

· 论 著 ·

# 丙氨酰谷氨酰胺对体外培养人类黏膜上皮细胞生物活性的影响\*

徐 军<sup>1</sup>, 刘 鑫<sup>2△</sup>, 刘 宇<sup>1</sup>, 卿尚兰<sup>2</sup>, 车珂科<sup>3</sup>

(1. 重庆市红十字会医院/江北区人民医院口腔科 400020; 2. 重庆市人民医院口腔科 400014; 3. 重庆市人民医院药学部 400014)

**摘要:**目的 研究丙氨酰谷氨酰胺(Ala-Gln)对体外培养的人类黏膜上皮细胞的生长、蛋白合成和碱性磷酸酶(ALP)活性的影响。**方法** 将体外培养的人类黏膜上皮细胞根据加入 Ala-Gln 或谷氨酰胺(Gln)情况分为 N 组(对照组)、A 组(加入 Ala-Gln 组)和 G 组(加入 Gln 组),再对 A 组和 G 组根据其推荐的基础浓度进行梯度浓度设立 8、4、2、1、1/2、1/4 和 1/8 各 7 个组,在培养至 12、24、36、48、60 和 72 h 之时,流式细胞仪计数细胞并绘制细胞生长曲线,另外再检测对应时段各自 ALP 浓度;72 h 时检测各组细胞总蛋白水平。**结果** N 组细胞在 72 h 内细胞数并未明显变化,ALP 水平随着时间推移有所增加,但差值均低于加药的两组差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。在整个 72 h 内,A1/2、A1/4 和 G1/2、G1/4 细胞数目和 ALP 水平都能保持持续增长的状态,但是无论是 A 或者 G 组别,1/4 浓度组以及其他浓度组都低于 1/2 浓度组;A 和 G 组别对应浓度组之间,细胞生长情况和 ALP 水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ );各药物浓度组细胞蛋白水平均高于 N 组,A 和 G 组细胞蛋白水平最高;而各对应药物浓度的 A 和 G 组别的细胞蛋白水平差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** Ala-Gln 和 Gln 都能促进颊黏膜上皮细胞生长,浓度过高或过低均不利于细胞的持续生长,但 1/2 推荐浓度的 Ala-Gln 即 16.5 mg/mL 的 Ala-Gln 更为合理。

**关键词:**丙氨酰谷氨酰胺; 颊黏膜; 上皮细胞; 细胞生长; 碱性磷酸酶

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2016.13.007 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2016)13-1760-05

## The influence of alanyl-glutamine on the biological activity of human buccal epithelial cells in vitro\*

XU Jun<sup>1</sup>, LIU Xin<sup>2△</sup>, LIU Yu<sup>1</sup>, QING Shanglan<sup>2</sup>, CHE Keke<sup>3</sup>

(1. Department of Stomatology, The Red Cross Hospital of Chongqing, Chongqing 400020, China; 2. Department of Stomatology, Chongqing People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400014, China; 3. Department of Pharmacy, People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400014, China)

**Abstract: Objective** To study the influence of alanyl-glutamine (Ala-Gln) on the cell growth, protein synthesis, and alkaline phosphatase (ALP) biological activity of human buccal epithelial cells in vitro. **Methods** According to the reagent of Ala-Gln or glutamine (Gln) added in the human buccal epithelial cells, the cells in vitro were divided into group N (the control group), group A (Ala-Gln) and group G (Gln). Meanwhile, in accordance with the recommended basic concentration, gradient concentration 8, 4, 2, 1, 1/2, 1/4 and 1/8 of group A and G were set up. After culture of 12, 24, 36, 48, 60 and 72 h, cells were counted by flow cytometry instrument, and drew cell growth curve were drawn as well. In addition, the concentration of ALP was detected in the corresponding period. And the levels of total cell protein were detected of each group's on 72 h after the culture. **Results** The amount of cells in group N did not change obviously within 72 h. The levels of ALP increased over time, and the difference of ALP in the group A and G on the 72 h compared with before the culture were statistically significant ( $P < 0.05$ ). After adding the two drugs, growth of all cells were accelerated obviously within 24 h, and the levels of ALP also increased significantly ( $P < 0.05$ ). Within 72 h, cells numbers and levels of ALP in the group of A1/2, A1/4, G1/2 and G1/4 kept increasing. While the cells numbers and levels of ALP in group G1/2 and group A1/4 were lower than that of group G1/2 and A1/4, respectively. There was no statistical differences in cell growth status and ALP content between group A and G ( $P > 0.05$ ). Levels of cell protein in group A and G were higher than group N. A1/2 and G1/4 had highest cell protein levels. And there was no significant difference in cell protein content between corresponding concentration groups in group A and G. **Conclusion** Ala-Gln and Gln can both accelerate the growth of buccal epithelial cells. Too high or too low of the Ala-Gln and Gln are not conducive to the growth of the cells. While, 1/2 recommended concentration (16.5 mg/mL) of Ala-Gln is more reasonable.

