

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.003474

整蛋白型肠内营养制剂改善脓毒症肠损伤代谢紊乱的
机制研究黄彪¹, 张正涛³, 左丹⁴, 杨洋², 罗仁杰³, 赵乙沅³, 徐昉³(1.重庆医科大学附属大足医院重症医学科, 重庆 402360; 2.重庆医科大学附属第一医院产科, 重庆 400016;
3.重庆医科大学附属第一医院重症医学科, 重庆 400016; 4.重庆医科大学附属大足医院临床营养科, 重庆 402360)

【摘要】目的:利用代谢组学方法研究脓毒症中整蛋白营养制剂引起的代谢紊乱,为脓毒症的临床治疗提供了新的理论和实验基础。**方法:**8~12周龄雄性小鼠随机分为3组:假手术组(Sham组)、脓毒症组(CLP组)和脓毒症+整蛋白组(CLP+IPEN组),每组6只小鼠。CLP组采用盲肠结扎和穿刺诱导脓毒症,而Sham组仅行剖腹手术,未行结扎穿刺。CLP+IPEN组术后接受额外的整蛋白肠内营养制剂。每天监测体重变化7 d,并在建模和喂养3 d后采集样本。染色观察回肠组织病理学变化,实时荧光定量聚合酶链式反应(quantitative real-time PCR)检测不同目的基因 mRNA 的表达。根据特定的标准,筛选整蛋白营养制剂治疗脓毒症的差异代谢物。**结果:**CLP组与CLP+IPEN组进行比较,发现有15种差异代谢物。在CLP+IPEN组中,3-甲基-1,3,5-戊三醇(dimethyl 3-hydroxy-3-methylpentane-1,5-dioate)、丙二酸(malonic acid)、苯酰胺(1-Serine, n-methoxycarbonyl-methyl ester)等5种代谢物的含量比CLP组有所增加($P<0.05$)。在整个实验过程中,3组小鼠的体质量均逐渐减轻,其中CLP组在4 d的体质量减轻最为明显($P<0.05$)。这表明,整蛋白营养制剂可以减轻脓毒症小鼠的体质量减轻。CLP+IPEN组的Chiu评分明显低于CLP组($P<0.05$),提示肠黏膜损伤明显减少。CLP组和Sham组中闭合蛋白(occludin)、紧密连接蛋白1(zonula occludens-1, ZO-1)和结肠黏蛋白(recombinant mucin 2, MUC2)的表达均升高,提示脓毒症导致肠道屏障功能受损。与CLP组相比,CLP+IPEN组中Occludin、ZO-1和MUC2的表达明显降低($P<0.05$)。**结论:**本研究通过代谢组学方法深入研究整蛋白营养制剂中脓毒症引起的代谢紊乱。整蛋白肠内营养制剂可以通过调节亚油酸代谢、不饱和脂肪酸生物合成、脂肪酸生物合成和细胞色素P450物质的代谢来改善脓毒症相关肠道损伤的代谢紊乱。此外,这些制剂在增强肠道屏障功能、减轻小鼠体质量减轻和减轻肠道损伤严重程度方面具有潜力,从而为增强脓毒症治疗功效奠定了基础。

【关键词】整蛋白型;脓毒症;肠损伤;代谢紊乱**【中图分类号】**R151**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2024-01-28Mechanism of intact-protein enteral nutrition formula improving
intestinal injury and metabolic disorders in sepsisHuang Biao¹, Zhang Zhengtao³, Zuo Dan⁴, Yang Yang², Luo Renjie³, Zhao Yisi³, Xu Fang³(1. Department of Critical Care Medicine, Dazhu Hospital Affiliated to Chongqing Medical University;
2. Department of Obstetrics, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 3. Department of Critical
Care Medicine, The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University; 4. Department of Clinical Nutrition,
Dazu Hospital Affiliated to Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the metabolic disorders induced by intact-protein enteral nutrition formula in sepsis through metabolomics methods, and to provide new theoretical and experimental bases for the clinical treatment of sepsis. **Methods:** Male mice, aged 8~12 weeks, were randomly divided into sham-operation group (Sham group), sepsis group (CLP), and sepsis+intact-protein enteral nutrition group (CLP+IPEN group), with 6 mice in each group. The mice in the CLP group were treated with cecal ligation and puncture to induce sepsis, while those in the Sham group were given laparotomy alone without ligation and puncture. The mice in the CLP+IPEN group received additional intact-protein enteral nutrition formula after surgery. Daily weight changes were monitored for 7 days, and samples were collected after 3 days of modeling and feeding. Staining was used to observe the histopathological changes

作者介绍: 黄彪, Email: 447992158@qq.com,

研究方向: 急危重症的临床研究。

通信作者: 徐昉, Email: xufang828@126.com。

基金项目: 重庆市科卫联合医学科研资助项目(编号: 2022MSXM020),
重庆市大足区科技发展资助项目(编号: DZKJ2023JSYJ-KWXM1014)。优先出版: <https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240418.1531.028>

