DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.11.046
第24卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 11
1350 2002年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)11-1350-03

严重腹腔感染时胃粘膜细胞胞液糖皮质激素受体变化对胃粘膜屏障功能的影响

张 超[1],牟海刚[1],孙念绪[1],杨宗诚[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]普通外科;[2]全军烧伤研究所,重庆 400038)

提 要:目的 了解严重腹腔感染时胃粘膜细胞胞液中糖皮质激素受体变化对胃粘膜屏障功能的影响。方法 将120只雄性Wistar大鼠,随机分成实验组(n=60)和对照组(n=60),实验组利用大鼠盲肠结扎穿孔造成严重腹腔感染动物模型,分别采用电生理法和放射免疫分析法测定了穿孔前、穿孔后3、6、12、24、48 h胃粘膜电位差变化和胃粘膜组织皮质醇含量变化,应用放射配体分析法对各时相胃粘膜细胞胞液糖皮质激素受体进行了测定。结果 盲肠穿孔后3 h胃粘膜组织皮质醇含量明显升高,12 h达高峰,而胃粘膜细胞胞浆内糖皮质激素受体的最大结合容量显著下降,平衡解离常数(KD值)明显增大,胃粘膜电位穿孔后显著下降。结论 糖皮质激素受体水平降低是严重腹腔感染后急性胃粘膜屏障功能受损的重要原因之一。

关键词:腹腔感染;胃粘膜屏障;糖皮质激素受体;胃粘膜电位差
中图法分类号:R322.44;R392.11;R632.5 文献标识码:A

Effect of changes of glucocorticoid receptor in cytoplasm of gastric mucosal cells on gastric mucosal barrier following severe intraperitoneal infection

ZHANG Chao, MU Hai-gang, SUN Nian-xu, YANG Zong-cheng (Department of General Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of glucocorticoid receptor(GCR) in cytoplasm of gastric mucosal cells on gastric mucosal barrier following severe intraperitoneal infection. Methods A total of 120 male Wistar rats weighing between 190 g and 250 g were randomly divided into 2 groups of 60 rats each (infected group and control group). Intraperitoneal infection rat model was established by cecal ligation and puncture(CLP). Then the dynamic changes of glucocorticoid receptor in cytoplasm of gastric mucosal cells and gastric mucosal potential difference(PD) were determined in rats suffering from severe intraperitoneal infection at pre-perforation, 3, 6, 12, 24 and 48 h after CLP. Results After severe abdominal infection, the cortisol level in gastric mucosa increased significantly but the number and affinity of GCR in cytoplasm of gastric mucosal cells and gastric mucosal potential difference decreased markedly. Conclusion GCR plays an important role in the acute gastric mucosal damage after severe intraperitoneal infection. The reduction of GCR level may result in dysfunction of gastric mucosal barrier.

Key words: intraperitoneal infection; gastric mucosal barrier; glucocorticoid receptor; gastric mucosal potential difference

应激性胃粘膜损伤是严重烧伤、创伤、感染、休克等的常见并发症,其临床发生率可高达10%~15%左右[1],发生机制至今尚未阐明,既往对应激性胃粘膜损害的研究主要集中在胃酸分泌及胃肠激素变化等方面,临床观察发现长期服用糖皮质激素易致消化性溃疡的发生,但对糖皮质激素及其受体变化在严重腹腔感染所致急性胃粘膜损害中的作用尚未见报道。本实验采用大鼠盲肠结扎穿孔造成腹腔感染动物模型,观察了穿孔后不同时期胃粘膜细胞胞液糖皮质激素受体(Glucocorticoid receptor, GCR)和胃粘膜电位差(Potential difference, PD)的动态变化,从细胞受体水平探讨应激性胃粘膜损伤的发病机制,为临床防治提供依据。

基金项目:全军"十五"医学科学研究重点课题(01Z069)
作者简介:张 超(1956-),男,重庆市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事胃肠外科方面的研究,发表论文23篇。电话:(023)68754160
收稿日期:2002-07-05;修回日期:2002-09-20

