

$P < 0.01$. 实验中, 和胃冲剂不能对抗麻黄碱抑制胃排空和小肠传输的作用, 提示该冲剂促进胃肠动力的机制可能与肾上腺素能受体无关, 对胃部交感神经也无抑制作用.

在急性毒性实验中, 给药后小鼠一般状态良好, 毛色正常、体重增加、饮食及活动未见异常, 未发现明显毒性反应, 7 d 内无一死亡, 最大耐受倍数为 240, 大于临床用药所需最大耐受倍数 100^[18]. 这证明本药无急性毒副作用, 口服用药安全可靠.

4 参考文献

- 1 李岩, 孙思予, 周卓. 消食行气中药对小鼠胃肠动力的影响. 新消化病学杂志 1997;5:153
- 2 李岩, 孙思予, 周卓, 陈苏宁, 王光尧. 健脾行气及消食中药组合对小鼠胃肠动力的影响. 华人消化杂志 1998;6(特刊7):208-209
- 3 王学清, 王秀杰, 李岩. 香砂平胃散对小鼠胃排空的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:571-574
- 4 李岩, 王学清, 张卫卫, 王江玥. 术香冲剂对小鼠胃肠动力的影响. 世界华人消化杂志 2003;11:575-5773
- 5 王贺玲, 李岩, 白鹳, 张健. 理气中药对鼠胃肠动力的影响. 世界华人消化杂志 2004;12:1136-1138
- 6 Francis J, Crthley D, Dourish CT, Cooper SJ. Comparisons between the effects of 5-HT and DL-fenfluramine on food intake and gastric emptying in the rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1995;50:581-585
- 7 吴春福, 陈多. 小鼠胃排空模型的探讨. 中国药理学通报 1997;13:271-272
- 8 Delandy CP, McGeeney KF, Dervan P, Fitzpatrick JM. Pancreatic atrophy: A new model using serial intraperitoneal injections of L-arginine. *Scand J Gastroenterol* 1993;28:1086-1090
- 9 Ozaki H, Blondfield DP, Hori M. Spontaneous release of nitric oxide inhibits electrical Ca²⁺ and mechanical transient in canine gastric smooth muscle. *J Physiol* 1992;445:231-247
- 10 Hull KM, Maher TJ. L-tyrosine potentiates the anorexia induced by mixed-acting sympathomimetic drugs in hyperphagic rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1990;255:403-409
- 11 唐红卫, 黄裕新, 徐海峰, 高巍, 周润锁, 尚磊, 王庆利, 高峰, 安晓丽. 功能性消化不良患者症状分型、胃排空功能、胃肠激素水平的相关性. 世界华人消化杂志 2003;11:1715-1719
- 12 丁西平, 王志华, 王巧民, 殷保书, 刘兰珍, 卫梅枝. 功能性消化不良患者血清一氧化氮水平及胃黏膜乙酰胆碱酯酶变化. 安徽医科大学学报 2004;39:59-62
- 13 王春虹, 黄颖秋. 功能性消化不良患者血清一氧化氮含量与食管动力变化特征研究. 胃肠病学和肝病杂志 2002;11:361-362
- 14 黄茂涛, 王振华, 陈代陆. 氮能神经在大鼠胃电节律失常中作用的研究. 中华消化杂志 1997;17(增刊):618
- 15 伍早安, 李国成, 胡道松. 肝胃不和型功能性消化不良大鼠幽门括约肌乙酰胆碱酯酶及一氧化氮合酶的表达. 中国中西医结合消化杂志 2004;12:8-10
- 16 Yang M, Fang DC, Li QW, Sun NX, Long QL, Sui JF, Gan L. Effects of gastric pacing on gastric emptying and plasma motilin. *World J Gastroenterol* 2004;10:419-423
- 17 周吕, 王礼建, 袁勃, 王玲. 胃动素对 Cajal 间质细胞引起的大鼠胃平滑肌收缩的作用. 中华医学杂志 2003;16:1422-1427
- 18 陈奇. 中药药理研究方法学. 第1版. 北京:人民卫生出版社, 1993:118

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

重组肠三叶因子对实验性结肠炎大鼠 NO 表达、MDA 和 SOD 活性的影响

杨天, 邹开芳

杨天, 邹开芳, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科
湖北省武汉市 430022
项目负责人: 邹开芳, 430022, 湖北省武汉市, 华中科技大学同济医学院附属协和医院消化内科. tinan1010@yahoo.com.cn
电话: 027-85726113
收稿日期: 2004-11-23 接受日期: 2004-11-25

摘要

目的: 研究重组肠三叶因子(rhITF)对实验性结肠炎大鼠 NO(一氧化氮)、MDA(丙二醛)、SOD(超氧化物歧化酶)的影响.

