

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.27.025

高原低氧致应激性溃疡大鼠模型的建立*

李永慧¹, 杨梅^{2△}

(1. 青海省西宁市第一人民医院 810002; 2. 青海大学医学院, 西宁 810001)

[摘要] **目的** 建立大鼠高原低氧致应激性溃疡实验动物模型。**方法** 将大鼠分为 6 组:常氧组、高原低氧 2 d 组、高原低氧 4 d 组、高原低氧 6 d 组、高原低氧 8 d 组和高原低氧 10 d 组。除常氧组外,其余各组大鼠分别在低压氧舱内(模拟海拔 5 000 m)饲养 2、4、6、8 d 和 10 d。观察各组大鼠胃黏膜溃疡指数、胃液量、胃蛋白酶活性和胃液 pH 值的变化。**结果** 大鼠在低压氧舱内模拟海拔 5 000 m 高原低氧 2、4、6、8、10 d 后,均可见胃黏膜多个不同程度的点状和线状出血、糜烂及溃疡形成;溃疡指数明显增加;胃液量和 pH 值均明显下降,胃蛋白酶活性明显升高。各指标变化均在高原低氧第 6 天时最明显。**结论** 大鼠在模拟海拔 5 000 m 的低压氧舱内饲养 2~10 d,均可建立高原低氧致应激性溃疡动物模型,且最佳时间是 6 d。

[关键词] 应激性溃疡;高原低氧;模型
[中图分类号] R573.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2017)27-3825-03

Establishment of rat model of plateau hypoxia caused stress ulcer

Li Yonghui¹, Yang Mei^{2△}

(1. Xining Municipal First People's Hospital, Xining, Qinghai 810002, China;
2. Medical College, Qinghai University, Xining, Qinghai 810001, China)

[Abstract] **Objective** To establish the rat experimental animal model of plateau hypoxia caused stress ulcer. **Methods** Rats were randomly divided into the normoxia group, plateau hypoxia 2, 4, 6, 8, 10 d groups. Except the normoxia group, the rats in other groups were fed in a hypobaric chamber(simulated altitude 5000 m) for 2, 4, 6, 8, 10 d srespectively. Then the gastric mucosal ulcer index, gastric juice volume, pepsin activity and PH value of gastric juice were observed in each group. **Results** Different degrees of point-like and line-like bleeding, erosion and ulcer formation could be seen in rat gastric mucosa in the hypobaric chamber(simulated altitude 5 000 m) on 2, 4, 6, 8, 10 d of plateau hypoxia; the ulcer index was significantly increased; the PH value and gastric juice volume were significantly decreased and the pepsin activity was significantly elevated. The changes of various indexes were most obvious on 6 d of plateau hypoxia. **Conclusion** Rats fed in a hypobaric chamber simulating a altitude of 5 000 m for 2—10 d can eastablish the altitude hypoxia caused stress ulcer animal model, moreover the optimal time is 6 d.

[Key words] stress ulcer; plateau hypoxia; model

应激性溃疡是机体在各种应激因素(创伤、手术、低氧、寒冷、心理因素等)的刺激下发生的胃肠道黏膜急性糜烂、溃疡、出血等,病情危重,病死率高^[1]。高原是人类最具挑战性的环境之一,高原环境具有氧分压低、紫外线强、气候寒冷、辐射高、气候多变等特点。高原低氧环境可引起机体复杂的病理生理改变,包括消化系统的改变,可发生急性胃肠黏膜缺血、缺氧、黏膜屏障破坏,导致胃十二指肠黏膜糜烂和溃疡,严重者引起上消化道大出血和穿孔^[2-4]。高原应激性溃疡也是急性高原病的常见表现。目前随着相关高原活动的增多,每年到达高原的人数将超过 200 万,因此,高原低氧致胃肠应激性溃疡引起了高原医学工作者的高度重视。为进一步研究高原低氧致胃肠应激性溃疡的发病机制及药物、心理等防治,本实验通过在低压氧舱内模拟 5 000 m 高原环境,观察高原低氧应激不同时间(低氧 2、4、6、8、10 d)大鼠胃溃疡指数、胃酸及胃蛋白酶的改

