DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.01.020

胶原溶液预防大鼠急性胃粘膜损伤的作用*

王 旭** 李根凤 杨宗城 (第三军医大学附属西南医院烧伤研究所) 重庆,400038

提 要 目的: 通过束缚冷冻大鼠模型,观察急性胃粘膜病变过程及胶原溶液的预防效果。方法: 采用胃粘膜电位差测定、血流量测定、损伤指数的判定及胃液 H^+ 浓度测定和胃粘膜亚硝酸根含量测定等,进行综合分析评价。结果: 试验组大鼠胃粘膜电位差,血流量及 NO浓度显著下降, H^+ 浓度及胃粘膜损伤指数明显上升。预防组大鼠上述各项检查测指标均有不同程度的改善与缓解($P<0.01$或 0.05)。结论: 血液灌流不足导致的缺血缺氧是冷束缚应激引起胃粘膜损伤的一个重要因素。胶原溶液能够保护胃粘膜屏障的完整性,缓冲胃酸,促进血小板凝聚,减轻各种因素对胃粘膜的直接损伤。

关键词 应激性胃粘膜损伤;胶原;预防
中图法分类号 R573

急性胃粘膜病变(Acute gastric mucosal lesions, AGML)是重危病人常见的并发症之一,由它所致的上消化道出血,死亡率较高。本实验旨在应用动物模型观察胶原溶液预防 AGML的作用,并探讨其作用机制,为临床应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物模型及分组

健康雄性 Wistar大鼠,体重 160±20 g,共 30只,随机分为 3组: 正常组、实验组、预防组各 10只。大鼠禁食 48 h,不禁水,将实验组大鼠束缚于固定架,置 4℃冰箱 4 h,造成应激性胃粘膜损伤模型[1]; 预防组在冷束缚前 30 min一次性喂胶原溶液 3 ml,作胃粘膜保护剂,其它处理相同; 正常组禁食 48 h,不禁水,不做束缚冷冻。除正常组外,各组动物均在致伤 4 h后麻醉下获取标本及各项检测数据。

1.2 观察指标

1.2.1 胃粘膜电位差测定 将胃沿大弯侧剪开,暴露胃粘膜, Ag/AgCl测定电极轻触于上,参比电极接触腹部切口皮下,在 810型 pH计上读出稳定电位值,单位用 mV表示。

1.2.2 胃粘膜血流量测定 天津南开大学研制的 LDF-3型微循环多普勒血流仪,待数值调零稳定后用激光探头轻触胃粘膜,记录读数,该读数代表了单位时间内通过被测组织微区的血细胞量。每个部位测 3次,以平均值表示。

1.2.3 胃粘膜损伤指数的判定 等渗盐水冲洗胃粘膜后,根据胃粘膜脱落、溃疡和出血范围,按 Guth标准[2]判定和计算胃粘膜损伤指数。

1.2.4 胃液 H^+ 离子浓度测定 胃液经离心沉淀,取上清液 0.5 ml,用已标定 0.2 N/L NaOH溶液,在微量滴定装置上滴定到 pH7.0根据NaOH的消耗量计算出胃液 H^+ 浓度(mmol/L)。

1.2.5 胃粘膜亚硝酸根(NO_2^-)含量测定[3] 收集全胃粘膜,匀浆后取上清液分别加入 0.1%雷佛奴尔 200 μl, 12 N HCl 400 μl,双蒸水到总体积 2 ml,利用 NO代谢产物 NO_2^- 与 2-乙氨-6, 9-二氧基吖啶在盐酸作用下反应生成樱桃红色原理,在紫外分光光度计 520 nm波长上比色,以每 0.1 g组织中含 NO_2^- 量间接代表 NO浓度。

2 结果

2.1 胃粘膜电位差

正常大鼠胃粘膜电位差为 22.10±5.27,实验组冷束缚后电位差明显下降,为 11.46±5.25,两组相比相差非常显著($P<0.01$)。预防组为 16.98±4.84,与实验组相比相差亦显著($P<0.05$)。

