

洛沙坦在大鼠门脉高压性胃病中的作用

张 瑞, 刘浔阳

(中南大学湘雅三医院普外一科, 长沙 410013)

[摘要] 目的:探讨洛沙坦在大鼠门脉高压性胃病中的作用及相关机制。方法:48只SD大鼠随机均分为假手术组、门静脉高压胃病模型组、洛沙坦治疗组、洛沙坦预防组。采用门静脉主干部分结扎+左肾上腺静脉结扎法复制门静脉高压胃病模型。测量门静脉压力(PVP)、胃损伤指数(GI)、胃病理评分(PI),用原位杂交技术检测各组大鼠胃部血管紧张素II₁型受体(AT₁R)表达分布和变化情况。结果:治疗组和预防组的PVP,GI和PI较模型组明显下降($P < 0.01$),血浆Ang II较模型组明显升高($P < 0.01$)。对照组罕见AT₁R表达,模型组AT₁R表达明显增高,治疗组和预防组的AT₁R表达较模型组减少($P < 0.01$)。结论 门脉高压性胃病时胃血管紧张素II₁型受体表达升高,洛沙坦不仅可以降低门脉压力,而且抑制黏膜下AT₁R活性,对门脉高压性胃病有治疗作用。

[关键词] 门脉高压性胃病; 血管紧张素II; 受体; 洛沙坦

[中图分类号] R573 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-7347(2007)03-0494-04

Effect of losartan on portal hypertensive gastropathy in rats

ZHANG Rui, LIU Xun-yang

(First Department of General Surgery, Third Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: **Objective** To determine the effect of angiotensin II receptor 1 antagonist losartan on portal hypertensive gastropathy (PHG) in rats and its mechanism. **Methods** Forty-eight Sprague-Dawley rats were randomly divided into 4 groups: a sham-operated group, a model group, a treatment group, and a prevention group. The partial portal vein and left suprarenal vein of rats were ligated to develop PHG. Portal vein pressure (PVP), the level of angiotensin II in blood, gastric injury index (GI), and pathological diagnosis integral (PI) were measured. In situ hybridization was used to determine the expression and immunolocalization of angiotensin II receptor 1 in rat stomach wall. **Results** PVP, GI, and PI of the treatment group and the prevention group were evidently reduced ($P < 0.01$), and the level of angiotensin II in blood increased obviously. The expression of angiotensin II receptor 1 was negative in the control group, increased significantly in the model group, and decreased significantly in the treatment group and the prevention group. **Conclusion** The expression of angiotensin II receptor 1 elevates in portal hypertensive gastropathy. Losartan can reduce PVP, inhibit the activation of angiotensin II receptor 1 in gastric submucous layer, and has therapeutic effect on PHG.

Key words: portal hypertensive gastropathy; angiotensin II; receptor; losartan

[J Cent South Univ (Med Sci), 2007, 32(3): 0494-04]

洛沙坦是一种非肽类血管紧张素 II 1 型受体抑制药 (angiotensin II receptor 1 antagonist, ATRA), 近几年来有研究发现洛沙坦对于肝纤维化、肝硬化和门脉高压症有治疗作用^[1], 但是洛沙坦对于门脉高压性胃病 (portal hypertensive gastropathy, PHG) 的作用仍不明确。本实验采用一期门静脉缩窄 + 左肾上腺静脉结扎法建立大鼠 PHG 模型, 探讨洛沙坦对于 PHG 的作用, 同时应用原位杂交的方法研究血管紧张素 II 1 型受体 (angiotensin II receptor 1, AT₁R) 在大鼠胃部的变化情况。

1 材料与方 法

1.1 实验动物及分组 48 只雄性 SD 鼠, 体重 250 ~ 300 g, 均购于中南大学湘雅医学院实验动物学部。随机平均分为假手术组、模型组、洛沙坦治疗组和洛沙坦预防组四组, 每组 12 只。

1.2 主要试剂 洛沙坦 (商品名科素亚), 购自杭州默沙东制药有限公司。AT₁R 原位杂交试剂盒, 购自武汉博士德生物工程有限公司。德国产 OPTION VIDAS 图像分析系统。Ang II ELASA 试剂盒购自晶美生物工程公司。

