

PEPSTATIN

對實驗胃潰瘍的效果

著者

張峯鳴
宋瑞樓
余瑞雲
楊棟彥

譯者

(概要)

以 Pepstatin，一種由放射線菌所生的特殊胃蛋白酶抑制物質，應用於幾種白鼠的實驗潰瘍，作其定性和定量上藥理活性研究。結果發現用口服 50 mg/kg 的 pepstatin 能抑制因幽門結紮 18 小時所生的潰瘍及七天的醋酸潰瘍。用同劑量對抗 serotonin 及 gold-thioglucose 所生之潰瘍，被發現並無明顯抑制作用。雖然在比較實驗用玉米粉能同樣產生對幽門結紮潰瘍、醋酸潰瘍有中等度抑制作用，但由 pepstatin 所顯示的抑制效果卻是具備統計學上的意義。另外，分泌實驗揭示胃之酸度並無抑制作用，因此 pepstatin 的藥理作用機序被認為是一種特殊的抗消化性潰瘍之一種蛋白酶抑制劑。綜而言之：本劑為一種有效的蛋白酶抑制物質，值得臨床應用為抗消化性潰瘍的治療藥物。

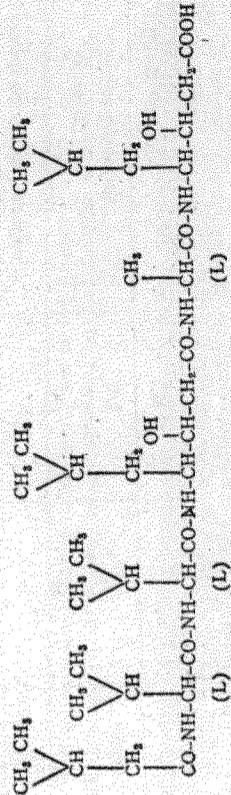
(前言)

儘管往昔對消化性潰瘍的成因和治療已有相當多的學者在進行研究，但影響潰瘍發生、痊癒、復發的因素仍不十分明瞭。1954 年，Levey 和 Sheinfeld 證明胃蛋白酶對酪蛋白 (casein) 的分解作用，可被一種硫化的多醣類所抑制。進一步實驗顯示，後者於生體內可抑制胃蛋白酶，且能減低經幽門結紮的白鼠所生之潰瘍。後來，1959 年 Anderson 和 Watt 更進一步發現一種鹿角菜糖 (carrageenin) 亦具備相似的胃粘膜保護作用，它是由海藻 (seaweed) 中得來的硫化多醣類，兼有抗氧化性及抗潰瘍作用，且可抑制由組織胺所引起之白鼠潰瘍。因此，胃液中主要的蛋白酶 (胃蛋白酶) 被相信是和胃酸一樣影響於潰瘍發生的另一個重要因子。除上述物質外，肝素 (heparin), dextran sulfate, dextran phosphate, chondroitin sulfate, cellobiose sulfate 與 sulfated amylopectin 均已被發現是 pepsin 之抑制物質。另一方面，Aoyagi 等學者在 1969 年報告由放射線菌類發現一種新的蛋白質酵素抑制劑，本物被 Umezawa 命名為 pepstatin，經發現能在濃度 0.01 μg/ml (體外) 對 pepsin 有 50% 抑制作用，同時發現其毒性小，無刺激性，低水溶性。在研究白鼠幽門結紮時，以口服 50 mg/kg 對胃部病灶有完全抑制作用。

這篇文章目的在測定由放射線菌所得的 pepstatin 在體內是否有抑制蛋白酶之作用，而能不改變胃酸之 PH 值。此乃應用一些知名的實驗潰瘍，由其實驗進行過程中對所生潰瘍之病發率及嚴重度做為判定基準。實驗並且擴大範圍，以決定它對胃分泌 PH 值之影響。

(材料與方法)

