

噪声应激大鼠胃壁细胞形态和泌酸功能的变化

曹晓鹏, 李兆申*, 湛先保, 彭国林, 陈小燕, 满晓华

(第二军医大学长海医院消化内科, 上海 200433)

[摘要] **目的:**建立白噪声致大鼠应激性溃疡模型(noise stress, NS),并研究噪声应激大鼠胃壁细胞形态和泌酸功能的变化。**方法:**采用白噪声应激建立NS大鼠模型。大鼠随机分为对照组、NS 4 h组及NS 8 h组,测定胃液pH值、胃黏膜溃疡指数(ulcer index, UI),用免疫荧光技术标记 H^+ , K^+ -ATP酶,在激光共聚焦扫描显微镜下观察壁细胞形态并在荧光显微镜下分类、计数。**结果:**(1)NS 4 h组胃液pH值为 2.22 ± 0.05 ,显著低于对照组的 2.59 ± 0.21 ($P < 0.05$),NS 8 h组胃液pH值为 1.31 ± 0.06 ,与对照组和NS 4 h组相比均有显著差异($P < 0.01$)。(2)NS 4 h组UI为 10.5 ± 1.29 ,显著高于对照组($P < 0.01$),NS 8 h组UI达 34.36 ± 2.22 ,显著高于对照组($P < 0.01$)及NS 4 h组($P < 0.05$)。(3)NS 4 h组分泌相壁细胞数(55.5 ± 3.42)/100,NS 8 h组为(62.0 ± 3.46)/100,均显著高于对照组的(42.5 ± 3.70)/100($P < 0.01$),其中NS 8 h组也显著高于NS 4 h组($P < 0.05$)。(4)胃液pH值与胃UI呈负相关($r = -0.85, P < 0.05$),与分泌相壁细胞数呈负相关($r = -0.89, P < 0.05$)。**结论:**白噪声应激可以成功的建立大鼠应激性溃疡模型;噪声应激大鼠胃酸分泌增加,胃酸在溃疡形成过程中起不可忽视的作用。

[关键词] 噪声;应激;胃酸;壁细胞,胃

[中图分类号] R 573.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)08-0863-04

Changes of gastric parietal cell configuration and acid secretion under noise stress in rats

CAO Xiao-peng, LI Zhao-shen*, ZHAN Xian-bao, PENG Guo-lin, CHEN Xiao-yan, MAN Xiao-hua (Department of Gastroenterology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a white noise-induced stress ulcer model in rats and to assess the changes of gastric parietal cell configuration and acid secretion under noise stress. **Methods:** Rats were randomly divided into 3 groups; NS 4 h, 8 h and control groups. The rat NS model was induced by white noise. The pH values of gastric juice were measured by the pH/mV pH meter and the gastric ulcer index (UI) was evaluated. The stomach tissue was processed for immunofluorescence detection and the β subunit of H^+ , K^+ -ATPase was immunostained. The gastric parietal cell configuration was observed with conventional microscopy and confocal laser scanning microscope. **Results:** (1)The pH value of NS 4 h group (2.22 ± 0.05) was significantly lower than that of control group ($2.59 \pm 0.21, P < 0.05$), but higher than that of NS 8 h group ($1.31 \pm 0.06, P < 0.01$). (2) The UI of NS 4 h group (10.5 ± 1.29) was significantly higher than that of the control group ($P < 0.05$), but significantly lower than that of NS 8 h group ($34.36 \pm 2.22, P < 0.01$). (3) The reticular pattern parietal cells in NS 4 h group (55.5 ± 3.42)/100 was significantly higher than that in control group (42.5 ± 3.70 /100, $P < 0.01$), but lower than that in NS 8 h groups (62.0 ± 3.46 /100, $P < 0.05$). (4) The pH was negatively related with both UI ($r = -0.85, P < 0.05$) and the number of reticular parietal cells ($r = -0.89, P < 0.05$). **Conclusion:** A white noise-induced stress ulcer model has been successfully established in rats. NS rats develop gastric mucosal lesions with increased acid secretion, which is closely related with the oxyntic function of parietal cells.

