

谷氨酰胺对肠组织TLR2、4及NF- κ B的调节与内毒素致肠损伤保护作用的关系

荆科, 孙梅

■背景资料

TLR是能识别病原微生物的免疫受体,通过信号转导激发天然免疫反应。NF- κ B的过度活化会激活、增强机体的非特异及特异性免疫反应,造成组织损伤和器官功能紊乱。谷氨酰胺是肠道重要的能源物质,能减轻病理状态下肠黏膜的损伤和改善肠黏膜屏障的功能。谷氨酰胺对肠道的保护作用是否与对TLR和NF- κ B的调节相关,尚不十分清楚。

荆科, 中国医科大学附属四院儿科 辽宁省沈阳市 110032
孙梅, 中国医科大学盛京医院儿科 辽宁省沈阳市 110004
作者贡献分布: 此课题由荆科与孙梅设计; 试剂由荆科提供; 完成实验, 数据分析, 撰写论文由荆科完成。
通讯作者: 荆科, 副主任医师, 110032, 辽宁省沈阳市, 中国医科大学附属四院儿科。jingke3185@sina.com
电话: 024-62571549
收稿日期: 2011-05-03 修回日期: 2011-07-19
接受日期: 2011-07-22 在线出版日期: 2011-07-28

Glutamine protects against endotoxin-induced intestinal injury by down-regulating TLR4 and NF- κ B expression in rats

Ke Jing, Mei Sun

Ke Jing, Department of Pediatrics, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China

Mei Sun, Department of Pediatrics, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, Liaoning Province, China

Correspondence to: Ke Jing, Department of Pediatrics, the Fourth Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110032, Liaoning Province, China. jingke3185@sina.com

Received: 2011-05-03 Revised: 2011-07-19

Accepted: 2011-07-22 Published online: 2011-07-28

Abstract

AIM: To investigate whether glutamine (Gln) exerts protective effects against endotoxin-induced intestinal injury in rats and to explore possible mechanisms involved.

METHODS: Twenty-four 10-day-old Wistar rats were equally and randomly divided into three groups: control group (intraperitoneally injected with normal saline 1 mL/kg), lipopolysaccharide (LPS) group (intraperitoneally injected with LPS 5 g/L), and Gln group (intraperitoneally injected with Gln 10 mL/kg and LPS 5 mg/kg). Rats were sacrificed 3 h after injection. A segment of distal ileum was dissected. The pathologic changes in the small intestine were observed under an optical microscope after hematoxylin-eosin staining. The mRNA and protein expression of TLR2/4 and NF- κ B was detected by RT-

PCR and immunohistochemistry, respectively.

RESULTS: The structure of the small intestine of rats in the control group was normal. Although inflammatory cell infiltration and interstitial and epithelial edema were observed in both the LPS group and Gln group, the pathological changes were significantly milder in the Gln group than in the LPS group. Compared to the LPS group, the mRNA and protein expression of TLR4 and NF- κ B was significantly lower in the Gln group (TLR4: 3.92 ± 0.50 vs 16.71 ± 1.28 , 38.80 ± 2.42 vs 20.69 ± 2.42 ; NF- κ B: 0.37 ± 0.14 vs 2.23 ± 0.72 , 17.21 ± 5.07 vs 22.76 ± 3.68 , $P < 0.01$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Gln exerts protective effects against intestinal injury in rats possibly by down-regulating TLR4 and NF- κ B mRNA and protein expression.

Key Words: Glutamine; Toll-like receptor; Nuclear factor- κ B; Lipopolysaccharide; Intestine

Jing K, Sun M. Glutamine protects against endotoxin-induced intestinal injury by down-regulating TLR4 and NF- κ B expression in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2011; 19(21): 2220-2225

摘要

目的: 探讨谷氨酰胺对肠组织TLR2、4及NF- κ B的调节与内毒素引起的肠损伤保护作用的关系。

方法: 24只日龄10 d的Wistar幼鼠随机分为正常对照组($n = 8$), 生理盐水1 mL/kg腹腔注射; 内毒素血症组($n = 8$), 脂多糖组(lipopolysaccharide, LPS)(5 g/L)5 mg/kg腹腔注射; 谷氨酰胺组(glutamine, Gln)($n = 8$), Gln 10 mL/kg(含谷氨酰胺13.46 mg/100 mL)+LPS 5 mg/kg腹腔注射。于腹腔注射后3 h处死幼鼠, 留取远端回肠组织, HE染色。光镜下观察肠组织病理改变, RT-PCR检测肠组织TLR2、4及NF- κ B mRNA的表达, 免疫组织化学检测肠组织TLR2、4及NF- κ B蛋白定位表达。