**Key words:** alanyl-glutamine; buccal mucosa; epithelial cells; cell growth; alkaline phosphatase

口腔复发性阿弗他溃疡(RAU)是最常见的口腔黏膜病,是以口腔黏膜自发性、复发性溃疡为特点的一种疾病,普通人群的发病率为 20% 左右;RAU 的局部治疗目前以消炎、止痛、防止继发感染、促进愈合为原则<sup>[1]</sup>;谷氨酰胺(Gln)是免疫细胞及成纤维细胞等快速增殖细胞的主要能量来源,除了具有增

加葡萄糖胺、氨基己糖、黏蛋白的生物合成和促进溃疡组织再生等生物活性外,还具有有效调节免疫应答、改善机体代谢状况、提高机体抗氧化能力等药理作用<sup>[2]</sup>;由于 Gln 在水溶液中溶解度低且不稳定,目前临床使用化学稳定性好、水溶性强、能耐受高温消毒等优点的 N(2)-L-丙氨酰-L-谷氨酰胺(Ala-Gln)

\* 基金项目:重庆市卫生和计划生育委员会医学科研项目(2013-02-098;2015MSXM067)。

作者简介:徐军,男,主治医师,主要从事口腔医学的研究。△ 通讯作者,E-mail:ares\_young@163.com。

为 Gln 的供体,通过在细胞外发生的水解,为机体提供稳定的 Gln<sup>[3]</sup>。本文就 Ala-Gln 对外培养的人类黏膜上皮细胞的生长、蛋白合成和碱性磷酸酶(ALP)活性进行研究,并与对应的 Gln 进行对比,以期为 Ala-Gln 治疗 RAU 的临床研究及应用提供理论依据。

## 1 材料与与方法

**1.1 细胞来源** 标本采自重庆市红十字会医院(江北区人民医院)口腔科在颊黏膜取送活检的组织中的正常组织,均征得患者本人及其家属同意并签署知情同意书。

**1.2 试剂与仪器** D-Hanks 缓冲液(自配,含 100 000 U/mL 青霉素,100 μg/mL 链霉素,3 mg/L 二性霉素 B)。24 U/mL Disease II 酶、M199 培养基、胰蛋白酶和优等胎牛血清(FBS)(均来自 Gibco, USA);二甲基亚砜(DMSO)(来自 MPBIO, USA);噻唑蓝(MTT)(来自 Amresco USA);Triton X-100(来自 Sigma, USA);二氧化碳细胞恒温培养箱(来自 Forma, Scientific, USA);酶联免疫检测仪(来自 Labsystems dragon MK3, Finland);CKC-TR-2W 型倒置显微镜(来自 Olympus, Japan);细胞计数仪(INNOVATI, German);YJ-875 型超净化工作台(苏州净化设备厂);96 孔培养板(北京中杉金桥生物技术有限公司);角蛋白一抗及即用型 SABC 试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司);Bicinchoninic acid (BCA)蛋白浓度测定试剂盒(上海美季生物有限公司);碱性磷酸酶试剂盒(南京建成生物公司)。