(2024-04-22)

of the ileum, and quantitative real-time PCR was used to measure the expression of different proteins. Differentially expressed metabolites in the treatment of sepsis with intact-protein enteral nutrition formula were identified based on specific criteria. **Results:** There were 15 differentially expressed metabolites between the CLP group and the CLP+IPEN group. Compared with the CLP group, the CLP+IPEN group had significant increases in the content of five metabolites including dimethyl 3-hydroxy-3-methylpentane-1,5-dioate, malonic acid, and L-Serine, N-(methoxycarbonyl)-methyl ester ($P<0.05$). Throughout the experiment, all three groups of mice showed a gradual reduction in body weight, and the CLP group showed the most significant weight loss on day 4 ($P<0.05$), suggesting that intact-protein enteral nutrition formula could alleviate weight loss in mice with sepsis. The CLP+IPEN group had a significantly lower Chiu score than the CLP group ($P<0.05$), indicating a notable reduction in intestinal mucosal injury. Both the CLP group and the Sham group had significant increases in the expression of occludin, zonula occludens-1 (ZO-1), and MUC2, suggesting that sepsis caused impairment of intestinal barrier function. Compared with the CLP group, the CLP+IPEN group had significant reductions in the expression of occludin, ZO-1, and MUC2 ($P<0.05$). **Conclusion:** This study investigates the metabolic disorders induced by intact-protein enteral nutrition formula in sepsis through metabolomics methods, and the results show that intact-protein enteral nutrition formula can alleviate metabolic disorders in sepsis-related intestinal injury by regulating linoleic acid metabolism, biosynthesis of unsaturated fatty acids, biosynthesis of fatty acids, and metabolism of cytochrome P450 substances. In addition, such formulas have the potential in enhancing intestinal barrier function, mitigating weight loss in mice, and reducing the severity of intestinal injury, thereby laying a foundation for strengthening the efficacy of sepsis treatment.

[Key words] intact-protein; sepsis; intestinal injury; metabolic disorders

脓毒症被定义为由机体对感染反应失调引起的危及生命的器官功能障碍^[1]。也是导致患者入住 ICU 的主要病因之一,其病死率仍居高不下^[2]。脓毒症和脓毒性休克是重大的国际公共卫生问题;世界卫生组织统计,其中院内每 10 万脓毒症患者中约有 189 例发生死亡^[3]。它通常是由感染、休克、创伤、烧伤、外科手术等严重疾病引起的;重症患者可发展为严重脓毒症、脓毒性休克和多器官功能障碍综合征^[4]。肠道的免疫反应和屏障功能在脓毒症的发病机制和进展中起重要作用^[5]。众所周知,脓毒症会对肠黏膜造成损伤,导致细菌移位,并加重局部和远端器官损伤^[6]。脓毒症会严重破坏肠道的微生物平衡^[7]。胃肠道衰竭既可能是脓毒症的原因,也可能是脓毒症中全身促炎反应的结果^[8]。控制脓毒症期间的炎症级联仍然是一个主要的临床挑战^[9]。因此,修复受损的肠道免疫屏障功能、逆转免疫功能障碍、改善肠道代谢紊乱在脓毒症的预防和治疗中发挥着重要作用。早期肠内营养可滋养肠道及维护肠屏障和免疫功能,启动时推荐整蛋白型制剂^[10]。然而,整蛋白型肠内营养制剂对脓毒症诱导的肠损伤代谢紊乱的保护作用还需进一步探索,因此本研究采用盲肠结扎穿孔脓毒症小鼠模型,深入研究整蛋白营养制剂改善脓毒症小鼠肠损伤代谢紊乱的机制研究。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选用雄性 8~12 周龄小鼠,体质量约 18~22 g,购自重庆医科大学实验动物中心。动物许可证编号:SYXK(渝)2022-0016。本研究已获得重庆市大足区人民医院伦理委员会批准(批件号:2021LLSC047)。

1.2 营养制剂与试剂

整蛋白型肠内营养制剂,规格:360 g/听(其中:100 g 含 462 kcal;蛋白质 18.5 g;碳水化合物 56.4 g;脂肪 8.2 g),进口药品注册证号:H20090007。

1.3 实验方法

1.3.1 模型构建及分组 选用雄性 8~12 周龄小鼠,饲养于重庆医科大学实验动物中心,在实验之前,将小鼠在 22℃ 下适应新环境 7 d,自由获取水和食物并且给予 12 h 光照/黑暗周期喂养。按随机数表法将小鼠分为 3 组,分别为脓毒症组 (CLP 组)、假手术组 (Sham 组)、脓毒症+整蛋白组 (CLP+IPEN 组),每组数量均为 6 只。CLP 组:采用盲肠结扎穿孔术 (cecal ligation and Puncture, CLP) 复制 Rittirsch 等^[11]脓毒症小鼠模型;首先将动物放在泡沫塑料垫上,取仰卧位,头远离操作者,通过给小鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 (0.05 mL/10 g) 进行麻醉,用镊子捏脚趾监测麻醉强度,直到它们对针刺刺激没有反应为止。实验过程中所有程序均在无菌条件下进行,体温保持在 36~38℃ 使用加热垫进行手术部位常规备皮、消毒,手术刀在皮肤中部做纵向切口 (不穿透腹膜腔),再用小剪刀将切口延伸并进入腹膜腔 (约 2 cm),识别腹部肌肉组织的中间白色筋膜,并对其进行解剖,并进行肌间切开及筋膜层和腹膜层的切开,使用钝性解剖钳定位盲肠,以使暴露;

