

谷氨酰胺对脓毒症小鼠氧化应激损伤的保护作用研究

曹婧然¹ 骆彬¹ 王海燕¹ 刘兵兵¹ 石红梅² 李国风³ 李增宁¹

(1. 河北医科大学第一医院临床营养科, 河北 石家庄 050031; 2. 河北医科大学公共卫生学院卫生化学教研室, 河北 石家庄 050031; 3. 河北省疾病预防控制中心药研所, 河北 石家庄 050031)

【摘要】 目的 探讨谷氨酰胺是否可以减轻脓毒症小鼠的氧化应激损伤, 从而为临床应用提供实验依据。**方法** 按随机数字表采取完全随机化方法将 5 周龄雄性昆明小鼠分为对照组、模型组、谷氨酰胺组 3 组, 每组 10 只。模型组与谷氨酰胺组腹腔注射内毒素 5 mL/kg 制备脓毒症模型, 对照组腹腔注射等量生理盐水。制模成功后, 谷氨酰胺组即刻尾静脉注射丙氨酸谷氨酰胺注射液 0.75 g/kg, 模型组和对照组尾静脉注射等量无菌生理盐水。6 h 后终止实验, 眼眶取血后处死动物, 取血清和肝、肾组织匀浆检测氧化应激指标超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)。**结果** 与对照组比较, 模型组血清、肝、肾组织 SOD 活性、GSH-Px 明显降低, MDA 含量明显升高。与模型组比较, 谷氨酰胺组血清、肝、肾组织 SOD 活性、GSH-Px 明显升高, MDA 含量明显降低[血清 SOD(U/mL): 134.78 ± 3.74 比 124.60 ± 3.49 , 肝脏 SOD(U/mg): 56.71 ± 1.35 比 49.84 ± 0.86 , 肾脏 SOD(U/mg): 46.22 ± 1.22 比 43.22 ± 1.52 ; 血清 GSH-Px(U/mL): 325.15 ± 21.86 比 267.04 ± 13.5 , 肝脏 GSH-Px(U/mg): 91.35 ± 1.59 比 83.40 ± 1.33 , 肾脏 GSH-Px(U/mg): 136.08 ± 0.58 比 132.97 ± 0.74 ; 血清 MDA($\mu\text{mol/L}$): 9.20 ± 0.32 比 13.67 ± 1.24 , 肝脏 MDA(nmol/mg): 1.85 ± 0.10 比 4.88 ± 0.17 , 肾脏 MDA(nmol/mg): 2.47 ± 0.12 比 3.52 ± 0.27 , 均 $P < 0.01$]。**结论** 脓毒症造成氧化应激与氧化损伤, 使用谷氨酰胺可以提高抗氧化酶 GSH-Px、SOD 水平, 增强抗氧化能力, 减少脂质代谢产物 MDA 含量, 减少有毒代谢产物, 从而起到减少氧化应激损伤的作用。

【关键词】 脓毒症; 氧化应激; 谷氨酰胺

A study on protective effect of glutamine on oxidative stress injury in mice with sepsis Cao Jingran*, Luo Bin, Wang Haiyan, Liu Bingbing, Shi Hongmei, Li Guofeng, Li Zengning. *Department of Clinical Nutrition, the First Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050031, Hebei, China
Corresponding author: Li Zengning, Email: lizengning@126.com