應用於本實驗的 pepstatin，是經由培養放射菌之濾液，以有機溶劑加以吸收而得。本物在真空下，用活性炭吸收，如再將抽取物濃縮，過濾後，冷卻產生它的結晶。為白色粉末，分子式為 $C_{34}H_{68}N_4O_8$ ，且有下例構造式：



因 pepstatin 不溶於水，故以 10% ethanol 作為溶劑，另具備含 10% ethanol 商用玉米粉當作比較實驗之用。60 隻 Wistar 系白鼠，平均體重 245 克，在保持一標準飲食下 (普通商用 chicken-chow 和水混合) 直到實驗前 24 小時，此時移去食物，剩下水。到實驗那天，老鼠稱重，隨意分為下述四個實驗：

- (1) 幽門結紮潰瘍—15 隻鼠用 Shay, Sun, Grumstein 幽門結紮術。此乃以輕度乙醚麻醉後，在腹部白線 (linea alba) 上中部切開，露出胃、十二指腸接合處。結紮幽門環，腹膜及腹直肌縫合後，再用外科創傷夾 (Wound clip) 關閉皮膚上之傷口。手術後五隻口服 50 mg/kg pepstatin，作為「處理群 (treated group)」，另五隻用同劑量玉米粉灌食，當作比較群，其他五隻不予食物，作為對照組。18 小時後，這些動物再被麻醉，腹再打開，結紮食道下端，移走胃及其內的分泌物，再在水中漂洗。由胃大彎切開，胃內容物個別用分離機管子收集，胃粘膜炎表面在於水中漂洗，用圖釘在濾紙上伸展。如此所得胃標本，由外觀上利用 Robert 和 Nezamis 潰瘍計數法估計其病灶。用 10% 福馬林固定，再於顯微鏡下觀察。胃內容物則用 2000 回轉 15 分鐘離心處理後，記載上層液之量並個別測定 PH 值，再由 Moor 氏換算表計算其酸度。全部胃酸排出量以每 100 g 鼠體重所排出胃酸度之 milliequivalents 統計。
- (2) 醋酸潰瘍—15 隻鼠經由腹部切開，乙醚麻醉，注入 0.1 c.c. 之 0.1% 醋酸入胃壁；五隻更進而每日以 pepstatin 50 mg/kg 灌食六次，當作「處理群」；另五隻用玉米粉灌食，作為比較群；最後五隻不給食品作為對照組；七天後，動物被屠殺，胃樣本處理如前所述。
- (3) Serotonin 潰瘍—15 隻鼠用 Nikodijevic 和 Traikov 的方法經肌肉注射 serotonin 20 mg/kg，其中五隻更進一步口服 pepstatin 50 mg/kg 當作處理群，另 5 隻以同量玉米粉當作比較群，另五隻餵食作為對照組。24 小時後，動物被手術，胃標本處理同上，但胃由胃小彎切開。
- (4) Gold thioglucose 潰瘍—15 隻鼠依 Deter 和 Liebelt 法肌肉注射本劑 0.45 mg/kg，5 隻進而口服 pepstatin 50 mg/kg 作為處理群，另五隻吃同量玉米粉作為比較群，另五隻不予食物作為對照組，24 小時後處理同上。

