

◇ 药学研究 ◇

溃疡方对乙酸胃溃疡大鼠 TFF1、EGF 和 EGFR 的影响

刘娜, 江伟, 唐静

摘要 目的 探讨溃疡方对乙酸性胃溃疡大鼠黏膜三叶肽因子 1(TFF1)、表皮生长因子(EGF)和表皮生长因子受体(EGFR)的影响。方法 将 50 只 SD 大鼠随机分为 5 组:正常组、模型组、溃疡方低剂量组、溃疡方高剂量组、雷尼替丁组,制备模型,采集标本,比较各组大鼠胃溃疡指数,用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)法检测胃黏膜组织中 TFF1、EGF 及其受体 EGFR mRNA 的表达,免疫组化法检测胃黏膜 TFF1、EGFR 的含量。结果 RT-PCR 结果显示,与正常组比较,模型组 TFF1、EGF 水平降低,差异无统计学意义,溃疡方高剂量组及雷尼替丁组 TFF1 均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$);溃疡方各剂量组及雷尼替丁组的 EGF 含量均高于正常组,差异有统计学意义($P < 0.01$),而模型组 EGFR 的含量较正常组升高,差异无统计学意义,但溃疡方各剂量组及雷尼替丁组升高更明显,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,溃疡方低剂量组、高剂量组及雷尼替丁组 TFF1、EGF 及 EGFR 的表达差异有统计学意义($P < 0.01$);免疫组化法结果显示,溃疡方各剂量组及雷尼替丁组 TFF1 及 EGFR 的表达均显著高于模型组,差异有统计学意义($P < 0.01$),尤其是溃疡方高剂量组。结论 溃疡方对乙酸所致大鼠胃溃疡有防御和修复治疗作用,其作用机制可能是通过促进胃黏膜中 TFF1、EGF 和 EGFR 的表达有关。

关键词 胃溃疡;溃疡方;三叶肽因子 1;表皮生长因子;表皮生长因子受体

中图分类号 R 573

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)01-0051-04

胃黏膜的保护作用在防治消化性溃疡中具有重要意义,近几年来中医药治疗此病显示了一定的优势,并取得了较好的远期疗效。溃疡方是桂林医学院江伟教授几十年治疗胃溃疡的经验方,该方以四君子汤为基础健脾益气和胃,佐以黄芪敛疮生肌,白芨护膜,香附、延胡索、白芍理气止痛,麦芽、谷芽、鸡内金消食导滞。临床应用中发现溃疡方治疗消化性溃疡有治愈率高、复发率低的特点。笔者通过制备

乙酸性胃溃疡模型,测定大鼠黏膜三叶肽因子 1(trefoil factor 1, TFF1)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)及表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor, EGFR)的表达情况,探讨溃疡方治疗胃溃疡的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 健康成年清洁级 SD 大鼠 50 只,雌雄各半, (180 ± 30) g, 由桂林医学院实验动物部提供。

1.1.2 实验药品 溃疡方(主要药物组成:党参 10 g, 白术 10 g, 黄连 6 g, 黄芪 12 g, 茯苓 10 g, 当归 9 g, 白芍 10 g, 延胡索 10 g, 三七 10 g, 白芨 10 g, 生麦芽 15 g, 鸡内金 15 g, 稻芽 15 g, 香附 10 g, 甘草 6 g 等)由桂林医学院附属医院中药房提供。雷尼替丁胶囊:中诺药业有限公司生产(国药准字 H13021317)。

