

肠内生态营养对创伤后大鼠肠屏障功能的影响

余利坚, 徐亮, 姚晖, 魏仁志, 綦晓龙

余利坚, 泸州市人民医院普外科 四川省泸州市 646000
徐亮, 姚晖, 魏仁志, 綦晓龙, 泸州医学院附属医院胃肠外科
四川省泸州市 646000
通讯作者: 徐亮, 646000, 四川省泸州市, 泸州医学院附属医院
胃肠外科. yulijianyouxiang@sina.com
电话: 0830-2392712-5448 传真: 0830-2392718
收稿日期: 2006-11-28 接受日期: 2006-12-18

Effects of enteral econutrition on intestinal mucosal barrier function in wounded rats

Li-Jian Yu, Liang Xu, Hui Yao, Ren-Zhi Wei,
Xiao-Long Qi

Li-Jian Yu, Department of General Surgery, Luzhou People's Hospital, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Liang Xu, Hui Yao, Ren-Zhi Wei, Xiao-Long Qi, Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China
Correspondence to: Liang Xu, Department of Gastrointestinal Surgery, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou 646000, Sichuan Province, China. yulijianyouxiang@sina.com
Received: 2006-11-28 Accepted: 2006-12-18

Abstract

AIM: To study effects of enteral econutrition on the function of intestinal mucosal barrier in wounded rats.

METHODS: A total of 30 Wistar rats were randomly and averagely divided into 3 groups, which received common forage (CF), enteral nutrition (EN) and enteral econutrition (EEN), respectively, for 7 days. The ileal membrane morphology and the numbers of IgA⁺, CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells were examined.

RESULTS: The villus height (205.4 μm vs 177.7 μm, $P < 0.05$), crypt depth (99.4 μm vs 77.7 μm, $P < 0.05$), mucosal thickness (299.9 μm vs 267.0 μm, $P < 0.05$) and villus surface area (10 321.5 μm² vs 8927.6 μm², $P < 0.05$) of ileum were increased in EEN group as compared with those in control group, but there was no significance between EN and EEN group ($P > 0.05$). The quantities of IgA⁺ (21.2 vs 17.5, 19.4, $P < 0.05$), CD3⁺ (24.2 vs 20.2, 22.1, $P < 0.05$), CD4⁺ (13.4 vs 8.9, 11.0, $P <$

0.05) and CD8⁺ (18.7 vs 12.6, 15.4, $P < 0.05$) cells were increased in EEN group as compared with those in control and EN group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: Enteral econutrition can restore and improve the function of intestinal mucosal barrier in wounded rat.

Key Words: Enteral nutrition; Econutrition; Intestinal mucosal barrier; Wistar rat

Yu LJ, Xu L, Yao H, Wei RZ, Qi XL. Effects of enteral econutrition on intestinal mucosal barrier function in wounded rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(5):509-512

摘要

目的: 研究肠内生态营养对创伤后大鼠肠道屏障功能的影响。

方法: 将30只Wistar大鼠随机分为3组, 即对照组、普通肠内营养组和肠内生态营养组。胃造瘘术后分别给予普通饲料、肠内营养剂和肠内生态营养剂7 d, 检测小肠黏膜形态学参数和黏膜IgA⁺, CD3⁺, CD4⁺和CD8⁺细胞数量。

结果: 肠内生态营养组的小肠绒毛高度(205.4 μm vs 177.7 μm, $P < 0.05$)、肠腺隐窝深度(99.4 μm vs 77.7 μm, $P < 0.05$)、黏膜厚度(299.9 μm vs 267.0 μm, $P < 0.05$)以及绒毛表面积(10 321.5 μm² vs 8927.6 μm², $P < 0.05$)均高于对照组, 肠内生态营养组和普通肠内营养组比较差异无显著性($P > 0.05$)。肠内生态营养组大鼠小肠黏膜中IgA⁺细胞(21.2 vs 17.5, 19.4, $P < 0.05$)和CD3⁺(24.2 vs 20.2, 22.1, $P < 0.05$), CD4⁺(13.4 vs 8.9, 11.0, $P < 0.05$)、CD8⁺(18.7 vs 12.6, 15.4, $P < 0.05$)细胞数均高于对照组和普通肠内营养组。

