

应激对大鼠胃黏膜黏液层 pH 梯度的影响

湛先保, 李兆中*, 邹多武, 许国铭 (第二军医大学长海医院消化内科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**观察应激对大鼠胃黏膜黏液层 pH 梯度的影响。**方法:**制作锑微电极,测定标准溶液的电位(mV)值,绘制 pH-mV 标准曲线。40 只大鼠随机均分为 4 组。对照组不施加应激,其他 3 组大鼠分别施加水浸束缚应激 1、2 和 4 h 后,以生理盐水冲洗胃腔,以 0.01 mol/L 盐酸溶液酸化胃腔 10 min,取腺胃黏膜以锑微电极测定胃黏液层 pH 梯度。**结果:**锑微电极在 pH 相同但组成不同的标准溶液中测定电位结果不同,但在同一组成的标准缓冲系统中 pH-mV 呈直线相关。应激 1 h 组黏液层 pH 梯度明显高于对照组($P<0.05$),黏液层胃腔侧 pH 明显低于对照组($P<0.05$),黏液层上皮侧 pH 与对照组无显著的统计学差异;应激 2 h 组黏液层胃腔侧 pH 较对照组无明显差异,但明显高于应激 1 h 组($P<0.05$),与对照组及应激 1 h 组相比,黏液层上皮侧 pH 及 pH 梯度明显降低($P<0.01$);应激 4 h 组黏液层胃腔侧 pH 明显高于其他 3 组($P<0.05$),黏液层上皮侧 pH 较应激 2 h 组无明显变化,但明显低于应激 1 h 组及对照组($P<0.01$),黏液层 pH 梯度显著低于其他 3 组($P<0.01$)。**结论:**胃黏膜维持黏液层 pH 梯度的功能在应激早期明显增强,而应激后期明显减弱;应激后期胃黏膜上皮层 pH 明显降低,提示黏膜上皮层明显酸化。

[关键词] 应激;胃黏膜;黏液;胃酸

[中图分类号] R 333.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)04-0377-04

Influence of stress on maintaining pH gradients of rat gastric mucus

ZHAN Xian-bao, LI Zhao-shen*, ZOU Duo-wu, XU Guo-ming (Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To observe the influence of stress on maintaining pH gradients of rat gastric mucus. **Methods:** Antimony microelectrodes were prepared according to the literature reported. The pH-mV curves of antimony microelectrode in different buffers were plotted. Forty rats were evenly randomized into 4 groups, including control group (without stress), 1 h-, 2 h- and 4 h- stress groups. Rats in the latter 3 groups received water immersion restraint stress. The gastric cavities in 4 groups were lavaged with normal saline, followed by lavage with 2 ml hydrochloric acid solution (0.01 mol/L) for 10 min, then the glandular mucosa of stomach was sampled and their mucus pH gradients were measured by antimony microelectrodes. **Results:** The voltages determined by antimony microelectrode in different buffers with the same pH value were different, but they showed a linear correlation with pH-mV in the same buffer. Compared with control group, the 1 h-stress group had an increased pH gradient ($P<0.05$) and a decreased luminal-mucus interface pH value ($P<0.05$); the above 2 groups had a similar mucus-epithelial interface pH value ($P>0.05$). Luminal-mucus interface pH value in 2 h-stress group was similar to that in the control group ($P>0.05$), but was higher than that of 1 h-stress group ($P<0.05$). Compared with 2 h-stress group, the mucus-epithelial interface pH value and the pH gradient in the control and 1 h-stress group were significantly higher ($P<0.01$). The luminal-mucus interface pH value in the 4 h-stress group was significantly higher than those of the other 3 groups ($P<0.05$). The mucus-epithelial interface pH in the 4 h-stress group was similar to that in the 2h-stress group, but was lower than those of the control and 1 h-stress groups ($P<0.01$). The pH gradient in the 4 h-stress group was markedly lower than those in the other 3 groups ($P<0.01$). **Conclusion:** The results suggest that the gastric mucosa has an obviously improved ability in maintaining mucus pH gradient during the early stage of stress, and a decreased ability during the later stage of stress. The decrease of mucus-epithelial interface pH value during the late stage of stress indicates that the gastric mucosa undergoes obvious acidosis.

