

十八、辅助保护胃粘膜检验方法

1 动物实验

1.1 原理

在一定时间内给予一定量的受试样品，用对胃粘膜有损伤作用的物质造成急性胃粘膜损伤模型，观察各剂量组胃粘膜的损伤程度；或用对胃粘膜有损伤作用的物质造成慢性胃溃疡模型，在一定时间内给予一定量的受试样品，观察各剂量组胃溃疡的面积和体积，反映受试样品对胃粘膜的辅助保护作用。

1.2 实验动物

选用 SD 或 Wistar 健康大鼠，单一性别，180—220 克，每组 8—12 只。

1.3 实验设计及剂量分组

受试物设三个剂量组，其中一个应为人推荐量的 5 倍剂量组，并同时设置正常对照组。不同的损伤模型，还应设置相应的模型对照组。慢性溃疡模型应先造模，手术次日再分组。受试样品给予时间一般为 14—30 天，必要时可以延长至 45 天。

1.4 胃粘膜损伤模型

1.4.1 急性胃粘膜损伤无水乙醇模型

1.4.1.1 实验动物：选用 Wistar 或 SD 健康大鼠，单一性别。

1.4.1.2 实验试剂及器材：无水乙醇、甲醛、解剖器械、游标卡尺、病理制片系统、显微镜等。

1.4.1.3 实验方法：动物随机分空白对照组、模型组和受试样品三个剂量组。各剂量组灌胃样品 30 天后，全部动物严格禁食 24 小时（不禁水），此期间亦禁止给予受试物。除空白对照外，所有试验组动物给予无水乙醇 1.0mL/只，1 小时后处死动物，暴露完整胃，结扎幽门，灌注适量 10%福尔马林溶液，固定 20min，然后沿胃大弯剪开，洗净胃内容物，展开胃粘膜，在体视解剖显微镜下或肉眼用游标卡尺测量出血点或出血带的长度和宽度。因宽度所代表损伤的严重性远较长度大，故双倍积分。其评分标准见表 1。

表 1 急性无水乙醇损伤大体观察评分标准

损伤程度	1 分	2 分	3 分	4 分
出血点	1 个	-	-	-
出血带长度	1—5mm	6—10mm	10—15mm	>15mm
出血带宽度	1—2mm	>2mm	-	-
总积分 = 出血点分值+长度分值+（宽度分值×2）				

观察指标：各实验组胃粘膜损伤程度以损伤发生率（%）、损伤积分指数和损伤抑制率（%）表示。损伤发生率（%）=某组出现出血或溃疡的大鼠数量 / 该组大鼠数量×100%；损伤积分指数 = 组损伤评分总和 / 组动物数量；损伤抑制率（%）= (A-B)/A×100%（A、B 分别为模型组与试验组的损伤积分）。

组织病理学观察及评分：大体检查完毕，将每只动物胃粘膜损伤最严重的部位切下，固定于 10%甲醛溶液，常规制片，HE 染色，镜下观察。注意选择胃粘膜正横切面，包括粘膜全层的区域观察。评分方法：以充血、出血、粘膜细胞变性坏死在整个粘膜上皮层的累及程度分为 5 级。充血权重为 1，出血权重为 2，上皮细胞变性坏死权重为 3，评分标准及病变总积分公式见表 2。

表 2 急性胃粘膜损伤组织病理学检查评分标准

病变	1分	2分	3分	4分	5分
充血	<1/5	1/5—2/5	2/5—3/5	3/5—4/5	上皮全层
出血	<1/5	1/5—2/5	2/5—3/5	3/5—4/5	上皮全层
上皮细胞变性坏死	<1/5	1/5—2/5	2/5—3/5	3/5—4/5	上皮全层

病变总积分 = 充血积分+出血积分×2+上皮细胞变性坏死积分×3

1.4.2 急性胃粘膜损伤消炎痛模型

1.4.2.1 实验动物：选用 Wistar 或 SD 健康大鼠，单一性别。

1.4.2.2 实验试剂及器械：消炎痛、甲醛、解剖器械、游标卡尺、病理制片系统、显微镜等。

1.4.2.3 实验方法：动物随机分空白对照组、模型组和受试样品三个剂量组，灌胃给予动物受试物 30 天后，禁食不禁水 24 小时，模型组和剂量组给予消炎痛 40mg/kg 一次性腹腔注射。5 小时后处死动物，剖腹将胃取出，结扎幽门和贲门，从十二指肠与幽门部结合处注入 10% 甲醛溶液 5 mL，固定 20 分钟后，沿胃大弯剪开，洗净胃内容物，展开胃粘膜，用纸吸干，观察胃粘膜损伤程度。用游标卡尺测量胃出血或溃疡的最大长度及宽度，以出血或溃疡的最大长宽径作为损伤指标评分。消炎痛所致胃粘膜损伤的溃疡一般较小，肉眼观查以点状多见，其评分标准见表 3。

