

注射用雷贝拉唑钠对不同溃疡模型大鼠的影响

邵明香, 刘宝峰, 沈连忠*

山东欣博药物研究有限公司 药物安全评价研究中心, 山东 临邑 251500

摘要: 目的 比较注射用雷贝拉唑钠对不同溃疡模型大鼠的影响。方法 采用幽门结扎法收集胃液, 测定注射用雷贝拉唑钠0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg/kg对大鼠胃液酸度、胃酸总分泌量的影响。制备吲哚美辛引起的胃溃疡模型、醋酸性胃溃疡、大鼠反流性食管炎以及半胱胺型十二指肠溃疡, 模型动物iv给予注射用雷贝拉唑钠后, 对溃疡进行评分, 计算溃疡抑制情况。结果 ①与模型组比较, 注射用雷贝拉唑钠8 mg/kg组胃液分泌量, 0.5、4.0、8.0 mg/kg组胃液酸度, 2、4、8 mg/kg剂量组胃酸分泌量均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。②与模型组比较, 0.5、1.0、2.0、4.0 mg/kg剂量组吲哚美辛引起的溃疡得分均显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。③注射用雷贝拉唑钠1 mg/kg对大鼠醋酸性胃溃疡、反流性食管炎、半胱胺型十二指肠溃疡抑制率分别为18.2%、37.5%和23.4%, 其中对反流性食管炎的抑制作用具有显著性差异 ($P < 0.05$)。结论 注射用雷贝拉唑钠抑制胃酸分泌, 对吲哚美辛引起胃溃疡、反流性食管炎、十二指肠溃疡和醋酸性胃溃疡均有抑制作用。

关键词: 注射用雷贝拉唑钠; 胃溃疡; 反流性食管炎; 胃酸; 十二指肠溃疡

中图分类号: R962.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2018) 12-2201-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.12.012

Effect of rabeprazole sodium for injection on different ulcer models in rats

SHAO Mingxiang, LIU Baofeng, SHEN Lianzhong

Shandong Xinbo Center for Drug Safety Evaluation and Research, Shandong Xinbo Pharmaceutical CO., LTD, Linyi 251500, China

Abstract: Objective To compare the effect of rabeprazole sodium for injection on different ulcer models in rats. **Methods** Gastric acid was collected by pyloric ligation method to determine the effect of rabeprazole sodium for injection at doses of 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, and 8.0 mg/kg on acidity and total secretion of gastric acid. Different indomethacin-induced ulcer rat models were established, including gastric ulcer model, acetic acid gastric ulcer model, reflux esophagitis model, and cysteamine duodenal ulcer model. Animal models were injected intravenously with rabeprazole sodium, and ulcer score and ulcer inhibition were then calculated. **Results** Compared with model group, the gastric juice secretion in the 8 mg/kg rabeprazole sodium injection group, the acidity of gastric juice in the 0.5, 4.0, and 8.0 mg/kg rabeprazole sodium groups, and the gastric acid secretion in the 2, 4, and 8 mg/kg rabeprazole sodium groups were all significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01). Compared with the model group, the ulcer scores in 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 mg/kg rabeprazole sodium groups were significantly decreased ($P < 0.05$, 0.01). The inhibition rate of 1 mg/kg rabeprazole sodium for injection to acetic acid in rats gastric ulcer, reflux esophagitis, cysteamine duodenal ulcer respectively were 18.2%, 37.5%, and 23.4%, of which the inhibitory effect on reflux esophagitis has significant difference ($P < 0.05$). **Conclusions** Rabeprazole sodium for injection has inhibitory effect on gastric acid secretion, and indomethacin-caused gastric ulcer, reflux esophagitis, duodenal ulcer, and acetic acid gastric ulcer.

