

ghrelin 对失血性休克大鼠胃黏膜的保护作用

褚万立 刘雪峰 刘军英 张强 林兆奋

【摘要】 目的 探讨重组大鼠 ghrelin 对失血性休克大鼠胃黏膜损伤的影响。方法 18 只健康雄性 SD 大鼠被随机分为对照组、失血性休克组、ghrelin 治疗组 3 组, 每组 6 只。失血性休克组及 ghrelin 治疗组制备失血性休克模型。ghrelin 治疗组休克复苏的同时经颈内静脉推注重组大鼠 ghrelin 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 。于复苏后 2 h 使用激光多普勒血流仪测定大鼠胃黏膜血流量; 用光镜及透射电镜观察胃黏膜损伤情况。结果 失血性休克组胃黏膜血流量较对照组明显降低 [(260.4 \pm 49.6) bpu 比 (418.6 \pm 57.3) bpu, $P < 0.01$]; 胃黏膜细胞坏死、脱落、溶解, 局部溃疡形成。ghrelin 治疗组胃黏膜血流量较失血性休克组明显提高 [(352.9 \pm 72.9) bpu 比 (260.4 \pm 49.6) bpu, $P < 0.05$], 且与对照组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 胃黏膜损伤显著改善。结论 重组大鼠 ghrelin 能够提高失血性休克大鼠胃黏膜血流量, 改善胃黏膜缺血/再灌注损伤。

【关键词】 失血性休克; 胃黏膜; 血流量; ghrelin

The protective effect of recombinant rat ghrelin on gastric mucosa in rats with hemorrhagic shock CHU Wan-li*, LIU Xue-feng, LIU Jun-ying, ZHANG Qiang, LIN Zhao-fen. * Burns Institute, the First Affiliated Hospital of General Hospital of PLA, Beijing 100048, China
Corresponding author: LIN Zhao-fen, Email: linzhao fen@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the effect of recombinant rat ghrelin on gastric mucosa in rats with hemorrhagic shock. Methods Eighteen healthy male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly assigned into three groups: control group, hemorrhagic shock group, and ghrelin treatment group, with 6 rats for each group. The hemorrhagic shock model was reproduced in hemorrhagic shock group and ghrelin treatment group, and recombinant rat ghrelin (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) was intravenously administered to rats in ghrelin treatment group when resuscitation begun. Two hours after resuscitation, the gastric mucosal blood flow (GMBF) was determined with laser Doppler flowmetry (LDF). The light microscope and transmission electron microscope (TEM) were used to assess gastric mucosal injury. Results The GMBF of the rats in hemorrhagic shock group was significantly lower than that in control group [(260.4 \pm 49.6) bpu vs. (418.6 \pm 57.3) bpu, $P < 0.01$], and the gastric mucosa was injured, presenting cell necrosis, cytolysis and focal ulceration. The GMBF of the rats in ghrelin treatment group was remarkably richer than that in hemorrhagic shock group [(352.9 \pm 72.9) bpu vs. (260.4 \pm 49.6) bpu, $P < 0.05$], but had no significant difference compared with that in control group ($P > 0.05$), and the gastric mucosa injuries were greatly improved in the rats of ghrelin treatment group. Conclusion Recombinant rat ghrelin, through enhancing the GMBF, can ameliorate the gastric mucosal ischemic/reperfusion injury in rats with hemorrhagic shock.

