

胃喜康对乙酸性胃溃疡大鼠胃黏膜细胞生长因子蛋白、基因表达的影响

胡冬菊 刘建平 李媛媛

(河北医科大学中医院, 石家庄市中山东路389号, 050011)

[摘要] **目的** 观察胃喜康煎剂对乙酸致胃溃疡模型大鼠生长因子的影响。**方法** 40只大鼠随机分为空白对照组(空白组)、模型组、雷尼替丁组、胃喜康低剂量组(低剂量组)、胃喜康高剂量组(高剂量组)5组, 每组8只。造模、采集标本, 用免疫组化法检测表皮生长因子(EGF)、转化生长因子 α (TGF- α)、表皮生长因子受体(EGFR)蛋白表达; 用原位杂交法、RT-PCR方法观测EGFR基因表达的情况。**结果** EGF、TGF- α 、EGFR蛋白表达增加($P < 0.05$); EGFR mRNA表达增强($P < 0.05$)。**结论** 胃喜康煎剂通过适当提高EGF、TGF- α 、EGFR表达水平, 在一定程度上起到抗胃溃疡并防止其复发的作用。

[关键词] 胃喜康; 胃溃疡; 细胞生长因子; 原位杂交法

Influence of Weixikang on Growth Factor Protein and Gene Expression of the Gastric Mucosa of Rats with Acetic Acid-induced Gastric Ulcer

HU Dong-ju, LIU Jian-ping, LI Yuan-yuan

(Chinese Medicine Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011)

ABSTRACT **Objective** To observe the influence of Weixikang (Herbal Decoction for Gastric Ulcer) on the growth factors of rats with acetic acid-induced gastric ulcer. **Methods** The rats were randomized into control group, model group, ranitidine group, Weixikang small dosage group, and Weixikang big dosage group, with eight rats in each. Models were made and samples collected. The immunohistochemical method was adopted to test the epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor- α (TGF- α), and the protein expression of epidermal growth factor receptor (EGFR). The hybridization in situ method and the RT-PCR method were adopted to test the gene expression of EGFR. **Results** The protein expression of EGF, TGF- α and EGFR was increased ($P < 0.05$); the expression of EGFR mRNA was strengthened. **Conclusion** Weixikang Decoction acts to a certain degree to resist the gastric ulcer and prevent recurrence through strengthening the expression of EGF, TGF- α and EGFR.

Key Words Weixikang (Herbal Decoction for Gastric Ulcer); Gastric ulcer; Cell growth factor; Hybridization in situ method

消化性溃疡(PU)是一种临床上常见的慢性复发性疾病。近年来随着H₂受体拮抗剂(H₂-RA)及质子泵抑制剂(PPI)的应用, 虽然能较快地促进溃疡近期愈合, 但停药后年复发率达65%~80%^[1]。胃喜康煎剂是我们多年来临床实践研制的治疗消化性溃疡的方剂, 在前期工作的基础上, 对其作用机理从乙酸致胃溃疡大鼠细胞生长因子及受体从蛋白、基因层面进行探讨, 现报告如下。

1 材料

1.1 实验动物

40只Wistar大鼠, 雄性, 体重220~250g, 河北医科大学实验动物中心提供。

1.2 实验用药

胃喜康由党参15g, 沙参15g, 丹参12g, 当归12g, 川芎9g, 白芍9g, 茯苓9g, 白术9g, 柴胡12g, 黄芩12g, 黄连9g, 枳实9g, 蒲公英12g, 延胡索15g, 三七粉3g, 炙甘草9g组成, 以上中药经河北医科大学中医学院中药系鉴

定, 符合《中华人民共和国药典》标准, 水煎后浓缩, 每毫升含中药2.7g。雷尼替丁, 每粒150mg, 汇仁制药有限公司生产。

1.3 试剂

dNTP(美国Promega公司); 表皮生长因子受体(EGFR)引物(北京鼎国生物公司); 目的基因序列及片段长度: 220bp; 上游引物: 5'-CCAGGCGCCCGGTGCCCCGC-3'; 下游引物: 5'-GCTGTAGCGGGGCTCAGCAT-3'; β actin引物(北京鼎国生物公司); β actin序列及片段长度: 545bp; 上游引物: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'; 下游引物: 5'-CTTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'; bpDNA Ladder(华美生物工程公司); EGFR mRNA原位杂交试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司); 地高辛标记EGFR cDNA探针。

