

胃泌素、5-羟色胺和生长抑素在急性酒精中毒大鼠胃窦的表达^{*}

夏白娟^{**}, 胡 赞, 李一欣, 谢 莉

(贵阳医学院 组织学与胚胎学教研室, 贵州 贵阳 550004)

[摘要] 目的: 探讨急性酒精中毒对大鼠胃窦部胃泌素(Gas)、5-羟色胺(5-HT)和生长抑素(SS)免疫反应阳性细胞的影响。方法: 正常雄性SD大鼠, 随机分为正常组和实验组, 实验组大鼠用白酒灌胃, 在灌胃后不同时间段取胃窦组织, 用免疫组织化学SABC法及图像分析法分析Gas、5-HT和SS阳性细胞的表达。结果: (1)与正常组比较, 酒精中毒大鼠胃窦部Gas、5-HT阳性细胞数增多($P < 0.05$), 以1 h组最为明显; SS阳性细胞数减少($P < 0.05$), 以2 h组最为显著; (2)急性酒精中毒大鼠胃窦部Gas、5-HT阳性细胞灰度值均低于正常组($P < 0.05$), 以1 h组最深; SS阳性细胞灰度值高于正常组($P < 0.05$), 以2 h最明显。结论: 在急性酒精中毒期间, Gas、5-HT在胃窦部表达增多, 而SS分泌减少, 提示这几种胃肠激素参与了酒精对胃黏膜的损伤过程。

[关键词] 酒精中毒; 急性; 胃泌素类; 5-羟色胺; 生长抑素; 胃; 免疫组织化学

[中图分类号] R329 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2011)05-0481-04

Expression of Gas, 5-HT and SS in Gastric Antrum of Rats with Acute Alcohol Intoxication

XIA Baijuan, HU Yun, LI Yixin, XIE Li

(Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the effect of acute alcohol intoxication on Gas, 5-HT and SS immunoreactively positive cells in gastric antrum of rats. **Methods:** Adult male SD rats were randomly divided into two groups: normal control group (group C) and experiment group (group E). Rats in group E were lavaged with alcohol. Then, the gastric antrum was obtained at different time points. The expression changes of Gas, 5-HT and SS were studied with immunohistochemical SABC method and image analysis technique. **Results:** (1) Compared with those of group C, Gas and 5-HT positive cell counts increased in gastric antrum of alcohol intoxication rats, especially in 1h group. However, SS positive cells decreased, especially in 2 h group ($P < 0.05$). (2) Image analysis showed that mean grey degrees of Gas and 5-HT in group E were lower than those of group C ($P < 0.05$), and those of 1 h group were the deepest. The mean grey degree of SS was stronger than that of group C, especially in 2 h group. **Conclusions:** The expression of Gas, 5-HT increases and the secretion of SS decreases in rat gastric antrum during alcohol intoxication suggesting that these gastrointestinal hormones participate in adjusting the gastric mucosa damaging process caused by alcohol.

[Key words] alcoholic intoxication; gastrins; 5-hydroxytryptamine; somatostation; stomach; immunohistochemistry

^{*}[基金项目] 贵阳医学院青年基金 K2007-41。

^{**} 通讯作者 E-mail: xiabaijuan@sina.com

酒精中毒能引起多种疾病,对消化系统损害尤其严重^[1]。胃泌素(gastrin, Gas)主要由胃窦 G 细胞分泌,能刺激胃肠运动和胃酸分泌,且还是胃壁细胞的重要生长因子和免疫调节因子^[2]。5-羟色胺(5-hydroxy tryptamine, 5-HT)主要由 EC 细胞合成,对胃黏膜水、电解质的分泌具有调控作用^[3],并且还能调节 G 细胞分泌 Gas^[4]。生长抑素(Somatostatin, SS)广泛分布于胃肠道的 D 细胞中,是胃酸分泌的主要抑制因子,能直接作用于 G 细胞抑制 Gas 的分泌^[5]。目前关于急性酒精中毒对胃窦内分泌细胞的影响报道甚少,2009 年 10 月对急性酒精中毒大鼠 Gas、5-HT 和 SS 在胃窦部的表达进行了研究,探讨这 3 种胃肠激素在急性酒精中毒胃黏膜损伤时的表达及作用。

