

胃和冲剂 II 号对慢性萎缩性胃炎大鼠 EGF 和 EGFR 表达的影响

雷 丽¹ 麻春杰² 杨喜平²

(1 内蒙古自治区包头市肿瘤医院放疗科, 包头, 014030; 2 内蒙古医科大学中医学院中医基础教研室, 呼和浩特, 010020)

摘要 目的: 观察胃和冲剂 II 号对 CAG (Chronic Atrophic Gastritis, CAG) 大鼠胃黏膜 EGF 和 EGFR 表达的影响, 探讨胃和冲剂 II 号治疗 CAG 的作用机制。方法: 将 72 只雄性 Wistar 大鼠随机分为正常对照组 12 只和造模组 60 只。除正常对照组外, 其余各组大鼠均使用综合造模法成功复制 CAG 动物模型。然后将造模组分为 5 组, 分别为模型组, 维酶素对照组, 胃和冲剂 II 号低、中、高剂量组。对各组大鼠施加相应治疗因素 60 d 后, 取各大鼠相同部位全层胃壁组织, 采用免疫组化法分别检测胃黏膜组织的 EGF 和 EGFR 的表达水平。结果: EGF 在胃和冲剂 II 号高剂量组中的表达值为 (1.25 ± 0.16) , 低于 CAG 大鼠模型组的表达值 (2.98 ± 0.15) , 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 胃和冲剂 II 号高剂量组 EGFR 的表达值为 (1.636 ± 0.809) , 低于模型组的表达值 (3.300 ± 1.337) , 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。结论: 胃和冲剂 II 号可能通过降低胃黏膜组织的 EGF 和 EGFR 的表达, 加快胃黏膜细胞的修复和抑制过度增殖, 从而对 CAG 起到治疗作用。

关键词 胃和冲剂 II 号; 慢性萎缩性胃炎; EGF; EGFR

The Effect of Weihe Granule II on the Expression Level of EGF and EGFR in CAG Rats

Lei Li¹, Ma Chunjie², Yang Xiping²

(1 Department of Radiation Oncology, Baotou Tumor Hospital, Baotou 014030, China; 2 College of Traditional Chinese medicine, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010020, China)

Abstract Objective: To explore the treatment effect of Weihe granule II on CAG by analyzing the expression level of EGF and EGFR in gastric mucosal of model rats of CAG treated with Weihe granule II. **Methods:** Seventy-two male Wistar rats were randomly divided into two groups, control group ($n = 12$) and model group ($n = 60$). The rat model of CAG in model group was created using comprehensive modeling method. Then, all rats in model group were assigned into five sub-groups, namely model sub-group, Vitacoenzyme control sub-group, low-dose sub-group, mediate-dose sub-group and high-dose Weihe granule II sub-groups. After all rats in each group were subjected to the corresponding treatments for 60 days, the expression level of EGF and EGFR in the same gastric tissue of each rat were be examined and compared with other groups. **Results:** The expression of EGF in the high-dose Weihe granule II sub-group (1.25 ± 0.16) was lower than that in model sub-group (2.98 ± 0.15), ($P < 0.01$); the expression of EGFR, in the high-dose Weihe granule II sub-group (1.636 ± 0.809) was lower than that in model sub-group (3.300 ± 1.337) ($P < 0.01$). **Conclusion:** Weihe granule II can treat CAG by decreasing the expression levels of EGF and EGFR in gastric mucosal to repair the gastric mucosal cells and inhibit the excessive proliferation for cancer prevention.

Key Words Weihe granule; Chronic atrophic gastritis; EGF; EGFR

中图分类号: R243; R573.3+2 文献标识码: A doi: 10.3969/j.issn.1673-7202.2014.01.029

表皮生长因子 (Epidermal Growth Factor, EGF) 是分子量为 6 045 道尔顿的多肽, 主要由颌下腺、胰腺和小肠分泌, 是参与胃黏膜损伤修复过程中最重要的肽类物质。表皮生长因子受体 (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR) 是正常上皮、间质、神经源性组织中表达的一类蛋白受体。当 EGFR 与其配体表表皮生长因子结合后, 一方面可以抑制胃酸分泌, 促进胃黏膜细胞分泌前列腺素, 保护胃黏膜^[1-2]; 另一方面对于细胞增殖、存活、黏附、转移及血管发生都发挥着重要作用^[3-4]。90% 的恶性肿瘤特别是在上皮源性的肿瘤, 其表皮生长因子受体与细胞的凋亡、增殖、分化、迁移

及细胞周期循环关系密不可分, 在良、恶性病变转化过程中起着非常重要的作用。我们对表皮生长因子及其受体在慢性萎缩性胃炎中的表达及胃和冲剂 II 号的干预作用进行了研究。