2.2 胃粘膜血流量变化

实验组束缚冷冻后胃粘膜血流量大幅度下降,为 23.65±10.65,明显低于正常组大鼠 57.20±11.75($P<0.01$)。预防组提前给药予以保护后,虽经束缚冷冻,但胃粘膜血流量仍能保持在较高水平 37.49±5.87,与实验组相比差异显著($P<0.01$)。

2.3 胃粘膜损伤指数

正常大鼠胃粘膜完整,淡红色、质地柔软、皱折均匀,肉眼未见明显胃粘膜损伤迹象。试验组大鼠胃粘膜水肿糜烂,有大量铁锈色血凝块附着,溃疡呈多发性、弥漫性黑色点线状,不易计数,常发生于胃体部,胃粘膜损伤指数 18.40±8.35 在冷束缚前喂胶原溶胶给予预防的大鼠,胃粘膜水肿明显减轻,溃疡呈少量单个存在,发生率下降,可见到白色胶原凝块,胃粘膜损伤指数显著下降到 7.9±2.13($P<0.01$)。

2.4 胃液 H^+ 浓度

正常组为 118.0±41.2 mmol/L;实验组 186.9±74.7 mmol/L,胶原预防组 96.4±57.2 mmol/L,后两组相比相差非

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39290700-03
** 王旭,女, 42岁,主管技师

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

常显著($P < 0.01$)。

2.5 胃粘膜 NO_2^- 浓度

正常大鼠胃粘膜 NO_2^- 浓度为 1.15± 0.46,实验组下降非常明显为 0.69± 0.15($P < 0.01$),预防组应用胶原给予保护后, NO_2^- 量接近正常值,为 1.04± 0.44,与实验组相比相差非常显著($P < 0.01$)。

3 讨论

正常情况下胃粘膜屏障可分为两部分,粘液一碳酸氢盐屏障,构成粘膜前保护机制的第一道防线;粘膜上皮细胞顶部的脂蛋白层和细胞间的紧密连接构成第二道防线"解剖屏障"。任何原因造成上述两道防线的功能降低,都将导致胃粘膜组织的损伤[4]。我们用自制的 Ag-AgCl 电极观察了各组大鼠胃粘膜电位差。电位差是粘膜对 H^+、Na^+、K^+、Cl^- 等离子的运转所致,电位差值取决于各种离子流在粘膜两侧的梯度差及其粘膜组织结构所具有的电阻抗,因此它的变化可代表和反映胃粘膜屏障的损伤程度。本研究发现大鼠在 4℃ 环境放置 4 h后,胃粘膜电位差明显降低,仅及正常大鼠的一半。而胃液中 H^+ 浓度迅速上升,提示伤后胃粘膜电阻抗发生改变,离子通透性增加,缓冲中和 H^+ 的能力下降,致使 H^+ 沿梯度浓度弥散入胃粘膜内,大量堆积,造成胃粘膜组织的严重损伤。NO 在生理状态下可以扩张血管,与其它舒缩血管因子共同调节器官的局部血流,维持血管正常张力。在病理状态下或者 NO 减少,或增高不足以对抗大量产生的缩血管物质,均导致胃部血管收缩、阻力增加。同时由于应激反应引起交感神经兴奋,肾上腺髓质分泌儿茶酚胺增加,机体为了保证心脑等重要器官的血流供应,重新进行灌流分布,胃肠道血供明显减少,我们发现束缚冷冻后,实验组大鼠胃粘膜 NO_2^- 浓度和血流量迅速下降,粘膜损伤指数明显上升,色泽从淡红色转而苍白,提示粘膜下血管收缩、血液灌流不足导致的缺血缺氧是束缚冷冻应激引起胃粘膜损伤的一个重要因素。

