

• 论著 •

两种内源性内皮素对脑出血应激性溃疡
干预作用的对比研究

黄幸青 饶文霖 刘晓燕 钟延东 林拓 张昌瑞 朱鹰

【摘要】 目的 观察内皮素(ET)抗体、ET受体拮抗剂对大鼠脑出血致应激性溃疡的干预作用,并比较其效果。**方法** 将SD大鼠随机分为对照组(A组)、模型组(B组)、ET抗体组(C组)、ET受体拮抗剂组(D组),每组10只。用非精确定位穿刺法将实验组大鼠自体尾静脉血200 μ l注入右脑实质内制备大鼠尾状核脑出血致应激性溃疡模型。B、C、D组分别于尾静脉注射0.2 ml生理盐水、ET抗体、ET受体拮抗剂(阿魏酸钠),每日1次,连用3 d。处死大鼠,观察其胃黏膜溃疡发生率、溃疡指数,血清ET-1,血清、脑、胃黏膜的丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD),光镜和电镜下观察脑、胃黏膜病理变化并进行超微结构电脑图像定量分析线粒体比表面(Rsv)和体积密度(Vv)。**结果** 制模后,血清ET-1无明显变化;血清、脑、胃黏膜MDA显著升高,SOD显著下降,脑组织含水量也明显升高;脑、胃壁细胞Rsv及胃壁细胞Vv均显著下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。B组胃黏膜溃疡发生率为30%,溃疡指数为15,其他组肉眼均未见溃疡灶。与B组比较,C、D组血清、脑、胃黏膜的MDA显著降低,SOD显著升高;C组脑含水量较B组显著下降,差异均有统计学意义(P 均 <0.01)。C、D组间上述指标差异均无统计学意义。B、C、D组间脑神经细胞、胃壁细胞超微结构电脑图像定量分析中的Rsv、Vv变化及各组间血清ET-1差异亦均无统计学意义。**结论** ET抗体、ET受体拮抗剂均可有效减轻大鼠脑出血致应激性溃疡的发生发展,ET抗体的干预效果似乎稍优于ET受体拮抗剂。

【关键词】 溃疡,应激性; 脑出血; 内皮素,内源性; 内皮素抗体; 内皮素受体拮抗剂

A comparison study of post-cerebral hemorrhage stress ulcer with two interventional treatments aimed at endogenous endothelin in rat HUANG Xing-qing, RAO Wen-lin, LIU Xiao-yan, ZHONG Yan-dong, LIN Tuo, ZHANG Chang-rui, ZHU Biao. Department of Emergency, The Affiliated Yuebei People's Hospital of Shantou University Medical College, Shaoguan 512026, Guangdong, China

【Abstract】 Objective To observe the respective effects of intervention either with endothelin (ET) antibody or with ET receptor antagonist on acute stress ulcer (ASU) subsequent to cerebral hemorrhage in rats. **Methods** Forty Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control group (group A, $n=10$), model group (group B, $n=10$), ET antibody (group C, $n=10$), and ET receptor antagonist group (group D, $n=10$). Right intracerebral hemorrhage was reproduced by injection of 200 μ l autologous venous blood. Normal saline, ET antibody, or ET receptor antagonist was respectively administered intravenously per day for designated group. The rats were sacrificed at 3 days of the experiment. The incidence of ASU and ulcer index were assessed, serum ET-1 level, malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (SOD) activity in serum, Rsvmit (Rsv) and Vvmit (Vv) of cerebral and gastric mucosa were measured, and pathological examination of the cerebral tissue and gastric mucosa was performed with light microscopy and electron microscopy. **Results** In group B, serum ET-1 level did not changed. MDA content were markedly increased in serum, cerebral and gastric mucosa, SOD activity were markedly decreased, cerebral water content were markedly increased; Rsv in neuron and gastric parietal cell, Vv in gastric parietal cell both were markedly decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). ASU was only observed in group B (the incidence was 30%, ulcer index was 15). It was not observed in other groups. Compared with group B, MDA content were significantly decreased, and SOD activity were significantly increased in serum, cerebral and gastric mucosa in groups C and D, cerebral water content in group C were dramatically decreased (all $P<0.01$), but these were not statistically different between groups C and D. Rsv and Vv in neuron and gastric parietal cell in groups B, C and D were not statistically different, and serum ET-1 level were not statistically different among the groups (all $P>0.05$). **Conclusion** Intervention of ET antibody and ET receptor antagonist can both reduce occurrence and development of ASU subsequent to cerebral hemorrhage in rats.