## 1.3 方法

**1.3.1 人类颊黏膜复层扁平上皮细胞的原代培养、分离纯化及鉴定** 无菌条件下,取出颊黏膜组织,去除坏死组织及血渍,磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗 3 次,用青霉素、链霉素浸泡 0.5 min, PBS 冲洗 2 次,使用眼科剪修除过多的黏膜下组织,剪碎约 0.5 mm×0.5 mm,将组织块放入含有三抗的 D-Hanks 液,4℃下保存,3 h 内送至实验室。在超净台内,用 D-Hanks 液洗涤标本 3 次,放入 2.24 U/mL Disease II 酶中,4℃冰箱过夜消化,黏膜层与黏膜下层分离后,用眼科镊将黏膜层揭下,0.25%胰酶 37℃恒温振荡消化 5 min,加入含血清的培养液终止消化,用吸管吹打,所得悬液用 100 目尼龙滤网过滤,滤液移至离心管,1 000 r/min 离心 5 min,吸去上清液,重新加入培养液,吹打混悬,血细胞计数板记细胞数,以 5×10<sup>4</sup>/mL 密度接种于 96 孔培养板内,置 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养,第二天换液去除未贴壁细胞,以后每隔 3 d 换液,细胞生长至 90%时传代<sup>[4]</sup>。传代时,用吸管吸除培养液, D-Hanks 洗涤板孔两次,加入 0.25%胰酶 37℃消化 30 min,像差显微镜下见大部分细胞变圆脱壁后,加入含血清的培养液中中止消化,吸管均匀吹打板底使细胞脱壁悬浮,将细胞悬液以 2.5×10<sup>4</sup>/mL 重新接种于新的培养板内,用链霉素和素-生物素复合物(SABC)法进行角蛋白免疫组织化学染色,鉴定细胞来源<sup>[5]</sup>。

**1.3.2 实验分组及处理** 根据加药情况,将加入 Ala-Gln 溶液的定为 A 组;加入 Gln 溶液的定为 G 组;含 20%胎牛血清 M199 培养基培养细胞作为对照,定为 N 组。根据 Ala-Gln 产品使用说明书中的推荐浓度,结合预实验,将 Ala-Gln 溶液的基础浓度定为 33 mg/mL,折算 Gln 溶液的基础浓度为 22 mg/mL,然后根据加入溶质的浓度进行梯度浓度,按照 8、4、2、1、1/2、1/4 和 1/8 的比例进行配比,将 A 和 G 组再分为 A8、A4、A2、A1、A1/2、A1/4、A1/8 和 G8、G4、G2、G1、G1/2、G1/4、G1/8 各 7 个组。

**1.3.3 细胞生长情况的研究** 取第 5 代颊黏膜上皮细胞,采

用胰蛋白酶消化贴壁培养的细胞,终止消化后添加体积分数 15%FBS 培养基,用移液管反复轻轻吹打成单细胞悬浮液,按照 1:3 的接种比例进行传代培养。将长好的贴壁细胞消化后,以 0.75×10<sup>6</sup>/mL 的细胞密度转入摇瓶进行扩大培养。待细胞形态良好,以每瓶 100 mL 均匀接入 250 mL 三角瓶中(接种密度为 1.0×10<sup>6</sup>/mL),按照 N、A 和 G 组分组加入对应浓度的溶液,置于 37℃培养箱内培养。在 72 h 以内,每隔 12 h 取样,流式细胞仪计数细胞,并将本实验重复进行 3 次。

**1.3.4 细胞蛋白总含量的研究** 将培养的颊黏膜上皮细胞以 1.0×10<sup>5</sup>/mL 的密度接种于 96 孔板,每孔 1 mL。血清饥饿 12 h 后,各浓度组加入 96 孔板中,每种浓度加 6 孔;对照组加入含 0.5%FBS 的 M199。96 孔板置于 CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 72 h 后,弃去孔内液体,用 pH 7.4 的 PBS 冲洗 3 次,吸干,每孔加入 150 μL 0.5% Triton X-100 裂解过夜,取 200 μL 裂解液按蛋白浓度试剂盒说明用酶联免疫检测仪于 562 nm 波长测吸光度,根据标准曲线将吸光度换算成蛋白浓度(μg/mL),将该实验重复进行 3 次。

**1.3.5 细胞 ALP 活性的研究** 取第 5 代颊黏膜上皮细胞,以 1.0×10<sup>5</sup>/mL 的细胞浓度接种于 96 孔培养板,20%胎牛血清 M199 培养基共培养 4 d,弃孔内液体,加入 Triton X-100,4℃过夜,在 72 h 以内,每隔 12 h 取上述各孔液体及空白对照的蒸馏水一并转入另一个 96 孔板。按 ALP 试剂盒说明依次按比例加入缓冲液、基质液,水浴,加入磷酸-4-硝基苯酯二钠盐(PNPP)显色剂后在酶联免疫检测仪上于 405 nm 波长下测吸光度,间接反映细胞 ALP 活性。根据标准曲线将吸光度换算成 ALP 浓度(U/mgprot),并使用蛋白浓度进行校正,该实验也重复进行 3 次。