预防组大鼠提前 30 min喂胶原口服液给予保护后,同样置 4℃ 环境冷冻 4 h,各项检测指标较实验组均有明显改善,胃粘膜电位差显著下降,胃粘膜损伤程度得到缓解,胃粘膜血流量及胃液 H^+ 浓度均有明显改善。胶原本身有促进表皮细胞、粘膜细胞及肠粘膜上皮细胞贴壁、增殖的作用早已为人们所认识。实验结果提示胶原溶液进入鼠胃后,可在胃粘膜上形成保持层,维持粘膜屏障的完整性,它特有的弱酸性,能够减轻部分胃酸及胃蛋白酶对胃体的自身消化。由于胃粘膜糖原储备较少,能量代谢对缺血十分敏感,在粘膜供血不足的情况下,胶原中所含的糖蛋白可以增加胃粘膜粘液及粘膜细胞 DNA含量[5]。参与对胃粘膜的保护作用。此外,胶原蛋白能够激活某些凝血因子,促进血小板凝聚。胶原溶液中添加的利多卡因还可对抗儿茶酚胺引起的缩血管反应,改善胃壁血液循环,提高胃粘膜的抗损伤能力[6,7]。

参考文献

1 Lally K P. Evaluation of varions nutritional supplements in the prevention of strees-induced gastric ulcers in the rat. Surg Gynecol bostet, 1984; 158(2): 124

2 Guth P H. Topical aspirin plus HCL gastric lesion in the rat. Gastroenterology, 1979; 76(1): 88

3 罗向东,杨宗城,黎鳌等.简便、灵敏的一氧化氮间接测定法.中华创伤杂志, 1994; 10(4): 185

4 Hawkey C J. Separation of the impairment of haemostsis by aspirin from mucosal injury in the human stomach. Clin Sci Colch, 1991; 81(4): 565

5 潘跃良,王韦,陈玉林.胶原预防和治疗无水酒精引起的胃粘膜损伤与人工合成 PGE的比较.上海医学, 1993; 16(11): 228

6 王塞枫,谢德芳,顾军等.胶原溶液预防皮质类固醇激素诱发消化道出血的疗效.第二军医大学学报, 1994; 15(3): 282

7 王　韦,胡云风,李兆申等.胶原对胃粘膜保护作用的研究.中华消化杂志, 1995; 15(2): 114

(收稿: 1997-08-26;修回: 1997-12-17)

(编辑　汪勤俭)

Preventive effects of collagen solution on acute injury of the gastric mucous membrane in rats

Wang Xu, Li Genfeng, Yang Zongcheng (Research Institute of Burns, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038)

Abstract Objective: To investigate the preventive effects of collagen solution on acute injury of the gastric mucous membrane. Methods: After the bound and frozen model was established in rats, the blood flow,

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

H+ concentration, damage index and NO concentration in the gastric mucous membrane were determined. **Results:** In the experimental group, the potential differences, blood flow and NO concentration in the gastric mucous membrane were significantly decreased while the H+ concentration and damage index in it significantly increased. Administration of collagen solution to the rats in the experimental group beforehand resulted in the restoration of the above indices ($P < 0.01$ or 0.05). **Conclusion:** The ischemia and hypoxia caused by insufficient blood perfusion is one of the important factors in the pathogenesis of injury of the gastric mucous membrane induced with bound and frozen irritation. Administration of collagen solution to the rats can prevent the direct injury of various factors to the gastric mucous membrane through maintaining the intactness of the gastric mucous membrane, buffering gastric acid, improving coacervation of the platelets and increasing the cellular DNA content.

Key words irritable injury of the gastric mucous membrane; collagen; prevention; rat

(上接39页)

本研究发展新的抗介质基因治疗策略通过应用急性相蛋白启动子(血清淀粉样蛋白 A)SAA3启动子对治疗基因(白介素-10)表达进行调控,调控 IL-10在局部组织表达,使其表达有可控制性,呈自适应表达。IL-10作为目的基因可广泛地下调单核/巨噬细胞系统活化及广泛控制多种炎性介质产生,而又不致过度表达抑制免疫功能及防御能力,使炎症反应控制在适度水平。观察 hIL10基因转染对 LPS休克模型的保护作用。探索供细胞因子基因治疗中目的基因受机体病理信号调控的方法——炎症诱导性启动子指导的目的基因表达的可能性及利用基因治疗方法探索对失控性炎症信号级联途径的中断及阻滞作用。

主要的实验结果及结论如下:

