

胃($H^+ + K^+$)-ATPase与急性胃粘膜病变的关系的研究*

左风蓉 吴同乐 李生广 陈采琴 林治焕

(中国科学院生物物理所, 北京)

摘要 本文对急性胃粘膜病变与胃粘膜($H^+ + K^+$)-ATPase的关系作了初步探讨, 实验结果说明以消炎痛为诱因引起大白鼠急性胃粘膜病变时胃粘膜上的胃酸分泌的质子泵($H^+ + K^+$)-ATPase活力受到抑制。在离体实验中低浓度的消炎痛 $< 2\mu\text{mol}$, 大白鼠胃粘膜($H^+ + K^+$)-ATPase的活力便受到显著的抑制, 在整体实验中维酶素对消炎痛引起的胃粘膜($H^+ + K^+$)-ATPase的抑制具有保护作用。

关键词: 胃粘膜 急性胃粘膜病变, ($H^+ + K^+$)-ATPase, 消炎痛, 维酶素

胃疾病是消化道最常见的疾病之一, 其发病机理较复杂, 至今没有令人满意的结果和解释^[1], 但目前认为多数的胃疾病很可能与胃酸分泌失调有关。近十几年来, 由于国际上已逐渐确认胃粘膜上一类新的ATPase——胃粘膜($H^+ + K^+$)-ATPase在胃酸分泌中起中心作用, 即高效的质子泵作用。因此探讨胃疾病与胃粘膜($H^+ + K^+$)-ATPase的关系已成为胃病变机理研究的一个十分重要的方面。最近已有人将胃粘膜($H^+ + K^+$)-ATPase的专一性抑制剂Omeprazole成功地用作抗胃溃疡药物, 并在实验和临床上取得极好的治疗效果^[2]。但是, 到目前为止, 国际和国内对这方面的研究尚少有报导。我们实验室选用大白鼠为模型动物, 以消炎痛(Indometacin)为诱因造成急性胃粘膜病变^[3]。据文献中介绍^[1], 早在1883年Beaumont就曾报导由于过度饮酒易引起急性胃粘膜病变的实例, 兹后, 又相继报导了某些药物如消炎痛可引起急性胃粘膜出血性病变^[1, 4]。我们对这种胃病变与胃酸分泌的质子泵——胃粘膜($H^+ + K^+$)-ATPase的关系进行了初步的探讨, 同时为一种特效胃病新药——维酶素的药理机制提供了一种可能的解释。

材 料 与 方 法

一、急性胃粘膜病变的鉴定

由于消炎痛引起的急性胃粘膜出血性病变主要是表现在浅表粘膜, 其特征性病理表现是胃粘膜糜烂, 可小如针尖大至一厘米直径, 伴有点状、条状、片状出血, 且此病变深度一般不超过粘膜肌层, 病变恢复后不留疤痕。我们用肉眼鉴定胃粘膜的出血斑点并计数。

* 本工作得到国家自然科学基金资助。
收稿日期: 1988-07-01, 修回日期: 1989-06-27

二、实验用维酶素溶液

维酶素是用新鲜黄豆渣以类酵母菌经固体发酵而制成的一种复合制剂，它除保留有黄豆中原有一些成份外，经生物合成又产生了多种新的有效成份，主要为脂溶性核黄素衍生物，其它有维生素 B_{12} 及微量脂溶性维生素、辅酶，以及必需氨基酸等。在此制剂中还含有微量元素Fe、Mn、Mo、Zn、Cu等。此制剂最初名为“粗制核黄素”(Crude Riboflavin Preparation)。实验用维酶素溶液是将维酶素经乙醚抽提冰冻干燥后溶于生理盐水中待用。

三、本实验所选用的动物

为180—220克正常、健康、成熟的雌性Wistar种大白鼠，随机分为三组，每组十只，分别在下列不同条件下平行饲养于笼中，喂予常规饲料与水七天：

第一组大白鼠每天在同一时间注射1mL生理盐水，作为正常对照组。

第二组大白鼠前六天每天注射1mL生理盐水，第七天空腹注射1mL浓度为5mg/mL的消炎痛溶液，注射后五小时开始即可形成典型的急性胃粘膜病变模型。简称为胃病变模型组。

