

螺旋藻多糖对胃溃疡大鼠胃黏膜的修复作用 及对 EGF 和 EGFR 表达的影响

隋璐*, 刘坤, 沈薇, 郝伟
(沈阳医学院 基础医学院, 沈阳 110034)

[摘要] 目的:观察螺旋藻多糖(PSP)对胃溃疡大鼠胃黏膜表皮生长因子(EGF)及表皮生长因子受体(EGFR)表达及溃疡愈合质量的影响,探讨其治疗胃溃疡的作用机制。方法:采用乙酸烧灼法制备实验性胃溃疡大鼠模型,给予高、低两个剂量的 PSP 干预治疗 15 d 后取材,HE 染色观察胃黏膜厚度、黏膜肌层缺损度变化;免疫组化观察胃溃疡大鼠胃黏膜 EGF 及 EGFR 表达情况。结果:PSP 对胃溃疡黏膜有一定的修复作用,可使溃疡细胞破损减少,胃黏膜厚度、黏膜肌层缺损度与模型组比较均有显著性差异,免疫组化可见 PSP 使胃溃疡大鼠胃黏膜 EGF 及 EGFR 表达上调。结论:PSP 治疗胃溃疡的作用机制可能与增加 EGF 及 EGFR 蛋白表达上调促进溃疡愈合有关。

[关键词] 螺旋藻多糖;胃溃疡;黏膜肌层缺损度;表皮生长因子;表皮生长因子受体

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)20-0162-04

[doi] 10.11653/syfj2013200162

Effect of Polysaccharide from *Spirulina platensis* on Mucosal Repair by Regulating the Expression of EGF and EGFR in Experimental Rats with Gastric Ulcer

SUI Lu*, LIU Kun, SHEN Wei, HAO Wei

(Department of Pathophysiology, Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China)

[收稿日期] 20130504(013)

[基金项目] 辽宁省教育厅科学技术研究项目(L2010548);沈阳市科学技术项目(F-13-318-1-45)

[通讯作者] *隋璐, 硕士, 副教授, 主要从事消化系统疾病的研究, Tel:024-62215681, E-mail:398722812@qq.com

- [10] Ju D, Sun D, Xiu L, et al. Interleukin-8 is associated with adhesion, migration and invasion in human gastric cancer SCG-7901 cells[J]. Medical Oncology, 2012, 29:91.
- [11] Fernando R I, Castillo M D, Litzinger M, et al. IL-8 signaling plays a critical role in the epithelial-mesenchymal transition of human carcinoma cells[J]. Cancer Res, 2011, 71 (15):5296.
- [12] Pine S R, Mechanic L E, Enewold L, et al. Increased levels of circulating interleukin 6, interleukin 8, C-reactive protein, and risk of lung cancer[J]. J Natl Cancer Inst, 2011, 103 (14):1112.
- [13] Hoffmann J, Junker H, Schmieder A, et al. EGCG downregulates IL-1RI expression and suppresses IL-1-induced tumorigenic factors in human pancreatic adenocarcinoma cells[J]. Biochem Pharmacol, 2011, 82(9):1153.
- [14] Bünger S, Haug U, Kelly F M, et al. Toward standardized high-throughput serum diagnostics: multiplex-protein array identifies IL-8 and VEGF as serum markers for colon cancer[J]. J Biomol Screen, 2011, 16 (9):1018.
- [15] 石海莲, 谢建群, 吴大正. 小檗碱对 AGS 细胞增殖和 IL-8 含量的影响[J]. 中药药理与临床, 2012, 28 (1):45.

