

# 蒙古族药阿给炭对胃溃疡大鼠溃疡组织 VEGF, bFGF 及其受体 mRNA 表达的影响

刘伟志, 张纯芳, 裴玲燕, 柯愈诗, 崔箭\*

(中国少数民族传统医学国家民委-教育部重点实验室,  
中央民族大学 中国少数民族传统医学研究院, 北京 100081)

**[摘要]** **目的:**研究蒙古族药阿给炭对应激型胃溃疡模型大鼠溃疡组织血管内皮生长因子(VEGF),碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)及其受体 mRNA 表达的变化,探讨阿给炭促进胃溃疡愈合的分子机制。**方法:**84 只 SD 大鼠分为 7 组,即正常组,模型组,阳性药云南白药组(0.18 g·kg<sup>-1</sup>),阿给生药组(1.35 g·kg<sup>-1</sup>),阿给炭药低、中、高剂量组(0.9,1.35,1.8 g·kg<sup>-1</sup>),除正常组外,其余各组采用水浸束缚应激方法复制急性胃溃疡大鼠模型。连续给药 1 周后,常规处死动物,剪取胃部溃疡组织,采用 Western blot 及 RT-PCR 技术检测 VEGF 及 VEGF 受体(VEGFR),bFGF 及 bFGF 受体(bFGFR) mRNA 及蛋白表达水平。**结果:**与正常组比较,急性应激性溃疡导致大鼠溃疡组织 bFGF( $P < 0.01$ )和 bFGFR( $P < 0.05$ )蛋白表达水平显著降低。与模型组比较阿给炭低剂量组明显升高了大鼠溃疡组织 VEGF mRNA( $P < 0.05$ )以及 VEGF 和 VEGFR 蛋白表达( $P < 0.05$ ),但无剂量相关性;其他各组与模型组无差异;中剂量、高剂量阿给炭和云南白药显著升高 bFGF 的蛋白表达( $P < 0.01$ ),高剂量阿给炭同时也升高了 bFGF 和 bFGFR mRNA( $P < 0.01$ )和 bFGFR 蛋白表达( $P < 0.05$ )。**结论:**阿给炭促进胃溃疡愈合的分子机制可能与上调 VEGF 及其受体蛋白,bFGF 及其受体蛋白有关,对 VEGF,bFGF 和 bFGFR 的调控是在转录水平,对 VEGFR 的调控是在后转录水平。

**[关键词]** 阿给炭;胃溃疡;血管内皮生长因子;碱性成纤维细胞生长因子

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)01-0108-05

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2016010108

## Effect of Mongolian Drug Charred *Arteisia frigida* on mRNA and Protein Expression of VEGF/VEGF Receptor and bFGF/bFGF Receptor of Peptic Ulcer in Rats

LIU Wei-zhi, ZHANG Chun-fang, PEI Ling-yan, KE Yu-shi, CUI Jian\*

(Institute of Chinese Minority Traditional Medicine, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

**[Abstract]** **Objective:** To study the effect of charred *Arteisia frigida* on the change of mRNA expressions of vascular endothelial growth factors (VEGF), basic fibroblast growth factors (bFGF) and their receptors in ulcer tissues of stress gastric ulcer model rats, and investigate the molecular mechanism for charred *A. frigida* to promote the healing of gastric ulcers. **Method:** 84 SD rats were randomly divided into 7 groups, named control group, model group, Yunnanbaiyao group (Positive drug, 0.18 g · kg<sup>-1</sup>), *A. frigida* crude drug group (1.35 g · kg<sup>-1</sup>), low dose charred *A. frigida* group, middle dose charred *A. frigida* group and high dose charred *A. frigida* group (0.9, 1.35, 1.8 g · kg<sup>-1</sup>). Water-immersion stress method was used in all other groups except normal group to establish rat models of acute gastric ulcer. After intragastric administration for one continuous week, stomach ulcer tissues were scissored from the conventionally sacrificed animals. Western blot and RT-PCR

