

萎胃康颗粒对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜上皮细胞 PCNA 和 EGFR 蛋白表达的影响

林海燕¹, 赵岩^{1*}, 于佳宁²

(1. 滨州医学院中西医结合学院, 山东 烟台 264003;

2. 滨州医学院烟台附属医院, 山东 烟台 264100)

[摘要] **目的:**探讨萎胃康颗粒对大鼠慢性萎缩性胃炎(CAG)的治疗作用及其机制。**方法:**90只SD大鼠随机取出18只为正常对照组,其余鼠造模后随机分为4组,模型组、萎胃康高、低剂量组、三九胃泰组均采用多重刺激复制大鼠CAG模型。在造模成功后分别ig萎胃康 $6, 3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,三九胃泰 $1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,0.9%的生理盐水 $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。用药30d后HE染色、透射电镜观察大鼠胃黏膜萎缩情况,免疫组化法观察胃黏膜上皮细胞中增殖细胞核抗原(PCNA)和表皮生长因子受体(EGFR)的表达。**结果:**光镜和电镜下均显示,萎胃康高、低剂量组胃黏膜病理变化比模型组明显减轻。模型组PCNA标记指数44.96%和EGFR的平均吸光度(A) 0.183 ± 0.030 ,明显高于正常组PCNA标记指数29.30%和EGFR的A 0.125 ± 0.039 。萎胃康高、低剂量组PCNA标记指数分别为29.58%,29.97%,EGFR的A分别为 0.100 ± 0.023 , 0.104 ± 0.027 ,与模型组比较,表达降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。**结论:**中药萎胃康颗粒对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜有明显修复作用,其作用机制可能是通过抑制胃黏膜PCNA和EGFR的过度表达而抑制细胞增殖和恶性转化实现的。

[关键词] 慢性萎缩性胃炎;萎胃康;上皮细胞中增殖细胞核抗原;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(2012)17-0179-04

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20120704.1740.024.html>

[网络出版时间] 2012-07-04 17:40

Influences of Weiweikang Granule on PCNA, EGFR of Gastric in Rats with Chronic Atrophic Gastritis

LIN Hai-yan¹, ZHAO Yan^{1*}, YU Jia-ning²

(1. Binzhou Medical University, Yantai 264003, China;

2. Yantai Hospital Affiliated to Binzhou Medical University, Yantai 264100, China)

[Abstract] **Objective:** To study the influences of Weiweikang granule (WWKG) on the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), epidermal growth factor receptor (EGFR) of gastric mucosa with chronic atrophic gastritis (CAG), and evaluate the possible mechanisms. **Method:** Ninety SD rats were randomly divided into five groups. The high dose WWKG group, low dose WWKG group, Sanjiu Weitai granule (SJWTG) group and model group. The multiple stimulations were used to duplicate the CAG model. After modeled successfully, the high dose WWKG group, low dose WWKG group, SJWTG group and model group were intragastrically injected (ig) with WWKG at dose of 6, 3 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, and SJWTG at dose of 1.6 $\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively and normal saline (0.9%) at dose of 20 $\text{mL} \cdot \text{kg}^{-1}$. After 30 days, the rats' stomach mucous membrane atrophy situation was observed with the help of light microscopy and transmission electron microscopy and the expression of PCNA and EGFR were observed with immunohistochemical method. **Result:** The light microscopy and electron microscopy examination showed that the pathological changes of gastric mucosa in large dose WWKG

[收稿日期] 20110628(019)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072782);山东省科技发展计划项目(2011YD19012)

[通讯作者] * 赵岩,教授,E-mail:Elanzhouzy@163.com

group and small dose WWKG group were significantly milder than those in the model group. Compared with the control group, the expression of PCNA labeling index (LI 44.96%) and EGFR (average absorbance, 0.183 ± 0.030) in the model group was higher than the normal group (LI 29.30%, 0.125 ± 0.039) obviously ($P < 0.01$). Compared with the model group, the expression of PCNA and EGFR in large dose WWKG group (LI 29.58%, 0.100 ± 0.023) and small dose WWKG group (LI 29.97%, 0.104 ± 0.027) was significantly lower ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** WWKG can significantly repair gastric mucosa of rats with CAG and its mechanism may be actualized by decreasing the expression of PCNA and EGFR and restraining cell proliferation and malignant transformation.

