

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2014.13.018

姜胃颗粒对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜 Bcl-2 和 PCNA 表达的影响

黄 彬¹, 谢伟昌², 李 健^{1*}, 郭绍举¹, 冯春霞¹

(1. 深圳市中医院, 广东省深圳市福田区福华路 1 号, 518033; 2. 广州中医药大学深圳临床医学院)

基金项目: 广东省科技计划项目 (2011B031700043)

[摘要] 目的 探讨姜胃颗粒治疗慢性萎缩性胃炎 (CAG) 的可能作用机制。方法 将 50 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组和姜胃颗粒低、中、高剂量组, 每组 10 只。除正常组外, 其余各组大鼠复制 CAG 模型, 造模后正常组和模型组给予 10 ml/kg 自来水灌胃, 姜胃颗粒低、中、高剂量组分别给予姜胃颗粒 1.8、3.6、7.2 g/d 灌胃, 共连续 12 周。采用免疫组织化学方法检验各组大鼠胃黏膜增殖细胞核抗原 (PCNA) 和抑凋亡基因 (Bcl-2) 表达。结果 与正常组比较, 模型组大鼠胃黏膜 Bcl-2、PCNA 表达显著增多 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 姜胃颗粒各治疗组 Bcl-2 均有明显下降 ($P < 0.01$); 与姜胃颗粒低剂量组比较, 中剂量组 Bcl-2 下降 ($P < 0.01$); 与姜胃颗粒中剂量组比较, 高剂量组 Bcl-2 下降 ($P < 0.01$)。与模型组比较, 姜胃颗粒各治疗组的 PCNA 阳性表达率均有明显下降 ($P < 0.01$); 与姜胃颗粒低剂量组比较, 中剂量组阳性表达率下降 ($P < 0.01$); 与姜胃颗粒中剂量组比较, 高剂量组阳性表达率下降 ($P < 0.01$)。结论姜胃颗粒可能通过抑制 CAG 大鼠胃黏膜 Bcl-2 和 PCNA 的表达, 调节细胞的增殖和凋亡, 从而改善 CAG 胃黏膜病变。

[关键词] 姜胃颗粒; 慢性萎缩性胃炎; 细胞凋亡; 增殖细胞核抗原

慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 是消化系统的常见病、多发病, 临床上表现为胃黏膜上皮和腺体萎缩、黏膜变薄、黏膜肌层增厚及伴有肠腺化生、不典型增生为特征的慢性胃炎, 与胃癌的发生关系密切相关。姜胃颗粒是深圳市中医院脾胃病专科在总结多年诊治 CAG 经验基础上, 研制的专门用于治疗 CAG 的中药制剂^[1]。本研究通过建立大鼠 CAG 模型, 旨在探讨姜胃颗粒治疗 CAG 的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物

清洁级 SD 大鼠 50 只, 雄性, 3 月龄, 体重 180~220 g, 购自南方医科大学南方医院实验动物研究所, 实验动物许可证号 SCXK(粤)2008-0002。

1.2 药物

姜胃颗粒 (深圳市中医院院内制剂, 每袋 10 g, 批号: 粤 Z20070548), 相当于党参 15 g、白术 7.5 g、黄芪 15 g、黄精 7.5 g、枸杞子 7.5 g、麦

冬 7.5 g、石斛 7.5 g、莪术 5 g、三棱 5 g、三七 5 g、半枝莲 7.5 g、白花蛇舌草 7.5 g。

1.3 主要仪器及试剂

光学显微镜购自德国 Leica, 抑凋亡基因 (Bcl-2) 抗体购自美国 Bioworld, 批号: BS4294; 增殖细胞核抗原 (PCNA) 抗体购自美国 Bioworld, 批号: BS1289; DAB 浓缩加强型试剂盒购自广州深达生物制品技术有限公司, 批号: SA0702; 即用型快捷免疫组化 Max Vision™ 试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司, 批号: KIT-5010; 脱氧胆酸钠溶液由中国医药公司上海化学试剂采购供应站提供, 批号: 66-02-18; 乙醇溶液由深圳市中医院提供, 批号: 20120305。

