

· 论 著 ·

谷氨酰胺对脓毒症大鼠肝脏 Bcl-2 和 p53 表达的影响

武岳¹, 周军利², 杜玲玲³, 邓津菊², 梁文佳², 李瑞林⁴

1. 宁夏医科大学临床学院, 宁夏 银川 750004; 2. 甘肃省人民医院烧伤科, 甘肃 兰州 730000;

3. 甘肃省人民医院干部病房 3 科, 甘肃 兰州 730000; 4. 天水市中西医结合医院, 甘肃 天水 741000

摘要: **目的** 研究谷氨酰胺对脓毒症大鼠肝脏 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (Bcl-2) 及 p53 基因表达的影响, 探讨谷氨酰胺对脓毒症大鼠肝脏的保护作用机制。**方法** 选取 SPF 级健康成年大鼠 42 只随机分成三组: 假手术组 6 只, 手术组 18 只, 谷氨酰胺组 18 只, 手术组及谷氨酰胺组采用盲肠结扎穿孔法制备脓毒症模型, 假手术组只打开腹腔翻动盲肠。各组大鼠于术后 12 h 取肝脏标本, 制作病理切片观察其病理变化, 实时荧光定量聚合酶链式反应法检测各时相点大鼠肝脏 Bcl-2 mRNA 及 p53 mRNA 表达。**结果** 手术组大鼠肝脏有明显病理变化, 而谷氨酰胺组大鼠虽有一定病理变化, 但程度较手术组明显减轻。手术组术后 12 h 肝脏细胞 Bcl-2 mRNA 表达水平较假手术组明显下调 (0.20 ± 0.05 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$), 而 p53 mRNA 的表达水平手术组较假手术组明显上调 (36.85 ± 0.15 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.01$); 谷氨酰胺组术后 12h 肝脏细胞 Bcl-2 mRNA 表达水平较手术组明显上调 (0.38 ± 0.04 vs 0.20 ± 0.05 , $P < 0.05$), 而 p53 mRNA 的表达水平较手术组明显下调 (12.74 ± 0.27 vs 36.85 ± 0.15 , $P < 0.01$)。**结论** 谷氨酰胺可能通过影响 Bcl-2 及 p53 的表达来抑制脓毒症大鼠肝脏细胞的损伤。

关键词: 谷氨酰胺; 脓毒症; 大鼠; B 细胞淋巴瘤/白血病-2; p53; 基因

中图分类号: R 631 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-8182(2015)02-0141-04

Effects of glutamine on expressions of liver Bcl-2 and p53 in rats with sepsis

WU Yue*, ZHOU Jun-li, DU Ling-ling, DENG Jin-ju, LIANG Wen-jia, LI Rui-lin

* Clinical School, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China

Corresponding author: ZHOU Jun-li, E-mail: jlzhou02_08@sina.com

Abstract: Objective To investigate the effects of glutamine on expressions of the liver B cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) and p53 genes in rats with sepsis and explore the mechanism of glutamine protective effect on liver in septic rats.

Methods Forty-two SPF grade healthy adult rats were randomly divided into 3 groups: sham operation group ($n = 6$), operation group ($n = 18$) and glutamine group ($n = 18$). The sepsis model was established by cecal ligation and puncture in operation group and glutamine group, and no operation but opening abdominal cavity and turning over the cecum was done in sham operation group. For all rats, the liver samples were taken 12 hours after operation, and the pathological sections were made to observe the pathological changes. The expressions of Bcl-2 mRNA and p53 mRNA at each time points were detected by real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction. **Results** The significant pathological changes of liver were found in operation group. Although certain pathological changes were also seen in glutamine group, the degree reduced significantly compared with operation group. At 12 hours after operation, the Bcl-2 mRNA expression level in operation group was significantly down-regulated compared with sham operation group (0.20 ± 0.05 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.05$), while the p53 mRNA expression level in operation group was significantly up-regulated compared with sham operation group (36.85 ± 0.15 vs 1.00 ± 0.00 , $P < 0.01$). At 12 hours after operation, the Bcl-2 mRNA expression level in glutamine group was significantly up-regulated compared with operation group (0.38 ± 0.04 vs 0.20 ± 0.05 , $P < 0.05$), while p53 mRNA expression level in glutamine group was significantly down-regulated compared with operation group (12.74 ± 0.27 vs 36.85 ± 0.15 , $P < 0.01$). **Conclusion** Glutamine could inhibit the injury of liver cell in septic rats possibly via affecting the expressions of Bcl-2 and p53 genes.