1.3 动物模型制备 实验前 24 h 禁食, 自由饮水, 乙醚麻醉大鼠。开腹后暴露并游离门静脉主干, 沿其纵轴外置一 9 号钝性针头, 于近肝门处用 3-0 丝线结扎门静脉主干及外置针头后拔针。然后暴露左肾和左肾静脉, 可见左肾上方的左肾上腺静脉, 略游离周围组织后双重结扎。随后分离左肾上腺脂肪囊, 如有小血管则予以结扎。假手术组仅游离出门静脉主干并显露左肾及左肾静脉后即关腹, 2 周后与模型组一起进行指标测定。预防组术后第 3 天给予洛沙坦 (100 mg/kg) 灌胃, 每日 1 次, 2 周后进行各项指标测定。治疗组则手术 2 周后开始给予洛沙坦 (100 mg/kg) 灌胃, 每日 1 次, 4 周后进行指标测定。

1.4 检测项目和方法

1.4.1 门静脉压力 沿腹中线进腹, 切口长约 5 cm, 暴露腹腔。找到肠系膜前静脉与脾静脉汇合点上方, 将一充满肝素钠生理盐水的 5 号静脉输液套管针逆行穿刺刺入门静脉, 然后拔出针芯。固定套管针后, 由助手抬起套管针尾部软管以大鼠右心房为“0”点测量门静脉压力 (portal vein pressure, PVP)。术后结扎穿刺处血管。

1.4.2 血浆 Ang II 浓度 剪开膈肌, 然后向上

剪开胸壁与心包, 暴露心脏。用 5 号注射器穿刺心脏采血 2 mL, 迅速注入在冰水中冷却的含 20 μ L EDTA 二钠和 10 μ L 二巯基丙醇的试管中, 摇匀, 放冰水浴冷却后, 4 $^{\circ}$ C 离心 3 000 r/min, 分离血浆, 吸取血浆放入预冷试管中, 储存于 -200 $^{\circ}$ C, 30 d 内按照 ELASA 试剂盒步骤法成批测定 Ang II。

1.4.3 胃损伤指数 待动物死后完整摘除胃脏, 并向胃内注入 2 mL 10% 的甲醛, 然后置于同浓度甲醛中充分固定, 10 min 后沿胃大弯剪开胃, 用清水反复冲洗胃黏膜表面污垢, 展开置于双目显微镜下观察出血性病灶, 用测微尺计算胃黏膜损伤面积。胃损伤指数 (gastric injury index, GI) 的计分参考 Guth 等^[2]的标准, 以局限于胃上皮的点状糜烂、溃疡、出血灶的长度累积计分: 正常为 0 分, 点状糜烂 1 分, < 1 mm 2 分, 1 ~ 2 mm 3 分, 3 ~ 4 mm 4 分, > 5 mm 5 分。

1.4.4 胃病理评分 于胃部病变最严重部位全层切取 0.5 cm 直径胃组织, 全胃无损伤者取胃底部组织, 石蜡包埋后连续 4 μ m 厚切片两张待测。HE 染色后光镜下观察胃组织学改变。病理损伤积分 (pathological diagnosis integral, PI) 参考 Mascuda 等^[3]的标准: 正常为 0 分, 表层上皮损伤为 1 分, 上层黏膜充血水肿为 2 分, 中/下层黏膜充血、出血和水肿为 3 分, 黏膜上层腺体结构紊乱或坏死为 4 分, 有深层的坏死或溃疡为 5 分。每张切片的损伤累积计分, 最大不超过 15 分。

1.4.5 胃壁 AT₁R 原位杂交及半定量分析 切片梯度脱蜡及水化后室温下置于新鲜配置 3% H₂O₂ 溶液中浸泡 20 min, 蒸馏水洗 2 次。滴加稀释的胃蛋白酶消化, 37 $^{\circ}$ C 30 min, 原位杂交专用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min, 蒸馏水洗 1 次。滴加后固定液 10 min 后蒸馏水洗 3 次, 每次 5 min。滴加预杂交液后置于 42 $^{\circ}$ C 恒温箱孵育 3 h, 甩干勿洗。滴加杂交液后盖上原位杂交专用盖玻片, 42 $^{\circ}$ C 恒温箱过夜。温浴为 37 $^{\circ}$ C 的 2 \times SSC 洗涤 5 min 2 次, 0.5 \times SSC 洗涤 15 min 1 次, 0.2 \times SSC 洗涤 15 min 1 次。滴加封闭液, 37 $^{\circ}$ C 30 min, 滴加生物素化鼠抗地高辛, 37 $^{\circ}$ C 60 min 后以原位杂交专用 PBS 洗 4 次, 每次 5 min。滴加 SABC 复合物, 37 $^{\circ}$ C 20 min 后以原位杂交专用 PBS 洗 3 次, 每次 5 min。滴加生物素化过氧化物酶, 37 $^{\circ}$ C 20 min 后以原位杂交专用 PBS 洗 4 次, 每次 5 min。DAB 显色后, 苏木素复染。每张玻片随机于胃黏膜及胃黏膜下