方法: 乙酸致结肠炎的大鼠给予 rhITF 灌肠后, 肉眼及光镜下观察黏膜损伤程度及组织学变化, 并检测结肠黏膜中 iNOS mRNA 和 NO 的表达及 MDA、SOD 活性.

结果: rhITF 组的结肠黏膜损伤指数(CMDI)较模型组低(1.22 ± 0.67 vs 2.11 ± 0.60 , $P < 0.05$), rhITF 组 iNOS mRNA 较正常组和模型组表达增加, NO 含量分别为(10.32 ± 1.95) $\mu\text{mol/g}$ 、(5.31 ± 1.31) $\mu\text{mol/g}$ 、(1.03 ± 0.40) $\mu\text{mol/g}$, rhITF

组与正常组和模型组的差异均具有统计学意义($P < 0.05$). rhITF 组、模型组和正常组 MDA 含量分别为(10.82 ± 2.19) nmol/mg、(12.75 ± 0.76) nmol/mg、(8.06 ± 0.76) nmol/mg, SOD 含量分别为(506.43 ± 54.01) nkat/mg、(496.93 ± 9.34) nkat/mg、(680.97 ± 35.51) nkat/mg, rhITF 组与模型组的差异没有统计学意义.

结论: rhITF 能减轻肠黏膜炎症反应, 可能与 iNOS 和 NO 途径有关.

杨天, 邹开芳. 重组肠三叶因子对实验性结肠炎大鼠 NO 表达、MDA 和 SOD 活性的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(3):403-405
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/403.asp>

0 引言

三叶肽是新近发现的一族富含半胱氨酸的小分子多肽, 主要由乳腺癌相关肽(PS2 或 TFF1)、解痉多肽(SP 或 TFF2)和肠三叶因子(ITF 或 TFF3)组成, 他们在人体胃

肠道上皮细胞呈特异性表达,可以增加胃肠黏膜的防御能力,促进溃疡愈合,抑制肿瘤生长^[1-2].目前国内外对三叶肽对胃黏膜的作用研究较多,而针对肠道三叶肽的研究则相对较少,我们通过研究重组肠三叶因子(rhITF)对乙酸诱导的大鼠结肠炎模型一氧化氮等表达的影响来探讨三叶肽对溃疡性结肠炎的治疗作用机制.

1 材料和方法

1.1 材料 重组肠三叶因子为北京大学生命科学院提供,超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)及一氧化氮(NO)试剂盒购自南京建成生物工程研究所,Trizol试剂盒为Gibco公司产品.逆转录酶M-MLV和Taq DNA聚合酶为Promega公司产品.其他相关试剂均为分析纯产品.♂ Sprague-Dawley大鼠,体重200-220 g,由华中科技大学同济医学院实验动物中心提供.

1.2 方法

1.2.1 溃疡性结肠炎动物模型制作 ♂ Sprague-Dawley大鼠45只,200-220 g,25℃净化实验室,混合饲料喂养,自由饮水,随机分出15只作正常组,另外30只3 d后参照文献[3]方法制备大鼠结肠炎模型:禁食24 h,戊巴比妥钠30 mg/kg腹腔麻醉后,用聚乙烯导管插入鼠结肠内距肛门口7-8 cm处,然后用注射器注入80 mL/L乙酸溶液1.5 mL,30 s后用生理盐水3 mL冲洗两次,苏醒后正常饮食.