【Abstract】 Objective To explore whether glutamine can ameliorate oxidative stress injury in mice with sepsis in order to provide an experimental basis for clinical application. **Methods** Thirty 5-week old Kunming male mice were randomly divided into three groups: control, model and glutamine groups, 10 mice in each group. Lipopolysaccharide (LPS) 5 mL/kg was injected into intraperitoneal cavity to establish septic model in model and glutamine groups, and an equal amount of normal saline was injected into the cavity in control group. After the septic model was successfully established, propylene ammonia acyl-glutamine 0.75 g/kg was immediately injected through tail vein in the glutamine group, and an equal amount of sterile normal saline was injected into the vein in the model and control groups. After 6 hours, the experiment was terminated, the blood was collected from the orbital cavity and the animal was sacrificed; serum, liver and renal tissue homogenates were taken to detect the indexes of oxidative stress, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), and lipid metabolite malonaldehyde (MDA). **Results** Compared with the control group, the levels of SOD activities and GSH-Px of serum and liver, kidney tissue in the model group were significantly lower, and the MDA content was significantly higher. Compared with the model group, the levels of SOD activities and GSH-Px of serum and liver, kidney tissue in the glutamine group were significantly higher, and the MDA content was significantly lower [SOD in the serum (U/mL): 134.78 ± 3.74 vs. 124.60 ± 3.49 , SOD in the liver (U/mg): 56.71 ± 1.35 vs. 49.84 ± 0.86 , SOD in the kidney (U/mg): 46.22 ± 1.22 vs. 43.22 ± 1.52 ; GSH-Px in serum (U/mL): 325.15 ± 21.86 vs. 267.04 ± 13.5 , GSH-Px in liver (U/mg): 91.35 ± 1.59 vs. 83.40 ± 1.33 , GSH-Px in kidney (U/mg): 136.08 ± 0.58 vs. 132.97 ± 0.74 ; MDA in serum ($\mu\text{mol/L}$): 9.20 ± 0.32 vs. 13.67 ± 1.24 , MDA in liver (nmol/mg): 1.85 ± 0.10 vs. 4.88 ± 0.17 , MDA in kidney (nmol/mg): 2.47 ± 0.12 vs. 3.52 ± 0.27 , all $P < 0.01$]. **Conclusion** Sepsis can cause oxidative stress and oxidative damage, glutamine not only can improve the levels of antioxidant enzymes of GSH-Px and SOD, enhance antioxidant capacity, reduce the MDA content of lipid metabolites, but also can reduce the toxic metabolites, so as glutamine has the effect of ameliorating oxidative stress injury.

【Key words】 Sepsis; Oxidative stress; Glutamine

随着临床营养学的发展,营养支持的目的已经不再是单纯满足能量的需求,而是扩充到维护细胞、组织器官功能,促进患者康复,即由营养支持到营养治疗^[1-2]。危重患者机体常常处于氧化应激状态,氧化应激状态下释放较多的自由基造成氧化应激损伤,加重疾病的炎症反应,影响疾病的预后^[3]。脓毒症(sepsis)是指由感染等因素引起的全身炎症反应综合征(SIRS)。由于脓毒症疾病状态下氧化应激损害更为严重,因此在对脓毒症患者进行营养支持时应考虑添加可以减少氧化应激的营养素。

谷氨酰胺是人体重要的条件必需氨基酸与药理营养素,在人体正常生理代谢与疾病应激状态下都发挥着重要作用。研究表明:谷氨酰胺可以有效预防营养不良状态下肌体组织的分解^[4];维持胃黏膜屏障的完整性,促进应激后胃肠愈合^[5];增强机体免疫功能^[6];改善癌症患者的营养不良状况,并减少放化疗带来的多种不良反应^[7]。同时,谷氨酰胺作为免疫营养素,还应用于各种免疫缺陷状态,如骨髓移植后的营养支持^[8]、人类获得性免疫缺陷综合征(艾滋病)患者的营养治疗^[9]以及各种危重症病的营养支持治疗中^[10]。近些年来,谷氨酰胺作为一种具有抗氧化作用的氨基酸也得到研究者的青睐^[11],尤其是在氧化应激相关疾病中发挥的作用。本研究通过建立脓毒症动物氧化应激模型,探究谷氨酰胺是否可以减少氧化应激损伤,增强其抗氧化能力。

1 材料与方法

1.1 主要实验动物与材料:实验动物为昆明小鼠,购于河北医科大学动物实验中心,动物合格证号:1309071。内毒素(100 mg)购于美国 Sigma 试剂公司;N2-L-丙氨酰 L-谷氨酰胺注射液 50.0 mL/kg(即 20% 谷氨酰胺注射液);购于重庆莱美药业股份有限公司。超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、丙二醛(MDA)试剂盒购于南京建成生物公司。