结论: 肠内生态营养能较好的改善创伤后大鼠的小肠机械屏障功能, 促进小肠黏膜屏障功能的恢复, 增强其肠道免疫功能。

关键词: 肠内营养; 生态营养; 肠黏膜屏障; Wistar大鼠

■背景资料

近几十年通过对肠内营养的研究发现, 其不仅可以为机体提供营养, 而且可以改善肠黏膜屏障功能, 起到阻止SIRS和多器官功能障碍的发生和发展。而随着肠内营养剂的商品化生产, 肠内营养的运用范围逐渐扩大, 对围手术期的肠内营养成为研究热点, 人们早就发现手术、创伤对肠道菌群有着较大的影响, 单纯的肠内营养并不完全符合生理状态, 故对于改善肠道菌群的生态营养的研究应运而生。

■ 创新盘点

本研究对普通手术创伤后的大鼠术后早期应用肠内营养, 比较普通的肠内营养和肠内生态营养对肠道黏膜和肠道免疫屏障功能的影响, 此类动物实验现阶段还较少。

余利坚, 徐亮, 姚晖, 魏仁志, 慕晓龙. 肠内生态营养对创伤后大鼠肠屏障功能的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(5):509-512
http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/509.asp

0 引言

随着对肠道微生态结构与功能研究的不断加深, 肠道菌群对机体健康的重要性逐步被认识. Bengmark^[1-2]根据多年临床观察和研究结果分析, 同时考虑到生态制剂在维护肠道正常功能的独特作用, 提出生态营养的概念, 即在传统肠内营养的基础上补充肠道有益菌群, 利用肠道内有益菌群的生物拮抗作用, 减少致病菌的过度生长. 同时提高肠道细菌的酵解效能以改善肠道内环境, 最终达到维护肠道微生态及肠道屏障功能, 改善机体营养状态及抗病力, 减少创伤、危重患者感染率的目的。

1 材料和方法

1.1 材料 选用清洁级Wistar大鼠30只, 体质量190-270 g, 雌雄各半, 由泸州医学院动物科提供, 随机分为3组: 对照组(control)、普通肠内营养组(EN)、肠内生态营养组(EEN), 每组各10只. 瑞素(Fresubin)购于Fresenius Kabi-华瑞公司. 金双歧片(口服双歧杆菌、乳杆菌、嗜热链球菌三联活菌片), 规格为0.5 g/片, 主要成分: 内含长型双歧杆菌活菌不低于 0.5×10^7 CFU, 保加利亚乳杆菌活菌和嗜热链球菌活菌不低于 0.5×10^6 CFU, 购于内蒙古双奇药业股份有限公司, 国药准字S19980004. 小鼠抗大鼠CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺单克隆抗体试剂均购于Serotec公司, 山羊抗大鼠IgA α 重链特异性单克隆抗体购于Rockland公司, SP系列试剂盒和相关的二抗购于北京中杉生物技术公司。

1.2 方法 大鼠适应性喂养2 d后, 手术造大鼠胃造瘘模型, 术后置于室温22-26℃, 湿度40%-70%的安静、通风良好的环境中单笼饲养, 除对照组给予大鼠专用饲料外, EN, EEN组分别给予不同成分的肠内营养剂(等氮等热量), 经胃造瘘管给予喂养, EN组给予瑞素, EEN组给予瑞素添加金双歧片(每只大鼠所用活菌数量大约为 1×10^8 CFU/d), 制成混悬液均现配现用. 所有营养剂配置后均存放于冰箱中, 但不得超过24 h. 各组能量供应均为1037 kJ/(kg·d), 于大鼠术后开始喂养, 第1天注入全量的1/2, 第2天注入全量的2/3, 第3天开始注入全量. 喂养7 d后处死大鼠, 距回盲部5 cm切取3 cm长的末段回肠, 清洗后立即置

于40 g/L中性甲醛中固定约12 h后, 然后常规石蜡包埋。

1.2.1 肠黏膜形态学参数 HE染色后, 显微镜下观察大鼠小肠黏膜形态结构. 每只动物取5张不连续的切片, 每张切片顺次取奇数视野观测10个绒毛, 并测量: 绒毛高度、肠腺隐窝深度、黏膜厚度以及绒毛表面积。

1.2.2 肠黏膜IgA⁺, CD3⁺, CD4⁺和CD8⁺细胞数量检测 免疫组织化学染色后镜下观察, 每张切片观察不相邻的5个视野, 计算出每张切片平均每个高倍视野IgA⁺和CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺细胞数。

