

养阴活胃合剂对慢性萎缩性胃炎模型大鼠胃黏膜淋巴瘤-2 基因和三叶因子 1 表达的影响

陈彦竹 何小艳 曾斌芳

【摘要】 目的 探讨养阴活胃合剂对慢性萎缩性胃炎模型大鼠 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 和三叶因子 1 (trefoil factor 1, TFF1) 基因蛋白表达的影响及机制。**方法** 将实验大鼠随机分为空白对照组、模型组、中药低、中、高剂量组及阳性药物对照组, 每组 16 只。除空白对照组常规饲养、自由进食水外, 均采用 2 g 水杨酸钠加入 100 mL 的 30% 乙醇溶液中给大鼠灌胃, 每天 1 次, 每次 3 mL, 配合隔日喂食不禁水法造成慢性萎缩性胃炎模型, 模型复制成功后分别运用中药低、中、高剂量及维生素治疗, 采用免疫组化法检测大鼠胃黏膜 Bcl-2 及 TFF1 表达阳性细胞数, 光镜观察胃黏膜病理组织学变化。**结果** 采用单因素方差分析法, 组间比较采用方差分析中的 LSD 法。与空白对照组 (18.08%) 比较, 各组 Bcl-2 蛋白阳性表达率均明显升高 ($P < 0.05$); 与模型组 (43.41%) 比较, 应用养阴活胃合剂治疗后, 中药高、中剂量组 Bcl-2 蛋白阳性表达率均明显降低 ($P < 0.05$)。与空白对照组 (95.66%) 比较, 各组 TFF1 蛋白阳性表达率均明显降低 ($P < 0.05$), 除中药高剂量组 TFF1 蛋白阳性表达率接近于空白对照组外 ($P > 0.05$); 与模型组 (84%) 比较, 中药高、中剂量组 TFF1 蛋白阳性表达率均明显升高 ($P < 0.05$)。**结论** 养阴活胃合剂对 CAG 大鼠模型有良好的治疗作用, 能够改善慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜病理形态, 提示养阴活胃合剂可能通过下调 Bcl-2 的表达, 上调 TFF1 表达起到治疗效果。

【关键词】 慢性萎缩性胃炎; 养阴活胃合剂; B 淋巴细胞瘤-2 基因; 三叶因子 1

【中图分类号】 R259 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.12.004

Effect of Yangyin Huowei mixture on gastric mucosalymphocytoma-2 gene and the expression of TFF-1 in rats with chronic atrophic gastritis CHEN Yan-zhu, HE Xiao-yan, ZENG Bin-fang.

College of Traditional Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Corresponding author: ZENG Bin-fang, E-mail: 2552721714@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the influence and mechanism of Yangyin Huowei mixture in B-cell lymphoma 2 gene (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) and trefoil factor-1 (TFF-1) gene expression of chronic atrophic gastritis rats model. **Methods** The experimental rats were randomly divided into control group, model group, low dose, middle dose, high dose group and positive control group, 16 rats in each group. Control group were treated with conventional farming, free access to water and food. Other groups were gavage administration solution which was sodium salicylate 2g adding in 100ml of 30% ethanol, 1 times a day, each time 3ml. And the rats were feed with alternate days to induced chronic atrophy gastritis model. When the model was successful, the rats were gavage administration with chinese medicine and riboflavin.

基金项目: 国家自然科学基金 (81160431)

作者单位: 830011 乌鲁木齐, 新疆医科大学中学院 [陈彦竹 (硕士研究生)、何小艳 (硕士研究生)、曾斌芳]

作者简介: 陈彦竹 (1989-), 女, 2013 级在读硕士研究生。研究方向: 消化系统疾病的中医药治疗。E-mail: 393522635@qq.com

通讯作者: 曾斌芳 (1965-), 博士, 教授, 博士生导师, 主任医师。研究方向: 消化系统疾病的中医药治疗。E-mail: 2552721714@qq.com