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级健康 SD 大鼠 100 只,雌雄各半,体重(220±20)g,购于甘肃中医学院,合格证号:SYXK(甘)

2011-0001。
1.2 仪器 DHY-3000 型低压氧舱(贵州风雷军械机械有限公司);pH S-2C 型精密酸度计(上海雷磁仪器厂);xMark 酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)。
1.3 方法
1.3.1 动物分组 健康 SD 大鼠由兰州(海拔 1 800 m)转运到西宁(海拔 2 260 m)后,分为 6 组,每组 8 只:常氧组、低氧 2 d 组、低氧 4 d 组、低氧 6 d 组、低氧 8 d 组和低氧 10 d 组。除常氧组外,其余各组大鼠分别在青海大学医学院高原医学研究中心提供的低压氧舱内(模拟海拔 5 000 m,氧分压 42 mm Hg,温度 16.9~24℃,湿度 37%~50%)饲养 2、4、6、8 d 和 10 d,每天早上开舱 1 h、晚上开舱半小时进行加食、给水及清理卫生。常氧组大鼠饲养在舱外动物实验室(海拔 2 260 m,昼夜采光,通风良好,室温 22℃左右),自由呼吸空气、摄食和饮水,其他饲养条件相同。
1.3.2 胃液量、胃液 pH 值和胃蛋白酶活性测定 各组大鼠在低压氧舱(模拟海拔 5 000 m)和常氧条件下(海拔 2 260 m)饲养相应时间后,腹腔注射 20%乌拉坦(0.4 mL/100 g 体重)

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81360687)。 作者简介:李永慧(1980—),本科,副主任医师,从事消化内科的临床工作。
△ 通信作者,E-mail:ym_0208@163.com。