[KEY WORDS] noise; stress; gastric acid; parietal cells, gastric

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(8): 863-866]

应激性溃疡(stress ulcer, SU)是平时常见病症,其并发上消化道出血的发病率和病死率均较高,预后凶险。目前认为SU的发生是由于胃黏膜屏障保护功能削弱、损伤因素作用相对增强的结果^[1]。胃酸作为最常见的内源性损伤因素,在应激性溃疡病变中的作用不容忽视。这可以被各种制酸剂治疗SU有确切疗效所证实^[1]。但在不同应激状态下,胃酸在SU发病中的确切作用不完全相同。

既往对应激性溃疡的研究多集中于严重疾病或

者创伤等情况。平时时期,噪声对人的身心健康可产生巨大不良影响。然而有关噪声应激时胃酸分泌

[基金项目] 全军医药科研“十五”规划基金重点项目(01Z059). Supported by Research Project of the “10th Five-Year Plan” for Medical Science Development of PLA(01Z059).

[作者简介] 曹晓鹏, 硕士, 主治医师. 现在解放军总参谋部管理保障部卫生处, 北京 100083. E-mail: caoxp75@126.com

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

的研究报道尚不多见。我们参考刘国实等^[2]的造模方法,采用噪声发生器产生的白噪声为应激源,建立大鼠噪声应激性溃疡模型,利用免疫荧光技术在激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)下观察壁细胞的不同形态,进而从细胞学水平研究噪声应激模型中壁细胞泌酸功能的变化。

1 材料和方法

1.1 实验动物与主要仪器、试剂 健康雄性 Sprague-Dawley(SD)大鼠(购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司)15只,体质量180~200g,清洁级,在长海医院动物实验中心饲养1周左右后开始实验。pH/mV型pH计(科尔-帕默仪器公司,美国),激光共聚焦扫描显微镜(Leica公司,德国),噪声发生器(Type 1405,丹麦)。鼠抗猪H⁺,K⁺-ATP酶β亚单位单克隆抗体2G11(美国Afinity Bioreagents公司),以一抗稀释液(北京中山生物技术有限公司)稀释至1:2000;羊抗鼠荧光抗体Alexa 488(美国Molecular Probes公司),以1%小牛血清(购自北京中山生物技术有限公司)稀释至1:200。

1.2 动物分组及模型制作^[2] 15只SD大鼠随机分为3组,即对照组(C组)、噪声应激4h组(NS 4h组)、噪声应激8h组(NS 8h),每组5只。所有大鼠实验前均禁食24h,但可自由饮水,实验前1h禁水。动物置于通风良好的暴露箱内,噪声由噪声发生器产生,经功率放大器放大后,输入扬声器。扬声器置于箱内侧壁和顶壁,连接微型话筒。频率放大器监测声压,暴露箱内任何点声压均匀度误差不得超过±1dB。暴露条件为白噪声,110dB。应激结束后即刻处死动物。

1.3 胃液pH值测定及胃黏膜溃疡指数(ulcer index,UI)评分 噪声应激模型制作完成后,将大鼠用1%戊巴比妥钠(30mg/kg)腹腔内注射麻醉,剖腹并游离胃,用两把止血钳分别夹住贲门和幽门。于皮胃区剪一小切口,插入pH/mV型pH计的pH电极,使电极头接触到胃液,测出胃液的pH值。取下胃后,用生理盐水洗去浆膜面血迹,沿大弯剪开胃壁使黏膜面外翻,用生理盐水轻轻冲洗胃腔及黏膜面上的血迹,将胃黏膜向上平展于生理盐水纱布上,在10倍放大镜下仔细计数腺胃区点线状糜烂、出血情况,按Guth标准^[3]评估胃黏膜UI并累积积分:斑点糜烂计1分,糜烂长度<1mm计2分,1~2mm计3分,2~3mm计4分,>4mm计5分。于腺胃区黏膜损伤明显处,用小组织剪剪下0.5cm×0.5cm大小的胃黏膜标本,放入准备好的装有10%

甲醛溶液的小瓶内固定,石蜡包埋切片后用于常规病理组织学检查。于腺胃前后壁中央处,剪取0.5cm×0.5cm大小的胃黏膜标本,放入准备好的装有改良Bouin液(甲醛溶液:饱和苦味酸=1:3)的小瓶内,4℃固定6h,4℃,0.1mol/L pH 7.4 PBS液浸泡过夜。系列乙醇脱水、石蜡包埋、切片(切片厚度为3μm),用于免疫荧光检查。