统计学处理 实验结果计量资料以均数±标准差(mean±SD)表示, 均数的比较用方差分析, 均采用SPSS11.0统计软件包进行分析, 按检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

30只大鼠中, EN组1只于术后6 h死亡, 原因不详. EN, EEN组各有1只大鼠因术后胃造瘘管脱出或堵塞而退出实验, 其余27只大鼠完成实验。

2.1 小肠黏膜形态参数测定结果 显微镜下观察, 各组大鼠小肠肠壁层次清楚, 黏膜上皮结构完整, 无明显充血和炎性细胞浸润. 对照组的肠黏膜萎缩, 绒毛矮而稀疏. 而EN组和EEN组肠黏膜绒毛高而密集, 其肠黏膜绒毛高度、腺隐窝深度、黏膜厚度和绒毛表面积均明显高于对照组(除EN组黏膜厚度), EN组和EEN组间差异无显著性(表1)。

2.2 小肠黏膜中IgA⁺, CD3⁺, CD4⁺和CD8⁺细胞的数量 通过免疫组织化学染色后, IgA⁺, CD3⁺, CD4⁺和CD8⁺细胞胞质被染成均匀的棕黄色, 细胞核被染成深蓝色, 绝大部分阳性细胞局限于黏膜层内, 计算出平均每高倍视野下阳性细胞数(表2)。

3 讨论

胃肠道不仅具有消化吸收的功能, 而且还具有肠道屏障功能, 其主要包括: 机械屏障、化学屏障、免疫屏障和生物屏障等4部分. 结构完整的肠黏膜上皮及细胞间的紧密连接构成机械屏障; 肠黏膜上皮细胞分泌的黏液、消化液和肠道寄生菌产生的抑菌物质为化学屏障; 肠黏膜上皮细胞分泌的sIgA, IgM等抗体及黏膜T淋巴组织组成黏膜免疫屏障; 肠道内正常共生菌对致病菌的定植抵抗作用及其菌间聚集构成了生物屏障. 以上任何一部分受损, 均可导致肠道屏障功

表 1 各组大鼠小肠黏膜形态参数

分组	n	绒毛高度(μm)	腺隐窝深度(μm)	黏膜厚度(μm)	绒毛表面积(μm ²)
对照组	10	177.7 ± 24.1	77.7 ± 6.2	267.0 ± 20.5	8927.6 ± 1214.1
EN	8	197.9 ± 16.8 ^a	88.5 ± 8.7 ^a	286.4 ± 23.8 ^a	9941.2 ± 842.1 ^a
EEN	9	205.4 ± 11.4 ^a	99.4 ± 11.9 ^a	299.9 ± 24.0 ^a	10321.5 ± 573.4 ^a

^aP<0.05 vs 对照组.

表 2 小肠黏膜中IgA⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺细胞的数量(mean ± SD个/高倍视野)

分组	n	IgA ⁺	CD3 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
对照组	10	17.5 ± 2.0	20.2 ± 1.0	8.9 ± 1.2	12.6 ± 2.1
EN	8	19.4 ± 1.3 ^a	22.1 ± 2.6 ^a	11.0 ± 2.0 ^a	15.4 ± 2.6 ^a
EEN	9	21.2 ± 2.0 ^{ac}	24.2 ± 2.4 ^{ac}	13.4 ± 1.9 ^{ac}	18.7 ± 2.9 ^{ac}

^aP<0.05 vs 对照组; ^cP<0.05 vs EN.

能损害, 导致细菌移位, 增加相关并发症. 大手术、创伤等应激状态下, 全身血流动力学改变可导致肠道的低灌注状态, 损害肠道黏膜屏障功能, 引起肠通透性升高, 在周围血中可检出内毒素^[3]或肠道常驻菌的特异DNA^[4]就是直接证据, 并与创伤程度成正比. 而正常人周围血中不能检测到肠腔内的常驻细菌特异DNA, 这是由于正常肠道屏障阻止了肠腔内常驻菌的入侵^[5].

