·短篇论著·

应激状态下大鼠胃黏膜降钙素基因相关肽含量的动态变化及意义

Dynamic changes of calcitonin gene-related peptide in rat gastric mucosa under cold restraint stress condition and its significance

雷银雪,湛先保*,李兆申,许国铭
(第二军医大学长海医院消化内科,上海 200433)

[摘要] **目的**:观察应激状态下大鼠胃黏膜降钙素基因相关肽(CGRP)含量的动态变化并探讨其意义。**方法**:以冷束缚应激方法制作大鼠应激模型,50只SD大鼠随机等分为5组,分别于应激0 h(对照组)、2 h、4 h、6 h和8 h以放免法测定胃黏膜组织CGRP含量。另取30只SD大鼠随机等分为对照组、吲哚美辛干预组和*L*-NAME干预组,分别于应激前15 min静脉注射生理盐水(5 ml/kg)、皮下注射吲哚美辛(5 mg/kg)、静脉注射*L*-NAME(5 mg/kg),应激2 h后采用放免法测定各组大鼠胃黏膜组织CGRP含量,以激光多普勒血流仪测定胃黏膜血流量(GMBF),并判定溃疡指数(UI)。**结果**:应激2 h、4 h和6 h组大鼠胃黏膜组织CGRP含量显著低于对照组($P<0.05$);应激6 h组显著高于应激4 h组($P<0.05$);应激8 h组显著高于应激6 h组($P<0.05$);应激8 h组与对照组间的差异无统计学意义。吲哚美辛干预组及*L*-NAME干预组大鼠胃黏膜CGRP含量显著高于生理盐水对照组,GMBF显著低于生理盐水对照组,UI显著高于生理盐水对照组($P<0.01$)。**结论**:大鼠应激过程中胃黏膜CGRP含量于应激早期显著降低,后期逐渐升高至正常水平;阻断环氧化酶及一氧化氮合酶虽可显著增高胃黏膜CGRP含量,但却明显加重胃黏膜血流降低程度和损伤程度。提示应激状态下,阻断环氧化酶及一氧化氮合酶时内源性CGRP无显著的黏膜保护作用。

[关键词] 应激;降钙素基因相关肽;胃黏膜
[中图分类号] R 333.2 [文献标识码] B [文章编号] 0258-879X(2007)05-0560-02

降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide,CGRP)在体内分布广泛,具有广泛的生理和病理生理意义。既往我们研究发现应激状态下,大鼠血浆CGRP含量显著升高,但其主要的组织来源不明确。业已证实胃黏膜组织内CGRP含量丰富,对胃黏膜有保护作用[1]。其胃黏膜保护作用主要通过黏膜内一氧化氮(nitric oxide,NO)和前列腺素(prostaglandins)介导[2-3]。既往研究发现冷束缚应激后血浆CGRP含量显著升高[4],但应激状态下胃黏膜组织内CGRP含量的变化及其意义尚未阐明。本实验拟进一步观察大鼠应激状态下胃黏膜组织CGRP含量的动态变化,并探讨其意义。

1 材料和方法

1.1 *试剂与仪器* CGRP放免试剂盒购于东亚免疫技术研究所,*L*-NAME购于美国Sigma公司,吲哚美辛为上海申隆制药厂产品。γ计数仪为上海原子核研究所日环仪器厂生产,LDF-Ⅲ型微机化激光多普勒血流仪测定系统系南开大学研制。

1.2 *动物分组和处理* 实验动物为健康成年雄性SD大鼠(购自上海计划生育研究所),体质量180~230 g,以冷束缚应激方法制作大鼠应激模型。50只大鼠随机等分为5组,分别于应激0 h(对照组)、2 h、4 h、6 h和8 h测定胃黏膜组织CGRP含量。另取30只SD大鼠随机等分为对照组、吲哚美辛干预组和*L*-NAME干预组,分别于应激前15 min静脉注射生理盐水(5 ml/kg)、皮下注射吲哚美辛(5 mg/kg)、静脉注射*L*-NAME(5 mg/kg)。3组大鼠均于冷束缚应激2 h后用2%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔注射麻醉,于剑突下腹正中线剖开腹腔并游离胃,于幽门前0.5 cm胃窦前壁少血管处用手术剪剪一直径0.5 cm圆形切口,插入血流仪探头,于胃窦四壁连续监测黏膜血流量90 s,取其均值。再取血3 ml并摘下胃,生理盐水漂洗后展平,按Guth标准计数UI,以激光多普勒血流仪测定胃黏膜血流量(GMBF),并剥离胃黏膜组织待测CGRP。

1.3 *放免法测定CGRP含量* 将胃黏膜组织置于沸水水浴中煮10 min,剪碎匀浆,4℃时离心3 000 r/min($r=8$ cm)×15 min,吸取上清液于指形管中,置−20℃冰箱中冻存待测。按CGRP放免试剂盒说明书,采用非均衡法,以γ计数仪测定沉淀中的^{125}I放射性强度,根据标准曲线测出样品中CGRP含量(ng/ml)。

1.4 *统计学处理* 采用第四军医大学曹秀堂等的BASE统计软件,数据用$\bar{x}\pm s$表示,组间数据分析以方差分析和Newman-Kleus方法检验。