用 3-0 丝线结扎盲肠中部,在结扎处于盲肠远端之间 18 号穿刺针穿刺,穿刺后,盲肠被挤出少量粪便保证穿刺成功,然后将盲肠送回腹腔恢复到原始位置,然后腹部切口关闭。将小鼠送回笼子,在 37 °C 的温度下立即皮下注射生理盐水 (50 mL/kg) 进行液体复苏。Sham 组:只游离盲肠,不予以结扎和穿刺情况下进行剖腹手术,其余操作步骤均脓毒症组。其中:Sham 组和 CLP 组术后常规饮食、饮水。CLP+IPEN 组:术后常规饮食处理基础上额外补充整蛋白肠内营养制剂 (整蛋白型肠内营养粉 4 g 和 40 °C 温开水 100 mL)。记录 3 组每日的体质量变化,观察 7 d,另外建模后饲养 3 d 后取材。

1.3.2 取材 采用小动物气体麻醉机结合异氟烷对小鼠进行麻醉,5% 异氟烷用于诱导小鼠深度麻醉,而后采用 3% 异氟烷用于维持麻醉状态,麻醉后开腹取回肠组织,留取形态学标本,剩余组织剪碎后匀浆放入 -80 °C 冰箱保存备用。

1.3.3 HE 染色 取小鼠回肠组织,去除肠内容物,将新鲜肠组织固定在 4% 多聚甲醛中。多聚甲醛固定回肠组织 H&E 染色:所有切片用不同浓度的乙醇和二甲苯脱水,石蜡包埋,其组织厚度 4~5 μm ,切片后用苏木精和伊红进行染色封片。在光学显微镜下观察回肠组织病理变化,并拍照收集图像。

1.3.4 实时荧光定量聚合酶链式反应 实时荧光定量聚合酶链式反应 (quantitative real-time, PCR) 对目的基因闭合蛋白 (occludin)、紧密连接蛋白 1 (zonula occludens-1, ZO-1) 和结肠黏蛋白 (recombinant mucin 2, MUC2) 的 mRNA 表达水平进行检测。

1.3.5 RNA 的提取及浓度和纯度测定 从 -80 °C 冰箱取出部分回 30 mg 肠组织,向其加入 1 mL RNAisoPlus,用剪刀剪碎肠组织,再使用电动匀浆机充分进行匀浆 4 次,室温静置 5 min。然后高速离心 5 min (4 °C, 12 000 r/min),吸取上清液,转移至新的 1.5 mL 离心管中,并加入 RNAiso Plus 的 1/5 体积量的氯仿,震荡混匀,室温下静置 5 min 后再次高速离心 15 min (4 °C, 12 000 r/min),将上清液转移至新的离心管中,加入 1 倍 RNAiso Plus 体积量的异丙醇后充分混匀,室温静置 10 min,再次高速离心 10 min (4 °C, 12 000 r/min) 后试管底部出现 RNA 沉淀。小心弃去上清保留沉淀物,加入与 RNAiso Plus 等量的 75% 乙醇清洗沉淀物,7 500 \times 4 °C 离心 5 min。打开离心管盖,室温下干燥沉淀几分钟。待沉淀干燥后,加入适量 0.1% 的焦碳酸二乙酯 (diethyl Pyrocarbonate, DEPC) 水溶解沉淀。再用琼脂糖凝胶电泳 (1% 琼脂糖+溴乙锭) 进行 RNA 纯度分析。符合要求后于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.3.6 逆转录合成 cDNA 反应液配制在冰上进行,按试剂盒的要求进行逆转录反应得到 cDNA,合成的 cDNA 保存于 -20 °C 或更低温度保存。

1.3.7 Q-PCR 扩增 配制反应液时,试剂请于冰上放置,避免强光照射。根据 Q-PCR 试剂盒说明书的试验步骤进行 Q-PCR 反应。

1.3.8 代谢组学分析 本研究采用安捷伦 GC7890B 色谱仪结合 MSD5977A 质谱法进行气相色谱-质谱分析。ZB-1701

GC 毛细管柱 (14% 腈丙苯基, 86% 二甲基聚硅氧烷, 20 m \times 180 μm \times 0.15 mm, 飞诺美) 用于代谢物分离。GC-MS 入口参数设置如下:注入体积 (1 μL), 脉冲无分流模式 (180 kPa, 持续 1 min)、保护芯片 (温度 290 °C) 和氦气载体流速 (1 mL/min)。气相色谱烤箱在 45 °C 下启动 2 min, 以 9 °C/min 的速度升至 180 °C, 并保持 5 min; 然后以 40 °C/min 的速度升至 220 °C 并保持 5 min, 以 40 °C/min 的速度继续升温至 240 °C, 保持 5 min; 最终以 80 °C/min 的速度升至 280 °C 并保持 3 min。辅助、质谱四极杆和质谱源的温度分别控制在 290 °C、230 °C 和 150 °C。质谱分析是在 70 eV 的电子碰撞电离下进行的。溶剂延迟设定为 5.5 min, 质量范围为 30~550 mm, 扫描速度为 1.562 m/s。