表 3 急性胃粘膜损伤消炎痛模型大体观察评分标准

损伤形态	1分	2分	3分	4分
出血点	1个	-	-	-
出血带长度	1—2mm	2—4mm	4—6mm	>6mm
出血带宽度	1—2mm	>2mm	-	-

总积分 = 出血点分值+长度分值+（宽度分值×2）

注：长度和宽度均以最大径计。

观察指标：各实验组胃粘膜损伤程度以损伤发生率（%）、损伤指数和损伤抑制率（%）表示。损伤发生率（%）= 某组出现出血或溃疡的大鼠数量 / 该组大鼠数量×100%；损伤指数 = 组损伤评分总和 / 组动物数量；损伤抑制率（%）= (A-B)/A×100%（A、B 分别为模型组与试验组的损伤积分）

组织病理学观察及评分：同急性胃粘膜损伤无水乙醇模型。

1.4.3 慢性胃溃疡模型

1.4.3.1 动物：选用 Wistar 或 SD 健康大鼠，单一性别。

1.4.3.2 实验试剂及器材：冰醋酸、解剖镜、微量注射器等。

1.4.3.3 实验方法：

1.4.3.3.1 醋酸注射法：将动物禁食不禁水 24 小时，乙醚或水合氯醛或戊巴比妥钠麻醉后，消毒腹部，于剑突下切开腹腔，将胃轻拉出腹腔外，用微量注射器于胃幽门处浆膜下注射 20—30μL 的 30% 冰醋酸，缝合切口，术后正常喂食和水。第二天将手术后状态良好的动物按体重随机分为模型组和受试样品三个剂量组。各剂量组按相应剂量灌胃，连续 14 天。模型组灌胃蒸馏水或溶剂。禁食 24 小时后处死，取出整个胃浸泡于 10% 的福尔马林溶液内，浸泡 20 分钟后沿胃大弯剪开，洗净内容物，取腺胃区展开平铺于玻璃板上，用纸吸干溃疡内的水分，测量其面积和体积。

溃疡面积和体积测量法：于带标尺的解剖显微镜下计数溃疡所占的方格数，换算成面积。然后用微量注射器将有色墨水注入溃疡内，将溃疡填满与周边平齐，读取微量注射器上刻度即为溃疡的体积。

1.4.3.3.2 冰醋酸浸渍法：将动物禁食不禁水 24 小时，乙醚、异氟烷、巴比妥钠或水合氯醛麻醉后实施剖腹手术，消毒腹部，于剑突下切开腹腔，将牛津杯（内径 5mm、长 10mm）垂直放置胃体部粘膜上，向管腔加入冰醋酸 0.2mL，1.5 分钟后用棉签蘸出冰醋酸，缝合手术切口，术后正常喂食和水，第二天将手术后状态良好的动物按体重随机分组、给药，动物处置和测量等操作同上。

1.5 数据处理和结果判定

数据可用方差分析，但需按方差分析的程序先进行方差齐性检验，方差齐，计算 F 值， F 值 $< F_{0.05}$ ，结论：各组均数间差异无显著性。 F 值 $\geq F_{0.05}$ ，即 $P \leq 0.05$ ，用多个实验组和对照组间均数的两两比较方法进行统计。对非正态或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态或方差齐要求后，用转换后的数据进行统计。若变量转换后仍未达到正态或方差齐的目的，改用秩和检验进行统计。

受试物一个或一个以上剂量组与模型对照组比较，急性胃粘膜损伤模型大体观察评分或大体观察评分与病理组织学检查评分显著降低，慢性胃溃疡模型的溃疡面积和/或体积显著减小，表明胃粘膜损伤明显改善，可判定该受试样品动物实验结果为阳性。

1.6 注意事项

动物禁食应完全，应严格控制动物禁食期间食粪便、皮毛、垫料等。

2 人体试食试验

2.1 受试者的选择标准

2.1.1 纳入受试者标准：符合慢性浅表性胃炎诊断标准且经胃镜筛选确诊为胃粘膜损伤的自愿受试者。

2.1.2 慢性浅表性胃炎诊断标准：病程迁延，有不同程度的消化不良、上腹痛、烧心、嗝气、反酸、腹胀等临床症状，可有上腹部轻度压痛。符合慢性浅表性胃炎纤维胃镜诊断标准及活体组织检查诊断标准。排除胃溃疡患者。