1.1.3 仪器与试剂 TRIzol RNA 提取试剂盒、逆转录试剂盒购自大连宝生物公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)内参和引物序列均由上海生工公司合成;EGF(136 bp)上游引物:5'-GTCTACGATGGGTACTGCCTC-3',下游引物:5'-GCGCAGCTTC-CACCAACGTAAG-3';EGFR(315 bp)上游引物:5'-CCAGGCGCCCGGTGCCCCGC-3',下游引物:5'-GCTGTAGCGGGGCTCAGCAT-3';TFF1(169 bp)上游引物:5'-CTGGTCATTGAGAACCAGCAAGAA-3',下游引物:5'-TGTCACCAGGCCAGATCCAG-3';GAPDH(595 bp)上游引物:5'-CAGTCCAGCCTCGTCTCAT-3';下游引物:5'-AGGGGCCATCCACAGTCTTC-3';即用型 EGFR 多克隆抗体由武汉博士德生物工程有限公司提供,TFF1 多克隆抗体(1:150)由北京博奥森试剂有限公司提供。

1.2 实验方法

1.2.1 造模方法与动物分组 参照文献^[1]制备大鼠胃溃疡模型,通过 HE 染色,光镜下观察胃黏膜组织形态判定造模成功与否。胃溃疡模型复制成功后,将大鼠随机均分为 5 组:正常组、模型组、溃疡方

2013-08-12 接收

基金项目:广西壮族自治区卫生厅重点科研课题(编号:200714)

作者单位:桂林医学院附属医院消化内科 桂林 451001

作者简介:刘娜,女,硕士研究生;

江伟,男,教授,主任医师,硕士生导师,责任作者, E-mail: weijiang7802@yahoo.com.cn

低剂量组、溃疡方高剂量组、雷尼替丁组 雌雄各半。

1.2.2 术后给药 造模成功后,从术后第3天开始灌胃给药:溃疡方低、高剂量组(予溃疡方免煎剂,浓度为2、4 g/ml),雷尼替丁组给予雷尼替丁30 mg/kg,模型组及正常组均给予等量的生理盐水,每组均按1 ml/100 g 1次/d。

1.2.3 取材 造模给药14 d后,禁食不禁水24 h,拉颈处死大鼠,取全胃,沿溃疡周围剪下约1.2 cm × 1.0 cm大小的胃组织,将胃组织标本一分为二,一部分迅速放入液氮中保存,以备RT-PCR法检测目标因子用;另一部分浸入4%多聚甲醛中固定24 h,脱水,常规石蜡包埋、切片,用于免疫组化。

1.2.4 检测指标及方法

1.2.4.1 溃疡损伤指数 取出大鼠的胃组织,自然展开,滤纸吸干,用游标卡尺测量溃疡的长度和宽度,长度指溃疡的最大直径,宽度为与直径垂直的最宽距离,二者乘积即为溃疡损伤指数。

1.2.4.2 RT-PCR法检测TFF1、EGF及EGFR mRNA表达 ① 组织总RNA-TRIzol提取:提取的总RNA经1.5%琼脂糖凝胶电泳后,每一样品均出现清晰的28S和18S条带,且28S条带的亮度和宽度约为18S条带的2倍,即所提出的总RNA无明显分解;分光光度计测定的吸光度(OD)值 OD_{260}/OD_{280} 在1.8~2.0,即所提RNA纯度较高;② 第1链cDNA合成和PCR扩增:按照RT-PCR一步法扩增试剂盒方法,分别以胃黏膜组织总RNA为模板进行RT-PCR扩增;③ PCR产物扩增反应结束后进行琼脂糖凝胶电泳,以目的因子与GAPDH光密度积分比值反映基因表达的强弱做出半定量分析。

1.2.4.3 免疫组化法检测TFF1和EGFR的蛋白表达 采用免疫组化SP法,按试剂盒说明书进行,阴性对照用PBS代替一抗,细胞胞质或胞膜出现棕黄色颗粒为阳性表达。每张切片在光镜下随机选取5个视野,采用Motic image advanced 6.0软件对图像进行分析,检测其阳性信号平均光密度值以反映TFF1及EGFR表达的强弱,光密度值越高,TFF1及EGFR表达越强。

1.3 统计学处理 采用SPSS 17.0统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间用单因素方差分析进行统计学处理。

