

# 共聚焦激光显微内镜在体评估 NSAIDs 相关胃病 及其药物干预效果

王晗<sup>1</sup>, 石莎<sup>1,2</sup>, 陈飞雪<sup>1</sup>, 李月月<sup>1</sup>, 曹静<sup>1</sup>, 左秀丽<sup>1</sup>, 李延青<sup>1</sup>

(1. 山东大学齐鲁医院消化内科, 山东 济南 250012; 2. 聊城市人民医院消化内科, 山东 聊城 252002)

**摘要:**目的 应用共聚焦激光显微内镜(CLE)在体评价非甾体抗炎药(NSAIDs)相关胃病中黏膜屏障功能障碍,探索替普瑞酮和雷贝拉唑对急性胃黏膜损伤预防与治疗的作用机制。方法 建立CLE急性胃黏膜损伤评分系统,在体评价NSAIDs相关急性胃黏膜损伤及药物干预效果,测定胃黏膜中occludin及ZO-1的表达水平。结果 NSAIDs相关胃病模型组黏膜损伤评分明显高于正常组,ZO-1与occludin表达明显减少。而药物预防组与治疗组损伤评分均明显降低,紧密连接蛋白表达则明显增多。结论 CLE可以客观、实时、准确地评价NSAIDs相关胃黏膜损伤中黏膜上皮细胞损伤及黏膜通透性的改变。NSAIDs可以引起occludin和ZO-1表达减少,导致黏膜屏障功能障碍,替普瑞酮和雷贝拉唑可以通过抑制occludin和ZO-1的表达减少,从而改善黏膜屏障功能。

**关键词:**共聚焦激光显微内镜;NSAIDs相关胃黏膜损伤;黏膜屏障功能障碍;替普瑞酮;雷贝拉唑

中图分类号:R573.3 文献标志码:A

## Evaluation of NSAIDs-induced gastropathy and therapeutic effect by confocal laser endomicroscopy

WANG Han<sup>1</sup>, SHI Sha<sup>1,2</sup>, CHEN Feixue<sup>1</sup>, LI Yueyue<sup>1</sup>, CAO Jing<sup>1</sup>, ZUO Xiuli<sup>1</sup>, LI Yanqing<sup>1</sup>

(1. Department of Gastroenterology, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan 250012, Shandong, China;

2. Department of Gastroenterology, Liaocheng People's Hospital,

Liaocheng 252002, Shandong, China)

**Abstract: Objective** To explore the morphological nature and exact mechanisms of gastric mucosal barrier dysfunction underlying NSAIDs-related gastric damage by using confocal laser endomicroscopy (CLE), and to investigate how acute mucosal injuries are influenced by geranylgeranylacetone and rabeprazole. **Methods** After a 4-grade score system of acute gastric mucosal injury by CLE was established, and the severity of NSAIDs-induced gastropathy and effect of medication were evaluated. The expressions of occludin and ZO-1 were detected. **Results** The CLE score was significantly increased and expression of tight junctions was down-regulated after the administration of indomethacin. Geranylgeranylacetone and rabeprazole could intervene in the damage process and protect the integrity of the epithelial barrier. **Conclusion** CLE can be objective, real-time and accurate in assessing the severity of NSAIDs-induced gastropathy. Geranylgeranylacetone and rabeprazole can be used as efficient prophylactic and therapeutic medications in NSAIDs-related gastropathy for their protective effect in maintaining the integrity of gastric mucosal barrier.

**Key words:** Confocal laser endomicroscopy; NSAIDs-induced gastropathy; Mucosal barrier dysfunction; Geranylgeranylacetone; Rabeprazole

非甾体类抗炎药(non-steroid anti-inflammatory drugs, NSAIDs)因其抗炎等作用而广泛用于临床<sup>[1-5]</sup>,然而 NSAIDs 应用所带来的胃黏膜损伤已成为消化道黏膜损伤的主要致病因素之一<sup>[6-9]</sup>。NSAIDs 可通过多种途径导致胃黏膜损伤的发生<sup>[10-16]</sup>,以往研究缺乏对 NSAIDs 胃黏膜损伤所致黏膜屏障功能障碍的具体评价。雷贝拉唑与替普瑞酮可以通过多种途径对 NSAIDs 所致胃损伤起保护作用<sup>[17-23]</sup>,但两药物在改善胃黏膜屏障功能的作用机制方面仍需进一步证实及完善。

共聚焦激光显微内镜(confocal laser endomicroscopy, CLE)在 NSAIDs 相关胃黏膜损伤中的应用价值尚缺乏验证,本研究旨在通过 CLE 在体观察 NSAIDs 相关胃黏膜损伤中黏膜通透性的改变以评价黏膜屏障功能障碍,并在此方法下结合体外实验分别探索替普瑞酮和雷贝拉唑对急性胃黏膜损伤黏膜屏障功能的预防与治疗作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年雄性 Wistar 大鼠 96 只,体质量 190 ~ 220 g,由山东大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 吡哌美辛肠溶片(25 mg/片):山西云鹏制药有限公司;替普瑞酮胶囊(50 mg/粒)、雷贝拉唑钠肠溶片(10 mg/粒):卫材中国药业有限公司;兔 SP 检测试剂盒、DAB 显色试剂盒:北京中杉金桥生物技术有限公司;兔抗大鼠 occludin、兔抗大鼠 ZO-1:美国 Intrivogen 公司;HRP 标记山羊抗兔 IgG:美国 Bioword 公司。

### 1.2 方法

1.2.1 动物模型制备 所有大鼠适应性饲养 1 周,实验前禁食 24 h,不禁水,药物灌胃 6 h 后进食。

药物预防机制研究中,大鼠按体质量随机分为 4 组:正常组(normal, N)、模型组(model, M)、替普瑞酮预防组(geranylgeranylacetone prevention, GP)、雷贝拉唑预防组(rabeprazole prevention, RP)。每组 12 只大鼠。正常组以生理盐水代替吡哌美辛灌胃;模型组为吡哌美辛(18 mg/kg)混悬液 1 mL 灌胃 6 h 后进行形态学观察或机制研究;替普瑞酮预防组与雷贝拉唑预防组为模型制备前 1 h 药物灌胃(雷贝拉唑 20 mg/kg、替普瑞酮 200 mg/kg)。