Immunohisto chemical method was used to detect positive cells of Bcl-2 and TFF-1, and light microscope was used to observe the changes of gastric mucosa. **Results** The results were compared with single factor analysis of variance, and the comparison among groups was performed with LSD method. Compared with the control group (18.08%), the positive expression rate of bcl-2 protein were significantly increased ($P<0.05$); and compared with the model group (43.41%), positive expression rate of bcl-2 protein were significantly decreased in *Yangyin Huowei* mixture high and middle dose group ($P<0.05$). Compared with the control group (95.66%), the positive expression rate of TFF-1 protein was significantly decreased ($P<0.05$) in other groups. The positive expression rate of TFF-1 protein in the high dose group was close to control group ($P>0.05$); the positive expression rate of TFF-1 protein in *Yangyin Huowei* mixture high and middle dose group was significantly higher than that in model group (84%). **Conclusion** *Yangyin Huowei* mixture in treatment of CAG rat model has good effect, and it can improve the pathological morphology of chronic atrophic gastritis in rat. all above show that *Yangyin Huowei* mixture can down-regulation of bcl-2 expression and up regulation of TFF-1 expression to have a good therapeutic effect.

【Key words】 Chronic atrophic gastritis; *Yangyin Huowei* mixture; Bcl-2; TFF-1

慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 为胃癌前变化的最初阶段,国内临床报道中药可以阻断或逆转胃癌的癌前病变^[1]。CAG 病因复杂,具有病程长、反复发作的特点。经过多年临床验证总结出养阴活胃合剂方,可改善 CAG 患者临床症状,能够改善局部病理以及逆转胃黏膜的病理状态,使病变胃黏膜趋于正常,对治疗慢性萎缩性胃炎有良好效果^[2],为了探讨该方对 CAG 的作用机制,本研究团队应用该方对动物模型进行了研究,观察其对 CAG 大鼠胃黏膜细胞相关因子 B 淋巴细胞瘤-2 基因 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 和三叶因子 1 (trefoil factor 1, TFF1) 基因表达的影响,并探讨其可能的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级成年雄性 Wistar 大鼠 96 只,体质量 150~200 g,标准颗粒饲料,均由新疆医科大学实验动物中心提供[许可证号:SCXK(新)2003-0001]。

1.2 药物及给药方法

中药养阴活胃合剂组成:阿魏、芦根、白术、茯苓、鸡内金、莪术^① 15 g、海螵蛸 30 g、旋覆花 10 g、炙远志、砂仁、炙甘草^② 6 g。由新疆维吾尔自治区中医药研究院提供水煎剂。模型复制成功后除空白对照组常规饲养、自由进食水外,模型组继续施加上述造模因素,养阴活胃合剂高、中、低剂量组分别喂饲水煎剂 2.22 g/(kg·d)、1.48 g/(kg·d) 和 0.74 g/(kg·d),阳性药物对照组予维酶素 0.86 g/(kg·d) 灌胃,共 12 周。

1.3 主要试剂与仪器

(今宁)维酶素片(湖北绿金子药业有限责任公

司生产,批号:120901);无水乙醇(天津市静海县大邱庄工业园区生产,批号:20131106);水杨酸钠(天津市化学试剂三厂生产,批号:20070916);兔抗 Bcl-2 多抗 IgG,免疫组化试剂盒为英国 abcam 公司产品;兔抗 TFF1 多抗 IgG,免疫组化试剂盒为美国 GeneTex 公司产品。

TD5AWS 台式离心机(长沙湘仪离心仪器有限公司);电热恒温培养箱 DNP-9162(上海跃进医用光学仪器厂)。

1.5 模型制备

将实验大鼠随机分为 6 组,即空白对照组,模型组,阳性药物对照组,中药高、中、低剂量组,每组 16 只。大鼠颗粒饲料适应性喂养 1 周后,空白对照组常规饲养、自由进食水,其余 5 组将 2 g 水杨酸钠加入 100 mL 的 30% 乙醇溶液中,给大鼠灌胃 3 mL/d,灌胃前 1 小时禁食、禁水;再配合隔日进食不禁水法,直到 12 周造模结束。每组处死 2 只大鼠,观察胃黏膜肠上皮化生和萎缩情况,以证实 CAG 造模成功。

1.6 取材及标本处理

末次给药后禁食不禁水 24 小时,5% 戊巴比妥麻醉大鼠,剖取全胃,沿胃大弯侧剖胃腔,作大体观察,以 4% 多聚甲醛溶液固定,常规取材,石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下组织形态观察。