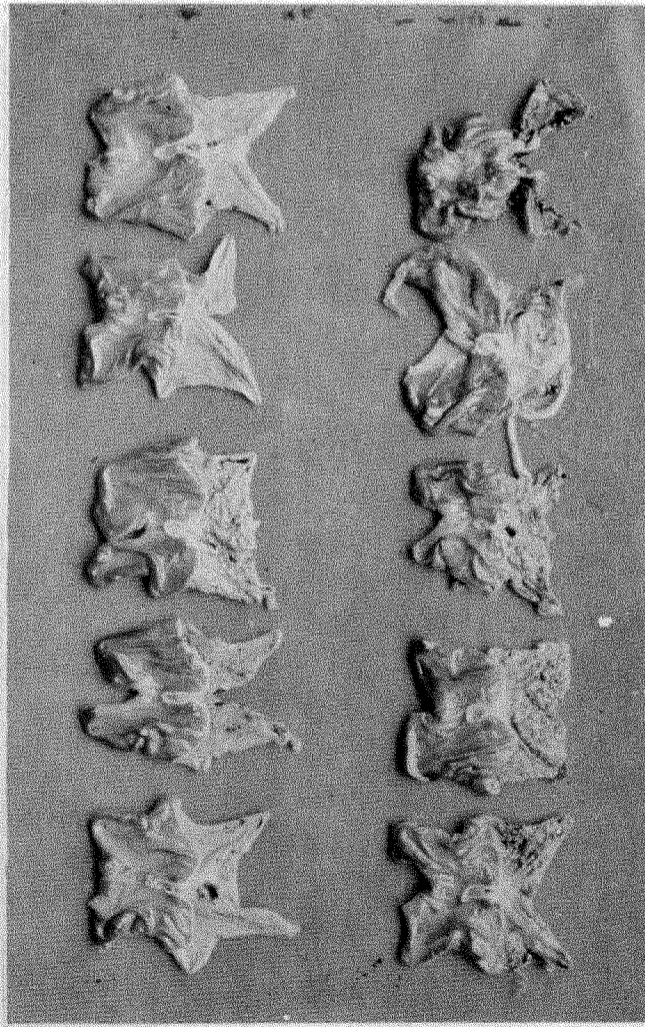
(結果)
(1) 幽門結紮潰瘍

Table 1. Effect of Pepstatin on Pylorus Ligation Ulcer

	Control	Corn Starch	Pepstatin*
Fore-stomach ulcer Development (%) Severity**	100 4	80 3	40 1
No. of lesion/rat	16/5	5/3	5/5
Glandular stomach erosion Development (%) Severity**	60 1	33 1	40 1
No. of lesion/rat	5/5	2/3	3/5
ULCER INDEX	25.2	17.7	11.6

* Pepstatin was administered 50 mg/kg per os.

** Classification of the severity of gastric lesions was based on the statistical latin square method.



如表1, 在 pepstatin 群共 5 隻鼠中, 2 隻前胃有 5 處輕微潰瘍。同時在腺胃 (glandular stomach) 上既有 3 處粘膜炎, 故總計潰瘍指數為 11.6。在玉米粉群中, 發現活鼠 3 隻中有 5 個嚴重潰瘍, 並有 2 個輕微粘膜炎, 潰瘍指數為 17.7。死亡動物的屍體解剖顯示, 動物死於前胃穿孔, 故真正指數似應較高。由於對照組動物餓了 18 小時, 產生潰瘍指數為 25.2, 比較 pepstatin 11.6, 玉米粉 17.7, 這些指數顯示, pepstatin 有明顯抑制幽門結紮潰瘍之作用, 但比較實驗餓食玉米粉也出現中程度抑制。雖然前胃之潰瘍有些學者不承認是真正化性潰瘍, 但本實驗最少顯示 pepstatin 可抑制在活組織中之攻擊因子。這種因子主要便是蛋白酶之活性。