两药治疗机制研究中,大鼠随机分为治疗对照组(treatment control, TC)、替普瑞酮治疗组(gera-

nylgeranylacetone treatment, GT)、雷贝拉唑治疗组(rabeprazole treatment, RT)与联合治疗组(double-drug treatment, DT)。每组 12 只大鼠。治疗对照组以吡哌美辛(18 mg/kg)混悬液 1 mL 灌胃 6 h 后以 1 mL 生理盐水分别于早 9 点和下午 3 点灌胃,共治疗 3 d 后进行观察;雷贝拉唑治疗组以吡哌美辛(18 mg/kg)混悬液 1 mL 灌胃 6 h 后以 20 mg/kg 雷贝拉唑混悬液 1 mL 于每日早 9 点连续灌胃 3 d;替普瑞酮治疗组:吡哌美辛(18 mg/kg)混悬液 1 mL 灌胃 6 h 后以 200 mg/kg 替普瑞酮混悬液 1 mL 于下午 3 点连续灌胃 3 d;联合治疗组:吡哌美辛(18 mg/kg)混悬液 1 mL 灌胃 6 h 后以雷贝拉唑 20 mg/kg、替普瑞酮 200 mg/kg 分别于早 9 点和下午 3 点连续灌胃 3 d。

1.2.2 Optiscan FIVE1 共聚焦激光显微内镜形态学评估 大鼠分别以 300 mg/kg 水合氯醛腹腔注射麻醉并固定于解剖平板上,取腹部正中切线,做 1 ~ 2 cm 纵行切口,沿胃大弯剖开胃。暴露胃黏膜后心内注射荧光素钠注射液(10  $\mu$ g/g),于 1 min 后将 FIVE 1 系统的小探头垂直并轻柔放置于胃黏膜表面,对黏膜形态学进行观察评估,同时采集并储存图片,观察时间控制在 20 min 内。根据 CLE 下黏膜损伤严重程度,将 CLE 下黏膜损伤评分分为 4 级,即 0、1、2、3 级分别计 0、1、2、3 分,分别计数高质量图像中的腺体得分情况,最后取单个腺体平均值即为各组 CLE 评分结果。

1.2.3 大体损伤情况评估 以糜蛋白酶及 PBS 缓冲液冲洗胃黏膜表面血迹及黏液,在 10 倍放大镜下计数黏膜损伤区域点线状糜烂、出血等情况,按 Guth 标准<sup>[24]</sup>评估胃黏膜损伤并累计积分,即以胃上皮的糜烂、溃疡、出血灶等的长度累计积分,正常为 0 分,斑点糜烂计 1 分,糜烂长度 < 1 mm 计 2 分,1 ~ 1.9 mm 计 3 分,2 ~ 2.9 mm 计 4 分,≥ 3 mm 计 5 分,各分值相加为该动物的溃疡指数。

1.2.4 免疫组化 取胃黏膜冲洗后行 10% 甲醛固定、石蜡包埋并以 4  $\mu$ m 厚度切片,HE 染色后显微镜下观察。对应 CLE 评分系统建立 4 级黏膜损伤组织学评分,0 ~ 3 级分别计 0 ~ 3 分,计数 10 个胃小凹得分情况,取平均值即为各组病理组织学评分。组织切片梯度脱蜡、脱水、抗原修复及山羊血清封闭后,一抗(occludin 1:300; ZO-1 1:800)4  $^{\circ}$ C 下孵育过夜。随后切片经过冲洗、二抗结合、辣根酶标记联袂卵白素孵育后,显微镜下显色数秒,再以苏木素复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,树脂封片。采用二级计分法计数阳性细胞,在装有目镜网格测微尺的

光学显微镜 200 倍视野下随机选择 5 个视野,计数 500 个细胞,根据阳性细胞比例及阳性着色强度,按 Shimizu 等<sup>[25]</sup>采用的评分标准进行评分:阳性细胞数 < 5%、5% ~ 24%、25% ~ 50%、51% ~ 74% 及  $\geq$  75% 分别判定为 0、1、2、3、4 分。每张切片阳性细胞的着色强度按无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分别判定为 0、1、2、3 分。根据两项积分之和判定结果,0 分为阴性(-),1~2 分为弱阳性(+),3~5 分为中等阳性(++),6~7 分为强阳性(+++)。每例均设有 HE 切片作对照观察,并设阳性和阴性对照。应用 Image J 图像处理软件进行统计。

1.2.5 扫描电镜(scanning electron microscopy, SEM) 取腺胃区组织冲洗后以 2.5% 戊二醛固定 12 h,1% 锇酸固定 2 h,50%、70%、90%、100% 乙醇依次脱水后,乙腈真空干燥,表面喷金处理,最后扫描电子显微镜下观察胃黏膜表面超微结构的变化。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件分析数据,所有数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示。多样本之间比较检验方差齐性,方差齐性时采用多样本单因素方差分析,两两组间采用 SNK-*q* 检验;方差不齐时用非参数秩和检验,两两组间采用 LSD-*t* 检验。均以双侧

$P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 胃黏膜损伤共聚焦内镜评分 正常胃黏膜腺体结构清晰可见,腺体呈类圆形,中间为黑色的胃小凹,周围上皮细胞呈环形围绕,上皮细胞荧光强度略高于胃小凹,偶见少许强荧光的细胞散在。上皮细胞间可见清晰的细胞间隙,细胞轮廓清晰,无荧光素渗漏。急性胃黏膜病变大鼠胃黏膜腺体肿胀变小,间质水肿增宽,胃小凹扩大或延长,细胞荧光明显增强,胃小凹内可见脱落细胞团块,严重者上皮细胞完全脱落,仅遗留框架样结构,胃小凹明显扩大。我们根据胃黏膜损伤严重程度的不同建立了 4 级 CLE 下 NSAIDs 胃黏膜损伤评分系统:0 级,腺体结构清晰,呈类圆形,上皮细胞结构清晰,呈弱荧光,无荧光素渗漏;1 级,腺体结构清晰呈类圆形,可见散在强荧光细胞;2 级,胃小凹上皮细胞脱落,呈团状强荧光,胃小凹扩大,间质变宽,荧光明显增强,并可见荧光渗漏;3 级,上皮细胞完全脱落,遗留胃小凹框架样结构,小凹明显扩大,荧光渗漏明显(图 1)。

