

安胃汤对慢性萎缩性胃炎模型大鼠 肠三叶因子基因表达的影响

韦维¹, 林寿宁^{2*}, 朱永苹²

(1. 广西中医学院, 南宁 530001; 2. 广西中医学院瑞康医院消化内科, 南宁 530011)

[摘要] 目的: 探讨安胃汤对实验性慢性萎缩性胃炎大鼠模型的肠三叶因子(intestinal trefoil factor, TFF3)基因表达的影响。方法: 采用甲基硝基亚硝基胍(*N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitroso-guanidine, MNNG)慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)大鼠模型, 36只清洁级健康雄性Wistar大鼠随机分为病理模型组、安胃汤组、胃复春组共3组。实时荧光定量PCR方法观察安胃汤对实验性慢性萎缩性胃炎大鼠模型胃黏膜TFF3 mRNA表达的影响, 对后者进行图像分析及统计学处理。结果: 病理模型组, 安胃汤组和胃复春组TFF3 mRNA/ β -actin值分别为(0.95 ± 0.23), (0.43 ± 0.04), (0.64 ± 0.04), 与病理模型组比较, 安胃汤组和胃复春组均显著降低TFF3 mRNA/ β -actin值($P < 0.01$); 安胃汤组作用优于胃复春组($P < 0.05$)。结论: 安胃汤可能通过降低胃黏膜TFF3 mRNA表达而起到治疗CAG作用。

[关键词] 安胃汤; 慢性萎缩性胃炎; 肠三叶因子; 实验研究

[中图分类号] R285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2011)03-0159-04

Effect of Anwei Decoction on Intestinal Trefoil Factor mRNA in Chronic Atrophic Gastritis Rats

WEI Wei¹, LIN Shou-ning^{2*}, ZHU Yong-ping²

(1. Guangxi Traditional Chinese Medicine University, Nanning 530011, China;

2. Department of Gastroenterology, Ruikang Affiliated Hospital of
Guangxi Chinese Medicine University, Nanning 530011, China)

[Abstract] Objective: To explore the effect of Anwei decoction on the expression of intestinal trefoil factor mRNAs (TFF3 mRNAs) in chronic atrophic gastritis (CAG) rats. **Method:** Thirty six rats were randomly divided into three groups: model group, Anwei decoction group and Weifuchun group. CAG was induced by *N*-methyl-*N*-nitro-*N*-nitroguanidine (MNNG). The expression of TFF3 mRNA in rats gastric mucosas was determined by real-time polymerase chain reaction (real-time PCR). **Result:** The ratio of TFF3 mRNA/ β -actin was 0.95 ± 0.23, 0.43 ± 0.04, 0.64 ± 0.04 respectively in the model group, Anwei decoction group and Weifuchun group. Compared with that in the model group, the expression of TFF3 mRNA was remarkably reduced in Anwei decoction group and Weifuchun group ($P < 0.01$). Anwei decoction showed better effect than Weifuchun ($P < 0.05$). **Conclusion:** Anwei decoction may treat CAG by reducing the expression of TFF3 mRNA in gastric mucosas.

[Key words] Anwei decoction; atrophic gastritis; intestinal trefoil factor; experimental research

[收稿日期] 20100807(001)

[基金项目] 广西自然科学基金项目(桂科自0728187)

[第一作者] 韦维, 医学博士, 副教授, 主要从事消化系统疾病的临床与基础研究, Tel: 0771-3111793, 15878771395, E-mail: 511855223@qq.com

[通讯作者] * 林寿宁, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事消化系统疾病的临床与基础研究, Tel: 0771-2218105, E-mail: LSN77766@sina.com

慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 是常见消化病, 与胃癌的发生有着密切的关系, 尤其是胃窦萎缩性胃炎与肠型胃癌的关系较为肯定, 世界卫生组织已将 CAG 定为胃癌前状态。因此对 CAG 防治具有重要的意义。三叶肽家族 (trefoil factor family, TFF) 是由胃肠道黏液分泌上皮合成和分泌的一组具有特定三叶结构域的小分子多肽, 在哺乳动物中包括 3 个因子: 乳腺癌相关肽 (the breast cancer-associated pS2 peptide, TFF1/PS2)、解痉多肽 (spasmolytic polypeptide, TFF2/SP) 和肠三叶因子 (intestinal trefoil factor, TFF3/ITF)。TFF3 具有很强的促进细胞增殖与移行的能力, 可促进受损区域上皮细胞重建并加快上皮细胞移行速度^[1]。安胃汤出自已故全国名老中医林沛湘教授治疗 CAG 的经验方, 临床上疗效显著^[2], 但其作用机制尚未完全阐明, 笔者通过动物实验观察其对胃黏膜 TFF3 mRNA 表达的影响, 探讨其防治 CAG 的作用机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级健康雄性 Wistar 大鼠, 雄性, 体重 140 ~170 g, 由广西食品药品检验所实验动物中心提供, 动物合格证号 SCXX(桂) 2003-0001。