**[收稿日期]** 20150318(008)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81072894)

**[第一作者]** 刘伟志,博士,从事民族医药开发研究,Tel:010-68939942,E-mail:weizhiliu@aliyun.com

**[通讯作者]** \*崔箭,博士,教授,从事民族医药的开发应用研究,Tel:010-68939905,E-mail:cuijian9393@aliyun.com

technique were used to detect mRNA and protein expressions of VEGF and its receptor VEGFR, bFGF and its receptor bFGFR. **Result:** Compared with the normal group, ulcer tissues in rats with acute stress ulcer had significantly decreased bFGF ( $P < 0.01$ ) and bFGFR ( $P < 0.05$ ) protein expressions. Compared with the model group, charred *A. frigida* low dose group significantly increased VEGF mRNA expression ( $P < 0.05$ ), VEGF protein expression VEGFR protein expression ( $P < 0.05$ ), but without dose dependence; no difference was found between the other groups and the model group. charred *A. frigida* middle dose group, high dose group and Yunnanbaiyao group significantly increased bFGF protein expression ( $P < 0.01$ ), and charred *A. frigida* high dose group also increased bFGF mRNA expression, bFGFR mRNA expression ( $P < 0.01$ ) and bFGFR protein expression ( $P < 0.05$ ). **Conclusion:** The molecular mechanism for charred *A. frigida* to promote the healing of gastric ulcers may be associated with up-regulation of VEGF and VEGFR protein expressions, bFGF and bFGFR protein expressions. The regulation of VEGF, bFGF, and bFGFR is at the level of transcription, and the regulation of VEGFR is at the post-transcriptional levels.

[**Key words**] charred *Arteisia frigida*; gastric ulcer; vascular endothelial growth factor; basic fibroblast growth factor

溃疡复发与溃疡的愈合程度密切相关,胃溃疡愈合不仅要求溃疡基底粘膜上皮的修复,更要求粘膜下组织结构的修复和重建,所以肉芽组织的生长和微血管形成在溃疡愈合中起着重要作用。许多生长因子参与了这一过程,并在溃疡修复中对溃疡基底肉芽组织生长和新血管形成起到了重要的促进作用,其中血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)是较为重要的两种。VEGF 是一种特异作用于血管内皮细胞,并能促进其有丝分裂的糖蛋白,具有直接刺激血管内皮细胞增殖的作用,同时 VEGF 能增加血管通透能力,有利于血浆纤维蛋白外渗,进而促进血管生成。而 bFGF 是一种具有生物活性的血管源性多肽,广泛存在于人体各组织中,其能以组织释放和旁分泌的方式诱导早期生长反应素(Erg-1)对组织的修复作用,是对创伤修复有重要调控作用的细胞因子。前期研究发现蒙族药阿给炭能促进模型大鼠粘膜下组织新生血管数、微血管密度的增加,促进溃疡基底组织的愈合,本实验拟从分子水平探讨蒙族药阿给炭能促进模型大鼠粘膜下组织重建的分子机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SD 大鼠, SPF 级, ( $200 \pm 10$ ) g, 雌雄各半, 中国医学科学院放射医学研究所实验动物中心, 合格证号 SCXK(津)2010-0002, 饲养于中国医学科学院放射医学研究所清洁级实验动物房, 常规饮食。

**1.2 药物及试剂** 蒙族药材“阿给”购自内蒙古药材采购供应公司, 经中央民族大学中国少数民族传统医学研究院阿里穆斯副教授鉴定为菊科蒿属冷蒿

*Arteisia frigida* 全草; 阿给炭药由北京普生霖药业有限公司按优化工艺代为炮制<sup>[1]</sup>。阿给炭经粉碎后过 100 目筛, 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配置成混悬液; 云南白药胶囊(云南白药集团股份有限公司, 批号 Z53020799)。TRIzol(美国 Invitrogen 公司), QuantiTect™ SYBR Green PCR Kit(德国 QIAGEN 公司, 批号 204143), VEGF-antibody(美国 Santa Cruz 公司, 货号 SC-152), VEGFR1-antibody(美国 Abcam 公司, 货号 AB32152), bFGF/FGF(美国 Abcam 公司, 货号 AB16828), FGFR1(美国 Abcam 公司, 货号 AB829), 其他化学试剂均购自北京化学试剂公司。

**1.3 仪器** Mini Protean 3 Cell 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司), 1-14 型低温离心机(德国 Sigma 公司), Linegene9620 型实时定量 PCR 仪和 TC-96/g/h(b) 型 PCR 仪(杭州博日科技有限公司)。