■同行评议者

秦春宏, 副主任医师, 南华大学附属第二医院普外科

结果: 光镜下对照组肠组织结构正常, Gln组和LPS组均可见间质和上皮细胞水肿, Gln组较LPS组明显减轻; 肠组织TLR2、4及NF- κ B mRNA表达Gln组较LPS组明显下降(3.055 ± 0.51 vs 4.09 ± 0.90 , 3.92 ± 0.50 vs 16.71 ± 1.28 , 0.37 ± 0.14 vs 2.23 ± 0.72 , 均 $P < 0.01$), 肠组织TLR4及NF- κ B蛋白定位表达Gln组较LPS组明显降低($P < 0.05$). TLR2蛋白定位表达Gln组较NS组、LPS组均增强($P < 0.01$).

结论: Gln减轻肠组织损伤的保护作用可能与其下调TLR4及NF- κ B mRNA和蛋白的表达相关.

关键词: 谷氨酰胺; Toll样受体; 核因子- κ B; 脂多糖; 肠组织

荆科, 孙梅. 谷氨酰胺对肠组织TLR2、4及NF- κ B的调节与内毒素致肠损伤保护作用的关系. 世界华人消化杂志 2011; 19(21): 2220-2225

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/19/2220.asp>

0 引言

Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)是近年发现的一种免疫受体, 是一种跨膜蛋白, 能识别病原微生物或细胞壁成分, 通过信号转导激发先天性免疫反应^[1-6], 引起细胞因子、炎症介质的释放, 导致组织损伤. 核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)是一种能与多种细胞基因的启动子和增强子中的 κ B序列位点发生特异结合的核转录因子, 是具有多向性调节作用的蛋白质分子, 具有广泛的生物学活性. 受感染、内毒素等多种因素刺激活化后, 参与调控多种因子的基因表达, 能促进细胞因子、黏附分子、趋化因子等基因转录, 在免疫调控、炎症、应激反应及细胞凋亡中起重要作用. NF- κ B的过度活化会激活、增强机体的非特异及特异性免疫反应, 造成组织损伤和器官功能紊乱^[7-11]. 谷氨酰胺(glutamine, Gln)是肠道重要的能源物质, 许多研究证实Gln能减轻病理状态下肠黏膜的损伤和改善肠黏膜屏障的功能^[12-19]. 但Gln对肠黏膜的保护作用的机制并不十分清楚. 本研究旨在探讨Gln对肠组织的保护作用是否可以通过抑制TLR和NF- κ B的表达而实现.

1 材料和方法

1.1 材料 清洁级Wistar幼鼠24只, 日龄10 d, 雌雄不限, 体质量为15-25 g, 由中国医科大学医学实验动物中心提供. 许可证号: SCXK(辽)2000-

0009; 内毒素(*Escherichia coli* O55:B5; 脂多糖, lipopolysaccharide, LPS)购于Sigma公司; TRIzol总RNA提取试剂购自美国Promega公司. RT-PCR试剂盒、反转录及PCR扩增所需要的酶及其他试剂购于大连宝生物工程公司(日本TaKaRa公司); 免疫组织化学试剂: TLR2兔抗大鼠IgG(一抗)购于Santa Cruz公司. TLR4、NF- κ B兔抗鼠IgG(一抗)购于武汉博士德生物工程有限公司; 即用型SABC试剂盒及DAB显色剂均购于武汉博士德生物工程有限公司. 即用型SABC试剂盒包括: 山羊抗兔IgG、SABC(链霉亲和素-过氧化物酶复合物)及正常血清封闭液. PCR引物根据MedLine数据库自行设计, 由上海英骏生物公司合成.

