

· 论 著 ·

舒芬太尼预先给药对浸水束缚应激大鼠胃组织 ASIC3 表达的影响

徐少群¹, 屠伟峰², 温君琳³, 赵高峰¹

1. 广东省中医院(广州中医药大学第二附属医院)麻醉科, 广东 广州 510120;

2. 广州军区广州总医院全军临床麻醉中心, 广东 广州 510010;

3. 粤北人民医院麻醉科, 广东 韶关 512026

摘要: **目的** 观察舒芬太尼与 APETx2 预先给药对浸水束缚应激(WIRS)大鼠胃组织酸敏感离子通道 3(ASIC3)表达及胃黏膜损伤的影响。**方法** 40 只雄性 Wistar 大鼠随机等分为对照组(C 组)、应激组(W 组)、舒芬太尼预先给药组(S 组,腹腔内注射舒芬太尼 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$)及 ASIC3 特异性拮抗剂 APETx2 预先给药组(A 组,腹腔内注射 APETx2 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$)。采用 WIRS 法复制应激性胃黏膜损伤模型,于应激 6 h 后留取标本测定溃疡指数(UI);黄嘌呤氧化酶法测定胃组织超氧化物歧化酶(SOD)活力与硫代巴比妥酸法测定丙二醛(MDA)含量;免疫组化和免疫印迹法测定胃组织 ASIC3 蛋白表达。**结果** 与 C 组比较,W 组、S 组及 A 组的 UI 值显著升高(P 均 < 0.01),SOD 值显著下降(P 均 < 0.01),MDA 值显著升高(P 均 < 0.01),胃组织 ASIC3 蛋白表达显著上调(P 均 < 0.01)。与 W 组比较,S 组及 A 组的 UI 值显著下降(P 均 < 0.01),SOD 值显著升高(P 均 < 0.01),MDA 值显著下降(P 均 < 0.01);A 组的 ASIC3 蛋白表达显著下调($P < 0.01$),S 组差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** APETx2 调控胃组织 ASIC3 蛋白表达,逆转氧自由基代谢失衡起胃黏膜保护作用;舒芬太尼同样通过逆转氧自由基代谢失衡起胃黏膜保护作用,但其作用机制并非通过调控 ASIC3 完成。

关键词: 舒芬太尼; 浸水束缚应激; 胃组织; 特异性拮抗剂,酸敏感离子通道 3; 溃疡指数; 超氧化物歧化酶; 丙二醛

中图分类号: R 573 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2016)08-1009-04

Effects of sufentanil pretreatments on ASIC3 expression in stomach tissues of rats with water immersion restraint stress

XU Shao-qun*, TU Wei-feng, WEN Jun-lin, ZHAO Gao-feng

* Department of Anesthesiology, Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510120, China

Corresponding author: TU Wei-feng, E-mail: wftuwx02@163.com

Abstract: Objective To evaluate the effects of pretreatments of sufentanil and APETx2 on acid sensing ion channel 3 (ASIC3) expression in stomach tissues of rats with water immersion restraint stress (WIRS) and gastric mucosal injury. **Methods** Forty male Wistar rats were randomly assigned to four groups ($n = 10$ each): control group (group C), stress group (group W), sufentanil pretreatment group (group S, intraperitoneal injection of 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ sufentanil), APETx2 pretreatment group (group A, intraperitoneal injection of 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ APETx2). The stress-induced gastric mucosal injury model was established by WIRS method. Six hours after stress, the gastric tissues specimen was taken to detect the ulcer index (UI), the total activity of superoxide dismutase (SOD) in gastric tissues by xanthine oxidase method, the content of malondialdehyde (MDA) in gastric tissues by thiobarbituric acid (TBA) method and ASIC3 protein expression in gastric tissues by immunohistochemistry and immunoblotting methods. **Results** Compared with group C, in groups W, S and A, the UI value increased significantly (all $P < 0.01$); the SOD level decreased significantly (all $P < 0.01$); the MDA level increased significantly (all $P < 0.01$); ASIC3 protein expression in gastric tissues was up-regulated significantly (all $P < 0.01$). Compared with group W, in groups S and A, the UI value decreased significantly (all $P < 0.01$); the SOD level increased significantly