2 实验方法

2.1 动物模型分组

动物随机分为空白对照组(空白组)、模型组、雷尼替丁组、胃喜康低剂量组(低剂量组)、胃喜康高剂量组

(高剂量组) 5组, 每组8只。

2.2 动物模型复制

按照 Takagi 等^[2]方法。大鼠麻醉后, 打开腹腔, 在胃前壁近幽门处(避开血管), 将10 μl 的乙酸由浆膜面注入胃的黏膜下层处。空白组造模注射相同剂量的生理盐水。术后3天开始给药, 低剂量组按2.0g/100g 体重每日1次灌胃(相当于成人剂量的5.4倍); 高剂量组按4.0g/100g 体重, 每日1次灌胃(相当于成人剂量的10.8倍); 雷尼替丁组按2.7mg/100g 体重, 每日1次灌胃; 空白组、模型组给予低剂量等容积的生理盐水。

2.3 标本采集动物处理

喂药观察14天, 禁食24小时, 断颈处死大鼠, 剪开腹腔, 结扎贲门、幽门端后取出胃, 沿胃大弯剪开, 用冰生理盐水冲洗干净后, 空白组于腺胃前壁近幽门处, 其余各组沿溃疡周围切下约1cm × 1cm 大小的胃壁, 迅速入液氮中冷冻保存。用 RT-PCR 方法检测 EGFRmRNA 表达。另沿溃疡周围切下约0.5cm × 0.5cm 大小的胃壁, 迅速浸入4%多聚甲醛中固定16小时, 脱水, 常规石蜡包埋, 制备5 μm 厚连续切片, 用原位杂交的方法检测 EGFRmRNA 表达, 用免疫组化检测表皮生长因子(EGF)、转化生长因子 α TGF-α 及 EGFR。

2.4 EGF、TGF-α免疫组化检测

按照试剂盒说明书进行, 每次实验以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗做阴性对照, 用已知的阳性片(乳腺癌组织切片)做阳性对照。采用北航彩色病理图文分析系统做图像分析, 记录光密度值及阳性细胞占总面积的百分比。

2.5 RT-PCR 方法检测 EGFRmRNA 表达

(1) 组织总 RNA 提取; (2) RNA 鉴定和定量; (3) cDNA 合成和 PCR 扩增。

2.6 EGFR 原位杂交检测

显微镜观察: 用已知的乳腺癌切片做阳性对照, PBS 做阴性对照, 选择实验组和空白组的阳性和阴性组织相, 进行400倍的显微照相。原位杂交半定量(semi-quantitative)分析: 在400倍镜下对原位杂交图像

进行分析, 每组随机抽取6只大鼠的切片各1张, 每张随机选取5个视野, 取5个数值的均值为记数值, 记录平均灰度值及阳性细胞占总面积的百分比。

2.7 统计学方法

用 SPSS 11.0 统计分析软件进行统计学分析。

3 结果

3.1 各组 EGF 免疫组化染色结果比较

空白组大鼠 EGF 的表达部位在胃黏膜的颈部, 以壁细胞、颈部细胞胞浆表达为主, 表达为弱阳性。表1示, 与模型组比较, 低剂量组、高剂量组溃疡旁黏膜组织 EGF 表达增强($P < 0.05$); 与雷尼替丁组比较, 低剂量组 EGF 表达未见明显变化($P > 0.05$), 高剂量组溃疡旁黏膜组织 EGF 表达增强($P < 0.05$)。

3.2 各组 TGF-α免疫组化染色结果比较

空白组大鼠 TGF-α表达部位在胃黏膜的颈部、基底部, 以壁细胞、颈部细胞胞浆表达为主, 表达为弱阳性。表1示, 与模型组比较, 低剂量组、高剂量组溃疡旁黏膜组织 TGF-α表达增强($P < 0.05$); 与雷尼替丁组比, 低剂量组、高剂量组溃疡旁黏膜组织 TGF-α表达无明显变化($P > 0.05$)。

3.3 组织总 RNA 提取结果

提取的总 RNA 经2%琼脂糖凝胶电泳后, 每一样品均出现清晰的28s 和18s 条带, 且28s 条带的亮度和宽度约为18s 条带的2倍。OD260/OD280在1.8~2.0之间。

