

实验研究

利血平致蒙古沙土鼠脾虚模型感染
幽门螺杆菌的实验研究杨俊¹ 王亚东² 何剑平¹ 李俊¹ 指导 喻方亭³

摘要 目的:探讨脾虚在幽门螺杆菌(HP)感染所致慢性胃炎中与 HP 感染及胃粘膜炎症程度的关系。方法:采用国际标准菌株 SS1 灌喂利血平致脾虚沙土鼠,建立脾虚沙土鼠感染 HP 动物模型,检测胃粘膜 HP 定植量、炎症程度,并与脾虚沙土鼠组、感染 HP 沙土鼠组及正常沙土鼠组对照。结果:脾虚沙土鼠感染 HP 后胃粘膜 NO 含量($6.91 \pm 1.17 \mu\text{mol/g}$)和 NOS 活性($2.77 \pm 0.54 \text{U/mg}$)较正常组均显著升高($P < 0.01$),胃粘膜 HP 的定植量也显著增加,炎症程度随之加重($P < 0.01$);脾虚沙土鼠胃粘膜 NO 含量($2.88 \pm 1.20 \mu\text{mol/g}$)和 NOS 活性($1.26 \pm 0.45 \text{U/mg}$)较正常组均显著升高($P < 0.01$),炎症程度无显著加重。结论:利血平所致脾虚沙土鼠胃粘膜 HP 定植量及炎症程度均有显著增加,提示脾胃虚弱可能是 HP 感染的病理基础。

主题词 脾虚 螺杆菌感染 利血平 疾病模型/动物

目前已一致认为,幽门螺杆菌(HP)是慢性活动性胃炎的病原菌,是活动性溃疡的重要致病因子,是胃粘膜相关淋巴组织淋巴瘤(MALT 淋巴瘤)的重要致病因子,同时可能是胃癌的协同致病因子,与功能性消化不良的关系有待明确^[1]。中医学者已作了大量 HP 感染的临床疗效观察及中药单复方对 HP 的体外抑菌试验^[2,3],因而建立实用且符合中医证型的 HP 感染动力模型,凭借病证结合的整体动物模型来阐明 HP 感染的致病特点及中医药治疗机制尤为重要。我们通过建立脾虚 HP 感染蒙古沙土鼠动物模型,试图验证脾虚在 HP 感染所致慢性胃炎中与 HP 感染及胃粘膜炎症程度的关系,为进一步研究中医药治疗 HP 感染相关性胃病的机制提供一种手段。

1 材料与方法

1.1 动物:无特殊病原菌(SPF)蒙古沙土鼠(Mongolian gerbil, MGS/Sea)32 只,8 周龄,雌雄各半,体重 53~62g,购自中国科学院上海生物制品研究所

实验动物中心。

1.2 药物及试剂:利血平注射液 1mg/ml(上海医科大学红旗制药厂生产,批号 980903);尿素酶试剂由第一军医大学南方医院全军消化内科研究所提供;硝酸还原酶法一氧化氮测定试剂盒、一氧化氮合酶测定试剂盒及双缩脲法蛋白定量试剂盒均为南京建成生物工程研究所产品(批号分别为 20020320、20020316 和 20020321)。

1.3 主要仪器:UV-754 型紫外可见光分光光度计为上海第三分析仪器厂产品。

2 方法

2.1 HP 菌株及培养:本实验所用的 HP 菌株来自澳大利亚 A Lee 教授实验室,由第一军医大学南方医院全军消化内科研究所免费提供国际标准菌株 SS1(Sydney strain 1),该菌株含有细胞毒素相关基因(cytotoxin associated gene, cagA)和空泡形成毒素基因(vacuolating toxin gene, vacA)。采用空肠弯曲菌琼脂培养基培养,添加 5% 脱纤维冻融羊血及万古霉素 10mg/L、两性霉素 B 2mg/L、多粘菌素 B 2500 U/L、抗菌增效剂 5mg/L。在一定湿度、微需氧(5% O₂, 8% CO₂, 80% N₂)37℃ 条件下孵育 72h 进行增菌培养。HP 的鉴定包括菌落形态、尿素酶试验、涂片观察等。