1.2 药物 安胃汤为免煎中药颗粒, 主要成分: 半夏、黄连、干姜、乌药、丹参、百合、白芍、薏苡仁、炙甘草, 其构成比为 13 5 5 7 15 20 20 10 5, 江苏天江制药厂生产, 广西中医学院瑞康医院药剂科提供; 胃复春片, 杭州胡余庆堂药业有限公司, 批号 091807, 产品规格 0.359 g/片。购自广西中医学院瑞康医院。

1.3 试剂 TRIzol 试剂 (总 RNA 抽提试剂, Invitrogen 公司, 产品编号 15596-026)、Taq 酶 (北京庄盟国际, 产品编号 ZT101-2), Rnasin A (核糖核酸酶 A, Sigma, 编号 R4875), Rnase Inhibitor (RNA 酶抑制剂, TaKaRa 公司, 编号 D2310A)。M-MLV Reverse Transcriptase (M-MLV 反转录酶, Promega 公司, 产品编号 M1701), Power SYBR Green PCR Master Mix (美国 ABI 公司, 产品编号 4367659), 05343 *N*-甲基-*N*-硝基-*N*-亚硝基胍 (Fluka 公司, 产品编号 05343), Oligo dT 序列, 引物序列由恒博和泰生物科技 (北京) 有限公司合成。Oligo dT 序列: 5'-TTTTGTACAAGCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3'; -actin (263 bp): 上游 5'-GAGACCTTCAACACCCAGCC-3', 下游 5'-AATGTCACGCACGATTTCCC-3'; TFF3

(221 bp) 上游: 5'-ATGGAGACCAGAGCCTTCTGGAC-3。TFF3 下游: 5'-AGAGGTTTGAAGCACCA GGGC-3。

1.4 仪器 7000 型实时荧光定量 PCR 系统 (美国 ABI 公司); DU2640 型紫外分光光度计 (Beckman 公司); 3K220 型低温高速离心机 (Sigma 公司); DF2C 型恒压恒流电泳仪 (北京六一仪器厂)。

2 方法

2.1 分组与给药 36 只清洁级健康雄性 Wistar 大鼠随机分为病理模型组、安胃汤组、胃复春对照组共 3 组, 每组 12 只。造模方法参照文献 [3]。3 组均自由饮用 170 mg·L⁻¹ 的 MNNG 液, 造模期间不再给予其他饮水, 共 8 周。均普通饲料饲养。第 8 周末, 各组随机抽取 2 只大鼠处死, 取胃, 行病理检查, 判断模型成功与否 (光学显微镜显示: 胃黏膜全层明显变薄、局灶上脱落、糜烂, 黏膜固有腺体数量明显减少、排列稀疏紊乱, 腺体体积缩小, 个别呈囊状扩张, 黏膜固有层淋巴细胞浸润、部分有淋巴滤泡形成 (图 1B)。造模成功后从第 9 周开始, 病理模型组每天每只 4 mL 纯净水 ig, 安胃汤组 2.5 g·kg⁻¹·d⁻¹ ig, 胃复春组 1.19 g·kg⁻¹·d⁻¹ ig, 1 次/日至第 12 周结束。

2.2 一般状态的观察 对各组大鼠的体质量、毛色、精神状态及活动情况进行观察、对照。

2.3 光镜标本处理 动物处死后, 取全胃, 沿胃大弯剪开, 取胃窦和胃体部。4% 多聚甲醛浸润固定 12 h 以上, 冲水 24 h, 50%, 75%, 95%, 100% 乙醇脱水, 二甲苯透明, 浸蜡后, 石蜡包埋。切片厚 5 μm, 常规苏木精-伊红染色病理学检查。