1.2 方法

1.2.1 分组和造模: 将24只幼鼠随机分为正常对照组[NS(normal saline)组 $n = 8$], 给予生理盐水1 mL/kg腹腔注射(intro-peritoneal, ip); LPS组($n = 8$), LPS(5 g/L)5 mg/kg ip; 谷氨酰胺组(glutamine, Gln, $n = 8$), Gln 10 mL/kg(含Gln 13.46 mg/100 mL)+LPS 5 mg/kg ip. 于腹腔注射后3 h处死, 留取距回盲端0.5-1 cm左右回肠组织, 于液氮冻存, 并转-70 °C保存, 另取肠组织4%甲醛固定, 以待检测和分析.

1.2.2 组织学观察: 4%多聚甲醛固定液中标本, 常规进行石蜡包埋、5 μ m组织切片、HE染色, 光学显微镜下观测肠组织学改变.

1.2.3 应用RT-PCR检测TLR和NF- κ B mRNA的表达: 按TRIzol总RNA提取试剂说明书进行操作提取总RNA, 并经紫外分光光度计测定, 计算提取物RNA浓度. 并经反转录扩增cDNA. RT-PCR检测NF- κ B mRNA表达取cDNA3 μ L(1 μ g), 10 \times Buffer 2 μ L, MgCl₂ 4 μ L, 10 mmol/L dNTPs 2 μ L, 引物100 ng, Tag DNA多聚酶1 U. 总体积20 μ L. 循环条件: 94 °C预变性3 min, 94 °C变性40 s, 退火1 min(TLR2 51.5 °C, TLR4 53.5 °C, NF- κ B 56 °C, β -actin 55 °C), 72 °C延伸(TLR2、4和NF- κ B 60 s, β -actin 90 s), 共35个循环, 72 °C共延伸7 min. 取PCR扩增产物2%琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像系统及分析系统进行条带分析, β -actin作为内参照标准化各组TLR2、4和NF- κ B mRNA含量(表1).

1.2.4 采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶法检测肠组织TLR2、4和NF- κ B蛋白定位表达: 石蜡切片常规脱蜡至水, 加300 mL/L H₂O₂+蒸馏水混合, 室温孵育10 min, 灭活内源性过氧化氢

■研究前沿

许多研究证实Gln能减轻病理状态下肠黏膜的损伤和改善肠黏膜屏障的功能. 但Gln对肠黏膜的保护作用的机制并不十分清楚.

■相关报道

Mihaela和Liboni
探究了谷氨酰胺
对NF- κ B的调节
与LPS诱导肠损伤
和休克的关系, 认
为谷氨酰胺具有
一定的保护作用。

表 1 TLR、NF- κ B及 β -actin引物序列

引物名称	扩增片段(bp)
TLR2 F: 5'-CGCTTCCTGAACCTGTCC-3' R: 5'-GGTTGTACCTGCTTCCA-3'	286
TLR4 F: 5'-CCAGAGCCGTTGGTGTAT-3' R: 5'-GCCCTGTGAGGTCGTTGA-3'	419
NF- κ B F: 5'-TGCGAATGGAGCGACAGG-3' R: 5'-AGGCCAAATGAAAGGAGTGG-3'	243
β -actin F: 5'-CACCCTGTGCTGCTCACCAGGCC-3' R: 5'-CCACACAGATGACTTGCCTCAGG-3'	690

酶, 蒸馏水冲洗。经热修复抗原, 滴加5% BSA封闭液, 室温下孵育30 min。滴加稀释的兔抗大鼠TLR2、4和NF- κ B抗体(一抗), 4℃孵育过夜。冲洗后滴加生物素标记的山羊抗兔IgG(二抗), 37℃孵育30 min。经冲洗, 再滴加SABC溶液, 37℃孵育30 min, 冲洗, 混匀后DAB显色, 室温条件下显色5 min, 蒸馏水充分洗涤。苏木素轻度复染10 min, 水洗反兰30 min。脱水、二甲苯透明处理, 封片。显微镜下观察。阴性对照: 除用PBS代替兔抗大鼠TLR2、4和NF- κ B抗体外, 其他步骤同上。结果判定TLR以细胞膜有棕黄色染色为阳性细胞; NF- κ B以细胞核和细胞质内有均匀的棕黄色颗粒染色为阳性细胞。

1.2.5 免疫组织化学测定蛋白表达: 每组图片取8个视野, 采取日本Olympus摄像系统和日本MetaMorph/BX41图像数据分析系统测定积分光密度值(integrated OD total, IODT)。

