

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2007)17-1573-03

一氧化氮在埃索美拉唑对大鼠胃黏膜损伤保护中的作用

乐桥良 张志坚 林克荣 (南京军区福州总医院消化科 福建 福州 350025)

Role of nitric oxide in the protective effect of esomeprazole on gastric mucosal lesion in rats

LE Qiao-Liang ZHANG Zhi-Jian LIN Ke-Rong

Department of Gastroenterology Fuzhou General Hospital Nanjing Military Command Fuzhou 350025 ,China

【Abstract】 AIM : To observe the role of nitric oxide (NO) in the protective effect of esomeprazole on the gastric mucosal lesion in rats. **METHODS** : Before gastric mucosal lesion was made in rats by pure alcohol , esomeprazole (20 mg/kg) was administered into the gastric chamber and N_ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME , 4 mg/kg) , L-arginine (250 mg/kg) and D-arginine (250 mg/kg) were injected intravenously. Gastric mucosal blood flow (GMBF) was assessed with laser Doppler flowmetry (LDF) , gastric mucosal and serum NO₂⁻/NO₃⁻ were measured by cadmium granulation reduction and colorimetric method , and the changes of ulcer index and the severity of tissues necrosis and neutrophils infiltration were observed. **RESULTS** : Ulcer index of the esomeprazole group was much lower than that of the control group (*P* < 0.01) , and the degree of tissues necrosis and neutrophils infiltration were much milder than those of the control group (*P* < 0.01) . The protective effect of esomeprazole was significantly decreased by prior administration of L-NAME. The inhibitory effect of L-NAME was antagonized by prior administration of L-arginine , but not D-arginine. Esomeprazole administered into the gastric chamber obviously increased GMBF , gastric mucosal and serum NO₂⁻/NO₃⁻ , which was prevented by pretreatment with L-NAME , but the antisecretory effect of esomeprazole was not affected by L-NAME. **CONCLUSION** : Esomeprazole has some NO-mediated protective effect against gastric mucosal lesion in rats and the action of esomeprazole against gastric acid secretion contributes little to the protective effect.

【Keywords】 nitric oxide ;esomeprazole ;gastric mucosal lesion ; cytoprotection rats

【摘要】目的 探讨一氧化氮(NO)在埃索美拉唑对大鼠胃黏膜损伤保护中的作用。方法 在乙醇诱导大鼠胃黏膜损伤

收稿日期 2006-12-18 ; 接受日期 2007-04-23

作者简介 乐桥良, 硕士, 副主任医师。Tel (0591)87893856 Email :

Leqiang@sohu.com

前, 预先给予埃索美拉唑(20 mg/kg)灌胃, L-硝基-精氨酸甲酯(L-NAME 4 mg/kg)、L-精氨酸(250 mg/kg)及 D-精氨酸(250 mg/kg)静脉注射。采用激光多普勒血流计(LDF)测定胃黏膜血流量(GMBF)、铜粒还原和比色法测定胃黏膜和血浆 NO₂⁻/NO₃⁻ 含量, 并观察了胃黏膜损伤指数(UI)、溃疡坏死组织和中性粒细胞浸润严重程度的变化。结果 :与模型损伤组比, 埃索美拉唑组大鼠 UI 降低(*P* < 0.01)、溃疡坏死组织和中性粒细胞浸润程度减轻(*P* < 0.01)。预先用 L-NAME 处理后, 埃索美拉唑保护胃黏膜损伤作用减弱, L-NAME 抑制作用可被 L-精氨酸拮抗, 而不被 D-精氨酸拮抗。向胃内灌注埃索美拉唑, 可增加 GMBF, 胃黏膜和血浆 NO₂⁻/NO₃⁻。L-NAME 可逆转这种作用, 但对埃索美拉唑抑制胃酸分泌作用无明显影响。结论 埃索美拉唑对大鼠胃黏膜损伤保护作用与 NO 有关, 这一作用与抑制胃酸分泌无关。