2.4 胃组织和 RNA 提取 各组于用药治疗 4 周后, 禁食 12 h, 将大鼠用 1% 乌拉坦液, 按体重 10 mL·kg⁻¹ 麻醉, 剖腹取胃, 沿胃大弯剪开, 并向胃窦近幽门口至胃大弯方向取 0.5 cm × 0.5 cm 胃黏膜组织, 放入 0.1% DEPC 水处理过的冻存管中, 并迅速加入 1 mL Trizol 溶液。封口膜封口后, 放入液氮中保存。

2.5 提取总 RNA 及反转录反应 Trizol 一步法提取总 RNA。紫外-分光光度计测定所提取 RNA 浓度。反转录反应体系: 总 RNA 2 μg, Oligo dT (0.5 g·mL⁻¹) 2 μL, dNTP (10 mol·L⁻¹) 3 μL, DTT (0.1 mol·L⁻¹) 2 μL, RNA 酶抑制剂 (40 U·μL⁻¹) 1 μL, MMLV-RT (200 U·μL⁻¹) 1 μL, 5 × MMLV-RT Buffer 6 μL, 加入 DEPC 处理过的无菌水至 30 μL; 反应条

件:45 反应 1 h,95 5 min 终止反应。

2.6 实时荧光定量 PCR(Real-time PCR) 反应 其中 20 μL 的 PCR 反应体系包含: 10 μL 的 SYBR Green PCR Master Mix, 5.4 μL 的 RNase Free Water (去 RNase 的水), 上、下游引物($0.05 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 1.8 μL 和 1 μL 的 cDNA。反应条件: 预变性, 94 , 5 min; 变性, 95 , 30 s; 退火, 58 , 30s; 延伸, 72 , 30 s; 共进行 40 个循环的扩增, 72 后延伸 5 min。实验中同步进行内参基因 $\beta\text{-actin}$ 的定量检测, 以目的基因与内参基因相对浓度比作为目的基因的相对表达量。扩增反应在 ABI I7000 荧光定量 PCR 仪上进行, 各样品的荧光信号值由荧光定量 PCR 仪的支持软件 ABI Prism7000SDS software 实时产生并自动计算定量数值。

2.7 统计方法 各样品目标基因的相对表达水平通过内参基因进行校准后用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 用 SPSS 13.0 for Windows 统计软件包对数据进行统计, 采用单因素方差分析, 进行 SNK 两两比较。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠胃组织观察 正常组胃黏膜呈粉红色, 表面光滑有光泽, 被覆较多黏液, 皱襞面光滑, 走向规则, 胃壁弹性良好。模型组黏膜薄弱, 色泽灰白, 表面黏液少, 皱襞低平、稀少甚至消失, 走向紊乱, 胃壁弹性减低。安胃汤组及胃复春组部分胃黏膜基本恢复正常, 以安胃汤组为明显。治疗前, 3 组大鼠体质量比较差异无显著意义。治疗后与病理模型组比较, 安胃汤与胃复春差异均有显著性意义 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。见表 1。

表 1 安胃汤给药 12 周对慢性萎缩性胃炎大鼠体质量的影响 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	治疗前 / g	治疗后 / g
病理模型	-	289 \pm 22	359 \pm 15
安胃汤	2.5	279 \pm 25	370 \pm 19 ¹⁾
胃复春	1.19	280 \pm 26	364 \pm 19 ¹⁾

注: 与病理模型组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (表 2 同)。

3.2 光学显微镜观察 正常组: 胃黏膜厚, 各层结构正常, 胃黏膜上皮细胞排列整齐, 固有腺体形状规则, 排列整齐, 未见萎缩、脱落或缺损, 可见少许嗜酸性粒细胞(图 1 A)。模型组: 胃黏膜全层明显变薄、局灶上脱落、糜烂, 黏膜固有腺体数量明显减少、排列稀疏紊乱, 腺体体积缩小, 个别呈囊状扩张, 黏膜

固有层淋巴细胞浸润、部分有淋巴滤泡形成(图 1B)。安胃汤组: 黏膜各层结构基本正常, 黏膜固有腺体丰富排列较规则, 无明显数量减少, 固有层见少许炎细胞浸润(图 1C)。胃复春组: 胃黏膜上皮稍变薄, 黏膜上皮排列整齐, 未见明显缺损, 固有腺体排列稍紊乱, 部分腺体体积缩小, 个别扩张, 固有层可内见淋巴细胞浸润(图 1D)。说明安胃汤与胃复春均能改善胃黏膜的病理形态, 但以安胃汤效果为佳。与病理模型组比较, 安胃汤组大鼠胃黏膜轻、中、重度萎缩明显少于病理模型组 ($P < 0.01$), 胃复春组明显少于病理模型组 ($P < 0.05$), 结果提示安胃汤组与胃复春均能显著改善大鼠胃黏膜病理异常, 降低萎缩的发生, 但安胃汤组与胃复春组差异无显著意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 安胃汤给药 12 周对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜萎缩情况的影响 ($n=10$)