**1.4 统计学处理** 多组均数的比较采用单因素方差分析,对应浓度组之间比较采用 Tamhane's T<sup>2</sup> 检验,采用 SPSS17.0 统计学软件进行分析。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 体外培养的人类颊黏膜扁平上皮细胞** 细胞呈扁平不规则多角形,中央有圆形核,细胞彼此紧密相连成单层膜,见图 1。经 SABC 法染色鉴定培养细胞表现为角蛋白染色阳性,胞浆和胞膜出现棕黄色颗粒者为阳性细胞,证明培养的细胞是扁平上皮细胞,而非纤维母细胞,见图 2。

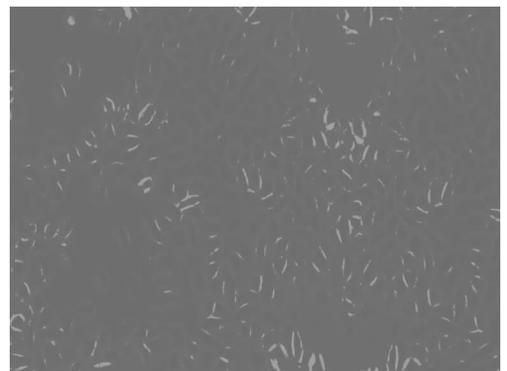


图 1 体外培养的人类颊黏膜扁平上皮细胞(倒置显微镜×40)

**2.2 细胞生长情况结果** N 组细胞的生长和凋亡处于一种平衡,细胞数并未明显变化,在 1.00~1.01×10<sup>6</sup>/mL;加入两种药物后,特别是 24 h 以内,都能明显促进细胞生长(F=3.127, P=0.001);其中, A8、A4 和 G8、G4 从 24 h 后,细胞数目未明显变化;48 h 后, A2 和 G2 细胞数目增长开始逐渐减慢,而

A1/8 和 G1/8 细胞数目开始下降;60 h 后, A1 和 G1 细胞数目增长开始逐渐减慢。在整个 72 h 内, A1/2、A1/4 和 G1/2、G1/4 细胞数目都能保持持续增长的状态,特别是 A1/2 组在 72 h 时达到了  $4.17 \times 10^6 / \text{mL}$ , 为最大值;无论是 A 或者 G 组别, 1/4 浓度组的生长数均低于 1/2 浓度组, 但差异无统计学意义 ( $P$  值均为 1.00)。A 和 G 组别对应浓度组之间, 细胞生长情况差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 1。

**2.3 各组细胞蛋白水平** 各药物浓度组细胞蛋白水平均高于 N 组, A1/2 和 G1/2 组细胞蛋白水平为各自组别最高, 而各对应药物浓度的 A 和 G 组别的细胞蛋白水平差异较小。见表 2。

**2.4 各组细胞 ALP 活性结果** N 组细胞的 ALP 水平随着时间推移有所增加, 但变化幅度不如加药的两组明显, 在加入两种药物后, 特别是 24 h 以内, 都明显提高了 ALP 的水平 ( $F = 5.776, P = 0.000$ ); 其中, A8、A4 和 G8、G4 从 24 h 后, ALP 水平未明显变化; 48 h 后, A2 和 G2 组 ALP 增长幅度开始逐渐减慢, 而 A1/8 和 G1/8 组 ALP 水平开始下降, 但仍较 N 组水平高, 差异有统计学意义 ( $P$  值分别为 0.010 和 0.008); 60 h 后, A1 和 G1 组 ALP 水平增长开始逐渐减慢。在整个 72 h

内, A1/2、A1/4 和 G1/2、G1/4 组 ALP 水平都能保持持续增长的状态, 特别 A1/2 在 72 h 时达到了 50.15 U/mgprot, 为本项实验数据的最大值; 无论是 A 或者 G 组别, 1/4 浓度组各时间点 ALP 的水平都低于 1/2 浓度组, 差异无统计学意义 ( $P$  值均为 1.00)。A 和 G 组别对应浓度组之间, ALP 水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。见表 3。

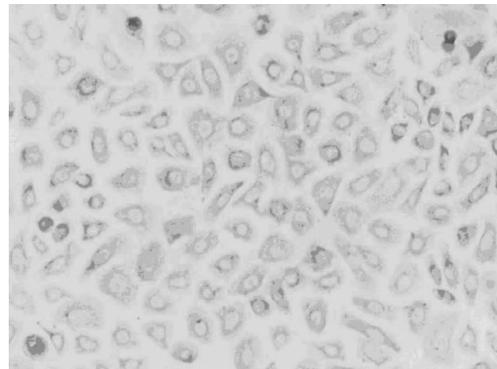


图2 人颊黏膜扁平上皮细胞角蛋白染色阳性(SABC×100)