1.2 动物分组方法及氧化应激模型制备

1.2.1 动物模型制备预实验:在开始正式实验前,对内毒素致脓毒症氧化应激模型制模成功与否进行预实验验证。选取 10 只 5 周龄雄性昆明小鼠,平均体质量为 (30.67 ± 1.65) g,采取完全随机化方法平均分为模型组与对照组,每组 5 只。模型组腹腔注射内毒素 5 mL/kg 制备脓毒症模型^[12-13];对照组腹腔注射等量生理盐水。6 h 后终止实验,眼眶取血后颈椎脱臼法处死动物,分离血清检测氧化应激

指标 SOD、GSH-Px、MDA。结果显示,模型组 SOD、GSH-Px 水平低于对照组,MDA 水平高于对照组,且差异具有统计学意义。证明采取腹腔注射内毒素构建小鼠脓毒症氧化应激模型成功。

1.2.2 动物分组及处理:5 周龄雄性昆明小鼠 30 只,平均体质量 (30.28 ± 3.65) g,参照随机数字表按完全随机原则将动物分为对照组、模型组、谷氨酰胺组,每组 10 只。模型组与谷氨酰胺组腹腔注射内毒素 5 mL/kg 制备脓毒症动物模型;对照组腹腔注射等量生理盐水。模型复制成功后,谷氨酰胺组即刻尾静脉注射丙氨酰谷氨酰胺注射液 0.75 g/kg^[14-15];模型组和对照组尾静脉注射等量无菌生理盐水。6 h 后终止实验,眼眶取血后用颈椎脱臼法处死动物,解剖分离出肝肾组织,迅速液氮冷冻。动物血低温放置,析出血清,离心,吸取血清,液氮冷冻待测。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 组织标本测定:从液氮中取出待测标本在 4℃ 冰箱中解冻,组织块在冷生理盐水中漂洗,除去血液,滤纸拭干,准确称取 0.3 g,以 1:9 的比例加入生理盐水(2.7 mL)进行组织匀浆,重复 6~8 次,制成 10% 匀浆液,离心 15 min,取上清液进行测定。部分 10% 匀浆液用生理盐水按 1:9 比例稀释成 1% 组织匀浆待测。使用分光光度计检测肝、肾组织中氧化应激指标 SOD、GSH-Px、MDA,按试剂盒说明书操作。为达到实验结果的稳定性,制备好的匀浆液均在当天进行测定。

1.3.2 血清指标测定:使用分光光度计检测血清中氧化应激指标 SOD、GSH-Px、MDA 水平,按照试剂盒说明步骤操作。

1.4 数据的收集与分析方法:使用 EXCEL 2003 进行数据录入,使用 SPSS 16.0 软件进行数据的描述与分析。首先对各组进行正态性与方差齐性检验,如果独立样本的数据服从正态性与方差齐性,采取参数检验方法进行假设检验。两组间比较采用 *t* 检验;3 组间比较采用单因素方差分析,进一步的两两比较采用 SNK-*q* 检验。如果数据不服从正态性与方差齐性,采用多个独立样本比较的 Kruskal-Wallis *H* 非参数检验,进一步的两两比较采用秩转换后的方差分析。检验水准为 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