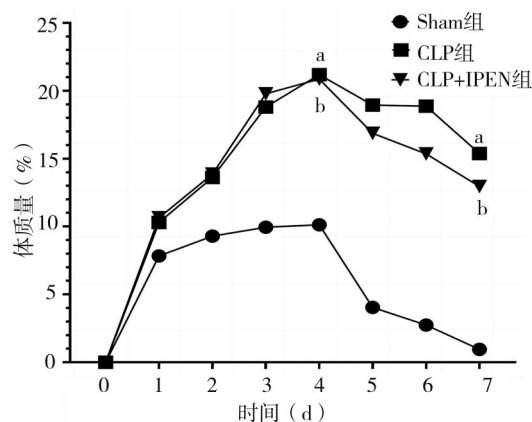
1.4 差异代谢物筛选和统计学方法

MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.MetaboAnalyst.ca>) 用于代谢组学研究。并将浓度数据上传到网站,进行求和归一化处理。然后执行 log10 转换和自动缩放使功能更具可比性。首先应用无监督 PCA 来检测组间的分布和分离。采用监督偏最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA), 最大限度地提高分类差别。R2 和 Q2 用于评价 PLS-DA 模型的预测精度和预测能力。基于 PLS-DA 模型,通过结合使用 t 检验的 FDR 和变量重要性投影 (variable imPortant for the Projection, VIP) 值来识别差异性代谢物。阈值设置为 VIP>1、P<0.05 及 FC>1.2 或 <0.8。采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析:计量资料采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;多组间比较用单因素方差分析,两两比较用 SNK (student-newman-keuls) 法。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 整蛋白肠内营养制剂对小鼠的体质量影响

在实验过程中小鼠体重变化如图 1 所示,1 d 后,3 组小鼠均体质量开始逐渐减轻,到 4 d,与 CLP 组 (21.183 \pm 1.837) 相比,CLP+IPEN 组 (20.867 \pm 1.331) 及 Sham 组 (10.133 \pm 1.108) 小鼠体重下降相对较少,CLP 组小鼠体质量下降最明显 ($F=111.791$, $P<0.001$)。



注:a,与 Sham 组比较, $P<0.05$; b,与 CLP 组比较, $P<0.05$

图1 小鼠体质量变化趋势图

2.2 整蛋白肠内营养制剂对小鼠肠上皮黏膜的影响

HE染色:CLP组显示不同程度的肠上皮黏膜损伤,并可看出整蛋白肠内营养制剂可明显改善脓毒症小鼠的肠道黏膜损伤,见图2;与CLP组(4.500 ± 0.548)相比,CLP+IPEN组(3.000 ± 0.894)的Chiu评分明显降低($F=39.605, P<0.001$;表1),表明肠黏膜损伤程度明显减轻。

2.3 整蛋白肠内营养制剂对CLP组小鼠肠道屏障的影响

与Sham组(0.384 ± 0.033)相比,CLP组(1.142 ± 0.088)及CLP+IPEN组(0.601 ± 0.154)的Occludin蛋白水平表达明显增加;CLP+IPEN组(0.601 ± 0.154)比CLP组(1.142 ± 0.088)的Occludin表达明显下降($F=84.025, P<0.001$)。与Sham组(0.664 ± 0.311)相比,CLP组(1.367 ± 0.573)及CLP+IPEN组(0.251 ± 0.061)的ZO-1蛋白水平表达明显增加;CLP+IPEN组(0.251 ± 0.061)比CLP组(1.367 ± 0.573)的ZO-1表达明显下降($F=13.364, P<0.001$)。与Sham组(0.287 ± 0.103)相比,CLP组(5.250 ± 1.230)及CLP+IPEN组(3.183 ± 0.979)的MUC2蛋白水平表达明显增加;CLP+IPEN组(3.183 ± 0.979)比CLP组(5.250 ± 1.230)的MUC2表达明显下降($F=45.064, P<0.001$)。以上结果表明:脓毒症可导致肠道屏障功能出现不同程度的损伤,整蛋白肠内营养制剂的干预有效地增强了脓毒症小鼠的肠屏障功能(表1)。

2.4 PLS-DA模式识别及结果分析,差异代谢产物筛选

采用偏最小二乘判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA))模式识别方法,以VIP>1、 $P<0.05$ 及FC>1.2或<0.8为条件筛选差异代谢物。结果显示,与CLP组相比,CLP+IPEN组的3-甲基-1,3,5-戊三醇(dimethyl 3-

hydroxy-3-methylpentane-1,5-dioate)、丙二酸(malonic acid)、苯酰胺(l-serine, n-methoxycarbonyl-methyl ester)、反式亚油酸(linolelaidic acid)、棕榈酯(palmitelaidic acid)、顺式-11,14-二十碳二烯酸(11,14-eicosadienoic acid)等15个代谢物含量改变明显。其中3-甲基-1,3,5-戊三醇、丙二酸、苯酰胺、2,2,2-三氯乙醇(trichloroethanol)、N-[(甲氧基羰基)甘氨酸甲酯(glycine, n-methoxycarbonyl-methyl ester)5个代谢产物含量增加($P<0.05$),见表2;而正十五烷酸(pentadecanoic acid)、顺-8,11,14-二十碳三烯酸(8,11,14-eicosatrienoic acid)、十甲基环五硅氧烷(cyclopentasiloxane, decamethyl)、酮戊二酸单酰胺(dl-gamma-methyl ketoglutaramate isomer 2)、2-羟雌甾二醇(2-hydroxyglutaramic acid)、反式亚油酸、棕榈酸酯、顺式-11,14-二十碳二烯酸、肉豆蔻酸(myristic acid)、硬脂酸(stearic acid)10个代谢产物含量减少($P<0.05$),见表2;其中VIP值最高的为棕榈酯,见图3、4。

