

doi:10.3969/j.issn.1005-3697.2020.04.02

❖ 论著 ❖

雌激素对消化性溃疡模型小鼠组织损伤的影响及相关机制研究

郭艳红¹, 姚青林², 张雪丽¹, 靳斌¹

(1. 西安市第一医院消化内科, 陕西 西安 710002; 2. 唐都医院消化内科, 陕西 西安 710038)

【摘要】目的:探讨雌激素对消化性溃疡模型小鼠组织损伤的影响及作用机制。**方法:**36只健康C57BL/6雌性小鼠适应性饲养7d后随机分为假手术对照组、假手术+PU模型对照组、假手术+PU模型+雌激素干预组、去势对照组、去势+PU模型对照组、去势+PU模型+雌激素干预组,每组各6只。根据实验设置分别建立消化性溃疡模型以及进行卵巢去势手术,雌激素干预组注射500 μg/kg雌激素,对照组注射等量生理盐水。干预7d后,分别检测并计算胃溃疡指数和溃疡抑制率、测定小鼠胃液和十二指肠液pH以及胃蛋白酶活性、试剂盒检测各组小鼠血清中活性氧(ROS)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性以及丙二醛(MDA)的含量、小鼠ELISA试剂盒检测小鼠血清中IL-17和IL-25含量。**结果:**与假手术对照组相比,假手术+PU模型对照组的溃疡指数、出血点数、ROS活性、MDA含量以及IL-17和IL-25含量均显著增加,胃液pH、十二指肠液pH、GSH-Px活性均显著降低($P < 0.05$);与去势对照组相比,去势+PU模型对照组的上述变化趋势与上述一致,差异也均具有统计学意义($P < 0.05$);而分别与假手术+PU模型对照组和去势+PU模型对照组相比,两个雌激素干预组以上所有指标变化趋势与上述相反($P < 0.05$)。与去势假手术组相比,去势组溃疡指数、出血点数、ROS活性、MDA含量以及IL-17和IL-25含量均显著增加,胃液pH、十二指肠液pH、GSH-Px活性均显著降低($P < 0.05$)。**结论:**采用雌激素治疗可显著减少消化性溃疡小鼠溃疡指数和出血点数,进而使得小鼠胃液和十二指肠液pH升高,促进消化性溃疡小鼠症状的改善,其作用机制可能与改善氧化应激和炎性相关指标有关。

【关键词】消化性胃溃疡;雌激素;溃疡指数;活性氧;胃蛋白酶

【中图分类号】R96 **【文献标志码】**A

Study on the effect of estrogen on tissue damage in peptic ulcer model mice and its related mechanism

GUO Yan-hong¹, YAO Qing-lin², ZHANG Xue-li¹, JIN Bin¹

(Department of Gastroenterology, 1. Xi'an First Hospital, Xi'an 710002; 2. Tangdu Hospital, Xi'an 710038, Shaanxi, China)

【Abstract】 Objective: To investigate the effect of estrogen on tissue damage of peptic ulcer model mice and its related mechanism. **Methods:** Healthy C57BL/6 female mice were selected and divided into sham surgery control group, sham surgery + PU control group, sham surgery + PU + E2 group, castration control group, castration + PU control group, castration + PU In the E2 group, 6 cases in each group. A peptic ulcer model and ovarian castration surgery were established according to the experimental settings. The estrogen intervention group was injected with 500 μg/kg estrogen, and the control group was injected with the same amount of normal saline. After 7 days of intervention, gastric ulcer index, ulcer inhibition rate, pH and pepsin activity of gastric juice and duodenal fluid were measured, and the activities of reactive oxygen species (ROS), glutathione peroxidase (GSH - Px) and malondialdehyde (MDA) in serum were detected by kit, and the contents of IL-17 and IL-25 in serum were detected by ELISA kit. **Results:** Compared with the sham operation group, the ulcer index, bleeding points, ROS activity, MDA content, and IL-17 and IL-25 contents in the sham operation + PU group increased significantly. The gastric juice pH, duodenal fluid pH and GSH-Px activities were significantly reduced ($P < 0.05$). Compared with the castration control group, the change trend of the castration + PU group was consistent with the above, and the differences were also statistically significant ($P < 0.05$), compared with the sham surgery + PU control group and the castration + PU control group, respectively, the changes in all indicators of the two E2 treatment groups were opposite to those described above ($P < 0.05$). Compared with the castration sham operation group, the ulcer index, bleeding points, ROS activity, MDA content, and IL-17 and IL-25 content in the castration group were significantly increased, and the gastric juice pH, duodenal juice pH, and GSH-Px activity were significantly reduced ($P < 0.05$). **Conclusion:** Treatment with estrogen can significantly reduce the ulcer index and bleeding points of