1.4 壁细胞H⁺,K⁺-ATP酶免疫荧光检测 胃黏膜石蜡切片脱蜡、脱水后以3%过氧化氢孵育15min消化内源性过氧化酶,0.01mol/L pH 7.4 PBS液漂洗后以0.01mol/L柠檬酸钠缓冲液微波抗原修复(98℃)30min,然后滴加1%小牛血清白蛋白,室温孵育30min。加稀释比例为1:2000的鼠抗猪H⁺,K⁺-ATP酶β亚单位单克隆抗体2G11,4℃孵育24h,0.01mol/L pH 7.4 PBS液漂洗后加稀释比例为1:200羊抗鼠荧光抗体Alexa 488,37℃避光孵育5h,0.01mol/L pH 7.4 PBS漂洗、烘干后以50%甘油封片,分别行常规荧光显微镜检查及CLSM观察。

1.5 壁细胞计数 根据荧光显微镜下和CLSM下的观察,参考Jiang等^[4]的实验方法,把壁细胞分为网格型、颗粒型和混合型。分泌相的壁细胞形态为网格型,而静息期壁细胞形态为颗粒型。对各组大鼠胃黏膜壁细胞进行计数,每只大鼠计算出100个壁细胞中处于分泌相的壁细胞总数。

1.6 统计学处理 所有实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组之间的比较采用方差分析,UI的比较采用两样本比较的秩和检验。胃液pH与UI、网格型壁细胞数目之间的关系采用直线相关分析。

2 结果

2.1 胃液pH值 NS 4h组胃液pH值较对照组显著降低($P < 0.05$)。NS 8h组胃液pH值较对照组和NS 4h组均显著降低($P < 0.01$)。见表1。

表1 大鼠胃液pH、胃黏膜UI以及网格样壁细胞数
Tab 1 Changes of intragastric pH, UI and number of reticular parietal cells in rats of different groups
(n=5, $\bar{x} \pm s$)

| Group | Intragastric pH | UI | Number of reticular parietal cell(/100) |
|---------|-----------------|-------------|---|
| Control | 2.59±0.21 | - | 42.5±3.70 |
| NS 4 h | 2.22±0.05* | 10.5±1.29 | 55.5±3.42** |
| NS 8 h | 1.31±0.06**△△ | 34.36±2.22△ | 62.0±3.46**△ |

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control group; △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$ vs NS 4 h group

2.2 胃黏膜组织病理变化及 UI 变化 光镜下对照组大鼠胃黏膜表层上皮结构完整,腺体排列整齐,黏膜层结构层次清楚。NS 4 h 组胃黏膜明显充血、水肿,表层上皮细胞受损明显,有坏死、脱落,局部腺体结构紊乱(图 1A)。NS 8 h 组黏膜明显出血、坏死,大片状脱落,黏膜中断,溃疡形成(图 1B)。

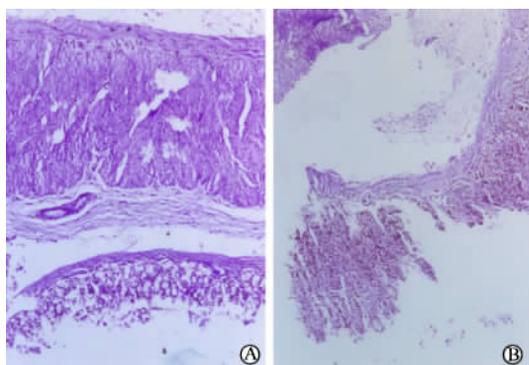


图 1 噪声应激大鼠胃黏膜组织学改变
Fig 1 Changes of gastric mucosal histology
in noise-stressed rats (H-E, $\times 100$)
A: NS 4 h group; B: NS 8 h group