统计学处理 所有数据以mean \pm SD表示, 用SPSS17.0统计软件包, 进行方差分析, 组间比较采用LSD法检验, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 肠组织在光镜下变化 NS组肠绒毛完整, 上皮细胞排列整齐, 杯状细胞少见, 无明显异常改变; LPS组给予LPS后3 h肠组织可见明显异常, 绒毛间质可见有充血, 少许炎性细胞浸润, 水肿明显, 肠上皮细胞排列紊乱, 细胞水肿; Gln组间质和上皮细胞水肿较LPS组明显减轻, 杯状细胞明显增加(图1)。

2.2 肠组织TLR2、4和NF- κ B mRNA的表达 NS组TLR2表达较弱, LPS组TLR2表达较NS组明显增强($P<0.01$), Gln组TLR2表达弱于LPS组($P<0.01$)。TLR4在NS组有一定的表达, LPS组表达较NS组显著上调($P<0.01$), Gln组较LPS组表达明显下调($P<0.01$)。NF- κ B在NS组表达非常弱,

表 2 肠组织TLR2、4和NF- κ B mRNA/ β -actin吸光度值

指标	NS组	LPS组	Gln组
TLR2	1.37 \pm 0.04	4.09 \pm 0.90 ^b	3.06 \pm 0.51 ^{bd}
TLR4	9.87 \pm 0.36	16.71 \pm 1.28 ^b	3.92 \pm 0.50 ^{bd}
NF- κ B	0.62 \pm 0.02	2.23 \pm 0.72 ^b	0.37 \pm 0.14 ^d

^b $P<0.01$ vs NS组; ^d $P<0.01$ vs LPS组。

表 3 肠组织TLR2、4和NF- κ B蛋白表达IODT

指标	NS组	LPS组	Gln组
TLR2	38.74 \pm 13.62	50.43 \pm 3.37 ^a	39.36 \pm 8.79 ^c
TLR4	14.39 \pm 2.33	20.69 \pm 2.42 ^b	38.80 \pm 2.42 ^{bd}
NF- κ B	15.64 \pm 4.83	22.76 \pm 3.68 ^b	17.21 \pm 5.07 ^c

^a $P<0.05$, ^b $P<0.01$ vs NS组; ^c $P<0.05$, ^d $P<0.01$ vs LPS组。

LPS组表达较NS组明显增高($P<0.01$), Gln组较LPS组表达明显下调($P<0.01$, 表2, 图2)。

2.3 肠组织TLR2、4和NF- κ B蛋白定位表达 TLR2蛋白表达在NS组肠绒毛上皮细胞膜处可见颜色较浅的棕黄色染色, LPS组蛋白表达较NS组明显增强($P<0.01$), Gln组蛋白表达较NS组、LPS组均明显增强($P<0.01$, 图3A); TLR4蛋白表达在NS组肠绒毛上皮细胞膜可见棕黄色染色较浅, LPS组蛋白表达较NS组明显增强($P<0.01$), Gln组蛋白表达较LPS组明显减弱($P<0.05$, 图3B); NF- κ B蛋白表达在NS组肠绒毛顶端上皮细胞胞质和胞核内可见少量棕黄色染色, LPS组蛋白表达较NS组明显增强($P<0.05$), Gln组蛋白表达较LPS组明显降低($P<0.05$, 图3C, 表3)。

3 讨论

感染是儿科常见病之一, 其危重症常伴发胃肠功能障碍, 此时, 提示病情加重和预后不良, 胃肠功能障碍常常被认为是多器官功能衰竭的始发因子^[20], 发病机制与内毒素和肠黏膜屏障功能密切相关, 近年来备受人们的关注。当肠黏膜的屏障功能破坏, 肠道内细菌及毒素大量入血及组织中, 引起内毒素血症, 内毒素血症又可促进细胞因子、炎性介质的释放, 加重肠黏膜屏障的损坏, 加速危重症的发展过程, 因此胃肠功能障碍是导致全身炎症反应综合征(systemic inflammatory response syndrome, SIRS)和多器官功能衰竭(multiple organ failure, MOF)的重要因素之一^[21,22]。Gln被认为是一种条件必需氨基酸,