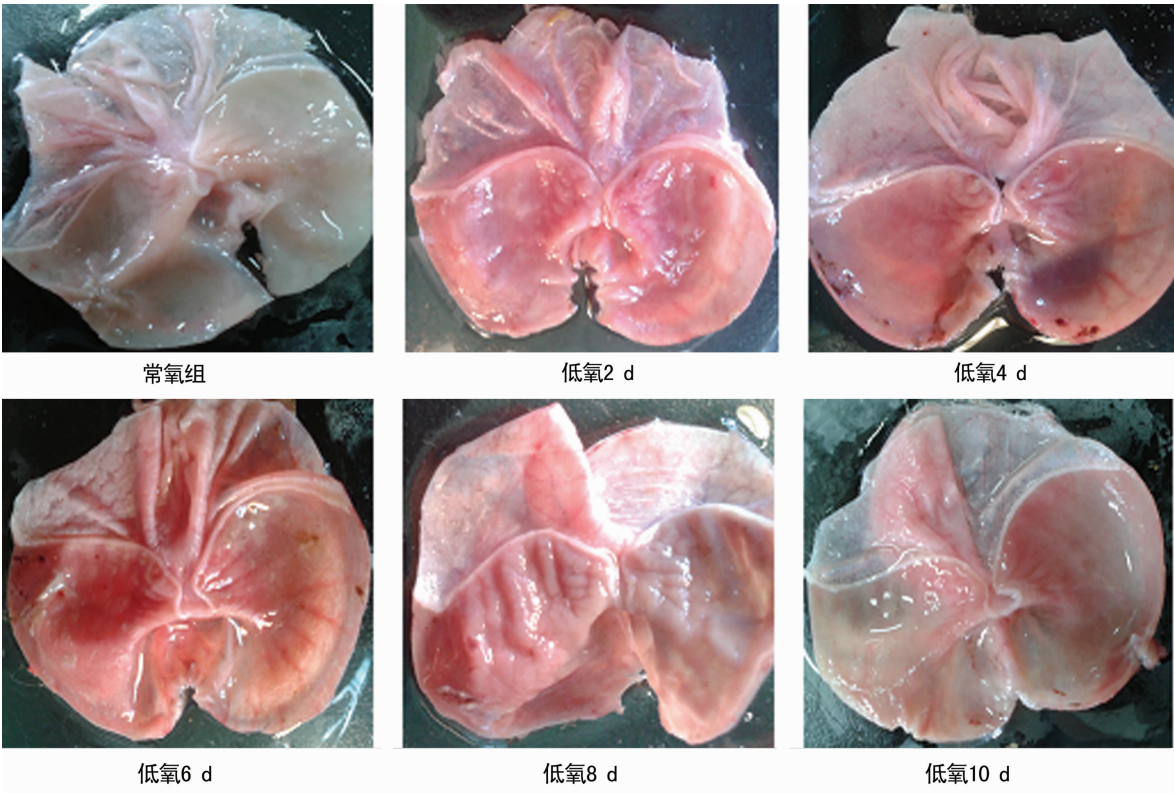


图 1 高原低氧不同时间对大鼠胃黏膜的影响

进行麻醉,背位固定,沿腹部中线纵行打开腹腔,分别结扎贲门和幽门下方一段十二指肠后剪断胃与食管及十二指肠连接处,取出全胃。用注射器抽取胃内所有胃液,置于刻度离心管中,测量其体积,即胃液量。取出的胃液以 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液用 pH S-2C 型精密酸度计检测胃液 pH 值。取部分上清胃液,按照胃蛋白酶测定试剂盒说明书进行操作,取反应终止后的样本在 660 nm 波长处测定吸光度(A),按说明书上公式计算胃液中胃蛋白酶的活性。

1.3.3 胃黏膜溃疡指数(UI)的测定 将上述方法取出的大鼠全胃,抽取完胃液后,从十二指肠处向胃内注射 10%甲醛约 5 mL(根据胃的大小控制剂量,所用甲醛能充盈胃即可,向胃内注射甲醛时要缓慢推注,避免用力过猛使甲醛进出或将胃撑破),再将胃放入 10%甲醛溶液中浸泡 15 min 后沿胃大弯剪开,用预冷的生理盐水冲洗胃腔内残留物及黏膜表面上的血迹,将胃平放于玻璃板上,在 10 倍放大镜下观察腺胃区点线状糜烂、出血情况。用数码相机在固定光源和固定位置拍照,采用 PhotoShop CS6 软件测量溃疡长度和宽度,并计算 UI。UI 计算方法根据 Guth 标准稍加改良:溃疡小于 1 mm 为 1 分,1~2 mm 为 2 分,2~3 mm 为 3 分,3~4 mm 为 4 分,大于 4 mm 将其分段计分,病灶宽度大于 1 mm 时则加倍计分,每只动物的累计总分即为该动物的 UI。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 19.0 进行统计分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本比较采用单因素方差分析,两两比较用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 高原低氧不同时间对大鼠胃黏膜的影响 常氧组大鼠胃黏膜表面光滑,呈粉红色,黏膜皱襞整齐清晰;高原低氧 2、4、6、8、10 d 组大鼠胃黏膜表面附有血痂,冷生理盐水冲洗后,可见多个不同程度的点状和线状出血、糜烂及溃疡形成。尤以高

原低氧 6 d 组最为明显,见图 1。

2.2 高原低氧不同时间对大鼠胃黏膜组织 UI 的影响 高原低氧 2、4、6、8、10 d 组大鼠的 UI 均明显高于常氧组,但在高原低氧 6 d 时大鼠的 UI 最高。说明高原低氧 2、4、6、8、10 d 均可致应激性溃疡,并且高原低氧 6 d 是建立高原低氧致应激性溃疡的最佳时间,见表 1。

表 1 高原低氧不同时间对大鼠 UI 的影响($\bar{x} \pm s$)		
组别	<i>n</i>	UI
常氧组	8	3.90±1.25
低氧 2 d	8	14.25±2.99 [#]
低氧 4 d	8	18.20±4.06 [#]
低氧 6 d	8	22.80±4.65 [#]
低氧 8 d	8	18.20±4.09 [#]
低氧 10 d	8	16.40±3.13 [#]