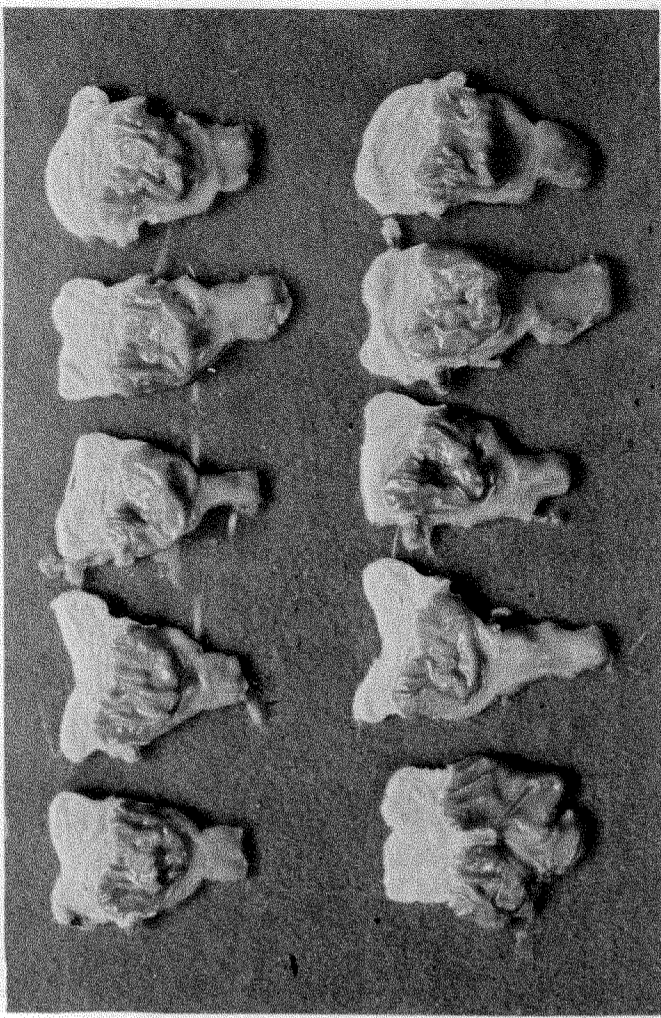
(2) 醋酸潰瘍

Table 2. Effect of Pepstatin on Acetic Acid Ulcer

	Control	Corn Starch	Pepstatin*
Glandular stomach ulcer Development (%) Severity**	100 4	60 3	60 2
No. of lesion/rat	5/5	3/5	1/5
ULCER INDEX	15.0	9.6	4.2

* Pepstatin was administered 50 mg/kg-day per os for 6 times.

** Classification of the severity of gastric lesions was based on the statistical latin square method.



如表2, 可知在 pepstatin 處理之 5 鼠中有 1 隻有開放性中度潰瘍, 其他 4 隻則只有瘢痕組織化 (cicatriziation)。同時在吃玉米粉之比較群中, 可見 3 隻有開放性潰瘍且有 2 處痕形成。結果潰瘍指數各為 4.2 及 9.6, 對照組為 15.0, 與對照組相比, pepstatin 有顯著潰瘍抑制作用, 而玉米粉組卻也呈現中程度之抑制。以肉眼觀察對照群的胃標本, 顯示有巨大穿孔潰瘍的粘膜炎, 而由肝或網膜覆蓋, 粘膜炎再生並不明顯, 然而, 在 pepstatin 群中, 可見一中小型癒合或瘢痕化潰瘍。如此明顯的結果顯示組織蛋白酶之抑制作用, 乃本現象之主因。