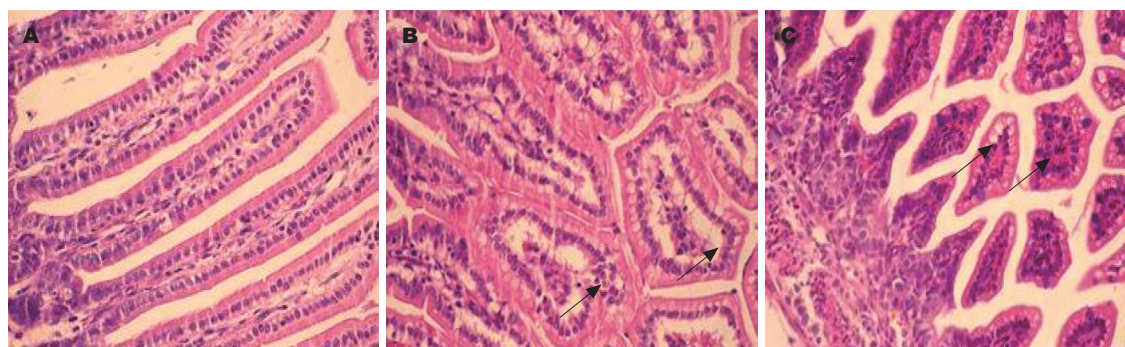


图1 肠组织光镜变化图(HE \times 400). A: NS组; B: LPS组; C: Gln组.

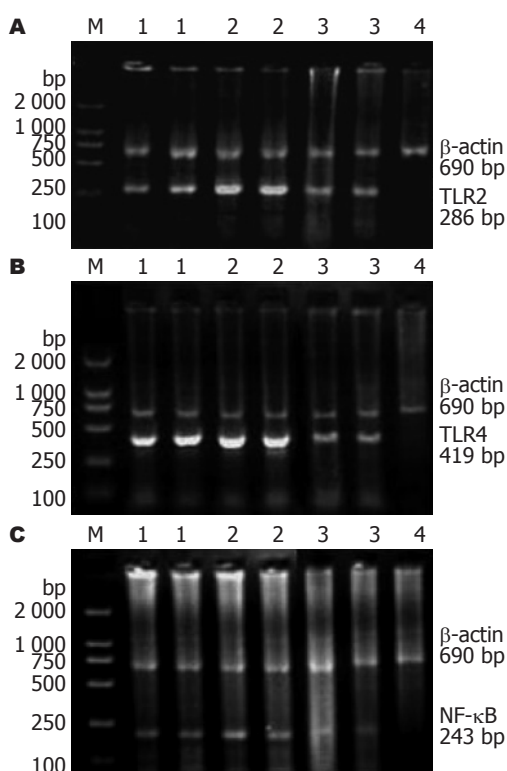


图2 肠组织TLR2、4和NF- κ B mRNA的表达. A: TLR2; B: TLR4; C: NF- κ B. M: Marker; 1: NS组; 2: LPS组; 3: Gln组; 4: 空白组.

是体内含量最为丰富的氨基酸, 是快速分裂细胞如黏膜上皮细胞、淋巴细胞等的主要能源物质. 是许多生物活性物质如核苷酸等的前质. 有资料表明对于重症感染的患者, 在全胃肠外营养(total parenteral nutrition, TPN)中给予Gln营养支持后, 可减轻肠黏膜的损伤和改善肠黏膜的屏障功能, 肠源性细菌易位的发生率明显下降, 使多脏器功能障碍综合征得到明显改善^[23-26].

以往的实验对Gln的作用多集中在营养支持方面的作用, 对Gln能减轻肠损伤的机制并没有清楚的阐述. 本研究显示对内毒素血症幼鼠给予Gln能明显下调TLR4和NF- κ B mRNA和蛋白的表达, 肠黏膜损伤明显减轻. LPS的识别和信