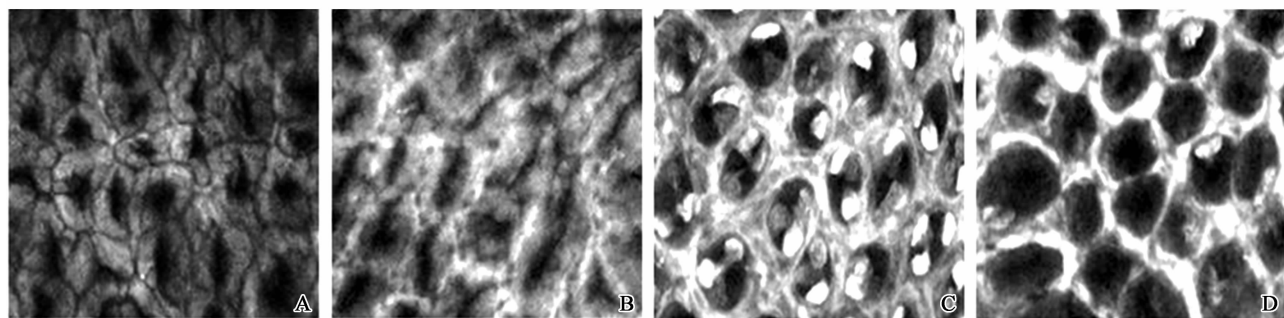


图 1 CLE 胃黏膜损伤评分( $\times 1000$ )

A:0 级; B:1 级; C:2 级; D:3 级。

Fig. 1 Gradings of mucosal injury under CLE( $\times 1000$ )

A: Level 0; B: Level 1; C: Level 2; D: Level 3.

为了进一步证实脱落细胞的存在,我们通过胃黏膜表面喷洒吡啶黄(propidium iodide, PI)来观察上皮细胞的状态,结果发现正常胃黏膜散在少量强荧光细胞,而损伤模型组强荧光细胞明显增多,严重者呈团状分布。我们用低浓度荧光素钠( $1 \mu\text{g/g}$ )心内注射后,观察可见弱荧光的团状细胞,后表面喷洒 PI,发现团状脱落细胞荧光明显增强,证实团状的强荧光即为脱落细胞形成的团块(图 2)。

2.2 NSAIDs 相关胃黏膜损伤严重程度及药物干预效果的评价

2.2.1 NSAIDs 相关胃黏膜损伤组织学与 SEM 评分 光学显微镜下可见,正常组大鼠胃黏膜形态结构完整,上皮细胞连续分布,无损伤性改变可见,而

NSAIDs 相关胃黏膜损伤模型组中可见胃黏膜上皮细胞不同程度的受损并脱落,损伤严重者甚至可见腺体顶端细胞完全缺失,仅残留腺体框架,同时间质内明显炎性细胞浸润,黏膜及黏膜下层充血水肿。根据光镜下不同大鼠胃黏膜损伤程度的不同,本研究制定了与 CLE 下 NSAIDs 相关胃黏膜损伤评分系统相匹配的病理组织学评分系统,以便于与 CLE 评分相对比:0 级,胃黏膜腺体结构清晰,上皮细胞结构完整,未见脱落细胞;1 级,腺体结构清晰,可见散在单个上皮细胞脱落;2 级,腺体结构呈不同程度的破坏,其中可见多个上皮细胞脱落,呈团状强,胃小凹扩大;3 级,上皮细胞完全脱落,腺体结构破坏明显,仅遗留胃小凹框架样结构(图 3)。