层选 5 个高倍视野,分析杂交信号的灰度值 (dB),以代表微血管 AT_1R mRNA 表达的强弱。

1.5 统计学处理 使用 SPSS11.0 统计软件分析,检测数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,4 组间计量资料比较使用方差分析, $P < 0.05$ 为具有统计学意义。

2 结 果

2.1 门静脉测压 模型组 PVP 明显升高,与假手术组比较有显著性差异 ($P < 0.01$)。治疗组和预防组 PVP 与模型组比较分别下降 33% 和 36%,降压效果明显 ($P < 0.01$)。治疗组与预防组 PVP 之间无统计学差异 ($P > 0.05$),但二组 PVP 仍高于假手术组 ($P < 0.01$) (表 1)。

2.2 血浆 Ang II 浓度 模型组、治疗组、预防组血浆 Ang II 浓度均明显升高,与假手术组比较有统计学差异 ($P < 0.01$)。治疗组与预防组 Ang II 浓度之间无统计学差异 ($P > 0.05$),但二组仍明显高于模型组 ($P < 0.01$) (表 1)。

2.3 胃损伤指数和胃病理损伤积分 肉眼可见各实验组大鼠胃黏膜水肿、散在分布的红点和

黏膜下小瘀斑。模型组偶见黏膜糜烂和溃疡,治疗组和预防组未见。光镜下模型组黏膜腺体排列欠整齐,上皮细胞脱落变薄,浅层毛细血管扩张,有红细胞溢出血管外。黏膜下层明显增厚。黏膜基底层和黏膜下层微静脉管壁增厚,管腔明显扩大。治疗组和预防组可见腺体排列尚整齐,黏膜下血管轻度扭曲,微血管扩张较模型组明显减轻。

模型组、治疗组、预防组胃损伤指数和胃病理损伤积分均明显升高,与假手术组有统计学差异 ($P < 0.01$)。治疗组与预防组的胃损伤指数和胃病理损伤积分均无统计学差异 ($P > 0.05$),但二组仍明显低于模型组 ($P < 0.01$) (表 1)。

2.4 原位杂交 胃黏膜 AT_1R mRNA 主要于胃黏膜和黏膜下的微循环血管壁表达,其中动脉表达明显强于静脉。肌层和浆膜血管壁上可见强信号,黏膜腺体细胞也有弱表达。假手术组单位面积血管壁信号(灰度值)较低,PHG 模型组胃黏膜和黏膜下灰度值明显升高,洛沙坦治疗组胃黏膜和黏膜下灰度值明显降低,但仍高于假手术组。洛沙坦预防组于治疗组灰度值无明显差异(表 1)。

表 1 各组大鼠 PVP, Ang II, GI, PI 和杂交信号的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Comparison of hybrid signal and PVP, Ang II, GI, and PI in 4 groups ($\bar{x} \pm s, n = 12$)

| 指标 | 假手术组 | 模型组 | 治疗组 | 预防组 |
|---------------|---------------------|------------------------|----------------------------|----------------------------|
| PVP(kPa) | 1.23 \pm 0.15 | 2.57 \pm 0.19 ** | 1.74 \pm 0.13 ***## | 1.68 \pm 0.14 ***## |
| Ang II(pg/mL) | 194.10 \pm 20.20 | 398.40 \pm 111.30 ** | 1763.20 \pm 151.40 ***## | 1935.90 \pm 102.70 ***## |
| GI | 0 | 15.17 \pm 3.24 ** | 10.33 \pm 4.67 ***## | 9.87 \pm 4.12 ***## |
| PI | 0 | 8.43 \pm 1.85 ** | 4.29 \pm 1.37 ***## | 3.79 \pm 1.43 ***## |
| 杂交信号(db) | 0.3467 \pm 0.0070 | 0.8735 \pm 0.0059 ** | 0.5125 \pm 0.0060 ***## | 0.4825 \pm 0.0057 ***## |