号转导是宿主发生防御反应的关键, LPS介导的细胞激活需细胞表面能够与内毒素结合的蛋白参与, 这些蛋白包括LPS结合蛋白(LPS binding protein, LBP)和CD14, 这些蛋白并没有跨膜转导信号的功能^[27,28]. 研究表明^[29]TLR4与CD14在与LPS的反应中的功能是紧密相连的, 其在肠道的分布也是密切相关的, 在肠道的表达有相似的模式. TLR即是免疫识别受体, 又是跨膜信号转导分子. TLR2、4均可识别LPS. 而TLR4是主要的识别受体^[30-32]. 研究表明^[33,34]TLR4与单独LPS的亲合力实际是相当低的, 在体内LPS形成LPS-LBP-CD14复合物后与TLR4结合的亲合力明显增强, 并使TLR4激活, 通过信号转导作用, 激活NF- κ B, NF- κ B激活并向核内移位, 促进促炎介质合成和释放, 如TNF- α 释放明显增加, 导致肠组织损伤, 使肠黏膜结构破坏和屏障功能降低, 导致细菌移位, 并可导致肠源性内毒素血症, 诱发MOF. 本研究表明Gln对TLR4 mRNA和蛋白的表达有明显的下调作用, 并同时伴有NF- κ B表达的下调, 肠组织损伤明显减轻. Gln对TLR4的表达下调作用其机制可能是多方面的. 其中Gln可能阻抑了TLR与LPS-LBP-CD14复合物或LPS-LBP与CD14等中间环节的结合, 使信号转导不能传导到细胞内, NF- κ B不能被激活, 因而炎症介质的合成释放受到抑制, 使肠黏膜免遭损伤. 因此, 我们认为Gln阻抑了TLR与LPS的结合, 减少了炎症介质的释放, 可能是其减轻肠黏膜损伤, 保护肠屏障功能的主要作用之一. 研究表明^[35,36], TLR2也被认为是LPS的信号转导分子, 在肠黏膜屏障保护方面起一定作用. 本研究显示Gln能下调mRNA表达, 但对肠黏膜蛋白表达无抑制作用. 这表明在肠组织损伤中TLR4可能起主要的作用. TLR2的作用有待进一步研究.

4 参考文献

- 1 Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A

■应用要点

本文研究了谷氨酰胺对TLR和NF- κ B的调节作用与肠损伤保护作用的关系, 扩展了谷氨酰胺对肠损伤保护作用机制的认识.