* : $P < 0.05$, * * : $P < 0.01$,与常氧组比较

表 2 高原低氧不同时间对大鼠胃液量、pH 值和胃蛋白酶活性的影响($\bar{x} \pm s$)			
组别	胃液量(mL)	pH 值	胃蛋白酶活性(U/mL)
常氧组	2.39±0.43	2.92±0.62	59.68±16.62
低氧 2 d	1.42±0.40 ^{* *}	2.25±0.26 [*]	83.89±24.66 [*]
低氧 4 d	1.46±0.53 ^{* *}	2.24±0.15 [*]	85.24±13.04 [*]
低氧 6 d	1.74±0.40 ^{* *}	2.23±0.13 [*]	93.47±13.84 ^{* *}
低氧 8 d	1.32±0.30 ^{* *}	2.29±0.27	91.41±19.61 ^{* *}
低氧 10 d	1.34±0.37 ^{* *}	2.41±0.17	82.63±17.88 [*]

* : $P < 0.05$, * * : $P < 0.01$,与常氧组比较

2.3 高原低氧不同时间对大鼠胃液量、pH 和胃蛋白酶活性的影响 与常氧组比较,高原低氧 2、4、6、8、10 d 组大鼠的胃液量和 pH 值均明显下降,胃蛋白酶活性明显升高。pH 值和胃蛋白酶活性在高原低氧 6 d 时变化最明显,而胃液量在高原低氧 8 d 时变化最明显。说明高原低氧可抑制胃液的分泌,但能提高胃液酸度和胃蛋白酶的活性,见表 2。

3 讨 论

应激是机体在各种内外环境因素及社会、心理因素刺激时所出现的全身性非特异性适应反应,严重的应激可导致胃肠道黏膜的损伤,产生胃肠道黏膜的糜烂、溃疡甚至穿孔,即应激性溃疡^[5]。应激刺激因素较多,如大手术、严重创伤、重度全身性感染、寒冷、高原缺氧、脑出血、烧伤以及处于高度紧张状态的高强度军事训练导致的心理和过劳应激等,均可能诱发应激性溃疡,出血甚至穿孔,一旦这种并发症发生,导致原发病加重,病死率可高达 50%^[6-8]。

应激性溃疡的发生机制及药物等的防治是医学领域研究的重要课题,而应激性溃疡动物模型是研究应激性溃疡损伤机制及防治的必要基础。根据诱发应激性溃疡的应激刺激因素不同,目前建立应激性溃疡的动物模型主要有以下几种方法:(1)单纯束缚应激:将动物四肢缚住,背位固定于木板或铁丝网上,放置 6 h 以上。(3)冷束缚应激:将动物束缚后再置于 4℃ 的冰箱中 3 h 以上。(4)水浸-束缚应激:将动物束缚后再置于 20~23℃ 的水浴中 3 h 以上。(5)烧伤应激:动物麻醉后脱毛,置于 96℃ 的热水中 18 s,导致 30% 体表面积Ⅲ度烫伤。(6)力竭性运动应激:将尾部负有 2% 体重重物的大鼠放入装有 33~36℃ 水的塑料桶内,当大鼠经过 10 s 后仍不能返回水面或运动极度不协调时即从水中捞出^[9]。也有研究者选择心理性应激、噪声应激、脑出血应激等方法制作应激性溃疡模型。

高原环境是一个特殊的生态环境系统,急进高原由于环境的强烈变化,机体缺氧及人们对高原的恐惧造成机体应激反应,也可导致应激性溃疡^[10-12]。研究高原低氧致胃肠应激性溃疡的发病机制和防治,不能简单采用上述的建模方式,而应建立高原低氧性应激性溃疡模型。本研究结果显示:大鼠在低压氧舱内模拟海拔 5 000 m 高原低氧 2、4、6、8、10 d 后,胃黏膜均可见多个不同程度的点状和线状出血、糜烂及溃疡形成;UI 明显升高;胃液量和 pH 值均明显下降,胃蛋白酶活性明显升高。各指标变化均在高原低氧第 6 天时最明显。说明大鼠在模拟海拔 5 000 m 的低压氧舱内饲养 6 d,是建立高原低氧性应激性溃疡动物模型的最佳时间。