1 材料和方法

1.1 材料

成年雄性 SD 大鼠 32 只,体重 180 ~ 220 g,由贵阳医学院实验动物中心提供。兔 Gas(工作浓度为 1:100)、5-HT 及 SS 抗血清(工作浓度为 1:100)由武汉博士德公司提供。

1.2 方法

1.2.1 分组及造模 按配对原则将大鼠随机分为正常对照组(normal control group, NCG)12 只和实验组(experiment group, EG)24 只,实验前 12 h 禁食(不禁水)^[6]。实验组大鼠用 53% 白酒 10 g/kg 的剂量给予灌胃,分别于 0.5、1、1.5 和 2 h 4 个时间段各处死 6 只,取胃窦标本;正常对照组不予任何处理,每期处死 3 只作为对照。取各时间段正常对照组和实验组大鼠胃窦标本,多聚甲醛液固定,常规石蜡包埋,制成 4 μm 厚的连续切片。

1.2.2 免疫组织化学 SABC 法 按免疫组织化学 SABC 法进行免疫组织化学染色,分别显示 Gas、5-HT 和 SS 阳性细胞。主要步骤:切片常规脱蜡至水,室温 10% 甲醇- H_2O_2 10 min,正常羊血清(1:50)室温封闭 20 min,分别滴加兔 Gas、5-HT 和 SS 抗血清,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;羊抗兔 IgG(1:100)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, SABC 复合物(1:100)37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min, DAB- H_2O_2 液显色,苏木精轻度复染细胞核,中性树胶封片。方法对照用 PBS 缓冲液代替特异性抗血清,其余步骤同上。

1.2.3 图像分析 随机选取各时间段实验组胃窦切片各 3 例,正常对照组 2 例。在 40 倍物镜下,每

例切片随机选取 5 个视野,用 BioMias 图像分析系统检测 Gas、5-HT 和 SS 阳性细胞的平均灰度值,并计数每个视野内有核 Gas、5-HT 和 SS 阳性细胞数。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 11.5 软件包对所得数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 示差异具有显著性。

2 结果

2.1 大鼠胃窦 Gas 阳性细胞

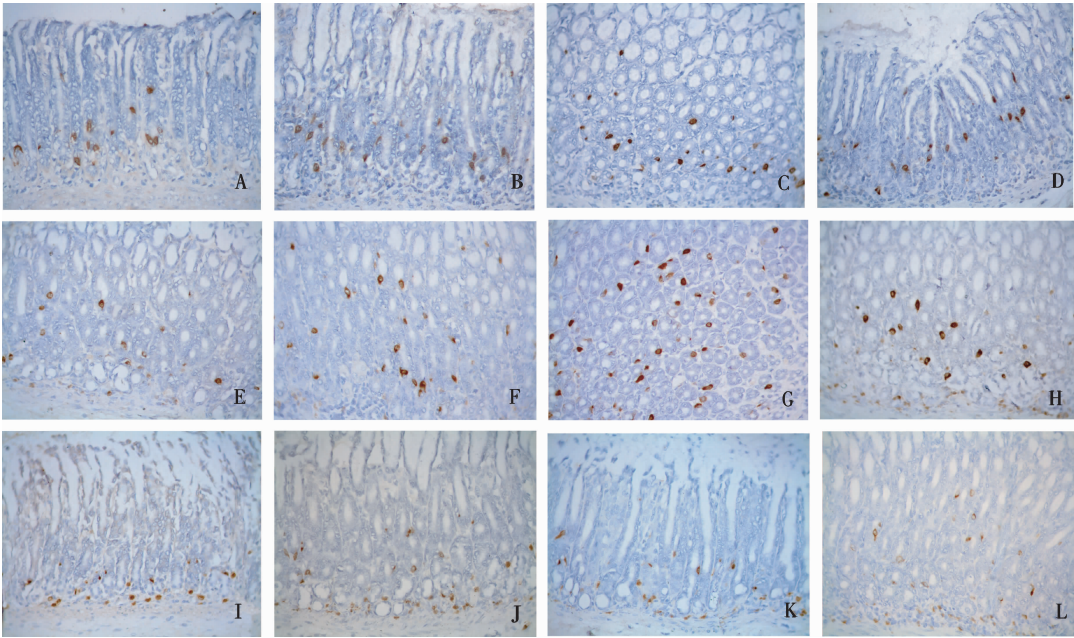
光镜下各组大鼠胃窦部均可见 Gas 阳性细胞,免疫反应产物呈棕色颗粒状,位于胞质内。Gas 阳性细胞存在于幽门腺,分布于上皮细胞间,细胞呈锥体形或烧瓶状,基底部较宽,顶部细长,有的细胞可见突起直达腺腔(图 1A)。实验组大鼠胃窦 Gas 阳性细胞的分布及形态与正常对照组大致相同,但细胞数增多、细胞的免疫染色加深(表 1,图 1B ~ D)。对细胞平均灰度值进行检测分析,各时间段实验组大鼠胃窦 Gas 阳性细胞的平均灰度值较正常对照组显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),以 1 h 组最为显著(图 2A)。