同行评价

本文选题恰当, 学术性较好, 对肠损伤的基础研究提供了实验基础。

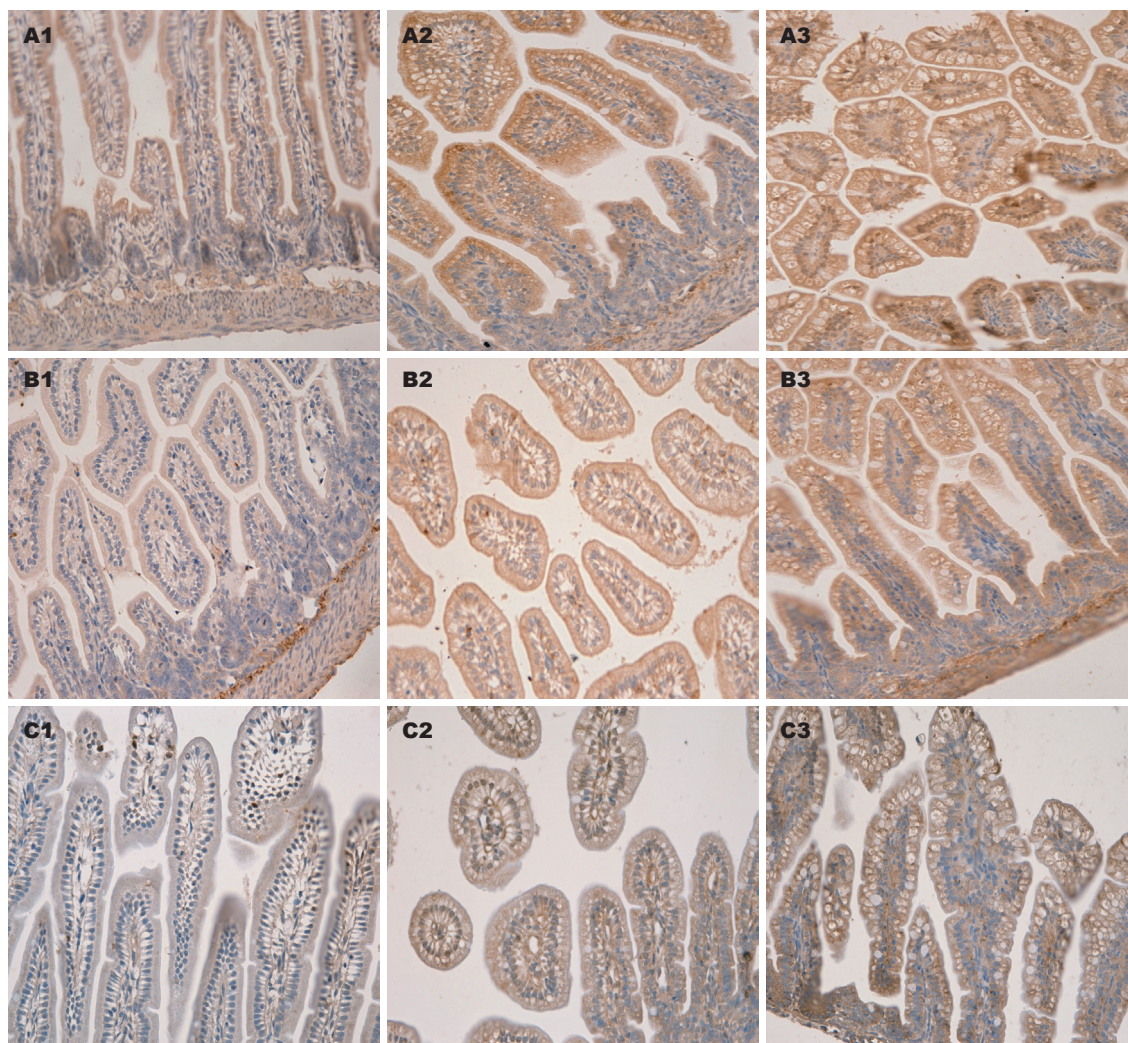


图3 免疫组织化学结果(光镜×400)。A: TLR2蛋白表达; B: TLR4蛋白表达; C: NF-κB蛋白表达; 1: NS组; 2: LPS组; 3: Gln组。

- human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997; 388: 394-397
- 2 Medzhitov R, Janeway CA. An ancient system of host defense. *Curr Opin Immunol* 1998; 10: 12-15
- 3 Krieg AM. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu Rev Immunol* 2002; 20: 709-760
- 4 Medzhitov R, Janeway C. The Toll receptor family and microbial recognition. *Trends Microbiol* 2000; 8: 452-456
- 5 Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 499-511
- 6 Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 2004; 430: 257-263
- 7 Gadjeva M, Wang Y, Horwitz BH. NF-kappaB p50 and p65 subunits control intestinal homeostasis. *Eur J Immunol* 2007; 37: 2509-2517
- 8 Gadjeva M, Tomczak MF, Zhang M, Wang YY, Dull K, Rogers AB, Erdman SE, Fox JG, Carroll M, Horwitz BH. A role for NF-kappa B subunits p50 and p65 in the inhibition of lipopolysaccharide-induced shock. *J Immunol* 2004; 173: 5786-5793
- 9 Liboni KC, Li N, Scumpia PO, Neu J. Glutamine modulates LPS-induced IL-8 production through IkappaB/NF-kappaB in human fetal and adult intestinal epithelium. *J Nutr* 2005; 135: 245-251
- 10 Ritchie MH, Fillmore RA, Lausch RN, Oakes JE. A role for NF-kappa B binding motifs in the differential induction of chemokine gene expression in human corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004; 45: 2299-2305
- 11 Castro P, Legora-Machado A, Cardilo-Reis L, Valença S, Porto LC, Walker C, Zuany-Amorim C, Koatz VL. Inhibition of interleukin-1beta reduces mouse lung inflammation induced by exposure to cigarette smoke. *Eur J Pharmacol* 2004; 498: 279-286
- 12 常晓, 王琳琳, 连淑君, 唐清, 陈萍, 王华. 谷氨酰胺对内毒素血症幼鼠肠屏障的保护作用. *中国当代儿科杂志* 2010; 12: 809-811
- 13 Sukhotnik I, Agam M, Shamir R, Shehadeh N, Lurie M, Coran AG, Shiloni E, Mogilner J. Oral glutamine prevents gut mucosal injury and improves mucosal recovery following lipopolysaccharide endotoxemia in a rat. *J Surg Res* 2007; 143: 379-384
- 14 Qin HL, Cui HG, Zhang CH, Wu DW, Chu XP. Effects of glutamine on structure and function of gut in endotoxemic rats. *World J Gastroenterol* 1996; 2: 69-72
- 15 秦环龙, 张彩华, 崔恒贵, 吴敦镇. 谷氨酰胺对内毒素血症大鼠小肠营养作用的实验研究. *肠外与肠内营养*

