

[文章编号] 1000- 4718(2006)03- 0620- 03

# 盐酸灌注豚鼠食管反流性疾病模型的建立\*

刘春丽, 赖克方, 陈如冲, 姚卫民, 罗 炜, 钟南山  
(广州呼吸疾病研究所, 广州医学院第一附属医院, 广东 广州 510120)

**[摘要]** 目的: 利用反复酸灌注的方法模拟人胃食管反流, 建立豚鼠食管炎模型, 以便为探讨反流相关性呼吸系统疾病提供实验动物模型。方法: 将胃管插入豚鼠食管至食管中、下端, 灌注含 0.5% 胃蛋白酶的 0.1 mol/L HCl(8drops/min, 20 min/d), 连续灌注 14 d。结果: 酸灌注后出现明显食管炎症病理改变, 光镜下可见食管下段粘膜基底细胞层增生, 乳头延长、角化过度。部分食管鳞状上皮过度增生、核增大、变圆。固有层慢性炎症细胞浸润明显, 粘膜下层内血管扩张、充血。气管、支气管粘膜也见水肿、基底膜增厚, 部分上皮脱落, 粘膜和粘膜下层炎症细胞浸润。结论: 连续酸灌注的方法成功地复制了豚鼠反流性食管炎模型, 同时伴有气管、支气管粘膜炎症, 为探讨反流相关性呼吸系统疾病的发病机制提供了帮助。

**[关键词]** 胃食管反流; 豚鼠; 模型; 动物; 盐酸

**[KEY WORDS]** Gastroesophageal reflux; Guinea pigs; Models, animal; Hydrochloric acid

**[中图分类号]** R363 **[文献标识码]** A

胃食管反流性疾病(gastro- esophageal reflux diseases, GERD)除伴发食管炎、Berrett食管等食管并发症, 还常并发或加重呼吸系统疾病, 如: 支气管哮喘、慢性咳嗽、慢性阻塞性肺疾病、睡眠呼吸暂停综合征等, 但是对于其发病机制的研究却很少, 国内、外多数为临床研究及少数观察单次盐酸灌注食管后气道血管渗出的变化<sup>[1,2]</sup>。但临床上 GERD 的发生是胃酸等反复多次反流的结果, 单次盐酸灌注模型不能全面、真实地观察反流性疾病发生的病理生理改变。为了探索反流性呼吸系统疾病的病理生理及功能变化, 合适的动物模型的建立是不可缺少的手段之一。目前常用的反流性食管炎模型多是适合消化系统疾病的模型, 对于研究反流相关的呼吸系统疾病不太适合; 能否建立一个适合研究反流相关性呼吸疾病的胃食管反流(gastro- esophageal reflux, GER)模型, 以期为进行系统全面的基础研究提供帮助? 目前普遍认为反流产生呼吸系统症状的原因主要与胃酸等反流物质对食管粘膜的损害有关, 所以我们采用胃管插入食管, 用含胃蛋白酶的盐酸灌注的方法试图建立豚鼠反流性食管炎模型。

## 材 料 和 方 法

### 1 动物及分组

雄性豚鼠 24 只, 体重 350- 450 g(第一军医大学实验动物中心), 随机分为 3 组, 盐酸灌注实验组、生理盐水对照组和未处理对照组, 每组 8 只。

### 2 方法

灌注前氯氨酮(50 mg/kg, ip)轻度麻醉豚鼠, 口腔插入 5F 胃管至食管中、下段, 胃管外端连接静脉输液器, 以 8 drops/min 速率灌注 0.1 mol/L HCl(含 0.5% 胃蛋白酶, Sigma 公司), 每次

20 min, 每天 1 次; 灌注时豚鼠取仰卧位, 用绷带将四肢和门牙固定, 并将其头部垫高, 以此方法连续灌注 14 d。生理盐水对照组: 用生理盐水代替盐酸灌注食管, 方法同上。未处理对照组同样条件饲养 14 d。14 d 后, 过量戊巴比妥钠腹腔内注射处死豚鼠, 取出食管、气管置 4% 多聚甲醛固定, 石蜡包埋, 常规 HE 染色后光镜观察组织学改变(日本 Nikon 光学显微镜及数码摄影一体化系统)。