## 2 方法

**2.1 分组与模型制备** 大鼠 84 只, 正常饲养 3 d 后进行实验。大鼠称重后, 随机分为 7 组, 即正常组、模型组、云南白药组(阳性药)、阿给生药组、阿给炭药低剂量组、阿给炭药中剂量组和阿给炭药高剂量组。动物禁食不禁水 12 h, 除正常组外, 其余各组动物于次日晚 23 h, 采用水浸应激束缚法<sup>[2]</sup>复制大鼠急性胃溃疡合并出血模型。将大鼠四肢固定于支架上, 然后浸于 ( $20 \pm 1$ ) °C 水槽中, 水没至大鼠胸骨剑突位置, 浸泡 6 h 后解除束缚, 禁食不禁水 12 h 后恢复正常饮食。

模型复制后次日, 各组随机选取 3 只大鼠, 10% 水合氯醛  $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  ip 麻醉后处死, 沿腹中线切开腹腔, 分离胃脏并结扎胃幽门, 经食道向胃内注入

10% 中性福尔马林固定液进行固定,后结扎贲门,剪取整个胃部置于 10% 中性福尔马林固定液中浸泡 10 min,取出沿胃大弯剪开,用生理盐水冲洗干净,观察胃粘膜表面溃疡和出血情况。

**2.2 分组与给药** 正常组、模型组对照组给予 0.5% 羧甲基纤维素钠,其余各组给药量如下:云南白药组( $0.18 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ );阿给生药组( $1.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ );阿给炭药低剂量组( $0.9 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ );阿给炭药中剂量组( $1.35 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ );阿给炭药高剂量组( $1.8 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ),连续灌胃给药 7 d,给药体积  $0.01 \text{ mL} \cdot \text{g}^{-1}$  动物体重,阿给生药剂量相当于炭药中剂量。

**2.3 Western blot 检测 VEGF, bFGF 及其受体蛋白的表达** 动物常规处死,解剖取胃,剪取新鲜溃疡组织,加入 RIPA 裂解液,低温环境下,研磨成组织匀浆液;低温下,利用超声波粉碎仪对组织匀浆液进行超声,工作 10 s,间隔 30 s,30 个循环;4 °C,10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 20 min,取上清。BCA 法进行蛋白定量后分装, -20 °C 保存备用。制备 SDS-PAGE 胶,将蛋白转到 PVDF 膜上,转移膜置于奶粉封闭液中,封闭 2 h;加一抗孵育 2 h, TBST 洗膜,加二抗孵育 1 h, TBST 洗膜, ECL 发光试剂发光, 胶片曝光, 显影, 定影。扫描图像,凝胶图像分析软件分析条带积分值。以各细胞因子及其受体蛋白条带的积分值与  $\beta$ -actin 的比值作为蛋白表达量。

**2.4 Real-Time PCR 检测 VEGF, bFGF 及其受体 mRNA 表达水平**

**2.4.1 RNA 提取** 剪取新鲜溃疡组织样品(大约 30 ~ 100 mg)放入盛有 1 mL 变性缓冲液(TRIZOL)的手动匀浆器中,在冰浴中充分匀浆。将匀浆液移至 1.5 mL ep 管中,15 ~ 30 °C 静置 5 min。加入 0.2 mL 三氯甲烷充分混匀 15 s,静置(15 ~ 30 °C 下)2 ~ 3 min,4 °C 12 000  $\times g$  离心 15 min。取上层水相置于新的离心管内,加入等体积的异丙醇,混匀后静置 10 min,4 °C 12 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min。弃去上清,加入 1 mL 的 80% 乙醇清洗沉淀,4 °C 10 000  $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min。室温风干沉淀(约 20 min),用 20  $\mu\text{L}$  DEPC 水溶解沉淀,取 2  $\mu\text{L}$  稀释 100 倍后测定 260 nm 吸光度  $A$ ,计算 RNA 浓度。