1 材料和方法

1.1 动物模型及分组

选用健康Wistar雄性大鼠120只,体重(220±30)g,标准饲料,单笼喂养1周。1%戊巴比妥钠腹腔内注入,剂量为30 mg/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2~3 cm,提出并游离盲肠,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50 ml/kg。

随机将动物分为两组:(1)感染组(60)按上述方法制作。(2)对照组(60):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3、6、12、24、48 h进行观察。每个时相点10只动物。

1.2 观察指标和方法

1.2.1 胃粘膜电位差测定 ①银-氯化银(Ag-AgCl)电极的制备:取直径为0.5 mm银丝,在火焰上慢慢来回加热至暗红,再用500号、800号金相砂纸和金刚砂粉依次打磨后,用酒精棉

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

球擦净。以银丝为阳极, 铂片为阴极, 在高纯 0.1 mol/L HCl 溶液中, 于 1~2 mA/cm^2 的阳极电流密度下氯化 4 h, 直到银丝表面覆盖上一层棕色 AgCl 镀层, 然后将其装入已处理好的小玻璃管内, 管内充入等渗盐水, 石蜡封口, 银丝上端焊接导线, 将制好的两只 Ag-AgCl 电极放在等渗盐水, 暗处过夜, 使其电位稳定, 待用。②胃粘膜 PD 测定: 将两只 Ag-AgCl 电极连接在 PHS-10A 数字式酸度-离子计上, 实验时将胃充分暴露, 在胃前壁上剪开 0.5 cm 长切口, 暴露胃粘膜, 将测定电极轻轻接触胃粘膜, 参比电极接触腹部切口皮下, 在仪器上读出电位值, 即为 PD 值, 单位为 mV。

1.2.2　胃粘膜皮质醇含量测定　　称取胃粘膜 200 mg, 用等渗盐水制成 10%匀浆液, 离心(4℃、3 000 r/min、10 min), 取上清液待测。皮质醇含量测定用放射免疫分析法(药盒由北京北方免疫试剂研究所提供)。

1.2.3　胃粘膜细胞胞液糖皮质激素受体(GCR)测定　　迅速刮取胃粘膜, 称重, 加 3~4 倍容积的匀浆缓冲液(蔗糖 0.2 mol/L, Tris 10 mmol/L, EDTA 1.5 mmol/L, pH 7.4, 使用前加巯基乙醇 20 mmol/L, 抑酞酶 1 000 U/g 胃粘膜组织)制备匀浆液, 以上操作在 0~4℃下进行。取 3 ml 匀浆液冷冻超速离心(4℃, 75 000× g, 45 min)。取上清液 0.4 ml 加入^{3}H-Dex 最终浓度为 32 nmol/L, 非特异结合管再加 1 000 倍非标记 Dex, 0~4℃放置 22 h, 使结合达到平衡, 葡聚糖活性碳分离后取上清液闪计数。求出受体的最大容量(R_0)和平衡解离常数(KD)。

1.3　统计学处理

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 统计软件对数据进行分析处理, 两组间比较采用 t 检验。

2　结果

2.1　胃粘膜电位差变化

感染组在穿孔后 3 h 胃粘膜电位差即有所下降, 6 h 显著下降($P<0.05$), 12 h 降至最低($P<0.01$), 24 h 和 48 h 仍显著高于对照组($P<0.01$, $P<0.05$), 见表 1。

2.2　胃粘膜组织皮质醇含量变化

穿孔后 3 h 胃粘膜组织皮质醇含量已明显升高, 峰值在 12 h, 48 h 才下降至接近对照组水平, 见表 2。

2.3　胃粘膜细胞胞液 GCR 的最大结合容量(R_0)变化

感染后 3 h 即见胃粘膜细胞胞液的 GCR 的 R 显著下降, 12 h 下降最明显, 24 h 仍显著低于对照组, 48 h 逐渐恢复到接近对照组水平, 见表 3。

2.4　胃粘膜细胞胞液 GCR 平衡解离常数 KD 值变化

穿孔后 3 h 胃粘膜细胞胞液 GCR 的 KD 值已增大, 12 h 达最大值, 24 h 仍显著高于对照组, 48 h 恢复到接近对照组水平, 见表 4。

表 1　胃粘膜电位差变化(mV, $\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Changes of gastric mucosal potential difference (mV, $\bar{x}\pm s$)

