

• 实验研究 •

消痞颗粒对慢性萎缩性胃炎伴不典型增生大鼠胃黏膜增殖和凋亡的影响

赵 晶¹ 孟 捷² 杨晋翔^{3*} 彭继升³

(1. 浙江大学生命科学学院, 浙江省杭州市余杭塘路 866 号, 310029;

2. 北京中医药大学东方医院; 3. 北京中医药大学第三附属医院)

基金项目: 教育部 2009 年度“高等学校博士学科点专项科研基金”资助项目(20090013110002)

* 通讯作者: yjx571102@163.com, (010)52075200

[摘要] 目的 探讨慢性萎缩性胃炎伴不典型增生的发病机制及消痞颗粒对其作用的机制。方法 将 60 只 Wistar 大鼠随机分为正常组、模型组、自然恢复组、消痞颗粒组、维酶素组, 每组 12 只。采用幽门弹簧插入术加灌胃高盐热糊法复制大鼠模型, 正常组、模型组于第 16 周造模成功后处死; 消痞颗粒组大鼠于手术 1 周后, 给予浓度为 0.6g/ml 的消痞颗粒溶液灌胃 0.5ml/(100g·d); 自然恢复组大鼠于造模 16 周后, 蒸馏水灌胃 0.5ml/(100g·d); 维酶素组大鼠手术 1 周后, 以浓度为 0.4g/ml 维酶素混悬液 0.5ml/(100g·d)灌胃, 各组均每周灌胃 6 天, 12 周后采用免疫组化法检测胃黏膜增殖细胞核抗原(PCNA)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(Bcl-2)和 Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)表达。结果 模型组与自然恢复组 PCNA 阳性细胞面密度、Bcl-2 均明显高于正常组($P<0.05$ 或 $P<0.01$); Bax 低于正常组($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, 其余各组 PCNA 阳性细胞面密度差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。消痞颗粒组 PCNA 面密度明显低于自然恢复组($P<0.05$), 消痞颗粒组与维酶素组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。消痞颗粒组 Bcl-2 较模型组明显减弱($P<0.05$), Bax 明显升高($P<0.01$); 消痞颗粒组与维酶素组比较差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 降低胃癌癌前病变大鼠胃黏膜中的 PCNA、Bcl-2 表达, 升高 Bax 表达可能是消痞颗粒改善慢性萎缩性胃炎伴不典型增生有效机制之一。

[关键词] 消痞颗粒; 慢性萎缩性胃炎; 不典型增生; 增殖细胞核抗原; Bcl-2; Bax; 凋亡; 增殖

Effect of Xiaopi Granules on Proliferation and Apoptosis in the Gastric Mucosa of Chronic Atrophic Gastritis Rats with Atypical Hyperplasia

ZHAO Jing¹, MENG Jie², YANG Jinxiang³, PENG Jisheng²

(1. Zhejiang University, Zhejiang Province 310029; 2. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine; 3. The 3rd Affiliated Hospital of Beijing University of Chinese Medicine)

ABSTRACT Objective To observe the therapeutic effect and mechanism of Xiaopi Granules (granules to disperse epigastric fullness syndrome) on chronic atrophic gastritis (CAG) with atypical hyperplasia (ATP). **Methods** Sixty male wistar rats were randomized into normal group, model group, natural recovery group, Xiaopi Granules group and vitacoenzyme group, with 12 in each. The rat models were replicated by methods of pylorus spring insertion and high-salt hot paste for 16 weeks. The rats in the normal group and the model group were executed after 16 weeks of modeling. The rats in the Xiaopi Granules group were intragastrically administrated with 0.5ml/(100g·d) of Xiaopi Granules one week after surgery. The rats in the natural recovery group were intragastrically administrated with 0.5ml/(100g·d) of distilled water after 16 weeks of modeling. The rats in the vitacoenzyme group were intragastrically administrated with 0.5ml/(100g·d) (0.04g/ml) of vitacoenzyme suspension one week after surgery. The intragastric administration was given 6 times weekly for 12 weeks in all groups. The expressions of proliferation cell nuclear antigen (PCNA), Bcl-2 and Bax in the gastric mucosa were detected with immunohistochemical method. **Results** The positive expressions of PCNA and Bcl-2 were significantly increased and the positive expression of Bax was significantly decreased in the model group and the natural recovery group compared with the normal group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with the model group, the positive expression density of PCNA was significantly different in all other groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). The positive expression density of PCNA in the Xiaopi Granules group was significantly lower than that in the natural recovery group ($P<0.05$) and has no significant difference with the vitacoenzyme group ($P>0.05$). The expression of Bcl-2 was reduced and the expression of Bax was increased significantly ($P<0.01$) in the Xiaopi Granules group as compared with those in the model group, but there was no significant difference as compared with the vitacoenzyme group ($P>0.05$). **Conclusion** Reduction of expression of PCNA and Bcl-2, and increase of expression of Bax in gas-