**2.4.2 逆转录反应合成 cDNA** 逆转录反应体系:0.1  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  DTT 2  $\mu\text{L}$ ,5  $\times$  RT-buffer 8  $\mu\text{L}$ ,10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs 4  $\mu\text{L}$ ,RNasin(40  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.5  $\mu\text{L}$ ,Oligo(dT)18(50  $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 2  $\mu\text{L}$ ,M-MLV(200  $\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ ,RNA 模板 1  $\mu\text{g}$ ,DEPC 水加至 40  $\mu\text{L}$ 。逆转录反应条件:42 °C 1 h,95 °C 5 min,产物 -20 °C 冻存,

待做定量 PCR。

**2.4.3 引物设定** VEGF 上游引物 5'-GGCTCACTTCCAGAAACACG-3';下游引物 5'-GTGCTCTG-CAGAATCTAGTGG-3';VEGFR 上游引物 5'-TG-GCATCGCGAAAGTGTATC-3',下游引物 5'-AAAGGGAGGCGAGCATCTC-3';bFGF 上游引物 5'-AAACCCAGGGCTTTCAATGTTAGTC-3',下游引物 5'-CCTATGATCAGTGCTCCACCA-3'。FGFR 上游引物 5'-CCAGT TGGGTCTGTCCCTGA-3',下游引物 5'-ACCAGCAGGTGGCAGAATTG-3'。

**2.4.4 实时定量 PCR** 实时定量 PCR 反应体系的配制:QuantiTect™ SYBR Green PCR mix 10.0  $\mu\text{L}$ ,目的基因上游引物 1.0  $\mu\text{L}$ ,下游引物 1.0  $\mu\text{L}$ ,cDNA 模板 2.0  $\mu\text{L}$ ,ddH<sub>2</sub>O 6.0  $\mu\text{L}$ ,共计 20.0  $\mu\text{L}$ 。实时定量 PCR 反应条件:95 °C 预变性 10 min,94 °C 变性 20 s,58 °C 退火加延伸 20 s,40 个循环,57 ~ 96 °C 绘制熔解曲线。

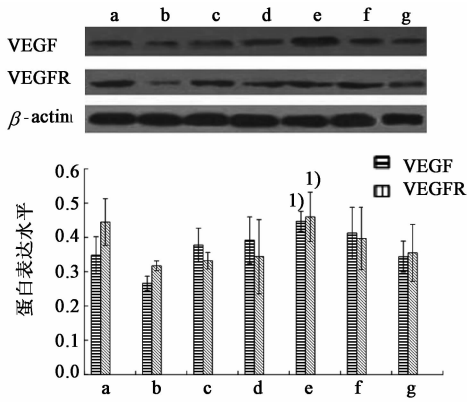
**2.5 统计学分析** 采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计分析,数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,各组之间比较采用单因素方差分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对 VEGF, bFGF 及其受体蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组大鼠溃疡部位 VEGF 和 VEGFR 的蛋白水平表达无显著性差异。与模型组比较,除炭药低剂量组有显著性差异外( $P < 0.05$ ),其他组均无统计学意义;其他组间比较无统计学意义。见图 1。与正常组比较,模型组大鼠胃溃疡组织 bFGF 和 bFGFR 蛋白的水平显著降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。与模型组比较,云南白药组、阿给炭药中、高剂量组均能提高模型大鼠 bFGF 蛋白表达( $P < 0.01$ );与阿给生药组比较,云南白药组、炭药中、高剂量组均有显著性差异( $P < 0.01$ )。对受体 bFGFR 的影响来看,与模型组比较,炭药高剂量组有显著性差异( $P < 0.05$ );其他各组无统计学意义。见图 2。

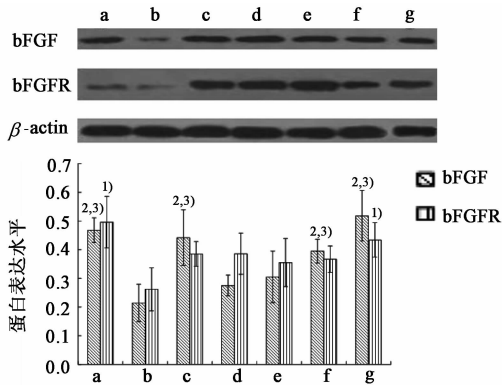
**3.2 对 VEGF, bFGF 及其受体 mRNA 的表达水平的影响** 与模型组比较,阿给炭药低剂量组能显著提高模型大鼠 VEGF mRNA 的表达,统计结果有显著性差异( $P < 0.05$ ),其他各组无统计学意义;对 VEGFR mRNA 的表达影响无统计学差异。表明蒙族药阿给炭能上调模型大鼠 VEGF mRNA 表达水平。见图 3。