Key words: rabeprazole sodium for injection; gastric ulcer; reflux esophagitis; gastric acid; duodenal ulcer

雷贝拉唑为苯并咪唑类化合物,是第二代质子泵抑制剂,通过特异性地抑制胃壁细胞 H^+ 、 K^+ -ATP酶系统而阻断胃酸分泌的最后步骤。临床上注射用雷贝拉唑钠主要用于口服疗法不适用的胃、十二

指肠溃疡出血,并可使基础胃酸分泌和刺激状态下的胃酸分泌均受抑制^[1]。注射用雷贝拉唑钠的临床前药理学的研究报道较少,有关临床应用以及检测方法的居多。本研究主要考察注射用雷贝拉唑钠

收稿日期: 2018-06-14

第一作者: 邵明香,女,从事药理毒理研究。Tel: (0534)5056587 E-mail: shaomingxiang1051@163.com

*通信作者: 沈连忠,男,研究员,从事药理毒理研究。E-mail: shlz6666@163.com

对不同溃疡模型大鼠的抑制作用,包括对吡罗美辛引起的胃溃疡、醋酸性胃溃疡、大鼠反流性食管炎以及半胱胺型十二指肠溃疡的影响。

1 材料

1.1 供试品与试剂及配制方法

注射用雷贝拉唑钠,规格20 mg,批号160701,质量分数99.3%,为白色疏松块状物,购自湖南明瑞制药有限公司;取一定量供试品用氯化钠注射液配制成不同浓度药液进行给药,配制工作在配制室层流洁净工作台中进行,配制后6 h内使用。氯化钠注射液,规格100 mL:0.9 g,批号1509292724,辰欣药业股份有限公司。半胱胺盐酸盐,规格200 g,郑州阿尔法化工有限公司;20.00 g半胱胺盐酸盐用去离子超纯水溶解并定容至200 mL,得100 mg/mL溶液。NaOH,规格500 g,批号20110115,天津市大陆化学试剂厂;准确称取400.00 mg NaOH,在烧杯中加入去离子超纯水溶解,定容至500 mL,得20 mmol/L NaOH标准滴定液。酚酞,规格25 g,批号20131121,天津市大茂化学试剂厂;准确称取100.00 mg酚酞用90%乙醇溶解,定容至10 mL,即得1%溶液。无水乙醇,批号20151028,色谱纯;冰乙酸,规格500 mL,批号20140819,天津市富宇精细化工有限公司,2 mL冰乙酸,用灭菌注射用水定容至10 mL,得20%醋酸溶液。吡罗美辛(消炎痛),批号20140218,湖北拓楚慷元医药化工有限公司;5.00 g NaHCO₃溶解在40 mL超纯水中,加入200.00 mg吡罗美辛粉末,超声溶解,再用超纯水定容至100 mL,得2 mg/mL吡罗美辛碳酸氢钠溶液。

1.2 实验动物和饲养环境

SPF级SD大鼠(远交群),7~8周龄,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2012-0001,动物质量合格证编号11400700179271、11400700161162、37009200004448、37009200004448、11400700202471。

饲养环境:山东欣博药物安全评价研究中心 SPF屏障系统,温度20~26℃,湿度40%~70%,换气次数≥15次/h,动物照度15~20 Lx,工作照度≥200 lx,照明时间12 h/12 h明暗交替;实验动物使用许可证号SYXK(鲁)2016-0011;SPF大小鼠生长繁殖饲料和垫料均购自北京科澳协力饲料有限公司,各项检测符合规定。

1.3 实验仪器

KDC-40低速离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;CD-15PMX三丰数据采集系统(三丰防

水、防尘电子数显卡尺),日本三丰;MK3酶标仪,赛默飞世尔(上海)仪器有限公司;SN-487小动物麻醉机,日本软隆生物技术有限公司。

2 方法

2.1 对胃酸分泌的影响^[2]