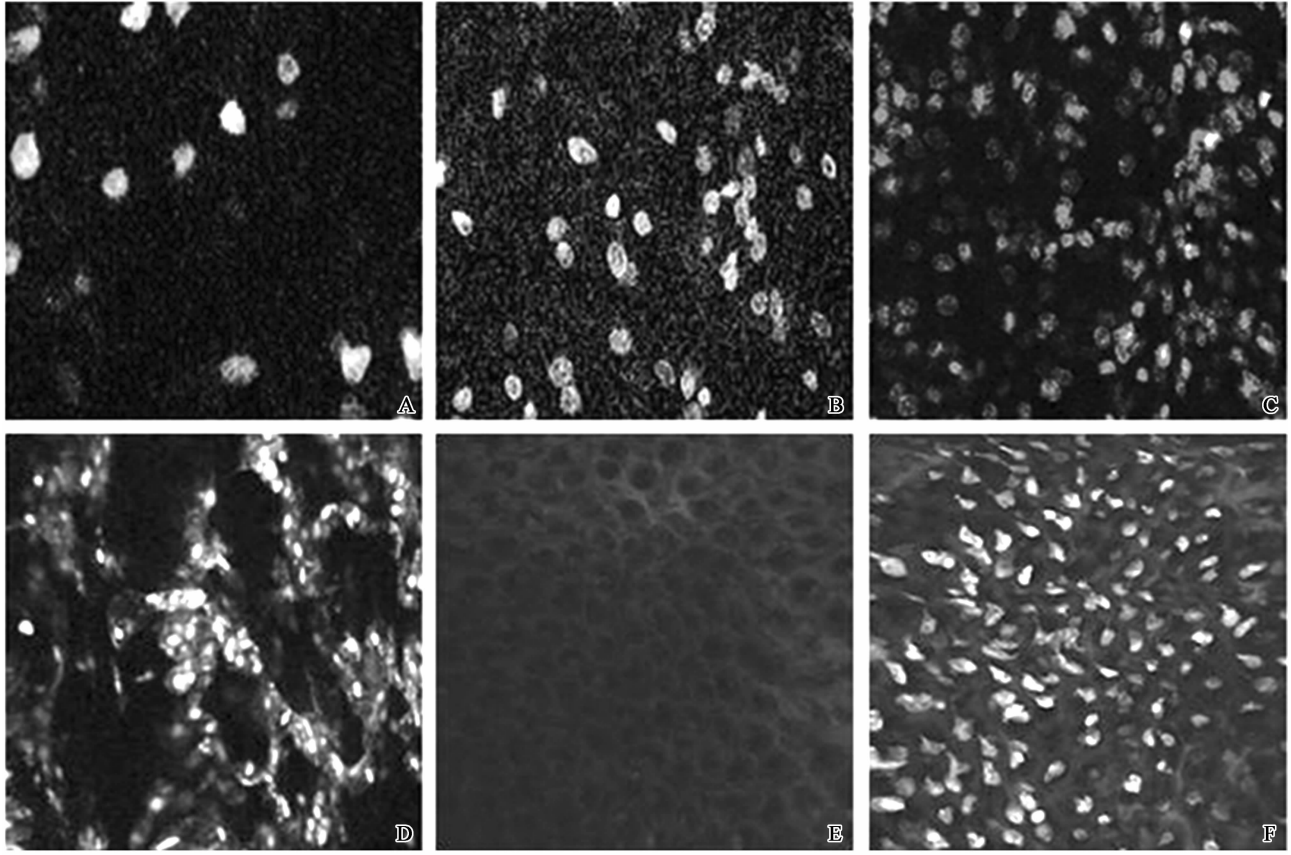


图2 黏膜表面喷洒PI后CLE下胃黏膜损伤表现( $\times 1000$ )

A:0级; B:1级; C:2级; D:3级; E:注射低浓度荧光素钠( $1\ \mu\text{g/g}$ )后,可见腺体轮廓及腺体内团块状脱落细胞; F:注射低浓度荧光素钠( $1\ \mu\text{g/g}$ )并表面喷洒PI后,团块状脱落细胞荧光明显增强。

Fig. 2 CLE presentation of gastric mucosa after the application of PI ( $\times 1000$ )

A: Level 0; B: Level 1; C: Level 2; D: Level 3; E: The contour of the pits and the intercellular spaces were clearly visible after a single injection of fluorescein sodium; F: Shedding cells in clumps with strong observable fluorescence signal following the application of both fluorescein sodium and PI.

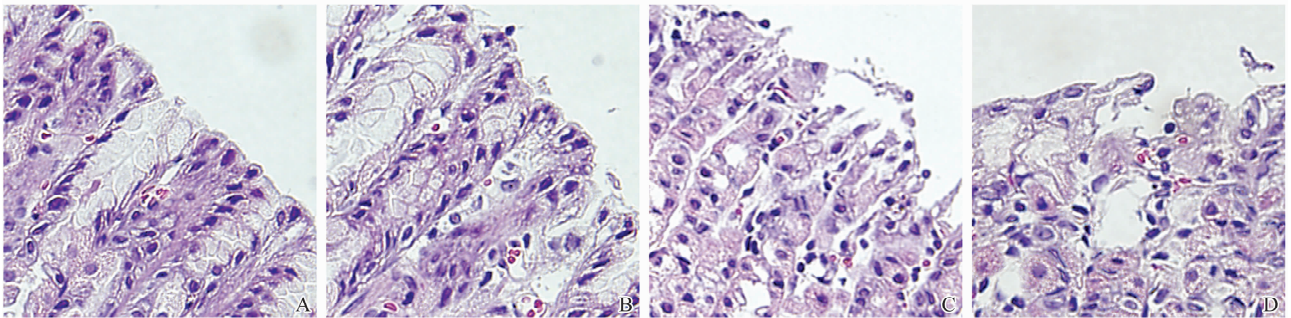


图3 黏膜损伤病理组织学评分( $\times 400$ )

A:0级; B:1级; C:2级; D:3级。

Fig. 3 Histopathological gradings of mucosal injury( $\times 400$ )

A: Level 0; B: Level 1; C: Level 2; D: Level 3.

扫描电镜下正常胃黏膜胃小凹清晰可见,并可见规律排列的上皮细胞。胃黏膜损伤后胃小凹内可见脱落细胞,严重者上皮细胞消失,间质暴露,呈框架样结构。同样根据损伤的严重程度,将SEM下胃黏膜损伤分为4级:0级,腺体结构清晰,上皮细胞规则排列,未见脱落细胞;1级,部分上皮细胞脱落,腺体细胞坏死;2级,上皮细胞脱落明显,呈团状位

于胃小凹内,可见黏膜间质暴露,呈框架状;3级,上皮细胞及腺体细胞明显破坏,黏膜间质暴露并形成深的小凹(图4)。

2.2.2 替普瑞酮、雷贝拉唑对NSAIDs相关胃黏膜损伤的预防效果 大体肉眼观,大鼠胃黏膜分为两部分,白色黏膜为鳞状上皮覆盖的胃底区,橘红色黏膜为柱状上皮覆盖的腺胃区。正常腺胃区黏膜色泽

红润,光滑,未见糜烂、溃疡及出血等损伤性改变,胃腔内液体澄清。NSAIDs 相关胃黏膜损伤模型组大鼠胃内可见血性积液,胃黏膜明显充血水肿,弥漫点状糜烂及沿胃长轴走向的条状出血斑,严重者表面可见血痂附着。黏膜损伤肉眼评分结果显示,

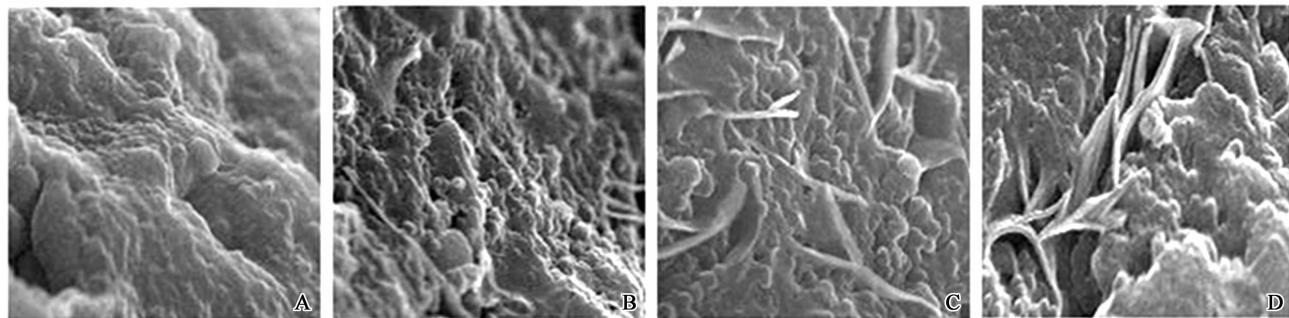


图4 黏膜损伤 SEM 评分( $\times 3\ 000$ )

A:0级; B:1级; C:2级; D:3级。

Fig. 4 SEM gradings of mucosal injury( $\times 3\ 000$ )

A: Level 0; B: Level 1; C: Level 2; D: Level 3.