1.7 Bcl-2 与 TFF1 免疫组化染色方法

采用通用型二步法免疫组化法检测。石蜡切片脱蜡至水洗;3% H_2O_2 去除内源性过氧化氢酶,PBS 液冲洗 3 次,蒸馏水洗 3 次;枸橼酸钠缓冲液修复抗原,PBS 冲洗 3 次,蒸馏水洗 3 次;加入山羊血清封闭非特异性抗原;一抗按照适当比例稀释滴入(以 PBS 代替一抗作为阴性对照),4℃ 冰箱孵育过夜,次日 37℃ 下复温 30 分钟,PBS 冲洗 3 次;滴加

通用型二抗,37℃温箱孵育 25 分钟,PBS 洗涤 3 次;DAB 显色 3~5 分钟,苏木素复染 10 秒,蒸馏水冲洗返蓝;各级乙醇脱水;二甲苯透明,中性树胶封固,显微镜下观察。各指标结果用标记指数(u)表示;LI:阳性细胞数/计数细胞总数×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,计算各指标阳性细胞表达率。

1.8 统计学处理

应用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理,计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析进行统计分析,经检验数据服从正态分布且方差齐,组间比较采用 LSD 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠胃组织肉眼观察比较

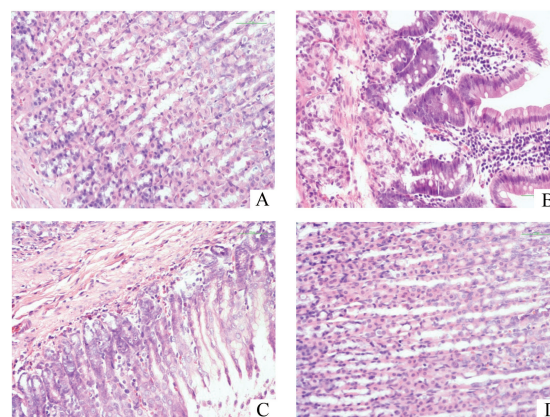
空白对照组大鼠胃黏膜柔软,表面较多黏液,皱襞面光滑,胃壁弹性良好,呈橘红色。模型组大鼠胃黏膜薄弱粗糙,灰白色泽,表面黏液减少,可见细小颗粒和结节,亦可见黏膜糜烂出血,皱襞变细,胃壁弹性减低,养阴活胃合剂组及阳性药维酶素组部分胃黏膜基本恢复正常,以养阴活胃合剂组为明显。

2.2 胃组织形态观察比较

空白对照组大鼠胃黏膜厚度正常,黏膜上皮层呈单层柱状,上皮细胞及腺体排列整齐,大小形状较为一致,固有层可见少许嗜酸性粒细胞散在,无增生和化生现象,肌层未见明显变化。模型组胃黏膜固有层腺体均有不同程度减少,胃黏膜固有层变薄,黏膜下层充血、水肿,黏膜固有层下部局灶性淋巴细胞、嗜酸性粒细胞浸润较明显,可见黏膜肌层增厚,胃幽门部位腺体结构不完整,肠上皮化生。阳性药物对照组胃黏膜较薄,固有层腺体有轻度减少,淋巴细胞灶性浸润。中药高剂量组胃黏膜基本正常,腺体排列较规整,可见散在淋巴细胞灶性浸润,未见肠上皮化生。见图 1。说明养阴活胃合剂与阳性药物对照组均能改善胃黏膜的病理形态,但以养阴活胃合剂效果为佳。