## 结 果

### 1 一般情况

实验组前 3 d 进食稍有减少, 体重轻度降低, 此后逐渐恢复, 5- 7 d 后豚鼠饮食、活动、体重已基本如常。实验组和对照组均未见动物死亡。

### 2 食管粘膜病理学改变

**2.1 大体形态变化** 3 组动物均未见明显食管大体形态改变。

**2.2 光镜下形态变化** 光镜下可见实验组豚鼠食管粘膜层不同程度增生, 以基底细胞层和棘层细胞增生为主(占粘膜全层 15% 以上), 乳头延长、角化过度, 部分食管鳞状上皮过度增生、核增大、变圆; 固有层中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、巨噬细胞和淋巴细胞浸润, 粘膜下层内血管扩张、充血(图 1、2)。两对照组基本正常。

### 3 气管粘膜病理学改变

实验组豚鼠气管、支气管粘膜水肿, 部分上皮脱落, 粘膜和粘膜下层巨噬细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和淋巴细胞浸润, 粘膜下层内血管扩张、充血(图 3、4)。对照组气管粘膜未见异常。

[收稿日期] 2004- 07- 07 [修回日期] 2004- 10- 12

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 30370621); 广州市科技攻关重点项目基金资助项目(No. 2002Z2- E0091)  
E-mail: chunlixiao02@yahoo.com.cn

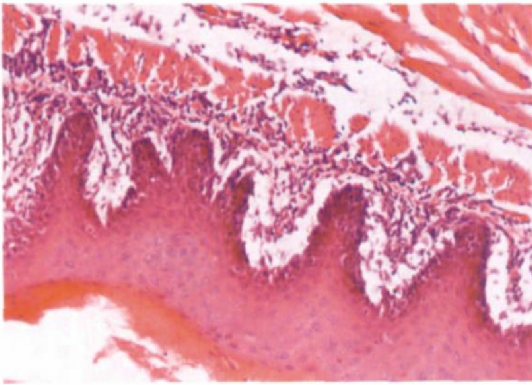


Fig 1 Chronic inflammatory in distal esophageal mucous membrane after esophageal acid perfusion for 14 consecutives days (HE staining,  $\times 200$ ).

图 1 盐酸灌注 14 d 的豚鼠食管粘膜慢性炎症改变

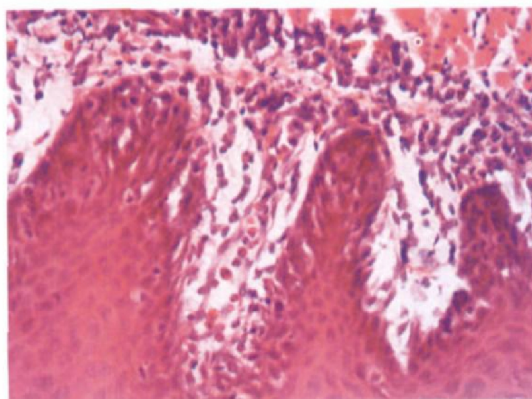


Fig 2 Inflammatory cell infiltration of esophagus in the acid perfusion guinea pigs (HE staining,  $\times 400$ ).

图 2 灌注盐酸组豚鼠食管粘膜炎症细胞浸润

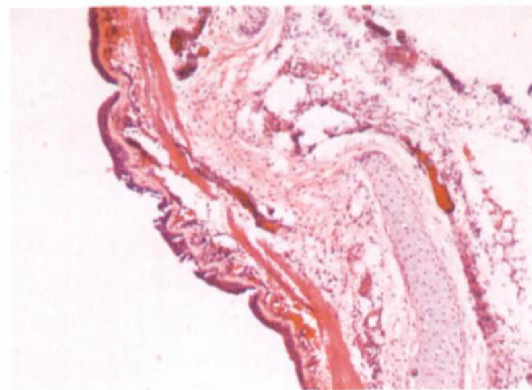


Fig 3 Chronic inflammatory in tracheal mucous membrane after esophageal acid perfusion for 14 consecutives days (HE staining,  $\times 200$ ).

