DOI:10.16016/j.1000-5404.201504028

论著

非禁食对浸水-束缚应激大鼠胃黏膜损伤的保护作用

桂红珍[1],杨 浪[2],盛剑秋[2],乔宝军[2] (400038 重庆,第三军医大学研究生管理大队[1];100700 北京,北京军区总医院消化内科[2])

[摘要] **目的** 探讨非禁食和禁食对大鼠应激性胃溃疡胃黏膜损伤及MMP-9、TIMP-2表达的影响。**方法** 非禁食应激组不予禁食,禁食应激组于应激前24 h禁食。用浸水-束缚应激(water-immersion and restraint stress,WIRS)建立大鼠应激性溃疡模型。应激3 h后,观察非禁食应激组和禁食应激组大鼠胃黏膜病变,对溃疡指数(UI)进行评分;组织学观察胃出血;用Western blot检测胃黏膜MMP-9、TIMP-2的蛋白表达。**结果** WIRS应激3 h能成功诱导大鼠应激性胃溃疡。非禁食应激组与禁食应激组比较,应激性胃溃疡大鼠的UI后者高于前者($P<0.01$),黏膜层炎性细胞浸润数后者高于前者($P<0.01$),WIRS大鼠胃黏膜MMP-9蛋白表达后者显著高于前者($P<0.01$),而TIMP-2蛋白表达后者略低于前者($P>0.05$)。**结论** 非禁食应激可显著减少MMP-9表达。非禁食处理减轻浸水-束缚应激大鼠胃黏膜损伤。

[关键词] 应激;胃溃疡;基质金属蛋白酶;禁食;非禁食
[中图法分类号] R-332;R459.3;R573.1 [文献标志码] A

Influence of non-fasting and fasting treatments on water-immersion and restraint stress-induced gastric mucosal injury in rats

Gui Hongzhen[1], Yang Lang[2], Sheng Jianqiu[2], Qiao Baojun[2] ([1]Postgraduate Team, Third Military Medical University, Chongqing, 400038; [2]Department of Gastroenterology, General Hospital of Beijing Military Command, Beijing, 100700, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigative the influence of non-fasting and fasting treatments on water-immersion and restraint stress (WIRS)-induced gastric mucosal injury and on the expression of MMP-9 and TIMP-2 in rats. **Methods** The non-fasting group was not fasting, and the fasting group was fasting at 24 h before WIRS. Stress-induced ulcer model was established by WIRS. The gastric mucosa was examined and the ulcer index (UI) was evaluated after 3-hour WIRS. Mucosal injury was observed with histological method. In addition, the protein expressions of MMP-9 and TIMP-2 were measured by Western blotting. **Results** The rat ulcer model was established by 3-hour WIRS. The UI, inflammatory cells and MMP-9 protein expression in the mucosa were higher in the fasting group than in the non-fasting group ($P<0.01$), while the TIMP-2 protein expression was slightly lower in the fasting group ($P>0.05$). **Conclusion** Non-fasting treatment can alleviate WIRS-induced gastric mucosal injury through significantly down-regulating the expression of MMP-9 in the rats.

[**Key words**] stress; gastric ulcer; MMPs; fasting; non-fasting

Supported by the Key Project of "Twelfth Five-year Plan" of Logistic Scientific Research of PLA(BWS11J058). Corresponding author: Sheng Jianqiu, Tel: 86-10-84008023, E-mail: jianqiu@263.net

应激(stress)是机体对生理和心理因素破坏内环境稳定时产生的反应,严重的应激可导致胃肠道黏膜的损伤,产生胃肠道黏膜的糜烂、溃疡甚至穿孔,即应激性溃疡[1]。临床上发现,重症监护病房(ICU)中的危重症患者在发病后24 h内即可发生应激相关性胃黏膜损害[2]。应激性胃溃疡(SUB)出血的预防效果可以直接影响原发病的预后,因此预防SUB的发生非常重要。然而,应激性溃疡出血的预防和治疗还存在许