tric mucosa in precancerous lesions of model rats might be relevant to its effect of regulating the apoptosis and proliferation of mucosal cells.

Keywords Xiaopi Granules (granules to disperse epigastric fullness syndrome); chronic atrophic gastritis; atypical hyperplasia; proliferating cell nuclear antigen; Bcl-2; Bax; apoptosis; proliferation

在慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生、非典型增生、胃癌演变过程中,胃黏膜上皮细胞的增生程度逐渐增加。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)能确切地反映细胞的增殖状态^[1-2]。B细胞淋巴瘤/白血病-2基因(Bcl-2)具有抑制细胞凋亡的作用,Bcl-2相关X蛋白(Bax)基因属于Bcl-2基因家族,编码的Bax蛋白可与Bcl-2形成异二聚体,对抗Bcl-2蛋白的抑制细胞凋亡作用,故Bcl-2与Bax两蛋白之间的比例是决定对细胞凋亡抑制作用强弱的关键因素。我们采用免疫组织化学方法观察大鼠胃癌癌前病变胃黏膜中PCNA、Bcl-2、Bax的表达和分布情况,并探讨消痞颗粒对PCNA、Bcl-2/Bax表达的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

雄性Wistar大鼠60只,清洁级,体重260~280g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物许可证号:SCXK(京)2002-0003号,采用随机数字表法将大鼠分为正常组、模型组、自然恢复组、消痞颗粒组、维酶素组,每组12只。

1.2 试剂与药物

试剂:鼠抗PCNA单抗(批号SC-56)、兔抗Bax多抗(批号SC-526)、兔抗Bcl-2多抗(批号SC-783)及免疫组化试剂盒(批号SP-9000)均为美国SantaCruz公司产品,氨基联苯胺(DAB)(批号ZLI-9033)为美国Sigma公司产品,均购自北京中山生物技术有限公司。鼠抗PCNA抗体、抗Bax多抗、抗Bcl-2多抗浓度均为1:300,以TBS溶液稀释。

药物:消痞颗粒(北京中医药大学东直门医院制剂室提供,院内制剂号990115,12g/袋),主要由党参、(炙)百合、香橼皮、丹参、三七粉、莪术、蒲公英、白花蛇舌草等组成;维酶素(北京长城制药厂生产,国药准字H11022232),其主要成分为多种维生素、氨基酸及微量元素。

1.3 模型制备^[3]与给药方法

除正常组外,其余各组大鼠禁食不禁水24h后,以3.5%水合氯醛腹腔麻醉1ml/100g。在无菌条件下开腹,在腺胃(相当于人体胃窦)距胃幽门环0.2cm处切小口,将长约2cm的金属弹簧一端插入

幽门环,并用缝线将弹簧两端固定。按手术常规逐层缝合胃及腹壁切口。手术1周后,每周给每只大鼠分别灌胃2次高盐热淀粉糊(60~70℃,含10%氯化钠),每次2ml,至第16周结束,将正常组、模型组处死,取材固定。各组造模成功并存活:模型组6只,自然恢复组9只,消痞颗粒组6只,维酶素组6只。另随机选取正常组大鼠6只。