【Key words】 acute stress ulcer; cerebral hemorrhage; endogenous endothelin; endothelin antibody; endothelin receptor antagonist

基金项目:广东省自然科学基金资助项目(2003-31181)

作者单位:512026 广东韶关,汕头大学医学院附属粤北人民医院急诊科

作者简介:黄幸青(1964-),男(汉族),广东省人,硕士生导师,主任医师,Email:david-huangxq@163.com.

急性应激性溃疡(ASU)导致的急性消化道出血是急性脑出血常见的并发症之一,其发生西医认为是各种应激造成的急性胃和十二指肠黏膜糜烂、溃疡;中医则认为主要是肝火上扰清窍、痰热内闭心窍,由于清阳之气不能敷布,后天之精不能归藏,饮

食清气无法入胃致胃失所养,废浊之物不能排出,浊邪、肝火、痰热内阻并犯胃,出现吐血等变症^[1]。为进一步探讨脑出血致 ASU 的发病机制,本研究中分别应用内皮素(ET)抗体和 ET 受体拮抗剂进行干预,观察效果并对比分析。

1 材料与方法

1.1 动物分组及模型制备:雄性 SD 大鼠 50 只,体重约 250 g,购于广东省实验动物中心。按随机数字表法分为对照组(A 组)、模型组(B 组)、ET 抗体组(C 组)、ET 受体拮抗剂组(D 组),每组 10 只。参照 Nath 等^[2]非精确定位穿刺法,采用大鼠自体尾静脉血 200 μ l 注入右脑实质内制备大鼠尾状核脑出血致应激性溃疡模型。C 组自尾静脉注射 0.2 ml ET 抗体(购自解放军总医院放射免疫中心,1:400 倍稀释),D 组注射阿魏酸钠(1 kg/L)0.2 ml,A 组和 B 组注射等量生理盐水,均每日 1 次,连用 3 d。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 血标本:腹腔注射硫喷妥钠麻醉大鼠,从心脏取血,乙二胺四乙酸(EDTA)和抑肽酶抗凝,离心取上清液,置-70℃冷冻保存。血清 ET-1 测定采用放射免疫法,血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)测定采用分光光度计法,试剂盒购自解放军总医院科技开发中心放射免疫研究所。

1.2.2 胃黏膜溃疡指数和发生率:剖腹取胃,沿胃大弯剪开胃壁使胃黏膜外翻,生理盐水冲洗,20 倍解剖显微镜下观察,计算溃疡指数和溃疡发生率。

溃疡指数 = 发生溃疡个体胃黏膜部所有溃疡点最长直径的总和
溃疡发生率 = 发生溃疡的动物数/实验动物总数 $\times 100\%$

1.2.3 脑组织、胃黏膜 SOD、MDA 测定:采用分光光度计法,试剂盒分别购自解放军总医院科技开发中心放射免疫研究所和南京建成生物工程研究所。

1.2.4 组织病理学观察:动物处死后,切取部分脑组织、胃组织,用甲醛水溶液固定,石蜡包埋,连续切片后苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察,由病理图文系统摄影存储。

1.2.5 超微结构观察:制备脑组织、胃组织电镜样本。随机拍照 10 个任意分布区,观察脑、胃壁细胞结

构变化,并对细胞线粒体的体积密度(Vv)、比表面(Rsv)进行图像分析和比较。

1.2.6 脑组织含水量检测:取右脑皮质组织置于预先称重的离心管中,测湿重后放入 80℃恒温干燥箱内烘干 24 h,测定恒重。按公式计算脑组织含水量。

脑组织含水量 = (湿重 - 干重)/(湿重 - 管重) $\times 100\%$

1.3 统计学处理:数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差检验,经 SPSS 10.0 统计软件处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 溃疡指数、溃疡发生率:A、C、D 组肉眼均未见任何溃疡病灶;B 组有 3 只大鼠胃黏膜可见散在性针尖状出血点,其余肉眼未见。B 组的溃疡指数合计为 15,溃疡发生率为 30%。