【Key words】 hemorrhagic shock; gastric mucosa; blood flow; ghrelin

在创伤、休克、脓毒症等疾病进程中, 存在广泛的胃肠黏膜损伤, 且由于后期并发肠道细菌移位及肠源性感染, 进而引起全身感染, 成为全身炎症反应综合征 (SIRS) 和多器官功能障碍综合征 (MODS) 的重要基础。本研究中以失血性休克大鼠为模型, 探讨重组大鼠 ghrelin 对胃黏膜的保护作用。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组: 健康清洁级雄性 SD 大鼠 18

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.05.003

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30471464)

作者单位: 100048 北京, 解放军总医院第一附属医院 (原解放军第三〇四医院) 烧伤整形科, 全军烧伤研究所 (褚万立); 200003 上海, 第二军医大学附属长征医院急救科 (刘雪峰、刘军英、张强、林兆奋)

通信作者: 林兆奋, Email: linzhao fen@sina.com

Email: chuwanli@sina.com

只, 体重 250~300 g, 由上海西普耳-必凯实验动物中心提供。按照随机数字表法将大鼠分为 3 组, 每组 6 只。①对照组: 仅给予麻醉、动静脉插管, 不进行休克、复苏, 插管后 4 h 检测指标; ②失血性休克组: 麻醉、动静脉插管后进行失血性休克复苏全过程; ③ghrelin 治疗组: 休克复苏的同时经颈内静脉推注重组大鼠 ghrelin (20 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 由瑞士 Alexis 公司生产), 其他操作同失血性休克组。

1.2 动物模型制备

1.2.1 外科准备: 大鼠术前禁食、不禁水 12 h 过夜, 称重, 戊巴比妥腹腔注射麻醉大鼠, 分离左侧颈总动脉进行插管, 通过三通管接 PowerLab 血压监测仪监测并记录动脉血压, 同时作为放血降压通道; 分离右侧颈内静脉, 插管用于回输失血及补液。

1.2.2 失血性休克复苏大鼠模型的制备:准备工作完成并稳定 15 min 后,记录动脉血压。经颈总动脉插管缓慢抽血,10 min 内使平均动脉压(MAP)降至 40 mm Hg(1 mm Hg=0.133 kPa),反复抽血、输液维持 MAP 在 35~45 mm Hg 达 1 h,回输失血并输注等量生理盐水进行复苏,复苏 30 min,以 MAP 稳定在 100 mm Hg 以上为标准。复苏成功后 2 h 检测胃黏膜血流量(GMBF),采集胃黏膜标本待测。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 GMBF 检测:复苏后大鼠仰卧位固定于解剖台上,开腹,充分暴露胃后,将胃从腹腔内轻轻拉出,固定于自制的胃固定台上,在胃大弯无血管区做一个 0.5 cm 的纵形切口,插入激光多普勒血流仪针形探头,轻触黏膜面,并为之保持垂直,保持折射率 25%~35%,待血流稳定后,分别在胃后壁、胃小弯、胃窦部 3 点测定 1 min,取 3 点均值作为 GMBF,以血流灌注单位 bpu 表示。

1.3.2 胃黏膜病理学观察:沿胃大弯将胃剖开,取针形探头未接触的胃底部黏膜组织,一块于体积分数为 4%多聚甲醛水溶液中固定,常温保存,组织切片、苏木素-伊红(HE)染色,光镜下观察胃黏膜病理学变化;另一块置于体积分数为 2.5%的戊二醛-磷酸盐溶液中固定,4℃保存,铀-铅双染,透射电镜下观察胃黏膜 X/A 样细胞超微结构变化。

1.4 统计学分析:采用 SAS 6.12 统计软件,数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较用 *t* 检验,多组间两两比较用 SNK-*q* 检验,多组间比较用单因素方差分析,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠休克前及复苏后 MAP 比较(表 1):各组大鼠休克前 MAP 比较差异均无统计学意义(*P*均>0.05)。失血性休克组与 ghrelin 治疗组大鼠在维持休克期间反复抽取的动脉血总血量与体重比值比较差异无统计学意义[(3.0±0.3)%比(3.3±0.4)%,*P*>0.05];复苏成功后,两组大鼠 MAP 有所下降,但组间比较差异也无统计学意义,且接近对照组水平(*P*均>0.05)。

表 1 各组大鼠 MAP、GMBF 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数	MAP(mm Hg)		GMBF (bpu)
		休克前	复苏后	
对照组	6	124.7±6.7	111.0±4.1	418.6±57.3
失血性休克组	6	124.5±5.7	107.2±3.7	260.4±49.6 ^a
ghrelin 治疗组	6	125.0±5.8	106.2±3.7	352.9±72.9 ^b