实验终止时,模型组有 1 只小鼠死亡。谷氨酰胺对脓毒症小鼠氧化应激保护作用的结果见表 1。

本研究结果显示:模型组血清、肝、肾组织 SOD、

表 1 谷氨酰胺对脓毒症小鼠氧化应激损伤的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	SOD			GSH-Px			MDA		
		血清(U/mL)	肝脏(U/mg)	肾脏(U/mg)	血清(U/mL)	肝脏(U/mg)	肾脏(U/mg)	血清($\mu\text{mol/L}$)	肝脏(nmol/mg)	肾脏(nmol/mg)
对照组	10	141.87 $\pm$ 3.77	59.84 $\pm$ 2.18	54.79 $\pm$ 0.98	396.15 $\pm$ 8.68	132.12 $\pm$ 3.90	154.91 $\pm$ 2.05	6.12 $\pm$ 0.47	1.46 $\pm$ 0.47	1.36 $\pm$ 0.08
模型组	9	124.60 $\pm$ 3.49 ^a	49.84 $\pm$ 0.86 ^a	43.22 $\pm$ 1.52 ^a	267.04 $\pm$ 13.50 ^a	83.40 $\pm$ 1.33 ^a	132.97 $\pm$ 0.74 ^a	13.67 $\pm$ 1.24 ^a	4.88 $\pm$ 0.17 ^a	3.52 $\pm$ 0.27 ^a
谷氨酰胺组	10	134.78 $\pm$ 3.74 ^b	56.71 $\pm$ 1.35 ^b	46.22 $\pm$ 1.22 ^b	325.15 $\pm$ 21.86 ^b	91.35 $\pm$ 1.59 ^b	136.08 $\pm$ 0.58 ^b	9.20 $\pm$ 0.32 ^b	1.85 $\pm$ 0.10 ^b	2.47 $\pm$ 0.12 ^b

注:与对照组比较,^a $P<0.01$;与模型组比较,^b $P<0.01$

GSH-Px 水平低于对照组,MDA 水平高于对照组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。脓毒症模型建立后,小鼠处于氧化应激状态,抗氧化酶水平下降,并伴随脂质代谢产物生成增加,这都会引发氧化损伤,影响疾病预后。谷氨酰胺组血清、肝、肾组织 GSH-Px、SOD 水平均高于模型组,MDA 水平低于模型组,差异均有统计学意义(均 $P<0.01$)。说明谷氨酰胺可以提高抗氧化酶活性,降低脂质代谢产物水平,起到一定的减少氧化损伤的作用。

3 讨论

GSH-Px 是机体内广泛存在的一种过氧化物分解酶,它能特异性地催化还原型谷胱甘肽(GSH)对氢过氧化物的还原反应。一般认为 GSH-Px 在细胞内能清除有害的过氧化物代谢产物,阻断脂质过氧化连锁反应,从而起到保护细胞膜结构和功能完整的作用。硒是 GSH-Px 的必须组成部分,GSH-Px 的活性中心是硒半胱氨酸,因此测定 GSH-Px 活性可以作为衡量机体硒水平的生化指标^[16-17]。硒能催化 GSH 变为氧化型谷胱甘肽(GSSG),使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物,同时促进过氧化氢(H_2O_2)的分解,从而保护细胞膜的结构及功能不受过氧化物的干扰及损害。已有研究证明:谷氨酰胺是谷胱甘肽的前体物质,补充谷氨酰胺有助于提高体内谷胱甘肽水平,提高机体的抗氧化能力^[18]。SOD 对机体的氧化与抗氧化平衡起着至关重要的作用,具有较强的清除超氧阴离子自由基的作用,保护细胞免受损伤^[19-20]。机体通过酶系统和非酶系统产生氧自由基,后者能攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸引发脂质过氧化作用,并由此形成脂质过氧化物,使组织细胞受损伤。脂质过氧化物不仅把活性氧转化成非自由基性的脂质分解产物,而且通过链式或链式支链反应放大活性氧的作用。氧自由基还能通过脂氢过氧化物的分解产物引起细胞损伤。因此,测试 MDA 水平常常可以反映机体脂质氧化的程度,间接反映细胞损伤程度^[21]。MDA 是细胞膜上多不饱和脂肪酸受自由基攻击而产生的脂质

过氧化产物,它的增高常提示机体氧化应激损伤,通常与各种抗氧化酶一起来评价抗氧化能力。

现代医学研究发现,许多疾病的发生与自由基的多余生成和氧化应激有密切关系。尤其是危重症疾病发病过程中会产生大量自由基,这些自由基对机体细胞进行攻击,进一步加重炎症反应,影响疾病的预后^[22-23]。因此,在危重症疾病的营养治疗中,不仅要考虑提供足够的能量与氮源,还应该添加具有减少氧化应激作用的免疫营养素。谷氨酰胺作为重要的一种免疫调节因子,用于危重症疾病的营养治疗,可以减少自由基的氧化损伤。本实验中,谷氨酰胺组血清及肝、肾组织中 GSH-Px、SOD 水平均高于模型组,MDA 水平低于模型组。脓毒症常常由于全身感染并发肝肾损害,继而引发急性肝肾功能不全,甚至发展成全身炎症反应与多器官功能障碍,这样会严重影响疾病预后,增加病死率。在传统营养支持治疗基础上添加谷氨酰胺,可以提高肝脏与肾脏的抗氧化能力,减轻脂质代谢产物的毒害作用,具有积极的意义。