与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$

3 讨 论

PHG 是 20 世纪 90 年代以来逐渐引起外科医师注意的一种门脉高压症常见并发症。目前认为胃黏膜损害的原因是多因素的结果,其中包括:消化性胃病、血流变化、胃黏膜损伤易感性的增强、NO 增多、胃泌素、TNF- α 水平等^[4]。因此治疗 PHG 的药物一般是减轻门脉压力,改善胃黏膜血流,其主旨是加强有效血流,改善胃黏膜局部微血管血液淤滞状态^[5]。本实验采用的动物模型在二期门静脉缩窄的基础上加扎了左肾上腺静脉,在不过多地增加手术操作的同时,更好地减少了门

腔分流,门静脉压力升高明显,加重了大鼠胃壁大体及镜下病变程度,类似于临床上 PHG 病人的胃黏膜变化,是研究 PHG 的良好大鼠模型。

AT_1R 广泛分布于人类体内,介导 Ang II 的大多数功能,而洛沙坦可以阻断 AT_1R 与 Ang II 的结合。本研究应用洛沙坦 100 mg/(kg \cdot d) 治疗大鼠 PHG 后发现,洛沙坦可以降低模型组 PVP 达 30% 以上,降门脉压力效果显著。洛沙坦治疗组和预防组大鼠胃黏膜水肿程度减轻,散在分布的红点和黏膜下小瘀斑减少,胃黏膜下血管扭曲扩张程度减轻,大鼠的胃损伤指数和病理损伤积分均显著下降,说明洛沙坦对 PHG 有治疗作用。

实验结果显示假手术组大鼠的 AT_1R 分布在胃壁全层血管内皮,黏膜层至肌层均可见 AT_1R mRNA 表达,而且密度变化不大。PHG 时, AT_1R 的表达全层上升,但此时黏膜和黏膜下的 AT_1R mRNA 表达远高于肌层,呈现出明显的密度增强。而应用洛沙坦干预后, AT_1R mRNA 表达明显低于模型组但仍显著高于假手术组,黏膜和黏膜下层的表达仍明显高于肌层。故认为大鼠胃部 AT_1R 分布变化可能也参与了 PHG 的发病机制。作为一个强力的血管收缩因子,由于胃黏膜和黏膜下 AT_1R 的表达明显多于肌层,导致黏膜下层以后的血管收缩阻力远大于肌层,大量的血流无法进入黏膜层,引起胃黏膜缺血缺氧营养障碍,继而引发胃黏膜血管扩张因素增强,大量微血管扩张扭曲,动静脉短路开放,产生 PHG 的病理变化。

应用洛沙坦干预后 AT_1R 的表达明显下降,胃黏膜血流也相应增加,微血管的扭曲扩张减轻,改善了胃黏膜的微循环障碍,起到治疗作用。而预防组门静脉压力升高幅度明显低于模型组,胃损伤情况也轻微很多,说明 Ang II 是 PHG 发生的重要因素,但不是决定性因素。洛沙坦可以在门脉压力逐渐升高的过程中减缓压力升高速度和严重

程度,但不能阻止门脉高压症和的门脉高压性胃病的最终形成。

参考文献:

- [1] Heller J, Trebicka J, Schiozawa T, et al. Vascular, hemodynamic and renal effects of low-dose losartan in rats with secondary biliary cirrhosis [J]. *Liver Int*, 2005, 25(3): 657-666.
- [2] Guth P H, Aures D, Pauslsen G. Topical aspirin plus HCL gastric lesions in the rat [J]. *Gastroenterology*, 1979, 70(1): 88-89.
- [3] Mascuda 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-G481.
- [4] Burak K W, Beck P L. Diagnosis of portal hypertensive gastropathy [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2003, 19(5): 477-482.
- [5] Lubel J S, Angus P W. Modern management of portal hypertension [J]. *Intern Med J*, 2005, 35(1): 45-49.

(本文编辑 陈丽文)