

· 论 著 ·

## 重组人肠三叶因子减轻烧伤后肠源性高代谢的实验研究\*

吴修文<sup>1</sup>, 王 煥<sup>1</sup>, 吴 炜<sup>2</sup>, 张 勇<sup>2</sup>, 万千雪<sup>2</sup>, 金 星<sup>2</sup>, 徐淑秀<sup>1△</sup>, 彭 曦<sup>2▲</sup>

(1. 蚌埠医学院护理系, 安徽蚌埠 233030; 2. 第三军医大学西南医院全军烧伤研究所/创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室, 重庆 400038)

**摘要:**目的 探讨重组人肠三叶因子(rhITF)对烧伤后肠源性高代谢的作用及期机制。方法 采用 30% 体表面积Ⅲ度烧伤小鼠模型, 将 72 只 BALB/c 小鼠随机分为正常对照组(C 组, 8 只)、烧伤对照组(B 组, 每个时相点 8 只)和 rhITF 治疗组(ITF 组, 每个时相点 8 只)。观察伤前及烧伤后 1、3、5、7 d 小鼠静息能量代谢率(REE)的变化, 同时检测伤后血浆内毒素(LPS)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )、白细胞介素-1(IL-1)和白细胞介素-6(IL-6)的含量。结果 两组烧伤小鼠的 REE、TNF $\alpha$ 、LPS、IL-1 和 IL-6 水平均明显高于烧伤前水平( $P < 0.05$ ), 两组比较, ITF 组小鼠 REE 明显低于 B 组, 平均降幅达 25% 左右。与之对应, 血浆 LPS、TNF- $\alpha$ 、IL-1 和 IL-6 含量也明显低于 B 组( $P < 0.05$ )。结论 rhITF 能减轻烧伤后肠道受损程度, 降低烧伤小鼠血中炎症介质水平, 从而减轻烧伤后肠源性高代谢。

**关键词:** 肠源性高代谢; 静息能量消耗; 炎症介质; 肠三叶因子; 烧伤

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.15.004

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)15-1465-02

Experimental study of recombinant human intestinal trefoil factor on alleviating enterogenous hypermetabolism after burn injury\*

Wu Xiuwen<sup>1</sup>, Wang Huan<sup>1</sup>, Wu Wei<sup>2</sup>, Zhang Yong<sup>2</sup>, Wan Qianxue<sup>2</sup>, Jin Xing<sup>2</sup>, Xu Shuxiu<sup>1△</sup>, Peng Xi<sup>2▲</sup>

(1. Department of Nursing, Bengbu Medical College, Bengbu, Anhui 233030, China; 2. Institute of Burn Research, Southwest Hospital, State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To study the effects of recombinant human intestinal trefoil factor(rhITF) on enterogenous hypermetabolism after severe burn injury and its possible mechanisms. **Methods** The mouse model of 30% body surface area third degree burns was established, 72 BALB/c mice were randomly divided into three groups: normal control(C, 8 cases), burned control(B, 8 cases at each time point) and rhITF treatment(ITF, 8 cases at each time point) groups. Resting energy expenditure(REE), the level of plasma tumor necrosis factor alpha(TNF $\alpha$ ), lipopolysaccharide(LPS), interleukin-1(IL-1) and interleukin-6(IL-6) were determined before burn and on postburn 1, 3, 5, 7 d. **Results** After burn injury, the levels of REE, plasma TNF $\alpha$ , LPS, IL-1 and IL-6 in the group B and ITF was significant higher than those before burn( $P < 0.05$ ). Compared with the group B, the level of REE in the group ITF were remarkable decreased with the average decreasing amplitude of 25%, and the plasma TNF $\alpha$ , LPS, IL-1 and IL-6 levels were also lower than those in the group B( $P < 0.05$ ). **Conclusion** rhITF treatment could abate the degree of intestine injury, decrease the inflammatory mediators in blood and reduce the enterogenous hypermitabolism.

**Key words:** enterogenous hypermetabolism; resting energy expenditure(REE); inflammatory mediators; intestinal trefoil factor(ITF); burns

肠道不仅是消化器官, 还是体内最大的内分泌和免疫器官, 肠道神经系统也是仅次于中枢神经系统的复杂体系。因此, “肠道是外科创伤应激的中心器官”这一概念已逐渐为人们接受<sup>[1]</sup>。但多年来, 肠道在严重创伤后机体高代谢反应中的地位仍不够明确。通过多年研究发现严重烧伤后高代谢源不仅来源于创面, 肠道也是重要的高代谢源, 形成了“肠源性高代谢”的概念<sup>[2]</sup>。如能有效维护肠黏膜屏障, 减少细菌和毒素移位, 降低机体过度炎症反应, 就有可能预防肠源性高代谢的发生, 从而适度降低烧伤后高代谢, 改善患者预后。