表1 预防机制研究各组黏膜损伤肉眼、组织学与 CLE 评分

组别	肉眼损伤评分	组织学评分	CLE 评分
正常组	0.00 $\pm$ 0.00	0.13 $\pm$ 0.23	0.10 $\pm$ 0.02
模型组	32.17 $\pm$ 4.17*	2.83 $\pm$ 0.31*	2.23 $\pm$ 0.29*
替普瑞酮预防组	11.17 $\pm$ 3.87**	1.44 $\pm$ 0.26**	1.05 $\pm$ 0.25**
雷贝拉唑预防组	11.50 $\pm$ 3.08**	1.39 $\pm$ 0.27**	1.44 $\pm$ 0.35**

\* $P < 0.001$  vs 正常组; \*\* $P < 0.001$  vs 模型组。

黏膜损伤 CLE 评分结果显示,NSAIDs 相关胃黏膜损伤模型组肉眼损伤评分明显高于正常组( $P < 0.001$ ,表1),而替普瑞酮预防组与雷贝拉唑预防组损伤评分则明显低于模型组( $P < 0.001$ ,表1),替普瑞酮与雷贝拉唑两预防组间无统计学差异( $P = 0.86$ ,表1)。同样,病理组织学评分结果显示模型组损伤评分明显高于正常组( $P < 0.001$ ,表1),而雷贝拉唑预防组及替普瑞酮预防组黏膜损伤则较模型组减轻( $P < 0.001$ ,表1)。

2.2.3 替普瑞酮、雷贝拉唑对 NSAIDs 相关胃黏膜损伤的治疗效果 表2显示,替普瑞酮治疗组、雷贝拉唑治疗组黏膜损伤肉眼评分与组织学评分均明显高于治疗对照组( $P < 0.001$ )。而联合治疗组胃黏膜基本恢复正常,色泽红润,仅见少量点状糜烂,较治疗对照组及单药治疗组均明显好转( $P < 0.01$ ),因此,替普瑞酮与雷贝拉唑均可有效治疗 NSAIDs 引起的急性胃黏膜损伤,并且两药联合应用效果更加理想。

2.3 紧密连接蛋白 ZO-1 与 occludin 的表达与分布  
2.3.1 替普瑞酮与雷贝拉唑对 ZO-1 与 occludin 表

NSAIDs 相关胃黏膜损伤模型组损伤评分明显高于正常组、替普瑞酮预防组及雷贝拉唑预防组( $P < 0.001$ ,表1),替普瑞酮与雷贝拉唑两预防组间无统计学差异( $P = 0.86$ ,表1)。

达的预防作用 正常组织中,ZO-1 蛋白主要表达于胞质和包膜,呈棕褐色,沿胃上皮细胞连续分布,occludin 蛋白在正常组织中呈棕褐色分布于细胞膜及包浆中。然而 NSAIDs 胃黏膜损伤后,ZO-1 与 occludin 蛋白表达明显减少,颜色变淡甚至缺失,同时存在分布不均(图5)。组化结果显示,与正常组相比,NSAIDs 胃黏膜损伤模型组 ZO-1 与 occludin 的表达明显减少( $P < 0.001$ ),两药物预防组 ZO-1 与 occludin 表达也明显少于正常组( $P < 0.001$ )。而与模型组相比,两药预防应用均可明显减轻 ZO-1 与 occludin 的表达缺失( $P < 0.001$ )。替普瑞酮与雷贝拉唑预防组之间无统计学差异(ZO-1:  $P = 0.35$ ; occludin:  $P = 0.67$ )。见表3。

表2 治疗机制研究各组黏膜损伤肉眼、组织学与 CLE 评分

组别	肉眼损伤评分	组织学评分	CLE 评分
治疗对照组	10.50 $\pm$ 1.87	1.24 $\pm$ 0.23	1.06 $\pm$ 0.18
替普瑞酮治疗组	5.67 $\pm$ 1.63**	0.57 $\pm$ 0.31**	1.00 $\pm$ 0.26**
雷贝拉唑治疗组	5.50 $\pm$ 1.87**	0.67 $\pm$ 0.21**	0.59 $\pm$ 0.13**
联合治疗组	3.00 $\pm$ 1.41*	0.44 $\pm$ 0.25*	0.40 $\pm$ 0.16*

\* $P < 0.05$  vs 治疗对照组; \*\* $P < 0.05$  vs 联合治疗组。

表3 预防作用研究各组 occludin 与 ZO-1 组化表达

组别	occludin	ZO-1
正常组	6.70 $\pm$ 0.47	6.80 $\pm$ 0.41
模型组	2.10 $\pm$ 0.61*	2.63 $\pm$ 0.72*
替普瑞酮预防组	4.67 $\pm$ 0.57**	4.77 $\pm$ 0.68**
雷贝拉唑预防组	4.57 $\pm$ 0.61**	4.63 $\pm$ 0.85**