Key words: Glutamine; Sepsis; Rat; B cell lymphoma/leukemia-2; p53; Gene

脓毒症是外科临床常见的一种危重症,除了可以引起剧烈的全身炎症反应外,还常导致肝、肺、肾、肠道和脑等多个器官的功能失常^[1],病死率高,因此寻找其治疗新途径尤为迫切。谷氨酰胺作为一种具有特殊作用的免疫营养素,近年来已成为研究的热点。本研究采用盲肠结扎穿孔法制备内源性脓毒症模型,观察谷氨酰胺对脓毒症大鼠肝脏的保护效应,并探讨其可能的作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 总 RNA 提取试剂(大连宝生物工程有限公司产品);逆转录试剂盒(上海东洋纺生物科技有限公司产品);引物(北京三博远志生物技术有限公司产品);实时荧光定量试剂盒(大连宝生物工程有限公司产品);谷氨酰胺(美国 Sigma 公司产品)。PTC-200 型梯度聚合酶链式反应仪(美国伯乐公司产品);Rotor-Gene 3000 型荧光实时定量 DNA 检测仪(Rotor-Gene 公司产品);ZPM-200 型光学显微镜(上海宙山精密光学仪器有限公司产品)。

1.2 动物模型分组与制备 SPF 级健康成年大鼠 42 只,雌雄各半,质量(220 ± 20)g,由甘肃省中医学院实验动物中心供给。按随机数字表法将大鼠分为三组,其中假手术组 6 只,手术组 18 只,谷氨酰胺组 18 只。各组大鼠经适应性饲养 1 周后,按 Singleton 等^[2]报道的方法行盲肠结扎穿孔(cecal ligation and puncture)复制脓毒症模型。手术组和谷氨酰胺组用 3-0 丝线靠近回盲端结扎 25% 的盲肠,同时保证肠道通畅。用 21G 规格的三角针头分别于盲肠近端和末端各穿 1 个孔,穿刺并挤出少量肠内容物,将盲肠放回腹腔,逐层关腹,其中假手术组仅开腹翻动盲肠。术后即刻于腹腔内注射 9 g/L 氯化钠溶液(30 ml/kg),以补充术中液体丢失。术后 10 min 内,谷氨酰胺组大鼠尾静脉注射浓度为 0.13 g/ml 的谷氨酰胺(0.75 g/kg),假手术组和手术组注射等体积的 9 g/L 氯化钠溶液。术后约 40 min 大鼠苏醒,予自由饮水及进食。12 h 后取各组大鼠肝脏组织,清洗后立即放入 -80℃ 冰箱冻存。

1.3 肝脏病理切片的制作与检测 冻存于 -80℃ 冰箱的术后 12 h 肝脏组织切块,经 4% 多聚甲醛固定 12 ~ 16h,HE 染色后制成石蜡切片,光镜观察。

1.4 实时荧光定量聚合酶链式反应法 检测 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2) mRNA 和 p53 mRNA 的表达用 RNAiso Plus 提取各组肝脏细胞的总 RNA,逆转录为 cDNA。引物序列^[3-4]如下。Bcl-2 上游引物:5-CTG TAC GGC CCC

AGC ATG CG-3, Bcl-2 下游引物:5-GCT TTG TTT CAT GGT ACA TC-3;p53 上游引物:5-GTT CCG AGA GCT GAA TGA GG-3,p53 下游引物:5-TTT TAT GGC GGG ACG TAG AC-3;β-actin 上游引物:5'-GAT GAT ATC GCC GCG CTC GTC GTC GAC-3',β-actin 下游引物:5'-AGC CAG GTC CAG ACG CAG GAT GGC ATG -3'。具体实验步骤按照试剂盒说明书进行,预变性 95℃30s,1 循环;PCR 反应为 95℃5s,60℃30s,40 循环;离解反应 95℃15s,60℃30s,95℃15s,1 循环。以 Bcl-2 mRNA、p53 mRNA 和内参 β-actin mRNA 含量的比值作为评价 Bcl-2、p53 mRNA 表达水平的指标。