注:与对照组比较,^a*P*<0.01;与失血性休克组比较,^b*P*<0.05

2.2 各组大鼠 GMBF 比较(表 1):失血性休克组 GMBF 较对照组明显降低(*P*<0.01)。ghrelin 治疗组 GMBF 明显高于失血性休克组(*P*<0.05),但与对照组比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。

2.3 光镜结果(彩色插页图 1):对照组胃黏膜结构清晰,黏膜上皮完整,固有层腺体细胞结构清晰,上皮层及固有层偶见轻微充血。失血性休克组胃黏膜充血、水肿明显,部分黏膜上皮坏死、脱落,甚至有溃疡形成,固有层腺体细胞可见坏死、溶解,但未见明显的炎性细胞浸润。ghrelin 治疗组损伤明显减轻,黏膜上皮结构基本完整,可见轻微充血、水肿,未见腺体细胞坏死。

2.4 电镜结果(彩色插页图 2):对照组 X/A 样细胞呈圆形或椭圆形,细胞核位于细胞一侧,染色质分布均匀,胞质内可见粗面内质网、线粒体,结构正常完整;与细胞核相对一侧可见密集的染色较深的分泌颗粒。失血性休克大鼠可见 X/A 样细胞核变形,染色质边集,核固缩;线粒体肿大,基质变淡,嵴变短甚至消失;粗面内质网扩张;细胞内分泌颗粒明显减少。ghrelin 治疗组细胞损伤明显减轻,仅可见轻微核固缩,线粒体轻度肿胀,分泌颗粒无明显减少。

3 讨论

ghrelin 是生长激素促分泌素(GHSs)的内源性配体,1999 年由 Kojima 等^[1]发现,大部分 ghrelin 由胃底部 X/A 样细胞分泌。ghrelin 在体内广泛介导生物学活性^[2];如促进生长激素分泌;增强食欲,促进摄食,增加体重;促进合成代谢;增强心肌收缩力,舒张血管,调节心脏功能;促进胃肠蠕动,调节胃酸分泌,改善胃肠道功能;促进促肾上腺皮质激素、糖皮质激素及催乳素等激素分泌。Sibilia 等^[3]首先发现在乙醇引起的小鼠胃溃疡模型中,脑室内注射 ghrelin(0.04~4.00 μg)能够明显减少黏膜溃疡数,其作用呈一定的剂量依赖性。此后,Brzozowski 等^[4-7]通过多项研究证实,在乙醇、缺血/再灌注损伤以及浸水制动应激等方法造成的小鼠胃黏膜损伤模型中,ghrelin 均能增加 GMBF,改善胃黏膜损伤。本研究发现,失血性休克组大鼠复苏 2 h GMBF 较对照组明显降低;说明给予 ghrelin 20 μg/kg 可明显提高 GMBF,光镜和电镜结果也提示胃黏膜上皮及腺体细胞损伤明显减轻。

ghrelin 增加 GMBF、改善胃黏膜损伤的功能可能是多因素共同作用的结果。首先,ghrelin 的胃黏膜保护作用依赖于感觉神经的完整性,迷走神经切除或神经阻滞均能阻断 ghrelin 的作用^[3-7]。第二,

ghrelin 可能通过一氧化氮(NO)介导胃黏膜的保护作用。实验证明,ghrelin 能明显增加胃黏膜局部 NO 浓度,而使用一氧化氮合酶(NOS)阻滞剂能明显阻断 ghrelin 的胃黏膜保护作用^[3-6,8]。第三,ghrelin 能促进胃黏膜合成前列腺素 E₂(PGE₂),而后者已被证明有比较明确的胃黏膜保护作用,而且 ghrelin 的这种作用能够被吗啡美辛及 rofecoxib 两种环氧合酶阻滞剂所阻断^[4,8]。第四,ghrelin 能明显降低胃黏膜局部核转录因子-κB(NF-κB)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)的浓度,表明 ghrelin 具有一定的抗炎作用,进而可能减轻胃黏膜局部损伤^[6]。