2.5 整蛋白肠内营养制剂对脓毒症代谢通路的影响

将筛选的CLP组与实验组共同差异代谢物正十五烷酸、顺-8,11,14-二十碳三烯酸、十甲基环五硅氧烷、酮戊二酸单酰胺、2-羟雌甾二醇、反式亚油酸、棕榈酯、顺式-11,14-二十碳二烯酸、肉豆蔻酸、硬脂酸输入在线网站MetaboAnalyst 5.0分析其参与的相关代谢通路,结果显示,与CLP组差异代谢物共涉及4条代谢通路,为亚油酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、脂肪酸的生物合成、细胞色素P450物质代谢(impact>0.05),见图5;表明整蛋白肠内营养可能通过调控亚油酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、脂肪酸的生物合成、细胞色素P450物质代谢改善脓毒症肠损伤代谢紊乱。

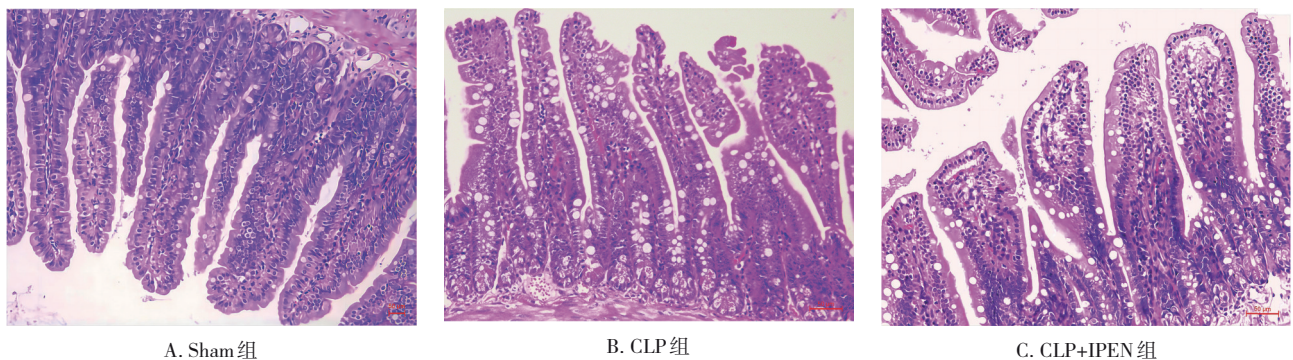


图2 HE染色后观察各组肠上皮黏膜病理性改变(200×)

表1 3组小鼠的Chiu评分及肠道黏膜屏障相关蛋白的情况比较

组别	n	Chiu评分	Occludin	ZO-1	MUC2
Sham组	6	1.167 ± 0.408	0.384 ± 0.033	0.664 ± 0.311	0.287 ± 0.103
CLP组	6	4.500 ± 0.548	1.142 ± 0.088	1.367 ± 0.573	5.250 ± 1.230
CLP+IPEN组	6	3.000 ± 0.894	0.601 ± 0.154	0.251 ± 0.061	3.183 ± 0.979
F值		39.605	84.026	13.364	45.064
P值		0.000	0.000	0.000	0.000

表2 CLP 组与 CLP+IPEN 组差异性代谢产物

差异代谢产物	VIP 值	R 值	P 值
pentadecanoic acid	1.774	-1.496	0.002
8,11,14-eicosatrienoic acid	2.456	-2.018	0.005
glycine,n-(methoxycarbonyl)-,methyl ester	1.660	1.464	0.005
trichloroethanol	1.695	1.444	0.005
cyclopentasiloxane,decamethyl	1.477	-1.311	0.012
dl-gamma-methyl-ketoglutaramateisomer 2	1.422	-1.233	0.017
2-hydroxyglutaramic acid Peak 1	2.020	-1.784	0.019
linolealaidi cacid	1.554	-1.377	0.022
palmitelaidic acid	2.908	-2.757	0.039
11,14-eicosadienoic acid	1.736	-1.702	0.058
myristic acid	2.334	-2.161	0.062
l-serine,n-(methoxycarbonyl)-,methyl ester	1.574	1.436	0.081
stearic acid	1.447	-1.263	0.082
dimethyl 3-hydroxy-3-methylpentane-1,5-dioate	1.499	1.256	0.091
malonic acid	1.719	1.426	0.096