2 结果

2.1 溃疡损伤指数 与模型组(4.34 ± 3.63)相比,雷尼替丁组(1.91 ± 1.80)、溃疡方高剂量组

(2.41 ± 1.78)大鼠溃疡损伤指数均明显降低($P < 0.05$);雷尼替丁组与溃疡方高剂量组大鼠溃疡损伤指数比较,差异无统计学意义。

2.2 HE染色观察大鼠胃黏膜的组织形态学 正常组大鼠胃组织结构正常,胃黏膜表面光滑,呈粉红色,黏膜皱襞整齐清晰,未见糜烂及溃疡。模型组大鼠可见溃疡形成,黏膜面表层见坏死组织,其下见肉芽组织增生,并可见大量炎症细胞浸润,肌层和浆膜完全被破坏,溃疡周围黏膜腺体间质充血、水肿,可见新生小毛细血管;与模型组比较,溃疡方高剂量组表层坏死组织减少,黏膜腺体重现,黏膜下层逐渐近似正常,间质充血水肿减轻,浆膜结构逐渐恢复完整,炎症细胞及渗出物逐渐消失,见图1。

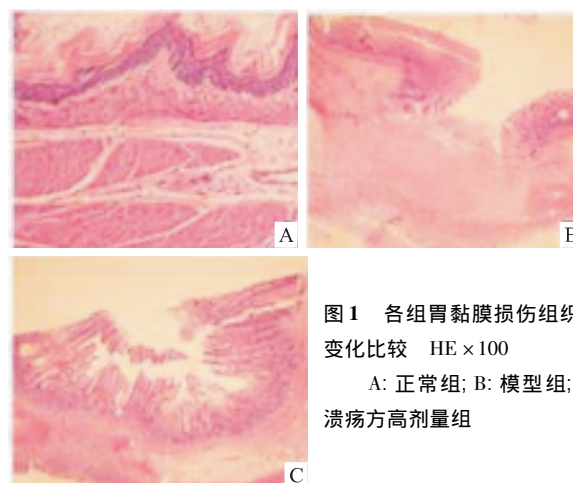


图1 各组胃黏膜损伤组织学变化比较 HE × 100
A: 正常组; B: 模型组; C: 溃疡方高剂量组

2.3 RT-PCR法检测结果比较 与正常组比较,模型组TFF1、EGF水平降低,但差异无统计学意义,溃疡方高剂量组及雷尼替丁组TFF1均显著升高($P < 0.01$),溃疡方各剂量组及雷尼替丁组的EGF含量均高于正常组($P < 0.01$),而模型组EGFR的含量较正常组升高,差异无统计学意义,但溃疡方各剂量组及雷尼替丁组升高更明显,差异有统计学意义($P < 0.01$);与模型组比较,溃疡方低、高剂量组及雷尼替丁组TFF1、EGF及EGFR的表达均显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表1、图2。

表1 大鼠胃组织TFF1、EGF、EGFR mRNA的含量比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别	TFF1	EGF	EGFR
正常	0.34 ± 0.16	0.28 ± 0.11	0.36 ± 0.16
模型	0.33 ± 0.15	0.25 ± 0.43	0.49 ± 0.13
溃疡方低剂量	$0.56 \pm 0.15^{**}$	$0.54 \pm 0.09^{**\Delta\Delta}$	$0.65 \pm 0.11^{**\Delta\Delta}$
溃疡方高剂量	$0.80 \pm 0.20^{**\Delta\Delta}$	$0.97 \pm 0.11^{**\Delta\Delta}$	$1.00 \pm 0.13^{**\Delta\Delta}$
雷尼替丁	$0.77 \pm 0.18^{**\Delta\Delta}$	$0.55 \pm 0.11^{**\Delta\Delta}$	$0.83 \pm 0.12^{**\Delta\Delta}$