2.2 动物造模及分组:所有动物置于第一军医大学中药新药研究重点实验室饲养,条件符合清洁级动物饲养要求。适应饲养 3 天后,随机分成正常组、脾虚组、HP 感染组及脾虚 HP 感染组(各 8 只)。脾虚 HP 感染组^[4]用利血平以 $0.2 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 皮下注射,连续 7 天,第 3 天沙土鼠开始出现精神倦怠、懒动、拱背、眼眯、大便溏、食量减少、消瘦等一系列脾虚症状,至第 7 天脾虚造模成功;然后再将 HP 增菌后用 280g/L 布氏肉汤调制成感染菌液,浓度为 $2 \times 10^{10} \text{CFU/L}$,30min 内用胃管注入禁食 12h 的沙土鼠胃内,0.5ml/L,然后再禁食 4h,接种连续 3 天。接种前 30min 用胃管灌喂 50% 乙醇 0.2ml,后 2 天不禁食。HP 感染组用生理盐水以 $0.2 \text{ml} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 皮下注射连续 7 天,第 8 天脾虚 HP 感染组给予 HP 菌液,正常组在同样条件下只

1 第一军医大学附属珠江医院中医科,广东省广州市工业大道中 253 号(510282)

2 第一军医大学南方医院全军消化内科研究所

3 第一军医大学中医系临床基础教研室

收稿日期:2002-09-09;修回日期:2002-10-08

予以生理盐水皮下注射及布氏肉汤灌喂,脾虚组同样条件下只予以布氏肉汤灌喂,在所有动物处死前7天用利血平以 $0.2\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 皮下注射,连续7天。

2.3 观察指标及方法

2.3.1 快速尿素酶试验:最后一次接种HP8周后以脊椎脱臼法处死所有动物,处死前12h断食水。处死后正中开腹取出全胃,沿胃大弯切开,用冰生理盐水轻轻漂洗掉胃内残留物,暴露胃粘膜,肉眼观察胃粘膜大体改变。96孔板每孔加入尿素酶试剂0.1ml,刮取少许胃粘膜组织放入尿素酶试剂中,试剂溶液颜色由黄变为红或紫红色为阳性。

2.3.2 胃粘膜HP感染及慢性炎症分级^[2]:沿胃的纵轴切取 $4\text{mm} \times 10\text{mm}$ 大小组织条块,经10%甲醛常规固定24h后,石蜡包埋,制成 $3 \sim 4\mu\text{m}$ 的连续切片,苏木精-伊红(HE)染色观察组织病理学改变,甲苯胺蓝染色用于HP判定。胃粘膜HP感染及慢性炎症分级判定标准以胃腔上皮表面和腺腔内HP的定植量进行HP感染的诊断与分级:(-)为腺腔表面及腺体内均无HP,(+)为腺腔表面有少量HP、腺体内无HP,(++)为腺腔表面有多少不等HP、腺体内有少量散在HP,(+++为腺腔表面有多少不等HP、腺体内有多量聚集成团的HP;以上皮和固有膜内淋巴细胞浸润的量进行胃粘膜炎症的分级:(-)为固有膜有少量淋巴细胞而腺上皮内无淋巴细胞,(+)为固有膜及腺上皮内均有少量淋巴细胞,(++)为固有膜有多量淋巴细胞、腺上皮内也有散在少量淋巴细胞。(++)为固有膜有多量淋巴细胞,腺上皮内有聚集成团淋巴细胞。

2.3.3 一氧化氮(NO)和一氧化氮合酶(NOS)测定:剩余胃组织用钝刀片刮取胃粘膜组织,称重后加入冰生理盐水,在玻璃匀浆器中充分研磨后制成10%胃粘膜组织匀浆,将胃粘膜组织匀浆以 $3000 \sim 4000\text{r/min}$ 离心15分钟,取上清液测NO和NOS。NO的检测使用硝酸还原酶法一氧化氮测定试剂盒,NOS检测使用一氧化氮合酶测定试剂盒,组织血浆蛋白的测定使用双缩脲法蛋白定量试剂盒。指标检测的操作步骤严格按说明书进行,根据公式计算NO及NOS活性。

2.4 统计学方法:用SPSS10.0 for Windows统计软件进行数据处理,均数的比较用方差分析,率的比较用 χ^2 检验,等级资料的比较用多个独立样本非参数检验(K Independent Samples Test)。

3 结果

3.1 胃粘膜的快速尿素酶试验结果:各组模型动物在处死时胃粘膜尿素酶试验阳性例数为正常组1例(12.5%)、脾虚组2例(25%)、HP感染组7例

(87.5%)、脾虚HP感染组8例(100%)。结果显示,HP感染组和脾虚HP感染组较正常组和脾虚组的胃粘膜快速尿素酶试验阳性率有显著性增高($P < 0.01$),较脾虚组的胃粘膜快速尿素酶试验阳性率有显著性增高($P < 0.05$)。而HP感染组与脾虚HP感染组、正常组与脾虚组的胃粘膜快速尿素酶试验阳性率差异均无显著性($P > 0.05$)。