肠三叶因子(intestinal trefoil factor, ITF)是肠道杯状细胞特异分泌的生长因子类多肽, 具有很强的肠道保护功能<sup>[3]</sup>。本课题组前期研究证实, 烧伤后肠道 ITF 分泌减少, 提供外源性 ITF 能有效减轻烧伤后胃肠道损伤<sup>[4]</sup>, 但是否能进一步降低烧

伤后肠源性高代谢还不清楚。因此, 本研究将着重观察 ITF 对烧伤后肠源性高代谢的影响, 并探讨其机制, 以期 ITF 在烧伤临床的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型

**1.1.1 烧伤模型制作及分组** 健康成年 BALB/c 小鼠 72 只, 体质量(22±3.0)g, 雌雄不限(第三军医大学附属大坪医院实验动物中心提供)。随机分成 3 组, 正常对照(control, C)组、烧伤对照(burned, B)组和 ITF 治疗(ITF)组, 实验分烧伤后 1、3、5、7 d 4 个时相点。C 组 8 只小鼠, B 组和 ITF 组各 32 只小鼠(每个时相点 8 只)。C 组不予烧伤, 其他 2 组小鼠烧伤前禁食 12 h, 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔麻醉, 背部电推剃毛, 称质量后置剃毛区于 80℃, 水浴 20 s, 造成 30% 体表面积Ⅲ度烧

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30971075); 国家重大新药创制课题(2009ZX09103-647)。△ 通讯作者, Tel: (0522)3175010;

E-mail: xssxx53@sina.com. ▲ 通讯作者, Tel: (023)6854149; E-mail: pxlrmm@163.com.

表 1 C 组及小鼠烧伤后不同时相点 REE 的变化( $\bar{x}\pm s, \text{kJ}\times 10^3/\text{m}^2$ )

组别	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
B 组	—	11.24±1.23	18.82±1.42*	22.45±1.96*	28.35±3.12*
ITF 组	—	12.15±1.22	15.88±1.25*△	16.47±1.33*△	19.45±1.78*△
C 组	12.24±1.15	—	—	—	—

\*:  $P<0.05$ , 与 C 组 0 d 时比较; △:  $P<0.05$ , 与 B 组同时相点比较; —: 表示无数据。

表 2 C 组及小鼠烧伤后不同时相点血浆 LPS 含量的变化( $\bar{x}\pm s, \text{U/mL}$ )

组别	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
B 组	—	0.38±0.07*	0.51±0.08*	0.43±0.08*	0.48±0.10*
ITF 组	—	0.24±0.09△	0.29±0.11△	0.31±0.13*△	0.26±0.12△
C 组	0.15±0.03	—	—	—	—

\*:  $P<0.05$ , 与 C 组 0 d 时比较; △:  $P<0.05$ , 与 B 组同时相点比较; —: 表示无数据。

表 3 C 组及小鼠烧伤后不同时相点血浆 TNF $\alpha$  含量的变化( $\bar{x}\pm s, \mu\text{g/mL}$ )

组别	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
B 组	—	1.63±0.29	4.26±0.52*	3.56±0.48*	4.06±0.30*
ITF 组	—	1.72±0.33	2.50±0.35*△	2.12±0.30*△	2.55±0.25*△
C 组	1.39±0.21	—	—	—	—

\*:  $P<0.05$ , 与 C 组 0 d 时比较; △:  $P<0.05$ , 与 B 组同时相点比较; —: 表示无数据。

表 4 C 组及小鼠烧伤后不同时相点血浆 IL-1 含量的变化( $\bar{x}\pm s, \text{ng/mL}$ )

组别	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
B 组	—	0.21±0.06	0.38±0.09*	0.41±0.10*	0.36±0.07*
ITF 组	—	0.23±0.05	0.25±0.06△	0.28±0.05*△	0.23±0.04△
C 组	0.19±0.05	—	—	—	—

\*:  $P<0.05$ , 与 C 组 0 d 时比较; △:  $P<0.05$ , 与 B 组同时相点比较; —: 表示无数据。

表 5 C 组及小鼠烧伤后不同时相点血浆 IL-1 含量的变化( $\bar{x}\pm s, \text{ng/mL}$ )

组别	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
B 组	—	0.13±0.02	0.22±0.04*	0.33±0.05*	0.27±0.04*
ITF 组	—	0.12±0.03	0.15±0.03*△	0.18±0.04*△	0.15±0.03△
C 组	0.11±0.03	—	—	—	—

