

败血症大鼠胃壁细胞形态和泌酸功能的变化研究

舒荣文¹, 彭国林², 朱人敏¹

(1. 南京军区南京总医院, 江苏南京 210002; 2. 解放军第 184 医院消化科, 江西鹰潭 335000)

[摘要] 目的 研究败血症大鼠胃壁细胞形态和泌酸功能的变化, 探讨胃酸在败血症胃黏膜损伤中的作用。方法 制作大鼠败血症模型, 测定胃液 pH 值、胃溃疡指数 UI, 用激光共聚焦扫描显微镜观察壁细胞形态。结果 败血症 24 h、48 h 组胃液 pH 值较对照组显著降低, 大鼠胃 UI 显著高于对照组, 败血症大鼠分泌期壁细胞数显著高于对照组。败血症大鼠胃液 pH 值与胃 UI 无明显相关, 胃液 pH 值与分泌期壁细胞数呈负相关。结论 败血症可引起胃黏膜损伤、出血, 从细胞学水平证明了败血症后胃酸分泌增多, 但胃黏膜损伤严重程度与胃液 pH 不相关, 胃酸只是败血症引起应激性溃疡的病因之一。

[关键词] 败血症; 大鼠; 应激; 胃酸; 胃壁细胞; H^+/K^+ -ATP 酶; 免疫荧光

中图分类号: R631.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-271X(2009)06-0515-03

The changes of gastric parietal cellular configuration in rats under sepsis

SHU Rong-wen, PENG Guo-lin, ZHU Ren-min (1. Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, Nanjing 210002, Jiangsu, China; 2. Department of Digestion, the 184th Hospital of PLA, Yingtan 335000, Jiangxi, China)

[Abstract] **Objective** To assess the changes of gastric parietal cellular configuration in rats under sepsis and try to elucidate the role of acid in the stress ulceration. **Methods** and methods The rat models of sepsis were made. The gastric pH value was measured and the gastric ulcer index (UI) was evaluated. The morphology of parietal cells was observed using Immunofluorescence with confocal laser scanning microscope (CLSM). **Results** Gastric pH value of intact rats was negatively correlated with UI. The gastric pH value in sepsis 24h rats and sepsis 48h rats were significantly lower than that of control groups. The gastric pH value in sepsis 48h rats was no different to that in sepsis 24h. The gastric UI in sepsis 24h rats were significantly higher than that in control groups. The gastric UI value in sepsis 48h rats was significantly higher than that in sepsis 24h rats. Gastric pH value of sepsis rats was not correlated with UI and negatively correlated with the number of secreting parietal cells UI. The number of secreting parietal cells in both groups was significantly more than that in intact rats. **Conclusion** Rats under sepsis developed gastric mucosal lesions and increased acid secretion. The severity of gastric mucosal lesions was not correlated with gastric pH value. Gastric acid is one of reasons that induce stress ulcer by sepsis.

[Key words] Sepsis; Rats; Stress ulcer; Acid, gastric; Parietal cell, H^+/K^+ - ATPase; Immunofluorescence

败血症(Sepsis)是危重患者中最常见病因死因之一, 应激性溃疡(stress ulcer, SU)也称急性胃黏膜病变, 是败血症的常见的胃肠道并发症之一, 一旦发生, 其预后极差^[1-3]。本实验制作大鼠败血症模型^[4], 使用在激光共聚焦扫描显微镜(confocal laser

scan microscope, CLSM)观察败血症大鼠壁细胞质子泵的分布及细胞形态的变化, 研究其胃酸分泌变化及其与壁细胞形态变化的关系, 进一步阐明在不同躯体应激状态下胃酸分泌情况及其在败血症 SU 发病中的作用。

作者简介: 舒荣文(1972-), 男, 江西鹰潭人, 本科, 主治医师, 从事消化内科研究工作。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 健康雄性 SD 大鼠(体重 180 ~ 210 g,上海西普尔-必凯公司提供),在南京军区南京总医院动物实验中心饲养一周左右后开始实验。pH/ mV 型 pH 计(美国科尔-帕默仪器公司);激光共聚焦扫描显微镜(Leica, 德国)。鼠抗猪 H⁺/K⁺-ATP 酶(亚单位单克隆抗体 2G11, (美国 Affinity Bioreagents 公司),一抗稀释液稀释为 1: 2 000(北京中山生物技术有限公司);羊抗鼠荧光抗体 Alexa 488(美国 Molecular Probes 公司),用 1% 小牛血清稀释为 1: 200。

1.2 动物分组及模型制作 大鼠随机分成正常对照组、败血症 24 h 组、48 h 组,每组 5 只。大鼠禁食 24 h 及禁水 1 h 后,1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔内注射麻醉,常规消毒腹部,打开腹腔寻找盲肠,实验组在盲肠远端 1/2 处用无菌 4 号丝线紧紧结扎,并用无菌 7 号针头在已结扎盲肠远段中央处贯通穿刺。然后把盲肠推回腹腔,关闭腹腔,逐层缝合;术后 24 h、48 h 处死。