[责任编辑 聂淑琴]

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the effect of polysaccharide from *Spirulina platensis* (PSP) on expression of epidermal growth factor (EGF) and EGF receptor (EGFR) in mucosa of experimental rats with gastric ulcer, and to study the possible mechanism for therapy of stomach ulcer. **Method:** The gastric ulcer in rats was induced by acetic acid burning and treated with low and high dose of PSP separately for 15 days, the gastric mucosal thickness and muscularis mucosa defect were observed by HE staining, and the expression of EGF and EGFR were detected by immunohistochemical staining. **Result:** The ulcer in treatment group healed well compared with model group and control group, high dose of PSP could promote the healing of gastric ulcer, reduce muscularis mucosa defect significantly ($P < 0.01$), increased the expression of EGF and EGFR observably. **Conclusion:** There is evident therapeutic effect of PSP on the experimental gastric ulcer in rats, and its mechanism might be related to the increasing EGF and EGFR protein expression.

[**Key words**] PSP; gastric ulcer; muscularis mucosa defect; EGF; EGFR

螺旋藻多糖 (polysaccharide from *Spirulina platensis*, PSP) 是从螺旋藻培养液中提取分离出来的主要成分之一,具有促进细胞生长、提高免疫力、抗肿瘤、抗辐射、抗衰老、对核酸内切酶活性和 DNA 修复合成有增强作用等功能的重要天然生物活性物质。已有报道显示 PSP 具有广泛的药理作用,临床用于糖尿病、高血压、抗贫血、抗癌的辅助治疗药物。近有报道螺旋藻多糖有抗溃疡作用,但其对溃疡的修复和治疗作用机制尚不完全清楚^[1]。

本实验通过研究螺旋藻多糖对大鼠胃黏膜细胞表皮生长因子 (EGF)、表皮生长因子受体 (EGFR) 表达的影响,进一步探讨其对乙酸诱发性胃溃疡大鼠胃黏膜的损伤修复与保护机制,为开发抗溃疡药物提供前期实验基础。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 Wistar 大鼠 50 只,体重为 200 ~ 230 g,雌雄各半,由沈阳医学院实验动物研究中心提供,动物合格证号:SCXK(辽)2010-0001。

1.2 试剂 螺旋藻多糖(由沈阳医学院化学教研室提供,采用高效凝胶渗透色谱法测定,纯度为 84.1%);奥美拉唑(哈药集团诺捷有限公司提供,药品批号 H20094032),给药前需加蒸馏水配成混悬液;EGF 检测试剂盒(米联瑞试剂上海分公司提供,批号 20101120);EGFR 检测试剂盒(福州迈新生物公司提供,批号 RMA-0554)。

1.3 仪器 BA200 型生物数码显微镜, Motic Images Advanced 3.2 图像分析软件(均为厦门麦克奥迪实业集团有限公司),SYD-K4080 恒温冷冻切片仪(沈阳誉德电子仪器有限公司),Hyl002 微量移液器(北京鸿跃创新科技有限公司)。

2 方法

2.1 乙酸烧灼胃溃疡模型的建立^[2] 选取 Wistar

大鼠,雌雄各半。实验前禁食不禁水 12 h,正常对照组除外,其他各组大鼠均按照文献方法^[3]用戊巴比妥钠($30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) ip 麻醉。将麻醉后大鼠仰卧位固定于大鼠手术台上,腹部剪毛,常规碘伏消毒腹部,在胸骨剑突下沿腹中线稍左分层切开腹壁约 3 cm 左右,将胃小心移出腹腔,用浸有 100% 冰醋酸直径约 5 mm 圆形滤纸贴与胃前壁窦体交界近幽门处浆膜面上,注意避开血管,大约 30 s 后取下再重复贴 1 次。用干净滤纸吸干残留在胃壁表面的冰醋酸,再用生理盐水冲洗,用网膜覆盖冰醋酸涂抹面后将胃送入腹腔,缝合切口,碘伏消毒保护切口,放回笼中正常饲养。

2.2 分组与给药 按完全随机的方法将 50 只大鼠分成 5 组,每组 10 只,分别为:空白对照组,适量生理盐水 ig;胃溃疡模型组,造模手术后以生理盐水 ig;PSP 低、高剂量组($200, 400 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$);奥美拉唑治疗组($1.8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。于造模手术后第 2 天开始各组分别每天一次 ig 给药,连续 ig 给药 15 d。于末次给药后禁食不禁水 12 h,第 16 天大鼠脱颈处死,打开腹腔结扎幽门、贲门,摘取全胃。