选用健康成年SD大鼠60只,雌雄各半,SPF级,体质量160~250 g。按照性别和体质量随机分为6组,分别为模型组和注射用雷贝拉唑钠0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg/kg组。动物禁食不禁水16~18 h,在异氟烷轻度麻醉状态下,仰卧位固定于鼠板上,腹部剑突附近去毛备皮,在剑突下沿腹正中中线切开腹壁,切口长约1 cm,止血钳钝性撑开腹膜,用止血钳(头上穿硅胶管)夹出胃及十二指肠,于幽门下穿一条2-0缝合线(勿伤及血管)结扎幽门,间断缝合腹壁肌肉和皮肤^[2]。结扎之后立即iv给药,给药体积5 mL/kg,模型组给予等体积的0.9%氯化钠注射液。给药后,动物回笼饲养,动物禁食禁水约8 h后,CO₂吸入处死,开腹,结扎贲门,摘取全胃,小心收集胃液,3 000 r/min离心15 min,取全部上清液,量其体积,采用NaOH滴定法测定胃液酸度及胃酸总分泌量,计算胃酸分泌抑制率。

胃酸分泌抑制率=(模型组胃酸总分泌量-给药组胃酸分泌量)/模型组胃酸分泌量

2.2 对吡罗美辛引起大鼠胃溃疡的影响^[3]

选用健康成年SD大鼠60只,雌雄各半,SPF级,体质量170~280 g。动物按照性别和体质量随机分为6组,分别为模型组和注射用雷贝拉唑钠0.25、0.50、1.00、2.00、4.00 mg/kg组,每组5雄5雌。动物禁食约48 h后,尾iv给药,给药体积为5 mL/kg,模型组给予等体积0.9%氯化钠注射液。给药10 min后ip吡罗美辛20 mg/kg,注射体积为10 mL/kg^[3]。注射吡罗美辛后,大鼠禁食约9 h后CO₂吸入处死,打开腹腔,用2-0丝线结扎幽门和贲门,取出全胃;向胃注入约2 mL 10%中性福尔马林固定液,然后将胃浸入10%中性福尔马林固定液固定2~5 min。取出,沿胃大弯剪开(避开溃疡部位),轻轻洗去胃内容物,将胃平铺在展板上,观察并统计胃溃疡形成情况,拍照,图片记录。然后将胃浸入10%中性福尔马林溶液中保存。计算溃疡抑制率,并用Bliss法计算ED₅₀。

溃疡程度评价方法:

点状溃疡:浅黄色点为表浅溃疡,1个点记1分;黑色点为深层溃疡,1个点记2分。

条状溃疡:黄色条状1 mm记1分,黑色条状1 mm

记2分。

块状溃疡:黄色块状1 mm²记1分,黑色块状1 mm²记2分(块状面积计算方法 $S=长径/2 \times 短径/2 \times \pi$)。

溃疡穿孔:1个孔记3分。

每只动物按照上述方法分别进行评分,然后计算溃疡总得分,根据溃疡得分可进一步计算给药组溃疡抑制率。

溃疡抑制率=(模型组溃疡组得分-给药组溃疡得分)/模型组溃疡得分

2.3 对大鼠醋酸性胃溃疡的影响^[4-6]

SD大鼠20只,雌雄各半,SPF级,体质量200~260 g。大鼠禁食不禁水24 h,在异氟烷轻度麻醉状态下,仰卧位固定于鼠板上,腹部剑突附近去毛备皮,在剑突下沿腹正中线切开腹壁,切口长2~3 cm,止血钳钝性撑开腹膜,打开腹腔,暴露胃部。将胃部轻轻拉出腹外,用微量进样器在胃窦前壁,胃壁肌层与浆膜层之间注入20%醋酸30 μ L^[4-6]。将胃轻轻送回大鼠体内,间断缝合腹壁肌肉和皮肤,回笼常规喂养。

模型制备次日,将模型制备后存活动物根据制备顺序随机入组,分别为模型组和注射用雷贝拉唑钠1 mg/kg组,动物开始尾iv给药,给药体积5 mL/kg,模型组给予等体积的0.9%氯化钠注射液,连续7 d,每天上午给药1次。

末次给药当日下午禁食,禁食24 h后,CO₂吸入

处死,开腹,结扎幽门和贲门,摘取全胃,向胃内注入2~3 mL 10%中性福尔马林固定液,将胃浸入福尔马林固定液固定5 min,取出,沿胃大弯剪开(避开溃疡部位),轻轻洗去胃内容物,将胃平铺在展板上,测量溃疡面积(溃疡面积 $S=长径/2 \times 短径/2 \times \pi$),拍照,图片记录。然后将胃浸入10%甲醛溶液中保存。根据溃疡面积计算溃疡抑制率。