3.4 各组 RT-PCR 检测结果比较

表2示, 各组胃组织 βactinmRNA PCR 的产物电泳各带明暗、宽窄均匀一致, 而各组胃组织的 EGFR mRNA PCR 产物电泳条带则显示不均一。空白组有基础水平的 EGFR mRNA 的表达; 与模型组比较, 雷尼替丁组 EGFR mRNA 表达量虽有增加的趋势, 但差异无显著性意义($P > 0.05$); 而低剂量组、高剂量组 EGFR mRNA 表达量明显增加($P < 0.01$); 与雷尼替丁组比, 低剂量组、高剂量组 EGFR mRNA 表达量明显增加($P < 0.05$); 低剂量组与高剂量组比, EGFR

表1 各组大鼠胃黏膜 EGF、TGF-α表达图像分析结果比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	EGF		TGF-α	
		面积百分比(%)	光密度值	面积百分比(%)	光密度值
空白组	8	6.88±3.31	0.57±0.25	9.83±2.89	0.82±0.53
模型组	8	16.09±5.65*	1.39±0.91*	16.20±4.30*	1.64±0.65*
雷尼替丁组	8	20.68±3.54*	2.80±0.82*#	17.95±4.13*	2.13±0.87*
低剂量组	8	22.13±5.55*#	3.20±0.67*#	21.89±6.18*#	2.64±0.74*#
高剂量组	8	25.71±5.15*#	3.81±0.93*#	23.99±4.78*#	3.06±1.11*#

与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, # $P < 0.05$; 与雷尼替丁组比较, △ $P < 0.05$

表2 各组大鼠胃组织 EGFR mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)		
组别	鼠数	原位杂交半定量(AU)
空白组	8	0.33 $\pm$ 0.04
模型组	8	0.46 $\pm$ 0.08*
雷尼替丁组	8	0.51 $\pm$ 0.12*
低剂量组	8	0.62 $\pm$ 0.08* $\# \Delta$
高剂量组	8	0.67 $\pm$ 0.10* $\# \Delta$

与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\# P < 0.05$; 与雷尼替丁组比较, $\Delta P < 0.05$

mRNA 表达量差异无显著性意义($P > 0.05$)。

3.5 各组原位杂交检测结果比较

空白组大鼠 EGFR mRNA 表达部位在胃黏膜的颈部、基底部, 以壁细胞、颈部细胞细胞浆及胞膜为主, 着色呈均匀的浅棕黄色。表3示, 与模型组比, 雷尼替丁组、低剂量组及高剂量组溃疡旁黏膜组织 EGFR mRNA 表达增强, EGFR mRNA 平均灰度值明显降低($P < 0.05$); 阳性细胞占总面积的百分比明显增加($P < 0.05$); 与雷尼替丁组比, 低剂量组、高剂量组溃疡旁黏膜组织 EGFR mRNA 表达增强, EGFR mRNA 平均灰度值明显降低($P < 0.05$); 阳性细胞占总面积的百分比差异无显著性意义($P > 0.05$)。

表3 各组 EGFR mRNA 平均灰度值、阳性细胞占总面积的百分比比较($\bar{x} \pm s$)			
组别	鼠数	平均灰度值(AU)	阳性细胞占总面积的百分比(%)
空白组	8	180.76 $\pm$ 20.50	0.108 $\pm$ 0.031
模型组	8	167.32 $\pm$ 8.50*	0.152 $\pm$ 0.028*
雷尼替丁组	8	153.71 $\pm$ 10.59* $\#$	0.226 $\pm$ 0.026* $\#$
低剂量组	8	136.10 $\pm$ 13.41* $\# \Delta$	0.234 $\pm$ 0.048* $\#$
高剂量组	8	133.11 $\pm$ 9.81* $\# \Delta$	0.255 $\pm$ 0.050* $\#$