有关高原低氧性应激性溃疡的发生机制目前尚不十分清楚,有研究者认为,急进高原由于受到低压、低氧的影响可引起肠黏膜绒毛卷曲、倒伏、凝结,肠黏膜微血管损伤,胃肠黏膜分泌型 IgG 的分泌减少,导致肠黏膜上皮细胞凋亡和自噬,使黏膜屏障功能被严重破坏^[13-14]。同时,急进高原由于环境的强烈变化,机体缺氧使机体发生应激反应^[15]。应激时:一方面交感神经兴奋,儿茶酚胺类物质分泌增多,引起内脏血管收缩,黏膜下层动静脉短路开放,造成黏膜缺血缺氧。另一方面,下丘脑-腺垂体-肾上腺皮质系统兴奋,使肾上腺皮质激素分泌增

多,皮质激素能促进胃酸的分泌,抑制胃黏液的分泌,同时加强甲状腺素的作用,甲状腺素能提高胃黏膜细胞的代谢率,使应激状态下胃黏膜缺血缺氧造成的能量代谢障碍进一步加剧。另外,高原地区迷走神经兴奋性增强,胃酸分泌增多。使过量 H⁺ 反流入细胞内,胃黏膜内酸碱平衡失调,导致大量代谢产物产生以及炎性介质失控,使胃黏膜微循环完全停滞,促进了溃疡的形成^[15]。

参考文献

[1] 王建枝,殷莲华. 病理生理学[M]. 8 版. 北京:人民卫生出版社,2014:126.

[2] Wu TY, Ding SQ, Liu JL, et al. High-altitude gastrointestinal bleeding: an observation in Qinghai-Tibetan railroad construction workers on Mountain Tanggula[J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(5): 774-780.

[3] 吴天一. 关注高原胃肠道出血症[J]. 高原医学杂志, 2000, 10(1): 1-3.

[4] 张翠萍, 谢印芝, 尹昭云. 高原低氧对消化系统生理功能影响及病理性损伤[J]. 解放军预防医学杂志, 2003, 21(3): 229-231.

[5] Herszenyi L, Juhasz M, Mihaly E, et al. Peptic ulcer disease and stress[J]. Orv Hetil, 2015, 156(35): 1426-1429.

[6] 石剑锋. 应激性溃疡防治的研究进展[J]. 现代预防医学, 2013, 40(1): 166-167.

[7] Bardou M, Quenot J P, Barkun A. Stress-related mucosal disease in the critically ill patient[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2015, 12(2): 98-107.

[8] Zhu D, Tong Q, Liu W, et al. Angiotensin (1-7) protects against stress-induced gastric lesions in rats[J]. Biochem Pharmacol, 2014, 87(3): 467-476.

[9] 尹斌, 刘真, 贾赤字. 应激性溃疡动物模型建立的研究进展[J]. 中华损伤与修复杂志, 2015, 10(5): 431-433.

[10] 刘德科, 陈嘉屿. 急进高原胃肠道运动功能障碍机制及其干预研究进展[J]. 医学综述, 2015, 21(3): 445-447.

[11] Syam AF, Simadibrata M, Wanandi SI, et al. Gastric ulcers induced by systemic hypoxia[J]. Acta Med Indones, 2011, 43(4): 243-248.

[12] 李春全. 高原地区 185 例应激性溃疡的临床分析[J]. 高原医学杂志, 2004, 14(2): 32-33.

[13] 周波, 杨定周, 周其全. 模拟高原低氧环境暴露下家兔小肠黏膜扫描电镜观察[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2009, 18(8): 751-753.

[14] 张学森, 陈奇, 严炜, 等. 高原缺氧对消化道黏膜损伤的研究现状[J]. 医学信息, 2011, 4(2): 1327-1328.

[15] 邵珂, 单体栋, 张方信. 高原低氧致胃肠应激性溃疡的研究进展[J]. 胃肠病学, 2011, 16(1): 57-59.

(收稿日期:2016-11-01 修回日期:2017-04-17)