2.2 血清 ET-1 及血清、脑组织、胃黏膜中 MDA、SOD 和脑组织含水量(表 1):各组间血清 ET-1 水平无明显变化(P 均 > 0.05)。与 A 组比较,B 组血清、脑、胃黏膜 MDA 显著升高,SOD 显著下降,脑组织含水量亦显著上升(P 均 < 0.01)。与 B 组比较,C、D 组血清、胃黏膜、脑组织 MDA 显著降低,SOD 显著升高(P 均 < 0.01),而 C、D 两组间差异无统计学意义。C 组的脑组织含水量显著低于 B 组,而 D 组则介于 B、C 组之间,差异不明显。

2.3 组织病理学观察(彩色插页图 1~2):B 组胃黏膜有出血,胃壁细胞部分线粒体肿胀,结构模糊或嵴断裂,偶见空泡变,内质网明显扩张,细胞核固缩、异染色质增多;脑组织有水肿和灶性出血坏死,脑神经细胞部分线粒体肿胀、嵴断裂,有空泡变,粗面内质网稀疏,细胞核未见明显异常。C 组胃黏膜仅有水肿,胃壁细胞部分线粒体轻度肿胀、嵴模糊,内质网扩张,细胞核少量异染色质边聚;脑组织疏松,血管、细胞间隙增宽,脑神经细胞线粒体肿胀、嵴断裂,少量粗面内质网扩张,膜不清,细胞核未见明显异常。D 组胃黏膜广泛坏死,部分腺体轮廓仍可辨认,胃壁细胞线粒体轻度肿胀、嵴模糊,内质网明显扩张,细胞核染色质增多、边聚;脑组织疏松,血管、细胞间隙增宽,脑神经细胞偶见线粒体嵴断裂,余无明显异常。

表 1 各组大鼠血清 ET-1、血清、脑组织、胃黏膜 MDA 和 SOD 以及脑组织含水量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	血清 ET-1 (ng/L)	MDA(μ mol/L)			SOD(kU/L)			脑组织含水量 (%)
			血清	脑	胃	血清	脑	胃	
A 组	10	66.92 $\pm$ 21.19	3.32 $\pm$ 0.66	2.41 $\pm$ 0.56	1.15 $\pm$ 0.20	68.43 $\pm$ 8.77	248.95 $\pm$ 8.55	247.89 $\pm$ 4.32	0.78 $\pm$ 0.01
B 组	10	68.87 $\pm$ 18.87	5.96 $\pm$ 0.84 ^b	5.93 $\pm$ 0.75 ^b	2.08 $\pm$ 0.23 ^b	35.03 $\pm$ 8.06 ^b	202.87 $\pm$ 19.94 ^b	206.20 $\pm$ 8.78 ^b	0.82 $\pm$ 0.04 ^b
C 组	10	69.33 $\pm$ 42.54	4.27 $\pm$ 0.55 ^{ac}	4.32 $\pm$ 0.35 ^{bc}	1.37 $\pm$ 0.16 ^c	61.30 $\pm$ 11.46 ^c	231.67 $\pm$ 12.76 ^{ac}	236.17 $\pm$ 11.08 ^c	0.78 $\pm$ 0.03 ^c
D 组	10	75.19 $\pm$ 34.14	4.44 $\pm$ 0.49 ^{bc}	3.98 $\pm$ 0.27 ^{bc}	1.26 $\pm$ 0.14 ^c	56.70 $\pm$ 8.06 ^{ac}	229.53 $\pm$ 8.76 ^{ac}	228.31 $\pm$ 16.86 ^{bc}	0.80 $\pm$ 0.03