肠上皮70%的营养供应来自肠腔内的直接营养吸收, 如果缺乏肠内营养的吸收将使肠黏膜处于病理状态^[6-7]. 本实验发现, 对照组的肠黏膜萎缩, 绒毛矮而稀疏, EN组和EEN组的小肠绒毛高度、肠腺隐窝深度、黏膜厚度、绒毛表面积均高于对照组(P<0.05), 表明肠内营养均可以避免应激状态下大鼠肠道绒毛的损害, 促进肠道绒毛的更新和修复, 增加了绒毛高度、腺隐窝深度和黏膜厚度, 增大了肠道绒毛表面积. 这与肠内营养对肠黏膜的营养作用密不可分. EN组和EEN组之间比较并没有显著差异(P>0.05), 表明肠内生态营养同普通肠内营养一样均能起到营养肠道上皮的作用, 促进肠道黏膜修复, 维护肠道黏膜屏障. 我们将延长生态营养给予的时间、增加剂量进行继续观察, 研究生态制剂对肠黏膜结构的持续影响.

肠道免疫屏障与肠黏膜中各种淋巴细胞的免疫功能有关, 即与肠相关淋巴样组织(gut-associated lymphoid tissue, GALT)和分泌型IgA(sIgA)有关. sIgA其相对分子质量为36 kDa, 是肠道分泌物中含量最丰富的免疫球蛋白, 是肠

道免疫的第一道防线, 在预防细菌黏附和移位上发挥重要的作用^[8]. CD3是构成T细胞抗原受体(TCR)的膜抗原, 主要分布于成熟T细胞、胸腺细胞和末梢T细胞等. CD4是辅助T细胞(helper T cell)的代表性的膜抗原, 他主要分布于大部分胸腺细胞和末梢T细胞, 可以辅助由TCR识别抗原-MHC复合体的同时, 规定T细胞的MHC class II限制性. CD8是杀伤T细胞(killer T cell)抑制T细胞(suppressor T cell)迟发性超敏反应(delayed type hypersensitivity, DTH)T细胞(DTH T cell)的共同标记, 辅助由TCR识别抗原-MHC复合体, 是选择的MHC class I限制性T细胞的重要分子^[9]. T淋巴细胞亚群不仅对于维护肠黏膜免疫屏障功能起着重要的作用^[10], 而且其对于全身免疫功能尤其是T淋巴细胞功能的改善也十分有益^[11]. EEN的黏膜IgA⁺, CD3⁺, CD4⁺和CD8⁺细胞高于对照组和EN组(P<0.05), 表明肠内生态营养比普通肠内营养更能促进术后大鼠肠道IgA的产生和肠黏膜GALT的增生, 从而促进了肠道免疫屏障恢复, 进而影响全身免疫状态, 减少细菌移位, 减少手术并发症, 促进创伤后大鼠恢复. 益生菌对于肠道防御的作用可能机制是: (1)在肠黏膜表面形成一层生物菌膜, 对致病菌起着生物拮抗作用, 起到占位性保护作用; (2)中和或减少肠道内某些有毒物质对肠黏膜造成的损害, 减少内毒素水平, 拮抗细菌毒素, 降低炎症反应; (3)细菌代谢为肠黏膜上皮细胞提供能量, 改善肠黏膜组织的局部血供, 促进损伤的肠上皮修复, 抑制致病菌繁殖; (4)激活肠道免疫系统活性,

■名词解释

1 肠内生态营养: 又称为肠内微生物生态营养, 即通过在肠内营养中添加益生菌, 从而改善肠道微生态, 进而更好的保护肠道屏障功能, 减少细菌和内毒素移位, 促进机体的康复.
2 益生菌: 对维护人体健康有重要功能作用, 但无或较低致病性的自然活微生物为益生菌. 他对于肠道黏膜免疫的发生和成熟是极为重要的, 又可以为肠道黏膜细胞提供某些营养成分, 对于维护肠道功能起着重要的作用.