(all $P < 0.01$); MDA level decreased significantly (all $P < 0.01$); ASIC3 protein expression was down-regulated significantly in group A ($P < 0.01$), and there was no significant difference in ASIC3 protein expression between groups W and S ($P > 0.05$). **Conclusions** APETx2 can play a protective role on gastric mucosa by regulating ASIC3 protein expression in gastric tissues and reversing the imbalance of oxygen free radical metabolism, while sufentanil can also play a protective role on gastric mucosa by reversing the imbalance of oxygen free radical metabolism, but its mechanism may not be through regulation of ASIC3.

Key words: Sufentanil; Water immersion restraint stress; Gastric tissues; A special autagonist, acid sensing ion channel 3; Ulcer index; Superoxide dismutase; Malondialdehyde

浸水束缚应激(WIRS)是一种经典的急性应激模型,能在数小时内产生以胃黏膜糜烂出血为特征的急性胃黏膜病变(AGML)^[1]。本课题组研究表明,在急性应激大鼠模型中,背根节(DRG)神经元上伤害性感受器变化明显,表现为瞬时受体电位香草酸亚型1(TRPV1)表达下降^[2],酸敏感离子通道3(ASIC3)表达上调^[3]。给予舒芬太尼或 ASIC3 特异性拮抗剂 APETx2 均可下调 DRG 神经元上 ASIC3 的表达而起胃黏膜保护作用^[3-4]。不同慢性胃肠炎患者的胃黏膜或肠黏膜上均有 ASIC3 蛋白明显表达^[5-6]。但迄今为止,尚无研究证实 ASIC3 在急性胃黏膜损伤中的表达情况,也未见报道舒芬太尼对 WIRS 大鼠胃组织 ASIC3 表达的影响。本研究拟通过 APETx2 预先给药,明确胃组织中 ASIC3 参与 WRIS 致 AGML 的作用;并通过腹腔内舒芬太尼预先给药,进一步观察舒芬太尼对 AGML 中胃组织 ASIC3 表达的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及分组 SPF 级 Wistar 大鼠 40 只(购自南方医科大学实验动物中心),成年雄性,体重(200 ± 30)g,随机等分为四组:对照组(C组)、应激组(W组)、舒芬太尼预先给药组(S组)及 APETx2 预先给药组(A组)。

1.2 药物处理 将枸橼酸舒芬太尼注射液(1 ml: 50 μg,宜昌人福药业)及 Toxin APETx2 冻干粉(Alomone,RTA-100,以色列)用 0.9% 氯化钠溶液稀释为 5 μg/ml,S 组在造模前腹腔内注射 25 μg/kg 的舒芬太尼,A 组同法注射 25 μg/kg 的 Toxin APETx2,其他两组注射等量的 0.9% 氯化钠溶液后进行实验。

1.3 模型复制 急性应激模型复制采用 WIRS 法^[7],实验前大鼠禁食不禁饮水 36 h 后束缚于自制铁丝笼中,垂直放入水中至剑突水平浸泡 6 h 后取出,水温保持(18 ± 1)℃。以 10% 水合氯醛按 0.4 ml/kg 麻醉后处死,剖腹分离胃,取出胃肉眼观察形态后测定溃疡指数(UI),留取胃组织测定其他指标。

1.4 胃黏膜形态观察 将取出的胃用蒸馏水冲洗干

净后沿胃壁大弯剪开,翻开暴露黏膜面,再以蒸馏水轻轻冲洗干净后肉眼观察胃黏膜形态。

1.5 UI 评定 胃黏膜形态观察完毕,洁净白纱布上完全平展胃黏膜,10 倍放大镜仔细观察并记录胃黏膜损伤情况,统计黏膜点线片状溃疡糜烂及出血情况,按 Guth 标准^[8]评估 UI。

1.6 胃组织超氧化物歧化酶(SOD)活力与丙二醛(MDA)含量测定 液氮罐取出冻存胃组织,称取重量,加 9 倍匀浆液,匀浆器匀浆,制备 10% 匀浆液,离心 10 min,取上清液,测定蛋白含量。采用黄嘌呤氧化酶法检测 SOD 总活力,采用硫代巴比妥酸(TBA)法测定 MDA 水平。实验操作过程按相应试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书进行。