注:与 A 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与 B 组比较,^c $P < 0.01$

2.4 超微结构电脑图像分析结果(表 2):与 A 组比较, B 组脑神经细胞、胃壁细胞 Rsv 和胃壁细胞 Vv 均明显减少, 差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。B、C、D 组间脑神经细胞、胃壁细胞 Rsv 和 Vv 比较差异均无统计学意义(P 均 > 0.05)。

表 2 各组大鼠脑、胃壁细胞 Rsv 及 Vv 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	Rsv(μm^{-1})		Vv	
		脑	胃	脑	胃
A 组	10	0.54 $\pm$ 0.07	0.30 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.01	0.31 $\pm$ 0.05
B 组	10	0.40 $\pm$ 0.04 ^b	0.24 $\pm$ 0.03 ^b	0.09 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.06 ^a
C 组	10	0.40 $\pm$ 0.02 ^b	0.27 $\pm$ 0.02	0.10 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.03
D 组	10	0.43 $\pm$ 0.03 ^b	0.26 $\pm$ 0.03 ^b	0.09 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.05 ^b

注:与 A 组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$

3 讨论

临床上脑出血所致 ASU 的治疗多以抑酸、保护胃黏膜等对症处理为主。对其发病机制的研究尚处于探索阶段。用冷束缚、烧伤、枪击伤、液压脑外伤等导致 ASU 的实验研究显示,内源性 ET 在 ASU 发生发展过程中可能扮演了重要角色^[3-4]。ET 具有强烈的收缩局部血管的作用,可以导致局部组织缺血、缺氧而变性坏死;ET 抗体可以对抗 ET-1 的收缩血管作用^[5]。阿魏酸钠为非肽类 ET 受体,具有减轻内皮继发性损伤、清除氧自由基、拮抗 ET 引起的血管收缩、升压及血管平滑肌细胞增殖、增加一氧化氮(NO)的合成、松弛血管平滑肌等作用^[6]。

本研究结果显示:B 组出现了典型的脑出血致应激性溃疡的组织病理学表现,脑、胃的 Rsv 及胃 Vv 较 A 组显著下降,与刘玉光等^[7]的报道相近。使用 ET 抗体和 ET 受体拮抗剂后则对肉眼溃疡的发生以及组织病理学损害有较大的改善;而对亚细胞结构损害的改善作用则不够明显,提示内源性 ET 通过收缩血管引起的细胞缺血、缺氧损害很可能是脑出血致应激性溃疡的病理基础,ET 抗体与 ET 受体拮抗剂均能阻断其发生及减轻损害程度。B 组血清、脑组织、胃黏膜氧自由基指标 MDA、SOD 的检测结果显示全身及局部组织缺血、缺氧时,产生大量的氧自由基,最终导致组织细胞损害。两种干预措施都可以减轻全身和局部组织缺血、缺氧导致的组织损害。使用 ET 抗体可减轻局部脑水肿,而 ET 受体拮抗剂作用则不明显。

有研究指出,冷束缚导致的 ASU 体内 ET 分泌急剧上升,内源性 ET 可能参与了应激性溃疡的发病过程,其机制是通过减少胃肠道局部血流量而引起胃黏膜的缺血、糜烂、溃疡^[8]。脑出血导致的 ASU

是否也与 ET 的作用密切相关呢?我们提出这样一个假说:大量的脑出血可能造成脑组织局部释放大量的 ET,使血管内皮强烈收缩,造成脑组织远端细胞变性坏死;机体遭受打击的信号通过某种转导途径,激发全身各个重要器官的血管内皮细胞或非内皮细胞释放内源性 ET,作用于邻近组织局部的 ET 受体,其中胃肠道黏膜下血管在 ET 的作用下强烈收缩,造成胃肠道黏膜缺血、缺氧,细胞变性坏死。本实验结果显示,各组间血清 ET-1 未见明显变化,与一些临床报道的结果^[9]不太一致,提示可能与以下因素有关:①脑出血导致的应激性溃疡并非通过血清 ET-1 进行转导,可能有其他的转导途径,ET-1 可能只参与组织局部的作用;②脑出血导致的 ASU 模型强度不足以引起全身血清 ET-1 的升高;③所有内皮或非内皮细胞分泌的 ET 不是主要向血管腔分泌,而是向非管腔方向通过自分泌和旁分泌作用发挥效应,因而 ET 的分泌可能更应考虑局部而非全身的情况^[7]。血清、脑组织、胃黏膜的 MDA 升高、SOD 降低,提示全身及局部组织缺血、缺氧均严重,可能与 ET 在组织局部强烈收缩血管导致局部组织缺血、缺氧有关。分别使用 ET 抗体、ET 受体拮抗剂对脑出血致应激性溃疡均显示了效果,而 ET 抗体的干预效果似乎稍优于 ET 受体拮抗剂。