与空白组比较, * $P < 0.05$; 与模型组比较, $\# P < 0.05$; 与雷尼替丁组比较, $\Delta P < 0.05$

4 讨论

EGF 是一种具有抑制胃酸分泌、促进上皮细胞增殖, 组织修复和细胞保护作用的内源性物质, 在保护胃黏膜免受损伤因子破坏、维持胃肠黏膜完整性方面起着非常重要的作用^[3]。TGF- α 是 EGF 家族中另一参与胃黏膜损伤后修复的主要调节肽, 在胃肠道 TGF- α 参与调节黏膜上皮的更新和黏膜损伤的修复, 是维持黏膜完整性的重要介质^[2]。EGFR 是一带有酪氨酸激酶活性的跨膜糖蛋白^[4]。主要分布在胃壁、十二指肠和小肠的黏膜上, 对 EGF、TGF- α 有高度的特异性和亲和力。胃黏膜受到损伤时(如溃疡)其黏膜层 EGFR 表达大量增加^[5], EGFR 的增加除了介导黏膜上皮细胞的分裂、修复外, 还介导减少胃酸的分泌, 是溃疡病组织修复过程中的主要环节^[6]。

我们研究发现, 用药后各组距溃疡边缘2mm 范围内黏膜层 EGFR mRNA 表达增强, 主要位于胃腺颈部

细胞, 此处恰是胃黏膜上皮细胞增殖的部位, 这为 EGF、TGF- α 促进胃黏膜生长和更新提供证据, 且模型组、雷尼替丁组 EGFR mRNA 表达强于空白组, 高、低剂量组比模型组更强, 说明胃喜康可通过增加 EGFR mRNA 转录水平, 调控 EGFR 蛋白表达量, 发挥 EGFR 合成诱导作用。从而使 EGF、TGF- α 与 EGFR 结合, 形成受体二聚体, 使自身的一系列酪氨酸被磷酸化, 通过 Grb2和 Sos 最终激活 P21^{ras} 而传送信号, 调节细胞生长与分化。根据以上结果, 推测胃喜康的抗溃疡作用可能与激活 EGF、TGF- α EGFR 系统, 促进胃黏膜上皮细胞增生、组织修复、抑制胃酸有关。

Tatnawski 等^[7]认为, 溃疡瘢痕的再生上皮化和腺结构重建是在 EGF 及其受体的调控下完成的, 我们的研究与其相似, 本实验观察到高、低剂量组可增加胃溃疡旁黏膜 EGF、TGF- α 水平, 增强 EGFR mRNA 的表达, 由此推测胃喜康的作用机理可能与诱导和激活 EGF、TGF- α 及其受体(EGFR), 将 EGF、TGF- α 固定在溃疡区域并使其增加、聚集, 同时增加 EGFR 在溃疡处黏膜的表达而实现的。EGF、TGF- α 与细胞表面的 EGFR 有效结合, 共同完成增加细胞内 DNA、RNA 和蛋白质合成, 刺激溃疡边缘正常的上皮细胞增殖、分化和移行, 并可刺激肉芽组织内微血管的形成, 改善微循环, 同时抑制胃酸的分泌, 以促进溃疡愈合, 提高溃疡愈合质量。

参考文献

[1]梅武轩, 邓兰琼, 崔世高. 柴胡桂枝汤对大鼠乙酸胃溃疡愈合质量的影响. 中国中西医结合脾胃杂志, 2000, 8(5) : 278 ~280.

[2]Tarnawski A, Santos AM, Hanke S, et al. Quality of gastric ulcer healing. Is it influenced by antiulcer drugs? Scand J Gastroenterol, 1995, 208(Suppl) : 9~13.

[3]Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, et al. Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. Nature, 1993, 363(6424) : 45~51.

[4]杨学松, 李益农, 叶嗣懋, 等. 大鼠胃溃疡愈合质量与抗强的松再损伤关系的实验研究. 北京医科大学学报, 1996, 28(6) : 454~456.

[5]Tarnawski A, Stachura J, Durbin T, et al. Increased expression of epidermal growth factor receptor during ulcer healing in rats. Gastroenterology, 1992, 102(2) : 695~698.

[6]Joshi V, Ray GS, Goldenring JR. Inhibition of parietal cell acid secretion is mediated by the classical epidermal growth factor receptor. Dig Dis Sci, 1997, 42(6) : 1194~1198.

[7]Ito M, Imai S, Toh T. Effect of epidermal growth factor (EGF) on gastric ulcer healing. 日本消化器病学会杂志, 1992, 89(临时增刊) : 1958.

(收稿日期: 2006-06-13; 修回日期: 2006-11-09)