1 材料与方法

1.1 设计 随机对照动物实验。

1.2 材料 雄性 Wistar 大鼠 72 只, 体重 (180 ± 20) g, 内蒙古大学实验动物研究中心提供。合格证号: SCXK(蒙)2002-0001。

1.3 试剂和仪器 大鼠表皮生长因子 (EGF) 酶联免疫分析 (ELISA) 试剂盒, 由美国 ADLITTERAM DIAG-

NOSTIC LABORATORIES 公司提供, 标号: RT110371。鼠抗人上皮生长因子受体免疫组化单克隆抗体, 福州迈新生物技术开发有限公司, 批号: 100803196A。DAB 显色试剂盒, 福州迈新生物技术开发有限公司, 批号: 100907414E。S-P 超敏试剂盒, 福州迈新生物技术开发有限公司, 批号: 10083197201。电热恒温箱 XMT-152A; 冰箱伊莱克斯 BCD-263; 压力锅 AS18-35-80; 电热恒温水槽 cata No. 0415-21466c; 组织切片机德国莱卡 RM2235; 光学显微镜 OLYMPUS BX41; 酶联免疫检测仪 DG3022A 型 国营华东电子管厂制造; 医用图像分析系统 LOGENE-1 (朗珈)。25% 氨水, 天津市大茂化学试剂厂。

1.4 方法

1.4.1 实验药物 胃和冲剂 II 号: 半夏、党参、干姜、黄连、黄芩、丹参等组成, 制成袋装, 每袋 12 g, 由内蒙古中蒙医院国家蒙药制剂中心提供, 批号: 20061001。维酶素片, 河北环海药业有限公司生产, 批号: 20070609。

1.4.2 动物模型的复制 将 72 只 Wistar 大鼠随机分为正常对照组 12 只和造模组 60 只, 按照《中药药理实验方法学》给大鼠 1% 氨水为饮料自由饮用^[5], 同时热盐水(55℃, 150 g/L 氯化钠)灌胃^[6], 1 次/d, 每次 2.5 mL, 并结合饥饿失常(2 d 足食, 1 d 禁食)。造模 90 d, 经病理形态学确定成功后, 将 CAG 大鼠再随机分为模型组、胃和冲剂 II 号低剂量组、胃和冲剂 II 号中剂量组、胃和冲剂 II 号高剂量组和维酶素阳性对照组。对照组大鼠每日灌服蒸馏水 2.5 mL。

1.4.3 给药方法 对照组: 每日按 10 mL/kg 大鼠体重灌服蒸馏水; 模型组: 每日按 10 mL/kg 大鼠体重灌服蒸馏水; 胃和冲剂 II 号低、中、高剂量组: 给药剂量分别为 2 g/kg、4 g/kg、8 g/kg 大鼠体重; 维酶素组: 按 0.5 g/kg 大鼠体重给药。连续灌胃给药 60 d。

1.4.4 指标检测 实验结束, 处死大鼠, 取胃, 用电子天平在腺胃部称取 0.5 g 胃组织, 眼科小剪刀尽快剪碎, 置于匀浆器中, 加入 9 倍量的冰生理盐水, 用匀浆器制成 10% 的组织匀浆(匀浆器的末端置于放冰块的冷水中), 3 500 r/min 离心 15 min, 取上清液置 4℃ 冰箱保存, 按大鼠表皮生长因子(EGF) ELISA 试剂盒说明书要求在酶联免疫检测仪上检测 EGF 的含量; 取各大鼠相同部位(沿胃小弯自前胃至幽门取全层胃壁 1 块(3 mm × 20 mm)的胃组织条块固定在 10% 中性甲醛液中作常规的石蜡切片、HE 染色等以观察病理组织变化及进行免疫组化, 检测 EGFR 表达情况。

1.5 主要观察指标 各组大鼠胃黏膜组织表皮生长因子含量、表皮生长因子受体的表达量。

1.6 统计学分析 所有数据分析采用统计软件 SPSS 16.0。数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 组间差异采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析纳入大鼠 72 只, 于造模过程中死亡 1 只, 造模结束后抽样处死 7 只, 64 只进入结果分析。