Group	Pre-perforation	Time after perforation (h)				
		3	6	12	24	48
Infection	0.78±2.43	8.26±1.92	15.72±1.65 *	11.25±1.53 **	13.17±0.85 **	16.48±1.75
Control	21.34±2.18	20.68±2.54	20.28±2.24	20.78±2.52	21.26±2.45	21.55±2.71

*: $P<0.05$　**: $P<0.01$ *vs* Control

表 2　腹腔感染后胃粘膜组织皮质醇含量变化(ng/mg $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Changes of cortisol contents in gastric mucosa tissue(ng/ma, $\bar{x}\pm s$)

Group	Pre-perforation	Time points after perforation (h)				
		3	6	12	24	48
Infection	7.24±1.09	9.13±1.55	11.25±1.75 *	14.26±2.23 **	12.96±1.91 **	9.32±1.64
Control	7.42±1.13	7.46±1.35 *	7.38±1.24	7.50±1.42	7.42±1.35	7.32±1.26

*: $P<0.05$　**: $P<0.01$ *vs* Control

表 3　腹腔感染后胃粘膜细胞胞液 GCR 结合容量变化(fmol/mg, $\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Alteration of the binding capacity of GCR in cytoplasm of gastric mucosal cells(fmol/mg, $\bar{x}\pm s$)

Group	Pre-perforation	Time after perforation (h)				
		3	6	12	24	48
Infection	212.59±30.64	167.89±29.86 *	138.75±27.45 **	129.25±25.64 **	165.73±31.24 *	189.44±29.36
Control	214.02±31.54	209.63±33.74 *	210.81±34.45	207.98±32.79	212.92±32.55	215.58±35.46

*: $P<0.05$　**: $P<0.01$ *vs* Control

表 4　胃粘膜细胞胞液 GCR 的 KD 值变化(10^{-9} mol/L, $\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Changes of KD value of GCR in cytoplasm of mucosol cells (10^{-9} mol/L, $\bar{x}\pm s$)

Group	Pre-perforation	Time after perforation (h)				
		3	6	12	24	48
Infection	4.65±1.41	5.01±1.54	7.85±1.83 *	9.96±1.92 **	7.76±1.68 *	7.44±1.62 *
Control	4.67±1.42	4.92±1.53	4.92±1.51	4.86±1.45	4.89±1.48	4.87±1.43

*: $P<0.05$　**: $P<0.01$ *vs* Control

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

3 讨论

糖皮质激素(GC)作为一种全身作用的重要应激激素,在创伤、感染,休克等应激状态时,血中浓度迅速升高,对机体具有一定的保护作用,近年的研究肯定了糖皮质激素能够降低毛细血管通透性,抑制炎性细胞渗出及白细胞趋化物质释放,从而表现出明显的抗炎作用[2]。此外,糖皮质激素还能稳定溶酶体膜,抑制LPO形成,有利于保护胃粘膜。但是,这些作用都是由糖皮质激素受体(GCR)介导的,GC与靶细胞内GCR结合,诱导细胞合成磷脂酶A2(PLA2)抑制蛋白(Lipocorlin),抑制PLA2活性,减少白三烯和血小板活化因子等多种细胞因子和炎症介质的形成[3]。因此,GCR的变化将严重影响GC的生物学效应,GCR减少,可导致GC功能不全[4]。已有资料表明机体在一定的条件下可对某些激素呈现抵抗现象,例如某些创伤和糖尿病患者血中胰岛素水平并不低,但仍出现高血糖[5]。本实验发现严重腹腔感染后胃粘膜组织中皮质醇含量明显升高,而胃粘膜细胞胞浆内GCR的最大结合容量(R0)则显著下降,数量明显减少;同时,胃粘膜细胞浆内GCR的平衡解离常数KD值明显增高,提示严重腹腔感染后不仅GCR的数量减少,而且GC与GCR结合的亲合力也明显下降,使GC与GCR的结合进一步减少,其生物学效应难以发挥。上述结果表明严重腹腔感染早期即有GC抵抗现象。