1.7 免疫组化法检测胃组织 ASIC3 蛋白表达 胃组织固定、石蜡包埋、切片后,一抗兔抗鼠 ASIC3 多克隆抗体(Abcam,ab7738,英国)加入,4℃过夜。滴加二抗抗鼠 IgG,按 SABC 试剂盒(碧云天生物技术公司,上海)说明书进行实验,DAB 显色。HPISA-2000 型全自动图象分析仪分析 ASIC3 蛋白定位。

1.8 免疫印迹法检测胃组织 ASIC3 蛋白表达 液氮罐取出冻存胃组织,预冷研磨器中充分研磨,放入 4℃的蛋白裂解液,冰上静置 30 min,充分裂解,离心 30 min(4℃,12 000 rpm)后取上清。Bradford 法测定蛋白浓度。行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS PAGE)后将蛋白转移至 PVDF 膜上,封闭、孵育、曝光、显影。以 Image J 系统进行分析,将蛋白条带灰度值与内参蛋白 β-actin 灰度值比较后半定量分析。

1.9 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计软件。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间数据行单因素方差分析(ANOVA)及 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体标本观察结果 C 组为正常大鼠胃黏膜形态,可见胃腔内胃液呈淡黄色,黏膜呈淡红色,表面光滑无损伤;W 组为急性应激大鼠胃黏膜形态,可见胃液呈咖啡色,黏膜层分布大量点线状出血及片状溃疡,其余黏膜呈暗红色且明显充血肿胀;S 组为舒芬

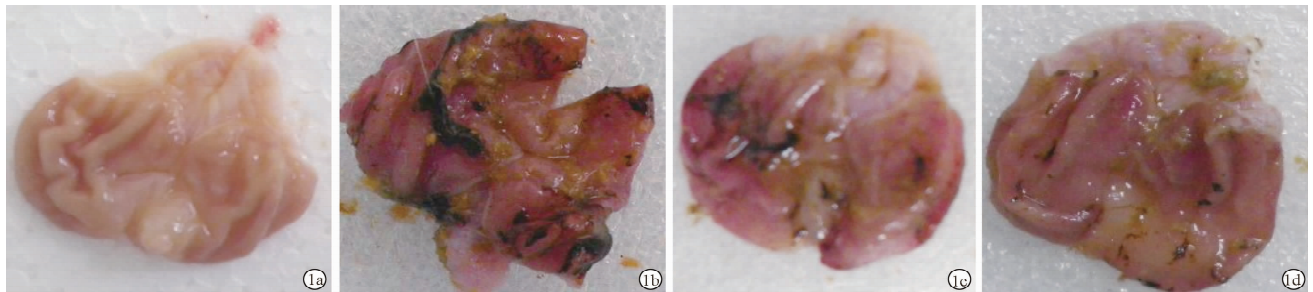
太尼预先给药大鼠胃黏膜形态,可见胃腔内少量血性积液,黏膜淡红色,表面附着少量血痂,黏膜呈点状出血及坏死,轻度充血水肿;A 组为 APETx2 预先给药大鼠胃黏膜形态,其形态与 S 组相似,也见少量血性积液,仅少量出血点及散在的斑点状溃疡。见图 1。

2.2 各组 UI、SOD、MDA 结果比较 与 C 组比较, W、S 及 A 组的 UI 值增高(P 均 <0.01);与 W 组比较, S、A 组的 UI 值降低(P 均 <0.01)。与 C 组比较, W、S、A 组的 SOD 值减少(P 均 <0.01), MDA 值增高(P 均 <0.01);与 W 组比较, S、A 组的 SOD 值均增高(P 均 <0.01), MDA 值减少(P 均 <0.01);与 S 组比较, A 组的 SOD 值及 MDA 值变化无统计学差异(P 均 >0.05)。见表 1。