与模型组比较,除炭药高剂量组能显著提高模



与模型比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$  (图 3 ~ 4 同)

图 1 阿给炭对大鼠 VEGF 及 VEGFR 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )  
Fig. 1 Effects of mongolian drug Charred *Arteisia frigida* on VEGF and VEGFR protein in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )



与模型组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ ; 与生药组比较<sup>3)</sup>  $P < 0.01$

图 2 阿给炭对大鼠 bFGF 及 bFGFR 蛋白表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )  
Fig. 2 Effects of mongolian drug Charred *Arteisia frigida* on bFGF and bFGFR protein in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

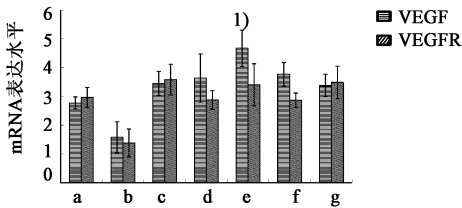


图 3 阿给炭对大鼠 VEGF 及 VEGFR mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

Fig. 3 Effects of mongolian drug Charred *Arteisia frigida* on VEGF and VEGFR mRNA in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

型大鼠 bFGF 及其受体 bFGFR mRNA 的表达外,云南白药组、阿给生药组、炭药低、中剂量组均无统计学意义;与生药组比较,各组均无统计学意义。结果说明炭药能显著调高模型大鼠 bFGF 及其受体 bFGFR mRNA 的表达水平。见图 4。

#### 4 讨论

胃溃疡愈合是复杂的生理过程,不仅需要黏膜

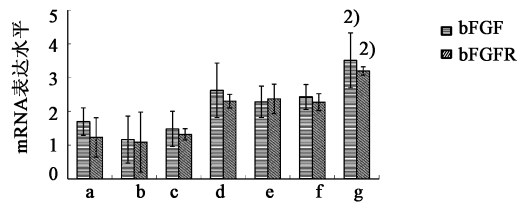


图 4 阿给炭对模型大鼠 bFGF 及 bFGFR mRNA 表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

Fig. 4 Effects of mongolian drug Charred *Arteisia frigida* on bFGF and bFGFR mRNA in rats ( $\bar{x} \pm s, n = 7$ )

下缺失的填充,更需要黏膜下组织的重建,因此肉芽组织的生长和血管形成在溃疡愈合中起着至关重要的作用,而许多生长因子参与了这一过程,就目前研究来看血管内皮生长因子可能为其中较重要的一种。VEGF 也称促血管素或血管通透性因子,是 Ferrara 等于 1989 年首次从牛垂体滤泡星状细胞的体外培养液中分离并纯化出来的能特异作用于血管内皮细胞,并能促进其有丝分裂的糖蛋白。VEGF 作为一种特异的因子直接刺激血管内皮细胞的增殖作用,目前大量研究证实 VEGF 在溃疡修复中对溃疡基底肉芽组织生长和新血管形成起到了重要的促进作用。李成军等<sup>[4]</sup> 在研究大鼠乙酸胃溃疡愈合过程中 VEGF 对胃黏膜组织形态的影响时发现 VEGF 促进了再生的异常胃黏膜向正常胃黏膜转化,并促进了再生胃黏膜功能的恢复。研究发现内源性 VEGF 在胃溃疡愈合的不同时期表达也有明显差异,说明 VEGF 参与了胃溃疡的愈合过程,也进一步表明胃溃疡愈合过程中需要形成微血管以便输送氧和营养物质等,而 VEGF 可能在此过程中起了重要作用<sup>[4]</sup>。因此通过上调溃疡部位 VEGF 及其受体的表达可能成为修复溃疡的重要治疗途径,对抗溃疡中药的相关研究也证实了这一机制<sup>[5]</sup>。