■同行评价

本文研究了肠内生态营养对创伤后大鼠肠屏障功能的影响,设计合理,结果可靠,具有一定的临床指导意义。

促进GALT的增生,增加sIgA等抗体的分泌,增强肠道免疫功能; (5)激活单核巨噬细胞系统,促进了巨噬细胞的吞噬和消化功能^[12-15]。

总之,肠内生态营养能保护创伤后大鼠肠道黏膜,使肠道黏膜屏障功能和肠道免疫屏障功能改善,提高了抗病能力和耐受手术应激的能力。

4 参考文献

- 1 Bengmark S. Ecnutrition and health maintenance - A new concept to prevent GI inflammation, ulceration and sepsis. *Clin Nutr* 1996; 15: 1-10
- 2 Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora. *Gut* 1998; 42: 2-7
- 3 姚国相, 薛新波, 卢兴培, 王剑明, 王欣, 俞亚红, 朱峰, 姜立, 申铭, 丁志强, 秦仁义, 邹声泉, 钱家勤. 大手术后免疫增强型肠内营养对血浆内毒素水平、血浆灭活内毒能力和预后的影响. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 1992-1995
- 4 文利平, 蒋朱明, 唐伟松, 梁存和, 王树惠, 张云, 王宝贵. 外科手术患者血中细菌DNA的检出率. *中国临床营养杂志* 2000; 8: 33
- 5 武正炎. 普通外科手术并发症预防与处理. 第1版. 北京: 人民军医出版社, 2002: 25-28
- 6 徐亮, 魏仁志, 庞明辉, 付华. 胃肠手术后早期肠内营养的临床研究. *泸州医学院学报* 2002; 25: 100-103

- 7 龚圣济, 骆明德, 陈大伟, 全志伟, 沈军, 储冰峰, 张一楚, 蔡威, 汤庆娅, 夏韶明, 冯一. 含纤维素肠内营养在消化道外科手术患者中的应用. *世界华人消化杂志* 2001; 9: 483-484
- 8 吴国豪. 肠道屏障功能. *肠外与肠内营养* 2004; 11: 44-47
- 9 新保敏和·石黑精. CD分类手册. 第1版. 天津: 天津科技翻译出版社, 2001, 20-26
- 10 McGhee JR, Mestecky J, Elson CO, Kiyono H. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. *J Clin Immunol* 1989; 9: 175-199
- 11 陈强谱, 欧琨, 赵红梅, 周旭, 邢雪. 早期肠内营养对腹部手术后患者T淋巴细胞亚群的影响. *世界华人消化杂志* 2000; 8: 1438-1439
- 12 Tuohy KM, Probert HM, Smejkal CW, Gibson GR. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Drug Discov Today* 2003; 8: 692-700
- 13 Doron S, Gorbach SL. Probiotics: their role in the treatment and prevention of disease. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2006; 4: 261-275
- 14 Thorlacius H, Nobaek S, Wang XD, Andersson R, Molin G, Bengmark S, Jeppsson B. Lactobacilli attenuate bacteremia and endotoxemia associated with severe intra-abdominal infection. *Surgery* 2003; 134: 467-473
- 15 Medici M, Vinderola CG, Weill R, Perdigon G. Effect of fermented milk containing probiotic bacteria in the prevention of an enteroinvasive *Escherichia coli* infection in mice. *J Dairy Res* 2005; 72: 243-249

电编 张敏 编辑 张焕兰

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2007年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

欢迎订阅 2007 年《世界华人消化杂志》

本刊讯 《世界华人消化杂志》为中国科技核心期刊、2003年百种中国杰出学术期刊、《中文核心期刊要目总览》2004年版内科学类的核心期刊、中国科技论文统计源期刊,《世界华人消化杂志》发表的英文摘要被美国《化学文摘(Chemical Abstracts)》,荷兰《医学文摘库/医学文摘(EMBASE/Excerpta Medica)》,俄罗斯《文摘杂志(Abstracts Journals)》收录。

《世界华人消化杂志》综合介绍以下领域的内容:消化基础研究、消化临床研究、消化内科、消化内镜、消化外科、消化肿瘤、消化介入治疗、消化护理、消化医学影像、消化病理、消化预防医学、消化误诊误治、消化中西医结合、消化检验、消化新技术应用、消化病诊断、消化病治疗、消化新药应用、消化专家门诊。

《世界华人消化杂志》2007年由北京报刊发行局发行,国际标准刊号 ISSN 1009-3079,国内统一刊号CN 14-1260/R,邮发代号82-262,出版日期每月8,18,28日,月价72.00,年价864元。欢迎广大消化科医务工作者及科教人员、各大图书馆订阅。联系地址:100023,北京市2345信箱,世界胃肠病学杂志社。联系电话:010-85381901-1020;传真:010-85381893;E-mail:wcjd@wjgnet.com;网址:www.wjgnet.com。