\*:  $P<0.05$ , 与 C 组 0 d 比较; △:  $P<0.05$ , 与 B 组同时相点比较; —: 表示无数据。

伤。伤后按 40 mL/kg 腹腔注入复方乳酸钠液抗休克。创面涂 2% 碘酊抗感染, 每天 2 次, 伤后给予标准动物颗粒饲料喂养, 自由饮水。

**1.1.2 药物来源及给药方式** 重组人 ITF (recombinant human ITF, rhITF) 来源于本课题组的前期制备, 采用毕赤酵母重组表达发酵获得的 rhITF 经验证与理论值完全相符, 毒理学实验已证实该重组蛋白毒副作用非常轻微。烧伤后 2 h 后采用 rhITF 灌胃, 剂量为 1.0 mg/kg, 每次给药容量为 0.5 mL, 每天分 2 次给药。

## 1.2 检测指标

**1.2.1 静息能量消耗 (resting energy expenditure, REE) 测定** 在清醒、空腹和安静状态下, 将小鼠放入一密闭容器中, 15 min 后收集气体, 用血气分析仪测定气体中  $\text{O}_2$  和  $\text{CO}_2$  的变化, 再以 Weir 公式计算:  $\text{REE}(\text{kJ/d}) = [3.9 \times \text{吸入 } \text{O}_2(\text{L/min}) + 1.1 \times \text{呼出 } \text{CO}_2(\text{L/min})] \times 1440 \times 4.184$ 。小鼠体表面积计算公式:  $S(\text{cm}^2) = \text{KW}^{2/3}$ ,  $K=0.0913$ ;  $W$  = 动物体质量 (g)。

**1.2.2 血浆肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 (interleukin-1, IL-1) 和 IL-6 的检测** 采用放射免疫法, 试剂盒由北京普尔伟业生物科技有限公司提供, 具体操作参见说明书。

**1.2.3 血浆内毒素 (ipopoly saccharide, LPS) 测定** 采用基质偶氮显色试剂测定其内毒素含量, 试剂盒由上海市医研所提

供, 按说明书操作, 单位以 U/mL 表示。

**1.3 统计学处理** 应用 SPSS13.0 统计软件进行数据分析, 计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示, 组间比较采用多因素方差分析, 以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

3 组小鼠 REE、血浆 LPS、血浆 TNF $\alpha$ 、血浆 IL-1 和血浆 IL-6 含量变化情况见表 1~5。

## 3 讨论

生理状况下, 肠黏膜屏障能阻止肠腔中绝大部分细菌和毒素的移位, 即便偶有移位发生, 肠道和肝脏的免疫系统有能力清除移位的细菌和毒素, 以维持机体内环境稳定<sup>[5]</sup>。严重烧伤导致应激反应, 组织缺血、缺氧和免疫紊乱, 引起肠道组织结构受损, 破坏肠黏膜屏障的完整性, 导致大量细菌和毒素移位, 进而引发全身感染和高代谢反应。实验结果显示, 小鼠烧伤后血浆内毒素含量大幅增加, 且发生时间早, 在伤后第 1 天即显著高于伤前, 烧伤后 3 d 达到峰值, 随后虽有所下降, 但仍远高于伤前。给予烧伤小鼠 rhITF 后能明显降低血浆内毒素含量, 提示 rhITF 能减轻烧伤后肠道损伤, 减少肠腔细菌和毒素移位。烧伤后炎症介质 TNF $\alpha$ 、IL-1 和 IL-6 的变化趋势与内毒素的变化类似, 但变化时相晚于内毒素, 一般在烧伤后 3 d 才大幅增加, 提示烧伤后肠道内毒素入血是引起其他炎症介质释放的重要因素。烧伤后穿越肠黏膜屏障的内毒素 (下转第 1470 页)

异,并推测出可能的传播模式,并据此采取相应的预防措施及干预手段减少宫内传播的风险。

#### 参考文献:

- [1] Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection[J]. *Lancet Infect Dis*, 2002, 2(7): 395-403.
- [2] 陈天艳, 刘敏, 陈云茹, 等. HBV 宫内传播的研究进展[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(19): 2138-2143.
- [3] Liu SL, Dong Y, Zhang L, et al. Influence of HBV gene heterogeneity on the failure of immunization with HBV vaccines in eastern China[J]. *Arch Virol*, 2009, 154(3): 437-443.
- [4] Shi Z, Li X, Yang Y, et al. Lamivudine in late pregnancy to interrupt in utero transmission of hepatitis B virus: a systematic review and meta-analysis[J]. *Obstet Gynecol*, 2010, 116(1): 147-159.
- [5] Wang S, Han JQ, Hu DR. The advancement of intrauterine-transplacental transmission of hepatitis B virus[J]. *Chin J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 18(8): 770-772.
- [6] Xu DZ, Yan YP, Zou S, et al. Role of placental tissues in the intrauterine transmission of hepatitis B virus[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2001, 185(4): 981-987.
- [7] Lin HH, Lee TY, Chen DS, et al. Transplacental leakage of HBeAg-positive maternal blood as the most likely route in causing intrauterine infection with hepatitis B virus[J]. *J Pediatr*, 1987, 111(6 Pt 1): 877-881.
- [8] Xu DZ, Yan YP, Choi BC, et al. Risk factor and mechanism of intrauterine transmission of hepatitis B virus: a