参考文献

- [1] 张丹,周海平,朱敏.急性脑血管疾病并发应激性溃疡及其中医辨证分型的探讨[J].中国中西医结合急救杂志,1999,6(2):85-88.
- [2] Nath FP, Jenkins A, Mendelow D, et al. Early hemodynamic changes in experimental intracerebral hemorrhage[J]. J Neurosurg, 1986, 65(5):697-703.
- [3] 段义民,李兆申,湛先保,等.内皮素在大鼠冷束缚应激性溃疡中的作用[J].解放军军医杂志,1999,24(1):15-17.
- [4] 刘国实,黄裕新,李栓位,等.枪击声致大鼠应激性溃疡的发病机制及防治[J].第四军医大学学报,1999,20(6):491-494.
- [5] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, et al. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells[J]. Nature, 1988, 332(6163):411-415.
- [6] 王琦,柳兢,姚弄航.阿魏酸钠对不稳定型心绞痛患者血清内皮素和一氧化氮的影响及临床疗效观察[J].中国全科医学,2007,10(8):623-625.
- [7] 刘玉光,孙春兰,王灿东,等.犬脑室内出血动物模型脑细胞超微结构的研究[J].中国危重病急救医学,1999,11(10):624-626.
- [8] Michida T, Kawano S, Masuda E, et al. Role of endothelin-1 in hemorrhagic shock-induced gastric mucosal injury in rats[J]. Gastroenterology, 1994, 106(4):988-993.
- [9] 苏立凯,王淑仙,田文艳,等.脑出血患者血清内皮素和自由基检测的临床意义及其相关性研究[J].中国危重病急救医学,1999,11(3):155-157.

(收稿日期:2007-12-13 修回日期:2008-06-05)

(本文编辑:李银平)

WCX-2 蛋白质芯片对脑损伤大鼠皮质差异蛋白的检测

(正文见652页)

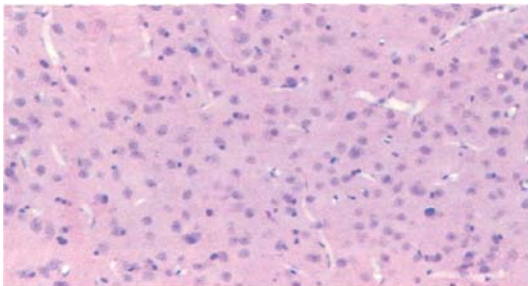


图4 光镜下观察假手术组大鼠大脑皮质病理学改变(HE, ×200)

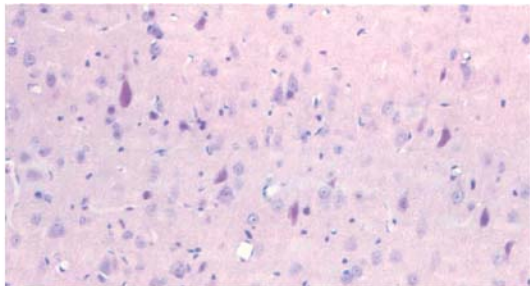


图5 光镜下观察损伤后8 h组大鼠大脑皮质病理学改变(HE, ×200)

脑出血患者血肿周围组织水通道蛋白-4表达与脑水肿
及病理超微结构变化的关系

(正文见674页)