[基金项目] 全军后勤科研"十二五"计划重点项目(BWS11J058)
[通信作者] 盛剑秋,电话:(010)84008023,E-mail:jianqiu@263.net
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150910.1106.015.html(2015-09-10)

多争议,因此如何预防应激性溃疡的发生已成为临床工作中急需解决的问题,也是临床研究的热点[3]。考虑药物的副作用等因素影响,能否提供一种除药物外预防应激性溃疡的有效途径?对于这些有明确应激因素存在的危重患者,有学者考虑早期应用肠内营养预防应激性溃疡可能有效[4]。但这些危重患者早期进食也存在不少问题,如存在胃排空不良,早期进食可能加速胃内 G^- 杆菌的繁殖,也可能刺激胃泌素的分泌而降低胃内 pH 值。因此对于这部分患者予以早期胃肠营养预防应激性溃疡目前还存在争议[5-6]。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是一组含锌离子的、参与降解细胞外基质的重要蛋白酶。其活性受转录、分泌、酶原激活及金属蛋白酶抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)调节[7]。已有研究显示 MMP-9 和 TIMP-2 参与多种原因引起的胃溃疡形成[8]。国内外研究发现:基质金属蛋白酶 MMPs 能选择性降解胃组织细胞外基质 ECM 的成分,MMPs 的活性受金属蛋白酶 TIMPs 的调节,因此检测 MMPs 的活性能反映胃溃疡发生及溃疡的严重程度[7,9]。为了探讨早期肠内营养对预防应激性溃疡的作用,试图从分子水平分析非禁食处理能减少应激性溃疡的发生,本研究探讨非禁食和禁食对大鼠应激性胃溃疡胃黏膜损伤及 MMP-9、TIMP-2 表达的影响,为临床预防应激性溃疡提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、试剂

SD 雄性大鼠 30 只(6 周龄,180 ~ 220 g,SPF 级,维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号 34760)。MMP-9 及 TIMP2 一抗(Millipore 公司),GAPDH 一抗(康成生物,KC-5A08),其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 采用随机数字表法将大鼠分为 3 组,每组 10 只:①对照组(非禁食、不应激);②禁食应激组(禁食 24 h + 应激 3 h);③非禁食应激组(非禁食 + 应激 3 h)。常规 WIRS 诱导大鼠应激性溃疡模型。

1.2.2 造模 浸水-束缚应激(water-immersion and restraint stress, WIRS)诱导大鼠应激性胃溃疡模型:SD 雄性大鼠在恒温、光照周期 12 h∶12 h 环境中饲养 1 周后用于模型建立;饿胃应激组于造模前禁食 24 h,禁水 2 h;饱胃应激组不禁食、禁水;用乙醚麻醉大鼠后,将其四肢束缚于鼠板上,待大鼠清醒后,将其垂直浸于 23 ℃ 的恒温水槽中,液面保持在大鼠胸骨剑突水平持续 3 h。

1.2.3 标本采集 结扎幽门和贲门,摘取全胃,沿胃大弯剪开,用预冷的生理盐水洗去胃内容物,用滤纸吸干多余的水分,平展于玻璃板上,检测记录溃疡情况。之后迅速用载玻片均匀用力刮取部分胃黏膜,将样品于液氮中速冻,然后置于 -80 ℃ 冰箱中保存待测。另取胃组织 0.5 cm × 1.0 cm,迅速置于 10% 福尔马林固定 24 h。

1.2.4 溃疡指数(UI)测定 浸水应激 3 h,乙醚麻醉后颈椎脱臼法处死动物,沿胃大弯剪开胃腔,用预冷的生理盐水冲洗后将胃展平,进行 UI 评估[10]:点状出血为 1 分,线状出血长度 < 1 mm 为 2 分,1 ~ 2 mm 为 3 分,2 ~ 4 mm 为 4 分,> 4 mm 为 5 分,宽度 > 1 mm 时分值 ×2。每只动物的累计总分即为该动物的溃疡指数。溃疡抑制率(%) = (模型组溃疡指数均值 - 实验组溃疡指数均值/模型组溃疡指数均值) × 100%。