2.2 免疫组化染色、图像分析采用双盲法进行观察, EGFR 结果判断标准: 阳性信号主要定位于细胞膜。根据染色反映的深度及阳性细胞的数量判断, 按经典免疫组化评分标准进行评分, 高倍镜下选择 5 个有代表性视野, 出现黄色颗粒为阳性染色, 将染色强度分为 4 级: 无黄色颗粒为 0 级, 计 0 分; 淡黄色颗粒为 1 级, 计 1 分; 黄色颗粒为 2 级, 计 2 分; 棕色颗粒为 3 级, 计 3 分。将细胞染色阳性百分比分为 4 级: 阳性细胞数 $< 25\%$ 为(-), $26\% \sim 49\%$ 为(+), $50\% \sim 75\%$ 为(++), $> 75\%$ 为(+++), 分别计为 0 ~ 3 分。两者评分相加为最终评分。

2.3 通过检测各组大鼠胃组织 EGF 的含量, 结果显示: 与正常组相比, 各造模组 CAG 大鼠胃组织 EGF 的含量显著升高($P < 0.01$); 而给药干预各组大鼠胃组织的 EGF 的含量较模型组降低($P > 0.05$), 特别是胃和冲剂高剂量组大鼠胃黏膜组织中的 EGF 含量降低明显($P < 0.01$)。具体数据见表 1。

表 1 胃和冲剂 II 号对大鼠胃黏膜 EGF 含量的影响

组别	例数(n)	EGF 含量(ng/mL)
正常组	10	0.69 ± 0.11
模型组	10	2.98 ± 0.15**
低剂量组	10	1.73 ± 0.25**△
中剂量组	11	1.47 ± 0.14**△
高剂量组	12	1.25 ± 0.16**△▲
维酶素组	11	1.61 ± 0.12**△

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$, 与模型组比较, △△ $P < 0.01$; 与维酶素组比较, ▲ $P < 0.05$ 。

表 2 胃和冲剂 II 号对大鼠胃黏膜 EGFR 蛋白表达的影响

组别	例数(n)	EGFR 蛋白的表达
正常组	10	1.500 ± 0.707
模型组	10	3.300 ± 1.337**□
低剂量组	10	2.500 ± 1.080□
中剂量组	11	1.909 ± 0.831*△□
高剂量组	12	1.636 ± 0.809*△△▲
维酶素组	11	3.091 ± 1.221

注: 与正常组比较, ** $P < 0.01$; 与正常组比较, * $P > 0.05$; 与模型组比较, △ $P < 0.05$; 与模型组比较, △△ $P < 0.01$; 与维酶素组比较, ▲ $P < 0.05$; 与维酶素组比较, □ $P > 0.05$ 。

2.4 通过测定不同组的 CAG 大鼠胃黏膜组织 EGFR 表达情况, 发现与对照组大鼠相比, 模型组大鼠胃黏膜组织中的 EGFR 蛋白表达明显升高($P < 0.01$); 与模型组大鼠相比, 胃和冲剂高剂量组大鼠胃黏膜组织中的 EGFR 蛋白表达明显降低($P < 0.01$), 中剂量组大鼠胃黏膜组织中的 EGFR 蛋白表达降低($P < 0.05$);

与维酶素组相比胃和冲剂高剂量组的大鼠胃黏膜组织中 EGFR 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), 中、低剂量组大鼠胃黏膜组织中的 EGFR 蛋白表达没有差异 ($P > 0.05$), 具体数据见表 2 和图 1。

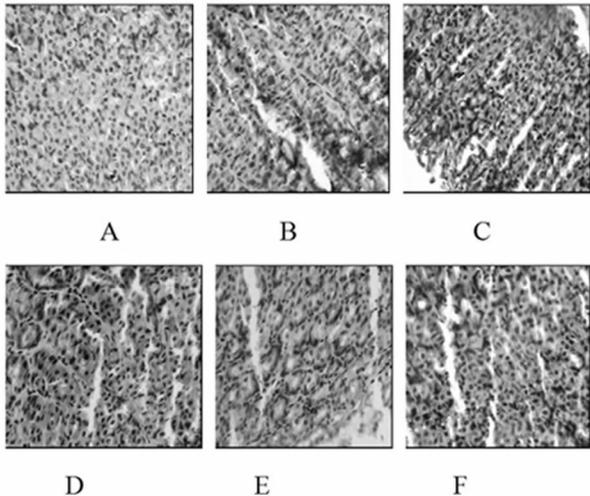


图 1 大鼠胃黏膜 EGFR 免疫组化图片 (200 ×)

注:A:对照组,B:模型组,C:胃和冲剂 II 号低剂量组,D:胃和冲剂 II 号中剂量组,E:胃和冲剂 II 号高剂量组,F:维酶素组

3 讨论

慢性萎缩性胃炎是胃黏膜表面反复受到损害后导致的病变,表现为腺体萎缩、数量减少,胃黏膜变薄,或伴炎性反应、肠上皮化生及不典型增生,易反复发作,临床较难治愈,为胃癌癌前状态之一,癌变率为 2.55% ~ 7.46%^[7]。

