维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)04－0513－03

丹参注射液对腹腔感染状态下胃粘膜 $Na^+-K^+-ATPase$ 活性和电位差的影响

张　茂[1]，张　超[2]，杨宗诚[2]

(1.重庆医科大学儿科学院中医科，重庆　400014；2.第三军医大学西南医院普外科，重庆　400038)

【摘　要】目的：探讨丹参注射液对严重腹腔感染状态下大鼠胃粘膜 $Na^+-K^+-ATPase$ 活性变化和电位差的影响。方法：利用大鼠盲肠结扎穿孔造成腹腔严重感染动物模型，应用生化法检测穿孔前和穿孔后 3h、6h、12h、24h、48h 各时相大鼠胃粘膜 $Na^+-K^+-ATPase$ 活性。应用电生理记录仪检测穿孔前和穿孔后 3h、6h、12h、24h、48h GTPD 变化。结果：盲肠穿孔后 3h $Na^+-K^+-ATPase$ 活性显著降低($P<0.05$)，12h 降至最低($P<0.01$)，仅为对照组的 48.5%，48h 仍未恢复正常；丹参组 12h、24h Na^+-K^+-ATP 酶活性比感染组显著升高($P<0.05$)。GTPD 穿孔后 3h 即有下降，6h 下降显著($P<0.05$)，12h 下降至最低($P<0.01$)，24h 和 48h 仍然显著低于对照组($P<0.05$，$P<0.05$)；丹参组 12h、24h 比感染组明显升高($P<0.05$)。结论：严重腹腔感染状态下胃粘膜 $Na^+-K^+-ATPase$ 活性降低可能是引起胃粘膜屏障功能受损的原因之一。早期应用丹参对有效地预防应激性溃疡的发生有重要的临床意义。

【关键词】腹腔感染；$Na^+-K^+-ATPase$；电位差；丹参

【中国图书分类法分类号】R282.71；R322.44；R632.50　　【文献标识码】A　　【收稿日期】2002－12－04

Effect of Dan Sen on gastric mucosal $Na^+-K^+-ATPase$ activity and gastric transmucosal potential difference in rats during severe intraperitoneal infection

ZHANG Mao, et al

(*Department of Chinese Medicine, College of Pediatrics, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect of Dan Sen on gastric mucosal $Na^+-K^+-ATPase$ activity and gastric transmucosal potential difference in rats during severe intraperitoneal infection. *Methods*: The intraperitoneally infected rat model was established by cecal ligation and puncture(CLP). Assay of $Na^+-K^+-ATPase$ activity in gastric mucosal tissue was conducted by biochemistry method. The electric－physiological recorder meter was used to measure gastric mucosal potential difference. *Results*: The activity of $Na^+-K^+-ATPase$ markedly decreased in infected group at 3h after perforation, compared with the control group ($P<0.05$). There was a minimum of $Na^+-K^+-ATPase$ activity at 12h post－perforation in infected group ($P<0.01$), only about 48.5% of the control group. At 12h and 24h post－perforation, $Na^+-K^+-ATPase$ activity of Dan Sen group was significantly raised much more than that of infection group ($P<0.05$, $P<0.05$). Gastric transmucosal potential difference (GTPD) of infected group decreased significantly compared with the control group ($P<0.05$) at 6h after perforation, and rapidly dropped to the lowest at 12h post－perforation ($P<0.01$). At 12h and 24h after perforation, GTPD was lower in infected group than that not only in the control group ($P<0.05$, $P<0.05$), but also in Dan Sen group ($P<0.05$). *Conclusion*: The decrease of $Na^+-K^+-ATPase$ activity might play an important role in gastric mucosal barrier damage following severe abdominal infection induced by CLP. And the application of Dan Sen in earlier period could prevent the occurrence of stress ulcer.

【Key words】Intraperitoneal infection; $Na^+-K^+-ATPase$; GTPD; Dan Sen

近年来，复方丹参注射液治疗应激性胃溃疡已有报道，但其机制仍不清楚，本文利用大鼠盲肠结扎穿孔动物模型，探讨了严重腹腔感染时大鼠胃粘膜 $Na^+-K^+-ATPase$ 活性和丹参的关系，旨在探讨复方丹参注射液治疗应激性胃溃疡的机制，为防治应激性胃粘膜损害提供客观的实验依据。

作者介绍：张　茂(1962－　)，女，讲师，
主要研究方向：儿科疾病的中、西医结合治疗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