在本研究中笔者未发现模型大鼠溃疡部位 VEGF 及其受体 VEGFR 蛋白表达不足的现象(与正常组比较,  $P > 0.05$ ),但给予蒙族药阿给炭治疗后却能显著提高模型大鼠溃疡组织 VEGF 及其受体 VEGFR 蛋白表达水平(与模型组比较,均  $P < 0.05$ ),同时阿给炭能上调模型大鼠 VEGF mRNA 表达水平,这是否是阿给炭促进溃疡愈合的机制还有待于进一步研究。

碱性成纤维细胞因子(bFGF)是主要由成纤维细胞、巨噬细胞和血管内皮细胞以及肥大细胞产生的一种具有生物活性的血管源性多肽,通常储存于细胞外基质中,以组织释放和旁分泌的方式发挥生物学作用。当血管基底或内皮细胞受伤时 bFGF 被

释放出来,通过与靶细胞上高亲和力受体 FGFR 结合,激活信号通路,发挥促进新血管生成和细胞增殖的作用<sup>[6]</sup>,因此,bFGF 是对溃疡愈合有重要调控作用的细胞因子。研究发现在人胃溃疡愈合过程中,存在着内源性 bFGF 表达由弱到强的演变,说明 bFGF 与胃溃疡愈合密切相关<sup>[7]</sup>。bFGF 对胃溃疡愈合的促进作用可能主要是通过刺激溃疡底部肉芽组织中微血管的形成、刺激成纤维细胞增殖等途径来实现的。有研究证实黄芪建中汤可通过激活 bFGF 基因,增加 bFGF 表达,从而刺激上皮移行、增生,刺激成纤维细胞增生和细胞外基质形成,促进结缔组织形成和新生血管生成来促进溃疡愈合的<sup>[8]</sup>。

在本研究中笔者发现模型组大鼠溃疡部位 bFGF 及其受体 bFGFR 蛋白表达水平与正常组比较显著下降(分别为  $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ ),而给予蒙族药阿给炭治疗后 bFGF 及其受体 bFGFR 蛋白表达显著提高,bFGF 及其受体 bFGFR mRNA 表达也显著提高(与模型组比较,均  $P < 0.01$ ),表明通过上调模型大鼠溃疡部位 bFGF 及其受体 bFGFR 蛋白是在转录水平和后转录水平,进而促进溃疡部位微血管生成与肉芽组织生长,这可能是蒙族药阿给炭促进溃疡愈合的机制之一。

[参考文献]

- [1] 张婉,唐丽,谢坤,等. 蒙族药阿给炭工艺的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2008, 19(11):2587-2588.
- [2] 刘良,王建华,邵庭荫,等. 大鼠束缚水浸应激性胃溃疡模型的实验控制[J]. 中国药理学通报, 1988, 4(4):246-248.
- [3] 李成军,王丽萍,夏立,等. 大鼠乙酸胃溃疡愈合过程中 EGF 和 VEGF 对胃黏膜组织形态的影响[J]. 医学研究杂志, 2010, 39(8):56-59.
- [4] 贺建华,李淑芳. 血管内皮生长因子在胃溃疡愈合中的内源性变化的研究[J]. 中国医药导报, 2007, 4(18):130-131.
- [5] 汤丽芬,徐升,许祖建,等. 黄芪建中汤对胃黏膜损伤模型大鼠 VEGF 表达的影响[J]. 中国中医药科技, 2011, 18(2):100-103.
- [6] Szebenyi G, Fallon J F. Fibroblast growth factors as multifunction signaling factors [J]. Int Rev Cytology, 1999, 185:445-506.
- [7] 贺建华,罗和生. 碱性成纤维细胞生长因子在胃溃疡愈合中的表达及意义[J]. 世界华人消化杂志, 2003, 11(1):61-64.
- [8] 陈垣毅. 黄芪建中汤加减对胃溃疡胃粘膜 bFGF 表达的影响[J]. 湖南中医杂志, 2005, 21,(6):13-15.

[责任编辑 周冰冰]

热烈祝贺中国中医科学院中药研究所屠呦呦研究员荣获

“2015年诺贝尔生理学或医学奖”

Congratulation to Youyou Tu on Her Receiving the 2015 Nobel

Prize in Physiology or Medicine