1.2.5 组织学观察 评估 UI 之后切取部分胃组织,常规组织病理制片及拍摄相片(E-20P 5.0 百万像素),并以 Adobe Photoshop version 6.0 图像处理、组织学观察。在 400 倍显微镜下,分别记录黏膜层 5 个不同视野内炎细胞浸润数量,取平均数作为该标本的炎症细胞浸润数量[4]。

1.2.6 Western blot 检测 取 0.1 g 组织标本裂解并抽提总蛋白、测定蛋白浓度,取 50 μg 总蛋白样品经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,100 V 转膜 2 h,5% TBS-T 脱脂奶粉封闭 2 h,加一抗 4 ℃ 孵育过夜,再加入辣根过氧化物酶标记的二抗(1∶2 000 稀释),室温孵育 2 h,曝光显影成像通过凝胶分析系统,将目的蛋白条带与相应内参蛋白(GAPDH)条带光密度比值用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析。实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两均数比较采用独立样本 t 检验,多组间分析采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)进行组间比较。

2 结果

2.1 大鼠 UI 测定结果

大鼠经束缚-浸水应激 3 h,建立了 SD 大鼠应激性胃溃疡模型。禁食应激组大鼠的整个胃组织上皮表面可见大量的出血点及溃疡产生(图 1)。严重程度以溃疡指数(UI)表达,非禁食应激组的 UI 均显著低于禁食应激组($P < 0.01$,表 1)。

表 1 各组大鼠溃疡指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	溃疡指数(UI)	黏膜炎症细胞数
对照组	0	9.2 ± 3.1
禁食应激组	68.4 ± 7.2	37.9 ± 6.3
非禁食应激组	26.1 ± 4.5	26.8 ± 5.3
P 值	< 0.01	< 0.01