2.3 胃组织 ASIC3 免疫组化结果 C 组为正常大鼠

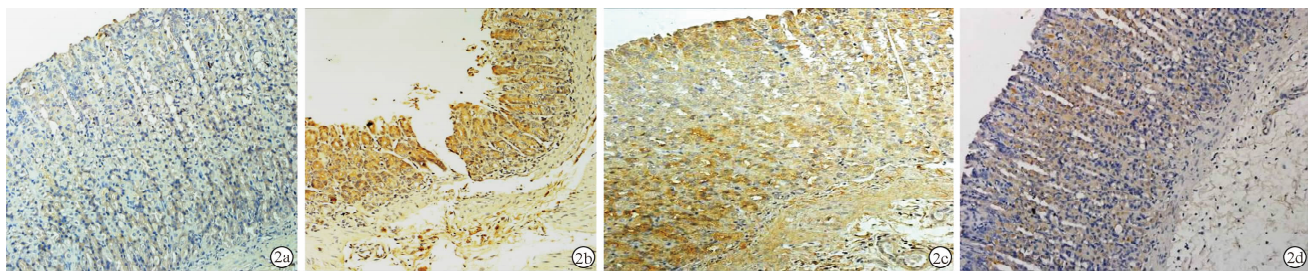
胃组织 ASIC3 蛋白免疫组化结果,仅微弱阳性表达于黏膜上皮层;W 组为急性应激大鼠胃组织 ASIC3 蛋白免疫组化结果,可见黏膜上皮层明显破坏,胃腺区、黏膜下及肌层神经丛均可见 ASIC3 蛋白棕黄色强阳性表达;S 组为舒芬太尼预先给药大鼠胃组织 ASIC3 蛋白免疫组化结果,也强阳性表达于上皮层、胃腺区、黏膜下和肌层神经丛区;A 组为 APETx2 预先给药大鼠胃组织 ASIC3 蛋白免疫组化结果,仅弱阳性表达于黏膜层。见图 2。

2.4 胃组织 ASIC3 免疫印迹结果 与 C 组比较, W、S 及 A 组的灰度值显著上升(P 均 <0.01);与 W 组比较, A 组的灰度值显著下降($P <0.01$), S 组与 W 组比较无统计学差异($P >0.05$)。见图 3、表 1。



注:1a:C 组;1b:W 组;1c:S 组;1d:A 组。

图 1 各组大鼠大体标本形态学改变($n=8$)



注:2a:C 组;2b:W 组;2c:S 组;2d:A 组。

图 2 各组大鼠胃组织 ASIC3 免疫组化染色($n=6, \times 200$)

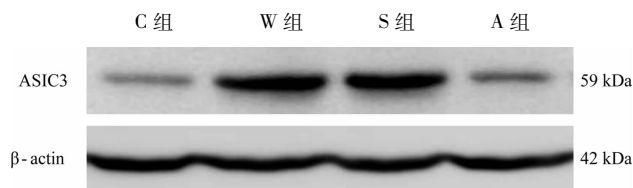


图 3 各组大鼠胃组织 ASIC3 蛋白表达($n=4$)

表 1 各组大鼠胃组织 UI、SOD、MDA 和 ASIC3 蛋白灰度值比较 ($\bar{x} \pm s$)

分组	UI 值 ($n=8$)	SOD 值($n=6$, U/mgprot)	MDA 值($n=6$, nmol/mgprot)	ASIC3 蛋白相对 灰度值($n=6$)
C 组	0.00 ± 0.00	163.99 ± 6.96	4.62 ± 0.60	0.12 ± 0.02
W 组	63.88 ± 4.45 *	38.04 ± 4.10 *	23.20 ± 2.77 *	1.45 ± 0.14 *
S 组	23.38 ± 4.60 **	98.47 ± 12.47 **	8.80 ± 1.06 **	1.40 ± 0.09 *
A 组	17.88 ± 3.56 **	97.06 ± 18.91 **	8.83 ± 1.82 **	0.54 ± 0.07 **