[KEY WORDS] stress; gastric mucosa; mucus; gastric acid

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(4): 377-380]

胃黏膜处于高酸环境而不受损害与其分泌的 HCO_3^- 及黏液有关,黏液减慢 HCO_3^- 由黏膜组织向胃腔及 H^+ 由胃腔向黏膜组织的弥散速率,形成“黏液- HCO_3^- ”屏障,表现为胃壁结合黏液层胃腔侧 pH 低而上皮侧 pH 高的现象,即所谓 pH 梯

[基金项目] 军队“十一五”医药卫生科研基金科技攻关项目(06G067)。Supported by Medical and Pharmacological Grant of 11th Five-year Plan of PLA(06G067)。

[作者简介] 湛先保,博士,讲师,主治医师。

E-mail: zhanxianbao@hotmail.com

* Corresponding author. E-mail: zhsl@81890.net

度^[1-3]。pH 梯度是评价黏液-HCO₃⁻屏障功能状态和反映胃黏膜维持黏液-HCO₃⁻屏障功能的综合指标,体现了胃黏膜拮抗胃酸逆流和损伤的能力^[4]。本研究采用铈微电极技术检测应激状态下大鼠维持胃黏膜表面结合黏液层 pH 梯度功能的变化。

1 材料和方法

1.1 实验材料 健康雄性 SD 大鼠(上海西普尔-必凯实验动物有限公司,体质量 180~220 g),铈(纯度 99.99%)购自中国医药集团上海化学试剂供应站,玻璃毛细管(GG17,直径 1.5 mm,长度 10 cm)购自中国科学院上海生理所科达生物技术公司,222 型甘汞电极为上海电光器件厂产品,2XA 型生物显微镜为上海光学仪器厂产品,pH/mV/温度列表计为 Cole-Parmer Instrument Co. 产品,微电极控制仪为日本 Narishige Scientific Instrument Lab. 产品。

1.2 pH 2.0~8.0 标准溶液的制备 以柠檬酸-磷酸缓冲系统配制 pH 2.0~7.0 标准溶液;以 0.1 mol/L 磷酸缓冲系统配制 pH 6.0~8.0 标准溶液;以盐酸-生理盐水溶液(HCl-NS)配制 pH 2.0~5.0 标准溶液。所配溶液经玻璃 pH 电极校正。

1.3 铈微电极的制作 按照 Caflisch 等^[5]报道的方法,将铈粒放入软质玻璃管中部,在煤气灯上烧熔,并拉制出包裹铈的内径 1.0 mm 的细玻璃管。切取长度约 1.0 cm 的细玻璃管,去除玻璃外壁,取长度约 3~4 mm 的铈芯放入 GG17 毛细玻璃管中,上下端各插入一直径 1.0 mm 细铜丝,将铈芯固定于毛细玻璃管中间,在微电极控制仪上加热(电流为 11 A,拉力为电极自身质量),拉出上下两根铈微电极。在铈微电极玻璃管中填入石墨粉固定铜丝,最后用树脂固定、固化。使用前将铈微电极尖端磨平,在 pH 7.0 缓冲液中过夜活化。

1.4 黏膜表面 pH 梯度测定系统的构建 将生物显微镜改制成微电极操纵仪,即将直径 100 μm 左右的铈微电极及甘汞电极固定于显微镜物镜筒上,显微镜微调旋钮每转 1 小格即相当于电极升降 2 μm。胃黏膜标本置于铺在载物台的滤纸上,标本黏膜面朝上,滤纸经生理盐水浸湿以作盐桥用。铈微电极及甘汞电极经导线连接至 pH/mV/温度列表计,记录 mV 值。

1.5 标准曲线的制作 以上述 pH 梯度测定系统测定所配 pH 2.0~8.0 标准溶液电位值,制作 pH-

mV 标准曲线。

1.6 动物模型的制作和处理 40 只大鼠随机均分为 4 组。各组大鼠经禁食 24 h、禁水 1 h 后,乙醚浅麻醉状态下束缚于鼠板上。对照组不施加应激,其他 3 组大鼠待清醒后浸入 20°C 水中,水面平胸骨剑突水平,分别浸泡 1、2、4 h。