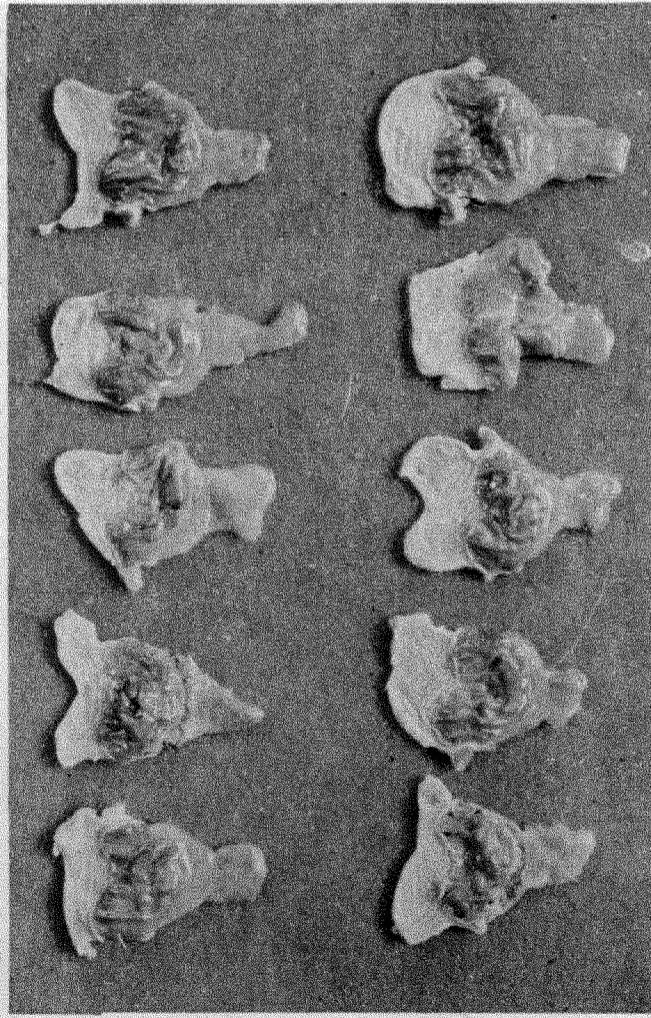
(3) Serotonin 潰瘍

Table 3. Effect of Pepstatin on Serotonin Ulcer

	Control	Corn Starch	Pepstatin*
Glandular stomach ulcer Development (%)	100	80	80
Severity**	2	2	2
No. of lesion/rat	3/3	4/5	4/5
ULCER INDEX	13.0	10.8	10.8

* Pepstatin was administered 50 mg/kg per os.

** Classification of the severity of gastric lesions was based on the statistical latin square method.



如表3，可見 pepstatin 及玉米粉二群中，4鼠之胃有4處中小型開放性潰瘍及鄰近粘膜輕微水腫。潰瘍指數均為10.8，比對照組的13.0，並無統計學重要性。故判定 pepstatin 對 serotonin 潰瘍的微小抑制作用是因抑制粘膜的發生而非直接作用於潰瘍，這小抑制作用可解釋為任何大分子物質所具有保護粘膜之作用。

(4) Gold thioglucose 潰瘍

Table 4. Effect of Pepstatin on Gold Thioglucose Ulcer

	Control	Corn Starch	Pepstatin*
Glandular stomach ulcer Development (%)	75	30	80
Severity**	1	2	1
No. of lesion/rat	7/4	8/5	4/5
ULCER INDEX	10.3	11.6	9.8

* Pepstatin was administered 50 mg/kg per os.