1.2.2 实验方法 将造模成功的大鼠随机分成两组,一组给予重组TFF3灌肠(1 mg/kg,溶于生理盐水1 mL),1次/d,共7 d,另一组作为空白对照给予生理盐水1 mL灌肠,同时正常组也给予生理盐水1 mL灌肠,1次/d,共7 d,在第8 d将所有大鼠处死.造模后第2 d起每天观察腹泻及肉眼血便情况.

1.2.3 组织学观察及酶学检测 三组大鼠断颈处死后立即剖腹分离出整段结肠,沿肠系膜缘打开肠腔,用4℃生理盐水轻轻冲洗,按照文献[4]方法评价结肠黏膜损伤指数(CMDI),评分标准为:0 = 无损伤;1 = 轻度充血、水肿,表面光滑,无糜烂或溃疡;2 = 充血水肿,黏膜粗糙呈颗粒状,有糜烂或肠粘连;3 = 高度充血水肿,黏膜表面有坏死及溃疡形成,溃疡最大纵径小于1 cm,肠壁增厚或表面有坏死及炎症;4 = 在3分基础上溃疡最大纵径大于1 cm,或全肠壁坏死.每段结肠自距肛门口7-8 cm处取2块组织标本,另于炎症严重或溃疡处取至少1块组织.标本用40 g/L甲醛固定,石蜡包埋,切片4 μm,常规HE染色,光镜下观察.在处死两组大鼠的同时,距肛门口7-9 cm处取3 mm×5 mm新鲜结肠组织标本,快速滤纸吸干后,置于液氮中冻存,供检测SOD、MDA及NO. SOD检测采用亚硝酸盐形成抑制法,MDA检测采用TBA显色法,NO检测采用硝酸还原酶法.

1.2.4 RT-PCR检测iNOS表达 总RNA抽提:50-100 mg肠黏膜组织捣碎→加入1 mL Trizol溶液,匀浆→加200 μL氯仿→剧烈振荡15 s→12 000 g离心15 min→取上

清0.5 mL→加入异丙醇0.5 mL→12 000 g离心10 min→弃上清,加入750 mL/L酒精清洗沉淀→晾干.

取4 μL总RNA进行逆转录,取2 μL逆转录产物进行PCR扩增.iNOS上游引物为5'-GCATCCCAAGTACGAGTG-3',下游引物为3'-TGACCTAAACCGACCAG-5'退火温度为49℃,扩增产物为400 bp,同时加入β-actin引物作为内对照,15 g/L琼脂糖凝胶电泳,观察PCR产物并用计算机凝胶电泳分析系统进行吸光度分析.

统计学处理 计量资料结果以平均值±标准差(mean ± SD)表示,比较采用方差分析,组间比较采用*q*检验.*P* < 0.05为显著性检验标准.

2 结果

2.1 动物模型 正常组大鼠活动如常,反应机警,毛发有光泽,饮食量正常,体重增加;模型组大鼠出现血便或稀便、卷曲而卧、少动、体毛凌乱、精神萎靡、食量下降、体重下降等表现,有2只死亡;而治疗组除1只死亡外,其余大鼠一般状况随给药时间延长而逐渐好转,无血便或稀便、食量增加、体重逐渐增加.

2.2 组织学表现 肉眼观,生理盐水处理组结肠黏膜高度充血水肿,可见糜烂、点状或片状出血,光镜下观察黏膜及黏膜下层有中度炎性细胞浸润,以中性粒细胞为主,有糜烂及溃疡,病变部位腺体排列不整齐,杯状细胞萎缩或减少;rhITF处理组结肠黏膜固有层内有少数淋巴细胞、浆细胞等浸润,未见溃疡,腺体排列整齐,正常对照组黏膜光滑,腺体结构清晰,偶见充血、水肿,无糜烂及溃疡.rhITF可降低结肠黏膜CMDI评分,且较之模型组和正常组的差异均有统计学意义(*P* < 0.05).

2.3 iNOS mRNA表达 rhITF能增强iNOS基因表达,与正常组及模型组的差异有统计学意义(*P* < 0.05).

