

# 溃疡平对阿司匹林诱导的复发胃溃疡大鼠胃黏膜组织中 VEGF 和 Flt-1 mRNA 表达的影响

赵堃, 赵红晔, 牛淑冬, 王滨\*

(齐齐哈尔医学院生理教研室, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

**[摘要]** 目的:以非甾体类抗炎药物阿司匹林所致胃溃疡复发大鼠为模型,探讨溃疡平抗胃溃疡复发的机制。方法:以 Okeba 改良法复制大鼠实验性胃溃疡,ig 阿司匹林制作复发模型,采用 RT-PCR 法观察溃疡平  $5.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ ,连续 ig 14 d 对胃溃疡组织血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) mRNA 表达的影响。结果:溃疡平组 VEGF mRNA 和 VEGF 受体(Flt-1) mRNA 的表达较复发组显著增高( $P < 0.01$ )。结论:溃疡平可提高胃黏膜中 VEGF 和 Flt-1 mRNA 的表达,从而增加黏膜中微血管通透性,将胃内有害物质稀释,并且刺激黏膜中腺体和血管的生成,达到保护胃黏膜的作用。这可能是溃疡平促进胃溃疡愈合,减少其复发的重要机制之一。

**[关键词]** 溃疡平; 胃溃疡复发; 血管内皮生长因子 mRNA; 实时 PCR

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)20-0267-03

## Effect of Kuifyangping on Expression of VEGF and Flt-1 mRNA in Gastric Mucosa of Rats with Aspirin-induced Gastric Ulcer Recurrence

ZHAO Kun, ZHAO Hong-ye, NIU Shu-dong, WANG Bin\*

(Department of Physiology, Qiqihar Medical University, Qiqihar 161006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the anti-ulcer recurrence mechanism of Kuifyangping through establishing experimental chronic ulcer model. **Method:** Okeba modified method was used to establish gastric ulcer model in rats by administering intragastrically with aspirin once a day. Kuifyangping of  $5.60 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  was administrated for 14 days. The RT-PCR method was used to detect the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor Flt-1 mRNA in the gastric mucosa surrounding ulcer. **Result:** Kuifyangping could increase the expression of VEGF and Flt-1 mRNA in the gastric mucosa surrounding ulcer (compared with recurrence group,  $P < 0.01$ ). **Conclusion:** Kuifyangping could decrease the gastric ulcer recurrence induced by aspirin. The effective mechanisms might be related to the enhancement of the expression of VEGF and Flt-1 mRNA, the increase in microvascular permeability, and the promotion of vasculogenesis in the gastric mucosa surrounding ulcer.

**[Key words]** Kuifyangping; gastric ulcer recurrence; VEGF mRNA; RT-PCR

胃溃疡(gastric ulcer, GU)是一种多发病。GU 的发生主要是胃黏膜的攻击因子与保护因子之间失衡所致,近几年西医通过运用  $\text{H}_2$  受体阻滞剂和质

子泵抑制剂,以及根除幽门螺旋杆菌(Hp)等治疗手段能较快促进 GU 愈合,但仍无法有效防止其复发<sup>[1]</sup>。中医药对胃溃疡不仅有较好的近期疗效,而

**[收稿日期]** 20120629(425)

**[基金项目]** 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12511629)

**[第一作者]** 赵堃,医学硕士,讲师,从事溃疡机制和抗溃疡药物研究, Tel:0452-2663183, E-mail:5188681@qq.com

**[通讯作者]** \*王滨,医学博士,教授,从事溃疡机制和抗溃疡药物及高血压分子遗传学研究, Tel:0452-2663183, E-mail:wangbinqqrhmc@yahoo.com.cn

且对溃疡的复发也有一定的干预作用。中医中药是消化性溃疡治疗的重要方面,中药治疗溃疡通过整体调节来实现对局部病变的修复<sup>[2]</sup>。

我们的前期工作发现,溃疡平能促进胃溃疡愈合<sup>[3-6]</sup>,但未探及其对胃溃疡复发的影响。本研究观察了溃疡平对阿司匹林诱导的复发胃溃疡大鼠胃黏膜组织中 VEGF 和 Flt-1 mRNA 表达的影响。

