

文章编号:1001-6880(2018)6-1061-06

辣椒素预防大鼠胃缺血再灌注损伤的作用及机制研究

阳 凤,王 瑶,尹德锋,廖文筠,彭 林,伍 洋,彭 燕*

西南医科大学附属医院,泸州 646000

摘要:本研究为探讨辣椒素(CAP)对大鼠胃缺血再灌注损伤(GI-R)的作用及机制。成年雄性健康SD大鼠40只,随机分为4组,每组10只,A组(空白对照组),B组(手术组),C组(CAP组),D组(CAP+手术组)。给予A组、B组大鼠灌胃生理盐水10 mL/kg/d,C组、D组大鼠灌胃CAP1 mg/kg/d。4周后B组、D组于GI-R模型建立后24小时处死大鼠,收集胃液测定胃酸总酸度,肉眼计数胃黏膜损伤指数,行胃窦组织病理学观察,检测胃黏膜辣椒素受体(TRPV1)、降钙素基因相关肽(CGRP)的表达,检测胃窦组织丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)的水平。结果显示A组、C组胃黏膜未见损伤;与B组相比,D组胃黏膜损伤程度显著减轻($P < 0.05$),胃酸总酸度显著降低($P < 0.05$),MDA值显著降低($P < 0.05$),SOD值显著升高($P < 0.05$),TRPV1、CGRP表达显著增多($P < 0.05$)。实验结果表明预先给予CAP 1 mg/kg/d连续灌胃4周具有预防缺血再灌注致大鼠胃黏膜损伤的作用,其机制可能与CAP上调TRPV1、CGRP在胃内的表达、减轻氧自由基损伤有关。

关键词:辣椒素;胃缺血再灌注;胃黏膜损伤;TRPV1;CGRP

中图分类号:Q939.9;R961

文献标识码:A

DOI:10.16333/j.1001-6880.2018.6.023

The Effect and Mechanism of Capsaicin Prevented Acute Gastric Mucosal Injury by Gastric Ischemia-reperfusion

YANG Feng, WANG Yao, YIN De-feng, LIAO Wen-jun, PENG Lin, WU Yang, PENG Yan*

The Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Sichuan Province 646000, China

Abstract: This study was to explore the effect and mechanism of capsaicin on gastric ischemia-reperfusion injury in rats. Specific methods were as follows: 40 SD rats were randomly divided into 4 groups with 10 rats in each group, group A (control group), group B (operation group), group C (CAP group) and group D (CAP + operation group). Rats in group A and group B were treated with intragastric administration of normal saline 10 ml/kg/d, group C and group D with intragastric administration of CAP1 mg/kg/d. After 4 weeks, the rats in group B and group D were killed 24 hours later after the establishment of GI-R model. Last, astric juice was collected to determine the total acidity of gastric acid, counted the gastric mucosal injury index, observed the gastric mucosa pathological injury, and detected the expression of TRPV1、CGRP、MDA、SOD. Results show that: the gastric mucosa of group A and C had no damage. Compared with group B, the gastric mucosa injury were significantly reduced ($P < 0.05$), total acidity decreased significantly ($P < 0.05$), MDA decreased significantly ($P < 0.05$), SOD increased significantly ($P < 0.05$) and the expression of TRPV1、CGRP increased significantly ($P < 0.05$) in group D. Experimental results show that: it could prevent that GI-R induced acute gastric mucosal injury in rats by pretreated with CAP 1 mg/kg/d for 4 weeks. The mechanism may be related to the up regulation of TRPV1 and CGRP expression in the stomach and the reduction of oxygen free radical damage by CAP.