与模型组比较: $^{**}P < 0.01$; 与正常组比较: $^{\Delta\Delta}P < 0.01$

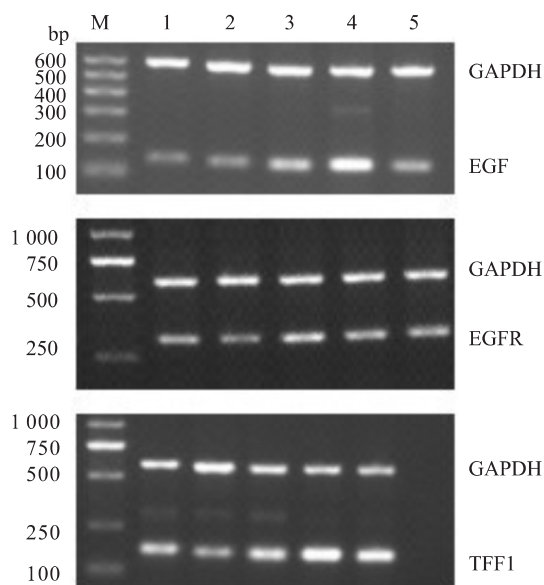


图2 RT-PCR 法检测结果

M: Marker; 1: 正常组; 2: 模型组; 3: 溃疡方低剂量组; 4: 溃疡方高剂量组; 5: 雷尼替丁组

2.4 免疫组化结果比较 TFF1 的表达部位主要在胃黏膜腺体细胞胞质中表达, 阳性染色定位于胃黏膜表面和小凹上皮及部分固有腺体; 正常大鼠 EGFR 主要在胃黏膜腺体的颈部、基底部, 呈弱阳性表达, 表达以壁细胞、颈细胞胞质及胞膜为主。与正常组比较 模型组 TFF1 表达降低, 而 EGFR 表达升高, 差异无统计学意义; 溃疡方高剂量组及雷尼替丁组 TFF1、EGFR 表达均显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较 溃疡方各剂量组及雷尼替丁组均显著升高 ($P < 0.01$), 尤其溃疡方高剂量组升高最明显, 见表 2、图 3。

3 讨论

目前, 普遍认为胃溃疡主要是由胃黏膜侵袭因素和黏膜自身防御-修复因素之间的相对失衡所致。研究^[2]表明, 溃疡愈合需要黏膜及黏膜下组织结构的再生、修复、重建及其防御功能的恢复, 这是多种细胞和分子相互作用的复杂过程, TFF1、EGF

表2 大鼠胃组织 TFF1 及 EGFR 平均光密度值比较 ($n = 10 \bar{x} \pm s$)

组别	TFF1	EGFR
正常	0.38 ± 0.05	0.44 ± 0.11
模型	0.34 ± 0.11	0.55 ± 0.08
溃疡方低剂量	0.63 ± 0.77 ** $\Delta\Delta$	0.66 ± 0.08 ** $\Delta\Delta$
溃疡方高剂量	0.96 ± 0.18 ** $\Delta\Delta$	0.99 ± 0.11 ** $\Delta\Delta$
雷尼替丁	0.85 ± 0.12 ** $\Delta\Delta$	0.87 ± 0.07 ** $\Delta\Delta$