3.2 HP定植量的变化:甲苯胺蓝染色可清楚显示HP,高倍镜下可见HP呈杆状、弯曲或逗点状,多位于粘液层表面,可侵入至胃腺窝深部。各组模型动物在处死时胃粘膜HP定植量分级的变化为:正常组与脾虚组(-)均8例;HP感染组(+)5例、(++)2例、(+++)1例;脾虚HP感染组(+)2例、(++)4例、(+++)2例。结果显示脾虚HP感染组与其他各组的胃粘膜HP定植量比较均有显著性增加($P < 0.01$);HP感染组的胃粘膜HP定植量较正常组和脾虚组比较均有显著性增加($P < 0.01$);而正常组与脾虚组的胃粘膜HP定植量无显著性差异($P > 0.05$)。

3.3 胃粘膜炎症程度变化:沙土鼠感染幽门螺杆菌后8周胃粘膜组织学改变表现为胃粘膜上皮细胞、腺窝上皮细胞及固有层中可见以淋巴细胞浸润为主的慢性炎症改变。各组模型动物在处死时胃粘膜炎症分级的变化为:正常组(-)8例;脾虚组(-)7例、(+)1例;HP感染组(-)1例、(+)6例、(++)1例;脾虚HP感染组(+)3例、(++)5例。结果显示脾虚HP感染组与其他各组的胃粘膜炎症分级比较均有极显著性增加($P < 0.01$);HP感染组的胃粘膜炎症分级较正常组和脾虚组比较均有显著性增加($P < 0.01$);而脾虚组的胃粘膜炎症分级较正常组比较有增加,但差异无显著性($P > 0.05$)。

3.4 各组模型动物胃粘膜NO含量和NOS活性比较:各组模型动物胃粘膜NO含量及NOS活性结果见附表。结果显示,脾虚组沙土鼠胃粘膜NO含量和NOS活性较其他各组均有显著降低($P < 0.01$);HP感染组沙土鼠胃粘膜NO含量和NOS活性较正常组虽有增高,但无统计学意义($P > 0.05$);脾虚HP感染组沙土鼠胃粘膜NO含量和NOS活性较正常组、脾虚组均有显著性差异($P < 0.01$),较HP感染组差异有显著性($P < 0.05$)。

4 讨论

HP是一种感染率极高的病原菌,稳定的病证结合动物模型的建立对HP感染中医发病机制及中医临床治疗的研究有重要意义。蒙古沙土鼠具有以下三个特点:(1)蒙古沙土鼠自然患胃炎的概率极小。Bingel

附表 各组动物胃粘膜 NO 和 NOS 结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	NO($\mu\text{mol/g}$)	NOS(U/mg)
正常组	8	4.84 $\pm$ 0.45	1.89 $\pm$ 0.59
脾虚组	8	2.88 $\pm$ 1.20 Δ	1.26 $\pm$ 0.45 Δ
HP 感染组	8	5.74 $\pm$ 0.49*	2.09 $\pm$ 0.51*
脾虚 HP 感染组	8	6.91 $\pm$ 1.17 Δ •●	2.77 $\pm$ 0.54 Δ •●

与正常组比较, $\Delta P < 0.01$;与脾虚组比较,* $P < 0.01$;与 HP 感染组比较,● $P < 0.05$

研究发现^[6],约 2% 的蒙古沙土鼠发生自然胃炎,未发现有 HP 自然感染的现象^[7]。(2)蒙古沙土鼠感染 HP 后胃内定植的菌量一般可达 10^5 CFU,虽比悉尼株(SS1)感染的 C57BL/6 小鼠胃内定植的菌量($10^6 \sim 10^7$ CFU)少,但组织学变化却更典型,与人类感染 HP 后的组织学表现更相似,可发生萎缩、溃疡、肠化生和胃癌,且可供检查的胃体积比小鼠大。(3)蒙古沙土鼠的寿命比小鼠长,适合长期观察。这些特点证明,蒙古沙土鼠比其它啮齿类动物更适合作为研究 HP 感染的动物模型。近年来用其建立的 HP 感染动物模型倍受重视,且用蒙古沙土鼠建立的 HP 感染模型基本符合 1995 年在瑞士洛桑制定的 HP 感染模型标准^[8]:(1)胃粘膜上看到 HP 定植,在胃窦及胃体粘膜引起类似于人的组织学变化;(2)每克胃粘膜组织有一定数量 HP;(3)可看到 HP 与胃粘膜粘附;(4)HP 感染长期持续存在;(5)用体外有一定次数继代培养的 HP 菌株,仍能在动物体内定植。