(1)血清淀粉样蛋白 SAA3增强子/启动子表达体系其体外、内的诱导表达活性分析。脂质体包裹的 pSAA3CAT转染的肝细胞株 SMMC7721与单核细胞 U937有低水平报告基因 CAT的表达,rIL-6+ rIL-1联合活化肝细胞株 SMMC7721可迅速诱导报告基因表达,6 h开始启动,24 h达峰值,72 h时已下降;LPS可启动转染单核细胞 U937细胞报告基因的表达;rIL-6+ rIL-1可剂量依赖性增加转染肝细胞 SMMC7721及单核细胞 U937细胞的 CAT表达。

腹腔注射脂质体包裹 pSAA3CAT体内基因转染,内毒素攻击可诱导报告基因主要在肝脏表达,LPS攻击转染鼠肝脏 CAT 12 h即可检出,24 h达峰值,120 h仍可检出;肝 CAT表达水平与 LPS剂量有剂量一效应关系。

(2) IL-10诱导性表达载体构建及体内、外表达分析。利用 SAA3启动子5′区(-306 bp+47 bp)片段连接 hIL10基因构建真核表达载体,pSAA3-hIL10成功表达于腹腔巨噬细胞及肝/kupffer细胞,hIL10特异性引物 RT-PCR分析、Western blot分析证实该表达载体成功转移并转录出完整的 mRNA分子并翻译出 hIL10分子。

RT-PCR分析证实转染 pSAA3 hIL10的腹腔巨噬细胞,hIL10表达有炎症诱导性。单剂量 LPS诱导 hIL10表达持续时间为120 h,LPS活化后 12 h即有 hIL10蛋白表达,峰值在 24~48 h,96 h hIL10已显著下降;同时可观察到 LPS活化转基因 MΦ细胞 TNF-α产生显著减少(37.6%),显著下调 IL-6的产生(42.8%);在肝/kupffer细胞混合培养系统,IL-10转基因下调混合培养系统 TNF-α产生(57.7%),显著抑制 IL-6的产生(36.8%);减轻 LPS活化后肝细胞的损伤,降低 AST、ALT、LDH的升高,$P < 0.05$

在小鼠内毒素血症模型,腹腔注射 pSAA3 hIL10转基因,RT-PCR分析证明脂质体包裹 DNA复合物可有效地体内转基因,LPS可诱导转录出完整的 hIL10 mRNA分子并有效地翻译出 hIL10蛋白。LPS显著诱导外源 hIL10在小鼠肝脏表达(mRNA),一次剂量的 LPS攻击后5 d内小鼠肝脏均有 hIL10表达;烫伤可显著延长 hIL10的表达(10 d内可检出);基因转染处理小鼠在 LPS攻击后小鼠血清 TNF-α下降44.75%~53.66%,血清 IL-6下降38.02%~38.1%,$P < 0.05$

(3) IL-10基因转染对烫伤小鼠肝脏局部炎性分子表达的抑制作用。原位杂交显示 hIL10基因转染预处理显著减少烫伤小鼠肝脏 TNF-α表达,减少肝脏 iNOS的表达,抑制肝脏粘附分子 ICAM-1 mRNA表达。IL-10基因转染预处理烫伤组形态学观察显示肝细胞水肿,肝细胞局灶性坏死减轻;电镜观察肝细胞、Kupffer细胞、内皮细胞超微结构病变减轻。基因转染处理抑制小鼠肝脏局部炎症介质分子的表达对肝细胞损伤,肝组织形态学的改变有一定的意义。

(4) IL-10基因转染提高内毒素血症小鼠的存活率。0.5~1.0 μg重组人 IL-10可显著减少 LPS(350 μg/mouse)攻击小鼠的死亡率;hIL10基因转染显著提高 LPS攻击小鼠的存活率,基因转染预处理组内毒素血症小鼠的存活率为42.6%,而对照组的存活率为26.8%(72 h),$P < 0.05$

关键词 白细胞介素-10;SAA3启动子;报告基因;基因治疗;巨噬细胞;Kupffer细胞;内毒素;烫伤;RT-PCR;TNF-α;IL-6;iNOS;ICAM-1

中图法分类号 R644

(收稿:1998-01-05;修回:1998-02-07)

(编辑 王 红)

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