对照组大鼠胃黏膜色泽红润,无充血、出血点以及糜烂等损伤性改变。NS 4 h 组大鼠胃黏膜明显充血,表面有少量血痂,腺胃部散在多数点状或线状糜烂、出血,UI 明显高于对照组($P < 0.01$)。NS 8 h 组大鼠胃黏膜表面附有较多血痂,腺胃部弥漫性点状或线状糜烂、出血,UI 明显高于对照组($P < 0.01$),也高于 NS 4 h 组($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 H^+, K^+ -ATP 酶标记免疫荧光染色观察结果 大鼠胃黏膜荧光标记后 CLSM 下胃黏膜观察全层均分布有壁细胞, H^+, K^+ -ATP 酶 β 亚单位被染为绿色,壁细胞形态分为网格型、颗粒型、混合状三种类型,网格型细胞质中充满管状结构,而颗粒型细胞质中充满颗粒样结构。网格型细胞是胃壁细胞分泌相,而颗粒型是胃壁细胞静息相(图 2A)。荧光显微镜下进行分泌相壁细胞计数,NS 4 h 组明显高于对照组($P < 0.01$),NS 8 h 组明显高于对照组($P < 0.01$)和 NS 4 h 组($P < 0.05$)。结果分别见图 2B 和图 2C 及表 1。

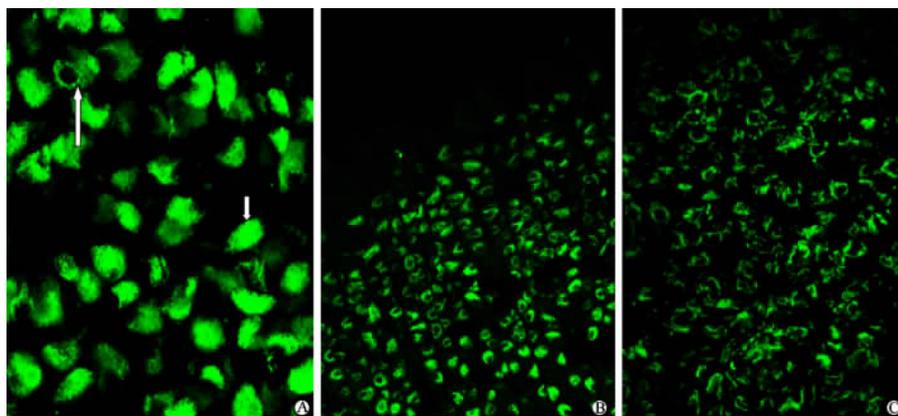


图 2 CLSM 下各组大鼠壁细胞形态表现

Fig 2 CLSM photograph of parietal cells of rats in different groups

A: Control group, parietal cells were reticular (long arrow) and diffused (short arrow); B: NS 4 h group; C: NS 8 h group

2.4 胃液 pH 值与 UI 及分泌相壁细胞数目的关系 经统计分析,大鼠胃液 pH 值与 UI 呈负相关($r = -0.85, P < 0.05$),与网格型壁细胞数目呈负相关($r = -0.89, P < 0.05$)。

3 讨论

噪声作为一种应激源,可以对人的身心健康产生损害并引起胃肠功能紊乱^[5]。强噪声可使大鼠的胃溃疡恶化,并对其愈合有明显负面影响^[6]。既往报道,战时溃疡病的发病明显高于平时^[7]。但是噪

声应激导致溃疡过程中,有关胃壁细胞泌酸功能的具体变化的研究报道尚不多见。我们的实验表明,强噪声急性应激可以导致大鼠急性胃黏膜损伤,并且随应激时间延长,损伤程度加重。这与文献报道一致。实验结果同时显示,噪声应激时,大鼠胃酸分泌增加,并随应激时间延长,胃液 pH 值降低,大鼠胃液 pH 值与 UI 呈负相关($r = -0.85, P < 0.05$),与分泌相网格型壁细胞数呈负相关($r = -0.89, P < 0.05$)。说明壁细胞的激活状态与胃液酸度和胃黏膜的损害程度密切,噪声应激中出现胃酸高分泌