消痞颗粒组于手术1周后,给予浓度为0.6g/ml的消痞颗粒溶液灌胃0.5ml/(100g·d);自然恢复组大鼠于造模16周后,蒸馏水灌胃0.5ml/(100g·d);维酶素组大鼠手术1周后,以浓度为0.04g/ml的维酶素混悬液0.5ml/(100g·d)灌胃,各组均每周灌胃6天,共12周。

1.4 指标检测与方法

1.4.1 取材与染色方法 实验结束后,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4~5μm。常规苏木精-伊红染色,免疫组织化学法染色。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、中性树脂胶封片。

1.4.2 PCNA、Bcl-2、Bax蛋白阳性反应物表达检测 PCNA检测:采用北京航空航天大学CMI-ASWIN计算机图像分析系统进行图像分析,并计算PCNA阳性细胞面密度。

Bcl-2检测:每张切片在高倍镜下观测计数200个细胞,依据镜下阳性染色细胞占计数细胞的比例判定染色结果,参考Krajewska^[4]半定量积分法,即根据每张切片的阳性细胞比例及着色深浅计分,着色细胞比例低于1/3为1分,1/3~2/3为2分,高于2/3为3分;着色程度:无着色为0分,浅蓝色为1分,棕黄色为2分,棕褐色为3分,两者合统计积分。

Bax检测:阳性反应物质呈棕黄色,主要位于腺上皮细胞胞质内,偶可伴核着色,以胞质或细胞核

表 1 各组大鼠胃黏膜 PCNA 阳性细胞面密度、Bcl-2、Bax 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	PCNA 阳性细胞面密度(%)	Bcl-2 积分(分)	Bax 阳性细胞数(个)
正常组	6	2.63±2.03	3.07±0.87	28.38±5.40
模型组	6	8.10±3.44 ^{##}	5.07±0.98 ^{##}	13.50±4.05 [#]
自然恢复组	6	5.44±0.92 ^{#△}	4.67±0.96 [#]	13.07±4.12 [#]
消痞颗粒组	9	2.66±2.17 ^{△△*}	3.47±1.12 ^{△△**}	17.37±5.95
维酶素组	6	3.72±1.58 ^{△△}	4.50±1.22	15.27±4.06

注:与正常组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$;与模型组比较,[△] $P<0.05$,^{△△} $P<0.01$;与自然恢复组比较^{*} $P<0.05$,^{**} $P<0.01$

中出现均匀一致的棕褐色颗粒为阳性细胞。先在低倍镜($\times 4$)下确定区域,再于 200 倍(20×10 , $0.739\text{mm}^2/\text{视野}$)下计数 5 个视野的阳性细胞数,并求其均数。

1.5 统计学方法

运用 SPSS 10.0 软件进行统计分析,采用 ANOVA 方差分析、方差齐性检验并进行多重比较。

2 结果

2.1 各组大鼠胃黏膜肉眼观察结果

模型组胃窦黏膜局灶苍白区,粟粒状结节较为多见;消痞颗粒组仍可见局灶苍白区,粟粒结节减少;自然恢复组和维酶素组与模型组相比变化不大。

2.2 各组大鼠胃黏膜光镜(HE 染色)观察结果

正常组胃黏膜厚度正常,上皮细胞及腺体排列整齐,大小形状较一致,腺上皮与腺管分界清楚;模型组胃黏膜萎缩变薄,腺体数量减少,间质内有淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞浸润,可见淋巴滤泡形成和肠上皮化生以及上皮不同程度的非典型增生,个别腺体呈共壁形象或囊性扩张;自然恢复组有程度不等的慢性浅表性、萎缩性胃炎、肠上皮化生等改变;消痞颗粒组胃黏膜上皮排列较规整,无明显变性、坏死,黏膜层仍有少量炎细胞浸润;维酶素组存在程度不等的慢性浅表性、萎缩性胃炎等改变,较模型组轻。

2.3 各组大鼠胃黏膜 PCNA 阳性细胞面密度比较

表 1 示,模型组与自然恢复组 PCNA 阳性细胞面密度均明显高于正常组($P<0.05$ 或 $P<0.01$);消痞颗粒组和维酶素组与正常组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。与模型组比较,其余各组 PCNA 阳性细胞面密度差异均有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。消痞颗粒组 PCNA 阳性细胞面密度低于自然恢复组($P<0.05$),而维酶素组与自然恢复组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.4 各组大鼠胃黏膜 Bcl-2、Bax 表达比较

