术中 Gln 的功效已经远远超越了传统非必需氨基酸的作用。当脓毒症患者的心肌组织受到损伤且处于应激状态时,给予 Gln 可有效补充外源性 Gln,并通过多种渠道对脓毒症患者的肠道屏障、代谢功能、免疫能力及抗氧化作用等发挥重要作用,维持免疫细胞的正常功能,提升脓毒症临床治愈率。但对于临床推广应用中所涉及的给药剂量、方式及治疗时间等因素,仍然需要进一步临床研究。

### 参考文献

- [1] 姚咏明,盛志勇.脓毒症防治学[M].北京:科学技术文献出版社,2008:13-25.
- [2] 尹海燕,何志捷,王吉文,等.谷氨酰胺对脓毒症大鼠心肌细胞 Bcl-2/Bax 表达的影响[J].中华急诊医学杂志,2009,18(10):1 037.
- [3] Farmer DG, Venick RS. Morbidity and mortality associated with chronic intestinal failure[J]. *Transplantation*, 2008, 85(10):1 385.
- [4] 牛婵娟,刘平.谷氨酰胺在脓症患者营养支持中的作用[J].氨基酸和生物资源,2014,36(4):29.
- [5] 吴锡平,沈丽娟.参附注射液对脓症患者心肌损伤的保护作用观察[J].中国药房,2013,24(40):3 790.
- [6] 吴海燕.丙氨酰谷氨酰胺在脓症患者治疗中的疗效观察[J].泰山医学院学报,2011,32(2):94.
- [7] Ryter SW, Choi AM. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from metabolism to molecular therapy[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2009, 41(3):251.
- [8] 戚仁斌,纪惜鑫,熊怡,等.甘氨酸谷氨酰胺对缺氧/复氧损伤心肌细胞的保护作用及机制研究[J].中国药理学通报,2011,27(5):656.

(收稿日期:2015-02-03 修回日期:2015-06-15)

(编辑:邹丽娟)

《中国药房》杂志——《文摘杂志》(AJ)收录期刊,欢迎投稿、订阅