状态,胃酸的作用不可忽视。

壁细胞的主要功能是分泌盐酸。电镜下,壁细胞有两种特征性的质膜系统,分泌小管和管泡系统,其形态、数量和壁细胞的分泌状态有关^[8]。分泌小管由壁细胞的顶膜内陷形成,而胞质内存在管泡系统。在管泡和分泌小管膜内均含有 H⁺,K⁺-ATP 酶。壁细胞由静息转入分泌状态时,形态学上发生显著变化。静息时可见胞质内管泡的数量很多,分泌小管稀疏,受刺激后,管泡融合于分泌小管形成致密的小管网络,从而使泌酸的有效面积增加,管泡数量则大大减少。最近 Jiang 等^[4]研究发现,荧光显微镜下免疫荧光标记 H⁺,K⁺-ATP 酶后,网格型结构对应于酸分泌活跃期的分泌小管,而颗粒型结构对应于大量的微管泡系统,所以网格型壁细胞为具有泌酸活性的壁细胞。胃酸分泌增加时,处于分泌状态的壁细胞增多。壁细胞超微结构的变化可以反映其泌酸活性。H⁺,K⁺-ATP 酶由两个亚单位组成:催化亚单位或 α 亚单位和 β 亚单位。本研究参考 Jiang 等^[4]的方法,免疫荧光标记 H⁺,K⁺-ATP 酶 β 亚单位。结果显示大鼠胃液 pH 值与分泌相壁细胞数呈负相关($r = -0.89, P < 0.05$)也证实了这一点。实验结果中,大鼠胃液 pH 值与 UI 呈负相关,说明噪声应激过程中,胃酸成高分泌状态,胃酸在溃疡形成中的作用不可忽视。

壁细胞的泌酸活动涉及神经、体液、内分泌、旁分泌、自分泌、神经-内分泌等复杂活动,他们相互作用,最终调节壁细胞的泌酸活动^[9]。刘国实等^[2]认为噪声应激使大鼠 G 细胞分泌胃泌素增多,从而刺激壁细胞产生过多胃酸,胃液 pH 下降,H⁺回渗增多而产生溃疡。而李玉梅^[10]认为应激状态下壁细胞分泌功能亢进是由于机体的神经内分泌功能紊乱,迷走神经的兴奋性增高,直接刺激壁细胞或通过

肠神经系统对肠嗜铬样细胞(ECL 细胞)的影响,使壁细胞兴奋所致。其具体机制有待进一步阐明。但可以肯定的是,噪声应激同样通过影响神经内分泌系统进而削弱胃黏膜保护机制,在此基础上胃酸等攻击性因子增强作用导致黏膜损伤。

总之,本实验应用免疫荧光技术探讨了噪声应激动物模型中壁细胞形态的变化和胃酸的作用,从细胞学水平上证实噪声应激可引起胃酸分泌增加,胃酸在噪声应激性溃疡形成中起重要作用,也为临床应用制酸剂治疗和预防噪声应激性溃疡提供了依据。

[参考文献]

- [1] 李兆申. 应激性溃疡发生机制及预防对策研究现状[J]. 解放军医学杂志,1999, 24: 391-393.
- [2] 刘国实,黄裕新,李栓位,等. 枪击声致大鼠应激性溃疡的发病机理及防治[J]. 第四军医大学学报,1999,20:491-494.
- [3] Guth PH, Paulsen G. Aspirin induced gastric injury in the rat: histologic changes and sucralfate cytoprotection[J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1987, 184:423-428.
- [4] Jiang XY, Suzuki E, Kataoka K. Immunofluorescence detection of gastric H⁺/K⁺ATPase and its alterations as related to acid secretion[J]. Histochem Cell Biol, 2002, 117:21-27.
- [5] 黄秀琴,王玉珍. 噪声对患者身心健康的损害[J]. 医学信息, 1995,8:279-280.
- [6] 刘超群,孙涛,李仲孝,等. 强噪声暴露后胃溃疡大鼠的血浆多肽激素水平[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2003,21:48-50.
- [7] 张学庸,张宁仔 主编. 现代野战内科学[M]. 北京:人民军医出版社,1997:249-251.
- [8] Ogata T, Yamasaki Y. Morphological studies on the translocation of tubulovesicular system toward the intracellular canaliculus during stimulation of the gastric parietal cell[J]. Microsc Res Tech, 2000,48:282-292.
- [9] 徐项桂. 胃酸分泌的外周调节[J]. 生物学杂志,2000,17:6-8.
- [10] 李玉梅. 大鼠应激性胃黏膜损伤与壁细胞泌酸的关系[J]. 第三军医大学学报, 2003,25:127-130.

[收稿日期] 2005-12-20

[修回日期] 2006-05-15

[本文编辑] 曹 静

欢迎订阅

《第二军医大学学报》

ISSN 0258-879X
CN31-1001/R

JOURNAL OF MEDICAL COLLEGES OF PLA ISSN 1000-1948
CN31-1002/R

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-373

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-725