2.1.3 排除受试者标准：

2.1.3.1 年龄在 18 岁以下或 65 岁以上，妊娠或哺乳期妇女，过敏体质及对本样品过敏者。

2.1.3.2 继发性慢性胃炎。

2.1.3.3 合并有心血管、脑血管、肝、肾和造血系统严重疾病，精神病患者。

2.1.3.4 经常用药、嗜酒、吸烟，4 周内参加过其它实验。

2.1.3.5 3 个月内用过已知对胃肠功能有损害的药物。

2.1.3.6 症状、体征分级为重症者。

2.1.3.7 有严重消化系统溃疡的病人。

2.1.3.8 正在服用其它治疗药物或接受其它治疗者。

2.1.3.9 未按规定服用样品，无法判断功效，或资料不全等影响功效或安全性判断者。

2.2 试验设计及服样期限

采用组间和自身两种对照设计。按受试者的症状轻重随机分为试食组和对照组，尽可能考虑影响结果的主要因素如年龄、性别、病程等，进行均衡性检验，以保证组间的可比性。每组受试者不少于 50 例。

2.3 受试样品的剂量和使用方法

试食组按推荐服用方法、服用量服用受试产品，在试验期间停用其它用于慢性胃病的物品，对照组服用安慰剂。按双盲法进行试食试验。观察时间不少于 30 天，必要时可延长至 45 天。试验期间不改变原来的饮食习惯，正常饮食。

2.4 观察指标

2.4.1 安全性指标

2.4.1.1 一般状况：包括精神、睡眠、饮食、大小便、血压等

2.4.1.2 血、尿、便常规检查

2.4.1.3 肝、肾功能检查

2.4.1.4 胸片、心电图、腹部 B 超检查（仅在试验开始前检查一次）

2.4.2 功效指标

2.4.2.1 症状观察

胃痛、暖气、反酸、腹胀、食欲不振、少食等临床症状。体征观察剑突下压痛程度。按症状轻重统计积分（重症 3 分，中度 2 分，轻度 1 分），见表 4。

表 4 人体试食试验症状轻重分级表

症状	轻（1分）	中（2分）	重（3分）
胃痛	轻微，持续时间短，不影响工作及休息	疼痛时间较长，每日超 4 小时，尚能忍受，但对工作及休息有一定影响	疼痛较重，持续难忍，需服药才能减轻
暖气	偶有发作	经常发作，引及两肋不适	频繁发作，引及两肋疼痛
反酸	偶有吐酸	饮食不适即吐酸	频繁吐酸
腹胀	腹胀轻微，时作时止，在短时间内可较甚	腹胀较甚或发作频繁，在较长时间内不缓解，影响工作及休息	腹胀难忍，持续时间长，需服药才能减轻
少食	食欲较差，饭量减少 1/2 以内	饭量减少 1/2—2/3	无食欲，饭量减少 2/3 以上

2.4.2.2 胃镜检查与体征观察

剑突下压痛程度检查，根据疼痛程度分为轻（1分）、中（2分）、重（3分）。

轻度：用力时才出现疼痛，压痛轻微 1分

中度：用力即出现疼痛，但疼痛尚能忍受，压痛明显 2分

重症：稍微用力即出现疼痛，疼痛不能忍受，压痛剧烈 3分

随机选择试食组和对照组各 15 例受试者进行胃镜检查，比较试食试验前后的改变。

2.5 数据处理和结果判定

统计症状和体征积分值。

试验数据为计量资料，可用 t 检验进行分析。凡自身对照资料可以采用配对 t 检验，两组均数比较采用成组 t 检验，后者需进行方差齐性检验，对非正态分布或方差不齐的数据进行适当的变量转换，待满足正态方差齐后，用转换的数据进行 t 检验。若转换数据仍不能满足正态方差齐要求，改用 t' 检验或秩和检验，但变异系数太大（如 $CV > 50\%$ ）的资料应用秩和检验。

结果判定：试食前后试食组自身比较及试食后试食组与安慰剂对照组组间比较，临床症状、体征积分明显减少，胃镜复查结果有改善或不加重，可判定该受试样品具有辅助保护胃粘膜的作用。