2.4 对大鼠反流性食管炎的影响^[7]

SPF级健康成年SD大鼠20只,雌雄各半,体质量220~280 g。随机分为模型组和注射用雷贝拉唑钠1 mg/kg组,每组5雄5雌。动物禁食不禁水约24 h后,在异氟烷轻度麻醉状态下,仰卧位固定于固定板上,腹部手术区常规消毒。于腹部剑突下正中作切口,暴露胃及幽门,用细线缝扎幽门,同时于食管-胃交界处纵行切开贲门肌约1 cm,分离至黏膜层完全暴露于视野中,以加强胃反流^[7]。将胃轻轻送回大鼠体内,间断缝合腹壁肌肉和皮肤。

模型制备后立即尾iv给药,给药体积为5 mL/kg,模型组给予等体积0.9%氯化钠注射液。给药后继续禁食禁水,24 h后用CO₂吸入处死,沿贲门向上钝性分离并剪取食管约3~4 cm,沿纵轴将食管剪开,生理盐水冲洗干净,铺平,肉眼观察病变程度并评分(评分方法见表1),计算食管炎抑制率。

食管炎抑制率=(模型组反流性食管炎评分-给药组反流性食管炎评分)/模型组反流性食管炎评分

表1 大鼠反流性食管炎指数评价方法

Table 1 Evaluation method of reflux esophagitis index in rats

分级	食管黏膜大体表现	积分
0级	正常,可有组织学改变	0
Ia级	点状或条状发红,糜烂<2处	1
Ib级	点状或条状发红,糜烂 \geq 2处	2
II级	条状发红,糜烂,并有融合,但并非全周性,融合<75%	3
III级	病变广泛,发红,糜烂融合呈全周性,融合 \geq 75%	4

2.5 对大鼠半胱胺型十二指肠溃疡的影响^[8-9]

选用SPF级健康成年SD大鼠20只,雌雄各半,随机分为模型组和注射用雷贝拉唑钠1 mg/kg组,动物ig给予10%半胱胺盐酸盐,600 mg/kg \times 2次^[8-9],间隔3 h,ig体积为6 mL/kg。第2次ig后约30 min,动物尾iv给药,给药体积5 mL/kg,模型组给予等体积0.9%氯化钠注射液。

大鼠首次ig半胱胺盐酸盐24 h后CO₂吸入处死。打开腹腔,取出胃和十二指肠,10%甲醛固定2~5 min,沿胃大弯和十二指肠系膜对侧剪开,冲洗内容物,平铺在展板上,观察十二指肠损伤情况,拍

照,图片记录。

溃疡程度评价方法:0分为无缺损;1分为溃疡面积最长直径<2 mm;2分为最长直径2~5 mm;3分为最长直径6~8 mm;4分为最长直径>9 mm;5分为溃疡穿孔。

每只动物按照上述方法分别进行评分,然后计算溃疡总得分。根据溃疡得分可进一步计算给药组溃疡抑制率。

2.6 统计学方法

大鼠溃疡得分用Excel计算出均值、标准偏差,以 $\bar{x} \pm s$ 表示;用TOXSTAT2006采用t检验对溃疡得

分进行统计分析,与模型组比较,计算给药组对实验大鼠的溃疡抑制率,采用Bliss法计算ED₅₀。

3 结果

3.1 对胃酸分泌的影响

SD大鼠幽门结扎约8h,胃液分泌量为(7.3±1.9)mL,胃液酸度为(131.5±16.7)mmol/L,胃酸分泌

量为(0.96±0.29)mmol;幽门结扎之后立即给予注射用雷贝拉唑钠,胃液分泌量、胃液酸度以及胃酸分泌量与模型组比较均有一定程度的降低,其中8mg/kg组胃液分泌量,0.5、4.0、8.0mg/kg剂量组胃液酸度,2、4、8mg/kg剂量组胃酸分泌量差异显著($P<0.05,0.01$),对大鼠胃酸分泌的ED₅₀为6mg/kg。结果见表2。