4 结论

脓毒症疾病状态下存在氧化应激损伤,添加免疫营养素谷氨酰胺可以提高抗氧化酶 GSH-Px、SOD 水平,增强机体抗氧化能力,减少脂质代谢有毒产物 MDA 含量,从而发挥提高机体抗氧化能力,减少氧化损伤的作用。本次实验结论还需要进一步的临床试验研究证实以及高质量等级循证医学证据的支持,并且需要深入到细胞与分子水平研究谷氨酰胺在危重症疾病中发挥减轻氧化应激作用的机制,从而为谷氨酰胺的临床应用提供科学有力的理论支持。

参考文献

- [1] 李银平.从营养支持到营养治疗——一脉相承中的思辨[J].中华危重病急救医学,2006,18(10):580-581.
- [2] 李宁,于建春,蔡威.临床肠外肠内营养支持治疗学[M].北京:中华医学电子音像出版社,2012:14-19.
- [3] 王新颖,李维勤,李宁,等.谷氨酰胺缺乏对危重病患者免疫及脏器功能的影响[J].中华危重病急救医学,2006,18(3):143-145.

- [4] 蒋朱明, 吴蔚然. 肠内营养[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 113-136.
- [5] 许晓东, 孙元水, 邵钦树, 等. 肠内免疫营养对胃癌患者术后肠黏膜屏障功能的影响[J]. 中华胃肠外科杂志, 2011, 14(6): 436-439.
- [6] Cavalcante AA, Campelo MW, De Vasconcelos MP, et al. Enteral nutrition supplemented with L-glutamine in patients with systemic inflammatory response syndrome due to pulmonary infection[J]. Nutrition, 2012, 28(4): 397-402.
- [7] 罗斌, 江华, 杨豫宁, 等. 谷氨酰胺与谷氨酰胺二肽用于外科营养支持的证据: 中英文文献随机对照研究的系统评价[J]. 中华临床营养杂志, 2003, 11(4): 252-258.
- [8] Oliva García JG, Pereyra-García Castro F, Suárez Llanos JP, et al. Efficacy of parenteral glutamine in patients undergoing bone marrow transplantation[J]. Nutr Hosp, 2012, 27(1): 205-208.
- [9] Bouvier G. Nutrition. How important is glutamine supplementation in HIV infection? [J]. HIV Clin, 2005, 17(1): 7.
- [10] Avenell A. Glutamine in critical care: current evidence from systematic reviews[J]. Proc Nutr Soc, 2006, 65(3): 236-241.
- [11] 邹晓防. 大鼠肠缺血/再灌注时给予谷氨酰胺和精氨酸能引起 PPAR- γ 和 iNOS 表达差异[J]. 中华危重病急救医学, 2006, 18(1): 53.
- [12] 彭曦, 陈蓉春, 王裴, 等. 谷氨酰胺对烧伤大鼠肠上皮细胞线粒体呼吸功能的影响[J]. 中华危重病急救医学, 2004, 16(2): 93-96.
- [13] 梁艳. 谷氨酰胺对脓毒症肺损伤大鼠肺组织中 PPAR- γ 表达的影响[D]. 长沙: 中南大学, 2009.
- [14] Kwon WY, Suh CJ, Kim KS, et al. Glutamine attenuates acute lung injury by inhibition of high mobility group box protein-1 expression during sepsis[J]. Br J Nutr, 2010, 103(6): 890-898.
- [15] Lee WY, Hu YM, Ko TL, et al. Glutamine modulates sepsis-induced changes to intestinal intraepithelial γ δ T lymphocyte expression in mice[J]. Shock, 2012, 38(3): 288-293.
- [16] 王晓峰, 沈耀亮, 郑峰, 等. 大黄联合谷氨酰胺对大鼠肠黏膜屏障损伤后修复的实验研究[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20(6): 341-344.
- [17] 刘敬臣, 王海棠, 王维. 丙氨酰谷氨酰胺对脓毒症大鼠肺损伤的保护作用[J]. 中南大学学报(医学版), 2008, 33(12): 1095-1100.
- [18] Ki MR, Yun NR, Hwang SY. Glutamine-induced production and secretion of Helicobacter pylori gamma-glutamyltranspeptidase at low pH and its putative role in glutathione transport[J]. J Microbiol Biotechnol, 2013, 23(4): 467-472.
- [19] 夏国栋, 吕沐瀚, 刘翼, 等. 麦滋林对重症急性胰腺炎患者细胞免疫功能的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2013, 20(4): 237-239.
- [20] 袁媛, 王学敏, 梁梦凡, 等. 谷氨酰胺对脓毒症小鼠腹腔巨噬细胞细胞因子分泌的影响[J]. 上海交通大学学报(医学版), 2008, 28(7): 822-826.
- [21] Lorente L, Martín MM, Abreu-González P, et al. Prognostic value of malondialdehyde serum levels in severe sepsis: a multicenter study[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53741.
- [22] Sikazwe D, Grillo A, Ramsinghani S, et al. Small diverse antioxidant functionalities for oxidative stress disease discovery[J]. Mini Rev Med Chem, 2012, 12(8): 768-774.
- [23] 顾景范, 杜寿珍, 郭长江. 现代临床营养学[M]. 北京: 科学技术出版社, 2009: 373-382.