1.5 统计学方法 所有数据采用 SPSS10.0 统计软件进行分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,先进行正态性和方差齐性检验,偏态资料采用对数转换近似正态后,多组间比较采用方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肝脏细胞的光镜观察 术后 12 h 肝脏组织切块,经 4% 多聚甲醛固定 12 ~ 16 h,HE 染色后制成石蜡切片,光镜观察显示术后 12 h,假手术组无明显病理变化;手术组可见广泛肝细胞坏死,呈局灶性,坏死灶内肝细胞见核固缩、核碎裂、核溶解;谷氨酰胺组可见与手术组相似改变,但程度明显较轻。见图 1。

2.2 肝脏组织 Bcl-2 mRNA 和 p53 mRNA 的表达 检测结果显示,手术组大鼠术后 12 h 肝脏细胞 Bcl-2 mRNA 表达水平手术组较假手术组明显下调($P < 0.05$),而谷氨酰胺组较手术组明显上调($P < 0.05$);大鼠术后 12 h 肝脏细胞 p53 mRNA 的表达手术组较假手术组明显上调($P < 0.01$),而谷氨酰胺组较手术组明显下调($P < 0.01$)。见表 1。

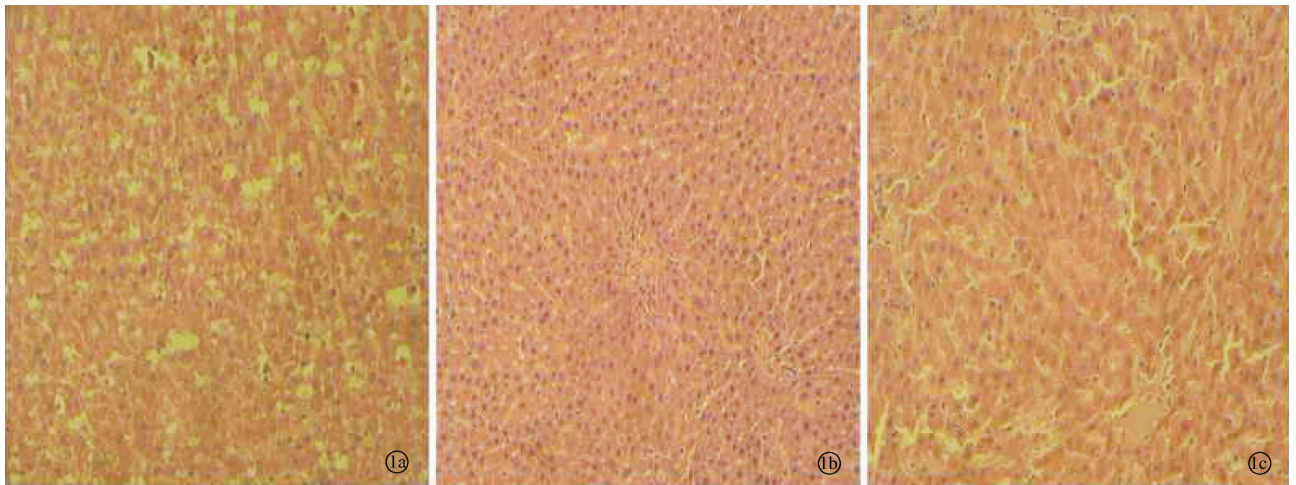
表 1 术后 12h 各组大鼠肝脏细胞 Bcl-2 mRNA 和 p53 mRNA 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	只数	Bcl-2 mRNA 的表达	p53 mRNA 的表达
假手术组	6	1.00 ± 0.00 ^a	1.00 ± 0.00 ^{aa}
手术组	18	0.20 ± 0.05	36.85 ± 0.15
谷氨酰胺组	18	0.38 ± 0.04 ^a	12.74 ± 0.27 ^{aa}

注:与手术组比较,^a $P < 0.05$;^{aa} $P < 0.01$ 。

3 讨论

脓毒症是创伤、烧伤、休克、大手术等临床急危重症患者的严重并发症之一,进一步发展可导致脓毒性休克及多器官功能障碍综合征(MODS)^[5],危及生命^[6]。尽管近年来在脓毒症的防治方面取得许多进展,但脓毒症病死率仍居高不下。脓毒症发病机制非