与模型组比较: ** $P < 0.01$; 与正常组比较: $\Delta\Delta P < 0.01$

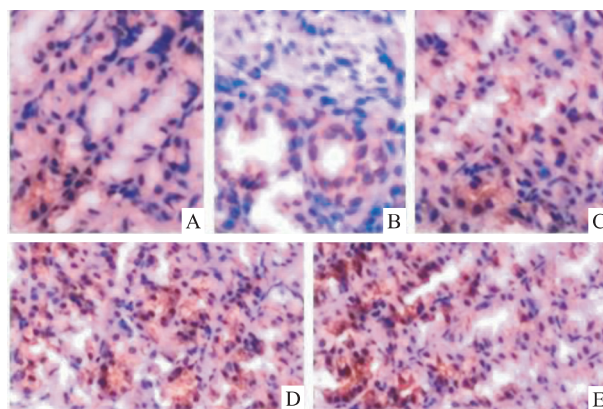


图3 各组大鼠 TFF1 表达 SP × 200

A: 正常组; B: 模型组; C: 溃疡方低剂量组; D: 溃疡方高剂量组; E: 雷尼替丁组

及 EGFR 作为重要的防御性细胞因子参与了这一过程。TFF1 是三叶因子家族成员之一, 三叶因子家族是一组对胃肠黏膜有重要保护和修复作用的小分子肽, TFF1 最早是 Masiakowski et al 1982 年从雌激素诱导的人乳腺癌细胞系 MCF-7 中获得, 在正常组织中, TFF1 主要在胃体及胃窦黏膜上皮表面细胞表达, 当胃肠道黏膜发生损伤时, 这种表达专一性消失^[3], 他可在整个胃肠黏膜损伤部位表达, 且较正常黏膜表达明显升高, 提示 TFF1 可促进细胞的迁移、增殖或分化, 在胃黏膜重建、修复中发挥重要作用^[4-5], 但其作用的发挥与 EGFR 酪氨酸激酶信号途径紧密相关^[6], 且 TFF1 诱导血管生成时必须依赖于 EGFR^[7]。也有研究^[8]表明, 胃黏膜损伤早期 TFF1 即可通过表达上调促进黏膜修复, 当胃黏膜严重受损, TFF1 不能正常表达而影响损伤黏膜的修复。本研究结果显示, 大鼠乙酸性溃疡模型组 TFF1、EGF 的表达均低于正常组, 推测 TFF1、EGF 的降低可能与胃溃疡的发生有一定的关系, 经溃疡方治疗后 TFF1、EGF 的含量均显著高于模型组, 表明溃疡方对乙酸性胃溃疡大鼠胃黏膜损伤有较好的修复作用, 其机制可能与合成和分泌 TFF1、EGF 有关, 本研究发现二者的表达范围一致, 即二者具有一定的协同增效趋势, 与刘密等^[9]研究观点一致。免疫组化结果显示, 与模型组相比, 溃疡方各剂量组及雷尼替丁组 TFF1 及 EGFR 显著升高, 差异有统计学意义, 两者具有一定的协同作用, 刘晓玲等^[6]研究也证明了此观点, 进一步说明 TFF1 可能是通过与 EGFR 的结合后才具有促进溃疡愈合的作用。

EGF 是一类内源性保护物质, 能促进上皮细胞增殖、分化和迁移, 具有修复和保护胃黏膜的作用, 是维持胃黏膜的完整性的重要介质^[10]。但 EGF 发

挥作用依赖于与其受体 EGFR 的特异性结合。EGFR 是一种具有酪氨酸活性的重要跨膜受体,参与调节胃黏膜上皮更新和修复过程。研究^[11]显示大鼠胃黏膜组织 EGF 与 EGFR 的表达有同步性,且与胃溃疡愈合质量一致,进一步说明 EGF 与 EGFR 的有效结合,显著抑制了胃酸分泌,增加了胃黏膜血流量,促进损伤黏膜修复。结合本研究结果提示:胃黏膜组织 TFF1、EGF、EGFR 三者在对胃黏膜防御、降低胃黏膜易性、促进受损胃黏膜重建修复等方面有一定协同作用,三者相互影响、相互作用,共同促进上皮细胞增生、损伤黏膜修复,发挥抗溃疡的作用,且随溃疡方浓度的增加,黏膜修复更快。

综上所述,溃疡方促进大鼠乙酸性胃溃疡愈合是通过上调 EGF 及 EGFR 的表达,启动黏膜修复机制,同时增加防御细胞保护因子 TFF1 的含量,诱导 TFF1、EGF、EGFR 三者间协同作用,加强胃黏膜细胞增殖能力,加快上皮细胞移行速度,提高溃疡的愈合质量。这在一定程度上也体现了中医药多靶点、多层次的作用特点,这一复杂的过程还会涉及其它一些因子及信号途径的参与,有待于进一步的探讨。