本研究显示:重组大鼠 ghrelin 能提高失血性休克大鼠 GMBF,改善胃黏膜缺血/再灌注损伤。

参考文献

- [1] Kojima M, Hosoda H, Date Y, et al. Ghrelin is a growth hormone releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, 1999, 402(6762):656-660.
- [2] Korbonits M, Goldstone AP, Gueorguiev M, et al. Ghrelin, a hormone with multiple functions. *Front Neuroendocrinol*,

2004, 25(1):27-68.

- [3] Sibilina V, Rindi G, Pagani F, et al. Ghrelin protects against ethanol-induced gastric ulcers in rats; studies on the mechanisms of action. *Endocrinology*, 2003, 144(1):353-359.
- [4] Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, et al. Exogenous and endogenous ghrelin in gastroprotection against stress-induced gastric damage. *Regul Pept*, 2004, 120(1-3):39-51.
- [5] Brzozowski T, Konturek PC, Drozdowicz D, et al. Role of central and peripheral ghrelin in the mechanism of gastric mucosal defence. *Inflammopharmacology*, 2005, 13(1-3):45-62.
- [6] Konturek PC, Brzozowski T, Walter B, et al. Ghrelin-induced gastroprotection against ischemia-reperfusion injury involves an activation of sensory afferent nerves and hyperemia mediated by nitric oxide. *Eur J Pharmacol*, 2006, 536(1-2):171-181.
- [7] Brzozowski T, Konturek PC, Sliwowski Z, et al. Neural aspects of ghrelin-induced gastroprotection against mucosal injury induced by noxious agents. *J Physiol Pharmacol*, 2006, 57 (Suppl 6):63-76.
- [8] Sibilina V, Pagani F, Rindi G, et al. Central ghrelin gastroprotection involves nitric oxide/prostaglandin cross-talk. *Br J Pharmacol*, 2008, 154(3):688-697.

(收稿日期:2008-07-15 修回日期:2009-03-20)

(本文编辑:李银平)

• 科研新闻速递 •

伊诺肝素能够更好地减轻血管内皮损伤及减少出血次数

脓毒症患者使用抗凝药物预防静脉血栓形成已得到广泛认可。最近研究显示,抗凝药物可能对炎症反应产生积极的影响。研究人员试图证实肝素减轻内毒素血症的血管内皮损伤,进一步评估伊诺肝素与普通肝素的差别。给 Wistar 大鼠静脉注射脂多糖(LPS)8.5 mg/kg 后分别快速推注普通肝素 350 U/kg、伊诺肝素 2.0 mg/kg 以及安慰剂。3 h 后,每组大鼠(每组 6 只)静脉采血,分别进行血细胞计数、凝血标记物、器官损伤标记物检测,并在微针穿孔后光镜下观察肠系膜微循环及出血区域。结果显示:普通肝素与伊诺肝素血管内皮细胞损伤减轻,淋巴细胞黏附性降低;普通肝素组出血区域大于伊诺肝素组($P < 0.01$);伊诺肝素组白细胞和血小板计数、纤维蛋白原、丙氨酸转氨酶(ALT)水平均明显低于普通肝素组(P 均 < 0.05)。因此得出结论:普通肝素与伊诺肝素通过减少淋巴细胞黏附均可减轻血管内皮细胞损伤;伊诺肝素较普通肝素更能减少出血面积。