组别	剂量 / $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	萎缩数	正常	轻度萎缩	中度萎缩	重度萎缩
病理模型	-	10	0	2	3	5
安胃汤	2.5	4	6	3	1	0 ²⁾
胃复春	1.19	5	4	3	2	1 ¹⁾

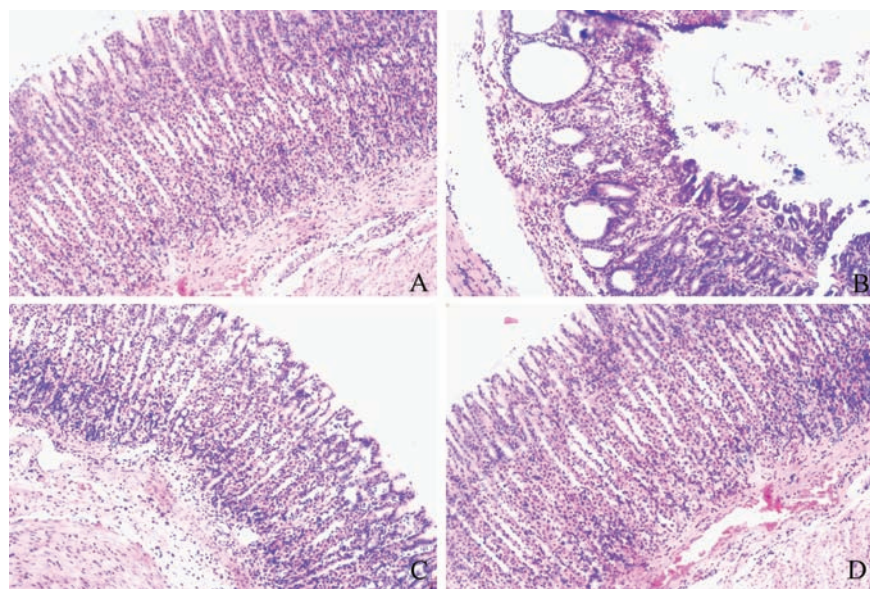


图 1 治疗 4 周后各组大鼠胃黏膜观察 (HE 染色, $\times 10$)

A. 正常组; B. 模型组; C. 安胃汤 $2.5 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组; D. 胃复春 $1.19 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组

3.3 总 RNA 的浓度测定 紫外分光光度计检测总 RNA 显示, A_{260}/A_{280} 值为 1.7 ~1.9, 总 RNA 的浓度符合实验要求。

3.4 标准曲线绘制 实验中, 目的基因和内参基因的标准曲线均由荧光定量 PCR 仪附带软件绘制, 其中 TFF3 基因的相关系数为 $r = 0.989$, 线性关系良好, 保证扩增结果的准确性。

3.5 安胃汤对 CAG 模型大鼠胃黏膜内 TFF3 mRNA 表达的影响 荧光定量扩增曲线光滑,说明扩增反应呈指数扩增;样本从各组扩增产物中随机选取,1.5%琼脂糖凝胶电泳观察 PCR 扩增结果,各产物特异性条带明亮可见,扩增片段符合设计片段长度;荧光定量 PCR 结果显示,与病理模型组相比,安胃汤组和胃复春对照组均显著降低 TFF3 mRNA / -actin 吸光度比值 ($P < 0.01$),安胃汤组优于胃复春对照组 ($P < 0.05$) (见表 3)。

表 3 各组大鼠胃黏膜 TFF3 mRNA / -actin 值比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	剂量 /g·kg ⁻¹	TFF3 mRNA / -actin
病理模型	-	0.95 ±0.23
安胃汤	2.5	0.43 ±0.04 ¹⁾
胃复春	1.19	0.64 ±0.04 ^{1,2)}

注:与病理模型组比较¹⁾ $P < 0.01$;与胃复春组比较²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