注:与 C 组比较, * $P <0.01$;与 W 组比较, ** $P <0.01$ 。

3 讨论

AGML 也称应激性胃溃疡,易发生在严重烧伤、创伤、重大手术等急危重人群,其发生率高达 80% ~ 100%^[9]。围术期创伤应激一直是临床麻醉医生所关注的内容,本课题组长期致力于此方面的临床及基础研究,临床观察发现,围术期良好的镇痛技术可减少 AGML 的发生率。进一步实验发现,麻醉科常用的镇静、镇痛药均可对应激性胃黏膜损伤起保护作用^[10-12],其是否存在共同作用机制有待深入研究。

由于不同药物药理作用不同,为揭示这些药物共同的抗伤害作用,课题组从感觉传入通路入手,研究机体所存在的特定伤害性感受器在胃肠道酸传感、伤

害性应激传感方面发挥的作用^[13]。现已证实 DRG 神经元上 ASIC3^[14]、TRPV1^[2] 是 WIRS 所致 AGML 的关键性伤害性感受器。为进一步揭示胃组织 ASIC3 在 WIRS 致 AGML 的作用,本研究通过造模发现,WIRS 可使 ASIC3 强阳性表达于全层胃组织中,且与胃黏膜损伤程度密切相关,ASIC3 特异性拮抗剂 APETx2^[14-15] 预先给药不仅使胃组织中 ASIC3 蛋白表达减弱,更可逆转胃黏膜损伤程度,充分提示胃组织 ASIC3 也是伤害性应激传感的关键性伤害性感受器。既往研究在炎症性膝关节炎大鼠^[16-17]、术后疼痛模型大鼠^[18]、酸诱发的炎症性疼痛模型大鼠^[19] 中均已证实,APETx2 可下调相应部位的 ASIC3 表达而发挥良好的消炎镇痛作用。提示 APETx2 可拮抗伤害性应激关键性伤害性感受器 ASIC3 而发挥抗伤害性应激作用。然而,APETx2 拮抗伤害性感受器 ASIC3 导致的下游分子变化仍未见报道。本研究发现,腹腔内注射 APETx2 后大鼠胃组织中 MDA 含量下降,SOD 含量升高,表明 APETx2 的抗伤害性应激能力与其减少机体氧化性损伤、增强抗氧化能力有关。

舒芬太尼药理作用主要以激动 μ -阿片受体为主。本课题组已充分表明,舒芬太尼能通过作用于 SOD、MDA 等氧化应激因子^[20],TNF- α 、IL-1 β 等促炎因子^[9],促肾上腺皮质激素释放因子^[21] 等中枢神经递质发挥胃黏膜保护作用。本研究也再次确证了舒芬太尼的抗氧自由基作用。然而,尽管给予舒芬太尼处理后胃黏膜能保持不受急性应激的破坏,但全层胃组织中 ASIC3 蛋白仍呈现阳性表达,提示尽管舒芬太尼预先给药能通过抗氧自由基作用起胃黏膜保护作用,但其作用机制并非通过调控 ASIC3 完成。

综上所述,本研究证实在急性应激大鼠模型中,APETx2 可调控胃组织 ASIC3 蛋白表达量,逆转氧自由基代谢失衡起胃黏膜保护作用;舒芬太尼也有逆转氧自由基代谢失衡起胃黏膜保护的作用,但其作用机制并非通过调控 ASIC3 完成。

参考文献

[1] 解立俊,屠伟峰. 颅脑损伤后应激性胃黏膜病变的病理生理机制研究进展[J]. 实用医学杂志,2007,23(6):920-922.
 [2] 郗文斌,屠伟峰,温君琳,等. 冷水束缚应激对大鼠脊髓背根神经节、胃组织内 TRPV1 mRNA 及血清 SOD、MDA 的影响[J]. 广东医学,2014,35(16):2506-2510.
 [3] 蒋群,屠伟峰. 舒芬太尼预处理对大鼠急性胃黏膜病变的保护作用及与酸敏感离子通道的关系[J]. 南方医科大学学报,2010,30(5):1099-1102.