2.2 大鼠胃窦 5-HT 阳性细胞

光镜下观察,大鼠胃窦的 5-HT 阳性细胞免疫反应产物呈棕黄色存在于胞质内(图 1E),方法对照切片未见免疫反应阳性细胞。大鼠胃窦的 5-HT 阳性细胞形态多样,呈卵圆形、梭形或不规则形,有的细胞可见突起。与正常对照组比较,各时间段实验组大鼠胃窦 5-HT 细胞的分布及形态无明显差异,但细胞数增多,免疫染色加深(表 1,图 1F ~ H)。图像分析显示实验组大鼠胃窦 5-HT 阳性细胞平均灰度值较正常对照组显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),且以 1 h 组最为显著(图 2B)。如表 1 所示,实验组大鼠胃窦 5-HT 阳性细胞数较正常对照组明显增多,差异有统计学意义($P < 0.05$),以 1 h 组最多。

2.3 大鼠胃窦 SS 阳性细胞

光镜下见大鼠胃窦 SS 阳性细胞主要分布于腺上皮之间,细胞形态多样,免疫产物呈棕黄色或棕黑色,定位于胞质内(图 1I)。与正常对照组比较,各时间段实验组大鼠胃窦 SS 阳性细胞的细胞数减少,免疫染色变浅(表 1,图 1J ~ L),图像分析测得平均灰度值升高($P < 0.05$),以 2 h 组灰度值最高(图 2C)。



注:A. 正常组 Gas 阳性细胞;B. 0.5 h 组 Gas 阳性细胞;C. 1 h 组 Gas 阳性细胞;D. 2 h 组 Gas 阳性细胞;E. 正常组 5-HT 阳性细胞;F. 0.5 h 组 5-HT 阳性细胞;G. 酒精灌胃后 1 h 组 5-HT 阳性细胞;H. 1.5 h 组 5-HT 阳性细胞;I. 正常组 SS 阳性细胞;J. 0.5 h 组 SS 阳性细胞;K. 1.5 h 组 SS 阳性细胞;L. 2 h 组 SS 阳性细胞。

图 1 Gas、5-HT 及 SS 阳性细胞 (SABC ×400)

Fig. 1 Gas, 5-HT and SS positive cells

表 1 各组大鼠胃窦 Gas、5-HT、SS 阳性细胞 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Counts of Gas, 5-HT and SS positive cell in rat gastric antrum of each group