表皮生长因子与其受体结合后可进一步激活 STAT3 及 MAPK 信号传导通路,促进细胞增殖并抑制凋亡,在细胞增殖、存活、粘附、转移及血管发生中起重要作用^[8-9]。作为一个广泛表达的基因,EGFR 的突变和高表达在肿瘤的发生发展过程中起着非常重要的作用。研究发现 EGFR 在非萎缩性胃炎组织中表达最低^[10],随着病变逐渐进展至萎缩性胃炎、肠化生和异型增生,EGFR 的表达将会持续增高,持续过度表达则有促进慢性萎缩性胃炎发展和癌变的危险^[11-12]。因此 EGFR 被认为与促进正常细胞恶性转化、刺激细胞无限增殖^[13]最终导致胃癌发生有密切关系。

胃和冲剂 II 号方由半夏、党参、干姜、黄连、黄芩、炙甘草、大枣、丹参等组成,临床中该方治疗慢性胃炎具有良好效果^[14]。前期研究表明,胃和冲剂 II 号能够明显改善大鼠 CAG 病损程度,增加 CAG 大鼠胃窦黏膜腺体层厚度,降低胃窦黏膜肌层厚度,恢复萎缩的腺体,减轻炎症反应^[15],充分证实了胃和冲剂 II 号对

CAG 大鼠的治疗作用,并能提高 CAG 大鼠血清抗氧化酶活性等。

本实验结果显示:高、中剂量胃和冲剂 II 号的疗效显著优于维酶素;低剂量胃和冲剂 II 号的疗效与维酶素无显著差异。中药复方从多系统、多靶位的整体水平治疗本病具有一定的优越性。因此,可以推论:高、中剂量胃和冲剂 II 号通过降低 EGF 及其受体 EGFR 在胃黏膜的表达,抑制胃酸分泌,促进胃黏膜细胞分泌前列腺素,促进未成熟壁细胞向成熟壁细胞方向分化,从而保护胃黏膜,同时抑制细胞增殖、存活、粘附、转移及血管发生,起到逆转肠化或癌变的作用。

参考文献

- [1]张青蓓,马俊江. 细胞因子在消化道溃疡发生发展及修复过程中的作用[J]. 中国临床药理学杂志,1999,15(1):73-76.
- [2]何秋兰,杨拯. 表皮生长因子及其受体在胃溃疡愈合中的作用[J]. 重庆医学,2008,10(19):2239-2241.
- [3]Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment[J]. Engl J Med,2008,358(11):1160-1174.
- [4]马林. 抗表皮生长因子受体的研究进展及在放射治疗中的应用[J]. 中华放射肿瘤学杂志,2003,12(1):62-64.
- [5]张沥,张玲霞,徐俊荣,等. 热盐水致大鼠萎缩性胃炎动物模型建立[J]. 世界华人消化杂志,2002,10(5):571-574.
- [6]陈奇. 中药药理实验方法[M]. 北京:人民卫生出版社,1994:99-100.
- [7]朱方石. 对慢性萎缩性胃炎中医治法现状的分析与研讨[C]. 南宁:第二十一届全国中西医结合消化系统疾病学术会议论文集,2009.
- [8]Ciardiello F, Tortora G. EGFR antagonists in cancer treatment[J]. Engl J Med,2008,358(11):1160-1174.
- [9]林寿宁,张继波,张建军. 表皮生长因子及其受体与胃溃疡愈合关系[J]. 山西中医,2011,27(3):58-60.
- [10]莫松松,陈芝芸,严茂祥,等. 胃黏膜癌变过程中表皮生长因子受体环氧合酶-2和三叶因子1的表达及其意义[J]. 胃肠病学,2008,13(3):159-162.
- [11]陈芝芸,严茂祥,项柏康,等. 胃乐康对萎缩性胃炎大鼠生长因子影响的研究[J]. 中医药学刊,2005,23(1):58-60.
- [12]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):148-150.
- [13]郝正魁,刘希双,王秀娟. 表皮生长因子及其受体在糜烂胃黏膜中的表达[J]. 世界华人消化杂志,2013,21(4):332-335.
- [14]麻春杰,魏玉霞,米子良. 胃和冲剂治疗慢性胃炎 68 例[J]. 中医研究,2007,20(5):43-44.
- [15]王艳,麻春杰,宋美丹,等. 胃和冲剂 II 号对慢性萎缩性胃炎大鼠病理形态学及抗氧化酶活性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(12):129-131.

(2013-05-16 收稿 责任编辑:徐颖)