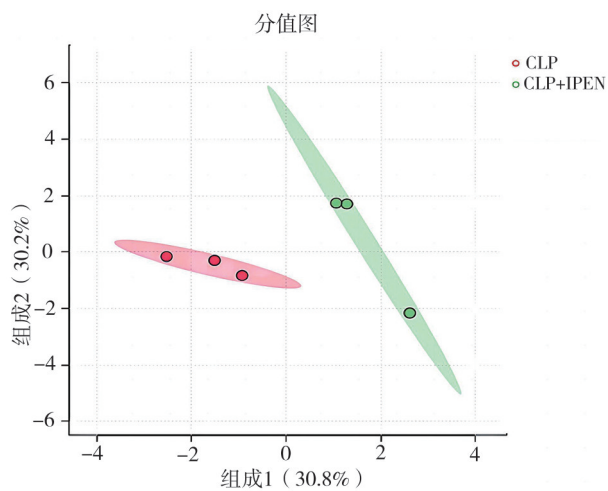


图3 CLP 组与 CLP+IPEN 组小鼠 PLS-DA 分析图

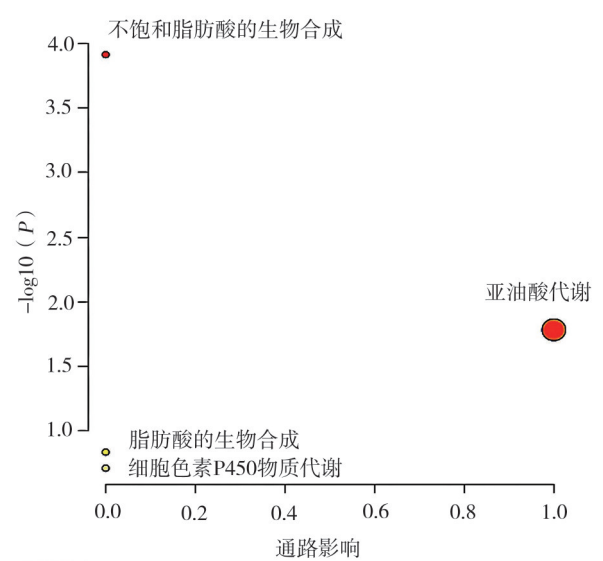


图5 整蛋白肠内营养制剂对脓毒症代谢通路分析图

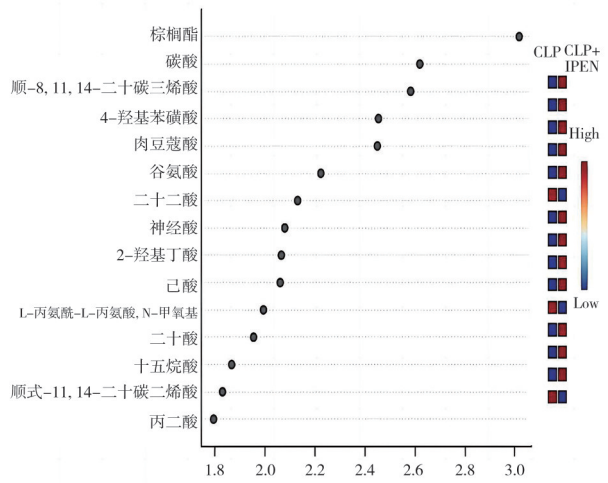


图4 VIP 值

3 讨论

脓毒症作为1种由感染引起机体生理、病理和生化紊乱的特异性反应,可导致肺、肝、肾等多器官功能障碍,并导致严重的糖代谢紊乱^[12]。脓毒症是1种对感染引起危及生命的器官功能障碍的疾病^[13]。脓毒症引起的多器官衰竭仍然是治疗有限的重症监护病房发病率和死亡率的主要原因^[14]。肠道是脓毒症重要的“效应器”和“启动器”,是脓毒症治疗的潜在靶标^[15]。胃肠道是脓毒症期间最容易和最

频繁受损的器官^[16]。当脓毒症发生时,肠道上皮细胞和细胞间连接容易受到过度的“炎症因子风暴”的影响^[17]。所以肠屏障功能障碍的相关的促炎机制可能是治疗是多器官功能障碍综合征及脓毒症的重点所在。目前针对脓毒症肠损伤的研究得到明显提升。然而,由于目前脓毒症肠损伤的具体发病机制不详,临床缺乏早期的诊断方法,给其治疗带来巨大困难,因此,寻找特异性较高的脓毒症肠损伤诊断标志物成为目前临床医学的研究重点。因此深入研究整蛋白营养制剂对脓毒症小鼠肠损伤代谢紊乱的机制研究是非常必要。

脓毒症是导致肠道功能障碍的器官功能损害或衰竭的重要因素^[18],肠屏障功能障碍是脓毒症进展的诱因^[19]。脓毒症涉及 1 种急性异常代谢状态,体质量增加可以提供间接的营养储备,在危及生命的急性疾病中起着至关重要的作用,较高的身体质量指数(body mass index, BMI)是 ICU 脓毒症患者预后的保护因素^[20]。整蛋白型肠内营养剂含酪蛋白、维生素、矿物质等,其适用于脓毒症血患者^[21]。本次试验结果得出第 1 d 后 3 组小鼠均体质量开始逐渐减轻,到第 4 d CLP 组的小鼠体质量下降最明显($P < 0.05$),但仍需进一步实验了解后期治疗是否对体质量有明显增重效果。