2.3 标本处理与免疫组化染色 沿胃大弯将胃剪开后倾出胃内容物,用生理盐水冲洗干净,将剪开胃平铺在平板上,以溃疡瘢痕最长径为中心取材,切取溃疡边缘约 3 mm 组织块大小约 $1.0 \text{ cm} \times 1.2 \text{ cm}$ (正常组取胃前壁近幽门处组织),然后用 10% 中性甲醛固定,常规梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,制成厚度为 $4 \mu\text{m}$ 连续切片备用。

常规 HE 染色,免疫组化染色方法按试剂盒说明书进行。一抗分别滴加兔抗 EGF、EGFR (浓度均为 1:100 稀释);滴加生物素化二抗(山羊抗兔 IgG);阴性对照以 PBS 代替一抗,已知阳性片做阳性对照。

2.4 观察指标

2.4.1 再生黏膜厚度及黏膜肌层缺损宽度测定 在 HE 染色片上,用 BA200 数码显微镜低倍镜找到溃疡部位,在高倍镜下 ($\times 400$) 观察,取 5 个视野, Motic-Image-Advanced3.2 图像分析软件测量计算平均值。

2.4.2 EGF 和 EGFR 的蛋白表达免疫组化法观察 在免疫组化染色片上,用 BA200 生物数码显微镜和图像采集系统观察 EGF 和 EGFR 的蛋白表达,结果判定:核膜、胞浆着棕黄色为阳性细胞。

2.5 统计学处理 SPSS 13.0 软件进行统计学分析,实验数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用两样本均数比较的 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异显著。

3 结果

3.1 大鼠再生胃黏膜厚度、黏膜肌层缺损度变化 PSP 低剂量组溃疡黏膜层缺损度未见明显修复,与模型组比较无显著性差异,PSP 高剂量组溃疡黏膜肌层缺损度有不同程度修复,与模型组比较有显著性差异, $P < 0.01$,其作用弱于奥美拉唑。见表 1。

3.2 免疫组化染色黏膜 EGF 蛋白表达情况 如图 1 所示,EGF 主要表达于胃黏膜壁细胞、颈部细胞的胞质中。与对照组相比,模型组 EGF 表达显著减

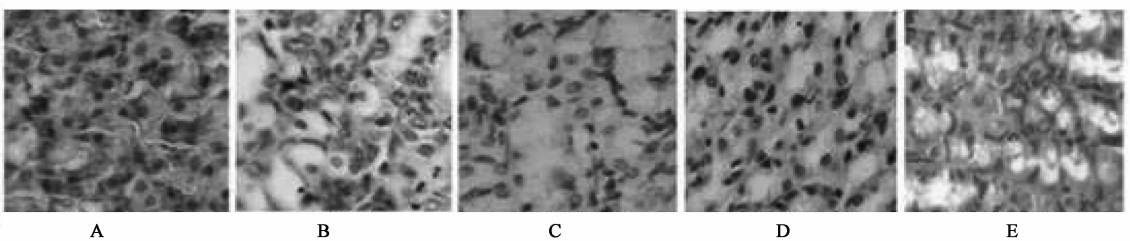
少, $P < 0.01$;与模型组相比,PSP 低剂量组 EGF 表达无明显变化,PSP 高剂量组与奥美拉唑组 EGF 表达均显著增加, $P < 0.01$ 。免疫组化灰度值结果见表 2。

