

重组人生长激素 (rhGH) 对肠梗阻大鼠肠黏膜屏障和免疫屏障的实验研究

邹华新 张宏伟 曹 慧 宋贤响 王冬琴

【摘要】 目的 探讨重组人生长激素 (rhGH) 对肠梗阻大鼠肠黏膜屏障和免疫屏障的保护作用。**方法** 结扎 SD 大鼠末端回肠, 使肠腔狭窄 75%, 制作成不完全性肠梗阻动物模型; 并应用 rhGH 6 d (每日 1 次), 观察其回肠黏膜形态学、回肠液 sIgA 改变及肠道细菌移位情况。**结果** 肠梗阻时, 大鼠回肠壁表现为肌层变薄, 黏膜厚度减少, 肠绒毛变短、变细; 回肠液中 sIgA 浓度减少及细菌移位数量增加; 应用 rhGH 后, 回肠黏膜厚度、肠绒毛结构保持相对完整, 回肠液中 sIgA 浓度升高, 细菌移位减少。**结论** 肠梗阻时, 大鼠肠道黏膜屏障和免疫屏障功能受损, 给予外源性 rhGH 可以较好保护受损肠道的黏膜屏障和免疫屏障功能。

【关键词】 人生长激素; 肠梗阻; 肠黏膜; 免疫; 模型, 动物

The experimental study of the recombinant human growth hormone (rhGH) on the intestinal obstruction of the rat intestinal mucosal barrier and immune barrier function. ZOU Hua-xin, ZHANG Hong-wei, CAO Hui, et al. Department of Surgerg Pediatrics, XuZhou Children's Hospital, Jiangsu 221006, China

【Abstract】 Objective To study of recombinant human growth hormone (rhGH) on intestinal obstruction in the rat intestinal mucosal barrier and immune barrier function. **Methods** Ligation of the SD rat ileum, the lumen stenosis 75% ,made into incomplete intestinal obstruction animal model and the application of rhGH 6 day (once a day), observe the ileal mucosa morphology ,ileal fluid sIgA change and bacterial translocation cases. **Results** Intestinal obstruction, rat ileum wall demonstrated intestinal muscle layer thinning, mucosal thickness reduction of intestinal villi, shorter, thinner; ileal concentration of sIgA in reducing bacterial translocation and increased in number; the application of recombinant human growth hormone (rhGH), ileal mucosa thickness, villus structure remained relatively intact, elevated sIgA concentration in ileal fluid and reduced bacterial translocation. **Conclusion** Intestinal obstruction, rat intestinal mucosal barrier and immune barrier function is impaired, the exogenous rhGH can better protect the impaired intestinal mucosal barrier and immune barrier function.

【Key words】 Human Growth Hormone; Intestinal Obstruction; Intestinal Mucosa; Immunity; Moldels, Animal

肠梗阻后机体会发生一系列病理生理和代谢改变, 全身处于免疫抑制和肠道黏膜受损状态, 肠道屏障功能降低, 细菌移位和内源性感染增加。研究表明重组人生长激素 (Recombinant human growth hormone, rhGH) 是体内重要的合成激素, 具有促进蛋白质合成, 加快组织修复, 维护肠黏膜功能的作用; 同时 rhGH 可通过上调白细胞介素-2 和白细胞介素-2 受体的表达, 增加 T 淋巴细胞亚群比值, 促进 T 淋巴细胞的分化和成熟; 外源性 rhGH 能直接刺激 B

淋巴细胞合成 IgG、IgM、IgA, 说明 rhGH 能够改善免疫功能, 增强机体抵抗力。本课题通过建立肠梗阻大鼠模型, 探讨肠梗阻时, 肠道黏膜屏障和免疫屏障损伤的发生机制, 以及重组人生长激素 (rhGH) 对它们的影响。