肠道提供了强大的黏膜屏障,黏膜形成了保护身体健康的 3 个基本屏障,包括物理屏障、生物化学屏障和免疫屏障^[22]。其中紧密连接(tight junction, TJ)在肠黏膜屏障中起到重要作用,occludin 是 TJ 的重要成分,脓毒症时炎症介质和内毒素相关的降钙素原(procalcitonin, PCT)升高可能诱导肠黏膜细胞凋亡增加和肠上皮 TJ 损害^[23]。在脓毒症模型小鼠回肠中, Occludin、ZO-1、MUC2 表达均明显增加,表明脓毒症可导致肠道屏障功能不同程度的损伤。实验中使用“整蛋白肠内营养制剂”治疗的 CLP+IPEN 组,其 Chiu 评分及 Occludin、ZO-1、MUC2 的表达与 CLP 组相比均明显下降,提示其可改善肠道屏障功能,降低其通透性,能减轻脓毒症肠损伤程度,认为可能机制是整蛋白型肠内营养治疗能通过维护脓毒症在应激状态下的肠道黏膜屏障功能,防止肠道细菌移位的发生从而减少内源性感染的发生。

本研究结果表明,CLP 组与 CLP+IPEN 组肠组织代谢组学存在差异,从脓毒症小鼠中筛选出 15 个整蛋白营养治疗脓毒症的差异代谢物,其中 5 种代

谢物明显升高,10 种代谢物明显降低。与 CLP 组的差异代谢物共涉及 4 条代谢通路,为亚油酸代谢、不饱和脂肪酸的生物合成、脂肪酸的生物合成、细胞色素 p450 物质代谢(impact>0.05),其中亚油酸代谢最具统计有意义,其次为不饱和脂肪酸的生物合成、脂肪酸的生物合成、细胞色素 p450 物质代谢。本次研究结果表明亚油酸代谢在 2 组患者代谢途径之间差异最明显,亚油酸是 1 种双不饱和脂肪酸,是人类营养中必需的脂肪酸,也是长和发育所必需的不饱和脂肪酸。亚油酸可转化为花生四烯酸,花生四烯酸是 C 反应蛋白、白细胞介素-6 等炎症因子的前体,可以促进炎症因子的产生^[24]。Kirkup SE 等^[25]的体外实验同样发现亚油酸使 PGE2 合成。增加亚油酸会产生大量的白三烯和前列腺素,对炎症不利。从实验结果可以看出,与 CLP 组小鼠相比,CLP+IPEN 组的 Occludin、ZO-1、MUC2 的表达明显下降,改善肠道屏障功能,减轻肠功能损伤程度,进一步促进了亚油酸代谢及去饱和的过程,也提高了小鼠对亚油酸的利用率。此外,也参与了不饱和脂肪酸的生物合成、脂肪酸的生物合成、细胞色素 p450 物质代谢过程。总之,试验结果表明整蛋白肠内营养制剂可以通过调节亚油酸代谢、不饱和脂肪酸生物合成、脂肪酸生物合成和细胞色素 p450 物质的代谢来改善脓毒症相关肠道损伤的代谢紊乱。其亚油酸代谢最有意义。

综上所述,本研究通过代谢组学方法深入研究了整蛋白营养制剂中脓毒症引起的代谢紊乱。研究结果表明,整蛋白肠内营养制剂可以通过调节亚油酸代谢、不饱和脂肪酸生物合成、脂肪酸生物合成和细胞色素 p450 物质的代谢来改善脓毒症相关肠道损伤的代谢紊乱。此外,这些制剂在增强肠道屏障功能、减轻小鼠体重减轻和减轻肠道损伤严重程度方面具有潜力,从而为增强脓毒症治疗功效奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Wei JX, Jiang HL, Chen XH. Endothelial cell metabolism in sePsis [J]. World J Emerg Med, 2023, 14(1): 10-16.
- [2] 孙啸宇, 陆宗庆, 张 金, 等.《拯救脓毒症运动:脓毒症与脓毒性休克治疗国际指南(2021)》摘译与解读[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2021, 28(6): 645-652.
- Sun XY, Lu ZQ, Zhang J, et al. Interpretation of Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of sePsis and sePtic shock 2021[J]. Chin J Integr Tradit West Med Intensive Crit Care, 2021,

28(6):645-652.

[3] Fleischmann-Struzek C, Mellhammar L, Rose N, et al. Incidence and mortality of hospital- and ICU-treated sepsis: results from an updated and expanded systematic review and meta-analysis[J]. Intensive Care Med, 2020, 46(8): 1552-1562.

[4] Yao LN, Zhang L, Zhou CJ. Analysis of Prognostic risk factors of sepsis Patients in intensive care unit based on data analysis[J]. J Healthc Eng, 2022, 2022: 3746640.

[5] Wang GL, Ma FF, Xie KM, et al. Liensinine alleviates mouse intestinal injury induced by sepsis through inhibition of oxidative stress, inflammation, and cell apoptosis[J]. Int Immunopharmacol, 2024, 127: 111335.

[6] Tian WZ, Yue Q, Fei W, et al. PE (0:0/14:0), an endogenous metabolite of the gut microbiota, exerts protective effects against sepsis-induced intestinal injury by modulating the AHR/CYP1A1 Pathway[J]. Clin Sci, 2023, 137(22): 1753-1769.

[7] Zhao J, Pan X, Hao D, et al. Causal associations of gut microbiota and metabolites on sepsis: a two-sample Mendelian randomization study[J]. Front Immunol, 2023, 14: 1190230.

[8] Tyszkowski M, Lemańska-Perek A, Śmiechowski J, et al. Citrulline, intestinal fatty acid-binding Protein and the acute gastrointestinal injury score as Predictors of gastrointestinal failure in Patients with sepsis and septic shock[J]. Nutrients, 2023, 15(9): 2100.