表 1 示,模型组、自然恢复组胃黏膜 Bcl-2 表达

显著增强,与正常组比较差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。消痞颗粒组较模型组 Bcl-2 阳性表达减弱($P<0.01$);维酶素组与自然恢复组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。消痞颗粒组与维酶素组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

模型组、自然恢复组 Bax 阳性表达较正常组明显减少($P<0.05$ 或 $P<0.01$);消痞颗粒组、维酶素组、模型组、自然恢复组 Bcl-2 阳性细胞组间比较差异无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论

胃癌是目前肿瘤防治的重点。据调查,我国 20 世纪 90 年代胃癌死亡占恶性肿瘤死亡的 23.2%,并且在过去的 20 年中,呈上升趋势^[5]。目前一般认为,胃癌是由癌前病变逐步发展形成的^[6],一般认为其演变规律为:正常胃黏膜→浅表性胃炎→萎缩性胃炎→肠上皮化生→异型增生→胃癌(肠型)^[7],异型增生是目前公认的胃癌癌前病变,尤其是中重度异型增生。因此,利用各种干预手段积极治疗癌前病变对防治胃癌的发生具有重要意义^[8]。

胃黏膜上皮组织处于高速增殖的状态,高速增殖的细胞基因易损伤且无法正常修复,为胃癌的发生提供了条件。PCNA 是一种相对分子量为 36000 的非组蛋白核内多肽,是 DNA 多聚酶 delta 的辅助蛋白,其含量反映了细胞的增殖程度,是细胞增殖的一种标志。PCNA 与 DNA 合成一致,表明细胞处于活跃的增殖状态,是评价肿瘤恶性潜能的良好指标^[10]。细胞的增殖活性与肿瘤的发生、发展及预后等生物学行为有关^[11]。

肿瘤的发生不仅是细胞增殖异常性疾病同时也是细胞凋亡异常性疾病。Bcl-2 具有抑制细胞凋亡的作用,在人类罹患的各类癌症中,超过半数表达高水平的 Bcl-2 蛋白^[12]。Bax 是编码 Bcl-2 相关 X 蛋白的基因,Bax 是极重要的促细胞凋亡基因^[13],Bax 蛋白与 Bcl-2 蛋白有 21% 的同源性,具有对抗 Bcl-2 蛋白抑制细胞凋亡的作用。

本研究显示,正常组大鼠胃黏膜及胃黏膜非典型增生处均有 PCNA 阳性细胞出现,模型组 PCNA 阳性细胞面密度表达增强,应用消痞颗粒治疗后,PCNA 表达减弱。正常组大鼠胃窦部黏膜的增殖带部分细胞可检出 Bcl-2 蛋白,而模型组大鼠胃黏膜则出现了 Bcl-2 蛋白表达的显著增强,与文献报道的人类胃癌前病变时 Bcl-2 蛋白表达的变化规律一致^[15]。消痞颗粒治疗后,大鼠胃黏膜的 Bcl-2 蛋白表达水平显著下降。正常组大鼠胃窦部黏膜的增殖带有 Bax 蛋白表达,而模型组 Bax 阳性表达的显著减弱,经消痞颗粒治疗 Bax 表达有一定增强,但结果无统计学意义,可能与样本量较少有关。

本病病机以本虚标实,虚实夹杂为特点,消痞颗粒以益气养阴、理气散结、活血化瘀、清热解毒为法,由百合乌药汤化裁而成。方中党参、(炙)百合补气养阴润燥;乌药、香橼皮理气消胀;党参、百合与乌药、香橼皮合用,扶正而不碍邪,驱邪而不伤正,补而不滞。丹参、三七活血化瘀,一寒一温活血不伤正,与入气分的乌药、香橼同用,气血同调,共奏化瘀理气、散结消痞之效。蒲公英、白花蛇舌草清热解毒化湿。研究表明,消痞颗粒可影响萎缩性胃炎伴非典型增生大鼠胃黏膜增殖和凋亡的失衡状态,从而阻断和逆转萎缩性胃炎癌前病变。