【关键词】 一氧化氮; 埃索美拉唑; 胃黏膜损伤; 细胞保护; 大鼠

【中图分类号】 R573.1 **【文献标识码】** A

0 引言

埃索美拉唑(esomeprazole)是人工合成的新一代质子泵抑制剂(proton pump inhibitor ,PPI) ,对酸分泌有显著的抑制作用^[1] ;同时对胃黏膜具有保护作用^[2-4]。一氧化氮(nitric oxide ,NO)是扩血管物质, 可增加胃黏膜血流量(GMBF) ,对胃黏膜具有保护作用^[5]。我们研究 NO 在埃索美拉唑对大鼠胃黏膜损伤保护中的作用, 探讨埃索美拉唑对胃黏膜保护作用的可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料 埃索美拉唑是阿斯利康公司提供的产品, L-硝基-精氨酸甲酯(N_ω-nitro-L-arginine methyl ester ,L-NAME)为 Sigma 公司产品, L-精氨酸、D-精氨酸为上海华美工程公司产品。铜粒为上海亨新工厂产品, 甘氨酸、亚硝酸盐为上海试剂一厂产品, 硫酸铜、N-1-奈乙胺盐酸盐为上海试剂三厂产品, 对氨基苯磺酸为上海山海科技研究所产品, 硫酸、硫酸锌、氢氧化钠、酚红为上海试剂二厂产品。雄性 SD 大鼠(上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供) , 体质量 200 ~ 260 g , 实验前禁食、不禁水 24 h。XHF-1 高速分解器为上海金山生化仪器厂产品, TG₃₂₈ B 型分析天平为

上海天平仪器厂产品 801 型离心机为上海手术器械厂产品, 724 微机型可见分光光度计为上海光学仪器厂产品, 眼科手术器械一套。激光多普勒血流计 (LDF) LDF-III 型, 南开大学制造, 技术参数如下: He-Ne 光源, 功率 2 mW, 输出功率 > 1 mW, 光纤长 2.5 m, 测定范围为 1 mm 半球区域, 量程选 ×1 档, 时间常数 1 s 档, 频率为 4 kHz。

1.2 方法 大鼠禁食 24 h 后, 30 g/L 戊巴比钠 (4 mg/kg) ip 麻醉, 用无水乙醇 1 mL 灌胃, 1 h 后腹正中切口进入腹腔, 沿胃大弯处剪开胃, 并进行各项实验指标测定。取 SD 大鼠 110 只, 分为 6 组, I ~ IV 组每组 22 只, V, VI 组每组 11 只。I 组: 假手术组, 作为正常对照; II 组: 损伤模型组, 作为损伤对照; III 组: 埃索美拉唑组, 在用无水乙醇灌胃 30 min 前, 向胃内灌注埃索美拉唑 (20 mg/kg)。IV 组: L-NAME 组, 用埃索美拉唑灌胃前 20 min, iv L-NAME (4 mg/kg)。V 组: L-精氨酸 (L-arginine) 组, 在 iv L-NAME 15 min 前, iv L-精氨酸 (250 mg/kg)。VI 组: D-精氨酸 (D-arginine) 组, 在 iv L-NAME 15 min 前, iv D-精氨酸 (250 mg/kg)。I ~ IV 组又各分成 2 小组, 每小组 11 只, 其中 1 组用于胃酸、GMBF、胃黏膜和血浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 测定, 另 1 组用于胃黏膜损伤指数 (ulcer index, UI) 判定和组织学观察。对照组给予等量的生理盐水。取胃液 2 mL, 加酚红指示剂 2 滴, 黄色表示有胃酸存在, 用 0.1 mol/L 氢氧化钠滴定至粉红色, 所耗氢氧化钠 (mL) × 50, 即为胃酸浓度 (mmol/L), 并换算成 pH。

1.2.1 GMBF 测定 采用 LDF 测定 GMBF, 开机预热 30 min 调出 LDF-III GMBF 测定程序, 从胃大弯处作一小切口, 用 LDF 的探头轻轻垂直接触胃黏膜表面, 待血流稳定后, 在胃体大小弯、胃窦大小弯取 4 点测定 GMBF, 取其平均值, 以激光多普勒信号电压值 (mV) 表示血流量的相对数值。

1.2.2 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量测定 用钝性刀片刮取胃黏膜, 组织匀浆, 离心后取上清液, -20℃ 贮存待测; 取外周血 2 mL, EDTA 抗凝, 离心后取上清液, -20℃ 贮存待测; $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量采用镉粒还原和比色法测定^[6]。

1.2.3 UI 判定 按 Guth 标准计算 UI, 处死动物, 取出胃及十二指肠, 沿大弯侧剪开后, 展平, 按溃疡或糜烂面积大小给予计分: 斑点状糜烂为 1 分, 糜烂 < 1 mm 为 2 分, 糜烂介于 1 ~ 2 mm 之间为 3 分, 糜烂为 2 ~ 4 mm 为 4 分, 糜烂 > 4 mm 为 5 分。