[9] Lubbers T, de Haan JJ, Hadfoune M, et al. Lipid-enriched enteral nutrition controls the inflammatory response in murine Gram-negative sepsis[J]. Crit Care Med, 2010, 38(10): 1996-2002.

[10] 刘承宇, 陈丽如, 朱明炜. 重症患者早期肠内营养的研究进展[J]. 中华临床营养杂志, 2022, 30(3): 161-166.

Liu CY, Chen LR, Zhu MW. Research Progress on early enteral nutrition in critically ill Patients[J]. Chin J Clin Nutr, 2022, 30(3): 161-166.

[11] Rittirsch D, Huber-Lang MS, Flierl MA, et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture[J]. Nat Protoc, 2009, 4(1): 31-36.

[12] 王龙海. 百里醌通过激活 SIRT1/STAT3 通路对脓毒症所致大鼠肝损伤和糖代谢紊乱的保护作用[J]. 重庆医科大学学报, 2021, 46(12): 1473-1478.

Wang LH. Protective effects of thymoquinone on sepsis-induced liver injury and glucose metabolism disorder in rats by activating SIRT1/STAT3 Pathway[J]. J Chongqing Med Univ, 2021, 46(12): 1473-1478.

[13] Madushani RWMA, Patel V, Loftus T, et al. Early biomarker signatures in surgical sepsis[J]. J Surg Res, 2022, 277: 372-383.

[14] Cao T, Ni R, Ding WM, et al. Nicotinamide mononucleotide as a therapeutic agent to alleviate multi-organ failure in sepsis[J]. J Transl Med, 2023, 21(1): 883.

[15] Quan RZ, Chen CY, Yan W, et al. BAFF blockade attenuates inflammatory responses and intestinal barrier dysfunction in a murine endotoxemia model[J]. Front Immunol, 2020, 11: 570920.

[16] Xu H, You J, He WQ, et al. Dynamic changes in the migratory microbial components of colon tissue during different periods of sepsis in an LPS-induced rat model[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2023, 13: 1330087.

[17] Song WY, Huang J, Li Y, et al. The role of TLR4/MyD88/NF- κ B in the protective effect of ulinastatin on the intestinal mucosal barrier in mice with sepsis[J]. BMC Anesthesiol, 2023, 23(1): 414.

[18] Hua ZJ, Wang YQ, Chen WP, et al. Emodin protects against intestinal dysfunction and enhances survival in rat model of septic peritonitis through anti-inflammatory actions[J]. Immun Inflamm Dis, 2023, 11(8): e942.

[19] Xie SH, Yang T, Wang ZF, et al. Astragaloside IV attenuates sepsis-induced intestinal barrier dysfunction via suppressing RhoA/NLRP3 inflammasome signaling[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 78: 106066.

[20] 王丹妮, 华黎电, 潘志国, 等. 体重指数对脓毒症患者预后的影响: 基于大型临床数据库 MIMIC-III 的回顾性分析[J]. 解放军医学杂志, 2021, 46(2): 129-135.

Wang DN, Hua LD, Pan ZG, et al. The impact of body mass index on the prognosis in sepsis Patients: a retrospective analysis on account of the large clinical database MIMIC-III[J]. Med J Chin People's Liberation Army, 2021, 46(2): 129-135.

[21] 吕艳超, 李兴华, 刘颖. 益生菌联合整蛋白型肠内营养辅助治疗脓毒血症的疗效及对肠道和免疫功能的影响[J]. 中国现代医学杂志, 2020, 30(24): 61-65.

Lü YC, Li XH, Liu Y. Effect of Probiotics combined with enteral nutrition with a nonelemental diet on sepsis and intestinal and immune function[J]. China J Mod Med, 2020, 30(24): 61-65.

[22] Duan YT, Huang JJ, Sun MJ, et al. *Poria cocos* Polysaccharide improves intestinal barrier function and maintains intestinal homeostasis in mice[J]. Int J Biol Macromol, 2023, 249: 125953.

[23] 刘慧恒, 王隽笙, 林锦洲, 等. 降钙素原通过影响磷酸化蛋白激酶 C α -闭合蛋白表达损害脓毒症大鼠肠黏膜屏障功能[J]. 创伤与急诊电子杂志, 2023, 11(1): 1-9.

Liu HH, Wang JS, Lin JZ, et al. Procalcitonin impairs intestinal mucosal barrier by decreasing occludin expression via activation of P-PKC α in septic rats[J]. J Trauma Emerg Electron Version, 2023, 11(1): 1-9.

[24] 刘莉, 谢胜, 刘礼剑, 等. 胃食管反流病患者血浆代谢组学研究及临床观察[J]. 广西大学学报(自然科学版), 2022, 47(1): 254-261.

Liu L, Xie S, Liu LJ, et al. Plasma metabolomics study and clinical observation in Patients with gastroesophageal reflux disease[J]. J Guangxi Univ Nat Sci Ed, 2022, 47(1): 254-261.

[25] Kirkup SE, Cheng Z, Elmes M, et al. Polyunsaturated fatty acids modulate Prostaglandin synthesis by ovine amnion cells *in vitro*[J]. Reproduction, 2010, 140(6): 943-951.

(责任编辑: 周一青)