

文献精读|低甲氧基果胶肠内喂养促进大鼠结肠吻合口愈合

原创 2018-03-02 林佳佳 重症营养

据 Nutrition 2017年7月22日报道题：《Enteral feeding with low-methoxyl pectin accelerates colonic anastomosis healing in rats》作者：Fumiyo Yamada等



Basic nutritional investigation

Enteral feeding with low-methoxyl pectin accelerates colonic anastomosis healing in rats



Fumiyo Yamada Ph.D. *, Naoyuki Endo, Sho Miyatake, Goro Ebisu, Kazuo Hino

Medical Foods Research Institute, OS-1 Division, Otsuka Pharmaceutical Factory, Inc., Takushima, Japan

背景

果胶喂养通过刺激短链脂肪酸（SCFA）传感器激活新的营养感应机制。此前曾有研究表明，摄入的膳食纤维经过肠道细菌分解可以增加SCFA产生从而促进吻合口愈合。同时，术后早期肠道机械负荷也与促进吻合愈合呈正相关。因此，吻合口周围的SCFA产生和机械负荷的结合可以构成促进吻合口愈合的一种有效方法。虽然在短肠综合征，果胶的有益效果是已知[5,6]，但据我们所知，很少有报道对果胶性质进行区分。

果胶多糖富含D-半乳糖醛酸（GA）。果胶的物理和生化特性是由GA羧基基团的酯化程度（DE）决定的。DE > 50%被称为高甲氧基果（HMP），DE < 50%被称为低甲氧基果胶（LMP）。

考虑到HMP和LMP存在生理学的差异，因此HMP和LMP对吻合口的愈合有不同的影响。本研究探究早期肠内喂养含有LMP或HMP流质饮食对大鼠结肠吻合口愈合的影响。

材料与amp;方法

动物与产所

30只7周雄性SD大鼠饲养在标准环境，动物与环境均符合国际标准。

流质饮食准备

每100大卡的等热量等氮饲料（除去果胶添加剂）含0.9g LMP或0.9g HMP，或不含果胶（PF）。

实验设计

三十只大鼠按第一天体重随机分为三组，在实验阶段分别喂含LMP，HMP和不含果胶（n=10只/组）的流质饮食（80 kcal/d）。第6天（术前一天），禁食24小时。第7天（手术日），大鼠喂养剂量为40kcal/d，而不是80kcal/d。随后，大鼠喂食剂量为80kcal/d。大鼠于第7天接受吻合手术，第14天处死。

吻合术：手术过程

大鼠术前禁食24 h，吸入异氟醚进行麻醉，胸骨稍下方沿腹中线作一约4cm的切口。将回盲部转移到腹腔的右侧暴露降结肠，切除自腹膜返折处3cm区域的降结肠，用7-0缝线在断段做8个单纯间断缝合。吻合手术由指定人员进行以避免技术差异的干扰。腹壁的筋膜层和腹部皮肤分别用3-0 Perma-Hand Silk (Ethicon)进行连续缝合。

吻合口破裂压和断裂强度

第14天，用异氟醚处死动物。将下腹部的缝合部位打开，在原位测量吻合口破裂压。聚四氟乙烯（京都，日本）一次性探测仪通过一个导管连接到传感器，离吻合口近端1.5cm处插入，并在结肠近端1.5厘米和远端1.5厘米用3-0丝线结扎。用注射泵以1毫升/分钟的速度通过导管连续输注生理盐水。腔内压力通过传感器监测（mlt0670 BP；东京，日本）和图表记录器记录。在确认吻合口瘘时，立即停止输注盐水，并将爆破压记录为吻合口破裂前即刻达到的峰值压力。

爆破压力试验后，切除从吻合口近端1.5cm到远端1.5 cm处的3cm的结肠并去除肠系膜的脂肪。组织的两端分别固定在一个数字测力计的钳夹上进行拉力试验。在测量断裂强度时，一个钳夹以30毫米/分钟的速度远离另一个钳夹，使组织不断拉直到吻合部位完全断裂。断裂强度定义为吻合口断裂前的最大张力。