[Key words] chronic atrophic gastritis; Weiweikang granule; PCNA; EGFR

慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 是临床常见病、多发病。1978 年 WHO 将 CAG 列为胃癌的癌前状态之一,特别是 CAG 伴肠上皮化生和(或)不典型增生,与胃癌的发生有着更为密切的关系,越来越受到医疗界的重视,为目前的研究热点。目前西医多采取抗酸剂、解痉剂、黏膜保护剂等处理。近年来中医对 CAG 发病机制的研究愈来愈重视,并取得了一定的进展。

经多年临床研究证实,萎胃康颗粒对 CAG 的疗效优于胃酶素,无明显副作用。我们前期的实验研究发现其可明显改善 CAG 大鼠胃黏膜萎缩情况^[1]。本实验进一步观察萎胃康颗粒对 CAG 大鼠胃黏膜上皮细胞中增殖细胞核抗原(PCNA)、表皮生长因子受体(EGFR)表达的影响。

1 材料

1.1 动物 SD 大鼠 90 只,SPF 级,雄性,体重 (200 ± 20)g,由山东烟台绿叶制药有限公司实验动物中心提供,许可证号 SCXK(鲁)20090001。

1.2 药物与试剂 萎胃康颗粒由西洋参、白术、白芍、三七、延胡索、熊胆、甘草按照 4:3:3:2:2:1:1 的比例组成,采用无机陶瓷膜微滤技术精制而成,由烟台大学医院制剂室制备;三九胃泰为三九医药公司生产,批号 Z44020705;水杨酸钠为国药集团化学试剂有限公司产品,批号 T20070226;PCNA 和 EGFR 兔抗鼠抗体、SP 试剂盒均为 Santa Cruz Biotech. Inc 产品,购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 仪器 Olympus-CH30 光学显微镜(日本),JEM-1400 型透射电镜(日本),CM1900 全自动石蜡组织切片机(德国),Olympus-4000ZOOM 数码相机(日本)。

2 方法

2.1 模型制备 CAG 模型参照文献[2]方法制备:2%水杨酸钠溶液 2 mL/次 ig,连灌 6 周;ig 前、后 1 h 禁食、禁水。前 3 周自由进食标准鼠饲料,进水;后

3 周单日禁食,自由饮水,双日足量喂食,自由饮水;隔日在温水中游泳 1 次,每次 10 min。

2.2 分组及给药 大鼠随机分为正常组 18 只,造模组 72 只。造模过程中动物死亡 2 只。造模结束后,随机抽取 6 只大鼠,处死,取胃经过常规病理学检查确定造模成功。将造模剩余 64 只动物按照随机数字表法分为模型组、萎胃康高、低剂量组、三九胃泰组,每组 16 只;正常对照组 18 只清洁自来水自由饮用,标准鼠饲料饲养,6 周后杀检 2 只与模型组对比,余 16 只。均予标准鼠饲料,同等环境与条件下饲养,自由饮水。每周测体重 1 次,确定给药量。萎胃康高剂量组 ig $6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (含生药 $0.3 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig);萎胃康低剂量组 ig $3 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (含生药 $0.15 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig);三九胃泰组 ig $1.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ (含生药 $0.08 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$, $20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ig);正常组、模型组 ig 0.9% 氯化钠 ($20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),均 1 次/d。

2.3 指标检测和方法 实验结束后,①每组中取 8 只大鼠,麻醉动物,迅速取出全胃,沿胃大弯剖开,用生理盐水冲洗,取胃小弯侧胃窦部,常规石蜡包埋,连续切片 3 张,切片厚 $5 \mu\text{m}$,1 张切片做 HE 染色,另 2 张切片做免疫组化染色。②每组中余 8 只大鼠进行心脏灌注固定。先灌注生理盐水(约 200 mL)至流出液体不见血色为止,接着灌注 4% 多聚甲醛 PBS 液(约 200 mL),当动物出现四肢抽搐,四肢变硬时,表示灌注完成。取胃窦部胃黏膜 $1 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$,迅速固定于 2% 多聚甲醛加 2.5% 戊二醛混合固定液内,置 4℃ 冰箱中固定 3 h,3 h,0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液充分漂洗,再用 1% 锇酸后固定 1.5 h,0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液充分漂洗,丙酮梯度脱水,Epon 812 包埋,标本经半薄切片,光镜定位后,再做超薄切片,厚度 70 nm,经醋酸铀和柠檬酸铅双重染色,透射电镜下观察。

免疫组化 SP 法检测 PCNA 和 EGFR 蛋白的表

达,严格按试剂盒方法操作。PCNA 结果用 PCNA 标记指数(LI)表示: $LI = \text{PCNA 阳性细胞数} / \text{计数细胞总数} \times 100\%$ 。在高倍镜下选取 5 个有代表性的视野,每个视野记数 100 个细胞,计算 PCNA 阳性细胞表达率。EGFR 结果用平均吸光度(A)表示,在相同的高倍镜($\times 400$)下,每张免疫组化切片随机将 5 个胃黏膜视野,用 Olympus-4000Z00M 数码相机照相(光亮度设定一致)用 Image-Pro Plus4.5 图像分析软件测其平均光密度,以其 5 个视野的均数作为每张切片 EGFR 的相对表达量。