表1 各组药物对颊黏膜上皮细胞生长情况的影响 ( $\times 10^6 / \text{mL}, \bar{x} \pm s$ )

组别	细胞数					
	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
N	1.01±0.00	1.01±0.01	1.00±0.02	1.00±0.00	1.00±0.02	1.00±0.02
A8	1.41±0.01	1.62±0.01	1.62±0.00	1.61±0.01	1.62±0.01	1.61±0.01
A4	1.37±0.01	1.55±0.01	1.56±0.02	1.55±0.01	1.56±0.01	1.55±0.01
A2	1.35±0.01	1.60±0.01	2.11±0.01	2.83±0.02	3.15±0.01	3.33±0.00
A1	1.34±0.01	1.62±0.01	2.12±0.00	2.84±0.00	3.42±0.01	3.71±0.01
A1/2	1.34±0.00	1.60±0.01	2.12±0.01	2.81±0.01	3.43±0.01	4.17±0.01
A1/4	1.27±0.01	1.42±0.00	1.83±0.01	2.42±0.01	3.11±0.01	3.82±0.01
A1/8	1.26±0.01	1.33±0.00	1.52±0.01	1.90±0.01	1.84±0.00	1.75±0.01
G8	1.42±0.00	1.63±0.01	1.62±0.01	1.63±0.02	1.63±0.01	1.62±0.01
G4	1.35±0.01	1.53±0.01	1.54±0.01	1.54±0.01	1.53±0.01	1.53±0.01
G2	1.34±0.01	1.60±0.01	2.12±0.01	2.80±0.00	3.13±0.01	3.31±0.01
G1	1.34±0.01	1.61±0.00	2.11±0.01	2.82±0.00	3.46±0.00	3.75±0.01
G1/2	1.34±0.01	1.61±0.01	2.12±0.01	2.80±0.00	3.45±0.01	4.13±0.01
G1/4	1.27±0.01	1.42±0.01	1.84±0.01	2.43±0.01	3.10±0.01	3.82±0.00
G1/8	1.26±0.02	1.35±0.00	1.56±0.01	1.90±0.01	1.83±0.01	1.75±0.01

表2 各组药物作用 72 h 后对颊黏膜扁平上皮细胞蛋白含量的影响 ( $\text{mg}/\text{mL}, \bar{x} \pm s$ )

组别	细胞蛋白水平
N	640.35±8.82
A8	873.45±6.04
A4	1 056.29±7.58
A2	1 200.98±6.73
A1	1 218.76±2.64
A1/2	1 374.18±5.24
A1/4	1 131.22±8.98

续表2 各组药物作用 72 h 后对颊黏膜扁平上皮细胞蛋白含量的影响 ( $\text{mg}/\text{mL}, \bar{x} \pm s$ )

组别	细胞蛋白水平
A1/8	994.67±10.29
G8	858.63±5.24
G4	1 050.87±7.74
G2	1 195.33±8.77
G1	1 209.85±7.49
G1/2	1 360.02±12.19
G1/4	1 130.39±5.92
G1/8	988.33±9.25

表 3 各组药物对颊黏膜上皮细胞 ALP 活性的影响 (U/mgprot,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	ALP 水平					
	12 h	24 h	36 h	48 h	60 h	72 h
N	24.21±0.10	24.44±0.08	24.62±0.07	24.90±0.06	25.26±0.10	25.63±0.11
A8	34.53±0.13	36.85±0.13	36.86±0.09	36.85±0.10	36.79±0.04	36.82±0.03
A4	32.17±0.07	36.35±0.01	36.36±0.07	36.40±0.09	36.37±0.08	36.36±0.10
A2	32.32±0.06	36.60±0.01	40.11±0.09	43.85±0.00	45.13±0.08	45.96±0.05
A1	32.50±0.09	36.74±0.11	40.26±0.07	44.00±0.08	47.48±0.08	48.53±0.03
A1/2	32.32±0.10	36.61±0.08	40.16±0.06	43.93±0.13	47.30±0.08	50.15±0.05
A1/4	31.20±0.07	35.44±0.07	38.86±0.02	41.40±0.02	44.12±0.10	46.85±0.15
A1/8	31.11±0.09	33.33±0.08	35.46±0.07	37.60±0.05	36.87±0.03	35.76±0.07
G8	34.62±0.02	36.92±0.10	36.89±0.11	36.91±0.06	36.87±0.11	36.88±0.12
G4	32.23±0.14	36.41±0.05	36.45±0.10	36.50±0.03	36.47±0.08	36.46±0.06
G2	32.33±0.05	36.71±0.16	40.16±0.05	43.78±0.02	45.25±0.04	46.00±0.07
G1	32.44±0.11	36.62±0.13	40.27±0.08	44.00±0.06	47.32±0.11	48.35±0.08
G1/2	32.30±0.09	36.67±0.05	40.00±0.06	43.81±0.09	47.23±0.09	49.92±0.16
G1/4	31.33±0.09	35.57±0.10	38.80±0.09	41.42±0.06	44.00±0.13	46.75±0.16
G1/8	31.23±0.15	33.43±0.10	35.47±0.06	37.66±0.08	36.78±0.08	35.62±0.04