- case-control study[J]. *J Med Virol*, 2002, 67(1): 20-26.
- [9] Gunther S, Li BC, Miska S, et al. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients[J]. *J Virol*, 1995, 69(6): 5437-5444.
- [10] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, et al. The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucl Acids Res*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [11] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis(MEGA) software version 4.0[J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [12] HSun X, Tang B, Wang J, et al. A preliminary study on the molecular evolution of the two routes of intrauterine transmission of HBV[J]. *Arch Virol*, 2012, 157(1): 155-164.
- [13] Lin HH. Perinatal transmission of hepatitis viruses: the possible mechanisms[J]. *Taiwan J Obstet Gynecol*, 2004, 43(1): 1-4.
- [14] Xu DZ, Yan YP, Zou S, et al. Role of placental tissues in the intrauterine transmission of hepatitis B virus[J]. *Am J Obstet Gynecol*, 2001, 185(4): 981-987.
- [15] Yue YF, Jiang H, Shi L, et al. Study on the mechanism of intrauterine infection of hepatitis B virus[J]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, 2004, 39(4): 224-226.

(收稿日期:2012-02-02 修回日期:2012-03-05)

(上接第 1466 页)

具有很强的免疫刺激活性,能激活多种免疫细胞,产生大量炎症介质,加重组织损伤和参与高代谢反应<sup>[6]</sup>。实验结果显示,给予 rhITF 能有效维护肠黏膜屏障,阻止内毒素入血,减轻了对免疫细胞的刺激,避免了炎症反应的级联放大效应,实验结果说明,使用外源性 rhITF 后能降低肠源性高代谢,使机体代谢率保持在一个较为合理的水平,防止代谢率过高加重机体损伤。

肠源性高代谢是本课题组经过多年研究提出的一个新概念,其定义为:在各种病理状态下,由于肠道本身受损以及肠腔内细菌、毒素移位造成的机体高代谢反应,它是炎症介质、神经递质、激素等多种因素共同作用的结果<sup>[2]</sup>。肠道损害是引发肠源性高代谢的结构基础,维护肠黏膜屏障功能是降低肠源性高代谢的主要途径。尽管肠源性高代谢的理论已提出,但防治措施还不完善。生长因子,尤其是肠道特异分泌的 ITF 在保护肠黏膜屏障中的作用值得重视,前期体外研究已经证实,ITF 能减轻烧伤血清对肠上皮细胞的损伤,在维护肠黏膜屏障中起重要作用<sup>[7]</sup>。本实验结果提示,使用外源性 ITF 能通过减轻烧伤后肠道损伤,维护肠黏膜屏障功能,减少肠腔细菌和毒素移位,减轻炎症介质对免疫系统的刺激,以间接方式降低全身高代谢反应。但 ITF 是否能直接作用于免疫细胞,调控免疫细胞活性,减轻烧伤后免疫应激,下调机体炎症反应,直接干预机体代谢反应,目前尚不甚清楚,值得深入研究。

#### 参考文献:

- [1] Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease[J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 45(9): 799-809.
- [2] 汪仕良, 邓诗琳. 烧伤代谢营养学[M]. 石家庄:河北科技出版社, 2009.
- [3] Kjellef S. The trefoil factor family-small peptides with multiple functionalities[J]. *Cell and Mol Life Sci*, 2009, 66(7): 1350-1369.
- [4] Sun Y, Wu W, Zhang Y, et al. ITF produced in escherichia coli promotes the healing of rat burn-induced acute gastric mucosal lesions[J]. *J Trauma*, 2008, 65(1): 163-169.
- [5] Todd WC, Carrie Y, Peterson L, et al. Role of p38 mapk in burn-induced intestinal barrier breakdown[J]. *J Surgical Res*, 2009, 156(1): 64-69.
- [6] Mashkoo AC, Shadab NR, Michael JK, et al. Impaired intestinal immunity and barrier function: a cause for enhanced bacterial translocation in alcohol intoxication and burn injury[J]. *Alcohol*, 2004, 33(3): 199-208.
- [7] 吴修文, 王焕, 万千雪, 等. 肠三叶因子和黏蛋白对烧伤血清所致肠上皮细胞免疫功能变化的影响[J]. *中华烧伤杂志*, 2011, 27(5): 341-346.

(收稿日期:2012-01-02 修回日期:2012-03-02)