1.3 实验步骤 模型制作完成后,将大鼠用 1% 戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔内注射麻醉,剖腹并游离胃,插入 pH 计电极,测定胃液的 pH 值。取下胃后,按 Guth^[5] 标准评估胃黏膜损伤溃疡指数(ulcer index, UI)并累计积分:斑点糜烂计 1 分;糜烂长度 < 1 mm 计 2 分;1 ~ 2 mm 计 3 分;2 ~ 3 mm 计 4 分;> 4 mm 计 5 分。于腺胃区黏膜损伤明显处,取标本,10% 甲醛溶液固定,石蜡包埋、切片,HE 染色后,光镜观察组织学变化。于腺胃前后壁中央处,剪取 0.5 cm × 0.5 cm 大小的胃黏膜标本,放入准备好的装有改良 Bouin's 液(福尔马林: 饱和苦味酸 1: 3)的小瓶内 4℃ 固定 6 h,0.01 mol/L pH7.4 PBS 液漂洗过夜后脱水、石蜡包埋、切片,切片厚度为 3 μm,用于免疫荧光检查。

1.4 免疫荧光检测壁细胞 H⁺/K⁺-ATP 酶 胃黏膜石蜡切片脱蜡、脱水后以 3% 过氧化氢孵育 10 min,0.01 mol/L pH 7.4 PBS 液漂洗后以 0.01 mol/

L 柠檬酸钠缓冲液微波抗原修复(98℃)30 min,然后滴加 1% 小牛血清白蛋白,加稀释比例为 1: 2 000 的鼠抗猪 H⁺/K⁺-ATP 酶(亚单位单克隆抗体 4℃ 孵育 24 h,漂洗后加稀释比例为 1: 200 羊抗鼠荧光抗体 Alexa 488,37℃ 避光孵育 5 h,漂洗、烘干后以 50% 甘油封片,分别行常规荧光显微镜检查及 CLSM 观察。

1.5 CLSM 下观察胃壁细胞形态 观察胃壁细胞形态,并对各组胃黏膜壁细胞进行计数,每只大鼠计算出 200 个壁细胞中处于分泌期壁细胞总数,

1.6 统计学处理 实验数据均以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,分析各组动物模型溃疡指数、分泌期壁细胞数同胃液 pH 之间的关系。各组之间的比较采用 *t* 检验,两变量之间的关系采用直线相关分析。

2 结果

对照组大鼠胃黏膜肉眼色泽红润,无充血、出血点以及糜烂等损伤性改变。胃黏膜普通显微镜下见表层上皮结构完整,腺体排列整齐,黏膜层组织结构层次清楚。免疫荧光标记后在 CLSM 下胃黏膜观察全层均分布有壁细胞,壁细胞形态可分为网格样型、弥漫型两种,网格样细胞为具有泌酸活性的壁细胞。在网格样型细胞浆中充满管状结构,而弥漫型细胞浆中充满了颗粒样结构。

败血症 24 h 组大鼠及 48 h 组胃液 pH 值较对照组显著降低,两组败血症大鼠之间无显著差异。败血症 24 h 组大鼠胃黏膜明显充血,表面附有少量血痂,腺胃部散在少量点状或线状糜烂、出血,UI 显著高于对照组;所有败血症 48 h 组大鼠的胃黏膜面附有大量血痂,腺胃部弥漫性点线状出血、糜烂及溃疡形成,UI 显著高于败血症 24 h 组。

扫描显微镜镜下观察到,败血症 24 h 组与败血症 48 h 组壁细胞形态多为网格样。胃液 pH 值与胃 UI 无明显相关,胃液 pH 值与分泌期壁细胞数呈负相关($r = -0.96, P < 0.05$);两组大鼠分泌期壁细胞数均显著高于正常对照组($P < 0.01$),两组之间并无明显差异。详见表 1。

表 1 大鼠胃液 pH 值、胃溃疡指数以及分泌期壁细胞数($\bar{x} \pm s$)

组 别	胃液 pH 值	胃 UI(分)	分泌期壁细胞数
正常对照组	2.60 ± 0.31	0.00 ± 0.00	86.2 ± 7.23
败血症 24 h 组	2.00 ± 0.26*	12.80 ± 2.28*	106.4 ± 8.26*
败血症 48 h 组	2.13 ± 0.26** [△]	22.00 ± 3.24* [▲]	101.6 ± 8.79* [△]

注:与正常对照组相比,* $P < 0.01$,** $P < 0.05$;与败血症 24 h 组相比,[△] $P > 0.05$,[▲] $P < 0.01$