### 3 讨 论

RAU 是最常见的口腔黏膜病,是以口腔黏膜自发性、复发性溃疡为特点的一种疾病,普通人群的发病率为 20 % 左右,该病因复杂,存在明显的个体差异。RAU 的局部治疗目前以消炎、止痛、防止继发感染、促进愈合为原则;全身治疗则以对因治疗、减少复发、促进愈合为原则。口腔与外界直接相通,局部用药十分方便,有利于药物发挥,由于主要通过局部接触和吸收发挥作用,进入体液并分布全身的剂量较小,对全身影响小,因此,良好的口腔局部用药更有利于 RAU 的临床治疗,也更加合理<sup>[6]</sup>。国内目前多采用生长因子、中药制剂、生物制剂、人工合成药物、免疫调节剂、微量元素补充药物等药物对 RAU 进行治疗,但由于 RAU 病因复杂、药物价格,以及患者依从性等原因,其疗效和推广应用都受到了很大的限制<sup>[7]</sup>。本课题组拟采用 Ala-Gln 为主要药物成分,配合新型给药系统(如温度敏感型生物粘附性凝胶等),从促进溃疡愈合和增强黏膜局部免疫力等方面治疗 RAU,在此之前需要对 Ala-Gln 对颊黏膜细胞的生长和分化功能予以研究,为今后的进一步研究提供一定的实验依据。本课题组研制的“丙氨酰谷氨酰胺生物粘附性制剂”已于 2015 年 6 月 17 日获得国家发明专利授权(专利号 ZL 2013 1 0375582.7)。

RAU 的病损部位主要以颊黏膜为主,多侵犯黏膜上皮和固有层。颊黏膜上皮细胞主要为复层扁平上皮细胞,胞质含糖源,可与 Gln 一同促进细胞快速生长和产生产物,同时减少代谢抑制物的生成<sup>[8]</sup>。固有层的基本细胞成分为成纤维细胞,有合成和更新纤维及基质的功能;另外,Gln 是快速增殖细胞的主要能量来源,因此本实验选用颊黏膜复层扁平上皮细胞作为实验用细胞。

Gln 是人体内水平最丰富的非必需氨基酸,是合成氨基酸、蛋白质、核酸和许多其他生物分子的前体物质,在肝、肾、小肠和骨骼肌代谢中起重要的调节作用,是机体内各器官之间转

运氨基酸和氮的主要载体。由于 Gln 在水溶液中溶解度低且不稳定,在长期储存或加热灭菌的条件下会生成有毒的焦谷氨酸和氨,无法将其制备为灭菌制剂以供临床使用<sup>[9]</sup>。因此,目前临床使用化学稳定性好、水溶性强、能耐受高温消毒等优点的 Ala-Gln 为 Gln 的供体,当 Ala-Gln 进入机体后被组织摄取、分解为丙氨酸(Ala)和 Gln,从而为机体提供稳定的 Gln。因此,本研究选取 Ala-Gln 和 Gln 两种溶液,同时设立空白对照组;根据 Ala-Gln 药物使用说明提供的推荐浓度折算 Ala-Gln 溶液的推荐浓度为 33 mg/mL,根据相对分子质量折算对应的 Gln 浓度为 22 mg/mL,并以此为基准浓度按照 8、4、2、1、1/2、1/4 和 1/8 进行梯度配比。