\* $P < 0.001$  vs 正常组; \*\* $P < 0.001$  vs 模型组。



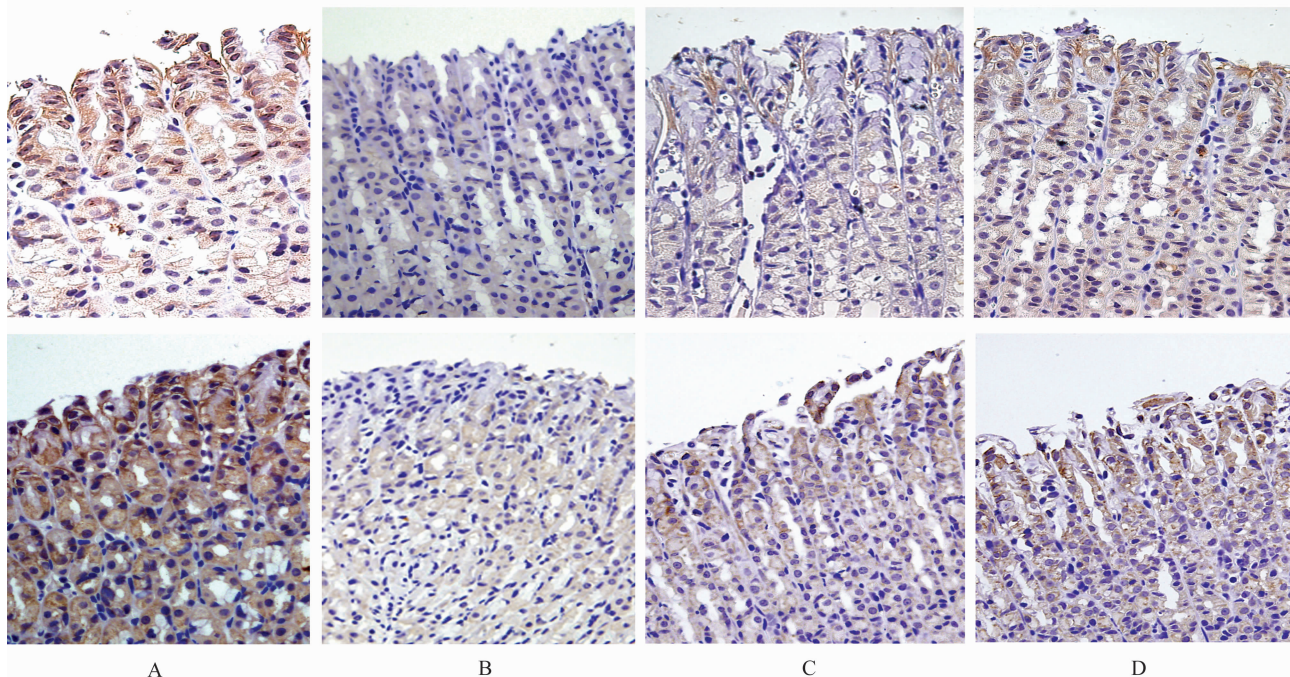


图5 预防作用研究各组 ZO-1(上)与 occludin(下)的表达( $\times 400$ )

A: 正常组; B: 模型组; C: 替普瑞酮预防组; D: 雷贝拉唑预防组。

Fig. 5 Expression of ZO-1(up) and occludin(lower) in different prevention groups( $\times 400$ )

A: Normal group; B: Model group; C: Geranylgeranylacetone prevention group; D: Rabeprazole prevention group.

2.3.2 替普瑞酮与雷贝拉唑对 ZO-1 与 occludin 表达的治疗效果 与治疗对照组相比,经替普瑞酮与雷贝拉唑治疗后,ZO-1 与 occludin 的表达缺失明显减轻( $P < 0.001$ ),两药联合治疗组效果尤为显著,

优于单药治疗,紧密连接蛋白表达甚至恢复到正常水平( $P < 0.001$ )。两单药治疗组之间无统计学差异( $P > 0.05$ ,图6)。见表4。

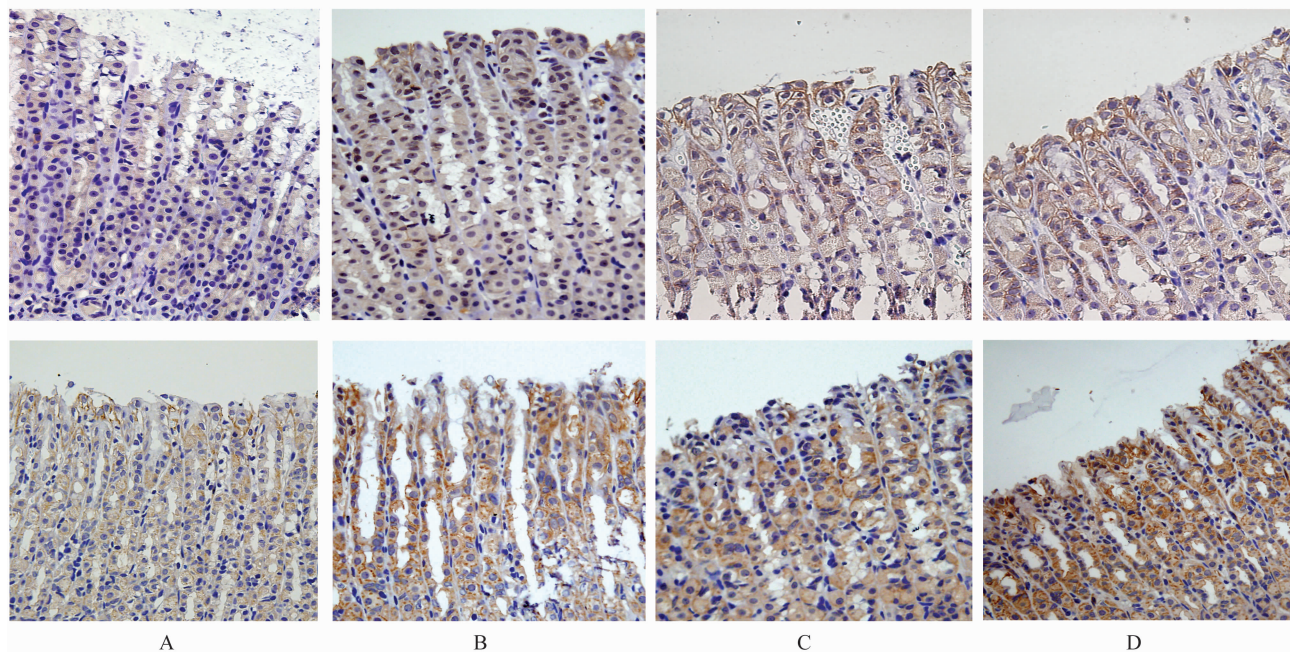


图6 治疗作用研究各组 ZO-1(上)与 occludin(下)的表达( $\times 400$ )

A: 治疗对照组; B: 替普瑞酮治疗组; C: 雷贝拉唑治疗组; D: 联合治疗组。

Fig. 6 Expression of ZO-1(up) and occludin(lower) in different treatment groups( $\times 400$ )

A: Treatment control group; B: Geranylgeranylacetone treatment group; C: Rabeprazole treatment group; D: Double-drug treatment group.