2.4 统计学方法 所有资料均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 13.00 统计软件进行分析,组间进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 对 CAG 大鼠胃黏膜上皮细胞 PCNA, EGFR 蛋白表达的影响 PCNA 染色阳性物质呈棕黄色细颗粒状均匀分布,主要位于细胞核上,偶见于细胞浆中。EGFR 染色阳性部位主要在细胞膜和细胞质,呈棕黄色(图 1)。表 1 显示,模型组与与其他各组结果比较,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。萎胃康高、低剂量组与模型组比较,PCNA 和 EGFR 表达均显著减少($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

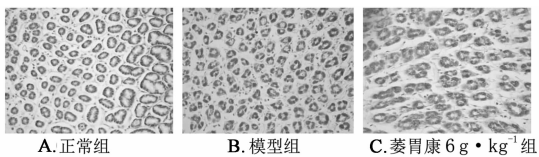


图 1 萎胃康颗粒对 CAG 大鼠胃黏膜上皮细胞 EGFR 表达的影响

表 1 各组大鼠胃黏膜上皮细胞 PCNA 和 EGFR 蛋白表达的比较($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	剂量 / $g \cdot kg^{-1}$	LI/%	EGFR 蛋白表达/A
正常	-	29.30	0.125 ± 0.039
模型	-	44.96 ³⁾	0.183 ± 0.030 ³⁾
萎胃康	6.0	29.58 ¹⁾	0.100 ± 0.023 ^{2,4)}
	3.0	29.97 ¹⁾	0.104 ± 0.027 ^{2,4)}
三九胃泰	1.6	39.63	0.151 ± 0.069

注:与模型组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与正常组比较³⁾ $P < 0.01$;与阳性对照组比较,⁴⁾ $P < 0.05$ 。

3.2 对 CAG 大鼠胃黏膜影响的光镜观察 正常对照组:胃黏膜厚度大,上皮完整,上皮细胞排列整齐,无脱落或缺损,细胞呈单层柱状,腺上皮与腺管分界清楚,固有膜腺体形状规则(图 2A);模型组:胃黏

膜层变薄,不完整,可见不同程度的变性或坏死的脱落细胞,腺体不同程度的萎缩或消失,间质有多种炎性细胞(主要为淋巴细胞和浆细胞)浸润(图 2B);萎胃康高剂量组:上皮细胞相对完整,细胞形态正常,腺体排列稍欠规整。肌层逐渐增厚,厚薄较均匀。表层黏膜无脱落,腺体无明显萎缩;胃窦部、前胃与胃交界处固有膜中的炎细胞浸润显著减少。固有膜水肿、血管扩张较模型组改善(图 2C)。三九胃泰组:胃黏膜,黏膜层较模型组增厚,炎细胞浸润有所减少,但腺体仍有萎缩(图 2D)

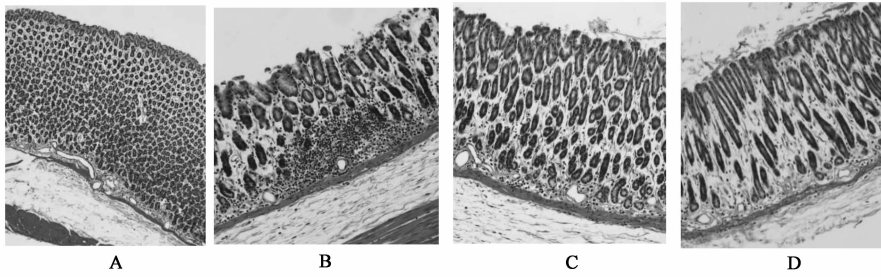
3.3 对 CAG 大鼠胃黏膜影响的电镜观察 正常对照组:胃黏膜上皮细胞呈高柱状,排列较规则紧密。腺体丰富,腺腔规则,各类细胞内细胞器均较丰富。表面黏液细胞顶端可见大量电子密度高的黏原颗粒,相邻细胞间缝隙较小,侧壁皱褶较多,有许多指状突起相互嵌合,游离面可见连接复合体结构(图 3A)。模型组:腺体萎缩、减少,腺腔不规则,细胞间距增大,腺细胞胞质内细胞器减少。表面黏液细胞分泌颗粒亦减少并出现空泡化,电子密度较低。间质内可见大量炎症细胞(图 3B)。萎胃康高、低剂量组腺细胞形态较正常,胞质内细胞器较发达,腺上皮基底膜连续完整。表面黏液细胞与正常对照组相似,细胞内黏原颗粒丰富,上皮细胞之间的紧密连接良好,间质内可见少量炎症细胞。电镜下两组间无明显差别(图 3C)。三九胃泰组腺体减少,腺腔有变形,细胞间隙较大,基膜较完整。表面黏液细胞与正常组相似,细胞内黏原颗粒减少,电子密度降低,上皮细胞之间的紧密连接良好,间质内可见炎症细胞(图 3D)。