细胞增殖是生物生长、发育、繁殖的基础,目前常用 MTT 法检测细胞的增殖效应,但不能较好地反应细胞活性情况;而流式细胞仪是对细胞进行自动分析和分选的装置,可以快速测量、存贮、显示悬浮在液体中的分散细胞的一系列重要的生物物理、生物化学方面的特征参量,并可以根据预选的参量范围把指定的细胞亚群从中分选出来,经过设定,可以计数活细胞和测细胞活力<sup>[10]</sup>,因此本研究采用流式细胞仪测定细胞生长情况。总蛋白水平的变化可反映细胞功能的活跃程度,细胞增殖与蛋白合成呈正相关,活细胞数量增加,其总蛋白水平也相应增多<sup>[11]</sup>,因此本研究将蛋白总水平也纳入实验指标。ALP 是参与组织形成、代谢和再生的一种重要物质,可作为评价细胞分化和成熟的一种指标,目前已发现 ALP1、ALP2、ALP3、ALP4、ALP5 与 ALP6 6 种同工酶,而其中 ALP5 来自上皮<sup>[12]</sup>,因此,本研究选取 ALP 作为评价该上皮细胞分化情况的指标。

本研究中,A8、A4、G8 和 G4 组,在 12 h 内,细胞数目和 ALP 水平均高于对照组( $P < 0.05$ ),但 48 h 后细胞数目和 ALP 水平几乎较 12 h 时无变化( $P > 0.05$ ),可能由于氨的生成较多,Gln 的利用受到抑制,Gln 在生成谷氨酸后经过脱氢途

径的流量减少,更多地向转氨途径偏移。究其原因,可能与脱氢途径相比,细胞通过转氨途径产生的氨较少,对细胞生长产生的抑制作用也较小,也就是说,转氨途径具有解“氨毒”的作用,从能量代谢的角度来看,转氨途径是低效率的产能途径,因为 1 mol Gln 经脱氢途径代谢,生成 2 mol 氨,最多可生成 27 个 ATP;而转氨途径生成 2 mol 氨,最多可生成 9 个 ATP,这与高氨浓度抑制细胞生长、细胞需要调整能量代谢的速率与生物合成的速率相协调的观点相符;而在细胞培养过程中,氨对细胞的生长有明显的抑制作用,遵循二级抑制模型,其模型常数  $K_a$  为  $4.46(\text{mmol/L})^{2[13]}$ 。本研究中,A2 和 G2 组在 60 h,以及 A1 和 G1 组在 72 h 出现细胞生长和分化减缓,可能与 Gln 分解造成的氨浓度增高有关。A1/2、A1/4、G1/2 和 G1/4 组在 72 h 内一直保持较好的生长,在 48 h 内对细胞的生长和 ALP 水平较之对照组的差异有统计学意义( $P < 0.05$ );48 h 后,G1/2 和 G1/4 组的细胞生长和 ALP 水平相对于 A1/2 和 A1/4 组稍偏低,但其差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),推测其原因为 Gln 在水溶液中不稳定,可能与 Gln 有效成分降低和 Gln 分解造成氨浓度增高有一定关联,也应予以综合考虑。A1/2 和 G1/2 组,从一开始就生长缓慢,ALP 水平偏低,与其他浓度组的差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),在 60 h 后,均停止生长并开始逐渐下降;而 A1/4 和 G1/4 组较之 A1/2 和 G1/2 组的细胞的生长较好,ALP 水平也较高,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明了 Ala-Gln 和 Gln 对细胞生长和分化的影响存在浓度依耐性。

关于细胞总蛋白水平方面,无论是 Ala-Gln 还是 Gln 组,在 1/8~1/2 浓度区间内,其蛋白水平呈浓度依赖性。1/2 浓度组总蛋白水平也高于 1 浓度组,其差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而 2~8 倍浓度组水平明显降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),可能为 Gln 代谢和分解产生了高浓度的氨,对细胞的生长有明显的抑制作用。

Gln 系自绿叶蔬菜中分离提取得到的两种人体非必需氨基酸之一,是人体内水平最丰富的非必需氨基酸,约占总游离氨基酸的 50%,是合成氨基酸、蛋白质、核酸和许多其他生物分子的前体物质,是机体内各器官之间转运氨基酸和氨的主要载体,也是免疫细胞及成纤维细胞等快速增殖细胞的主要能量来源。近年来,多项动物实验和临床研究均证实,Gln 除了具有增加葡萄糖胺、氨基己糖、黏蛋白的生物合成和促进溃疡组织再生等生物活性外,还具有增加淋巴细胞总数、有效调节免疫应答、改善机体代谢状况、提高机体抗氧化能力等药理作用,因而成为研究的热点<sup>[14]</sup>。但是,Gln 在水溶液中溶解度低且不稳定,在长期储存或加热灭菌的条件下会生成有毒的焦谷氨酸和氨,无法将其制备为灭菌制剂以供临床使用。