注:1a:假手术组术后 12 h 无明显病理改变;1b:手术组术后 12 h 可见广泛肝细胞坏死,呈局灶性,坏死灶内肝细胞显核固缩、核碎裂;1c:谷氨酰胺组术后 12 h 可见与手术组相似病理改变,但程度明显减轻。

图 1 各组术后 12 h 肝脏细胞的光镜观察(HE 染色, $\times 400$)

常复杂,临床救治十分困难,涉及感染、炎症、免疫、凝血及组织损害等一系列基本问题,并与机体多系统、多器官病理生理改变密切相关^[7]。在脓毒症的发生发展中,肝脏是一个重要的靶器官,研究表明肝功能衰竭在各器官衰竭的顺序中位列第二位^[8]。

肝细胞凋亡是造成肝脏损伤和肝脏疾病的中心环节。细胞凋亡是一种主动的死亡,它的发生有赖于相关基因的表达和蛋白质的合成。Lancel 等^[9]报道,内毒素可以诱导脓毒症大鼠心肌细胞中三磷酸腺苷、磷酸肌酸、糖原减少,激活凋亡通路,从而引起细胞凋亡。在多细菌性腹膜炎中回肠、盲肠、肺脏、肾脏和骨骼肌的细胞凋亡增加^[10]。

谷氨酰胺是目前公认的具有特殊作用的免疫营养素之一。尽管谷氨酰胺被界定为非必需氨基酸,但对危重患者而言它是必需氨基酸^[11-12]。近年来,其独特而复杂的营养生理功能逐渐成为营养学、生理学、营养免疫学等学科领域的研究热点。有研究表明谷氨酰胺可以通过减少 caspase-3 基因及蛋白的表达抑制脓毒症大鼠心肌细胞凋亡的发展^[13-14],早期静脉使用谷氨酰胺治疗,可以减少脓毒症大鼠炎症、纤维化和细胞凋亡的发生,进而减少其肺部及远端脏器的损伤;实验研究显示,给予脓毒症小鼠谷氨酰胺治疗,可能部分改善脓毒症所致急性肺损伤^[15]。本研究中,手术组术后 12 h,可见广泛肝细胞坏死,呈局灶性,坏死灶内肝细胞显示核固缩、核碎裂、核溶解;而谷氨酰胺组术后 12 h,可见与手术组相似病理改变,但病变程度明显减轻,凋亡细胞明显减少。Bcl-2 蛋白是最重要的抗凋亡物质,付小兵等^[16]研究认为在缺血再灌注条件下,原癌基因 Bcl-2 激活起到重要内源性抑制凋亡作用,与凋亡水平呈负相关;而 p53 基因与其相反,可以促进细胞的凋亡,与凋亡水平呈正

相关。本实验结果显示,大鼠术后 12 h 肝脏细胞 Bcl-2 mRNA 的表达手术组较假手术组明显下调,而谷氨酰胺组较手术组明显上调,差异有统计学意义;大鼠术后 12 h 肝脏细胞 p53 mRNA 的表达手术组较假手术组明显上调,而谷氨酰胺组较手术组明显下调,差异亦有统计学意义。

综上所述,本实验应用谷氨酰胺对脓毒症大鼠模型进行干预,通过对各实验组大鼠光镜下肝脏细胞病理变化的观察和肝细胞 Bcl-2 和 p53 mRNA 表达的检测,显示谷氨酰胺可能通过抑制肝脏细胞的凋亡,发挥对内源性脓毒症大鼠肝脏的保护作用。

参考文献

- [1] Patel GP, Gurka DP, Balk RA. New treatment strategies for severe sepsis and septic shock[J]. *Curr Opin Crit Care*, 2003, 9(5):390-396.
- [2] Singleton KD, Wischmeyer PE. Effects of HSP70.1/3 gene knockout on acute respiratory distress syndrome and the inflammatory response following sepsis[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290(5):L956-961.
- [3] Dubal DB, Shuqhrue PJ, Wilson ME, et al. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors[J]. *J Neurosci*, 1999, 19(15):6385-6393.
- [4] Longxi P, Buwu F, Yuan W, et al. Expression of p53 in the effects of artesunate on induction of apoptosis and inhibition of proliferation in rat primary hepatic stellate cells [J]. *PLoS One*, 2011, 6(10):e26500.
- [5] 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.
- [6] Aziz M, Jacob A, Wang P. Revisiting caspases in sepsis[J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5:e1526.
- [7] 盛志勇, 姚咏明. 脓毒症与多器官功能障碍综合征[J]. *中华急诊医学杂志*, 2003, 12(10):653-654.