1.4 模型建立

大鼠 CAG 模型建立参考文献 [2-4] 方法。第 1~5 周自由饮用 20 mmol/L 脱氧胆酸钠溶液, 每 5 天以 10 ml/kg 灌胃 55℃ 的 60% 乙醇溶液 1 次; 第 6~13 周更替自由饮用 20 mmol/L 脱氧胆酸钠溶液和 15% 乙醇溶液, 每 3 天更替 1 次, 每 7 天以 10 ml/kg 灌胃 55℃ 的 60% 乙醇溶液 1 次; 同

* 通讯作者: lijian@163.com, 13828869065

时配合饥饱失常法,第 1~8 周给予 2 天饱食 1 天禁食,第 9~13 周给予 2 天饱食 1 天禁食水。

1.5 动物分组及给药

50 只 SD 大鼠采用随机数字表法分为正常组、模型组和萎缩颗粒低、中、高剂量组,每组 10 只。除正常组外,其余各组大鼠建立 CAG 模型。造模成功后正常组、模型组给予 10 ml/kg 自来水灌胃,每日 1 次,萎缩颗粒低、中、高剂量组分别给予萎缩颗粒 1.8 g/d、3.6 g/d、7.2 g/d 灌胃,每日 1 次,相当于成人剂量的 1、2、4 倍,各组连续灌胃 12 周。

1.6 取材与染色

12 周后处死大鼠,取大鼠胃组织固定于 10% 中性甲醛,常规取材,石蜡包埋,包埋组织进行连续切片,切片厚 4~5 μ m。部分切片行 HE 染色,观察病理变化。切片脱蜡至水,3% H_2O_2 封闭内源性过氧化酶,磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 洗涤,微波修复, PBS 洗涤 3 次,加入非免疫的羊血清封闭非特异性抗原,倾去血清,加入一抗,4℃ 孵育过夜, PBS 洗涤,加入生物素标记的二抗孵育, PBS 洗涤,加入过氧化物酶—链酶卵白素孵育, PBS 洗涤, DAB 显色,苏木精复染,梯度乙醇脱水,二甲苯透明、中性树胶封片。

1.7 免疫组织化学方法检测胃黏膜 Bcl-2、PCNA 表达

Bcl-2 检测结果采用光密度表示,在 400 倍镜下,每张切片选取 5 个视野, Image-Pro Plus 6.0 图像分析软件 (德国 Leica) 测其平均光密度 (OD 值),以 5 个视野的均数作为每张切片 Bcl-2 的相对表达量。PCNA 检测结果采用 PCNA 增殖指数表示,在 400 倍镜下,每个视野观察 500 个细胞,记录阳性细胞数, PCNA 增殖指数 (%) = PCNA 阳性细胞数 / 计数细胞总数 $\times 100\%$ 。

1.8 统计学方法

采用 SPSS 18.0 软件进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 各组大鼠胃黏膜病理变化

HE 染色显示,正常组固有腺体未见萎缩,腺体数量基本正常,黏膜肌层未见增厚,免疫组织化学染色只见极少阳性染色区域;模型组固有腺体明显萎缩,腺体数量明显减少,黏膜肌层增厚,免疫组织化学染色可见大片阳性表达区域, Bcl-2 主要

表达于细胞浆内呈棕色或棕黄色, PCNA 主要表达于细胞核呈深棕色或棕黄色;各给药组固有腺体萎缩程度较模型组均减轻,腺体数量明显增多,黏膜肌层变薄,免疫组织化学染色阳性表达区域缩小。

2.2 各组大鼠胃黏膜 Bcl-2、PCNA 表达比较

表 1 示,与正常组比较,模型组大鼠胃黏膜 Bcl-2、PCNA 表达显著增多 ($P < 0.01$);与模型组比较,萎缩颗粒低、中、高剂量组大鼠胃黏膜 Bcl-2、PCNA 表达显著下降 ($P < 0.01$);与萎缩颗粒低剂量组比较,萎缩颗粒中、高剂量组大鼠胃黏膜 Bcl-2、PCNA 表达显著下降 ($P < 0.01$);与萎缩颗粒中剂量组比较,萎缩颗粒高剂量组大鼠胃黏膜 Bcl-2、PCNA 表达显著下降 ($P < 0.01$)。