表2 供试品对实验大鼠胃酸分泌的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Effect of rabeprazole sodium for injection on gastric acid secretion($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n	胃液分泌量/mL	胃液酸度/(mmol·L ⁻¹)	胃酸分泌量/mmol	胃酸分泌抑制率/%
模型	—	9	7.3±1.9	131.5±16.7	0.96±0.29	—
注射用雷贝拉唑钠	0.5	9	7.2±1.9	108.5±22.8*	0.79±0.29	18.3
	1.0	10	6.4±1.8	111.8±23.3	0.71±0.23	25.8
	2.0	9	5.4±2.3	110.0±31.9	0.60±0.31*	37.4
	4.0	10	5.6±2.0	91.3±36.9**	0.53±0.30**	44.3
	8.0	10	5.2±1.6*	87.0±24.3**	0.45±0.17**	52.8

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; ED₅₀为6mg/kg。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group; ED₅₀ = 6 mg/kg.

3.2 对吲哚美辛引起大鼠胃溃疡的影响

模型组大鼠黑色条状溃疡较多,为深层溃疡,溃疡得分为116。给予注射用雷贝拉唑钠后,大鼠的胃损伤程度有所减轻,与模型组比较,0.5、1.0、2.0、4.0mg/kg剂量组溃疡得分均显著降低($P<0.05,0.01$)。见表3。

3.3 对大鼠醋酸性胃溃疡的影响

模型组动物溃疡面积较大,平均溃疡面积约为22.8mm²。尾iv给予注射用雷贝拉唑钠连续7d后,溃疡面积明显减小,对醋酸性胃溃疡的抑制率为18.2%,见表4。

3.4 对大鼠反流性食管炎的影响

模型组动物食管病变广泛,糜烂融合,且融合

表4 注射用雷贝拉唑钠对不同模型溃疡的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 4 Effect of rabeprazole sodium for injection on different ulcer model in rats($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	醋酸性胃溃疡		反流性食管炎		十二指肠溃疡	
	溃疡面积/mm ²	抑制率/%	食管炎指数/级	抑制率/%	溃疡得分	抑制率/%
模型	22.8±7.5	—	4.0±0	—	4.7±1.0	—
注射用雷贝拉唑钠1mg·kg ⁻¹	18.7±11.0	18.2	2.5±1.7*	37.5	3.6±1.4	23.4

与模型组比较: * $P<0.05$

* $P<0.05$ vs model group

程度皆大于75%,食管炎指数为4级。注射用雷贝拉唑钠1mg/kg组食管炎指数为2.5级,对反流性食管炎的抑制率为37.5%,且与模型组比较具有显著性差异($P<0.05$)。见表4。

3.5 对大鼠半胱胺型十二指肠溃疡的影响

模型组大部分动物十二指肠穿孔,且有较长的深溃疡,平均溃疡得分为4.7。注射用雷贝拉唑钠

表3 注射用雷贝拉唑钠对吲哚美辛引起SD大鼠胃溃疡的影响($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 3 Effect of rabeprazole sodium for injection on indomethacin-induced gastric ulcer($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	溃疡得分	抑制率/%
模型	—	116±20	—
注射用雷贝拉唑钠	0.25	102±27	12.07
	0.50	84±33*	27.59
	1.00	67±27**	42.24
	2.00	57±25**	50.86
	4.00	41±16**	64.66

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$; ED₅₀为1.8mg/kg。

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs model group; ED₅₀=1.8 mg/kg。

1mg/kg组溃疡得分为3.6,对半胱胺型十二指肠溃疡的抑制率为23.4%,见表4。

4 讨论

质子泵抑制剂是近十几年来用于治疗消化性溃疡、胃食管反流性等酸相关性疾病应用广泛、疗效较好的药物,其疗效已被大量的临床试验所证实。雷贝拉唑钠是继奥美拉唑、泮托拉唑、兰索拉