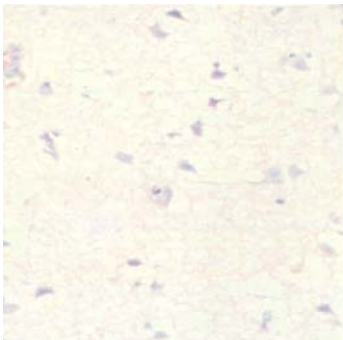


图2 光镜下观察患者脑出血后24~48 h血肿周围脑组织水肿明显(HE, ×200)

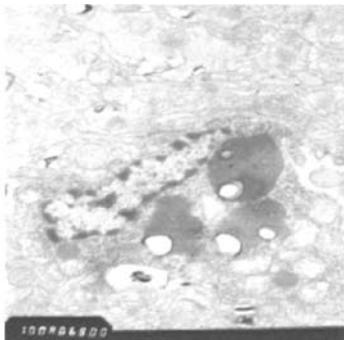


图3 电镜下观察患者脑出血后24~48 h血肿周围脑组织胶质细胞胞质及线粒体肿胀明显, 次级溶酶体增加(铀-铅双染, ×10 000)

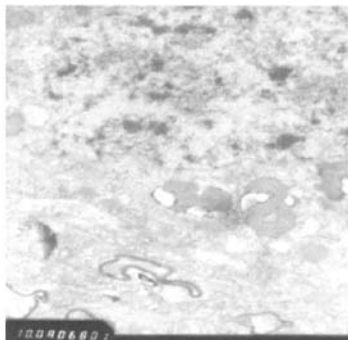
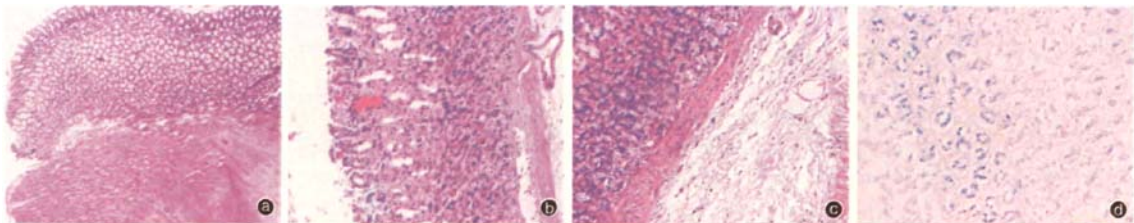


图4 电镜下观察患者脑出血后24~48 h血肿周围脑组织神经细胞损伤严重, 核染色质聚集, 核膜不完整, 胞质及线粒体肿胀明显, 次级溶酶体增加(铀-铅双染, ×8 000)

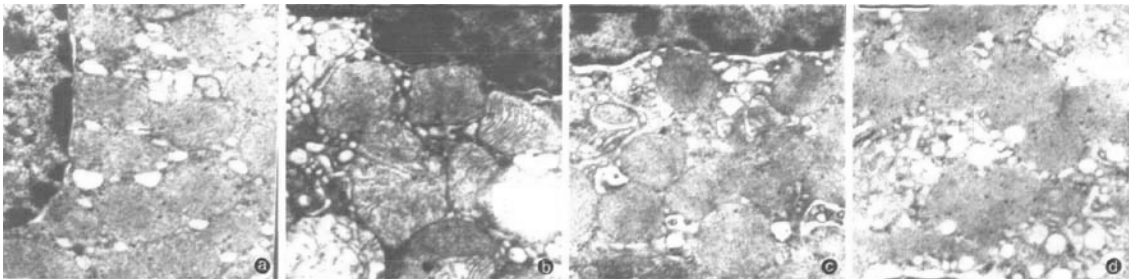
两种内源性内皮素对脑出血应激性溃疡干预作用的对比研究

(正文见678页)



①:对照组(A组), ②:模型组(B组), ③:内皮素抗体组(C组), ④:内皮素拮抗剂组(D组)

图1 光镜下观察各组大鼠胃黏膜病理学改变(HE, ×100)



①:对照组(A组), ②:模型组(B组), ③:内皮素抗体组(C组), ④:内皮素拮抗剂组(D组)

图2 电镜下观察各组大鼠胃壁细胞超微结构改变(铀-铅双染, ×8 000)