吻合口的生物化学分析

在断裂强度试验后，对结肠组织进行称重，并在以前的报告基础上采用改进的方法测定羟脯氨酸浓度作为胶原含量的指标。简而言之，结肠组织混匀在2ml的生理盐水中并以3000g离心10分钟，收集上清液作为盐溶性胶原组分和微球，随后在6 N 盐酸，110°C温度下水解24H，收集不溶性胶原组分。采用液相色谱-质谱仪测定组分中的羟脯氨酸含量，氮含量用氮分析仪测定。

营养参数

在第1, 7天和第14天分别测定各组大鼠体重。从第7到14天记录每只大鼠的饮食摄入量。在破裂压力试验后, 从腹主动脉采集血样, 用全自动生化分析仪测定血浆总蛋白、白蛋白、血糖和血尿素氮。

盲肠内容物

第14日获取盲肠内容物, 用pH电极测定盲肠内容物pH值。在盲肠段的几种有机酸含量 (即, 甲酸, 醋酸, 丙酸, 异丁酸, 丁酸、异戊酸、正戊酸、琥珀酸、乳酸) 采用内标法测定, 配备一个垫片组SCR 102 H柱高效液相色谱和电导检测器。

结果

1.分析组别

六只大鼠 (LMP组4只和HMP组2只) 在吻合手术24 h内死于出血或肠梗阻, 可能由于不成功的手术程序造成的, 因此被排除在外。

其余大鼠耐受手术且无吻合口渗漏。在分析动物时LMP, HMP和PF组的大鼠数量分别是: 6, 8, 10。

2.吻合爆破压和断裂强度

三组间爆破压力值无显著性差异 (表1)。然而, 断裂强度LMP组比HMP和PF组显著升高 ($P < 0.001$) (表1)。

Table 1

Anastomosis bursting pressure and breaking strength

	LMP (n = 6)	HMP (n = 8)	PF (n = 10)
Bursting pressure, mm Hg	170.44 ± 22.77	157.78 ± 19.07	167.36 ± 18.34
Breaking strength, N	2.77 ± 0.48	1.36 ± 0.20*	1.59 ± 0.30*

HMP, high-methoxyl pectin; LMP, low-methoxyl pectin; PF, pectin free
Rats were fed an LMP, HMP, or PF diet. Data are presented as mean ± SD
* $P < 0.001$ vs LMP group.

3.吻合组织的生化成分

LMP组每个单位长度组织的重量明显高于PF组 ($P < 0.01$; 表2)。组织中氮含量在3个组别中组明显差异。LMP组盐溶组分中的羟脯氨酸含量显著高于PF组 ($P < 0.01$), 且有高于HMP的趋势 ($P=0.2578$)。不溶性组分中羟脯氨酸含量在三组间无明显差异。

Table 2
Composition of anastomosis site tissue

	LMP (n = 6)	HMP (n = 8)	PF (n = 10)
Wet weight, g/cm	0.26 ± 0.07*	0.19 ± 0.04	0.17 ± 0.06
Nitrogen content, mg/g wet weight	0.41 ± 0.05	0.36 ± 0.06	0.37 ± 0.04
Salt-soluble hydroxyproline, nmol/μmol tissue N	3.37 ± 1.36*	2.42 ± 1.00	1.44 ± 0.94
Insoluble hydroxyproline, nmol/μmol tissue N	26.59 ± 1.30	26.43 ± 6.89	28.28 ± 3.77

HMP, high-methoxyl pectin; LMP, low-methoxyl pectin; PF, pectin free

Data are presented as mean ± SD

* $P < 0.001$ vs LMP group.