第三组大白鼠前六天每天注射1mL浓度为1mg/mL的乙醚抽提的维酶素生理盐水溶液（约与每日人的用药剂量相当），同于第七天注射1mL浓度为5mg/mL的消炎痛溶液，这组是用以观察维酶素对急性胃粘膜病变形成的影响，称为维酶素影响胃病变组。以上皆为皮下注射。

以上各组动物在最后一次注射后12小时断颈，分别取出各组大白鼠的胃，每组由10个胃组成，然后按下面的方法在完全相同的条件下制备各组的胃($H^+ + K^+$)-ATPase膜囊泡，并比较各组间胃($H^+ + K^+$)-ATPase的比活差异。

四、大白鼠胃($H^+ + K^+$)-ATPase膜组份的制备过程

在 0°C 或 0°C 以下进行，首先将大白鼠胃粘膜组织刮落层悬浮于50mL匀浆液中(113mmol/L甘露醇，37mmol/L蔗糖，0.2mmol/L EDTA，50mmol/L Tris-HCl, pH7.4)，用匀浆器上下匀浆20次后，差速离心以除去线粒体和细胞核等杂质膜碎片^[5]，所得的粗胃($H^+ + K^+$)-ATPase膜组份悬浮液进一步在37%和50%的不连续梯度缓冲液上进行超速离心分离(100000g \times 45min)，收集位于37%与上清液界面层的纯化的含有($H^+ + K^+$)-ATPase的膜组分，悬浮在等渗液中于液氮中保存，作为待测($H^+ + K^+$)-ATPase活力之用。

五、大白鼠胃粘膜($H^+ + K^+$)-ATPase活力测定

反应介质为，40mmol/L Tris-醋酸，180mmol/L蔗糖，2mmol/L MgCl_2 ，1mmol/L 鸟本苷，2mg/mL Oligomycin，2.5mmol/L ATP，14mmol/L KCl(或14mmol/L氯化胆碱)。水解释放的无机磷按文献[6]测定。测定蛋白按Lowry方法^[7]。

我们共进行三次实验，每次对三组动物在胃取出后均用预冷的生理盐水洗去渣滓，对胃出血点进行鉴定与计数比较。

结 果

一、急性胃粘膜出血性病变动物模型的形成

实验前 24 小时, 选用的大白鼠即停止喂食, 仅给予水。临实验前, 称取 1g NaHCO_3 溶于 100mL 水中, 待溶后, 再称取 500mg 的消炎痛 (Indometacin) (石家庄制药厂生产) 倾入以上溶液中, 于磁力下搅拌至全溶, 其最终浓度为 5mg/mL。利用消毒后的注射针头吸取以上消炎痛液 1mL, 于实验组大白鼠皮下注入 (而对照组则注射 1mL 的生理盐水), 然后, 在注射后的 12 小时, 采用断头法杀死动物, 取出胃, 沿幽门部打开, 除去积聚在胃内的渣滓, 洗净, 此时即可明显见到实验组动物胃粘膜上表现出弥漫性的出血点和条状 (如 Fig.1 所示), 成功率为 100%, 无一例外。(见 Fig.1)

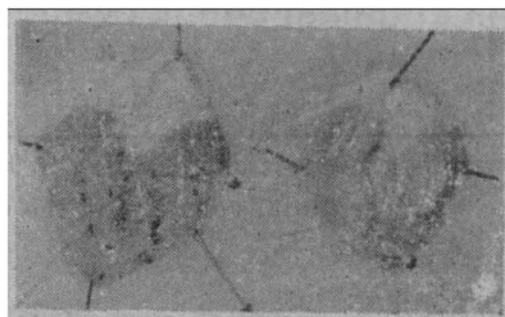


Fig.1 Comparison of Gastric Mucosa between Normal Rat Stomach (Right) and the Rat Stomach after Indometacin Injection (Left)