表4 治疗作用研究各组 occludin 与 ZO-1 组化表达

组别	ZO-1	occludin
治疗对照组	2.83 ± 0.79	3.10 ± 1.27
替普瑞酮治疗组	4.73 ± 0.78 <sup>*#</sup>	4.13 ± 1.07 <sup>*#</sup>
雷贝拉唑治疗组	4.40 ± 0.86 <sup>*#</sup>	4.33 ± 0.92 <sup>*#</sup>
联合治疗组	5.70 ± 0.75 <sup>*</sup>	5.80 ± 0.96 <sup>*</sup>

<sup>\*</sup>P < 0.05 vs 治疗对照组; <sup>#</sup>P < 0.05 vs 联合治疗组。

### 3 讨论

CLE 问世以来在消化道疾病诊断方面得到了广泛应用,并且制定了一系列相对完善的诊断标准。但是,对于急性胃黏膜病变的观察及研究甚少。本研究第一次应用 CLE 对急性胃黏膜损伤形态学特点进行观察并制定了相应分级标准,同时结合肉眼评估、病理组织学分析、SEM 检测与 CLE 评分对 NSAIDs 相关急性胃黏膜损伤及药物干预效果进行了综合分析。

我们根据胃小凹形状、上皮细胞及间质的形态、细胞脱落后荧光信号的强弱等指标,应用 CLE 对大鼠急性胃黏膜病变制定了相应的分级标准。本研究发现,CLE 能清晰地显示胃小凹、上皮细胞及间质的情况,客观显示损伤时坏死的强荧光上皮细胞,几乎可以与扫描电镜媲美。同时我们发现 CLE 评分结果与肉眼下黏膜损伤评分及组织学评分相比均具有良好的-一致性,因此 CLE 通过其在评价黏膜上皮细胞损伤程度及黏膜通透性功能的优势,可作为在体急性胃黏膜损伤客观、可靠且准确的评估方法。此外,CLE 还可以大面积地对损伤黏膜进行扫描,且在进行临床统计过程中,可以选取较多的视野进行综合分析,取平均值,避免了肉眼观察的主观性及粗糙性,以及组织学观察的局限性。我们还发现,出血明显的区域可能并不是损伤最严重的区域。

先前对于黏膜通透性的研究,多半通过应用分子探针测量渗透率来反映黏膜通透性,然而该方法粗糙、准确性欠佳,且不能用于局部观察。CLE 在评价黏膜通透性方面显示出其强大的优势,利用小分子荧光素钠,可以直接观察局部荧光素钠渗漏情况,从而判断黏膜通透性,方法简单,便于操作及观察,且对观察对象无损害。Li 等<sup>[26]</sup>用 CLE 观察炎症性肠病患者黏膜渗透性的改变,使得 CLE 在黏膜渗透性的观察方面取得了较大进展。我们通过观察评估胃黏膜损伤时黏膜通透性改变,发现正常及 1 级黏膜损伤时基本无荧光素钠渗漏,2 级损伤时荧光素钠渗漏明显增加,约 60% 出现荧光素钠渗漏,3 级损

伤时均出现荧光素钠渗漏。其渗漏情况与损伤程度呈正相关。因此,本研究证实 CLE 下荧光素钠渗透情况的评价可作为 NSAIDs 相关胃黏膜损伤严重程度评估的有效手段。

紧密连接蛋白是上皮细胞间连接的主要方式,在维持细胞极性及黏膜通透性方面发挥着重要作用<sup>[27]</sup>。本研究进一步探索了 NSAIDs 相关胃损伤中黏膜通透性改变与紧密连接蛋白 ZO-1 和 occludin 表达之间的关系。本研究结果表明,NSAIDs 的应用可造成胃黏膜紧密连接蛋白表达的减少,同时紧密连接蛋白的破坏和表达减少与 CLE 下上皮细胞结构紊乱及荧光素钠渗透增加呈现明显相关,紧密连接蛋白功能状态与黏膜损伤的严重程度密切相关,结果表明 CLE 可作为在体客观评价紧密连接蛋白功能状态的可靠手段。我们应用 CLE 首次在体评估了替普瑞酮和雷贝拉唑对 NSAIDs 相关胃黏膜损伤的预防与治疗效果,同时评价了替普瑞酮与雷贝拉唑在急性胃黏膜损伤中对紧密连接蛋白表达的影响。本研究结果显示,替普瑞酮与雷贝拉唑预防组及治疗组 CLE 下黏膜损伤评分、溃疡指数和病理组织学评分均明显低于 NSAIDs 相关黏膜损伤模型组,同时组化结果显示,两药物预防与治疗组中紧密连接蛋白 occludin 与 ZO-1 的表达均明显多于模型组,因此证实替普瑞酮与雷贝拉唑可有效刺激紧密连接蛋白的表达与重构,从而改善胃黏膜通透性,修复黏膜屏障功能,保护胃黏膜免受 NSAIDs 诱导的损伤并促进损伤后的修复过程。

综上所述,共聚焦显微内镜以其清晰的观察黏膜上皮细胞损伤及细胞通透性改变的优势,可为 NSAIDs 相关胃黏膜病变损伤程度评价提供可靠的在体评分手段。NSAIDs 可引起胃黏膜紧密连接蛋白的表达异常,CLE 下表现为胃黏膜表面荧光素钠渗透增加。替普瑞酮与雷贝拉唑可通过促进紧密连接蛋白的表达,维持黏膜屏障功能的完整性,从而成为 NSAIDs 相关胃黏膜损伤性疾病有效的预防与治疗药物。