1.7 各组大鼠胃黏膜表面 pH 梯度的测定 大鼠应激后,以 1% 戊巴比妥钠 1 ml 腹腔注射麻醉,剖腹,结扎贲门及幽门,经胃底向胃内注入 2 ml 生理盐水冲洗胃腔后,取出胃内溶液,再以 2 ml 0.01 mol/L HCl-NS 溶液注入胃腔,10 min 后剖腹取出胃,于腺胃前后壁近中央处避开明显病变处切取 0.5 cm×0.5 cm 组织块,应用构建的黏膜表面 pH 梯度测定系统测定胃黏膜表面黏液层 pH 梯度。

1.8 统计学处理 采用 SAS 6.12 统计分析软件,各组 pH 值以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异以方差分析检验。

2 结果

2.1 标准曲线 铈微电极在 pH 相同但组成不同的标准溶液中测定电位结果不同,但在同一组成的标准缓冲系统中 pH-mV 呈直线相关。经换算得斜率为:pH 2.0~7.0 柠檬酸-磷酸缓冲液 28~34 mV/pH,pH 6.0~8.0 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 45 mV/pH,pH 2.0~5.0 HCl-NS 溶液 48~65 mV/pH(图 1)。结果表明铈微电极所测电位值与 pH 值呈正相关,可换算成 pH 值。

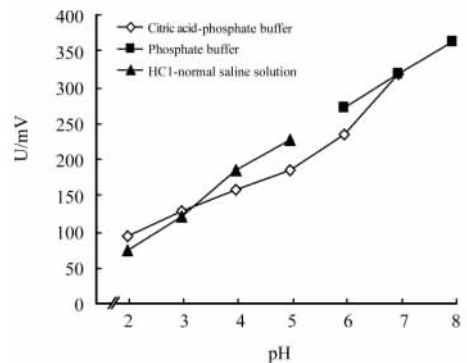


图 1 不同缓冲液铈微电极 mV-pH 标准曲线
Fig 1 mV-pH curves of antimony microelectrode in different buffers

2.2 酸化胃腔后各组大鼠黏液层胃腔侧 pH、上皮侧 pH 及黏液层 pH 梯度的变化 经 0.01 mol/L

HCl-NS 酸化处理胃黏膜 10 min 后, 对照组大鼠胃黏膜表面黏液层存在 pH 梯度; 应激 1 h 组黏液层 pH 梯度明显高于对照组 ($P < 0.05$), 提示胃黏膜维持黏液层 pH 梯度功能增强, 黏液层胃腔侧 pH 明显低于对照组 ($P < 0.05$), 黏液层上皮侧 pH 与对照组无显著的统计学差异; 应激 2 h 组黏液层胃腔侧 pH 较对照组无明显差异, 但明显高于应激 1 h 组 ($P <$

0.05), 与对照组及应激 1 h 组相比黏液层上皮侧 pH 及 pH 梯度明显降低 ($P < 0.01$); 应激 4 h 组黏液层胃腔侧 pH 明显高于其他 3 组 ($P < 0.05$), 黏液层上皮侧 pH 较应激 2 h 组无明显变化, 但明显低于应激 1 h 组及对照组 ($P < 0.01$), 提示上皮层发生酸化, 黏液层 pH 梯度显著低于其他 3 组 ($P < 0.01$), 提示胃黏膜维持黏液层 pH 梯度功能减弱。见表 1。

表 1 酸化胃腔后黏液层胃腔侧 pH、上皮侧 pH 及黏液层 pH 梯度变化

Tab 1 Changes of luminal-mucus interface pH values, mucus-epithelial interface pH values and gastric mucus pH gradients of acidified stomach

($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Group	Luminal-mucus interface pH values	Mucus-epithelial interface pH values	Gastric mucus pH gradients
Control	2.57 ± 0.42	5.44 ± 0.77	2.87 ± 0.63
1 h-stress	2.34 ± 0.38*	5.60 ± 0.72	3.26 ± 0.58*
2 h-stress	2.74 ± 0.50 Δ	4.22 ± 0.43** $\Delta\Delta$	1.48 ± 0.32** $\Delta\Delta$
4 h-stress	3.32 ± 0.53* $\Delta\Delta$	4.19 ± 0.75** $\Delta\Delta$	0.87 ± 0.48** $\Delta\Delta\Delta$