[4] 徐少群,屠伟峰,郗文斌,等. APETx2 对应激性胃黏膜损伤大鼠脊髓背根神经节酸敏感离子通道 3 表达的影响[J]. 实用医学杂志,2015,31(7):1088-1091.
 [5] Yuan LP,Bo Y,Ming G,et al. Expression of acid-sensing ion channels of gastric mucosa from patients with Henoch-Schönlein purpura[J]. J Pediatr Gastroenterol Nutr,2012,54(4):561-563.
 [6] Holzer P. Acid-sensing ion channels in gastrointestinal function[J]. Neuropharmacology,2015,94:72-79.
 [7] Xu S,Tu W,Wen J,et al. The selective ASIC3 inhibitor APETx2 alleviates gastric mucosal lesion in the rat[J]. Pharmazie,2014,69(7):542-546.
 [8] Lim JH,Kim JH,Kim N,et al. Gastroprotective effect of cochinchina momordica seed extract in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced acute gastric damage in a rat model[J]. Gut Liver,2014,8(1):49-57.
 [9] Ali T,Harty RF. Stress-induced ulcer bleeding in critically ill patients[J]. Gastroenterol Clin North Am,2009,38(2):245-265.
 [10] 丁冬,屠伟峰,李成龙. 氯胺酮预处理对大鼠应激性溃疡的保护作用[J]. 实用医学杂志,2008,24(2):179-181.
 [11] 凌琼,屠伟峰,李成龙,等. 氟比洛芬酯预处理明显减轻冷水束缚应激大鼠氧自由基介导急性胃黏膜损害[J]. 国际麻醉学与复苏杂志,2009,30(2):116-118.
 [12] 李成龙,屠伟峰,丁冬. 舒芬太尼预处理对大鼠急性胃黏膜病变组织中 TNF- α mRNA 与 IL-1 β mRNA 表达的影响[J]. 热带医学杂志,2010,10(6):663-665.
 [13] Holzer P. Role of visceral afferent neurons in mucosal inflammation and defense[J]. Curr Opin Pharmacol,2007,7(6):563-569.
 [14] Jensen JE,Durek T,Alewood PF,et al. Chemical synthesis and folding of APETx2, a potent and selective inhibitor of acid sensing ion channel 3[J]. Toxicon,2009,54(1):56-61.
 [15] Bulsiewicz WJ,Shaheen NJ,Hansen MB,et al. Effect of amiloride on experimental acid-induced heartburn in non-erosive reflux disease[J]. Dig Dis Sci,2013,58(7):1955-1959.
 [16] Izumi M,Ikeuchi M, Ji Q, et al. Local ASIC3 modulates pain and disease progression in a rat model of osteoarthritis[J]. J Biomed Sci, 2012,19(1):77.
 [17] Yuan FL,Chen FH,Lu WG, et al. Acid-sensing ion channels 3: a potential therapeutic target for pain treatment in arthritis[J]. Mol Biol Rep,2010,37(7):3233-3238.
 [18] Deval E,Noël J,Gasull X, et al. Acid-sensing ion channels in post-operative pain[J]. J Neurosci,2011,31(16):6059-6066.
 [19] Karczewski J,Spencer RH,Garsky VM, et al. Reversal of acid-induced and inflammatory pain by the selective ASIC3 inhibitor, APETx2[J]. Br J Pharmacol,2010,161(4):950-960.
 [20] 刘晓艳,屠伟峰,曹明,等. 舒芬太尼或(和)泮托拉唑预处理对浸水束缚应激大鼠胃黏膜损伤的影响[J]. 实用医学杂志,2013,29(6):883-886.
 [21] 杨垂勋,屠伟峰,安裕文. 舒芬太尼预处理对冷水束缚应激大鼠血浆促肾上腺皮质激素释放因子的影响[J]. 实用医学杂志,2010,26(18):3299-3301.