目前临床使用化学稳定性好、水溶性强、能耐受高温消毒等优点的 Ala-Gln 为 Gln 的供体,当 Ala-Gln 进入机体后被组织摄取、分解为丙氨酸(Ala)和 Gln,从而为机体提供稳定的 Gln。Ala-Gln 被线粒体基质内产生的最主要的前体蛋白加工酶-基质加工肽酶(MPP)迅速水解为丙氨酰和 Gln<sup>[15]</sup>,也有报道将其前体加工酶称为“谷氨酰双肽酶”<sup>[16]</sup>;Gln 通过谷氨酰酶(GA)分解成谷氨酸(Glu)和氨,该酶位于线粒体内膜,是细胞利用 Gln 进行谷氨酰酶醇解的起始酶和关键酶。谷氨酰酶首先是脱氨降解为谷氨酸和氨,此反应是不可逆反应。谷氨酸可在谷氨酸脱氨酶的催化下脱去两个氨基形成  $\alpha$ -酮戊二酸,也

可经天门冬氨酸氨基转移酶或丙氨酸氨基转移酶转化为  $\alpha$ -酮戊二酸,同时生成天门冬氨酸或丙氨酸,然后进入三羧酸循环。对 Gln 代谢的影响应综合考虑氨对谷氨酰酶的消耗、丙氨酸的积累,以及氨的生成等几个方面。

## 参考文献

- [1] Babae N, Baradaran M, Mohamadi H, et al. Therapeutic effects of zataria multiflora essential oil on recurrent oral aphthous lesion[J]. Dent Res J (Isfahan), 2015, 12(5): 456-460.
- [2] 刘寿荣, 黄文豹. 谷氨酰酶对急性肝功能不全大鼠的防治作用[J]. 中国现代应用药学杂志, 2015, 22(6): 508-510.
- [3] Jakopin Z. Murabutide revisited; a review of its pleiotropic biological effects [J]. Curr Med Chem, 2013, 20(16): 2068-2079.
- [4] 章静波. 组织和细胞培养技术[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 66.
- [5] 陈文, 李森恺, 史宏道, 等. 人体口腔粘膜上皮细胞体外培养和鉴定[J]. 现代口腔医学杂志, 2005, 19(5): 489-491.
- [6] Tarakji B, Gazal G, Al-Maweri SA, et al. Guideline for the diagnosis and treatment of recurrent aphthous stomatitis for dental practitioners[J]. J Int Oral Health, 2015, 7(5): 74-80.
- [7] 张伏琴, 江春霞, 王智巍, 等. 复发性口腔溃疡的临床治疗进展[J]. 中国药房, 2015, 26(35): 5030-5032.
- [8] Kalaev VN, Artiukhov VG, Nechaeva MS. Micronucleus test of human oral buccal epithelium; problems, progress and prospects[J]. Tsitol Genet, 2014, 48(6): 62-80.
- [9] Stehle P, Kuhn KS. Glutamine: An obligatory parenteral nutrition substrate in critical care therapy[J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 545467.
- [10] 薛雅蓉, 庄重, 刘智慧. 设计利用现代科学仪器紧跟科学前沿的细胞生物学实验[J]. 实验技术与管理, 2013, 30(6): 163-166.
- [11] Ivanov KP. Modern medical problems of energy exchange in humans[J]. Vestn Ross Akad Med Nauk, 2013, 6(4): 56-59.
- [12] Bishop N. Clinical management of hypophosphatasia[J]. Clin Cases Miner Bone Metab, 2015, 12(2): 170-173.
- [13] 黄剑峰, 王佳鸣, 崔磊. 氨对人表皮角质细胞生长和代谢的影响[J]. 中国医药生物技术, 2007, 2(2): 123-129.
- [14] Pradelli L, Povero M, Muscaritoli M, et al. Updated cost-effectiveness analysis of supplemental glutamine for parenteral nutrition of intensive-care patients[J]. Eur J Clin Nutr, 2015, 69(5): 546-551.
- [15] 于健春. 谷氨酰酶制剂的研究进展[J]. 腹部外科, 2000, 13(4): 203-205.
- [16] 杨俊涛. 谷氨酰酶生物合成的研究进展[J]. 国外医学临床生物化学与检验学分册, 1996, 17(6): 253-256.