1.1.1 动物模型:选用健康 wistar 雄性大白鼠 180 只(第三军医大学动物中心),体重 220±30g,标准饲料,室温下单笼喂养 1 周。1%戊巴比妥钠腹腔内注入,剂量为 30mg/kg,麻醉后腹部电推剃毛,碘伏常规消毒,中下腹正中切口入腹,长约 2～3cm,游离并提出盲肠,注意保护肠系膜血管,找到盲肠与回结肠交界处,用 4 号丝线环行结扎盲肠,保持回结肠通畅。在盲肠中部用 9 号针头贯穿后放回腹腔,关腹。术后皮下注射生理盐水,以补充术中丧失的体液,剂量为 50ml/kg。

1.1.2 药品:复方丹参注射液(上海第九制药厂生产)。

1.1.3 随机将动物分为 3 组(每组 60 只,每个时相点 10 只动物):(1)感染组按模型制作。(2)丹参组按模型制作后,在尾静脉内注射丹参,剂量为 0.2ml/100g,给药时间为穿孔前 30min。(3)对照组:动物除不行盲肠结扎穿孔外,其余处理与感染组相同。分别于穿孔前、穿孔后 3h、6h、12h、24h、48h 进行观察。

1.2 观察指标

1.2.1 胃粘膜 $Na^+-K^+-ATPase$ 活性测定:按 Mozsik 等[1]的方法稍加修改。

酶制备:取全胃沿大弯侧剪开,用冷冻冲洗液(内含 NaCl 130mmol/L,EDTA-Na_2 5mmol/L,眯唑 30mmol/L,调整 pH 至 7.5)冲洗粘膜后,刮取胃粘膜,称重、剪碎,加 9 倍体积的冷冻匀浆液(冲洗液+2.4mmol/L 去氧胆酸钠)作匀浆,匀浆液 4℃ 离心(3000g)15min,取上清液再次 4℃ 高速离心(20000g)20min,弃上清,沉淀物用冷冻匀浆液洗涤两次,-20℃ 冰箱保存。

酶活力测定:反应总体积 450μl,pH 7.4。分设 A、B 两管,A 管含 100mmol/L NaCl,20mmol/L KCl,10mmol/L 咪唑,5.6mmol/L $MgCl_2$,2mmol/L ATP-Na_2;B 管加 1mmol/L 哇巴因,不加 KCl,增加 NaCl 至 120mmol/L,其余同 A 管。分别向 A、B 两管中加入酶制备样品 100μl,立即置于 37℃ 恒温水浴 15min,再向各管加入 15% 三氯醋酸 100μl,终止反应;4℃ 离心(3000g)15min,取上清 0.4ml 加入定磷试剂,45℃ 温育 15min,660nm 波长下测 OD 值。根据 A、B 两管 OD 值之差计算 $Na^+-K^+-ATPase$ 活力。在紫外分光光度计上用 280nm 和 260nm 波长测定样品中蛋白质含量。酶活力单位:nmol Pi/min/mg protein。

1.2.2 电位差(GTPD)的测定:完成胃粘膜血流量(GMBF)测定后将两只自制的 $AgCl_2$ 电极连接于 PHS-10A 数字式酸度-离子计上,测定电极轻轻接触胃粘膜,参比电极置于腹部切口皮下,稳定后记录电位值,单位为 mV,以绝对值表示。

1.3 统计学分析

所有计量资料均用 $\bar{x}\pm s$ 表示,用 spss 10.0 统计软件包进行 t 检验及方差分析。

2 结 果

胃粘膜 Na^+-K^+-ATP 酶活性在穿孔后 3h 即发现显著下降($P<0.05$),12h 降至最低,仅为对照组的 48.5%,48h 仍未恢复正常。注射丹参组从 12h 开始 Na^+-K^+-ATP 酶活性与感染组显示出差别($P<0.05$)(表 1)。

胃粘膜电位差穿孔后 3h 即有下降,6h 显著下降($P<0.05$),12h 下降至最低($P<0.01$)。24h 和 48h 仍然显著低于对照组($P<0.05$,$P<0.05$)。丹参组从 12h 开始胃粘膜电位差与感染组显示出差别($P<0.05$)(表 2)。

表 1 胃粘膜 Na^+-K^+-ATP 酶活性变化(nmol pi/min/mg 蛋白,$\bar{x}\pm s$)

组别	n	穿孔前	穿孔后时相(h)				
			3	6	12	24	48
感染组	60	152.94±13.85	113.29±12.51*	106.83±12.37*	92.32±9.85**	95.53±11.34**	127.68±12.72
丹参组	60	153.72±13.28	115.78±13.25*	109.56±13.12*	132.95±7.19▲	138.45±11.98▲	140.35±10.19
对照组	60	154.21±13.56	152.82±11.63	151.58±13.25	152.78±1236	155.31±13.12	153.24±12.45

与对照组相比:*$P<0.05$;**$P<0.01$;

丹参组与感染组相比:▲$P<0.05$;▲$P<0.01$

表 2 胃粘膜电位差变化(mV,$\bar{x}\pm s$)