Key words: CAP; GI-R ; Gastric mucosal injury; TRPV1; CGRP

胃肠道是人和动物体内最易受损的组织,在严重创伤、烧伤、大手术、感染等应激状态时,各器官供血不足,血液再分布造成胃肠黏膜缺血出现最早、最明显,引起胃组织缺血再灌注而造成胃黏膜损伤。

因此在各种应激发生时保护胃黏膜尤为重要。近年来国内外有研究发现辣椒素(capsaicin, CAP)对胃黏膜有保护作用。我们前期的研究发现小剂量CAP对正常大鼠胃黏膜并无损伤作用,且预先给予大鼠灌胃CAP1 mg/kg/d连续4周,发现CAP对吲哚美辛致急性胃黏膜损伤有保护作用^[1,2]。基于此,本实验通过预先给予CAP 1 mg/kg/d连续灌胃

4周,探讨小剂量CAP对胃缺血再灌注损伤(Gastric ischemia-reperfusion injury, GI-R)的作用及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

成年雄性健康SD大鼠40只,质量160~180g(西南医科大学附属医院实验中心),CAP(成都曼思特生物科技有限公司),丙二醛(malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶(super-oxide dismutase, SOD)测试盒(南京建成生物工程研究所),兔抗大鼠辣椒素受体(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)多克隆抗体、兔抗大鼠降钙素基因相关肽(Calcitonin Gene-Related Peptde, CGRP)多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司)。

1.2 方法

实验动物随机分为4组,每组10只,A组(空白对照组),B组(手术组),C组(CAP组),D组(CAP+手术组)。具体如下:

A、B组:予以大鼠生理盐水10mL/kg/d灌胃后自由饮水进食,连续4周;

C、D组:予以大鼠CAP1mg/kg/d灌胃后自由饮水进食,连续4周;

上述处理结束后,各组大鼠禁食不禁水24h后,C、D组大鼠3%戊巴比妥钠麻醉后打开腹腔,仔细分离腹腔动脉与周围组织后,用小动脉夹夹闭腹腔动脉30min后恢复血流。24h后处死各组大鼠,收集标本。

1.2.1 标本采集

处死大鼠后收集相关标本,具体操作如下:

1.2.1.1 将大鼠固定在手术台上,剖腹,充分暴露内脏;

1.2.1.2 结扎大鼠的贲门、幽门,取其胃,沿胃大弯侧剪开,倒出胃液,并用生理盐水5mL清洗胃,收集胃液待用于胃酸总酸度测定;

1.2.1.3 将胃窦组织修剪为0.5cm×0.5cm大小,共取3块。1块浸泡于福尔马林中待用于病理组织学检查及检测TRPV1、CGRP的表达,其余2块置于-70℃的冰箱中待用于MDA、SOD的检测。

1.2.2 检测指标及方法

1.2.2.1 胃黏膜损伤指数的检查及判定标准

将胃内容物清洗干净后,按Guth标准改良评分法^[3]测定大鼠胃黏膜损伤指数,结果用“均数±标准差”表示。

1.2.2.2 胃酸总酸度测定

将收集的胃液置于离心机中,将其离心(3000rpm)10分钟后,取上清液,以酚酞作指示剂,用0.01mmol/L的NaOH进行酸碱滴定。结果用“均数±标准差”表示。

1.2.2.3 胃黏膜病理损伤积分的检查及判定标准

大鼠胃窦组织经福尔马林固定24h后,依次行脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、HE染色,在光学显微镜下观察胃黏膜病理组织学变化。按Masuda标准^[4]进行评分,每张切片累计积分最大不超过15分。结果用“均数±标准差”表示。

1.2.2.4 按试剂说明采用硫代巴比妥酸法测定胃窦组织MDA含量,氮蓝四唑法测定胃窦组织SOD活力。

1.2.2.5 胃黏膜内TRPV1、CGRP的表达。

采用二步免疫组化法检测大鼠胃黏膜内TRPV1、CGRP的表达,光镜下观察TRPV1、CGRP阳性产物的表达,判定标准:TRPV1、CGRP阳性产物强阳性者呈深黄色或棕色,阳性呈黄色,弱阳性呈浅黄色,阴性则与背景同色。选取相同染色条件下的切片于400倍光镜下随机选取5个视野观察免疫阳性产物的染色深度与广度。计分标准为:特别密集“++++”4分,密集“++”3分,中等“++”2分,稀疏“+”1分,阴性“-”0分。

1.3 统计学方法

应用SPSS17.0统计软件分析数据,所有实验数据以均数±标准差表示,各组数据先进行正态分布、方差齐性检测,若符合方差分析的应用条件(方差齐 $F > 0.1$),则采用单因素方差分析,组间差异显著性检验用独立样本t检验,若不符合则采用非参数统计方法。检验水平 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 肉眼下大鼠胃黏膜形态学改变及黏膜损伤指数