模型动物注射利血平后造成副交感神经功能相对或绝对亢进,同时又引起腹泻而耗气,从而出现中医脾虚证的各种主要证候,造成脾虚模型^[9]。在脾虚证模型规范化研究中发现^[10],脾虚证模型主要是以苦寒泻下、耗气破气、限量营养、劳倦过度、利血平五大类为中心,其中利血平脾虚证模型在发表文献量及引用率方面均居第三位。我们通过预试验确定了 0.2mg/kg、持续 7 天的利血平造模剂量,既成功地造成实验动物迅速出现脾虚症状,又使动物不至于死亡。预试验结果显示,当利血平总剂量达到 1.8mg/kg 时可致动物半数死亡。

通过大量 HP 相关性胃病的中医临床观察发现^[11],随着年龄的增加和病程的延长,HP 相关性胃病患者中脾胃虚弱证型的比率有逐渐增加的趋势。

NO 是人体内广泛存在的一种重要信使分子,它是由 NOS 催化 L-精氨酸后生成。NOS 主要由结构型一氧化氮合酶(cNOS)和诱导型一氧化氮合酶(iNOS)组成。通常生理状态下,胃粘膜血管内皮细胞和神经细胞持续稳定的表达 cNOS,产生少量的 NO 调节胃粘

膜循环和粘液分泌,具有保护胃粘膜的功能;而在感染、炎症等病理刺激时,胃粘膜内中性粒细胞和单核巨噬细胞浸润,iNOS 在细胞因子与白介素(IL-1、IL-2)、肿瘤坏死因子等作用时活化,产生大量 NO,此时过量生成的 NO 可直接引起细胞毒作用或通过与氧自由基氧化生成毒性更大的过氧硝基阴离子和羟自由基,导致细胞膜脂质过氧化损伤,并可通过 HP 的尿素酶及其水解产物氨、HP 的 LPS、caga 和 vaca 蛋白及 p53 基因等凋亡相关基因的共同作用,活化抑制细胞增殖的因子,造成 DNA 损伤,因此而诱导胃上皮细胞发生凋亡^[13]。实验中脾虚沙土鼠胃粘膜 NO 含量和 NOS 活性显著降低,而脾虚沙土鼠感染 HP 后胃粘膜 NO 含量和 NOS 活性显著升高,胃粘膜 HP 的定植量也显著增加,炎症程度随之加重,提示脾虚在 HP 感染发病机制中的作用可能是首先导致具有正常保护胃粘膜功能的 NO 含量和 NOS 活性显著下降,从而使胃粘膜抵御 HP 侵袭的能力显著下降;随着 HP 感染的加重,HP 可能通过 IFN 等因子的放大作用,促进机体巨噬细胞、胃粘膜上皮细胞等 iNOS 表达增加,进而持续大量产生 NO,造成胃粘膜损伤,并导致 DNA 的损伤和畸变,从而引发胃炎、溃疡、癌变等病变。

参考文献

- 1 张万岱,萧树东,胡伏莲,等.幽门螺杆菌若干问题的共识意见.中华消化杂志,2000,20(2):117-118.
- 2 张存钧,蒋振明,张镜人.中药对幽门螺杆菌抑菌作用的体外研究.中国中西医结合脾胃杂志,1997,5(3):168-169.
- 3 冀爱英,赵文霞,郭强,等.夏连抑幽胶囊治疗幽门螺杆菌感染性胃炎的临床及实验研究.中国中西医结合杂志,1999,19(10):595-598.
- 4 陈小野.实用中医证候动物模型学.北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1993:163-169.
- 5 张亚历.胃肠疾病内镜、病理与超声内镜诊断彩色对照图谱.北京:军事医学科学出版社,2000:195-196.
- 6 Bingel SA. Pathologic findings in amaging Mongolian gerbil(Meriones unguiculatus)colony. Lab Anim Sci,1995,45:597-600.
- 7 Watanabe T, Tada M, Nagai H, et al. Helicobacter pylori infection induces gastric cancer in mongolian gerbils. Gastroenterology, 1998, 115(3):642-648.
- 8 胡伏莲,周殿元.幽门螺杆菌的基础与临床.北京:中国科学技术出版社,2000:136.
- 9 刘学松,黄树明,李织,等.利血平致动物脾虚模型机制的研究.中国医药学报,1989,4(5):68-70.
- 10 陈小野,武晓冬,蔡永春,等.脾气虚证动物模型规范的初步探讨.中国中医药信息杂志,1998,5(12):7-8.
- 11 冯莲君,延文.幽门螺杆菌与胃脘痛中医分型的关系.现代中西医结合杂志,2000,9(2):105-106.
- 12 晏楠,吕农华.幽门螺杆菌感染及其代谢产物一氧化氮对胃上皮细胞凋亡的影响.中华消化杂志,2000,20(1):45-46.