组别	n	穿孔前	穿孔后时相(h)				
			3	6	12	24	48
感染组	60	22.82±1.43	20.05±1.62	15.24±1.43*	11.56±1.38**	16.95±1.45*	18.86±1.52
丹参组	60	21.95±1.56	22.72±1.54	16.56±1.58*	20.45±1.42▲	21.12±1.29▲	21.68±1.49
对照组	60	22.84±1.51	23.67±1.65	23.13±1.62	23.48±1.53	22.64±1.62	22.35±1.47

与对照组相比:*$P<0.05$;**$P<0.01$;

丹参组与感染组相比:▲$P<0.05$;▲$P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com

3 讨 论

GTPD 的形成是由于粘膜对 H^+、Na^+、K^+、Cl^- 等离子流的转运而造成的离子梯度所致，其大小取决于各种离子流在粘膜两侧的梯度差及粘膜组织结构所具有的电阻抗。正常情况下，胃腔内的 H^+ 浓度比粘膜内高 300～400 万倍，当胃粘膜屏障功能受损时，H^+ 顺着巨大的离子梯度大量回渗到粘膜内，Na^+ 则从粘膜内流到胃腔，造成离子梯度发生变化，导致 GTPD 降低。胃粘膜对 H^+、Na^+、K^+、Cl^- 等离子的跨膜转运是一个主动的耗能过程，需要 ATP 提供能量，这一过程主要依赖于胃粘膜细胞膜上的 $Na^+ - K^+ -$ ATPase 来完成[2]。$Na^+ - K^+ -$ ATPase 是位于细胞膜上的一种糖蛋白，不对称地镶嵌在细胞膜上，较易受到损伤因子的攻击，使其活性下降。已证实在胃粘膜细胞中存在 $Na^+ - K^+ -$ ATPase－ADP 系统和 ATP—腺苷酸环化酶—cAMP 系统，并发现这两个系统间的相互作用有下列特点：①ATP 转变为 ADP 的增多可引起 ATP 转变为 cAMP 的显著减少；②应用阿托品和肾上腺素可抑制 ATP 转变为 ADP；③外源性给予 cAMP 可抑制胃酸的分泌；④cAMP 本身是一种 $Na^+ - K^+ -$ ATPase 的抑制剂。从而确认这两个系统间存在着负反馈的调节机制。有许多致病因素可以破坏胃粘膜 $Na^+ - K^+ -$ ATPase－ADP 系统和 ATP—腺苷酸环化酶—cAMP 系统间的平衡。ATP 沿一条途径的分解增加对另一途径的分解有间接抑制作用，而两条途径同时或其中一条分解的异常增强或减弱，均可使得粘膜的保护能力降低。

已有实验表明：丹参注射液可以增加胃粘膜血流量(GMBF)[3]，实验观察到，注射丹参组从 12h 开始 $Na^+ - K^+ -$ ATP 酶活性与感染组显示出差别($P<0.05$)，推测丹参在应激状态下，可能参加了能量代谢。

能量代谢障碍是胃粘膜损伤过程中的一个重要因素。某些应激性溃疡的发生是胃粘膜特异性能量不足的结果。而 $Na^+ - K^+ -$ ATPase－ADP 系统和 ATP—腺苷酸环化酶—cAMP 系统的作用是能量代谢障碍的中心环节。它不仅是维持粘膜细胞正常功能和膜通透性的关键，而且是致病因素损伤胃粘膜的作用点，并与 PG 等的细胞保护作用机制有关[4]。

本实验结果表明：严重腹腔感染状态下 GMBF 下降是引起胃粘膜屏障功能损害的基本因素，随着 GMBF 的下降，一方面胃粘膜清除过量 H^+ 的能力降低，更重要的是胃粘膜细胞内能量产生不足，ATP 生成减少，细胞膜上的 $Na^+ - K^+ -$ ATPase 活性降低，不能维持粘膜两侧的离子梯度，胃粘膜电位差下降，胃粘膜屏障功能受损。而在创伤早期应用丹参，可以有效地预防应激性溃疡的发生，其远期疗效有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] Mozsi G, Vizi F. Examination of stomach wall $Mg^{2+} - Na^+ - K^+ -$ dependent ATPase, ATP, and ADP in pylorus－ligated rats[J]. Am J Dig Dis. 1976;21(8):649－654.

[2] Saita H, Murakami M. Effect of teprenone on gastric mucosal injury induced by Helicobacter pylori in rats [J]. Arzneimittelforschung, 2000;50(12):1110－1114.

[3] 赵世民. 医学自由基的基础与临床[M]. 山东大学出版社, 1993;114－115.

[4] Kaunitz JD, Akiba Y. Integrated duodenal protective response to acid[J]. Life Sci, 2001;69(25－26):3073－3081.