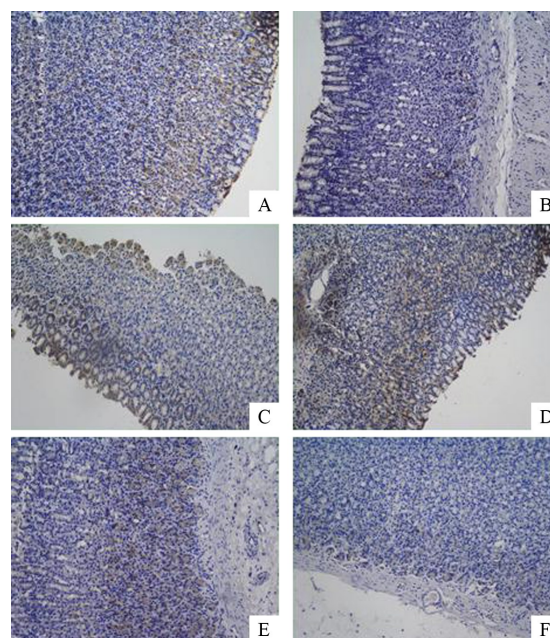
2.3 各组大鼠胃黏膜 Bcl-2 免疫组化染色统计的比较

Bcl-2 蛋白阳性反应物质呈棕黄色颗粒,主要位于细胞浆内。空白对照组大鼠胃黏膜有极少量阳性细胞染色为细胞质染色,细胞核有少量表达;阳性药物对照组和中药高、中剂量组大鼠胃黏膜部分细胞可见黄色、褐色程度不同的染色,与模型组比较染色较浅;模型组染色最重。见图 2。



A 空白组 B 模型组 C 阳性药物对照组 D 中药高剂量组

图 1 大鼠胃黏膜组织 HE 染色病理切片(HE×200)



A 空白对照组 B 模型组 C 阳性药物对照组
D 中药高剂量组 E 中药中剂量组 F 中药低剂量组

图 2 各组大鼠胃黏膜中 Bcl-2 蛋白的表达情况(×200)

采用阳性着色细胞计数法,统计结果:与空白对照组比较,各组 Bcl-2 蛋白阳性表达率均明显升高($P < 0.05$);与模型组比较,中药高、中剂量组和阳性药物对照组 Bcl-2 蛋白阳性表达率均明显降低($P < 0.05$);与阳性药物对照组比较,中药高剂量组 Bcl-2 蛋白阳性表达率明显降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);中药高、中、低剂量组间比较,中药低剂量组 Bcl-2 明显高于中药高、中剂量组($P < 0.05$)。见表 1。

2.4 各组大鼠胃黏膜 TFF1 免疫组化染色统计的比较

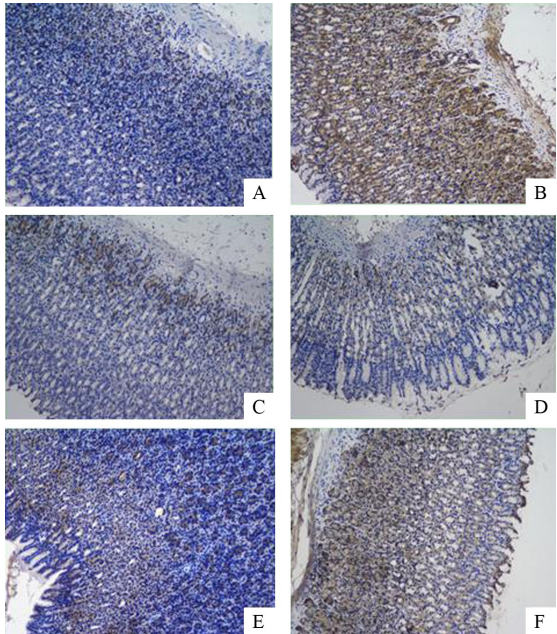
TFF1 主要表达于胃黏膜腺体细胞胞浆中,细胞膜及细胞核中有少量表达。空白对照组大鼠胃黏

膜腺体细胞胞浆有大量阳性细胞表达,核周聚焦明显,呈棕黄色,染色最深见于接近腔面的细胞;阳性药物对照组和中药组大鼠胃黏膜部分细胞可见黄色程度不等的染色,与模型组比较染色较重;模型组染色最轻。见图 3。

表 1 各组大鼠胃黏膜 Bcl-2 和 TFF1 阳性表达率的比较($\bar{x}\pm s$, 表达率/%)

组别	n	Bcl-2 阳性	TFF1 阳性
空白对照组	14	18.08±1.62	95.66±1.7
阳性药物对照组	13	37.45±2.69 ^{ab}	89.40±2.45 ^{ab}
模型组	11	43.41±3.14 ^b	84.00±2.79 ^b
中药高剂量组	12	32.25±2.59 ^{abcd}	93.33±4.18 ^{acd}
中药中剂量组	12	34.90±3.28 ^{abd}	90.90±5.76 ^{abd}
中药低剂量组	13	40.54±7.03 ^b	86.68±5.01 ^b