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

[作者简介] 雷银雪,副主任医师,总后人才基金班学员. 现在宜昌市第一人民医院消化内科,宜昌 443000.
* Corresponding author. E-mail:zhanxianbao@hotmail.com

2 结 果

对照组和应激 2 h、4 h、6 h 和 8 h 组大鼠胃黏膜组织 CGRP 含量分别为 428.54±73.60、287.55±87.94、261.79±50.57、322.44±49.95 和 446.50±76.18(ng/g 组织)。应激 2 h、4 h 和 6 h 组胃黏膜组织 CGRP 含量显著低于对照组 ($P<0.05$);应激 6 h 组显著高于应激 4 h 组 ($P<0.05$);应激 8 h 组显著高于应激 6 h 组($P<0.05$);应激 8 h 组与对照组间的差异无统计学意义。

吲哚美辛干预组及 *L*-NAME 干预组大鼠胃黏膜 CGRP 含量显著高于对照组,GMBF 显著低于对照组,溃疡指数显著高于对照组($P<0.01$,表 1)。

表 1 吲哚美辛及 *L*-NAME 对应激 2 h 大鼠胃黏膜 CGRP、GMBF 和 UI 的影响

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

组别	CGRP (w_B/ng·g^{-1})	GMBF (ρ_B/ng·ml^{-1})	UI
对照组	287.55±87.94	118.10±12.60	2.45±0.07
吲哚美辛组	559.05±77.33**	52.10±19.29*	9.30±3.47*
L-NAME 组	545.13±93.50**	53.40±7.38*	6.86±1.96*

* $P<0.05$,** $P<0.01$ 与对照组比较

3 讨 论

消化系统 CGRP 含量丰富,主要分布于消化管的小血管、消化腺及肌间神经丛周围[5]。研究发现休克时血管和小肠 CGRP 浓度最高,而血管中 CGRP 浓度以门静脉最高,提示胃肠道及血管的 CGRP 含量高于其他系统和器官组织。既往我们研究发现大鼠应激 6 h 血浆 CGRP 含量显著升高,但胃黏膜组织内 CGRP 含量的变化尚不明确。本实验结果显示胃黏膜组织 CGRP 含量显著高于我们以往报道的血浆含量[4],提示应激对胃黏膜组织 CGRP 的影响显著,可能是应激后血浆 CGRP 含量升高的组织来源之一。

在大鼠胃黏膜组织内,CGRP 主要分布于辣椒素敏感的感觉神经 C 纤维和感觉神经 β 细胞中,辣椒素敏感传入神经受刺激后即可释放 CGRP,发挥生理和病理生理作用。CGRP 具有胃黏膜保护作用,抑制 CGRP 合成可增强胃黏膜损伤因子的损害作用,促进 CGRP 合成则减轻胃黏膜损伤因子的损害作用[6-7]。

研究表明 CGRP 对胃肠道的生理作用主要通过一氧化氮和前列腺素介导,产生黏膜充血及保护作用,从而维持黏膜的完整性[1-3]。业已证实内源性一氧化氮和前列腺素具有扩张胃黏膜血管、增加黏膜血流量、保护胃黏膜作用。本研究结果显示阻断一氧化氮合酶及环氧化酶后,应激大鼠 GMBF 降低、溃疡指数升高,与文献报道一致。

本研究发现采用吲哚美辛及 *L*-NAME 减少内源性前列腺素和一氧化氮合成后,胃黏膜 CGRP 含量增加,其机制有待于进一步研究。但结果发现,尽管胃黏膜组织 CGRP 含量升高,胃黏膜血流量却进一步减少,胃黏膜损害进一步加重。提示应激状态下,抑制环氧化酶和一氧化氮合酶时,CGRP 无显著的黏膜保护效应。

[参 考 文 献]

[1] Evangelista S. Role of sensory neurons in restitution and healing of gastric ulcers[J]. Curr Pharm Des, 2006,12:2977-2984.

[2] Harada N, Okajima K, Uchiba M, et al. Contribution of capsaicin-sensitive sensory neurons to stress-induced increases in gastric tissue levels of prostaglandins in rats[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003,285:G1214-G1224.

[3] Peskar B M. Neural aspects of prostaglandin involvement in gastric mucosal defense[J]. J Physiol Pharmacol, 2001,52(4 Pt 1):555-568.

[4] 雷银雪,李兆申,湛先保,等. 降钙素基因相关肽在应激性溃疡发生中的作用[J]. 第二军医大学学报,1998,19:464-466.

[5] Domotor A, Peidl Z, Vincze A, et al. Immunohistochemical distribution of vanilloid receptor, calcitonin-gene related peptide and substance P in gastrointestinal mucosa of patients with different gastrointestinal disorders[J]. Inflammopharmacology, 2005,13(1-3):161-177.

[6] Saeki T, Ohno T, Kamata K, et al. Mild irritant prevents ethanol-induced gastric mucosal microcirculatory disturbances through actions of calcitonin gene-related peptide and PGI2 in rats[J]. Am J Physiol, 2004,286:G68-G75.

[7] Hayashi H, Ohno T, Nishiyama K, et al. Transient prevention of ethanol-induced gastric lesion by capsaicin due to release of endogenous calcitonin gene-related peptide in rats[J]. Jpn J Pharmacol, 2001,86:351-354.

[收稿日期] 2006-11-16 [修回日期] 2007-04-02

[本文编辑] 曹 静