### 1 材料与方法

**1.1 动物** 雄性 Wistar 大鼠,体重 180 ~ 220 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,合格证 SCXK(京)2011-0001。

**1.2 药品与试剂** 溃疡平的主要药物为海螵蛸、鸡内金、元胡、浙贝母、乳香、没药、甘草等,药物均购自北京同仁堂药店,经水煎浓缩而成,含原生药 560 g·L<sup>-1</sup>。盐酸雷尼替丁胶囊(大连美罗中药厂有限公司,批号 20110305),加生理盐水配成 2.83 g 的混悬液;阿司匹林片(石家庄康力药业有限公司,批号 110414),加生理盐水配成 4 g·L<sup>-1</sup>;VEGF, Flt-1,  $\beta$ -actin 引物: TAKARA 公司合成, PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒: TAKARA 公司提供。

**1.3 分组与给药** 将 32 只大鼠采用 Okeba 法<sup>[7]</sup>复制成胃溃疡模型大鼠,然后随机分成未复发组、复发组、溃疡平组和盐酸雷尼替丁组 4 组,每组 8 只。溃疡平组 ig 溃疡平药液 5.60 g·kg<sup>-1</sup>,盐酸雷尼替丁组 ig 盐酸雷尼替丁药液 2.83 × 10<sup>-2</sup> g·kg<sup>-1</sup>,未复发组及复发组 ig 等量生理盐水,连续 14 d,停药 14 d 后,参照王国忠等<sup>[8]</sup>的方法复制大鼠胃溃疡复发模型。复发组、溃疡平组和盐酸雷尼替丁组均 ig 阿司匹林药液 4 × 10<sup>-2</sup> g·kg<sup>-1</sup>,1 次/d,以诱导胃溃疡复发;未复发组以等量生理盐水 ig,连续 30 d。末次灌服后,禁食(不禁水)24 h,颈椎脱臼法处死大鼠,剖开腹腔,将贲门、幽门端用线结扎,然后取出胃置于滤纸上,用剪刀沿胃大弯剪开,用冰生理盐水反复冲洗干净后,各组沿溃疡周围切下约 1 cm × 1 cm 大小的胃壁,迅速放入液氮中冷冻保存。

**1.4 胃黏膜中 VEGF mRNA 和 Flt-1 mRNA 表达的测定** 取保存于液氮中的胃壁组织,用 RT-PCR 方法检测胃黏膜组织 VEGF 和 Flt-1 mRNA 的表达。

采用 PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒,按照说明书提示严格操作。见表 1。

反应结束后,使用 Sequence Detection software version 1.2.3 软件(Applied Biosystems 公司)分析 PCR 过程各检测样本的阈循环(Threshold cycle,

表 1 各目的基因的引物序列、产物大小

基因	引物	片段/bp
VEGF	forward 5'-TGGACCTGGCTTTACTGCTG-3'	127
	reverse 5'-TGGGATAGCCCAATCCGAGA-3'	
Flt-1	forward 5'-TATGCCTGCAGAGCCAGGAAC-3'	136
	reverse 5'-TCGTGGAGCCACTGATGGAC-3'	
$\beta$ -actin	forward 5'-GAGGGAAATAGTGCCTGAC-3'	445
	reverse 5'-CTGGAAGCTGGACAGTGAG-3'	

$C_T$ ),阈循环值随模板浓度增大而减少。每个样本均设 2 个复孔,内参照基因亦设 2 个复孔,取 2 个复孔  $C_T$  值的平均值进行计算。采用 2<sup>- $\Delta\Delta C_T$</sup>  方法<sup>[9]</sup>分析 VEGF 和 Flt-1 的 mRNA 表达水平。

$$\Delta C_T = C_T \text{ 目的基因} - C_T \beta \text{ actin}$$

$$\Delta \Delta C_T = \Delta C_T \text{ 干预组} - \Delta C_T \text{ 空白对照组}$$

**1.5 统计学处理** 应用 SPSS 13.0 统计分析软件,计量数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,用单因素方差分析,最小显著差法(Least significant difference, LSD)进行两两比较,双侧检验,以  $P < 0.05$  表示差别有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 对胃黏膜 VEGF mRNA 表达的影响** 与复发组比较,溃疡平和盐酸雷尼替丁组的 VEGF 表达量明显增高,表明溃疡平和盐酸雷尼替丁组的 VEGF mRNA 表达上调( $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ )。与盐酸雷尼替丁组相比,溃疡平组的 VEGF 表达量明显增高,表明溃疡平上调 VEGF mRNA 表达的作用强于盐酸雷尼替丁( $P < 0.01$ )。与未复发组相比,各组的 VEGF 表达量明显增高,表明 VEGF mRNA 表达上调( $P < 0.01$ )。见表 2。