基金项目: 陕西省自然科学基金(2015JQ4044)

作者简介: 郭艳红(1974-),女,主治医师。E-mail: Guoyanhong2578@163.com

通讯作者: 姚青林。E-mail: Guoyanhong2578@163.com

peptic ulcer mice, which can increase the pH of gastric juice and duodenal juice in mice, and improve the symptoms of peptic ulcer mice. The mechanism may be related to improving stress and inflammation.

[Key words] Peptic ulcer; Estrogen; Ulcer index; Reactive oxygen species; Pepsin

消化性溃疡 (peptic ulcer, PU) 是目前临床较为常见的慢性消化系统相关疾病之一, 其治疗难点在于治疗周期长且易复发^[1-2]。临床上 PU 最常见并发症为出血, 发生率约为 15% ~ 20%, 也可能发生胃穿孔和胃出口梗阻等^[3]。如何有效治疗并控制该疾病的发生和进展, 是医学界一直有待解决的热点问题。相关资料^[4]显示, 女性消化性溃疡的发病率显著低于男性。另有研究^[5]表明, 女性处于妊娠期后, 消化性溃疡的发病率较非孕期女性显著降低, 且消化性溃疡女性患者怀孕后, 该疾病症状会发生好转迹象, 甚至完全消失。还有研究^[6]指出, 一些可影响女性雌激素代谢的行为如过度减肥可能是消化性溃疡患者出现症状的危险因素。结合以上资料和结论, 初步推测消化性溃疡的发病可能与雌激素的作用有一定关系。本研究通过建立消化性溃疡小鼠模型, 采用注射雌激素进行治疗, 并对其作用效果及机制进行探讨, 从而为女性消化性溃疡患者提供新的治疗思路。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

健康成年 C57BL/6 雌性小鼠 36 只, SPF 级, 质量 (22 ± 2) g, 购自广东省医学实验动物中心。适应性饲养 7 d 后随机分为假手术对照组、假手术 + PU 模型对照组、假手术 + PU 模型 + 雌激素干预组、去势对照组、去势 + PU 模型对照组、去势 + PU 模型 + 雌激素干预组, 每组各 6 只。

1.2 方 法

1.2.1 小鼠卵巢趋势手术 根据实验分组, 选择需要进行去势手术的小鼠, 麻醉后, 按照该手术常规操作, 从小鼠背部开口去除双侧卵巢, 假手术组仅摘取卵巢周围部分脂肪, 不摘除卵巢。

1.2.2 模型建立^[7] 通过在健康的 C57BL / 6 小鼠中注射幽门螺杆菌来诱导 PU, 小鼠造模前禁食 12 h。选择幽门螺杆菌标准菌株或从患者胃粘膜中分离的菌株, 鉴定纯化后培养 48 h 后收集并稀释, 5 000 rpm 离心 3 min, 然后将收获沉淀悬浮, 并于 PBS 中计数, 调整浓度为 10⁶ cfu/mL。通过口腹进行接种, 每只小鼠每次接种 100 μL, 每周 3 次, 每次接种间隔 1 d, 共 15 d。