肉眼下大鼠胃黏膜形态学观察结果为A组、C组:大鼠胃黏膜呈橘红色,表面光滑,无充血水肿,未见损伤,未见血性积液;B组大鼠胃黏膜充血、水肿明显,有大量点状出血或条状糜烂灶,胃黏膜表面附着血痂;D组大鼠胃黏膜损伤程度较B组明显减轻,可见少许出血点及散在点状糜烂灶。D组损伤显著小于B组($P < 0.05$)。胃黏膜损伤指数见表1。

2.2 大鼠胃窦黏膜病理组织学改变及黏膜病理组织损伤积分

各组大鼠胃黏膜病理组织学改变见图 1, A 组及 C 组胃黏膜正常; B 组胃黏膜上皮细胞坏死、脱

落, 腺体结构紊乱; D 组胃黏膜上皮细胞部分坏死、脱落。D 组损伤显著小于 B 组($P < 0.05$)。胃黏膜病理损伤积分见表 1。

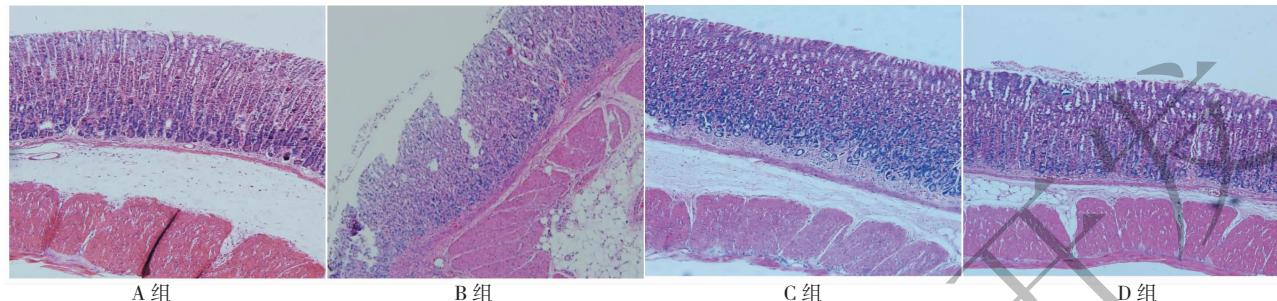


图 1 大鼠胃窦黏膜病理组织学改变($\times 100$) A 组: 空白对照组; B 组: 手术组; C 组: CAP 组; D 组: CAP + 手术组。

Fig. 1 Pathological changes of gastric antrum mucosa in rats($\times 100$). Group A(control group); Group B(operation group); Group C(CAP group); Group D(CAP + operation group)

2.3 胃酸总酸度

各组大鼠进行胃酸总酸度测定, C 组胃酸总酸

度显著小于 A、B、D 组($P < 0.05$), D 组胃酸总酸度显著小于 B 组($P < 0.05$)。见表 1。

表 1 大鼠胃黏膜损伤积分、胃酸总酸度

Table 1 The integral of gastric mucosal damage and the total acidity of gastric acid in rats

组别 Group	动物只数 Number of animals	黏膜损伤指数 Gastric mucosal damage	病理损伤积分 Pathological damage score	胃酸总酸度 Total acidity of gastric acid
A	10	0 *	0 *	$30.15 \pm 3.48 ^{*} \wedge$
B	10	33.35 ± 5.12	4.61 ± 1.27	$42.21 \pm 4.32 ^{\wedge}$
C	10	0 *	0 *	$25.13 \pm 2.45 ^{*}$
D	10	$18.24 \pm 3.11 ^{*}$	$2.13 \pm 0.85 ^{*}$	$32.87 \pm 3.07 ^{*} \wedge$

注: * 与 B 组比较 $P < 0.05$, \wedge 与 C 组比较 $P < 0.05$ 。

Note: * compared with group B, $P < 0.05$; \wedge compared with group C, $P < 0.05$.