表 1 PSP 对胃溃疡大鼠再生黏膜厚度、黏膜肌层缺损宽度影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	再生黏膜 厚度	黏膜肌层 缺损度
对照	-	425.86 ± 21.23	-
模型	-	250.04 ± 23.28 ¹⁾	360.34 ± 23.14
奥美拉唑	1.8	410.81 ± 31.97 ²⁾	247.46 ± 28.53 ²⁾
PSP	400	383.52 ± 32.11 ²⁾	298.70 ± 31.12 ²⁾
	200	289.04 ± 22.82 ¹⁾	313.72 ± 33.08

注:与对照组比较¹⁾ $P < 0.01$;与模型组比较²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.3 免疫组化染色黏膜 EGFR 表达情况 如图 2 所示,EGFR 主要表达于胃黏膜壁细胞、颈部细胞的胞浆及胞膜。与对照组相比,模型组 EGFR 表达显著减少, $P < 0.01$;与模型组相比,PSP 低剂量组 EGF 表达无明显变化,PSP 高剂量组与奥美拉唑组 EGFR 表达均显著增加, $P < 0.01$ 。免疫组化灰度值结果见表 2。



A. 正常对照组;B. 模型组;C. 奥美拉唑 1.8 mg·kg⁻¹组;D. PSP 400 mg·kg⁻¹组;E. PSP 200 mg·kg⁻¹组(图 2 同)

图 1 PSP 对胃溃疡大鼠胃黏膜 EGF 表达的影响(免疫组化染色, $\times 400$)

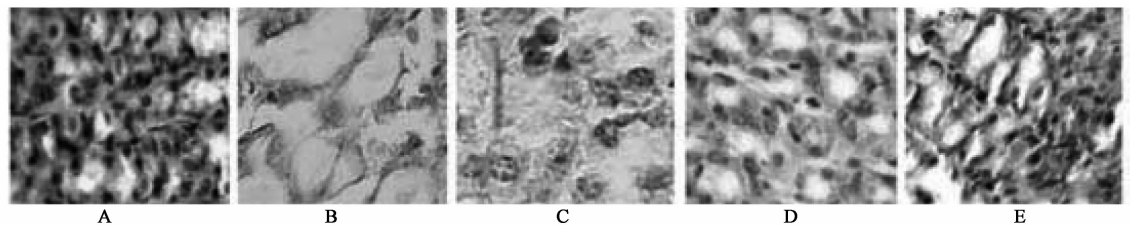


图 2 PSP 对胃溃疡大鼠胃黏膜 EGFR 表达的影响(免疫组化染色, $\times 400$)

4 讨论

消化性溃疡是内科常见病之一,治疗消化性溃疡的目标是减少攻击因子和增强防御因子。EGF 是一种促进溃疡愈合的重要调节因子,广泛地存在消化道内,在保护胃黏膜免受损伤因子破坏、调节黏膜上皮的更新,同时维持胃肠黏膜完整性方面起着

非常重要的作用。而其要发挥生理功能必须与其受体 EGFR 结合,结合后可以刺激上皮细胞的增殖和迁移,参与黏膜的修复和溃疡的愈合^[4]。目前研究表明,EGF 主要通过以下几种途径起到保护胃肠黏膜的作用:EGF 能显著抑制胃泌素和组胺促壁细胞分泌胃酸作用;EGF 能与其他胃肠因子协同作用参

表 2 PSP 对溃疡大鼠胃黏膜组织 EGF 及 EGFR 蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	平均灰度值	
		EGF	EGFR
对照	-	166.75 ± 4.28	170.37 ± 6.34
模型	-	170.34 ± 6.71 ¹⁾	173.42 ± 6.38 ¹⁾
奥美拉唑	1.8	155.09 ± 6.51 ²⁾	160.58 ± 7.34 ²⁾
PSP	400	159.31 ± 7.28 ²⁾	163.72 ± 5.78 ²⁾
	200	169.55 ± 5.52 ¹⁾	172.52 ± 5.32 ¹⁾