** Classification of the severity of gastric lesions was based on the statistical latin square method.

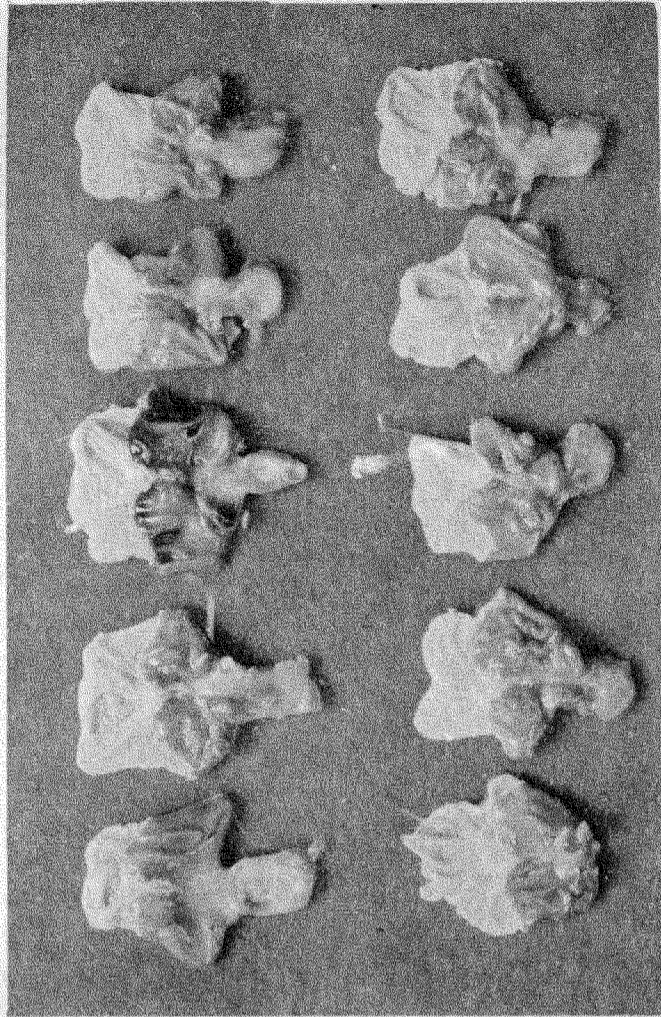


表4 pepstatin 對 Gold thioglucose 潰瘍之效果

如表4，pepstatin 群5鼠中有4鼠可見4處爛性變化，另在比較群中，胃同樣部分5鼠中有4隻有6處糜爛性變化，另外加上2個輕度潰瘍，指數分別為9.8，11.6，比對照組10.3，無統計學重要性。因大量肌肉注射 gold thioglucose 於本研究中是一種特殊經由腸丘下部破壞以生潰瘍之機序，亦是利用藥作用於中樞神經而誘生潰瘍者，pepstatin 遂不致有意義地抑制本機序所發生的潰瘍。因此 pepstatin 既不足以降低中樞神經所引起的病壯，也非拮抗本化學劑之藥理作用，故 pepstatin 在此實驗是為非特异性作用。

(5) 分泌試驗

Table 5. Effect of Pepstatin on Spontaneous Gastric Secretion

GROUP	Volume (ml/100g)	H+ Content (pH)	Acidity (mEq/l)	Acid Output (mEq/100g)	U*	P**
Control	5.20±0.57	1.04±0.37	114.6±9.80	0.568±0.069	0.37	0.36
Pepstatin	5.65±0.76	1.12±1.14	98.6±8.70	0.555±0.067	0.79	0.22
Corn Starch	4.98±0.81	1.14±0.11	95.2±9.92	0.534±0.048		

All values are mean ± s. d.

U*: Unit-normal deviates.

P**: Probability that observed difference is due to chance.

表 5 pepstatin 對自然胃分泌之效應

如表 5, 對照組絕食, 18 小時幽門結紮, 可分泌相當量之胃酸。18 小時之酸分泌量為 0.568 meq/100g rat, 經口服 pepstatin 及玉米粉後則為 0.555 及 0.534, 這些鼠中對胃液量及酸度無明顯之差異或改變。用 Student's t 統計結果並無意義, (P > 0.1)。故 pepstatin 抗潰瘍之機轉, 並不在改變或抑制胃酸及分泌。

(討論)

現代臨床上治胃或消化性潰瘍的主要方法在中和固定胃液內容物。一般用制酸劑、粘膜保護劑, 有時併用副交感神經拮抗劑而導致併發症。這種方法並未能證明對胃及十二指腸潰瘍有癒合作用, 目前有一些胃蛋白酶抑制劑, 如 carrageenin, sulfated amylopectin 及 aluminum sucrose-ester, 使我們更有機會去研究消化性潰瘍之形成及潰瘍的癒合效果, Carrageenin, 一種中性硫化多醣類, 主要包括硫化 6- 牛乳糖配體, 互連成長鏈聚合物, 分子量有數萬之大。高分子及低分子量之 Carrageenin 其抑制潰瘍之機轉已發現為減少對蛋白酶的保護作用。另一方面, 硫化 amylopectin 是有支鏈的合成性多醣, 有很多硫化側鏈, 其擁有抗潰瘍之性質已由 Turney 等人廣泛研究過。其機轉可能係結合胃粘液及粘膜破壞處。它似乎不論中性或合成之多醣, 可經由多條路徑以抗潰瘍。可能本物質之作用為單純, 與蛋白酶抑制有很大關係。另一方面, pepstatin 1969 年 Aoyagi 等人發現微生物能產生異化作用酶的, 也可生酶之抑制劑。後來發現培養液 (actinomycetes) 有 pentapeptides 構造本性, 分子量 685.92, 於體外濃度 0.01 μg/ml 可生 50% 抑制 pepsin on casein。因 Carrageenin, sulfated amylopectin 本質為多醣類, pepstatin pentapeptide, 故三者間在構造上及作用形式上不同。然而, 嘗試在臨床上應用這三種物質在理論上是不可能的。