2.4 胃窦组织 MDA 含量、SOD 活力

各组大鼠胃窦组织 MDA 含量、SOD 活力结果如表 2 所示, 与 B 组相比, D 组 MDA 含量显著降低

($P < 0.05$), SOD 活力显著升高($P < 0.05$); A 组、C 组 MDA、SOD 活力差异无明显统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 大鼠胃窦组织 MDA 含量、SOD 活力

Table 2 MDA content and SOD activity in gastric antrum of rats

组别 Group	动物只数 Number of animals	MDA (nmol/mg prot)	SOD (μ /mg prot)
A	10	$0.88 \pm 0.23 ^{*}$	$121.58 \pm 9.72 ^{*}$
B	10	3.56 ± 0.41	105.67 ± 9.88
C	10	$0.79 \pm 0.18 ^{*}$	$123.16 \pm 10.14 ^{*}$
D	10	$2.31 \pm 0.38 ^{*}$	$113.54 \pm 10.81 ^{*}$

注: * 与 B 组比较 $P < 0.05$ 。

Note: * Compared with group B, $P < 0.05$.

2.5 大鼠胃窦黏膜 TRPV1、CGRP 表达情况及评分

免疫组化法检测 TRPV1、CGRP 在胃黏膜内的

表达, 发现阳性产物主要表达在胞浆内, A 组、B 组 TRPV1 阳性产物颜色为浅黄色, 分布稀疏; C 组、D

组 TRPV1 阳性产物颜色为黄色或棕黄色, 分布特别密集。其中 C 组表达较 A、B 组显著增多 ($P < 0.05$), D 组表达较 A、B 组显著增多 ($P < 0.05$), C、

D 组表达差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。TRPV1 和 CGRP 表达情况见图 2 和图 3, 表达评分如表 3 所示。

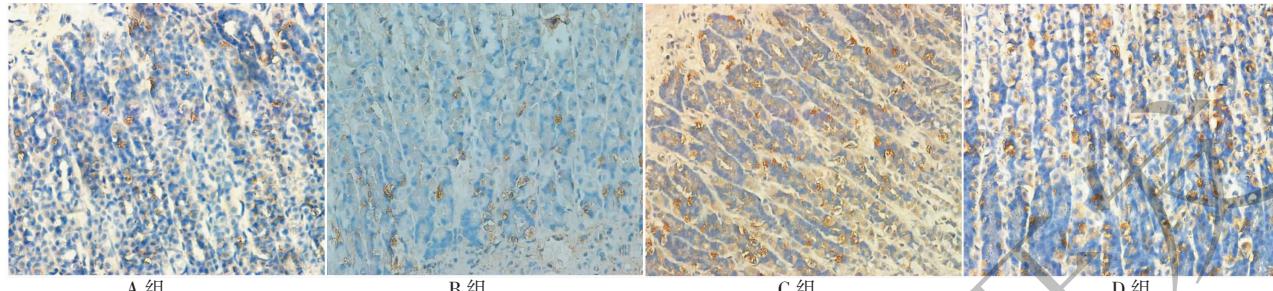


图 2 大鼠胃窦黏膜 TRPV1 表达情况 ($\times 400$) A 组: 空白对照组; B 组: 手术组; C 组: CAP 组; D 组: CAP + 手术组。

Fig. 2 Expression of TRPV1 in gastric antrum mucosa of rats. ($\times 400$). Group A (Control group); Group B (Operation group); Group C (CAP group); Group D (CAP + operation group)