注:与模型组比较,^a $P<0.05$;与空白对照组比较,^b $P<0.05$;与阳性药物对照组比较,^c $P<0.05$;与中药低剂量组比较,^d $P<0.05$ 。



A 空白对照组 B 模型组 C 阳性药物对照组
D 中药高剂量组 E 中药中剂量组 F 中药低剂量组

图 3 各组大鼠胃黏膜中 TFF1 蛋白的表达情况(×200)

采用阳性着色细胞计数法,统计结果:与空白对照组比较,除中药高剂量组接近于空白对照组外($P>0.05$),其余各组 TFF1 阳性表达率均明显降低($P<0.05$);与模型组比较,中药高、中剂量组和阳性药物对照组 TFF1 蛋白阳性表达率均明显升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与阳性药物对照组比较,中药高剂量组 TFF1 蛋白阳性表达率明显升高($P<0.05$);中药高、中、低剂量组间比较,中药低剂量组 TFF1 阳性表达率明显低于中药高、中剂量组($P<0.05$)。见表 1。

3 讨论

CAG 多由慢性浅表性胃炎演变而成,是导致胃癌发生的重要原因。其病情迁延反复难愈,兼于长期的病理损伤本身、内伤外邪等诸多因素而导致血络瘀阻。本实验中养阴活胃合剂能够改善大鼠腺体萎缩情况,使病变胃黏膜趋于正常,对 CAG 大鼠有良好治疗作用。方中芦根养阴和胃降逆,配伍白术、茯苓健脾助运,加之阿魏消积散痞,莪术可活血行气止痛,旋复花、炙远志兼顾疏肝理气、化痰通络,合鸡内金、砂仁消食和胃,诸药配合,标本兼顾,共奏养阴活血,化痰和胃之功。

临床资料证实胃癌前状态和胃癌组织中 TFF1 的表达明显下调,可能是胃黏膜恶变的早期事件之一^[3]。TFF1 作为三叶因子家族成员之一,具有保护胃肠道黏膜、促进细胞迁移和黏膜修复的重要作用。本研究结果发现,中药组 TFF1 阳性表达率明显高于其他各组,提示养阴活胃合剂可能通过增加胃黏膜 TFF1 表达而起到治疗慢性萎缩性胃炎的作用,从而抑制肿瘤的产生。Bcl-2 是 Tsujimoro 等人在 1985 年最先从滤泡性非霍奇金淋巴瘤中分离出来的一个抗凋亡基因。转基因研究表明,Bcl-2 为致癌基因,主要通过抑制线粒体依赖性凋亡通路被激活的功能达到抑制细胞凋亡和延长细胞寿命的作用造成肿瘤细胞堆积^[4]。本研究发现模型组大鼠胃窦黏膜 Bcl-2 阳性表达明显升高,经养阴活胃合剂干预后,中药高、中剂量组及阳性药物对照组 Bcl-2 蛋白阳性表达均呈减少趋势,表明养阴活胃合剂能不同程度地下调 Bcl-2 蛋白表达,可能在一定程度上促使胃黏膜上皮细胞细胞增殖和细胞凋亡平衡,改善甚至逆转 CAG 胃黏膜的病理状态。

综上所述,通过本研究提示养阴活胃合剂可明显降低 Bcl-2 和增强 TFF1 的表达,通过保护胃黏膜细胞,阻止癌前病变进一步发展,促使病变胃黏膜恢复正常,起到改善甚至逆转 CAG 病变的作用。

参 考 文 献

[1] 王文,张仲海,夏天.消萎灵对大鼠胃黏膜癌前病变的逆转作用[J].新中医,1999,31(7):39-40.
[2] 戴明,丁国宁,雷云霞,等.养阴活胃合剂治疗慢性萎缩性胃炎患者胃镜组织学影响[J].陕西中医,2013,7(9):34.
[3] 石淑青,蔡建庭.三叶因子 I 和 II 在胃癌和癌前状态中的表达[J].中华内科杂志,2004,43(3):195-198.
[4] Mariano M T, Moritti I, Donelli A, et al. Bcl-2 gene expression in hematopoietic cell differentiation[J]. Blood, 1997, 80: 768-775.

(收稿日期: 2015-06-19)
(本文编辑: 蒲晓田)