胃粘膜PD是由于粘膜对H^+、Na^+、K^+、Cl^-等离子的转运所致,其大小取决于各种离子流在粘膜两侧的梯度差,以及粘膜组织结构所具有的电阻抗,它的变化能较好地反映胃粘膜屏障的受损情况,是目前用来检测胃粘膜屏障功能变化最敏感的指标之一[6]。本实验发现严重腹腔感染后6 h胃粘膜PD即已明显下降,12 h和24 h降至最低,48 h仍未恢复正常。提示严重腹腔感染后胃粘膜细胞已经发生不同程度的损害,胃粘膜屏障功能受到严重破坏,H^+顺着巨大的离子梯度从胃腔内快速弥散入粘膜内,在局部发挥作用,引起胃酸和胃蛋白酶的分泌进一步增加,加重胃粘膜损伤。就目前所知,创伤和感染后的脏器损害与应激状态下的过度炎症反应密切相关,在这些炎症反应中,血管内皮细胞、巨噬细胞和中性粒细胞及其释放的细胞因子和炎症介质起着重要的作用,它们在体内构成一个复杂的反馈系统,其作用互相叠加、互相联系,引起脏器损害[7]。GC通过GCR的介导抑制这些反应,减少应激状态下的脏器损害。我们的实验结果表明:严重腹腔感染后早期即有胃粘膜屏障损害的发生和GC抵抗现象的存在,其本质可能是胃粘膜细胞内GCR减少所致。

严重腹腔感染后胃粘膜细胞内GCR减少的原因尚未阐明,有学者认为激素受体的变化受血中激素的向下调节[8],另有学者认为GCR的减少是由于GCR蛋白的降解加快所致[9]。因此,深入研究应激状态下胃粘膜细胞内GC与GCR的变化及其相互关系,对阐明严重腹腔感染后应激性胃粘膜损害的发生机制有重要意义。

参考文献:

[1] Bagchi D, Carryl O R, Tran M X, *et al*. Acute and chronic stress-induced oxidative gastrointestinal mucosal injury in rats and protection by bismuth subsalicylate[J]. Mol Cell Biochem, 1999, 196(1—2): 109—116.

[2] Harada N, Okajima K, Murakami K, *et al*. Gastric prostacyclin(PGI2) prevents stress-induced gastric mucosal injury in rats primarily by inhibiting leukocyte activation[J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 1999, 57(5—6): 291—303.

[3] Bosscher K D, Berghe W V, Haegeman G. Mechanisms of anti-inflammatory action and of immuno-suppression by glucocorticoids: negative interference of activated glucocorticoid receptor with transcription factor[J]. J Neuroimmunol, 2000, 109(1): 16—22.

[4] Jusko W J. Pharmacokinetics and receptor-mediated pharmaco-dynamics of corticosteroids[J]. Toxicology, 1995, 102(1—2): 189—196.

[5] Steinberg H O, Paradisi G, Hook G, *et al*. Free fatty acid impairs insulin-mediated vasodilation and nitric oxide production[J]. Diabetes, 2000, 49(7): 1 231—1 238.

[6] Carmelo S, Cinzia C M, Antonia G, *et al*. A new technique for continuous measurement and recording of gastric potential difference in the rat: Evaluation of NSAID-induced gastric mucosal damage[J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 1995, 34(2): 63—72.

[7] Fiorucci S, Antonelli E, Santucci L, *et al*. Gastrointestinal safety of nitric oxide-derived aspirin is related to inhibition[J]. Gastroenterology, 1999, 116(5): 1 089—1 106.

[8] Guthrie B, Kenneth P M, Christopher J K, *et al*. Glucocorticoid receptor binding in twin pairs is affected by shared environment but not by shared genes[J]. J Stero Biochem Mol Biol, 2002, 80(4—5): 395—400.

[9] Dragoslava Z, Stojko V, Gordana M, *et al*. Hyperthermic stress affects the thermal modulation of glucocorticoid-receptor affinity [J]. J Thermal Biol, 2001, 26(6): 575—584.

(编辑 张 宁)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net