一、Table 1、Table 2 给出了正常对照组、病变组、维酶素影响组的大白鼠胃粘膜 ($\text{H}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 的比活以及总活力的比较。三次实验的结果均表明病变组胃膜组分 ($\text{H}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 的比活力大大低于正常组胃膜组分 ($\text{H}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 的比活力 (平均仅为正常组的 28%)。而且, 病变组 ($\text{H}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 总活力下降的程度与其比活的下降程度基本一致。而且我们发现维酶素影响组的大白鼠胃粘膜组分 ($\text{H}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 的比活和总活力基本保持在正常对照组膜组分 ($\text{H}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 的活力水平上, 这表明了先给大白鼠注射药用剂量的维酶素一段时间后, 可以观察到基本阻止消炎痛为诱因的急性胃粘膜病变所造成的 ($\text{H}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 活力的下降。胃粘膜上出血点也观察到显著减少 (Fig.2 所示)。

三、此外, 为了进一步探讨大白鼠急性胃粘膜病变组 ($\text{H}^+ + \text{K}^+$)-ATPase 活力大大下降

Table 1 Comparison of the specific activity of ($\text{H}^+ + \text{K}^+$)-ATPase

Experiment	Group 1		Group 2		Group 3	
	Spec. Act.	%	Spec. Act.	%	Spec. Act.	%
1	9.62	100	1.37	14	7.90	82
2	5.20	100	2.10	40	5.60	107
3	1.38	100	0.41	30	1.45	105

Group 1: Control

Group 2: Model group of acute gastric mucosal lesion

Group 3: "Crude riboflavin Preparation" Protecting group

The specific activity is defined as $\mu\text{mol ATP hydrolyzed/mg.h.}$ and the activity of the control group is taken as 100%

Table 2 Comparison of the Total Activities of (H⁺ + K⁺) -ATPase

Experiment	Group 1			Group 2			Group 3		
	Tot.	Act.	%	Tot.	Act.	%	Tot.	Act.	%
1	19.24		100	2.74		14	15.8		82
2	24.96		100	8.65		35	26.21		105
3	4.14		100	1.44		35	4.35		105

group1, 2 and 3 refer to the legend of table 1

The total activity of the control group is taken as 100%

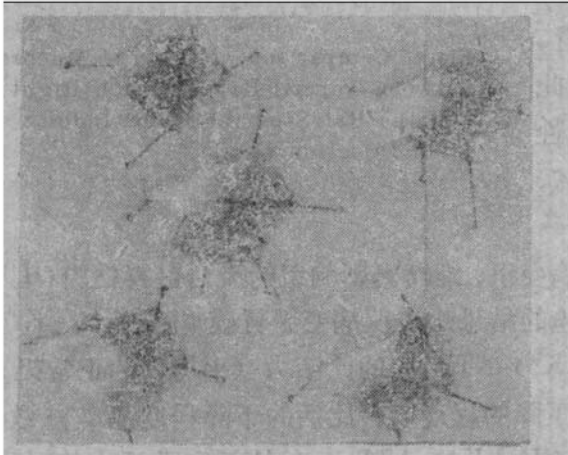


Fig.2 Gastric Mucosa of Rat Stomach with "Crude Riboflavin Preparation" Protection before Indometacin Injection.

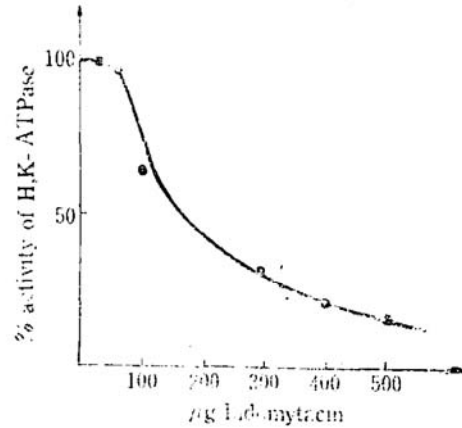


Fig.3 In vitro, the Inhibitory Effect of Indometacin on the Activity of Gastric (H⁺ + K⁺) -ATPase. After Incubating various Concentration of Indometacin with Gastric Mucosal Membrane of Rats in 20°C 10 Minutes, the Activities of (H⁺ + K⁺) -ATPase Were Measured. The Activity of (H⁺ + K⁺) -ATPase in the Absence of Indometacin was Taken as 100%

的原因,我们在离体条件下分别测定了不同的消炎痛浓度对正常的大白鼠 (H⁺ + K⁺)-ATPase 的活力的影响(见Fig.3)。结果表明,在极低的消炎痛浓度下 (<2µmol), (H⁺ + K⁺)-ATPase 的活力便受到显著的抑制。