材料与方法

一、材料

选择 SD 大鼠 80 只, 雌雄不限。由徐州医学院动物实验室提供, 质量 190 ~ 240 g, ¹²⁵I-sIgA 药盒 (武汉博士德生物工程有限公司); rhGH 制剂 (长春金赛药业有限责任公司生产)。

二、方法

将实验大鼠随机分为 4 组, 每组 20 只, 分别是假手术组 (A 组)、回肠末端结扎组 (B 组)、回肠末端结扎组 + 肌肉注射生理盐水组 (C 组)、回肠末端结扎组 + rhGH 治疗组 (D 组) 治疗 6 d。实验大鼠均禁食 6 h 后, 以氯胺酮 100 mg/kg 腹腔注射麻醉, 经下腹正中切口入腹, 游离出回肠末端。A 组不结扎回肠末端, 其余各组距回盲部 10 cm 处游离出回肠, 用 1 号细丝线结扎致肠腔狭窄约 75%, 制作成不完全性肠梗阻动物模型, 再分别缝合腹部肌层及皮肤。

所有动物于手术前、麻醉 6 h 后均予流质饲养, C 组、D 组于术后次日开始, 交替双侧后肢分别皮下注射生理盐水和 rhGH。rhGH 剂量为 $1.25 \text{ U} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 生理盐水剂量与 rhGH 剂量相同; A、B、C、D 组均于术后 6 d 处死。所有实验大鼠取材时均先肉眼观察回肠结扎线近端肠管壁及肠系膜淋巴结等病变情况; 取腹水及无菌匀浆后的肠系膜淋巴结接种做细菌培养; 最后收集结扎线近端长约 10 cm 的末端回肠内消化液及用生理盐水冲洗肠腔后的冲洗液, 以 4 000 r/min 取上清液, 于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存, 行 IgA 测定。将上述回肠组织以乙醇固定, 石蜡包埋切片, HE 染色, 用多媒体彩色病理图文分析系统, 测量回肠黏膜厚度和绒毛高度。

三、统计学处理

采用 SPSS13.0 软件进行数据处理, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 均数的比较用方差分析, 频数资料采用 χ^2 检验、方差分析和 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

结 果

大鼠一般情况观察: 肠道结扎 75% 后形成不全

性肠梗阻, 予流质饮食, 大鼠活动无明显减少, A 组无死亡, B 组于术后 3 d、5 d、6 d 各死亡 1 只, C 组于术后 3 d、4 d、5 d 各死亡 1 只, D 组术后 2 d、4 d、6 d 各死亡 1 只。

肠壁及肠系膜淋巴结肉眼观察与对照组相比, 肠梗阻大鼠梗阻近端肠壁扩张水肿, 肠系膜淋巴结稍肿大, 腹腔有淡黄色腹水; 应用 rhGH 6 d, 肠系膜淋巴结肿大不明显, 腹水量明显减少。

腹水与肠系膜淋巴结培养: 大鼠腹水中能检测到细菌的例数分别是: A 组 0/20 例, B 组 4/17 例, C 组 4/17 例, D 组 1/17。分析两组细菌培养结果, B 组与 A 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), C 组与 B 组相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), C 组与 D 组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

回肠液中 sIgA 浓度变化: 肠梗阻大鼠回肠液中 sIgA 浓度 A 组为 $(1.65 \pm 0.53) \text{ mg/L}$, B 组为 $(1.24 \pm 0.64) \text{ mg/L}$, C 组为 $(1.19 \pm 0.52) \text{ mg/L}$, D 组为 $(1.52 \pm 0.65) \text{ mg/L}$ 。

肠道黏膜光镜下组织学改变: 大鼠回肠黏膜厚度与绒毛高度: B 组、C 组与 A 组相比, 肠梗阻大鼠绒毛高度和黏膜厚度值明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。实验组肠梗阻大鼠以 rhGH 6 d 后绒毛高度和黏膜厚度见表 1, D 组与 A 组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。小肠绒毛结构组间对比见图 1。