1.2.4 组织学观察 全胃用 40 g/L 甲醛固定, 制成石蜡切片, HE 染色光镜下观察, 评定标准如下: ① 坏死物质: 未见为 0, 仅在溃疡底面边缘有少许为 (+),

薄层覆盖整个溃疡底为 (++) , 厚层覆盖为 (+++) 。② 中性粒细胞浸润: 未见为 0, 偶见 (+), 明显 (++), 介于后两者之间为 (++)。

统计学处理: 对计量资料, 多组之间比较采用方差分析, 组间两两比较采用 SNK-*q* 检验, 组间方差不齐时, 采用 Kruskal-Wallis 检验及 Wilcoxon 检验, 对计数资料, 组间比较采用 Fisher 确切概率法。

2 结果

2.1 UI 测定 损伤模型组大鼠 UI 比正常对照组升高 ($P < 0.01$); 埃索美拉唑组与损伤模型组比降低 ($P < 0.01$); L-NAME 组与损伤模型组比无统计学差异 ($P > 0.05$), 而比埃索美拉唑组升高 ($P < 0.01$); L-精氨酸组与损伤模型组和 L-NAME 组比均降低 ($P < 0.01$), D-精氨酸组与损伤模型组和 L-NAME 组比均无统计学差异, 而比埃索美拉唑组升高 ($P < 0.01$, 表 1)。

2.2 胃组织学观察 损伤模型组大鼠溃疡底部可见大量坏死物质, 周围组织中中性粒细胞浸润明显; 埃索美拉唑组溃疡底部坏死物质和周围组织中中性粒细胞浸润均比损伤模型组减轻 ($P < 0.01$); L-NAME 组溃疡底部坏死物质和周围组织中中性粒细胞浸润与损伤模型组比均无统计学差异 ($P > 0.05$), 而比埃索美拉唑组严重 ($P < 0.01$); L-精氨酸组与损伤模型组和 L-NAME 组比二者均减轻 ($P < 0.01$), 与埃索美拉唑组比无统计学差异 ($P > 0.05$); D-精氨酸组与损伤模型组和 L-NAME 组比二者均无统计学差异, 而比埃索美拉唑组严重 ($P < 0.01$, 表 1)。

表 1 各组大鼠 UI 变化和组织学观察 ($n = 11, \bar{x} \pm s$)

组别	UI	坏死物质		中性粒细胞浸润	
		≤ +	++/+++	≤ +	++/+++
I	0	-	-	-	-
II	25.4 ± 2.2	2	9	2	9
III	5.7 ± 0.7 ^b	9	2 ^b	8	3 ^b
IV	24.3 ± 2.5 ^d	2	9 ^d	3	8 ^d
V	5.6 ± 0.9 ^b	9	2 ^b	9	2 ^b
VI	25.2 ± 2.7 ^d	2	9 ^d	2	9 ^d

^b $P < 0.01$ vs II, ^d $P < 0.01$ vs III.

2.3 GMBF 测定 损伤模型组大鼠 GMBF 与正常对照组比降低 ($P < 0.01$), 埃索美拉唑组与损伤模型组比升高 ($P < 0.05$), L-NAME 组与损伤模型组比无统计学差异 ($P > 0.05$), 而比埃索美拉唑组降低 ($P < 0.05$, 表 2)。

表2 I ~ IV组大鼠 GMBF, 胃黏膜和血浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 及胃液 pH 的变化 ($n=11, \bar{x} \pm s$)

组别	GMBF (mV)	胃黏膜 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ (nmol/L)	血浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ ($\mu\text{mol/L}$)	pH
I	322 ± 48	0.37 ± 0.03	29.94 ± 2.05	3.52 ± 0.52
II	196 ± 22 ^b	0.69 ± 0.06 ^b	54.86 ± 4.23 ^b	2.34 ± 0.26 ^a
III	298 ± 41	0.88 ± 0.08	82.41 ± 6.36	6.86 ± 0.72
IV	192 ± 23 ^c	0.41 ± 0.05 ^d	31.58 ± 3.35 ^d	6.71 ± 0.73

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs I, III; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs III.