3 讨论

败血症是应激性溃疡的危险因素之一,多项研究^[6-7]表明,败血症后血流再分布,脑、肾脏的血流无改变,心肌以及骨骼肌的血供减少,但胃、十二指肠、小肠、胰腺血流减少更为明显,一般认为由于胃黏膜血流减少,粘液层变薄,碳酸氢钠、前列腺素分泌减少等原因致胃黏膜屏障受损,胃酸逆流入而导致胃黏膜病变^[8-9]。

本实验中采用的败血症动物模型与临床疾病发病过程相似,制作简便,重复性强。实验结果显示败血症 24 h 组大鼠胃液 pH 值、胃 UI 明显高于正常对照组 ($P < 0.01$);胃黏膜组织 HE 染色后光镜下充血、水肿,表层上皮有部分坏死、脱落。所有败血症 48 h 组大鼠胃液 pH 值、胃 UI 明显高于败血症 24 h 组 ($P < 0.01$),胃黏膜组织 HE 染色后光镜下轻度出血、坏死,小片状脱落,黏膜中断,溃疡形成,溃疡周围黏膜明显充血、水肿。免疫荧光标记败血症大鼠胃黏膜壁细胞 H^+/K^+-ATP 酶后在激光共聚焦扫描显微镜观察其形态并分类计数,发现败血症 24 h 组以及败血症 48 h 组分泌期壁细胞数均显著高于对照组 ($P < 0.01$),胃液 pH 值与胃 UI 无明显相关,胃液 pH 值与分泌期壁细胞数呈负相关。

这些结果表明败血症可引起胃黏膜损伤、出血,胃酸分泌增多,但胃黏膜损伤严重程度与胃液 pH 不相关,胃酸只是败血症引起应激性溃疡的病因之一。

参考文献

- [1] Bone RC. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome) [J]. JAMA, 1992, 268 (24): 3452-3455.
- [2] 王正康. 胃应激性溃疡的防治原则 [J]. 医学新知杂志, 2007, 17(4): 187.
- [3] Jarvis WR, Edwards JR, Culver DH, et al. Nosocomial infection rates in adult and pediatric intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System [J]. Am J Med, 1991, 91(3): 185S-191S.
- [4] 林毅红, 梁仲培, 刘金保. 盲肠结扎穿刺致大鼠败血症的改良模型 [J]. 广州医药, 1998, 29(1): 39-40.
- [5] Guth PH, Paulsen G, et al. Aspirin-induced gastric injury in the rat; histologic changes and sucralfate cytoprotection [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1987, 184(4): 423-428.
- [6] Fink MP, Cohn SM, Lee P, et al. Effect of lipopolysaccharide on intestinal intramucosal hydrogen ion concentration in pigs: evidence of gut ischemia in a normodynamic model of septic shock [J]. Crit Care Med, 1989, 17(7): 641-646.
- [7] Brooke M, Hinder F, McGuire R, et al. Nitric oxide synthase inhibition versus norepinephrine for the treatment of hyperdynamic sepsis in sheep [J]. Crit Care Med, 1996, 24(5): 835-844.
- [8] Brooke M, Hinder F, McGuire R, et al. Nitric oxide synthase inhibition versus norepinephrine in ovine sepsis: effects on regional blood flow [J]. Shock, 1996, 5(5): 362-370.
- [9] Vallet B, Lund N, Curtis SE, et al. Gut and muscle P02 in endotoxemic dogs during shock and resuscitation [J]. J Appl Physiol, 1994, 76(2): 793-800.

(收稿日期: 2009-03-02; 修回日期: 2009-10-16)

(本文编辑: 潘雪飞; 英文编辑: 王建东)

(上接第 509 页)

- [5] 赵文斌, 闫自强, 姚 茹. 飞行员腰腿痛流行病学及诊治现状 [J]. 人民军医, 2007, 50(7): 395.
- [6] 冯 艺, 叶忠明, 郭彦祥, 等. 501 名飞行员腰椎间盘突出症发病情况调查 [J]. 中国疗养医学, 2004, 4(13): 217-218.
- [7] 徐先荣, 竹兆君, 尹 欣. 歼击机飞行员住院疾病谱分析 [J]. 中华航空航天医学杂志, 2005, 16(2): 135-138.
- [8] 张奎渤, 刘 辉, 郑召民. 非特异性下腰痛发病机制的研究进展 [J]. 脊柱外科杂志, 2006, 4(6): 369-372.

- [9] 宋进良, 郑 稼, 游之海. 腰腿痛的临床研究现状 [J]. 实用诊断与治疗杂志, 2006, 20(12): 886-888.
- [10] Deyo RA, Mirza SK, Martin BI. Back pain prevalence and visit rates: estimates from U. S. national surveys 2002 [J]. Spine, 2006, 31(23): 2724-2727.
- [11] 沈江洁, 王 军, 张榕红. 飞行人员生活方式现状及对策 [J]. 中国疗养学, 2004, 13(1): 13.

(收稿日期: 2009-06-15; 修回日期: 2009-08-07)

(本文编辑: 黄攸生; 英文编辑: 王建东)