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs 1 h-stress group; Δ $P < 0.05$, $\Delta\Delta$ $P < 0.01$ vs 2 h-stress group

3 讨论

1978 年 Caflisch 等^[5]首先报道了用于组织内 pH 测定的铈微电极技术, 其原理为铈在水溶液中形成稳定的氧化物 (Sb_2O_3), 与溶液中 H^+ 反应形成电势, 其电位差高低与 H^+ 活度 (pH) 成正比, 在 pH 1.0~8.0 缓冲液中呈线性关系, 可用于测定组织内 pH。本实验所制作的铈微电极在不同 pH 标准系统中, 尽管读数与斜率不尽相同, 但在同一缓冲系统中, 电位值与 pH 值线性正相关, 与文献报道一致, 因此可用于测定并反映组织 pH 趋势。因 HCl-NS 接近黏液层内电解质组成, 文献报道中多以其作为标准 pH 参照系统。本实验以其作为标准 pH 参照系统, 测定的胃黏液层上皮侧 pH 明显低于 pH 7.0 的中性值, 可能与参照系统、测定温度、pH/mV/温度列表计阻抗等因素有关。

1981 年 Williams 等采用铈微电极技术首先证实了当以 0.01 mol/L HCl-NS 酸化离体的兔胃黏膜时胃黏液层存在 pH 梯度, 黏液层胃腔侧和上皮侧 pH 值分别为 2.31 ± 0.04 和 7.26 ± 0.15 。此后许多文献报道离体的人、兔、蛙胃黏膜及在体的兔、犬、人胃黏膜表面存在 pH 梯度。目前一般认为胃黏液层 pH 梯度与胃黏膜功能状态密切相关^[3,6-8]。文献报道五肽胃泌素刺激最大胃酸分泌时, 大鼠胃黏液层 pH 梯度仍存在, 表明在最大泌酸状态下胃黏膜

仍可维持黏液层 pH 梯度。胃黏膜损伤后, 组织和血浆内 HCO_3^- 漏入胃腔时有助于在胃黏液层重建 pH 梯度。当用吲哚美辛 (消炎痛) 诱发胃黏膜损伤时, 可发现局部黏液层 pH 梯度升高。损伤后黏膜表面形成黏液帽, 可形成较大 pH 梯度, 即使在暴露于 0.15 mol/L HCl 情况下也能维持 1 h。抑制前列腺素合成或诱导胃黏膜血流降低可破坏 pH 梯度。在预实验中我们观察了胃黏膜未经 0.01 mol/L HCl-NS 酸化情况下各组黏液层 pH 梯度, 发现对照组黏液层胃腔侧 pH 较高, 黏液层 pH 梯度较低, 而应激各组黏液层胃腔侧 pH 及黏液层 pH 梯度差异颇大, 这是由于各组大鼠在不同应激强度下胃黏膜分泌状态、胃腔内酸度、黏液组成及功能不同之故, 难以反映胃黏膜维持黏液层 pH 梯度的功能。因此本实验在测定黏液层 pH 梯度前先以生理盐水冲洗胃腔, 去除腔内存在的胃酸, 再以 0.01 mol/L HCl-NS 酸化胃黏膜, 以使胃黏膜处于同等酸度刺激状态, 此时黏液层 pH 梯度的变化可反映胃黏膜维持黏液层 pH 梯度功能。

本实验发现对照组以 0.01 mol/L HCl 酸化胃腔后, 黏膜表面存在 pH 梯度。应激 1 h 组黏液层胃腔侧 pH 低于对照组, 系应激刺激酸分泌之故; 黏液层上皮侧 pH 与对照组无显著差异, 因而 pH 梯度略有升高, 可能系自身保护现象。应激 2 h 组大鼠胃腔侧 pH 较对照组升高, 为血浆及组织液漏入胃