表 1 各组大鼠胃黏膜 Bcl-2、PCNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	Bcl-2 (OD 值)	PCNA (%)
正常组	10	0.99 $\pm$ 0.18	12.1 $\pm$ 2.2
模型组	10	3.06 $\pm$ 0.22*	69.7 $\pm$ 6.7*
萎缩颗粒低剂量组	10	2.23 $\pm$ 0.26 [▲]	50.0 $\pm$ 8.2 [▲]
萎缩颗粒中剂量组	10	2.00 $\pm$ 0.23 ^{▲△}	41.2 $\pm$ 7.6 ^{▲△}
萎缩颗粒高剂量组	10	1.62 $\pm$ 0.25 ^{▲△#}	30.9 $\pm$ 8.2 ^{▲△#}

注:与正常组比较, * $P < 0.01$;与模型组比较, [▲] $P < 0.01$;与萎缩颗粒低剂量组比较, [△] $P < 0.01$;与萎缩颗粒中剂量组比较, [#] $P < 0.01$

3 讨论

CAG 发病机理目前尚未完全清楚,目前认为可能与环境、免疫、遗传、胆汁反流、幽门螺旋杆菌感染以及不良饮食习惯等因素有关^[5]。CAG 临床上以胃脘痞满、疼痛和食欲不振为主症,以噯气、嘈杂、乏力等为次症,故中医学将其归属于“胃痛”、“胃脘痛”、“嘈杂”等范畴。CAG 病因复杂,多由外邪犯胃,饮食失调,情志内伤或体质虚弱等原因所致。病变脏腑在胃腑,肝、脾在病机中起重要作用,胆与肾也与之相关。我们经临床长期观察发现虚、瘀、毒是其核心病机,“虚”表现为脾气虚、胃阴虚,“瘀”为血瘀,气为血帅,气虚无力行血,故血液瘀滞,“毒”为热毒,胃阴亏虚,郁热内生,聚而成毒。且因该病缠绵难愈,日积月累,致虚、瘀、毒共存,故其表现多为虚实夹杂之象,因此其治疗需虚实兼施为宜。萎缩颗粒以益气健脾、养阴活血、清热解毒为组方原则,方以黄芪、党参、白术补气健脾益气,补后天之本,治虚为本;黄精、枸杞子、麦冬、石斛养阴益胃,与益气之品相和,气阴双补;莪术、三棱、三七活血通络,使脾胃脉络通畅、瘀滞消除,则气血流通,脾胃得以滋溉;白花蛇舌草、半枝莲清热解毒,使其

久病久积之郁热郁毒得于清除。总之,该方药以益气健脾、养阴活血为主,兼以清胃热祛瘀毒,标本兼治,虚实共调,恰中 CAG 病机,故获良效^[6-7]。

CAG 发展变化是胃癌演变过程中的关键环节。目前认为肿瘤的发生、发展与癌基因、抑癌基因失活有关,并且与细胞凋亡与增殖失衡有着非常密切的关系。PCNA 是细胞 DNA 合成及分裂不可缺少的因子,是反应细胞增殖活性的主要生物学指标^[8]。当在 CAG 时,胃黏膜上皮细胞发生成熟障碍,失去抑制 DNA 合成的能力,表现为 DNA 合成活性增强,PCNA 标记指数增高^[9]。Bcl-2 是公认的细胞凋亡抑制基因。研究发现^[10],Bcl-2 参与细胞凋亡的调控并在萎缩性胃炎、肠化生、异常增生及胃癌组织中均有不同程度的表达,提示不典型增生的细胞可通过 Bcl-2 过度表达逃避细胞凋亡,延长细胞寿命,增加恶变几率。本研究结果发现,与模型组比较,萎胃颗粒各剂量组 Bcl-2 水平、PCNA 阳性表达率均有明显下降 ($P < 0.01$),并且呈剂量依赖性,以高剂量组下降最为显著 ($P < 0.01$)。综上,萎胃颗粒可能通过抑制 CAG 大鼠胃黏膜 Bcl-2 和 PCNA 的表达,调节细胞的增殖和凋亡,从而改善胃黏膜病变的病理状态,避免 CAG 进一步向胃癌转化。

参考文献

[1] 邓睿宁,黄明河,刘心亮,等. 萎胃汤治疗慢性萎缩性胃

炎伴癌前病变临床疗效及对 PCNA 和 bcl-2、bax 表达的影响[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2011, 19(1): 10-13.