CAG 与中医的“痞满”、“胃脘痛”、“杂”等病症的症状表现非常类似。其病机以脾胃虚弱、胃失和降为主,气虚、阴虚及湿郁或湿热、血瘀并见,临床多表现为虚实相兼,寒热错杂。病变脏腑涉及脾胃肝。安胃汤是在全国名老中医、广西中医学院林沛湘教授治疗慢性胃病验方基础上组方而成^[2]。本方组方严谨,寒热并用,活血行气,畅通气机,疗效独特,并在临床上有显著疗效。

本研究结果显示,实验性 CAG 模型大鼠经安胃汤和胃复春治疗后,胃黏膜变薄、黏膜固有腺体数量明显减少、腺体体积缩小等病理形态有明显改善,安胃汤组治疗后大鼠胃黏膜各层结构基本正常,黏膜固有腺体丰富排列较规则,无明显数量减少,固有层见少许炎细胞浸润。胃复春组治疗后大鼠胃黏膜上皮稍变薄,黏膜上皮排列整齐,未见明显缺损,固有腺体排列稍紊乱,部分腺体体积缩小,个别扩张,固有层可见淋巴细胞浸润。说明安胃汤与胃复春均能改善胃黏膜的病理形态,但以安胃汤效果为佳。

TFF3 参与损伤黏膜的再生和修复,对胃肠黏膜起保护作用,胃黏膜的损伤越严重,TFF3 的表达越明显。其机制在于 TFF3 能加速胃肠上皮愈合,TFF3 通过与黏液糖蛋白的相互作用或交联,形成黏弹性的黏液凝胶层,阻止胃蛋白酶以及机械应力改变等因素造成的胃黏膜损伤,从而增强胃肠道黏膜

防御屏障的保护能力^[4]。一旦修复完成,基底侧受体不再接触三叶肽,细胞移走停止。TFF3 在胃肠黏膜的早期再生修复中扮演着重要的角色。国外研究显示在胃黏膜发生肠化、不典型增生到胃癌的发生过程中表达逐步增高^[5],国内唐氏^[6]研究结果也显示,TFF3 表达随着浅表性胃炎、萎缩性胃炎、不典型增生而逐渐升高,胃癌 TFF3 表达反而低于萎缩性胃炎、不典型增生,3 组之间差异不显著,却显著高于正常组和浅表性胃炎。黄亚平^[7]亦有同样的报道。本研究结果表明,荧光定量 PCR 结果显示,与模型组相比,安胃汤治疗组、胃复春对照组 TFF3 mRNA 水平显著降低 ($P < 0.01$),安胃汤大剂量组优于胃复春对照组 ($P < 0.05$)。

根据 TFF3 对胃黏膜的保护作用机制,作者推测安胃汤在治疗 CAG 的过程中,TFF3 是过度表达的。随着疾病好转,TFF3 表达也随之下降。TFF3 此过程中起到了参与损伤黏膜的再生和修复的作用。

[参考文献]

- [1] De Paulsen N, Brychzy A, Fournier M C, et al. Role of transforming growth factor-alpha in von Hippel-Lindau (VHL) (-/-) clear cell renal carcinoma cell proliferation: a possible mechanism coupling VHL tumor suppressor inactivation and tumorigenesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98(4): 1387.
- [2] 林寿宁. 中国百年百名中医临床丛书—林沛湘[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2001, 10: 99.
- [3] 王四旺, 施新猷, 黄传贵, 等. 中药药效学研究及评价[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 2001: 315.
- [4] Ogata H, Podolsky D K. Trefoil peptide expression and secretion is regulated by neuropeptides and acetylcholine [J]. Am J Physiol, 1997, 273(2 Pt1): 348.
- [5] Leung W K, Yu J, Chart F K, et al. Expression of trefoil peptides(TFF1, TFF2, and TFF3) in gastric carcinomas, intestinal metaplasia, and non-neoplastic gastric tissue [J]. J Pathol, 2002, 197(5): 582.
- [6] 唐忠辉, 陈华生, 邹宗楷, 等. 胃黏膜癌变过程中 TFF3、survivin、CD147、CD34 表达及其相关性[J]. 山西医科大学学报, 2009, 40(3): 202.
- [7] 黄亚平, 雷琳, 朱庆茹. 胃癌及癌前病变组织三叶因 3 表达的相关性研究[J]. 内科, 2009, 4(6): 854.

[责任编辑 聂淑琴]