**2.2 对胃黏膜 Flt-1 mRNA 表达的影响** 与复发组比较,溃疡平组 Flt-1 表达量明显增高,表明溃疡平组 Flt-1 mRNA 表达上调( $P < 0.01$ )。与盐酸雷尼替丁组相比,溃疡平组 Flt-1 表达量明显增高,表明溃疡平上调 Flt-1 mRNA 表达的作用强于盐酸雷尼替丁( $P < 0.01$ )。与未复发组相比,溃疡平和盐酸雷尼替丁组的 Flt-1 表达量明显增高,表明 Flt-1 mRNA 表达上调( $P < 0.01$  和  $P < 0.05$ )。见表 3。

## 3 讨论

随着溃疡病治疗药物的进展,GU 的近期愈合已不成问题,但常规抗酸治疗愈合的溃疡,停药后一年复发率可接近 60%<sup>[10]</sup>,深入研究 GU 复发有着重要的理论和临床意义。而非甾体抗炎药可破坏胃黏膜屏障,抑制前列腺素合成,失去对胃黏膜保护而导致溃疡复发。GU 的复发与修复是一个十分复杂的过程,其修复过程不仅需要黏膜缺失的填充,而且需要黏膜下组织结构重建,是多种细胞、生长因子及细

表 2 诱发 30 d 各组大鼠胃黏膜 VEGF mRNA 的表的比较( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	VEGF $C_T$	$\beta$ -actin $C_T$	$\Delta C_T$ (VEGFC <sub>T</sub> - $\beta$ -actin $C_T$ )	$\Delta \Delta C_T$ ( $\Delta C_T$ - $\Delta C_T$ 复发组)	相对于复发组的 VEGF 表达量
未复发	-	28.62 ± 0.34	20.49 ± 0.28	8.13 ± 0.44	1.22 ± 0.44	0.4(0.3 ~ 0.6) <sup>2)</sup>
复发	-	27.43 ± 0.25	20.52 ± 0.40	6.91 ± 0.47	0.00 ± 0.47	1.0(0.7 ~ 1.4)
溃疡平	5.60	25.52 ± 0.25	20.54 ± 0.35	4.98 ± 0.43	-1.93 ± 0.43	3.8(2.8 ~ 5.1) <sup>2)</sup>
盐酸雷尼替丁	2.83 × 10 <sup>-2</sup>	26.90 ± 0.40	20.48 ± 0.31	6.42 ± 0.51	-0.49 ± 0.51	1.4(1.0 ~ 2.0) <sup>1)</sup>

注:与复发组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ , <sup>2)</sup>  $P < 0.01$ (表 3 同)。

表 3 诱发 30 d 各组大鼠胃黏膜 Flt-1 mRNA 的表达比较( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

组别	剂量/ $g \cdot kg^{-1}$	Flt-1 $C_T$	$\beta$ -actin $C_T$	$\Delta CT$ (Flt-1 $C_T$ - $\beta$ -actin $C_T$ )	$\Delta \Delta CT$ ( $\Delta C_T$ - $\Delta C_T$ 复发组)	相对于复发组的 Flt-1 表达量
未复发	-	27.75 ± 0.33	20.41 ± 0.37	7.34 ± 0.50	0.39 ± 0.50	0.8(0.5 ~ 1.1)
复发	-	27.47 ± 0.27	20.52 ± 0.23	6.95 ± 0.35	0.00 ± 0.35	1.0(0.8 ~ 1.3)
溃疡平	5.60	26.41 ± 0.41	20.53 ± 0.26	5.88 ± 0.49	-1.07 ± 0.49	2.1(1.5 ~ 2.9) <sup>2)</sup>
盐酸雷尼替丁	2.83 × 10 <sup>-2</sup>	27.06 ± 0.26	20.42 ± 0.31	6.64 ± 0.40	-0.31 ± 0.40	1.2(0.9 ~ 1.6) <sup>1)</sup>