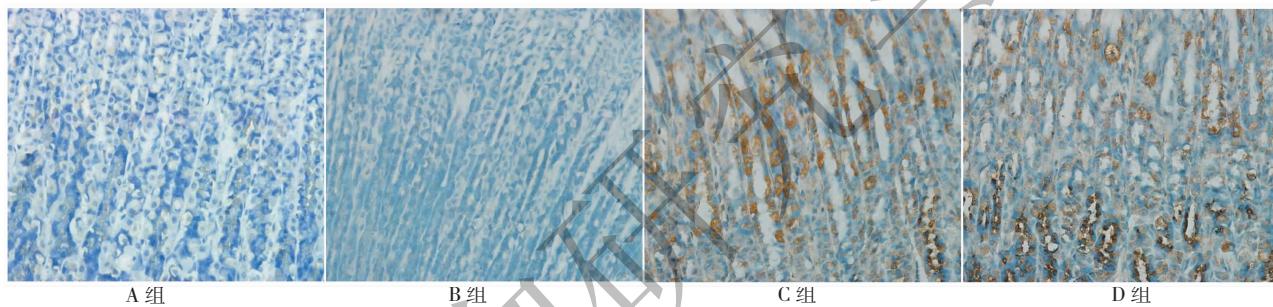


图 3 大鼠胃窦黏膜 CGRP 表达情况 ($\times 400$) A 组: 空白对照组; B 组: 手术组; C 组: CAP 组; D 组: CAP + 手术组。

Fig. 3 Expression of CGRP in gastric antrum mucosa of rats ($\times 400$). Group A (control group); Group B (operation group); Group C (CAP group); Group D (CAP + operation group)

表 3 大鼠胃窦黏膜 TRPV1、CGRP 表达评分结果

Table 3 The expression of TRPV1 and CGRP in gastric antrum mucosa of rats

组别 Group	动物只数 Number of animals	TRPV1	CGRP
A	10	$1.73 \pm 0.51^{* \wedge}$	$1.69 \pm 0.47^{* \wedge}$
B	10	$1.65 \pm 0.55^{* \wedge}$	$1.66 \pm 0.41^{* \wedge}$
C	10	3.22 ± 0.65	2.95 ± 0.54
D	10	3.25 ± 0.69	2.98 ± 0.52

注: * 与 C 组比较 $P < 0.05$; ^ 与 D 组比较 $P < 0.05$ 。

Note: * compared with group C, $P < 0.05$, ^ compared with group D, $P < 0.05$.

3 讨论

近年来随着临床医学的一些重要进展, 缺血再灌注损伤的普遍意义已引起人们的高度重视。国内外对胃缺血再灌注的研究逐渐增多, 普遍认为缺血再灌注的发生与一些综合因素有关, 如胃黏膜内氧自由基的生成过量、细胞内钙超载、胃组织及血浆中

内皮素水平增高、胃酸分泌增多、白细胞浸润、前列腺素合成减少、胃循环障碍等。

近年来位于胃组织的 TRPV1 作为伤害性感受器对局部应激的调控作用日益受到重视。TRPV1 是一种属于 TRP (transient receptor potential, TRP) 阳离子通道超家族的非选择性阳离子通道蛋白, 广泛表达于胃黏膜上皮细胞中, 能被 CAP、高温、低 PH

值等激活,可通过调节黏膜血流量、胃酸分泌、胃动力等因素改变胃组织微环境,进而对黏膜防御机制产生影响^[5,6]。有研究报道 TRPV1 在一些胃外组织器官损伤修复过程中发挥了重要作用,在血管内皮细胞中 TRPV1 可以增加其增殖和迁移能力,进而改善内皮细胞功能和缓解血管疾病,TRPV1 参与调节 IL-6 和 P 物质水平,调控角膜上皮损伤后增殖和迁移^[7]。由此我们推测 TRPV1 可能在胃黏膜损伤修复的过程中扮演了重要的角色。TRPV1 适量激活后可以通过诱导 CGRP 的表达增多和增肌胃黏膜血流量等一系列病理生理改变,发挥胃黏膜保护作用^[8]。研究表明胃黏膜血流量增加、CGRP 介导的细胞增殖均为促进损伤修复的积极因素^[9,10]本研究亦发现 CAP 组、CAP + 手术组 TRPV1、CGRP 的表达显著高于空白对照组及手术组。

OKUMI 等^[11]研究发现口服 1~100 mg/kg CAP 表现出剂量依赖性的抑制胃酸分泌作用。我们前期研究发现给予大鼠 CAP1 mg/kg/d 可明显降低胃酸总酸度,且 CAP 灌胃 4 周组较 2 周组胃酸总酸度更低^[2]。本研究亦发现 CAP 组胃酸总酸度较低,且 CAP + 手术组的胃酸总酸度显著低于手术组。Mozsik^[12]研究发现 CAP 通过 CAP 敏感神经使胃黏膜的神经或激素分泌改变,他将胃液分为壁细胞分泌和非壁细胞分泌两个部分,认为 CAP 引起的胃酸浓度降低是由于非壁细胞分泌的胃液增多。Myren 等^[13]研究发现胃酸酸度降低是 CAP 作用于 CAP 敏感神经后使 CGRP 释放增多,血管扩张,血流量增加,从而增强清除反向弥散 H⁺的能力。因此我们推测 CAP 对胃酸分泌的改变是其胃黏膜保护作用的重要机制。