1.2.3 干预治疗 去势手术/假手术 1 周后, 对雌激素治疗组小鼠颈背部皮下雌激素 (浓度 0.1 mg/mL) 注射, 注射剂量 500 μg · kg⁻¹ · d⁻¹, 连续治疗 7

d, 其余分组注射生理盐水, 剂量、时间以及方法与雌激素治疗组一致。

1.2.4 指标检测 (1) 血清中 IL-17 和 IL-25 水平检测: 治疗结束后, 断颈法处死各组小鼠, 腹主动脉取血, 离心, 取上清。分别采用小鼠 IL-17 ELISA 试剂盒和小鼠 IL-17 ELISA 试剂盒检测各组小鼠血清中 IL-17 和 IL-25 水平, 具体步骤按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作; (2) 溃疡指数评分标准: 治疗结束后, 断颈法处死各组小鼠, 剪开小鼠腹腔, 分离胃和十二指肠组织, 进行溃疡指数评分。溃疡面积为 1 ~ 12 mm² 计 1 分, 13 ~ 25 mm² 计 2 分, 26 ~ 37 mm² 计 3 分, 38 ~ 50 mm² 计 4 分, ≥ 50 mm² 或穿孔性溃疡计 5 分, 面积 ≤ 1 mm² 的溃疡点, 10 个点记为溃疡面积 1 mm²; 计数各小鼠溃疡出血点数。 (3) 小鼠胃液以及十二指肠液 pH 测定: 治疗结束后, 断颈法处死各组小鼠, 剪开小鼠腹腔, 分离胃和十二指肠组织, 分别收集小鼠胃液和十二指肠液, pH 测定二者 pH 值。 (4) 小鼠血清中 ROS 和 GSH-Px 活性以及 MDA 含量检测: 活性氧 (ROS) 检测试剂盒检测小鼠血清中 ROS 活性; 谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-PX) 测定试剂盒 (比色法) 检测小鼠血清中 GSH-Px 活性; 丙二醛 (MDA) 测定试剂盒 (TBA 法) 检测小鼠血清中 MDA 含量; 具体步骤均按照试剂盒说明书进行操作, 试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 对数据进行分析处理, 计量资料以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 进行检验, 两组间比较采用 *t* 检验。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 各组小鼠溃疡指数和出血点数比较

与假手术组相比, 假手术 + PU 模型对照组的溃疡指数和出血点数均显著增加 (*P* < 0.05), 与去势对照组相比, 去势 + PU 模型对照组的溃疡指数和出血点数也显著增加 (*P* < 0.05); 而分别与假手术 + PU 模型对照组和去势 + PU 模型对照组相比, 两个雌激素干预组的溃疡指数和出血点数均显著减少 (*P* < 0.05)。分别与假手术 + PU 模型对照组和假手术 + PU 模型 + 雌激素干预组相比, 去势 + PU 模型对照组和去势 + PU 模型 + 雌激素干预组溃疡指数和出血点数均显著增加 (溃疡指数: *t* = 3.764, *P* =

0.003; $t = 4.213$, $P = 0.001$; 出血点数: $t = 2.765$, $P = 0.018$; $t = 2.967$, $P = 0.026$)。见表 1。

表 1 各组小鼠溃疡指数和出血点数比较($\bar{x} \pm s$)

分组	溃疡指数(分)	出血点数(个/鼠)
假手术对照组($n=6$)	0	0
假手术+PU模型对照组($n=6$)	3.16 ± 0.26 *	2.83 ± 0.60 *
假手术+PU模型+雌激素干预组($n=6$)	1.83 ± 0.19 *#	1.03 ± 0.22 *#
F值	436.935	90.425
P值	0.001	0.001
去势对照组($n=6$)	0	0
去势+PU模型对照组($n=6$)	3.83 ± 0.35 *	3.67 ± 0.44 *
去势+PU模型+雌激素干预组($n=6$)	2.33 ± 0.22 *#	2.00 ± 0.77 *#
F值	392.296	77.271
P值	0.001	0.001

* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与 PU 模型对照组相比。

2.2 各组小鼠胃液相关指标检测结果比较

与假手术对照组相比,假手术+PU模型组的胃液和十二指肠液 pH 均显著降低,胃蛋白酶活性显著增加($P < 0.05$),与去势对照组相比,去势+PU模型组的胃液和十二指肠液 pH 均显著降低,胃蛋白酶活性显著增加($P < 0.05$);而分别与假手术+PU模型对照组和去势+PU模型对照组相比,两个雌激素干预组的胃液和十二指肠液 pH 均显著增加,胃蛋白酶活性显著降低($P < 0.05$)。假手术组和去势组的胃液 pH、十二指肠液 pH 和胃蛋白酶活性相比差异不具有统计学意义($t = 1.514$, $P = 0.158$; $t = 1.585$, $P = 0.141$; $t = 0.207$, $P = 0.840$),分别与假手术+PU模型对照组和假手术+PU模型+雌激素干预组相比,去势+PU模型对照组和去势+PU模型+雌激素干预组胃液和十二指肠液 pH 均显著降低(胃液 pH: $t = 2.727$, $P = 0.032$; $t = 2.551$, $P = 0.027$; 十二指肠液 pH: $t = 0.529$, $P < 0.001$; $t = 4.390$, $P = 0.001$),胃蛋白酶活性均无显著变化($t = 0.936$, $P = 0.396$; $t = 0.703$, $P = 0.497$)。见表 2。

表 2 各组小鼠胃液相关指标检测结果比较($\bar{x} \pm s$)

分组	胃液 pH	十二指肠液 pH	胃蛋白酶/U
假手术对照组($n=6$)	4.03 ± 0.48	6.05 ± 0.43	12.36 ± 1.58
假手术+PU模型对照组($n=6$)	2.65 ± 0.41 *	4.83 ± 0.40 *	16.57 ± 3.47 *
假手术+PU+雌激素干预组($n=6$)	3.50 ± 0.39 *#	5.67 ± 0.26 *#	13.72 ± 2.26 *
F值	15.843	17.007	4.230
P值	0.001	0.001	0.035
去势对照组($n=6$)	3.67 ± 0.33	5.67 ± 0.40	13.09 ± 2.77
去势+PU模型对照组($n=6$)	2.16 ± 0.16 *	3.50 ± 0.47 *	18.69 ± 4.33 *
去势+PU+雌激素干预组($n=6$)	3.00 ± 0.28 *#	4.83 ± 0.39 *#	14.80 ± 3.01 *#
F值	48.397	40.432	4.178
P值	0.001	0.001	0.036

* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与 PU 模型对照组相比。

2.3 各组小鼠血清中 ROS 和 GSH-Px 活性以及 MDA 含量比较

与假手术对照组相比,假手术+PU模型组的小鼠血清中 ROS 活性和 MDA 含量均显著增加, GSH-Px 活性显著降低($P < 0.05$),与去势对照组相比,去势+PU模型组的小鼠血清中 ROS 活性和 MDA 含量也均显著增加, GSH-Px 活性显著降低($P < 0.05$);而分别与假手术+PU模型对照组和去势+PU模型对照组相比,两个雌激素干预组的小鼠血清中 ROS 活性和 MDA 含量均显著降低, GSH-Px 活性显著增加($P < 0.05$)。假手术对照组和去势对照组小鼠血清中 ROS 和 GSH-Px 活性以及 MDA 含量相比差异不具有统计学意义($t = 1.687$, $P = 0.120$; $t = 1.567$, $P = 0.145$; $t = 0.388$, $P = 0.705$),分别与假手术+PU模型对照组和假手术+PU模型+雌激素干预组相比,去势+PU模型对照组和去势+PU模型+雌激素干预组小鼠血清中 ROS 活性和 MDA 含量均显著增加(ROS: $t = 5.428$, $P < 0.001$; $t = 4.815$, $P = 0.001$; MDA: $t = 2.393$, $P = 0.036$; $t = 2.329$, $P = 0.040$), GSH-Px 活性均显著降低($t = 3.023$, $P = 0.012$; $t = 2.513$, $P = 0.029$)。见表 3。

表 3 各组小鼠血清中 ROS 和 GSH-Px 活性以及 MDA 含量比较($\bar{x} \pm s$)