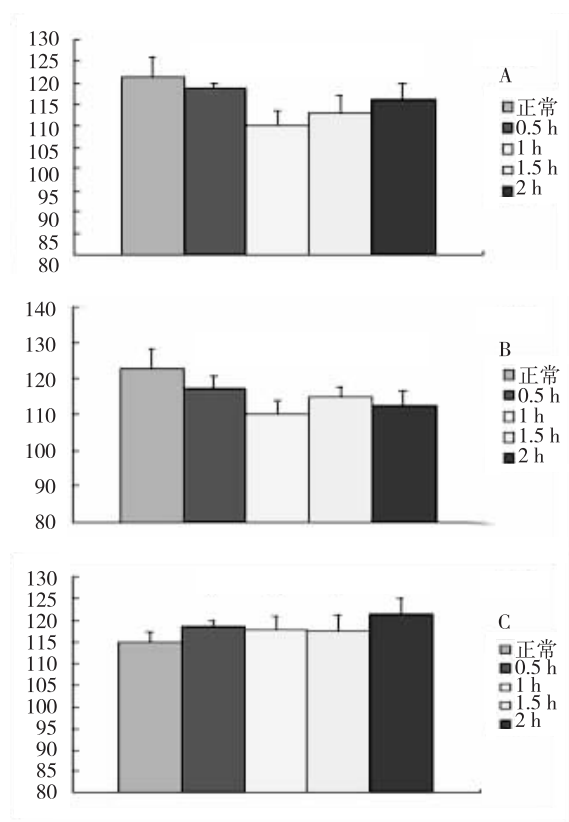
细胞数	NCG (细胞数/视野)	酒精灌胃后(细胞数/视野)			
		0.5 h	1 h	1.5 h	2 h
GAS	10. 59 ± 2. 01	13. 24 ± 1. 72 ⁽¹⁾	16. 16 ± 2. 77 ⁽¹⁾	13. 43 ± 2. 34 ⁽¹⁾	12. 54 ± 1. 09 ⁽¹⁾
5-HT	12. 64 ± 1. 95	15. 92 ± 2. 13 ⁽¹⁾	19. 67 ± 4. 26 ⁽¹⁾	16. 47 ± 2. 08 ⁽¹⁾	14. 78 ± 2. 46 ⁽¹⁾
SS	17. 51 ± 1. 82	13. 67 ± 3. 12 ⁽¹⁾	12. 24 ± 2. 53 ⁽¹⁾	10. 17 ± 3. 37 ⁽¹⁾	8. 35 ± 1. 68 ⁽¹⁾

⁽¹⁾与 NCG 比较, $P < 0.05$

3 讨论

经口摄入的酒精首先在胃内贮存,而过量高浓度的酒精可直接损害胃黏膜屏障,出现黏膜充血、胃黏膜糜烂出血,甚至浅表性溃疡。Gas 能促进胃壁细胞增殖,修复胃黏膜^[7];Gas 还是一种免疫调节肽,能参与调控多种炎症因子^[8],减少酒精对胃黏膜的损伤,保护黏膜的完整。有研究报道,在乙醇刺激下,胃黏膜分泌 Gas 增多,通过 CCK 受体和一氧化氮及精氨酸协同调节从而达到对消化管壁的保护作用^[9]。本实验中, Gas 在急性酒精中毒大鼠胃窦表达增强,提示胃窦通过分泌 Gas 增多的方

式参与对抗并修复酒精对胃黏膜的损伤。
胃肠道功能受内在神经-肠神经系统 (enteric nervous system, ENS) 支配,能自主、协调地完成复杂的蠕动、分泌及反射等功能。ENS 对胃肠道的调控需要其感受到肠腔内压力和化学刺激,这个过程由 EC 细胞介导,通过释放 5-HT 激活黏膜下初级传入神经纤维实现对胃肠道的调控功能。5-HT 能调节机体对酒精的摄入,与酒精成瘾密切相关^[10,11]。Diptendu 等^[12]发现,在急性酒精作用下,斑马鱼体内 5-HT 水平显著升高,对酒精依赖小鼠大脑神经递质的研究也发现 5-HT 表达增多^[13]。本实验观察到急性酒精中毒大鼠胃窦 5-HT 阳性细胞免疫染色加深、细胞数增加,与上述报道结果