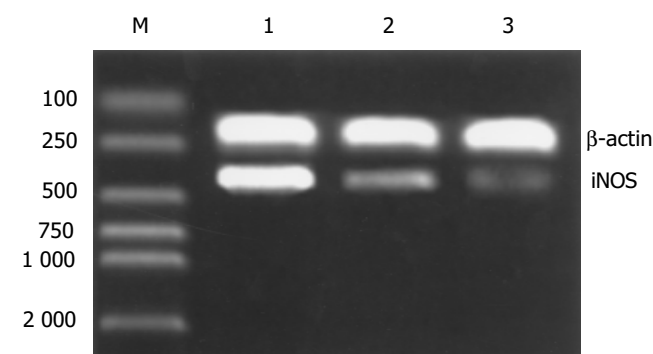


图1 结肠iNOS mRNA表达. 1: rhITF组; 2: 模型组; 3: 正常组; M: DNA marker(bp).

2.4 酶学检查结果 由表1可见, rhITF能使结肠黏膜中NO的表达显著增加,较之模型组和正常组的差异均有统计学意义(*P* < 0.05).另外,结肠炎模型中MDA表达升高,而SOD降低,与正常组比较差异有统计学意义,但rhITF组与模型组的差异无统计学意义(*P* > 0.05).

表1 rhITF 对 CMDI 评分、iNOS mRNA、NO 表达、MDA、SOD 活性的影响(mean ± SD)

组别	CMDI	iNOS/ β -actin	NO(μ mol/g)	MDA(nmol/mg)	SOD(nkat/mg)
正常组	0.50 ± 0.53	0.21 ± 0.03	1.03 ± 0.40	8.06 ± 0.76	680.97 ± 35.51
模型组	2.11 ± 0.60 ^a	0.68 ± 0.06 ^a	5.31 ± 1.31 ^a	12.75 ± 0.76 ^a	496.93 ± 9.34 ^a
rhITF 组	1.22 ± 0.67 ^{ac}	0.75 ± 0.02 ^{ac}	10.32 ± 1.95 ^{ac}	10.82 ± 2.19 ^a	506.43 ± 54.01 ^a

^aP<0.05 vs 正常组; ^cP<0.05 vs 模型组.

3 讨论

三叶肽家族是一类新近发现的、对胃肠道黏膜有保护作用的因子,能促进受损黏膜周围完好的上皮细胞向黏膜损伤表面迁移覆盖,促进损伤黏膜快速修复,或与黏液中的黏蛋白相互作用,加强黏液凝胶层,抵抗黏膜表层有害物质损伤,抑制肿瘤生长^[5-7],已有研究发现三叶肽能促进鼠实验性结肠炎黏膜修复^[8].乙酸直接诱导大鼠化学性溃疡性结肠炎,其机制与增强血管通透性、激活激肽等炎症递质有关,是研究人类溃疡性结肠炎致炎机制的模型.近年来自由基在溃疡性结肠炎发病机制中的作用已成为研究的重要课题.NO是一种相对稳定的气体自由基,由结构型(cNOS)和诱生型(iNOS)催化L-精氨酸所生成,各种NOS异构体产生的NO可能参与调节不同的炎症反应过程^[9].研究发现iNOS抑制剂可加重急性肠道炎症^[10];外源性NO参与减少白细胞募集和促炎性因子的释放^[11];应激时NO减少可能导致肠道运动障碍和黏膜受损^[12],提示NO的防御功能^[13-14].我们观察到,rhITF能提高iNOS mRNA表达,增加NO含量,能减轻黏膜炎症反应,与有些学者的研究结果相近^[15],我们认为NO可能通过调节肠道微血管通透性,维持生理性的血管张力,抑制血小板聚集和白细胞黏附,与PGE联合作用等机制保护肠黏膜,但又与以往的一些研究结果矛盾,这些结果表明NO能影响多种免疫活性物质的合成和分泌,能够激活和放大免疫/炎症反应,形成瀑布效应,损伤抗氧化物酶等,从而加重炎症和组织损伤^[14,16-18].此外,我们未观察到rhITF能明显减少MDA和提高SOD的含量,提示重组肠三叶因子的黏膜保护作用可能与MDA和SOD关系不大,但仍需要进一步研究.总之,我们发现rhITF能减轻肠黏膜炎症反应,增强iNOS表达从而增加NO含量,可能对于提高肠黏膜防御能力有积极的作用.