- [7] Mohseni M, Ziaefard M, Abbasi Z. Protection against ischemia-reperfusion injury in prolonged resuscitation: a case report and review of literature[J]. ARYA Atheroscler, 2014, 10(4): 227-229.
- [8] 孙加源, 白春学. 肺移植后缺血再灌注损伤发病机制的研究进展[J]. 国际呼吸杂志, 2006, 26(2): 129-133.
- [9] Zhao W, Zhou S, Yao W, et al. Propofol prevents lung injury after intestinal ischemia-reperfusion by inhibiting the interaction between mast cell activation and oxidative stress[J]. Life Sci, 2014, 108(2): 80-87.
- [10] Wang R, Wu X, Liang J, et al. Intra-artery infusion of recombinant human erythropoietin reduces blood-brain barrier disruption in rats following cerebral ischemia and reperfusion[J]. Int J Neurosci, 2014 Oct 22. [Epub ahead of print].
- [11] Shimoda M, Sawada T, Iwasaki Y, et al. Erythropoietin strongly protects the liver from ischemia-reperfusion injury in a pig model[J]. Hepatogastroenterology, 2009, 56(90): 470-475.
- [12] Wu H, Ren B, Zhu J, et al. Pretreatment with recombinant human erythropoietin attenuates ischemia-reperfusion-induced lung injury in rats[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2006, 29(6): 902-907.
- [13] Bisschops L, van der Hoeven JG, Mollnes TE, et al. Seventy-two hours of mild hypothermia after cardiac arrest is associated with a lowered inflammatory response during rewarming in a prospective observational study[J]. Crit Care, 2014, 18(5): 546.
- [14] 丁璐, 吴本清, 黄进洁, 等. 重组人促红细胞生成素对新生大鼠高体积分数氧肺损伤的防治效果[J]. 实用儿科临床杂志, 2009, 24(6): 431-433.
- [15] Shang Y, Li X, Prasad PV, et al. Erythropoietin attenuates lung injury in lipopolysaccharide treated rats[J]. J Surg Res, 2009, 155(1): 104-110.

收稿日期: 2014-09-29 修回日期: 2014-10-15 编辑: 石嘉莹

(上接第 143 页)

- [8] 陈绪军, 肖琦, 艾中立, 等. 肝细胞损伤, 细胞凋亡及肝细胞保护(文献综述)[J]. 国外医学外科学分册, 2000, 27(1): 21-24.
- [9] Lancel S, Petillot P, Favory R, et al. Expression of apoptosis regulatory factors during myocardial dysfunction in endotoxemic rats[J]. Crit Care Med, 2005, 33(3): 492-496.
- [10] Hotchkiss RS, Swanson PE, Freeman BD, et al. Apoptotic cell death in patients with sepsis, shock, and multiple organ dysfunction[J]. Crit Care Med, 1999, 27(7): 1230-1251.
- [11] Sheridan RL, Prelack K, Yu YM, et al. Short-term enteral glutamine does not enhance protein accretion in burned children: a stable isotope study[J]. Surgery, 2004, 135(6): 671-678.
- [12] Wernerman J. Glutamine to intensive care unit patients[J]. JPEN J Parenter Enteral Nutr, 2003, 27(4): 302-303.
- [13] Yin HY, Wei JR, Zhang R, et al. Effect of Glutamine on caspase-3 mRNA and protein expression in the myocardium of rats with sepsis[J]. Am J Med Sci, 2014, 348(4): 315-318.
- [14] de Oliveira GP, Silva JD, de Araújo CC, et al. Intravenous glutamine administration reduces lung and distal organ injury in malnourished rats with sepsis[J]. Shock, 2014, 41(3): 222-232.
- [15] Hu YM, Yeh CL, Pai MH, et al. Glutamine administration modulates lung $\gamma\delta$ T lymphocyte expression in mice with polymicrobial sepsis[J]. Shock, 2014, 41(2): 115-122.
- [16] 付小兵, 杨银辉, 孙同柱, 等. 缺血-再灌注诱导 bcl-2 基因表达及其对肠道细胞凋亡的影响[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(8): 459-461.

收稿日期: 2014-11-14 修回日期: 2014-11-26 编辑: 石嘉莹