2.4 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量 损伤模型组大鼠胃黏膜和血浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 比正常对照组均增加 ($P < 0.01$) 埃索美拉唑组比正常对照组增加 ($P < 0.01$) 亦比损伤模型组增加 ($P < 0.05$) L-NAME 组与埃索美拉唑组比减少 ($P < 0.01$) 而与正常对照组比无统计学差异 ($P > 0.05$ 表 2)。

2.5 胃液 pH 损伤模型组大鼠胃液 pH 与正常对照组比降低 ($P < 0.05$) 埃索美拉唑组与损伤模型组比升高 ($P < 0.01$) L-NAME 组与埃索美拉唑组比无统计学差异 ($P > 0.05$ 表 2)。

3 讨论

埃索美拉唑通过抑制胃壁细胞分泌小管的 $\text{H}^+/\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶, 使胃酸分泌的最终步骤阻断, 其抑制作用强而持久, 从而可以治疗消化性溃疡^[1]。有研究表明, 埃索美拉唑对胃黏膜损伤具有保护作用^[2]; Koch 等^[3]发现埃索美拉唑对消炎痛引起大鼠胃黏膜损伤有明显防治作用, 埃索美拉唑对危重患者应激性胃黏膜损害及胃黏膜出血有很好的预防作用^[4]。本实验结果显示, 预先用埃索美拉唑给由乙醇诱导胃黏膜损伤大鼠灌胃, 与损伤模型组比, 胃黏膜损伤指数明显降低, 病理组织观察, 其溃疡坏死物质和周围中性粒细胞浸润亦明显减少, 表明埃索美拉唑对大鼠胃黏膜损伤具有保护作用。

NO 是由血管内皮细胞产生血管舒张因子, Nejadkey 等^[5]发现 L-NAME (NOS 抑制剂) 能明显降低大鼠 GMBF 和胃黏膜血红蛋白含量, 表明 NO 对胃黏膜损伤有保护作用。我们用 L-NAME 预先处理大鼠, 能明显升高埃索美拉唑降低的胃黏膜损伤指数, 溃疡底部坏死物质增多, 周围中性粒细胞浸润也非常明显, 在 L-NAME 给药 15 min 前给予 L-精氨酸则能抑制这种损伤作用, 而不被 D-精氨酸抑制, 表明 NO 介导了埃索美拉唑对胃黏膜的保护作用。

本实验结果显示, 向胃内灌注埃索美拉唑, 能明显增加胃黏膜和血浆 $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$ 含量, 同时 GMBF 亦升高, 而在埃索美拉唑灌胃前 20 min 给予 L-NAME 则能逆转这种作用。本实验结果还显示, 埃索美拉唑能显著提高胃液 pH, 抑制胃酸分泌, 而 L-NAME 则对埃索美拉唑抑制胃酸分泌的作用无明显影响。

【参考文献】

- [1] Shah SA, Sander S, Coleman CI, et al. Delivery of esomeprazole magnesium through nasogastric and gastrostomy tubes using an oral liquid vehicle as a suspending agent in vitro [J]. Am J Health Syst Pharm 2006, 63(19): 1882-1887.
- [2] Genta RM, Rindi G, Fiocca R, et al. Effects of 6-12 months of esomeprazole treatment on the gastric mucosa [J]. Am J Gastroenterol, 2003, 98(6): 1257-1265.
- [3] Koch TR, Petro A, Darrabie M, et al. Effects of esomeprazole magnesium on nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy [J]. Dig Dis Sci 2005, 50(1): 86-93.
- [4] Spirt MJ. Stress-related mucosal disease: Risk factors and prophylactic therapy [J]. Clin Ther 2004, 26(2): 197-213.
- [5] Nejadkey F, Nahavandi A, Dehpour AR, et al. Role of nitric oxide in the gastro-protective effect of lithium [J]. Pathophysiology 2006, 13(2): 85-89.
- [6] 乐桥良, 林克荣, 张志坚. 一氧化氮在潘托拉唑对大鼠胃黏膜损伤保护中的作用 [J]. 第四军医大学学报, 2005, 26(23): 2166-2168.

编辑 许福明

· 消息 · 陕西省科技期刊界热烈祝贺《现代电子技术》创刊 30 周年暨进入中国科技核心期刊

2007 年 7 月 13 日下午, 陕西电子杂志社在陕西国平酒店举办了《现代电子技术》创刊 30 周年暨进入中国科技核心期刊座谈会, 全省科技期刊界 30 余种期刊的主要负责人到会并祝贺。与会者与陕西电子杂志社的新一届领导班子共同回顾了《现代电子技术》杂志 30 年来不断发展的历程, 并对取得的成绩给予高度评价, 对入选中国科技核心期刊表示热烈的祝贺。这次座谈会对于我省科技期刊界互相增进了解和交流办刊经验, 提高期刊的双效益都起到了积极的促进作用。