白慧颖,编译自《Shock》,2009 年 3 月(电子版);胡森,审校

L 选择蛋白减轻脓毒症微血管损伤

已知 L 选择蛋白水平降低与急性呼吸窘迫综合征有关,可溶性 L 选择蛋白水平增高能够减少局部炎症反应导致的微血管出血。因此研究人员设想,L 选择蛋白释放减少会加重局部炎症反应的发生和微血管损伤。研究者分别采用腹腔注射脂多糖(LPS)或碳酸氢盐缓冲液(BBS)以及阴囊内注射肿瘤坏死因子-α(TNF-α)或 BBS 制备大鼠模型,将动物分为全身炎症反应组、局部炎症反应组、全身炎症反应+局部炎症反应组和对照组。各组大鼠分别腹腔注射 L 选择蛋白释放抑制物 Ro31-9790 或对照药品。通过活体解剖提睾肌以观察淋巴细胞与血管内皮细胞的相互影响及微血管损伤程度(渗漏指数)。结果显示,Ro31-9790 治疗组 L 选择蛋白释放减少,炎症反应加重,血管通透性增加;对照组全身炎症反应减轻。研究者因此得出结论:L 选择蛋白释放减少会加重局部炎症反应和微血管损伤;脓毒症时 L 选择蛋白释放减少会增加淋巴细胞介导的器官损伤。

白慧颖,编译自《Surgery》,2009,145(4):384-391;胡森,审校

维拉帕米预处理减少细胞因子释放可显著降低感染性休克大鼠死亡率

细胞因子在脓毒症和感染性休克病理生理变化过程中发挥重要作用。膜转运蛋白 P-糖蛋白(P-gp)可能与细胞因子释放有关,如白细胞介素-2(IL-2)、IL-4 及 γ-干扰素(IFN-γ)。研究者观察了维拉帕米(P-gp 抑制剂)对脂多糖(LPS)致感染性休克大鼠的死亡率以及对细胞因子释放的影响,并比较单独使用己酮可碱、利索茶碱、泼尼松或与维拉帕米联用的效果。结果显示,联合应用维拉帕米可减少肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、IFN-γ 的释放与基因表达,显著降低感染性休克大鼠死亡率。提示 IFN-γ 释放可能与 P-gp 有关。研究者认为,维拉帕米可提高感染性休克的生存率,与己酮可碱和泼尼松联用可增强其对感染性休克的治疗作用。维拉帕米的这些作用可能与 P-gp 相关。

白慧颖,编译自《Int Immunopharmacol》,2009,9(4):478-490;胡森,审校

ghrelin 对失血性休克大鼠胃黏膜的保护作用

(正文见263页)

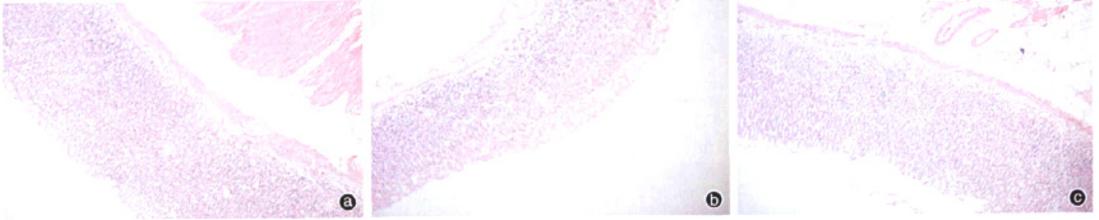


图1 光镜下观察各组大鼠胃黏膜病理学改变 对照组(a)胃黏膜及固有层腺体细胞结构清晰,黏膜上皮完整;失血性休克组(b)胃黏膜上皮坏死、脱落,固有层腺体细胞坏死,ghrelin治疗组(c)胃黏膜上皮基本完整,固有层及黏膜下层充血、水肿减轻 HE $\times 100$