图 3 盐酸灌注 14 d 的豚鼠气管粘膜慢性炎症改变

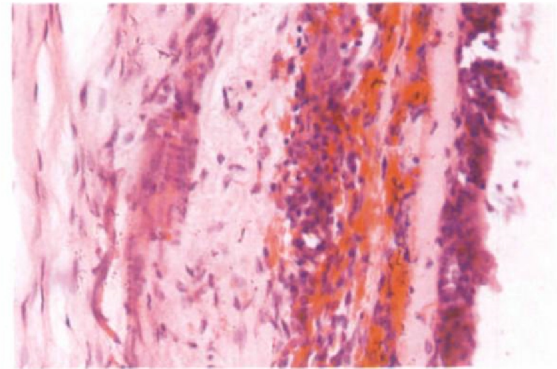


Fig 4 Inflammatory cell infiltration of tracheal in the acid perfusion guinea pigs (HE staining,  $\times 400$ ).

图 4 盐酸灌注组豚鼠气管粘膜炎症细胞浸润

呼吸系统症状,有必要对其进一步深入研究。

目前国内外常用的 GER 性动物模型多是适合观察反流性食管炎、Berrett 食管的消化疾病模型。如狗、兔或大鼠等动物,多通过贲门成形、全胃切除+食管-空肠吻合术等手术建立,手术复杂,术后死亡率高,模型建立困难;狗的模型因价格昂贵,难以进行多组、大量研究;而兔的模型因抗体或相关的试剂盒购买困难,也难以进行深入基础研究;大鼠虽然容易饲养,但大鼠的咳嗽反射不敏感,哮喘模型和咳嗽模型建立困难,难以进行反流性呼吸疾病的研究<sup>[4,5]</sup>,因此有必要建立一个适合呼吸疾病研究的反流性模型,以便对 GER 性呼吸疾病进行深入研究。豚鼠咳嗽反射敏感、致敏容易,易建立咳嗽和哮喘模型,是研究呼吸疾病的常用动物<sup>[5]</sup>。我们通过盐酸灌注 14 d 的方法建立了豚鼠反流性食管炎模型,操作方法简单。通过病理学的观察,证实该方法可以产生食管炎的病理改变,与国内外常用的食管炎模型的病理表现相同<sup>[4]</sup>,说明模型建立成功。

此外,上述豚鼠同时也出现了气管、支气管的慢性炎症性改变。GER 性咳嗽等反流性相关性呼吸疾病患者的气管、支气管粘膜也存在不同的慢性炎症改变,我们的动物模型与此相似,说明我们的模型适合于 GER 相关的呼吸疾病的研究。

气管与食管有共同的胚胎起源(前肠)和神经支配;食管机械感受器 Aδ 传入纤维、伤害刺激感受器 C 纤维与气道快速适应感受器(RARs)和 C 纤维均来自迷走神经的结状神经节和颈神经节,传入神经纤维都投射到脑干孤束核。近年来,多数学者<sup>[1,6]</sup>推测食管-支气管反射及相关神经肽所介导的神经源性炎症可能在 GER 相关性呼吸系统中起着重要作用,表现为血管通透性增高、血浆外渗、组织水肿等,进而出现咳嗽、哮喘等呼吸系统症状。Hamamoto 等<sup>[6]</sup>发现,向豚鼠食管下段灌注 1 mol/L 盐酸,导致气管和大支气管粘膜血浆外渗明显增多,应用 SP 受体拮抗剂 FK-888 呈剂量依赖性地抑制气道血浆渗出。Daoui 等<sup>[1]</sup>在向兔和豚鼠食管注入 1 mol/L 盐酸之前,给予 NK-1 受体拮抗剂 SR14033,气管和大支气管粘膜血浆外渗大部分能被抑制。这些研究说明食管-支气管反射的存在,也部分解释了本研究豚鼠的气道炎症病理改变。进一步说明该模型适合于 GER 相关的呼吸疾病研究。

### 讨 论

近年来,GER 与呼吸系统的关系逐渐为临床医生所认识。Harding 等<sup>[2]</sup>曾就 199 例哮喘病人调查发现,82% 的患者并发 GER 症状,24 h 食管 pH 监测还证实无 GER 症状病例中仍有 29% 存在 GER。我所的研究也发现中、重度哮喘患者 GER 的发生率达 58%,不明原因慢性咳嗽患者中有 10% - 20% 是由 GER 引起<sup>[3]</sup>。这些均提示相当高频率 GERD 引发