表 1 4 组大鼠小肠黏膜形态学参数 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Rat intestinal mucosa morphology parameters of 4 groups ($\bar{x} \pm s$)			
组别	例数	绒毛高度 (μm)	黏膜厚度 (μm)
A 组	20	316.47 ± 18.94	392.68 ± 44.36
B 组	17	236.26 ± 15.35	316.25 ± 33.75
C 组	17	234.56 ± 16.72	314.63 ± 37.64
D 组	17	286.38 ± 19.16	378.46 ± 40.76

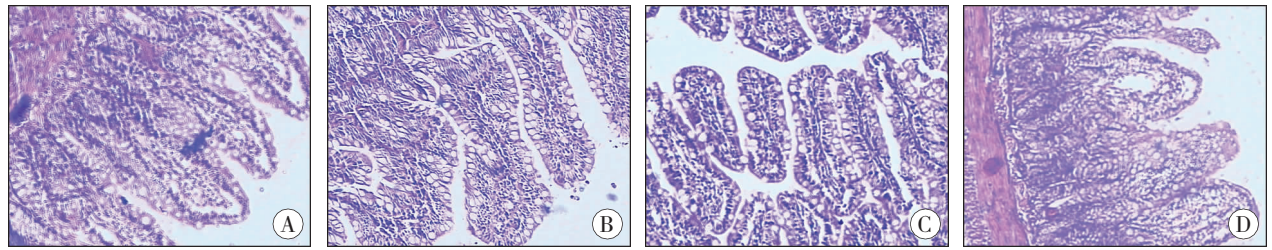


图 1 4 组大鼠小肠肠绒毛结构图 A, 假手术组 (HE $\times 200$); B, 回肠末端结扎组 (HE $\times 200$); C, 回肠末端结扎加肌注生理盐水组 (HE $\times 200$); D, 回肠末端结扎组加 rhGH 治疗组 (HE $\times 200$)

Fig. 1 Rat small intestinal villus structure diagram of 4 groups. A, Group: sham operation group (HE $\times 200$); B, Group: ileal ligation group (HE $\times 200$); C, Group: ileal ligation and injection of physiological saline group (HE $\times 200$); D, Group: ileal ligation group and rhGH treatment group (HE $\times 200$)

讨 论

正常情况下,肠道内存在的大量细菌不能进入血液循环或人体组织,依赖于肠道对细菌具有的机械、生物、化学和免疫屏障。当肠道的机械屏障和(或)免疫屏障受到破坏后,内毒素分子进入血液循环,引起内毒素血症,同时肠内细菌向肠外组织迁移,进入肠道淋巴结、血液或肝脾,形成细菌移位。

肠梗阻时梗阻肠管近端膨胀,肠壁变薄,肠腔压力不断升高,到一定程度时可使肠壁血运障碍,导致肠道的机械屏障和(或)免疫屏障受到破坏;同时在梗阻以上的肠腔内细菌数量显著增加,细菌大量繁殖,而产生多种强烈的毒素。当肠道的机械屏障和(或)免疫屏障破坏到一定程度后,内毒素分子进入血液循环,引起内毒素血症,同时肠内细菌向肠外组织迁移,进入肠道淋巴结、血液或肝脾,形成细菌移位^[1,2]。肠梗阻时发生细菌移位的另一原因是肠道免疫功能下降。