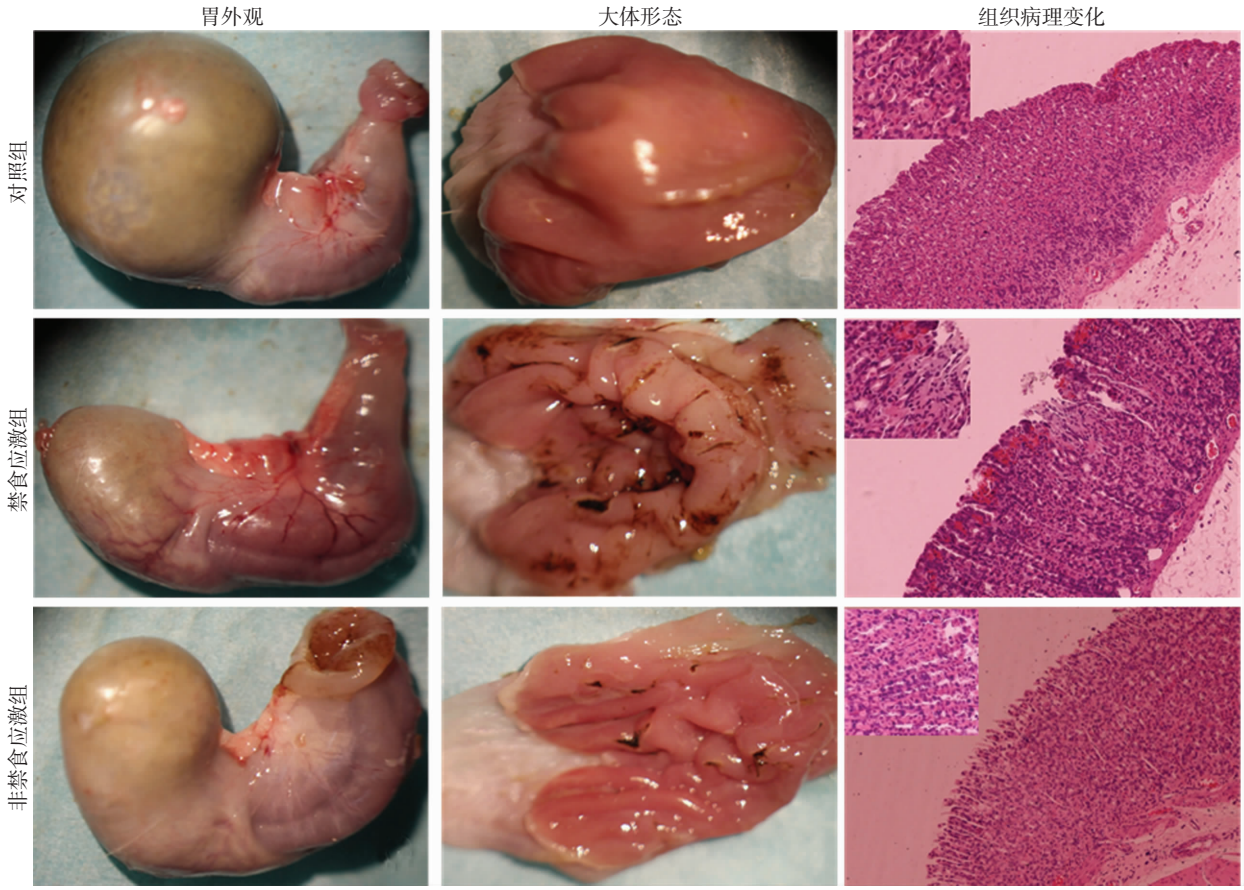
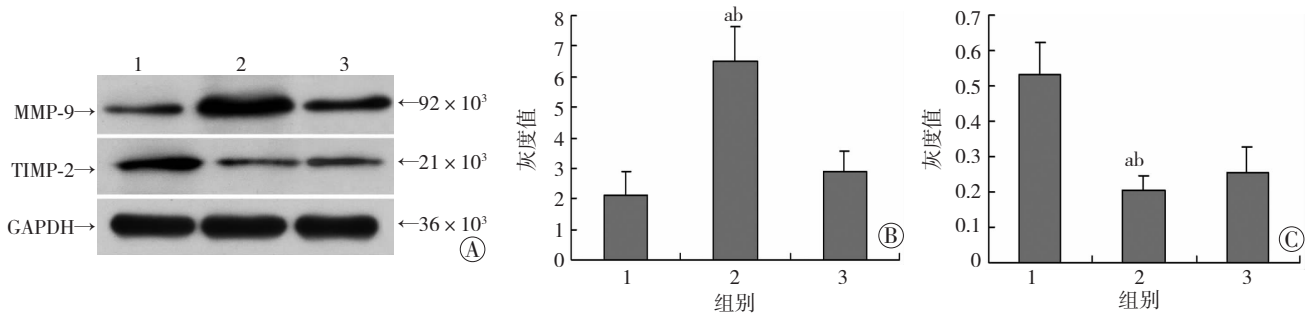


图 1　禁食和非禁食 WIRS 大鼠胃外观、大体形态和组织病理变化　（×200）



1：空白对照组；2：禁食＋应激组；3：非禁食＋应激组；A：Western blot 检测结果；B、C：半定量分析结果　a：$P<0.01$，与空白对照组比较；b：$P<0.01$，与非禁食应激组比较

图 2　Western blot 检测非禁食与禁食 WIRS 大鼠胃粘膜 MMP-9 及 TIMP-2 蛋白表达

2.2　组织学观察结果

禁食应激组显示断裂的黏膜上皮层，破坏的腺细胞和不连续的胃小凹，而非禁食应激组胃黏膜的损害明显减轻。黏膜下层炎症细胞浸润数，非禁食应激组显著低于禁食应激组（$P<0.01$，表 1，图 1）。