4.营养参数

虽然术后三组提供的能量相同，LMP组的体重在第7和14天显著高于HMP和PF组 ($P < 0.05$, $P < 0.001$, 分别 =)。LMP组大鼠在术后有显著较高的体重增加相对于PF组 ($P < 0.01$; 表3 =)。

虽然各组大鼠血浆总蛋白和白蛋白水平均在正常范围内，但各组间有统计学差异 ($p < 0.05$)。三组的血浆葡萄糖、尿素氮水平无明显差异。

Table 3
Nutritional parameters

Parameter	Day	LMP (n 6)	HMP (n 8)	PF (n 10)
Body weight, g	1	341.90 ± 12.71	335.84 ± 12.18	334.72 ± 12.49
	7	314.59 ± 6.53	296.71 ± 14.26*	298.96 ± 8.45*
	14	341.26 ± 6.88	315.66 ± 11.40†	315.60 ± 10.41†
Body weight gain, g	7-14	26.67 ± 1.51	18.95 ± 6.50	16.64 ± 6.45‡
Energy intake, kcal/7 d	7-14	518.73 ± 12.45	508.00 ± 30.11	521.52 ± 15.57
Total protein, g/dL	14	4.65 ± 0.26 [§]	4.68 ± 0.20 [§]	4.99 ± 0.24
Albumin, g/dL	14	2.37 ± 0.18 [§]	2.39 ± 0.07 [§]	2.60 ± 0.15
Glucose, mg/dL	14	198.17 ± 19.10	203.00 ± 30.44	211.80 ± 25.19
Blood urea nitrogen, mg/dL	14	11.97 ± 1.75	13.39 ± 2.57	14.77 ± 2.18

HMP, high-methoxyl pectin; LMP, low-methoxyl pectin; PF, pectin free
Data are presented as mean ± SD

* $P < 0.05$.

† $P < 0.001$ vs LMP.

‡ $P < 0.01$.

§ $P < 0.05$ vs PF group.

5.大鼠粪便外观

LMP组所有大鼠的粪便都是正常的，而在HMP和PF组大鼠的粪便都为水样便（图1）。大便的外观在整个实验过程中保持一致。

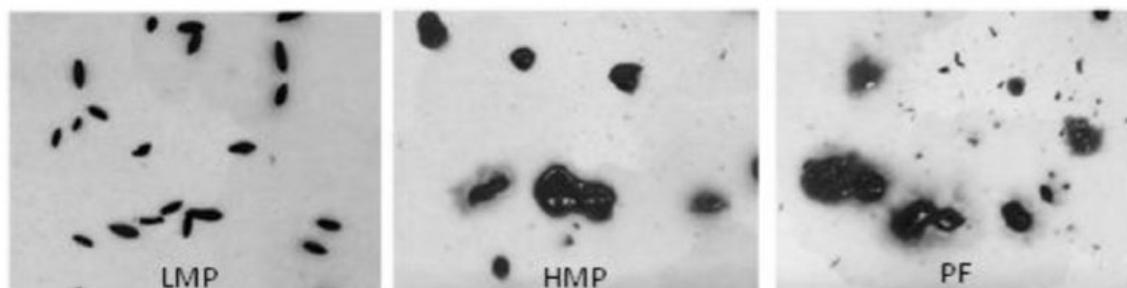


Fig. 1 Stool appearance. Representative images of stools produced on day 14 of the experimental period. Normally formed stools were produced by the rats in the low-methoxyl pectin (LMP) group, whereas watery stools were produced by the rats in the high-methoxyl pectin (HMP) and pectin-free (PF) groups. Similar stools were produced throughout the experimental period.

6.pH值和盲肠内容物中有机酸的浓度

盲肠内容物的pH值在三个不同的组别中无明显差别。LMP组总有机酸含量显著高于其他两组 (表4; $p < 0.001$)。在SCFAs检测中, 只有乙酸浓度在LMP组中显著高于HMP和PF组 ($P < 0.01$)。其他的短链脂肪酸如丙酸和丁酸在三组间无显著差异。