#### 参考文献:

- [1] Brooks P, Emery P, Evans J F, et al. Interpreting the clinical significance of the differential inhibition of COX-1 and COX-2[J]. *Rheumatology*, 1999, 38(8): 779-788.
- [2] Bedson J, Whitehurst T, Lewis M, et al. Factors affecting over-the-counter use of aspirin in the secondary prophylaxis of cardiovascular disease [J]. *Br J Gen Pract*, 2001, 51(473): 1001-1003.
- [3] Brunelli C, Amici C, Angelini M, et al. The non-steroid-

- al anti-inflammatory drug indomethacin activates the eIF2 $\alpha$  kinase PKR, causing a translational block in human colorectal cancer cells[J]. *Biochem J*, 2012, 443(2): 379-386.
- [4] Brady R R, Loveridge C J, Dunlop M G, et al. C-Src dependency of NSAID-induced effects on NF-kappaB-mediated apoptosis in colorectal cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(7): 1069-1077.
- [5] Jones R. Nonsteroidal anti-inflammatory drug prescribing: past, present and future[J]. *Am J Med*, 2001, 110(1A): 4S-7S.
- [6] Laine L. Approaches to nonsteroidal anti-inflammatory drug use in the high-risk patient[J]. *Gastroenterology*, 2001, 120(3): 594-606.
- [7] Allison M C, Howatson A G, Torrance C J, et al. Gastrointestinal damage associated with the use of nonsteroidal antiinflammatory drugs[J]. *N Engl J Med*, 1992, 327(11): 749-754.
- [8] Fries J F, Williams C A, Bloch D A, et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated gastropathy: incidence and risk factor models[J]. *Am J Med*, 1991, 91(3): 213-222.
- [9] Dubois R W, Melmed G Y, Henning J M, et al. Risk of upper gastrointestinal injury and events in patients treated with cyclooxygenase (COX)-1/COX-2 nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), COX-2 selective NSAIDs, and gastroprotective cotherapy: an appraisal of the literature[J]. *J Clin Rheumatol*, 2004, 10(4): 178-189.
- [10] Takeuchi K, Tanaka A, Hayashi Y, et al. Functional mechanism underlying COX-2 expression following administration of indomethacin in rat stomachs: importance of gastric hypermotility[J]. *Dig Dis Sci*, 2004, 49(2): 180-187.
- [11] Takeuchi K, Tanaka A, Hayashi Y, et al. COX inhibition and NSAID-induced gastric damage-roles in various pathogenic events[J]. *Curr Top Med Chem*, 2005, 5(5): 475-486.
- [12] Banerjee D, Bhattacharya S, Bandyopadhyay S K, et al. Biochemical mechanism of healing activity of the natural phenolic, allylpyrocatechol against indomethacin-induced gastric ulceration in mice[J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(11): 2868-2877.
- [13] Brzozowski T, Tarnawski A, Hollander D, et al. Comparison of prostaglandin and cimetidine in protection of isolated gastric glands against indomethacin injury[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2005, 56 Suppl 5: 75-88.
- [14] Nagano Y, Matsui H, Muramatsu M, et al. Rebamipide significantly inhibits indomethacin-induced mitochondrial damage, lipid peroxidation, and apoptosis in gastric epithelial RGM-1 cells[J]. *Dig Dis Sci*, 2005, 50 Suppl 1: S76-83.
- [15] Yoshikawa T, Naito Y, Kishi A, et al. Role of active oxygen, lipid peroxidation, and antioxidants in the pathogenesis of gastric mucosal injury induced by indomethacin in rats[J]. *Gut*, 1993, 34(6): 732-737.
- [16] Chiou S K, Mandayam S. NSAIDs enhance proteasomic degradation of survivin, a mechanism of gastric epithelial cell injury and apoptosis[J]. *Biochem Pharmacol*, 2007, 74(10): 1485-1495.
- [17] Nishida T, Yabe Y, Fu H Y, et al. Geranylgeranylacetone induces cyclooxygenase-2 expression in cultured rat gastric epithelial cells through NF-kappaB[J]. *Dig Dis Sci*, 2007, 52(8): 1890-1896.
- [18] Okazaki M, Shimizu I, Ishikawa M, et al. Gastric mucosal levels of prostaglandins and leukotrienes in patients with gastric ulcer after treatment with rabeprazole in comparison to treatment with ranitidine[J]. *J Med Invest*, 2007, 54(1-2): 83-90.
- [19] Skoczylas T, Sarosiek I, Sostarich S, et al. Significant enhancement of gastric mucin content after rabeprazole administration; its potential clinical significance in acid-related disorders[J]. *Dig Dis Sci*, 2003, 48(2): 322-328.
- [20] Ushijima H, Tanaka K, Takeda M, et al. Geranylgeranylacetone protects membranes against nonsteroidal anti-inflammatory drugs[J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 68(4): 1156-1161.
- [21] Ohta Y, Kobayashi T, Inui K, et al. Preventive effect of teprenone on acute gastric mucosal lesion progression in compound 48/80-treated rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2004, 487(1-3): 223-232.
- [22] Dekigai H, Nakamura H, Bai J, et al. Geranylgeranylacetone promotes induction and secretion of thioredoxin in gastric mucosal cells and peripheral blood lymphocytes[J]. *Free Radic Res*, 2001, 35(1): 23-30.
- [23] Suemasu S, Tanaka K, Namba T, et al. A role for HSP70 in protecting against indomethacin-induced gastric lesions[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(29): 19705-19715.
- [24] Guth P H, Aures D, Paulsen G. Topical aspirin plus HCl gastric lesions in the rat: cytoprotective effect of prostaglandin, cimetidine, and probanthine[J]. *Gastroenterology*, 1979, 76(1): 88-93.
- [25] Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissue [J]. *Hum Pathol*, 1990, 21(6): 607-612.
- [26] Li C Q, Xie X J, Yu T, et al. Classification of inflammation activity in ulcerative colitis by confocal laser endomicroscopy[J]. *Am J Gastroenterol*, 2010, 105(6): 1391-1396.
- [27] Anderson J M, Van Itallie C M. Tight junctions and the molecular basis for regulation of paracellular permeability [J]. *Am J Physiol*, 1995, 269(4 Pt 1): G467-G475.