

## 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

王会丽<sup>1</sup>, 贾欣<sup>2</sup>, 白静<sup>2</sup>, 赵雷<sup>2</sup>, 吕华<sup>2</sup>, 齐亚娟<sup>2\*</sup>

(1. 唐山市中医医院药剂科, 河北 唐山 063000; 2. 华北煤炭医学院药理教研室, 河北 唐山 063000)

**[摘要]** 目的: 考察普胃丸(Puwei Pill, PWP)对慢性胃溃疡(chronic gastric ulcer, CGU)大鼠胃组织中促增生因子表皮生长因子(Epidermal Growth Factor, EGF)和表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)蛋白表达的影响。方法: 将大鼠随机分为 5 组, 即正常组、假手术组、模型组、PWP 组和奥美拉唑肠溶片(OMLZ)组, 用醋酸烧灼法建立大鼠 CGU 模型, 通过灌注给药, 于 16 d 后处死大鼠, 然后分别采用免疫组化法和 Western blot 法, 观察 PWP 对胃组织中 EGF 和 EGFR 蛋白表达的影响, 考察 PWP 抗 CGU 的促黏膜增生机制。结果: 与模型组比较, PWP 与 OMLZ 组 EGF 和 EGFR 的平均阳性密度均显著增加( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), EGF 和 EGFR 蛋白表达均显著提高( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), PWP 可明显增加胃组织中 EGF 和 EGFR 的蛋白表达。结论: PWP 通过促进胃组织中 EGF 和 EGFR 的蛋白表达来发挥抗 CGU 的作用。

**[关键词]** 普胃丸; 慢性胃溃疡; 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(2011)12-0148-03

## Effects of Puwei Pill on Expressions of Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Receptor Protein in Gastric Tissue in Rats with Chronic Gastric Ulcer

WANG Hui-li<sup>1</sup>, JIA Xin<sup>2</sup>, BAI Jing<sup>2</sup>, ZHAO Lei<sup>2</sup>, LV Hua<sup>2</sup>, QI Ya-juan<sup>2\*</sup>

(1. The Pharmacy of Tangshan Chinese Medicine Hospital, Tangshan 063000, China;

2. The Department of Pharmacology, North China Coal Medical College, Tangshan 063000, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the effects of Puwei Pill (PWP) on expressions of epidermal growth factor (EGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) protein in gastric tissue in rats with chronic gastric ulcer (CGU). **Method:** The animals were divided into five groups. CGU model was built by using acetic acid. Then the protein expressions of EGF and EGFR in gastric tissue was determined by immunohistochemical staining and western blot so as to evaluate the pro-mucosa growth mechanism underlying PWP resisting of CGU. **Result:** Compared with the model, PWP could obviously increase the expressions of EGF and EGFR protein in gastric tissue. **Conclusion:** PWP plays the role of resisting of CGU through increasing the expression of EGF and EGFR protein in gastric tissue.

**[Key words]** Puwei Pill; chronic gastric ulcer; epidermal growth factor; epidermal growth factor receptor

胃溃疡(gastric ulcer, GU)作为临床常见病的一种,其病理过程十分复杂,涉及坏死物质的清除、肉

**[收稿日期]** 20100714(006)

**[基金项目]** 河北省唐山市科学技术研究与发展计划课题(08360202A-3)

**[第一作者]** 王会丽, 大学本科, 副主任药师, 主要从事临床药学, Tel: 13103157562, E-mail: zhang96wang@yahoo.com.cn

**[通讯作者]** \* 齐亚娟, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事心血管药理学及中药研发, Tel: 0315-3725870, E-mail: yajuanqi@yahoo.com.cn

芽组织的生长、新生血管的生长、纤维组织及疤痕组织的形成和上皮重构等<sup>[1]</sup>,其整个过程又受生长因子及其受体的调控<sup>[2]</sup>。

生长因子作为一组刺激细胞增殖和维持细胞活力的细胞因子,在溃疡上皮组织和底部结缔组织的再建过程中发挥着重要作用,已经成为抗消化性溃疡药物作用的新靶点。其中表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)及其受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)在胃肠道上皮生长、修复过程中起着重要作用,日益受到重视。

已证实普胃丸(Puweil Pill, PWP)对多种实验性 GU 具有保护作用<sup>[3]</sup>,且其机制与抗氧化及改善胃黏膜血流有关<sup>[4]</sup>。本实验采用醋酸烧灼法建立大鼠慢性胃溃疡(chronic gastric ulcer, CGU)模型,进一步考察 PWP 对胃溃疡愈合过程中胃组织 EGF 和 EGFR 的蛋白表达的影响,从而阐明 PWP 抗 CGU 的促黏膜增生机制。