生理条件下,机体可通过维持氧化-抗氧化动态平衡来维持内环境的稳定和器官组织的生理功能。生物体内脂质在氧自由基的作用下可发生过氧化反应,氧化终产物为 MDA,会引起细胞膜和线粒体膜损伤,产生能量障碍,破坏细胞结构,介导细胞凋亡,SOD 是机体内天然存在的氧自由基清除因子。基鹏等^[14,15]实验发现,小剂量 CAP 预处理后可减轻兔肺缺血再灌注损伤的氧化应激反应,可使兔肺组织 MDA 含量降低。Koguer K 研究认为小剂量 CAP 有显著的抗脂质过氧化作用,Tsurugizawa T 等发现,胃 TRPV1 敏感神经元失活后,浸水束缚应激造成胃黏膜损伤程度加重,此时伴随着脂质过氧化水平升高,他们认为感觉神经参与了急性胃黏膜损伤的发病过

程,脂质过氧化在这一过程中起重要作用^[16,17]。本实验中 CAP + 手术组组较手术组胃黏膜损伤小,且 MDA 水平降低,SOD 活力升高,推测 CAP 可能有抗胃黏膜过氧化损伤作用。

我们的前期研究及本研究均证实了小剂量 CAP 对大鼠急性胃黏膜损伤有保护作用,为 CAP 的临床应用提供了实验支持。但 CAP 对胃黏膜的作用机制目前尚不完全清楚,有待进一步研究。

参考文献

- Xu J(徐劲), Peng Y(彭燕). Effect of intragastric administration of capsaicin on gastric mucosal barrier in rats [J]. World Chinese journal of digestology(世界华人消化杂志), 2016, 24:2304-2311.
- Yang F(阳凤), Wang Y(王瑶), Peng Y(彭燕), et al. The effect and mechanism of capsaicin prevented acute gastric mucosal injury by ondometacin [J]. J Practical Med(实用医学杂志), 2017, 33:1231-1234.
- Guth PH, Paulsen G, Nagata H. Histologic and microcirculatory changes in alcohol-induced gastric lesions in the rat: effect of prostaglandin cytoprotection [J]. Gastroenterology, 1984, 87:1083-1090.
- Masuda E, Kawano S, Nagano K, et al. Role of endogenous endothelin in pathogenesis of ethanol-induced gastric mucosal injury in rats [J]. Am J Physiol, 1993, 265:G474-478.
- Shi XM(史孝敏), Li ZP(李泽培), Peng Y(彭燕). Advances in study on TRPV1 in gastrointestinal diseases [J]. Gastroenterology(胃肠病学), 2013, 18:444-446.
- Su YS, Xin JJ, Yang ZK, et al. Effects of different local moxibustion-like stimuli at zusanli (ST36) and zhongwan (CV12) on gastric motility and its underlying receptor mechanism [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2015, 20:1-8.
- Hofmann NA, Barth S, Waldeck-Weiermair M, et al. TRPV1 mediates cellular uptake of anandamide and thus promotes endothelial cell proliferation and network-formation [J]. Biol Open, 2014, 3:1164-1172.
- Evangelista S. Capsaicin receptor as target of calcitonin gene-related peptide in the gut [J]. Prog Drug Res, 2014, 68:259-76.
- Magierowski M, Jasons K, Sliwowski Z, et al. Exogenous asymmetric dimethylarginine (ADMA) in pathogenesis of ischemia-reperfusion-induced gastric lesions: interaction with protective nitric oxide (NO) and calcitonin gene-related peptide (CGRP) [J]. Int J Mol Sci, 2014, 15:4946-4964.

(下转第 1091 页)