讨 论

从离体实验的结果表明消炎痛可以使胃粘膜(H⁺ + K⁺)-ATPase 活力下降,并随消炎痛的浓度增加而加强其抑制作用(Fig.3),所以推测以消炎痛为诱因造成大白鼠急性胃粘膜病变时,大白鼠胃粘膜上的胃酸分泌质子泵(H⁺ + K⁺)-ATPase 活力下降的原因可能是消炎痛直接作用的结果。由Table1与Table2的结果表明消炎痛导致的病变组(H⁺ + K⁺)-ATPase比活

力下降的程度基本上与总活力下降程度一致,这说明病变组与正常组($H^+ + K^+$)-ATPase膜制剂总蛋白产量基本不变,也就是说,消炎痛导致的病变组($H^+ + K^+$)-ATPase比活力的下降不是由于该酶量变,而是由于质变,这可能是消炎痛直接作用于($H^+ + K^+$)-ATPase影响其构象所致,但这一变化为何引起胃粘膜成表性出血造成急性胃粘膜损伤尚有待于进一步探讨。因为胃酸分泌的调节是一个十分复杂的多层次调节体系,对于胃酸分泌失调疾病机理的探讨尚有待整体、器官、细胞、分子等多种水平加以综合研究。

当一定浓度的维酶素存在于体内时,可以使消炎痛对胃粘膜($H^+ + K^+$)-ATPase的抑制作用减弱,即是使($H^+ + K^+$)-ATPase活力增高,甚至恢复到原来的水平(Table1、Table2),并使消炎痛导致的急性胃粘膜出血点也减轻(Fig.2、Fig.3),这似乎是维酶素对($H^+ + K^+$)-ATPase有保护作用,但维酶素成份复杂,它与胃粘膜($H^+ + K^+$)-ATPase的相互作用以及对胃病变的药理机制还不清楚,尤其临床应用维酶素于萎缩性胃炎有特殊疗效的机理等都还有待于进一步探究。但是从我们的初步研究结果表明似乎急性胃粘膜病变的发生和预防都与胃($H^+ + K^+$)-ATPase有着十分密切的关系。

致谢: 对许桂珍、安其标同志在维酶素的抽提与胃粘膜制备中给予的帮助表示衷心感谢。

参 考 文 献

- [1] 张锦坤、陆廉贝等,内科讲座—胃肠疾病第4章,1984,北京:人民卫生出版社。
- [2] Elander B et al. *Scand J Gastroenterol*, 1986, 21:268—272.
- [3] 郭燕世等.生理学报,1985, 37:229—234.
- [4] 王德民、鲁立:北医学报,1985, 17(1):15—18.
- [5] Forte J G et al. *Gastroenterology*, 1982, 69:175—189.
- [6] Tsai C M et al. *Biochim Biophys Acta*, 1975, 401:196—212.
- [7] Lowry O H et al. *J Biol Chim*, 1951, 193:165—175.

Study on the Relation Between Gastric($H^+ + K^+$)-ATPase and Acute Gastric Mucosal Lesion

Zuo, Feng-rong Wu, Tong-le Li, Sheng-guang
Chen, Cai-qin Lin, Zhi-huan
(*Institute of Biophysics Academia Sinica, Beijing*)

Abstract A preliminary investigation on the relation between the acute gastric mucosal lesion and the activity of gastric mucosal ($H^+ + K^+$)-ATPase is presented in this paper. The experimental results showed that when the acute gastric mucosal lesion of rats induced by indometacin appeared the activity of acid transporting ($H^+ + K^+$)-ATPase was inactivated. In vitro, even in low concentration of indometacin $< 2\mu\text{mol}$ the decrease of gastric mucosal ($H^+ + K^+$)-ATPase activity was significantly. In vivo, the drug "crude riboflavin preparation" could exert its effect by protecting the gastric mucosal ($H^+ + K^+$)-ATPase from the inhibition caused by indometacin.

Key words: Gastric mucous membrane, Acute gastric mucosal lesion, ($H^+ + K^+$)-ATPase, Indometacin, Crude riboflavin preparation