唑等的第二代质子泵抑制剂,与第一代相比,其作用较快、较持久。注射用雷贝拉唑钠与口服的片剂比较,作用迅速、减少胃肠道黏膜的刺激性、避免了口服制剂的首过效应^[1],临床上主要用于口服疗法不适用的胃、十二指肠溃疡出血,并可使基础胃酸分泌和刺激状态下的胃酸分泌均受抑制,且持续的静脉滴注比间断的口服给药能更好的抑制胃酸分泌^[10]。

本研究使用多种实验动物模型综合评价注射用雷贝拉唑钠的药理学作用。胃溃疡模型有多种,目前比较常用的大鼠胃溃疡模型主要有应激性溃疡(水浸应激模型)、化学因素型胃溃疡模型(吡啶美辛法、醋酸性)及幽门结扎型大鼠胃溃疡模型等,随着分子生物学技术的发展,相关技术也应用到溃疡模型制备的领域中,如基因敲除技术、蛋白缺失技术等^[11]。

基于临床急性和慢性胃溃疡的发病机制不同以及溃疡特点的差异,选择与临床发病机制相似的,且重复性好、操作简单的动物模型评价药物的药理学作用显得尤为重要。本研究中使用的动物模型水浸应激法、醋酸性模型和幽门结扎法可评价急性溃疡,吡啶美辛模型可用于评价慢性溃疡。在制备醋酸性模型时,需注意注射的醋酸量不宜过大,过量的醋酸会溢出浆膜层,影响造模范围的判断。醋酸不能穿透胃壁肌层,否则造成胃壁穿孔,引起动物死亡。醋酸性模型在造模后的1~4 d模型较严重,会引起动物食欲下降,被毛蓬松,甚至会引起动物死亡,7~10 d后,醋酸模型逐渐自愈。在胃溃疡模型制备的过程中,要充分考虑动物禁食对模型的影响,其中幽门结扎法动物模型需要禁水。

本研究证实注射用雷贝拉唑钠不仅对急性溃

疡,如醋酸性模型和幽门结扎法模型有效,还对消炎痛法模型等慢性溃疡有效,同时还对大鼠反流性食管炎以及半胱胺型十二指肠溃疡均具有良好的抑制作用,与临床适用症一致。

参考文献

- [1] 陈敏纯,周伦,李雪晴,等.注射用雷贝拉唑钠在中国健康受试者的单、多剂量药理学[J].中国药师,2012,15(4):483-486.
- [2] 刘可云,朱毅.水黄皮根总黄酮抗大鼠幽门结扎型胃溃疡作用[J].中国公共卫生,2010,26(1):78-80.
- [3] 孙建慧,柳用绍,宫泽辉.胃星星秘方对大鼠不同模型胃溃疡的防治效果分析[J].军事医学科学院院刊,2004,28(6):555.
- [4] 王英.冰乙酸性大鼠胃溃疡模型制作方法比较[J].实用诊断与治疗杂志,2007,21(7):505-506.
- [5] 孙凤莲,宋于刚,朱新生,等.冰乙酸性大鼠胃溃疡模型制作及溃疡自愈过程中胃窦的组织学观察[J].第一军医大学学报,2001,21(8):5778-5781.
- [6] 杨明,王晓娟,孙红,等.树舌多糖对大鼠醋酸性胃溃疡的保护作用[J].中国药理学通报,2005,21(6):767-768.
- [7] 冯巧巧,刘军田.右旋雷贝拉唑钠对大鼠反流性食管炎模型的作用研究[J].药学研究,2015,34(5):259-261.
- [8] 贾建辉,王敏伟,曹红,等.左旋托拉唑镁对动物实验性十二指肠溃疡的影响[J].沈阳药科大学学报,2004,21(4):294-296.
- [9] 刘均利,张席锦.黄腐酸对大鼠十二指肠溃疡的影响[J].基础医学与临床,1984(Z1):46.
- [10] 邱枫,何晓静,孙亚欣,等.注射用雷贝拉唑钠在健康人体中的药理学及安全性研究[J].华西药学杂志,2014,29(2):176-179.
- [11] 肖韦,许昂,季晖.胃溃疡药理模型的研究进展[J].药学与临床研究,2016,24(2):145-150.