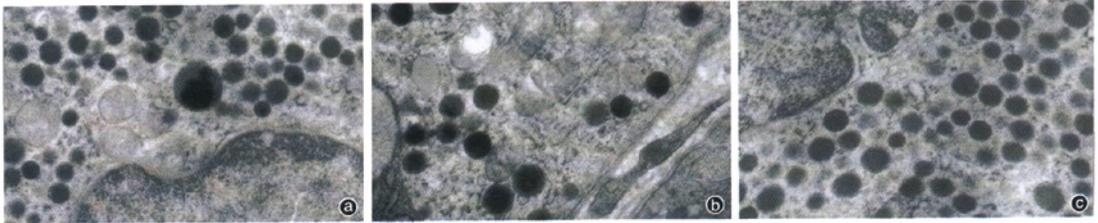


图2 电镜下观察各组大鼠胃黏膜病理学改变 对照组(a)细胞核内质网结构正常、完整,细胞质内可见密集的分泌颗粒;失血性休克组(b)线粒体肿大,基质变淡;粗面内质网扩张;细胞内分泌颗粒减少;ghrelin治疗组(c)细胞质内分泌颗粒密集 铀-铅双染 $\times 20\,000$

肠系膜淋巴管结扎对失血性休克大鼠的器官保护作用

(正文见274页)

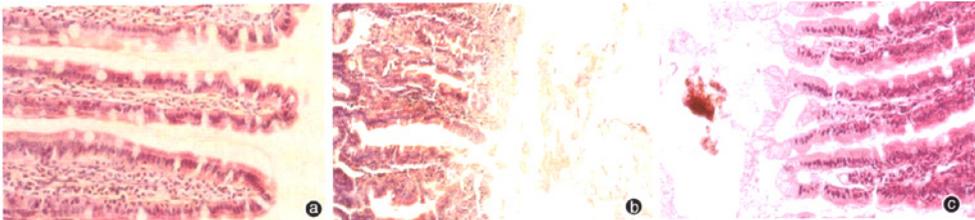


图3 各组大鼠小肠组织病理学改变 对照组(a)小肠结构清晰,黏膜完整;休克组(b)小肠绒毛顶端结构破损,绒毛顶端黏膜细胞有坏死、脱落;结扎组(c)小肠黏膜细胞坏死、脱落程度减轻,结构基本完整 HE $\times 200$

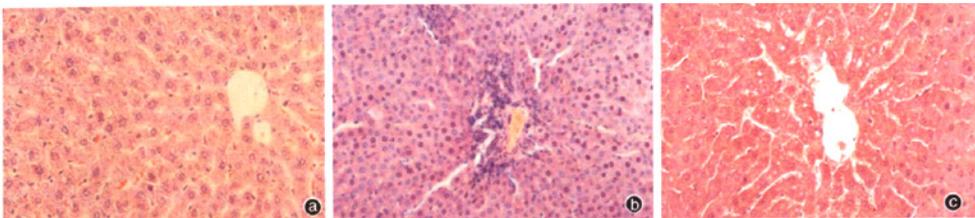


图4 各组大鼠肝组织病理学改变 对照组(a)肝脏结构完整,排列整齐,汇管区肝细胞呈放射状排列;休克组(b)肝脏结构排列紊乱,肝细胞变性、坏死,汇管区大量炎性细胞浸润;结扎组(c)肝细胞坏死及炎性细胞浸润程度减轻 HE $\times 100$

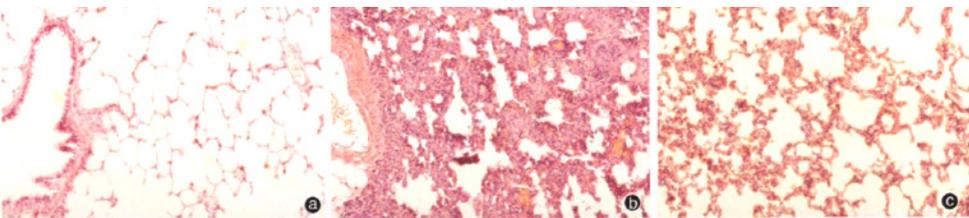


图5 各组大鼠肺组织病理学改变 对照组(a)肺泡结构清晰,完整;休克组(b)肺间质水肿,大量炎性细胞浸润;结扎组(c)肺间质水肿及炎性细胞浸润程度减轻 HE $\times 100$