注:A. Gas 阳性细胞,B. 5-HT 阳性细胞,C. SS 阳性细胞

图2 Gas、5-HT 及 SS 阳性细胞平均灰度值

Fig. 2 Mean grey degrees of Gas,

5-HT and SS positive cells

相符。胃窦分泌 5-HT 增多的原因可能是由于 EC 细胞分泌大量的 5-HT,从而引起 ENS 对胃肠道的调控,主要表现为胃肠道功能的紊乱等。

SS 能抑制机体几乎所有生理性内外分泌反应,另外还抑制胃肠道运动及抑制细胞增殖^[14,15]。有研究表明,Gas 能极大地减少乙醇对胃黏膜的损伤,而 SS 能促进 Gas 的这种保护作用。谢勇等^[16]通过对酒精中毒大鼠胃体和胃窦 SS 的放射免疫学测定,发现 SS 含量显著下降,表明酒精可破坏 D 细胞或抑制 SS 的分泌。本实验中酒精中毒大鼠胃窦 SS-IR 细胞表达减少,且随着时间的推移呈逐渐降低的趋势,可能是由于高浓度酒精能延迟胃排空,酒精停留在胃内对胃壁长时间持续的损伤,导致 D 细胞功能严重受损有关。随着 SS 的分泌减少,其对 G 细胞和 EC 细胞的抑制作用下降,可能是导致 Gas 和 5-HT 分泌增多的原因之一。

4 参考文献

- [1] Boguradzka A, Tarnowski W, Mazurczak-Pluta T. Gastroesophageal reflux disease in hazardous drinkers [J]. Pol Merkur Lekarski, 2006 (121): 99-104.
- [2] Chao C, Hellmich MR. Gastrin, inflammation, and carcinogenesis [J]. Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity, 2010 (1): 33-39.
- [3] Hansen MB, Witte AB. The role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion [J]. Acta Physiol (Oxf), 2008 (4): 311-323.
- [4] Ericsson P, Håkanson R, Norlén P. Gastrin response to candidate messengers in intact conscious rats monitored by antrum microdialysis [J]. Regul Pept, 2010 (1-3): 24-30.
- [5] Schubert ML. Gastric exocrine and endocrine secretion [J]. Current Opinion in Gastroenterology, 2009 (6): 529-536.
- [6] 王亚南. 酒精中毒大鼠动物模型的研究 [J]. 中国康复理论与实践, 2006 (4): 319-320.
- [7] Brzozowska I, Ptak-Belowska A, Pawlik M, et al. Mucosal strengthening activity of central and peripheral melatonin in the mechanism of gastric defense [J]. Journal of physiology and pharmacology, 2009 (Suppl 7): 47-56.
- [8] Calatayud S, Alvarez A, Victor VM. Gastrin: an acid-releasing, proliferative and immunomodulatory peptide [J]. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 2010 (1): 8-19.
- [9] Brzozowski T, Konturek PC, Konturek SJ, et al. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation [J]. Journal of physiology and pharmacology, 2005 (Supp 5): 33-55.
- [10] Anacker AM, Ryabinin AE. Biological contribution to social influences on alcohol drinking: evidence from animal models [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2010 (7): 473-493.
- [11] Uzbay IT. Serotonergic anti-depressants and ethanol withdrawal syndrome: a review [J]. Alcohol & Alcoholism, 2008 (1): 15-24.
- [12] Chatterjee D, Gerlai R. High precision liquid chromatography analysis of dopaminergic and serotonergic responses to acute alcohol exposure in zebrafish [J]. Behav Brain Res, 2009 (1): 208-213.
- [13] Shibasaki M, Inoue M, Kurokawa K, et al. Expression of Serotonin Transporter in Mice With Ethanol Physical Dependency [J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2010 (2): 234-237.
- [14] Panteris V, Karamanolis DG. The puzzle of somatostatin: action, receptors, analogues and therapy [J]. Hepatogastroenterology, 2005 (66): 1771-1781.
- [15] Corleto VD. Somatostatin and the gastrointestinal tract [J]. Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes, 2010 (1): 63-68.

(2011-04-08 收稿, 2011-05-03 修回)