4 讨论

CAG 属中医学“胃脘痛”、“痞满”等范畴。病位在胃,与肝、脾两脏关系密切。病变初期以湿热阻滞、气郁不畅为主,久则脾胃气阴受损,或脾气虚弱或胃阴损伤,进一步发展可因气不行血,或阴不荣络致胃络血瘀。据此,笔者确立了补脾健胃、益气养阴、理气活血之组方原则。组方在辨证论治的基础上又结合中药药理学研究成果,疗效确切。

PCNA 又称为周期蛋白,存在于细胞核内,是 DNA 多聚酶 δ 的一种助因子,直接参与细胞 DNA 复制,是细胞增殖的一种标志,能确切反映细胞的生长速度及状态,对胃癌癌前病变的诊断、分级、指导治疗、预后判断有实用价值^[3,4]。

EGFR 是癌基因 c-erbB-1 的表达产物,一旦表达异常则可使细胞过度增生,而此种过度增生的细



A. 正常组; B. 模型组; C. 姜胃康 6.0 g·kg⁻¹组; D. 三九胃泰 1.6 g·kg⁻¹组(图 3 同)

图 2 姜胃康颗粒对 CAG 大鼠胃黏膜病变的影响(HE, ×400)

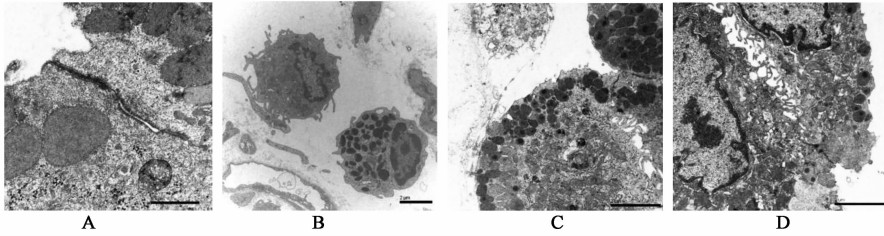


图 3 姜胃康颗粒对 CAG 大鼠胃黏膜超微结构的影响(透射电镜, Bar = 2 μm)

胞易发生变异并可逐步向恶性表型转化。EGFR 不同程度的表达,可能调节和刺激细胞增殖,促进有丝分裂并向癌发展^[5-6]。

本实验中观察到模型组 PCNA 阳性细胞标记指数和 EGFR 表达较正常组明显增强,经姜胃康治疗后,PCNA 阳性细胞标记指数和 EGFR 表达与模型组有显著性降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),提示姜胃康治疗慢性萎缩性胃炎的机制与对胃炎黏膜的增殖现象有一定的作用,从而有利于黏膜细胞的更新及损伤后的修复,调节胃黏膜细胞增殖水平恢复正常,减少胃癌发生的危险性有关,其具体的机制有待进一步的研究。

[参考文献]

[1] 赵岩,傅兵,赵大华. 姜胃康颗粒治疗慢性萎缩性胃炎的实验研究[J]. 中国中西医结合消化杂志,2008(4):

229.

[2] 张淑芹,赵林山,郑继奎. 慢性萎缩性胃炎动物模型的复制[J]. 哈尔滨师范大学自然科学学报,2001,17(6):81.

[3] Boonstra J, Rijken P, Humbel B, et al. The epidermal growth factor [J]. Cell Biol Int,1995,19(5):413.

[4] 赵丽,王莹,关洪全. 黑布药膏对兔耳增生性瘢痕成纤维细胞增殖与凋亡的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(9):213.

[5] Yoshiyuki T, Shimizu Y, Onda M, et al. Immunohistochemical demonstration of epidermal growth factor in human gastric cancer xenografts of nude mice [J]. Cancer,1990, 65(4):953.

[6] 王会丽,贾欣,白静,等. 普胃丸对慢性胃溃疡大鼠胃组织中 EGF 和 EGFR 蛋白表达的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(12):148.

[责任编辑 聂淑琴]