重组人生长激素(recombinant human growth hormone, rhGH)是近年来利用 DNA 技术合成的生长激素,它的作用及生物动力学与垂体分泌的内源性生长激素相同^[3]。研究表明, rhGH 通过与肠道的生长激素受体(growth hormone receptor, GHR)结合后,促进胃肠黏膜上皮细胞的生长、分化,改善机体的免疫功能,增强机体抵抗力^[4];其机制是:①通过与肠道的 rhGH 受体结合,增加谷氨酰胺(GLN)的合成、摄取和利用,促进肠黏膜 DNA 含量增加,减少肠黏膜损伤,促进肠黏膜修复,维持肠道黏膜上皮细胞的正常形态、结构和功能;②rhGH 具有增强骨髓前体细胞的增殖与分化、促进单核细胞的移动、趋化以及刺激中性粒细胞粘附等作用,并通过促进巨噬细胞和多形核中性粒细胞释放超氧化物阴离子的方式来杀灭病原微生物,从而降低腹腔内的活细菌,使细菌向腹腔外的播散减少^[5];③通过作用于肝细胞膜上的生长激素受体(growth hormone receptor, GHR),合成胰岛素样生长因子-I(insulin-like growth factor-I, IGF-I),肝脏合成的 IGF-I 是一个单链多肽,能引导细胞分化和蛋白合成,抑制细胞凋亡,IGF-I 对肠道的作用表现为刺激肠上皮细胞的分化,增加 DNA 及蛋白质的合成,促进从隐窝细胞到绒毛细胞的分化和转化^[6-8]。④能上调 GH-IGF-I 轴活性,增强白细胞吞噬等细胞免疫功能,增加 T 淋巴细胞亚群比值,促进 T 淋巴细胞的分化

与成熟,肠道局部产生 sIgA 增多,增强体液免疫功能,抑制炎症介质如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1、IL-6、血小板活化因子(PAF)等的生成和释放,维持肠道黏膜上皮细胞的正常形态、结构和功能^[9-10]。本实验结果提示,使用外源性 rhGH 6 d 后,肠梗阻大鼠的回肠壁肌层厚度、浆膜面相对完整,黏膜厚度和肠道绒毛高度及结构相对完整,说明 rhGH6 对肠梗阻大鼠的肠道机械屏障功能有保护作用。

绒毛是肠道屏障的组成部分,是肠道机械屏障功能的外在表现;淋巴细胞是免疫系统的主要成分,肠道拥有人体最大的黏膜相关淋巴样组织,肠道免疫屏障与肠黏膜中各种淋巴细胞的免疫功能有关,即与肠道相关淋巴样组织(gut-associated lymphoid tissue, GALT)有关^[11]。肠道免疫系统中另一个起核心作用的是 sIgA,其相对分子质量为 36 000,是肠道分泌物中含量最丰富的免疫球蛋白,肠黏膜 sIgA 是肠道免疫的第一道防线,在预防细菌粘附和移位上发挥重要的作用^[12]。本实验研究证实,与对照组相比,肠梗阻时回肠内 sIgA 浓度明显下降。通过皮下注射 rhGH 6 d,回肠液中的 sIgA 浓度与实验组和生理盐水组差异有显著性;rhGH 治疗组与假手术组差异无显著性,客观上表明 rhGH 能促进肠道黏膜和免疫屏障的恢复,从而增强大鼠的免疫功能。

参 考 文 献

- 1 Anand RJ, Leaphart CL, Mollen KP, et al. The role of the intestinal barrier in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis [J]. Shock, 2007, 27(2): 124-133.
- 2 Gong JF, Zhu WM, Yu WK, et al. Role of enteral nutrition in adult short bowel syndrome undergoing intestinal rehabilitation: the long-term outcome [J]. Asia Pac J Clin Nutr, 2009, 18(2): 155-163.
- 3 Fuhr U, Tuculanu D, Berghout A, et al. Bioequivalence between novel ready-to-use liquid formulations of the recombinant human GH Omnitrope and the original lyophilized formulations for reconstitution of Omnitrope and Genotropin [J]. Eur J Endocrinol, 2010, 162(6): 1051-1058.
- 4 孙少川, 郑春宁, 刘国勤, 等. 重组人生长激素对大鼠肠道缺血再灌注后肠壁组织 T 淋巴细胞亚群和浆细胞凋亡的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(5): 605-606.
- 5 郭光华, 蔡晨, 李国辉. 肠内免疫营养联合重组人生长激素对烫伤大鼠的治疗作用 [J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(1): 42-45.
- 6 Smith JR, Benghuzzi H, Tucci M, et al. (下转第 213 页)