- 1997; 4: 8-11
- 16 饶小平, 朱绿绮, 连惠红. 谷氨酰胺对失血性休克兔肠屏障功能保护作用的研究. *中国当代儿科杂志* 2006; 8: 66-70
- 17 吴秀清, 舒林华, 孙梅, 王虹, 高红. 谷氨酰胺对内毒素血症幼年大鼠小肠上皮细胞凋亡的作用及其机制探讨. *中国当代儿科杂志* 2006; 8: 496-498
- 18 Kessel A, Toubi E, Pavlotzky E, Mogilner J, Coran AG, Lurie M, Karry R, Sukhotnik I. Treatment with glutamine is associated with down-regulation of Toll-like receptor-4 and myeloid differentiation factor 88 expression and decrease in intestinal mucosal injury caused by lipopolysaccharide endotoxaemia in a rat. *Clin Exp Immunol* 2008; 151: 341-347
- 19 李军, 许玲芬, 孙梅. 谷氨酰胺对内毒素血症诱导小鼠肠损伤的保护作用. *中国优生与遗传杂志* 2006; 14: 30-32
- 20 Deitch EA. The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure. *Arch Surg* 1990; 125: 403-404
- 21 Söderholm JD, Perdue MH. Stress and gastrointestinal tract. II. Stress and intestinal barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001; 280: G7-G13
- 22 王茂贵. 小儿胃肠道特点、黏膜屏障与胃肠功能障碍. *中国实用儿科杂志* 2001; 14: 2-5
- 23 Haque SM, Chen K, Usui N, Iiboshi Y, Okuyama H, Masunari A, Cui L, Nezu R, Takagi Y, Okada A. Alanyl-glutamine dipeptide-supplemented parenteral nutrition improves intestinal metabolism and prevents increased permeability in rats. *Ann Surg* 1996; 223: 334-341
- 24 Ardawi MS. Effects of epidermal growth factor and glutamine-supplemented parenteral nutrition on the small bowel of septic rats. *Clin Sci (Lond)* 1992; 82: 573-580
- 25 Ardawi MS, Jamal YS, Ashy AA, Nasr H, Newsholme EA. Glucose and glutamine metabolism in the small intestine of septic rats. *J Lab Clin Med* 1990; 115: 660-668
- 26 Noguchi Y, James JH, Fischer JE, Hasselgren PO. Increased glutamine consumption in small intestine epithelial cells during sepsis in rats. *Am J Surg* 1997; 173: 199-205
- 27 Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* 1990; 249: 1431-1433
- 28 Ulevitch RJ, Tobias PS. Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin. *Annu Rev Immunol* 1995; 13: 437-457
- 29 Ortega-Cava CF, Ishihara S, Rumi MA, Kawashima K, Ishimura N, Kazumori H, Udagawa J, Kadowaki Y, Kinoshita Y. Strategic compartmentalization of Toll-like receptor 4 in the mouse gut. *J Immunol* 2003; 170: 3977-3985
- 30 Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999; 274: 10689-10692
- 31 Shimazu R, Akashi S, Ogata H, Nagai Y, Fukudome K, Miyake K, Kimoto M. MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J Exp Med* 1999; 189: 1777-1782
- 32 Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta* 2002; 323: 59-72
- 33 da Silva Correia J, Soldau K, Christen U, Tobias PS, Ulevitch RJ. Lipopolysaccharide is in close proximity to each of the proteins in its membrane receptor complex. transfer from CD14 to TLR4 and MD-2. *J Biol Chem* 2001; 276: 21129-21135
- 34 Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001; 167: 1609-1616
- 35 Cario E, Gerken G, Podolsky DK. Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2007; 132: 1359-1374
- 36 Ey B, Eyking A, Gerken G, Podolsky DK, Cario E. TLR2 mediates gap junctional intercellular communication through connexin-43 in intestinal epithelial barrier injury. *J Biol Chem* 2009; 284: 22332-22343

编辑 曹丽鸥 电编 何基才