現在研究證實, pepstatin 主要在降低幽門結紮及醋酸潰瘍, 比較實驗的玉米粉投與雖略有抑制作用但不明顯。另外口服玉米粉及 pepstatin 對 serotonin 潰瘍及 gold thioglucose 潰瘍並無抑制作用。因此, 可知 pepstatin 之作用在抑制胃液中致潰瘍之因子及制止胃壁慢性潰瘍性之消化, 用分泌實驗證明此作用既不影響胃酸度, 也不影響胃分泌之量。故抑制胃蛋白酶活性被以為是在本實驗中主要之效果。依此, 以實驗消化性潰瘍起源於靜脈血滯留 (serotonin

ulcer) 或中樞神經破壞 (gold thioglucose ulcer) 而由來者, 不致因 pepstatin 投與而受影響。然而被用做比較實驗之玉米粉, 顯示有較少可抑制潰瘍之活性, 此現象可能因為是本物質有多糖之性質, 也許當為一種部份蛋白酶抑制劑或粘膜保護劑, 以減少胃壁之損傷。

Pepstatin 可溶於乙醇, 可形成 ethyl ester, C₁₈H₁₇N₃O₉, 進一步研究指出, 體外此 ester 濃度只要 0.01 μg/ml 可 50% 抑制 pepsin, 同濃度自然型也可抑制 pepsin。但, Tang 發現, 乙醇本身也有水解 pepsin 作用。雖然體外實驗顯示 pepstatin 及其 ethyl ester 在 pepsin-casein test 上有相同活性, 但在體內, 須考慮其二者之間的互相作用性。

由我們的實驗發現, 鼠口服 50 mg/kg pepstatin 不生中毒徵象。Umezawa 等人報告 LD₅₀ 之值經由腹腔內路徑對鼠為 1090 mg/kg, 兔子 875 mg/kg, 狗為 450 mg/kg。口服 LD₅₀ 之值對所有動物而言, 均大於 2000 mg/kg。每天服用 250 mg/kg (鼠) 經過 180 天不致中毒。組織學上也觀察不到這些鼠有中毒現象。對平滑肌亦無刺激性, 90% 經口服下可由糞便中排出。故它為一低毒性、低溶解性及一安全可靠、對臨床抗潰瘍上有效應之物質。

臨床上, 吾人早已知道鹼性物有抗 pepsin 作用。任何鹼只要可提高胃液中 PH 值到 7 或大於 7 者, 將可在幾秒鐘內有效地抑制 pepsin, 且這些抑制作用為不可逆。今已知口服鹼性物, 最普遍是小蘇打製劑, 雖只能短期間中和胃酸, 但其減少臨床症狀之能力可持續數小時之久, 此即何以這簡單化合物現今仍被廣泛使用, 作為強力破壞 pepsin 及 HCl 而來治療胃病之理由。現在, pepstatin 之發現, 使吾人在治療消化性潰瘍之臨床上更邁進一步。

ACKNOWLEDGEMENT: The authors wish to express their gratitude to Banyu Pharmaceutical Co., Japan for their gift of Pepstatin. The aurothioglucose used in this experiment was supplied by Schering A. G. Berlin, Germany through the courtesy of their branch office in Japan.