2.3　WIRS 大鼠胃黏膜 MMP-9 及 TIMP-2 蛋白表达

大鼠胃黏膜 MMP-9 的蛋白表达，禁食应激组明显高于对照组（$P<0.01$）；非禁食应激组显著低于禁食应激组（$P<0.01$），但是略高于对照组（$P>0.05$）。而大鼠胃黏膜 TIMP-2 蛋白表达，禁食应激组和非禁食应激组均明显低于对照组（$P<0.01$）；非禁食应激组略高于禁食应激组（$P>0.05$，图 2）。

3　讨论

危重症患者，如脑出血、大手术、休克、严重创伤、重度全身性感染、烧伤等，以及处于高度紧张状态的高强度军事训练导致的心理和过劳应激，均可能诱发应激性溃疡、出血甚至穿孔；一旦这种并发症发生，导致原发病加重，死亡率可高达到 50%[2]。如何预防应激性溃疡的发生已成为临床工作中急需解决的问题。目前除了临床有少量讨论非禁食而给予早期肠内营养来

预防应激性溃疡的文献,与其相关的基础实验研究比较少。本研究观察了禁食和非禁食对浸水-束缚应激(WIRS)大鼠胃黏膜损伤的影响,结果显示非禁食组大鼠胃黏膜损伤明显低于禁食组大鼠,提示非禁食处理对浸水-束缚应激大鼠胃黏膜损伤具有保护作用。有学者发现,外科患者实施营养支持,从胃肠内途径给予较肠外途径效果好,而且肠内营养开始越早越好[11]。对于危重患者有明确的应激因素存在时,建议早期应用胃肠内营养以预防应激性溃疡[4]。胃肠内营养不仅能提供足够的热量和氮源,还能促进胃肠蠕动,增加胃肠道黏膜血流量,提供黏膜代谢所需要的氧及营养物质等减轻应激因素的作用,从而减少应激性溃疡的发生[5-6]。也有学者认为,对于危重症患者,例如存在机械通气和凝血功能障碍的ICU患者,给予早期胃肠内营养,可能导致吸入性肺炎、梭状芽孢杆菌感染等并发症,而那些不需要机械通气的患者经过早期肠内营养可能减少应激性溃疡的发生[12]。由于危重症患者尤其是机械通气的患者,存在胃排空延迟、pH值下降、容易引起反流甚至呛咳等不良影响,临床医师必须权衡利弊,加强研究胃肠内营养的成分、给予量及给入途径等方面的观察研究。

本研究观察了禁食和非禁食对浸水-束缚应激大鼠胃黏膜MMP-9、TIMP-2表达的影响。结果显示,大鼠胃黏膜MMP-9的蛋白表达,非禁食应激组与对照组比较无明显差异,但显著低于禁食应激组,提示非禁食情况下,胃内食物对黏膜具有保护作用。而大鼠胃黏膜TIMP-2蛋白表达,非禁食应激组及禁食应激组均明显低于对照组;而非禁食应激组略高于禁食应激组,差异无统计学意义。提示非禁食及禁食对浸水-束缚应激大鼠胃黏膜TIMP-2的表达无明显影响,其原因还不清楚,TIMP-2如何影响MMP-9尚有待进一步研究。在基质金属蛋白酶家族中,MMP-9是上皮再生的关键因素之一[13]。乙醇诱导的大鼠急性胃溃疡模型中,随TNF-α、IL-6的增加,MMP-9的表达呈现上升的趋势[14];导致胃溃疡的严重程度与乙醇用量及MMP-9活性呈正比;MMP-9活性降低又与TIMP表达增加有关[15]。在应激性溃疡研究发现中,WIRS大鼠胃黏膜MMP-9、MMP-2在转录和翻译水平的表达上调,支持MMP-9参与应激性溃疡的发生[16]。