(收稿日期: 2015-04-27)

(本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

本刊常用的不需要标注中文的缩略语(一)

1 秒用力呼气容积

(forced expiratory volume in 1 second, FEV₁)

B 型钠尿肽(B-type natriuretic peptide, BNP)

C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)

 γ -干扰素(γ -interferon, IFN- γ)

白细胞计数(white blood cell count, WBC)

白细胞介素-4(interleukin-4, IL-4)

丙二醛(malondialdehyde, MDA)

不稳定型心绞痛(unstable angina pectoris, UAP)

超敏心肌肌钙蛋白 I

(high sensitive cardiac troponins I, hs-cTnI)

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)

充血性心力衰竭(congestive heart failure, CHF)

创伤性脑损伤(trumatic brain injury, TBI)

胆碱酯酶(cholinesterase, ChE)

对比剂肾病(contrast induced nephropathy, CIN)

多器官功能衰竭(multiple organ failure, MOF)

肺炎严重程度指数(pneumonia severity index, PSI)

改良早期预警评分(modified early warning score, MEWS)

肝性脊髓病(hepatic myelopathy, HM)

高迁移率族蛋白 B1(high mobility group protein B1, HMGB1)

核转录因子- κ (nuclear factor- κ B, NF- κ B)

呼气末正压(positive end-expiratory pressure, PEEP)

呼吸机相关性肺炎(ventilator associated pneumonia, VAP)

活化凝血时间(activated coagulation time, ACT)

肌红蛋白(myoglobin, MYO)

肌酸激酶(creatine kinase, CK)

肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme MB, CK-MB)

急性病毒性心肌炎(acute viral myocarditis, AVI)

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)

急性冠脉综合征(acute coronary syndrome, ACS)

急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)

急性有机磷农药中毒

(acute organophosphorus pesticide poisoning, AOPP)

简明精神病评定量表(brief psychiatric rating scale, BPRS)

降钙素(calcitonin, CT)

降钙素原(procalcitonin, PCT)

经皮冠状动脉介入(percutaneous coronary intervention, PCI)

巨噬细胞炎症蛋白(macrophage inflammatory protein, MIP)

连续性肾脏替代治疗

(continuous renal replacement therapy, CRRT)

抗人胸腺细胞球蛋白(antihuman thymocyte globulin, ATG)

临床肺部感染评分(clinical pulmonary infection score, CPIS)