分组	ROS(U/mL)	GSH-Px(U/mL)	MDA($\mu\text{mol/L}$)
假手术对照组($n=6$)	126.14 ± 7.89	166.64 ± 5.17	16.75 ± 2.10
假手术+PU模型对照组($n=6$)	263.66 ± 9.43 *	147.63 ± 4.32 *	25.44 ± 2.75 *
假手术+PU模型+雌激素干预组($n=6$)	182.43 ± 8.22 *#	157.14 ± 4.61 *#	19.03 ± 2.51 *#
F值	393.315	24.515	19.998
P值	0.001	0.001	0.001
去势对照组($n=6$)	133.70 ± 7.63	171.34 ± 5.22	17.23 ± 2.19
去势+PU模型对照组($n=6$)	293.43 ± 9.57 *	140.34 ± 4.03 *	29.43 ± 3.02 *
去势+PU模型+雌激素干预组($n=6$)	206.45 ± 9.04 *#	151.03 ± 3.77 *#	22.46 ± 2.59 *#
F值	497.20	77.351	33.192
P值	0.001	0.001	0.001

* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与 PU 模型对照组相比。

2.4 各组溃疡小鼠血清中 IL-17 和 IL-25 含量比较

与假手术对照组相比,假手术+PU模型组小鼠血清中 IL-17 和 IL-25 含量均显著增加($P < 0.05$),与去势对照组相比,去势+PU模型组小鼠血清中 IL-17 和 IL-25 含量均显著增加($P < 0.05$);而分别与假手术+PU模型对照组和去势+PU模型对照组相比,两个雌激素干预组小鼠血清中 IL-17 和 IL-25 含量均显著减少($P < 0.05$)。假手术对照组和去势对照组小鼠血清中 IL-17 和 IL-25 含量相比差异不具有统计学意义($t = 1.196$, $P = 0.257$; $t = 1.143$, $P = 0.277$),分别与假手术+PU模型对照组和假手术+PU模型+雌激素干预组相比,去势+PU模型对照组和去势+PU模型+雌激素干预组小鼠血清

中 IL-17 和 IL-25 含量均显著增加 (IL-17: $t = 3.668$, $P = 0.004$; $t = 2.856$, $P = 0.016$; IL-25: $t = 7.003$, $P < 0.001$; $t = 2.861$, $P = 0.015$)。见表 4。

表 4 各组溃疡小鼠血清中 IL-17 和 IL-25 含量比较
($\bar{x} \pm s$, ng/mL)

分组	IL-17	IL-25
假手术对照组 (n=6)	0.168 ± 0.014	0.795 ± 0.053
假手术 + PU 模型对照组 (n=6)	0.207 ± 0.017 *	1.112 ± 0.049 *
假手术 + PU + 雌激素干预组 (n=6)	0.174 ± 0.010 *#	0.963 ± 0.063 *#
F 值	13.569	49.324
P 值	0.001	0.001
去势对照组 (n=6)	0.177 ± 0.012	0.832 ± 0.059
去势 + PU 模型对照组 (n=6)	0.243 ± 0.017 *	1.361 ± 0.072 *
去势 + PU 模型 + 雌激素干预组 (n=6)	0.196 ± 0.016 *#	1.073 ± 0.070 *#
F 值	30.157	93.078
P 值	0.001	0.001

* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与 PU 模型对照组相比。

3 讨论

消化性损伤常发生于胃和十二指肠近端, 通常是指患者消化道发生酸性损伤, 导致黏膜及其下层发生破裂^[8], 其临床症状表现为上腹部疼痛、腹胀、恶心、大便习惯改变等, 严重可导致胃肠道出血^[9]。目前, 普遍认为幽门螺杆菌感染是消化性溃疡疾病的主要诱因, 该病菌尤其在老年患者中作用显著^[10]。而相关报道^[8, 11-12]已证实, 消化性溃疡受多因素影响, 如近年来发现心理压力和非甾体抗炎药 (NSAIDs)。另外, 临床研究^[13]显示, 消化性溃疡受到遗传等因素的影响。相关研究^[14]认为, 消化性溃疡发生的总体机制是由于粘膜屏障无法保护胃十二指肠粘膜免受酸性胃分泌物的影响。