[2] 邓伟民,许鑫梅. 清胀冲剂治疗大鼠慢性萎缩性胃炎实验研究[J]. 广州中医药大学学报, 1998, 15(3): 200-201.

[3] 王茵萍,范刚后,孙茂峰,等. 穴注黄芪,当归注射液对实验性慢性萎缩性胃炎胃黏膜屏障的影响[J]. 广州中医药大学学报, 2002, 19(3): 195-198.

[4] 翦林宏,彭志辉,陈立峰,等. 大鼠慢性萎缩性胃炎模型的建立[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(3): 161-163.

[5] Vannella L, Lahner E, Annibale B. Risk for gastric neoplasias in patients with chronic atrophic gastritis: a critical reappraisal[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(12): 1279-1285.

[6] 蔡锦莲,黄明河,陈秀凤,等. 萎胃散治疗慢性萎缩性胃炎及癌前病变的研究[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2002, 10(1): 14-17.

[7] 黄明河,蔡锦莲. 萎胃散治疗大鼠慢性萎缩性胃炎实验研究[J]. 中国中西医结合脾胃杂志, 2000, 8(4): 199-200.

[8] Moldovan GL, Pfander B, Jentsch S. PCNA, the maestro of the replication fork[J]. Cell, 2007, 129(4): 665-679.

[9] Wang L, Chen S, Chen Z, et al. Morphological and pathologic changes of experimental chronic atrophic gastritis (CAG) and the regulating mechanism of protein expression in rats[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2006, 7(8): 634-640.

[10] 裴莹,宋伯根,沈丽贤. Bcl-2 蛋白与胃癌相关性的研究[J]. 同济大学学报, 2001, 22(1): 16-17.

Effects of Weiwei Granules on the Expressions of Bcl-2 and PCNA in Mucosa of Rats With Chronic Atrophic Gastritis

HUANG Bin¹, XIE Weichang², LI Jian¹, GUO Shaoju¹, FENG Chunxia¹

(1. Shenzhen TCM Hospital, Guangdong Province 518033; 2. Shenzhen Clinical Medical School, Guangzhou University of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To research the effects and mechanism of Weiwei Granules on chronic atrophic gastritis (CAG). **Methods** Totally 50 SD rats were randomized into the normal group, model group and Weiwei Granules low-dose (1.8 g/d), middle-dose (3.6 g/d) and high-dose (7.2 g/d) groups, with 10 in each. The CAG models were established in all groups except the normal group with comprehensive method. The intragastric administration lasted for 12 weeks. The expressions of Bcl-2 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in mucosa of CAG rats were observed with immunohistochemical method. **Results** Comparing with the model group, the OD values of Bcl-2 in Weiwei Granules groups were significantly decreased ($P < 0.01$). Comparing with the Weiwei Granules low-dose group, the OD value was significantly decreased in the middle-dose group ($P < 0.01$). Comparing with the Weiwei Granules middle-dose group, the OD value was significantly decreased in the high-dose group ($P < 0.01$). Comparing with the model group, the positive expression rate of PCNA in Weiwei Granules groups were significantly decreased ($P < 0.01$). Comparing with the Weiwei Granules low-dose group, the positive expression rate of PCNA was significantly decreased in the middle-dose group ($P < 0.01$). Comparing with the Weiwei Granules middle-dose group, the positive expression rate of PCNA was significantly decreased in the high-dose group ($P < 0.01$). **Conclusion** Weiwei Granules can relieve the pathological state of gastric mucosal lesions and avoid stomach cancer possibly by inhibiting the expressions of Bcl-2 and PCNA in mucosa of CAG rats and regulating the proliferation and apoptosis of cells.

Keywords Weiwei Granules; chronic atrophic gastritis; Bcl-2; proliferating cell nuclear antigen

(收稿日期: 2013-09-27; 修回日期: 2014-03-15)

[编辑: 洪涛]