腔并中和了灌注的 HCl 溶液所致;黏液层上皮侧 pH 较对照组及应激 1 h 组降低,系酸逆流入上皮层导致上皮层明显酸化之故;黏液层 pH 梯度下降提示胃黏膜维持 pH 梯度功能减弱。应激 4 h 组黏液层胃腔侧 pH 显著升高,可能为血浆及组织液漏入胃腔加重所致;黏液层上皮侧 pH 明显降低,表明上皮层明显酸化;黏液层 pH 梯度降低至应激 1 h 组 30%,表明胃黏膜维持黏液层 pH 梯度功能明显减弱。大体检查也发现应激 2 h 胃黏膜有糜烂等表现,应激 4 h 胃黏膜病变加重、出血增加,提示血浆及组织液渗出可能是改变黏液层 pH 的原因。

胃黏膜 pH 梯度反映了黏液-HCO₃⁻屏障的功能,pH 梯度的维持需要正常的黏液凝胶层及 HCO₃⁻[8]。任何对这两方面有影响的因素均可能破坏 pH 梯度。本实验结果直观地描述了应激状态下胃黏膜维持“黏液-HCO₃⁻”屏障功能的变化,其机制可能与胃碱分泌或黏液层 H⁺ 通透性变化有关,需要进一步研究。

[参考文献]

[1] Schreiber S,Nguyen T H,Stuben M,et al. Demonstration of a

pH gradient in the gastric gland of the acid-secreting guinea pig mucosa[J]. *Am J Physiol*,2000,279: G597-G604.
 [2] Phillipson M. Acid transport through gastric mucus[J]. *Ups J Med Sci*, 2004,109:1-24.
 [3] Tanaka S, Meiselman H H,Engel E, et al. Regional differences of H⁺, HCO₃⁻, and CO₂ diffusion through native porcine gastroduodenal mucus[J]. *Dig Dis Sci*, 2002,47:967-973.
 [4] Allen A,Flemström G. Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*,2005,288:1-19.
 [5] Caflisch C R,Pucacco L R,Carter N W. Manufacture and utilization of antimony pH electrodes[J]. *Kid International*,1978, 14:126-141.
 [6] Konturek S J,Konturek P C,Pawlik T, et al. Duodenal mucosal protection by bicarbonate secretion and its mechanisms[J]. *J Physiol Pharmacol*,2004,55(Suppl 2):5-17.
 [7] Baumgartner H K,Montrose M H. Regulated alkali secretion acts in Tandem with unstirred layers to regulate mouse gastric surface pH[J]. *Gastroenterology*,2004,126:774-783.
 [8] Phillipson M,Atuma C,Henriksnas J, et al. The importance of mucus layers and bicarbonate transport in preservation of gastric juxtamucosal pH[J]. *Am J Physiol*,2002,282:G211-G219.

[收稿日期] 2006-11-16

[修回日期] 2007-03-02

[本文编辑] 曹 静

• 书 讯 •

《肿瘤用药与伽玛刀治疗》已出版

本书由李宏斌,戴德银主编,人民军医出版社出版,ISBN 号 978-7-5091-0649-5,大 32 开,平装,358 页,29.2 万字,定价 29.00 元。

本书共 3 篇 17 章,第一篇介绍了 44 种常见肿瘤的流行病学、临床表现、诊断要点、防治措施及临床用药;第二篇阐述了 140 余种抗肿瘤药物的作用特点、适应证、用法用量、不良反应及注意事项;其中属于 2004 年版《国家基本医疗保险和工伤保险药品目录》的甲类和乙类品种分别用“甲类”、“乙类”,收载 2005 年版《中华人民共和国药典》中的药品则以“典”字为代表,标注于相应通用药名的右上角“[]”中,便于读者快捷检查、参考。第三篇介绍了 17 种常见肿瘤的伽玛刀治疗方法、照射剂量及疗效评估,并附治疗前后对照彩图 75 幅。全书内容丰富,资料翔实,图文并茂,对肿瘤诊断、治疗和预防具有重要参考价值,适合临床医师、药师及相关专业人员阅读参考,亦可供肿瘤患者及其亲属求医问药时参阅。

本书由人民军医出版社市场部发行。

通讯地址:北京市 100036 信箱 188 分箱,邮编:100036

电话:010-51927252;010-51927300-8168。E-mail: wanglan@pmp.com.cn