溃疡指数和出血点数是目前消化性溃疡的治疗的直观评价指标, 相关实验研究结果表明, 经药物治疗后, 消化性溃疡模型小鼠的溃疡指数和出血点数均显著降低^[15]。本研究结果表明, 雌激素干预组的溃疡指数和出血点数均较治疗前显著减少 ($P < 0.05$), 而所有去势组的溃疡指数和出血点数均较假手术组显著增加 ($P < 0.05$), 表明雌激素治疗后, 消化性溃疡小鼠的溃疡症状显著改善, 说明其对溃疡小鼠具有一定治疗作用, 与上述相关研究结果一致。另外, 本研究中去除卵巢后的消化性溃疡小鼠其溃疡症状也较假手术组更为严重, 该结论也为临床数据中男性消化性溃疡患者显著高于女性做出解释。另外本研究结果表明雌激素治疗后, 消化性溃疡小鼠胃液和十二指肠液 pH 显著增加 ($P < 0.05$), 与相关研究^[16]结果一致, 证明雌激素可抑制消化性

溃疡小鼠胃酸和十二指肠液分泌, 从而保护胃黏膜, 减轻消化性溃疡症状。

通常消化性溃疡也会引起患者炎症反应和应激反应相关指标的改变, 其也是该疾病治疗药物的作用机制的常用指标。本研究结果表明, PU 模型组的 ROS 活性、MDA 含量以及 IL-17 和 IL-25 含量均较对照组显著增加, GSH-Px 活性显著降低 ($P < 0.05$); 两个雌激素干预组治疗组的应激和炎性指标均较 PU 模型组显著改善 ($P < 0.05$); 而与去势假手术组相比, 去势对照组 ROS 活性、MDA 含量以及 IL-17 和 IL-25 含量均显著增加, GSH-Px 活性显著降低 ($P < 0.05$), 说明经雌激素治疗后, 消化性溃疡小鼠应激及炎性指标均显著改善, 而卵巢去势假手术组以上指标较去势组显著改善, 表明雌激素可能通过改善应激和炎性相关指标从而对消化性溃疡小鼠发挥治疗作用。

综上所述, 雌激素可通过降低消化性溃疡小鼠溃疡指数和出血点数, 进而抑制小鼠胃液和十二指肠液分泌, 并降低胃蛋白酶活性, 从而保护胃黏膜, 促进消化性溃疡小鼠症状的改善, 其作用机制可能与改善应激和炎性相关指标有关。本研究不足之处在于由于样本量较少因此未对雌激素作用不同时间点各组溃疡小鼠溃疡指数等相关指标进行比较, 从而对其作用趋势进行分析, 将在后续研究中扩大样本量进行深入探讨。

参考文献

- [1] 吴丽静. 消化性溃疡 107 例的护理 [J]. 中国乡村医药, 2015, 22(2): 93.
- [2] 赵金和. 消化性溃疡治疗失败或治疗后复发的非药物性因素探析 [J]. 临床医药文献电子杂志, 2017, 4(80): 153-157.
- [3] 索宝军, 王晔, 周丽雅, 等. 注射用艾普拉唑钠治疗消化性溃疡出血的多中心、随机、双盲、阳性药物平行对照 III 期临床研究 [J]. 中华消化杂志, 2018, 38(10): 691-696.
- [4] 王娜娜, 陈洪波. 2012-2014 年邢台地区上消化道出血临床特征分析 [J]. 医学临床研究, 2016, 33(4): 793-796.
- [5] 袁育红, 袁世珍. 妊娠期消化性溃疡的诊治 [J]. 新医学, 1994, (10): 559-560.
- [6] Lee SP, Sung IK, Kim JH, et al. Risk Factors for the Presence of Symptoms in Peptic Ulcer Disease [J]. Clin Endosc, 2016, 50(6): 578-584.
- [7] Kaur B, Garg N, Sachdev A, et al. Effect of the oral intake of probiotic *Pediococcus acidilactici* BA28 on *Helicobacter pylori* causing peptic ulcer in C57BL/6 mice models [J]. Appl Biochem Biotech, 2014, 172(2): 973-983.
- [8] Lanas A, Chan FKL. Peptic ulcer disease [J]. Lancet, 2017, 390(10094): 613-624.

(下转第 567 页)