参考文献

- [1] Garcia RL, Coitrera MD, Gown AM. Analysis of proliferating grade using anti-PCNA /cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues [J]. Am J Pathol, 1989,134(4):733-739.
- [2] Robbins BA, de la Vega D, Ogata K, et al. Immunohistochemical detection of proliferating cell nuclear antigen in solid human malignancies[J]. Arch Pathol Lab Med, 1987,111(9):841-845.
- [3] 张旭晨. 综合法复制大鼠胃癌前期病变模型[J]. 中华实验外科杂志,1994,11(5):31-33.
- [4] Krajewska M, krajewski S, Epstein JI, et al. Immunohistochemical analysis of bcl-2, bax, bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers[J]. Am J Pathol, 1996,148(5):1567-1576.
- [5] 孙秀娣,牧人,周有尚,等. 中国胃癌死亡率 20 年变化情况分析及其发展趋势预测[J]. 中华肿瘤杂志,2004,26(1):4-9.
- [6] 陆再英,钟南山. 内科学[M]. 7 版. 北京:人民卫生出版社,2008:397-384.
- [7] Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, et al. Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach[J]. J Gastroenterol,2000,35 Suppl 12:111-115.
- [8] Shao XH, Yang YP, Dai J, et al. Effects of He-Ne laser irradiation on chronic atrophic gastritis in rats[J]. World J Gastroenterol,2005,11(25):3958-3961.
- [9] Waseem NM, Lane DP. Monoclonal antibody analysis of the proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Structural conservation and the detection of a nucleolar form[J]. J Cell Sci,1990,96(Pt 1):121-129.
- [10] Maeda K, Chung YS, Onoda N, et al. Proliferating cell nuclear antigen labeling index of preoperative biopsy specimens in gastric carcinoma with special reference to prognosis [J]. Cancer,1994,73(3):528-533.
- [11] Hemmer J. In vitro bromodeoxyuridine labelling of squamous carcinomas of the oral cavity[J]. Eur J Cancer, 1990,26(2):113-115.
- [12] Reed JC. Promise and problems of Bcl-2 antisense therapy [J]. J Natl Cancer Inst,1997,89(14):988-990.
- [13] Maeda S, Yoshida H, Mitsuno Y, et al. Analysis of apoptotic and antiapoptotic signaling pathways induced by Helicobacter pylori[J]. Gut,2002,50(6):771-778.
- [14] El-Rifai W, Powell SM. Molecular biology of gastric cancer[J]. Semin Radiat Oncol,2002,12(2):128-140.
- [15] 王仰坤,纪小龙,马乃绪. 胃黏膜异型增生形态与 p53, Bcl-2 和 c-erbB-2 表达的关系[J]. 世界华人消化杂志, 1999,7(2):114-116.

(收稿日期:2012-07-24;修回日期:2012-10-12)

[编辑:侯建春]

(上接第 2114 页)

- [3] 吴焕淦. 溃疡性结肠炎中医诊断与治疗[M]. 上海:上海科学技术出版社,2009:345-346.
- [4] 石学敏. 针灸学[M]. 北京:中国中医药出版社,2002:251-252.
- [5] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2002:122.
- [6] 陈治水,危北海,张万岱,等. 溃疡性结肠炎中西医结合治疗方案(草案)[J]. 中国中西医结合消化杂志,2005,13(2):133-134.

- [7] 刘敬军,郑长青,周卓,等. 白头翁三七丹参灌肠治疗溃疡性结肠炎的实验研究[J]. 陕西中医,2009,30(1):105-107.
- [8] 方庆霞,王少松,谢有良,等. 穴位埋线治疗功能性便秘患者 72 例临床观察[J]. 中医杂志,2011,22(21):1849-1851.
- [9] 陈锦锋,陈建林,韩宇斌,等. 芍药汤合白头翁汤治溃疡性结肠炎(湿热内蕴型) 80 例疗效观察[J]. 新中医,2007,40(7):47-48.

(收稿日期:2012-02-23;修回日期:2012-05-18)

[编辑:叶晨]