总之,非禁食可通过减少浸水-束缚应激大鼠胃黏膜MMP-9表达,减少黏膜溃疡指数(UI)及黏膜层炎症因子的表达,减轻浸水-束缚应激大鼠胃黏膜损伤。本研究为临床使用早期胃肠内营养预防应激性溃疡提供了理论依据。

参考文献:

[1] Ali T, Harty R F. Stress-induced ulcer bleeding in critically ill patients[J]. Gastroenterol Clin North Am, 2009, 38(2): 245-265.

[2] Choung R S, Talley N J. Epidemiology clinical presentation of stress-related peptic damage and chronic peptic ulcer[J]. Curr Mol Med, 2008, 8(4): 253-257.

[3] Koczka C P, Geraldino-Pardilla L B, Goodman A J. Physicians' opinions of stress ulcer prophylaxis: survey results form a large urben medical center[J]. Dig Dis Sci, 2013, 58(3): 777-781.

[4] Ganguly K, Swarnakar S. Induction of matrix metalloproteinase-9 and -3 in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced acute gastric ulcers in mice: regulation by melatonin[J]. J Pineal Res, 2009, 47(1): 43-55.

[5] Stratton R J, Ek A C, Engfer M, *et al*. Enteral nutritional support in prevention and treatment of pressure ulcers: a systematic review and meta-analysis[J]. Ageing Res Rev, 2005, 4(3): 422-450.

[6] 吴建胜, 吴金明, 林春景, 等. 早期肠内营养预防应激性溃疡的临床研究[J]. 中国实用内科杂志, 2007, 27(8): 611-612.

[7] English J L, Kassiri Z, Koskivirta I, *et al*. Individual Timp deficiencies differentially impact pro-MMP-2 activation[J]. J Biol Chem, 2006, 281(15): 10337-10346.

[8] Cheng H C, Yang H B, Chang W L, *et al*. Expressions of MMPs and TIMP-1 in gastric ulcers may differentiate H. pylori-infected from NSAID-related ulcers[J]. ScientificWorldJournal, 2012, 2012: 539316.

[9] Lempinen M, Inkinen K, Wolff H, *et al*. Matrix metalloproteinases 2 and 9 in indomethacin-induced rat gastric ulcer[J]. Eur Surg Res, 2000, 32(3): 169-176.

[10] Konturek P C, Konturek S J, Brzozowski T, *et al*. Gastroprotective activity of melatonin and its precursor, L-tryptophan, against stress-induced and ischaemia-induced lesions is mediated by scavenge of oxygen radicals[J]. Scand J Gastroenterol, 1997, 32(5): 433-438.

[11] 秦环龙, 吴肇汉. 肠内营养在外科临床中的应用[J]. 肠外与肠内营养, 2000, 7(2): 119-121.

[12] Chanpura T, Yende S. Weighing risks and benefits of stress ulcer prophylaxis in critically ill patients[J]. Crit Care, 2012, 16(5): 322.

[13] 林金锋, 聂时南. 应激性溃疡预防性治疗的研究进展[J]. 中国急救医学, 2014, 34(5): 468-472.

[14] Staines K, Young J R, Butter C. Expression of chicken DEC205 reflects the unique structure and function of the avian immune system[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e51799.

[15] Yang M S, Lee H S, Kim M H, *et al*. Rhinitis patients with sputum eosinophilia show decreased lung function in the absence of airway hyperresponsiveness[J]. Allergy Asthma Immunol Res, 2013, 5(4): 232-238.

[16] 桂红珍, 杨浪, 金鹏, 等. 褪黑素减轻浸水-束缚应激大鼠胃黏膜损伤[J]. 基础医学与临床, 2015, 35(3): 318-322.

(**收稿**:2015-04-07;**修回**:2015-05-25)

(编辑 王 红)