4 参考文献

- 1 Wong WM, Poulson R, Wright NA. Trefoil peptides. *Gut* 1999;44:890-895
- 2 卢雅丕,任建林.三叶因子家族研究进展.世界华人消化杂志 2003;11:2019-2021
- 3 邓长生,夏冰,陈德基,周燕,龚玲玲,高志清.超氧化物歧化酶对大鼠乙酸性结肠炎黏膜的保护作用.中国病理生理杂志 1994;10:23-25
- 4 Millar AD, Rampton DS, Chander CL, Claxson AW, Blades S, Coumbe A, Panetta J, Morris CJ, Blake DR. Evaluating the

- 5 antioxidant potential of new treatments for inflammatory bowel disease using a rat model of colitis. *Gut* 1996;39:407-415
- 6 Thim L, Madsen F, Poulsen SS. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. *Eur J Clin Invest* 2002;32:519-527
- 7 Podolsky DK. Mechanisms of regulatory peptide action in the gastrointestinal tract:trefoil peptides. *J Gastroenterol* 2000;35(Suppl 12):69-74
- 8 Hahm KB, Im YH, Parks TW, Park SH, Markowitz S, Jung HY, Green J, Kim SJ. Loss of transforming growth factor beta signaling in the intestine contributes to tissue injury in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;49:190-198
- 9 Tran CP, Cook GA, Yeomans ND, Thim L, Giraud AS. Trefoil peptide TFF2(spasmolytic polypeptide)potentially accelerates healing and reduces inflammation in a rat model of colitis. *Gut* 1999;44:636-642
- 10 Beck PL, Xavier R, Wong J, Ezedi I, Mashimo H, Mizoguchi A, Mizoguchi E, Bhan AK, Podolsky DK. Paradoxical roles of different nitric oxide synthase isoforms in colonic injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004;286:G137-147
- 11 Dikopoulos N, Nussler AK, Liptay S, Bachem M, Reinshagen M, Stiegler M, Schmid RM, Adler G, Weidenbach H. Inhibition of nitric oxide synthesis by aminoguanidine increases intestinal damage in the acute phase of rat TNB-colitis. *Eur J Clin Invest* 2001;31:234-239
- 12 Salas A, Gironella M, Salas A, Soriano A, Sans M, Iovanna J, Pique JM, Panes J. Nitric oxide supplementation ameliorates dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *Lab Invest* 2002;82:597-607
- 13 Takahashi A, Tomomasa T, Kaneko H, Watanabe T, Tabata M, Morikawa H, Tsuchida Y, Kuwano H. Intestinal motility in an in vivo rat model of intestinal ischemia-reperfusion with special reference to the effects of nitric oxide on the motility changes. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001;33:283-288
- 14 Cross RK, Wilson KT. Nitric oxide in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2003;9:179-189
- 15 Rumi G, Tsubouchi R, Nishio H, Kato S, Mozsik G, Takeuchi K. Dual role of endogenous nitric oxide in development of dextran sodium sulfate-induced colitis in rats. *J Physiol Pharmacol* 2004;55:823-836
- 16 Tan XD, Liu QP, Hsueh W, Chen YH, Chang H, Gonzalez-Crussi F. Intestinal trefoil factor binds to intestinal epithelial cells and induces nitric oxide production:priming and enhancing effects of mucin. *Biochem J* 1999;338(Pt3):745-751
- 17 Yoshida Y, Iwai A, Itoh K, Tanaka M, Kato S, Hokari R, Miyahara T, Koyama H, Miura S, Kobayashi M. Role of inducible nitric oxide synthase in dextran sulphate sodium-induced colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14(Suppl 1):26-32
- 18 Kriegelstein CF, Cerwinka WH, Laroux FS, Salter JW, Russell JM, Schuermann G, Grisham MB, Ross CR, Granger DN. Regulation of murine intestinal inflammation by reactive metabolites of oxygen and nitrogen:divergent roles of superoxide and nitric oxide. *J Exp Med* 2001;194:1207-1218
- 19 Potoka DA, Nadler EP, Upperman JS, Ford HR. Role of nitric oxide and peroxynitrite in gut barrier failure. *World J Surg* 2002;26:806-811