(下转第 624 页)

是较难的,且不易分离提纯<sup>[7,8]</sup>。本研究利用 Hp 重组抗原 ureB 免疫动物制备单抗,既能获取足够的纯化抗原,又勿需过多考虑表达系统的因素所造成重组蛋白与天然抗原结构差异过大等问题,因为抗原蛋白 ureB 本身是细菌蛋白,受细菌 DNA 编码控制,所以在大肠杆菌中表达的重组 ureB 蛋白同样能保持菌体蛋白的性状,通过 Western blotting 证实了该蛋白制得的单抗能够针对天然抗原起反应。

我们利用基因工程技术得到的 Hp 重组抗原 ureB 检测患者血清中相关抗体,证实具有较高特异性与敏感性。而快速尿素酶检测特异性较低。对于现症感染的检测,必须依赖抗体来检测体内的抗原,为此我们初步建立了一种诊断 Hp 现症感染的单克隆抗体检测试剂盒,该诊断方法不仅具有血清学试验特异性强、灵敏度高及损伤性小等优点,而且对鉴别患者 Hp 菌现症感染或既往感染具有重要价值。

[参 考 文 献]

[1] Gormally SM, Kierce BM, Daly LE, et al. Gastric metaplasia and duodenal ulcer disease in children infected by *Helicobacter pylori*[J]. *Gut*, 1996, 38(4): 513- 517.

[2] Michel M, Cooper N, Jean C, et al. Does helicobacter pylori initiate or perpetuate immune thrombocytopenic purpura? [J]. *Blood*, 2004, 103(3): 890- 896.

[3] 白艳艳,王兆钺,白 霞,等. 幽门螺杆菌特异性抗原尿素酶 B 的体外表达[J]. *中国免疫学杂志*, 2005, 21(4): 295- 298.

[4] 胡晓慧,沈 飞,董宁征,等. 抗人基质金属蛋白酶- 2 的单抗制备及功能研究[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(5): 876- 881.

[5] 陶玉珍,刘 瑛. 杂交瘤细胞染色体分析[J]. *生物制品资料选编*, 1991, 137- 139.

[6] 白 玲,马爱群,燕 航. 冠心病患者抗磷脂抗体与人巨细胞病毒感染关系的初步研究[J]. *中国循环杂志*, 2000, 15(3): 148- 150.

[7] 李有全,宁 磊,陈翠萍,等. 抗幽门螺杆菌尿素酶单克隆抗体的构建[J]. *生物制品年刊*, 1991, 32- 34.

[8] 涂小萍,秦 敏,杨国有,等. 幽门螺杆菌尿素酶单克隆抗体的研制及鉴定[J]. *微生物学免疫学进展*, 2004, 32(4): 26- 29.

(上接第 621 页)

[参 考 文 献]

[1] Daoui S, D' Agostino B, Gallelli L, et al. Tachykinins and airway microvascular leakage induced by HCl intra - oesophageal instillation[J]. *Eur Respir J*, 2002, 20(2): 268- 273.

[2] Harding SM, Guzzo MR, Richter JE. 24- h esophageal pH testing in asthmatics: respiratory symptom correlation with esophageal acid events[J]. *Chest*, 1999, 115(3): 654- 659.

[3] 朱礼星,马洪明,赖克方,等. 胃食管反流性咳嗽的临床分析[J]. *中华内科杂志*, 2003, 42(7): 461- 465.

[4] Elton C, Uppal R, Moore D, et al. Partial cardiomyectomy- an animal model of gastro- oesophageal reflux[J]. *Int J Surg Invest*, 1999, 1(1): 81- 85.

[5] Tatar M, Pecova R, Karclova D. Sensitivity of the cough reflex in awake guinea pigs, rats and rabbits[J]. *Bratisl Lek Listy*, 1997, 98(10): 539- 543.

[6] Hamamoto J, Kohrogi H, Kawano O, et al. Esophageal stimulation by hydrochloric acid causes neurogenic inflammation in the airways in guinea pigs[J]. *J Appl Physiol*, 1997, 82(3): 738- 745.