## 1 材料

**1.1 动物** 清洁级 SD 大鼠 45 只,雌雄各半,体重 180 ~ 220 g,由北京医科大学实验动物中心提供。合格证号 SCKK(京)20050013。

**1.2 药品与试剂** PWP 处方组成:巴豆霜 10 g,雄黄 10 g,郁金 10 g,乳香 5 g,没药 5 g,陈皮 5 g,木香 5 g,琥珀 5 g,胆南星 5 g,紫豆蔻 5 g。制备:郁金、没药、乳香、陈皮、木香、琥珀、胆南星各药加入去离子水 400 mL,浸泡 1 h 后,常规煎煮 20 min,加入紫豆蔻继续煎煮 20 min,过滤,留药液,药渣再加入 200 mL 水,常规煎煮 20 min,过滤,合并两次滤液,浓缩至 1 g·mL<sup>-1</sup> 浸膏,将制备好的巴霜、雄黄、琥珀粉及淀粉与流浸膏混合均匀,制成含生药 1.3 g·g<sup>-1</sup>/丸。奥美拉唑肠溶片(OMLZ):长春北华药业有限公司产品,批号 H10920058;兔抗鼠 EGF(EIA-2022)和 EGFR(ZA-0505)多克隆抗体,北京中杉金桥生物技术有限公司;SABC 免疫组化、DAB 显色试剂盒购于武汉博士德生物工程有限公司。

**1.3 仪器** JA-2003 型电子天平,上海天平仪器厂;DYY-TB 型电泳仪,北京六一仪器厂。

## 2 方法

**2.1 动物分组、造模与取材** 将 45 只大鼠随机分为 5 组,即正常组、假手术组、模型组, PWP 组和 OMLZ 组,每组各 9 只。按照 Takagi<sup>[5]</sup>方法改良制备 GU 模型,假手术组用生理盐水代替乙酸。术后 24 h

开始给药, PWP 组每周 ig 给药 1 次 0.24 g·kg<sup>-1</sup>, OMLZ 组每天 ig 给药 1 次(3.6 mg·kg<sup>-1</sup>),其余各组每天给予等量蒸馏水,于造模第 16 天,处死大鼠取胃,并沿溃疡周围剪下约 1 cm × 1 cm 大小的胃组织,无溃疡者在相同部位取材。将胃组织标本一分为二,一部分迅速放入液氮罐中以备 Western blot 检测用,另一部分置于 4% 多聚甲醛固定,用于免疫组化。

**2.2 免疫组化法检测胃黏膜组织 EGF 和 EGFR 的蛋白表达** 采用免疫组化 SABC 法,按说明书进行,阴性对照用 PBS 代替一抗, EGF 和 EGFR 的工作浓度均为 1:100,以细胞胞浆出现棕黄色颗粒为表达阳性。每张切片在 200 倍光镜下拍 10 个视野,采用 Motic image advanced 6.0 软件对图像进行分析,以灰度值表示阳性细胞着色强度,以阳性着色面积占总面积百分比表示阳性密度。

**2.3 Western blot 法检测胃组织中 EGF 和 EGFR 的蛋白表达** 取胃溃疡组织蛋白细胞裂解上清液,进行常规 Western-blot 检测,10% 分离胶和 5% 浓缩胶,采用 PVDF 膜进行半干转膜,一抗为兔抗鼠 EGF 和兔抗鼠 EGFR 多克隆抗体,二抗为辣根过氧化物标记的羊抗兔 IgG, DAB 试剂盒显色,以相应分子量位置(预染 Marker 做标记)出现棕色条带为阳性。特异性蛋白条带扫描后,在同一条件下应用 CMIAS 真彩医学图象分析系统取 8 个点测定条带平均吸光度(A)。以  $\beta$ -actin 作为内参照。

**2.4 统计学处理方法** 实验数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 SPSS 15.0 统计软件进行处理,多组间比较采用 One-Way ANOVA 进行分析,以  $P < 0.05$  为有统计学意义。

## 3 结果

**3.1 PWP 对胃黏膜组织 EGF 和 EGFR 阳性细胞表达的影响** EGF 和 EGFR 主要在胃黏膜层的上皮细胞胞浆表达,在肌层和固有层也有少量表达。正常组和假手术组胃黏膜层均只有少量表达;模型组大量表达,且与假手术组比较,平均阳性密度均明显增加( $P < 0.01$ );而 OMLZ 组和 PWP 组也均有大量表达,且与模型组比较,平均阳性密度均显著增加( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。见表 1。

**3.2 PWP 对胃组织中 EGF 蛋白表达的影响** 如表 2 所示,正常组和假手术组 EGF 蛋白表达均较少,且二者间无显著差异;模型组显著高于假手术组( $P <$

表 1 普胃丸对胃黏膜组织中 EGF 和 EGFR 阳性细胞表达的影响

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	EGF 的平均 阳性密度	EGFR 的平均 阳性密度
正常	-	52.09 ± 13.99	9.16 ± 0.38
假手术	-	54.37 ± 10.69	12.24 ± 2.30
模型	-	89.34 ± 18.89 <sup>1)</sup>	51.91 ± 2.33 <sup>1)</sup>
OMLZ	0.003 6	107.42 ± 10.42 <sup>1,2)</sup>	96.20 ± 2.29 <sup>1,3)</sup>
PWP	0.24	113.12 ± 14.66 <sup>1,3)</sup>	105.10 ± 2.04 <sup>1,3)</sup>