参考文献

- [1] Okabe S, Amagase K. An overview of acetic acid ulcer models the history and state of the art of peptic ulcer research [J]. *Biol Pharm Bull* 2005 28 (8): 1321-41.
- [2] Nie S N, Qian X M, Wu X H, et al. Role of TFF in healing of stress-induced gastric lesions [J]. *World J Gastroenterol* 2003, 9 (8): 1772-6.
- [3] Ribieras S, Tomasetto C, Rio M C, et al. ThepS2/TFF1 trefoil factor from basic research to clinical applications [J]. *Biochim Biophys Acta* 1998, 13(78): 61-77.
- [4] 杨俊, 戴一扬, 厉朝喜, 等. 三叶肽因子 I 表达与胃癌及胃溃疡的关系 [J]. *浙江医学* 2012 34(8): 587-9.
- [5] Song J Y, Kim B W, Lee A W, et al. Expression of MUC5AC and trefoil peptide 1 (TFF1) in the subtypes of intestinal metaplasia [J]. *Clin Endosc* 2012 45(2): 151-4.
- [6] 刘晓玲, 王汝俊, 莫旺福. 补中益气汤对脾虚大鼠胃黏膜 TFF1 mRNA 与蛋白表达的影响 [J]. *中药药理与临床*, 2012, 28(3): 25-7.
- [7] 潘卫新, 卜平, 朱海航. 胃癌及癌前病变中的 TFF1、EGFR 表达与血管再生的相关性研究 [J]. *临床消化病杂志*, 2009 21(6): 339-41.
- [8] 任建林, 何绍珍, 潘金, 等. 三叶因子 I 在乙醇诱导的大鼠急性胃黏膜损伤中的表达 [J]. *胃肠病学* 2008, 13(3): 145-8.
- [9] 刘密, 常小荣, 严洁, 等. 艾灸预处理对大鼠应激性胃黏膜损伤增殖修复相关因子的影响 [J]. *世界华人杂志*, 2012 20(1): 53-9.
- [10] Yi S X, Yang R D, Yan J, et al. Effect of electroacupuncture at Foot-Yangming Meridian on somatostatin and expression of somatostatin receptor genes in rabbits with gastric ulcer [J]. *World J Gastroenterol* 2006, 12(11): 1761-5.
- [11] 文国容, 徐靖宇, 刘雪梅, 等. 胃乐散对大鼠胃溃疡黏膜 EGFR、EGFR 和 TGF- β 1 的影响及意义 [J]. *时珍国医国药* 2012, 23(1): 3-4.

Effects kui-yang-fang on TFF1, EGF and EGFR in acetic acid induced gastric ulcers of rats

Liu Na, Jiang Wei, Tang Jing

(Dept of Gastroenterology, The Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 451001)

Abstract Objective To investigate the effects of kui-yang-fang on trefoil factor 1 (TFF1), epidermal growth factor (EGF) and epidermal growth factor receptor (EGFR) in acetic acid induced gastric ulcers of rats. **Methods** 50 rats were randomly divided into five groups. The rats of the gastric ulcer model were used by the icy acetic acid. After drug treatment for 14 days, the rats gastric mucosa was collected to compare to the ulcer index, then check the content of TFF1, EGF and EGFR with RT-PCR and observe TFF1, EGFR with immunohistochemical staining. **Results** Compared to the control, the levels of TFF1 and EGF in model group decreased, and the difference was not statistically significant. The EGFR level of model group was higher than that of normal group with no statistically significant difference. But the increase of kui-yang-fang groups and ranitidine group was more obvious, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Compared to the model group, kui-yang-fang and ranitidine groups significantly elevated the level of TFF1, EGF and EFR in gastric ulcer, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Immunohistochemical staining showed that TFF1 and EGFR expression in kui-yang-fang and ranitidine groups were significantly increased, the difference was statistically significant ($P < 0.01$), but the increase of kui-yang-fang of high-dose group was more obvious. **Conclusion** One of the possible mechanism is kui-yang-fang promotes expression of TFF1, EGF and EGFR to protect and repair gastric tissue.

Key words gastric ulcer; kui-yang-fang; trefoil factor 1; epidermal growth factor; epidermal growth factor receptor