与胃酸分泌的调节^[5],是能起到组织修复和细胞保护作用的内源性物质;EGF 可通过保护黏膜微血管、增加胃黏膜的血流量及改善微循环,或者作为一种调节溃疡愈合的中介因子对胃黏膜的再生和保护起作用^[6];EGF 能有效维持消化道黏膜表面黏液/碳酸氢盐屏障的存在,防止胃酸、胃蛋白酶、微生物、胆盐等攻击因子对胃肠黏膜屏障的侵袭,维持其完整性^[7-8]。EGFR 是一种跨膜糖蛋白,其具有络氨酸激酶活性,与 EGF 有高度的亲和力。当 EGF 与细胞膜上其特异性受体 EGFR 结合后,诱导其变构,受体膜上的酪氨酸蛋白激酶被激活,通过自分泌或旁分泌生长因子来诱导 EGFR 磷酸化,调节细胞增殖与分化,发挥了黏膜修复和重建的功能^[9]。因此,EGF 和 EGFR 的检测可以作为评价消化性溃疡愈合质量的一个非常重要的指标。

本实验通过观察免疫组化图片发现,PSP 高剂量组与奥美拉唑组 EGF、EGFR 表达均为较强阳性,盐水对照组表达呈弱阳性,二者的表达具有同步性,而阳性表达主要见于胃黏膜壁细胞和颈部细胞内,在壁细胞内的表达增多,为 EGF 具有抑制胃酸分泌的作用提供了可靠的理论依据,从而提示 PSP 能同时增加溃疡大鼠 EGF 与 EGFR 蛋白表达作用,通过 EGF 与 EGFR 的有效结合,提高胃溃疡黏膜的修复能力。当胃溃疡大鼠经 PSP 治疗后其胃黏膜厚度增加、黏膜肌层缺损度缩小,作用与奥美拉唑相近。由此可见,PSP 对溃疡黏膜的修复作用是通过促进

胃溃疡黏膜 EGF 及 EGFR 表达平行上调,进而刺激溃疡边缘愈合带上皮细胞的增殖、分化、移行,增加黏膜血流量,增强胃黏膜屏障功能,增加溃疡修复功能,提高溃疡愈合质量来完成的。因此,PSP 抗溃疡作用机制与上调 EGF 与 EGFR 蛋白表达有关。而胃溃疡的发生与发展是一个复杂的病变过程,与多种因素有关,因此 PSP 抗溃疡及促进溃疡愈合的分子作用机制还有待于进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 刘晋,郭长江,刘嘉喜.等.海藻多糖免疫调节作用的研究进展[J].微生物学通报,2007(5):49.
- [2] 徐叔云,卞如濂,陈修,等.药理实验方法学[M].3版.北京:人民卫生出版社,2002:1332.
- [3] 陈志东.消化性溃疡模型在研究新药中的作用[J].现代中西医结合杂志,2006,15(15):2137.
- [4] 贺建华.生长因子在消化性溃疡愈合中的作用[J].国外医学:消化系统疾病分册,2003,23(1):12.
- [5] 胡素敏,张小萍,谢斌,等.张氏益胃汤对乙酸性胃溃疡大鼠生长因子的影响[J].江西中医学院学报,2010,22(5):64.
- [6] 刘建平,卜涛,白建乐,等. EGF、TGF- α 及 EGFR 在大鼠胃溃疡自愈过程中的表达及意义[J].中国药理学通报,2003,19(10):1185.
- [7] 赵雷,张博男,白静,等.郁金煎剂对实验性胃溃疡的保护作用[J].时珍国医国药,2011,22(6):1446.
- [8] Konlurek P C, Konlurek S J, Brzozowski T, et al. Epidermal growth and transforming growth factor-alpha role in prottbn and healing of gasttic mucosal lesions [J]. Eur J Gastroenterol Hepayol,1995,7(10):933.
- [9] Burke C L, Stern D F. Activation of neu (ErbB-2) mediated by disulfide bond-induced dimerization reveals a receptor tyrosine kinase dimer interface[J]. Mol Cell Biol, 1998,18:5371.

[责任编辑 聂淑琴]