注:与假手术组比较<sup>1)</sup>  $P < 0.01$ ;与模型组比较<sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,<sup>3)</sup>  $P < 0.01$ (表 2~3 同)。

表 2 普胃丸对胃组织中 EGF 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	A
正常	-	96.58 ± 14.92
假手术	-	102.27 ± 13.37
模型	-	129.74 ± 26.80 <sup>1)</sup>
OMLZ	0.003 6	148.11 ± 22.31 <sup>1,2)</sup>
PWP	0.24	154.68 ± 16.51 <sup>1,3)</sup>

0.01);与模型组比较,OMLZ 和 PWP 组均显著升高( $P < 0.01$ )。

**3.3 PWP 对胃组织中 EGFR 蛋白表达的影响** 如表 3 所示,正常组和假手术组 EGFR 蛋白表达无显著差异;模型组显著高于假手术组( $P < 0.01$ );OMLZ 和 PWP 组与模型组比较,也均显著升高( $P < 0.01$ )。

表 3 普胃丸对胃组织中 EGFR 蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s, n=9$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	A
正常	-	8.53 ± 0.85
假手术	-	11.02 ± 3.03
模型	-	47.88 ± 2.97 <sup>1)</sup>
OMLZ	0.003 6	84.62 ± 1.90 <sup>1,3)</sup>
PWP	0.24	93.26 ± 2.72 <sup>1,3)</sup>

#### 4 讨论

本课题组已证实,中药复方制剂 PWP 可通过抑制胃液及胃酸的分泌,增加黏膜血流和抗氧化几个方面发挥抗慢性 GU 的作用<sup>[3,4]</sup>。然而 GU 的修复是一个十分复杂的过程,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、生长因子及细胞外基质相互作用的结果<sup>[5]</sup>。

EGF 可通过与其有特异性的受体(EGFR)结合显著抑制胃酸分泌,被认为是调节溃疡愈合的中介因子。具有抑制胃酸分泌,促进上皮增殖、组织修复,增加黏膜血流等作用,对胃黏膜的保护和再生起着重要作用<sup>[6]</sup>。另外,EGF 还可能参与胃酸分泌的

调节,甚至增加胃黏膜血流量<sup>[7]</sup>。另外,EGF/EGFR 自身分泌系统在溃疡愈合中可能对细胞增殖、分化、迁移及抑制胃酸方面起着重要作用<sup>[8]</sup>。EGFR 也是溃疡病组织修复过程中的主要环节。大量研究已表明,抗消化性溃疡药物可促进正常和溃疡胃黏膜中 EGF 和 EGFR 的基因表达,从而刺激上皮细胞增殖和迁移,加速溃疡愈合<sup>[9]</sup>。

本实验发现,模型组 EGF 和 EGFR 表达显著高于正常和假手术组;而与模型组比较,OMLZ 及 PWP 组又均明显增加,提示 PWP 可能通过增加胃组织的 EGF 和 EGFR 的蛋白表达,从而刺激肉芽组织的形成,抑制壁细胞分泌,并刺激溃疡边缘上皮细胞的增殖、分化、移行,增加黏膜血流量,增强黏膜的再生功能。从而促进溃疡愈合。

#### [参考文献]

- [1] Machowska A, Brzozowski T, et al. Gastric secretion, proinflammatory cytokines and epidermal growth factor (EGF) in the delayed healing of lingual and gastric ulcerations by testosterone [J]. *Inflammopharmacology*, 2008, 16(1):40.
- [2] 时昭红,张介眉,周慧芳,等. 促愈颗粒对胃溃疡实验大鼠胃黏膜表皮生长因子及其受体表达的影响[J]. *中国中西医结合消化杂志*, 2007, 15(1):25.
- [3] 齐亚娟,孙丽曼,白静,等. 普胃丸抗实验性胃溃疡的药效[J]. *中成药*, 2009, 31(4):520.
- [4] 贾欣,冯永,耿菲,等. 普胃丸对复发胃溃疡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):181.
- [5] 张永峰,谭永港,赵燕萍等. 胃黏膜表皮生长因子受体在溃疡愈合中的表达[J]. *深圳中西医结合杂志*, 2004(1):40.
- [6] 贺建华,罗和生. 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, 13(1):12.
- [7] 廖小金. 表皮生长因子结构和生物学效应[J]. *海峡药理学*, 2006, 18(5):14.
- [8] 刘建平,卜涛,白建乐,等. EGF、TGF2 $\alpha$  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.
- [9] 黄贵华,林寿宁,韦维,等. 安胃汤对胃溃疡大鼠胃黏膜 EGF 及 EGFR 表达的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2005, 32(10):1095.

[责任编辑 聂淑琴]