Table 4
pH and organic acids composition of cecal contents

	LMP (n = 6)	HMP (n = 8)	PF (n = 10)
pH	5.29 ± 0.35	5.18 ± 0.15	5.29 ± 0.11
Total organic acids, $\mu\text{mol/g}$ contents	54.25 ± 5.91	30.33 ± 4.47 [*]	31.65 ± 9.08 [*]
Total SCFAs, $\mu\text{mol/g}$ contents	41.73 ± 5.46	28.34 ± 4.46 [†]	29.00 ± 8.39 [†]
Acetate, $\mu\text{mol/g}$ contents	33.54 ± 4.00	21.63 ± 3.45 [†]	20.71 ± 6.80 [†]
Propionate, $\mu\text{mol/g}$ contents	5.22 ± 1.13	4.65 ± 1.25	5.40 ± 1.42
n-Butyrate, $\mu\text{mol/g}$ contents	2.97 ± 0.66	2.06 ± 0.72	2.88 ± 0.70

HMP, high-methoxyl pectin; LMP, low-methoxyl pectin; PF, pectin free; SCFAs, short-chain fatty acids

Total SCFAs refers to the sum of the concentrations of acetate, propionate, and n-butyrate. Data are presented as mean ± SD

^{*} $P < 0.001$ vs LMP group.

[†] $P < 0.01$.

结论

在这项研究中, 吻合口愈合的评价使用两种方法: 断裂强度和爆破压试验。本研究发现是LMP喂养的大鼠吻合口断裂强度是最高的, 表明LMP比HMP更有效地促进吻合口愈合。此外, 盲肠SCFA浓度和粪便的外观在LMP和HMP组之间有明显不同, 提示吻合口愈合的机制。

爆破压试验评估了吻合口漏, 适合于评价相对早期 (术后第5天或7天) 的吻合口愈合。目前的研究在7d后评价可能有些晚了。在术后第7天吻合口漏已很少见。在这种情况下, LMP组断裂强度仍显著高于HMP组, 表示LMP喂养后吻合口有更强大的愈合能力。

羟脯氨酸在盐溶性和不可溶组分含量可作为吻合口愈合的另一个参数。盐溶性组分中羟脯氨酸含量提示有新合成的胶原蛋白, 而在不可溶性组分中则表示成熟的胶

原。这个盐溶性和不可溶性中羟脯氨酸含量的研究结果提示在LMP组吻合口部位发生活跃的胶原合成，但三组中成熟胶原含量无明显差异。在LMP组吻合口组织更高的湿量也表明激活成纤维细胞和胶原合成从而促进肉芽组织的形成。上述结果表明在LMP喂养组吻合部位有强健的肉芽组织形成。

SCFAs，尤其丁酸，常被用来作为肠上皮细胞的能量底物，可能促进结肠吻合口的愈合。SCFAs也可以促进结肠对水、钠的吸收。结果表明LMP组盲肠内容物中SCFAs高水平可以部分解释LMP组促进吻合口愈合。同时，盲肠中高水平的SCFA可以更好地发酵果胶。但我们的研究表明LMP组发性比HMP组差（分别为57%，93%），LMP的低发酵性可能通过未消化的LMP的凝胶化作用促进正常粪便的形成。因此，LMP的局部发酵有两个有利的影响：SCFA的产生和正常粪便的形成。其可能的机制有待我们进一步探索。

LMP组显著增加的大鼠体重似乎与吻合口愈合无关系。观察HMP和PF组的粪便均为水样便，体液潴留可能是造成其体重差异的原因。至少术后体重增加和血浆总蛋白和白蛋白水平在LMP和HMP组间无差异，不太可能是因为系统营养状况影响吻合康复。

本研究探究早期肠内喂食含有LMP或HMP流质饮食对大鼠结肠吻合口愈合的影响。喂食LMP组的断裂强度和胶原含量明显高于HMP或PF组大鼠。这些结果表明LMP饮食促进吻合口愈合，这个可以用经过结肠形成的正常粪便移动时所产生的机械应力解释。在LMP组大鼠盲肠中短链脂肪酸产生也可能促进吻合口愈合。



本公众号由李维勤教授团队推出，是重症营养的交流平台，扫一扫轻松关注我们