胞外基质相互作用的结果。研究表明 VEGF 在溃疡的修复中起着重要的作用<sup>[11]</sup>,可促进微血管和结缔组织再生,它是目前作用最强、研究最多和特异性最高的血管新生调控因子。在一些血供丰富、代谢旺盛的组织中,由于血管生成和生长发育的需要,VEGF 的表达水平往往较高。VEGF 受体(VEGFR)发现有 3 种类型,分别为 KDR, Flt-1, Flt-4, 其中 KDR, Flt-1 主要表达在血管内皮细胞。实验发现,缺乏 Flt-1 受体,将会造成血管形成障碍。在慢性胃溃疡愈合过程中和胃黏膜保护方面 VEGF 起着双重作用<sup>[12]</sup>,既通过稀释胃内有害物质和增加微血管的通透性来保护胃黏膜,又通过刺激血管生成和腺体分泌来促进胃溃疡愈合。

本次实验表明,各组大鼠在用阿司匹林诱发 30 d 后,与复发组相比,溃疡平组 VEGF 和 Flt-1 mRNA 表达明显增强,提示溃疡平可上调胃黏膜组织中 VEGF 和 Flt-1 mRNA 的表达,且作用强于盐酸雷尼替丁。综上所述,溃疡平可能通过提高胃黏膜组织中 VEGF 和 Flt-1 的表达,增强血管内皮细胞的分化能力,增多黏膜血管形成,从而使胃黏膜上皮细胞更新能力大大增强,胃黏膜血流显著增多,促进结缔组织、腺体和微血管再生,促进黏膜上皮增殖、黏膜组织修复和保护细胞的作用,防止胃溃疡的复发。

#### [参考文献]

- [1] 贾欣,冯永,耿菲,等. 普胃丸对复发胃溃疡大鼠抗氧化及改善胃黏膜血流的作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(5):183.
- [2] 申定珠,李家邦,蒋荣鑫,等. 健胃愈疡颗粒对乙酸性胃溃疡复发大鼠作用的蛋白质组学研究[J]. 中医杂

- 志,2010,48(6):545.
- [3] 王滨,赵红晔,赵堃,等. 溃疡平对大鼠乙酸胃溃疡愈合质量的影响[J]. 中国中医药科技,2011,18(6):封3.
- [4] 王滨,赵红晔,周丽,等. 溃疡平对胃溃疡大鼠胃黏膜组织中 EGF 和 EGFR mRNA 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报,2008,31(11):759.
- [5] 朱立革,曹军,赵红晔,等. 溃疡平对胃溃疡大鼠胃黏膜组织中 VEGF 和 Flt-1 mRNA 表达的影响[J]. 北京中医药大学学报,2010,33(7):476.
- [6] 赵红晔,曹军,王月飞,等. 溃疡平对乙酸性胃溃疡大鼠胃黏膜血流量及血清 ET-1, NO 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(17):213.
- [7] Okabe S, Roth J L, Pfeiffer C J. A method for experimental, penetrating gastric and duodenal ulcers in rats. Observations on normal healing [J]. Am J Dig Dis,1971,16:277.
- [8] 王国中. 阿司匹林引起大鼠乙酸胃溃疡复发及其机制[D]. 杭州:浙江大学博士论文,2007:35.
- [9] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup> $\Delta\Delta C_T$  Method [J]. Methods,2001,25(4):402.
- [10] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 12 版. 北京:人民卫生出版社,2005:1866.
- [11] 白静,姜妍,贾欣,等. 普胃丸对胃溃疡复发大鼠胃组织 VEGF 和 bFGF 表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(8):189.
- [12] Szabo S, Deng X, Khomenko T, et al. Gene expression and genetherapy in experimental duodenal ulceration [J]. J Physiol Paris,2001,95(1/6):325.

[责任编辑 何伟]