

双蒲散对慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜细胞 TGF- β 1/Smad3 信号通路的影响*

★ 杨宗保^{1**} 葛来安² 何晓晖^{2***} 王亚东¹ 王晨光² 刘琼² 付勇² (1. 厦门大学 福建 厦门 361005; 2. 江西中医药大学 南昌 330004)

摘要: 目的: 观察双蒲散对慢性萎缩性胃炎的治疗作用以及胃黏膜细胞 TGF/Smad 信号通路的影响。方法: 40 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、双蒲散组和维酶素组, 每组 10 只。采用 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (MNNG) 方法复制慢性萎缩性胃炎大鼠模型, 正常组不处理, 模型组只造模不干预, 其余两组造模 16 周后分别灌胃双蒲散和维酶素 4 周。光镜观察胃黏膜组织病理学, 酶联免疫吸附法测定胃黏膜组织 Bcl-2、P53、PCNA、Ag-NORs、EGF、TGF- β 1 与 Smad3 蛋白的表达。结果: 与正常组比较, 模型组大鼠胃黏膜组织 Bcl-2、P53、PCNA、Ag-NORs、EGF、TGF- β 1 的表达皆明显升高, Smad3 皆显著下降 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 双蒲散组大鼠胃黏膜组织 Bcl-2、P53、PCNA、Ag-NORs、EGF、TGF- β 1 的表达皆明显下降, Smad3 皆显著升高 ($P < 0.05$), 其效应显著高于维酶素组。结论: 双蒲散可通过调节 TGF- β 1/Smad3 信号通路调节慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜细胞的增殖和凋亡, 抑制胃黏膜细胞的异型增生, 阻断慢性萎缩性胃炎向胃癌前病变发展。

关键词: 双蒲散; 慢性萎缩性胃炎; TGF- β 1/Smad3; 信号通路

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** B

慢性萎缩性胃炎 (Chronic Atrophic Gastritis, CAG) 属于慢性胃炎的一种, 临床病程长、易反复, 难于彻底治愈而且易恶变, 是消化系统疑难病症之一。病理改变主要以胃黏膜变薄、腺体萎缩、易异化甚至癌变。现代医学对于 CAG 缺乏有效的治疗手段。双蒲散是国家级名中医何晓晖教授治疗 CAG 的有效验方, 本实验研究观察双蒲散对 CAG 大鼠胃黏膜细胞 TGF- β 1/Smad3 信号通路的影响, 从细胞增殖和凋亡角度探讨双蒲散治疗 CAG 的分子生物学机制, 为临床开展双蒲散治疗 CAG 提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 清洁级 SD (Sprague-Dawley) 大鼠 40 只, 雄性, 8 周龄, 体重 180-220g, 购自厦门大学实验动物中心 (实验动物许可证号: SCXK (闽) 2008-0001)。大鼠饲养于垫玉米芯的大鼠笼中, 每笼 10 只, 室温 $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, 湿度 50%, 采用自然光暗周期, 自由饮食水, 适应性饲养 1 周后进行实验。

1.2 试剂与仪器 酶标仪 (芬兰, Labsystems Multiskan MS, 352 型)、洗板机 (芬兰, Thermo Labsystems, AC8 型)、离心机 (国产 TG16W 型)、隔水恒温式培养箱 (国产 GNP-9080 型)、计量天平 (TP-200D, 湘仪天平仪器设备有限公司)、冷冻干燥机 (LGJ-10 多歧管压盖型, 北京松源)、倒置荧光显微镜 (Olympus 公司); N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (MNNG, 日本东京化成株式会社); ELISA 试剂盒 (武汉博士德生物有限公司)。

2 方法

2.1 造模方法 按照 JI Livingstone 等^[1] 方法加以改进: 即将 MNNG 配制成浓度为 150mg/L 的饮用液置于光屏蔽瓶中让大鼠自由饮用, 隔日 (即换液日) 用夹子夹尾 10min, 2 日饱食 1 日饥饿。为保证饮用液的新鲜, 隔日换一次饮用液, 持续 20 周。模型成功标准: 肉眼下见胃黏膜缺损, 黏膜层变薄, 光镜下见胃黏膜腺体数目减少, 细胞核固缩且深染。

2.2 分组与处理 40 只大鼠按照随机数字表法分

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81260556); 江西省自然科学基金项目 (20131512040019)

** 第一作者: 杨宗保, 副教授。研究方向: 消化系统疾病的中医药防治。E-mail: yzblq@163.com

*** 通信作者: 何晓晖, 教授。研究方向: 消化系统疾病的中医药防治。Tel: 079186363359, E-mail: renqiao@263.net。

为四组：(1) 正常组：正常 SD 大鼠，喂饲标准饲料，不予任何处理；(2) 模型组：复制 CAG 模型，喂饲标准饲料，不予任何处理；(3) 双蒲散组：复制 CAG 模型，造模 16 周后灌胃双蒲散 3mL（以相当于人临床等效剂量的 2 倍 × 人与大鼠药物剂量换算系数 6.71 倍，以成人体重 60kg 计算，配制药液浓度为 0.72g/mL），每日 1 次，至第 20 周结束；(4) 维酶素组：复制 CAG 模型，造模 16 周后灌胃维酶素，每日 1 次，至第 20 周结束。

2.3 药物制备 双蒲散方：蒲黄（安徽，批号：130626）60g、蒲公英（河南，批号：130815）100g、太子参（安徽，批号：130725）80g、刺猬皮（四川，批号：130826）40g、白花蛇舌草（福建，批号：130827）100g、五灵脂（福建，批号：130819）60g、石见穿（福建，批号：130826）80g、鸡内金（福建，批号：130821）60g、凤凰衣（福建，批号：130234）100g。药物购自厦门市燕来福制药有限公司，并且由厦大中医系实验室制备成冻干粉^[2]。维酶素片：河北环海药业有限公司，批号：20120214，0.2g/片，将维酶素药片剥离糖衣后至于玻璃研磨皿中研磨成粉，用纯净水配制成混悬液备用。

2.4 胃黏膜组织的处理 第 20 周时，停止干预。处理前 24h 禁食不禁水，大鼠称量体重后，腹腔注射 10% 水合氯醛，按照 0.3mL/100g 的剂量麻醉。麻醉后腹部朝上置于鼠板上，用手术刀迅速打开大鼠腹腔，取出胃部。用眼科剪沿胃大弯将胃剪开、翻转。用冰生理盐水将胃内容物洗净后再用冰 1 × PBS 缓冲液清洗一遍，摊开平放于洁净滤纸上，剪取胃腺部 1cm × 1cm 大小的组织块，称重，进行相关指标检测。

2.5 指标检测

2.5.1 胃黏膜组织病理学 剪取胃窦部 1.5cm × 1cm 组织块，用 4% 多聚甲醛固定，石蜡包埋，常规病理切片及 HE 染色，进行组织病理学观察。

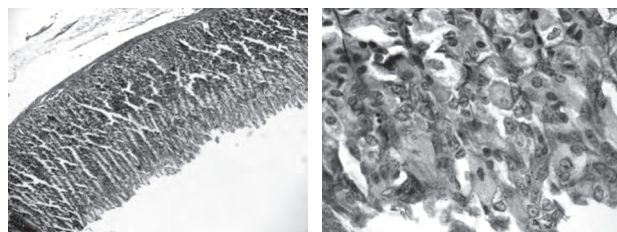
2.5.2 胃黏膜细胞 Bcl-2、P53、PCNA、Ag-NORs、EGF、TGF-β1、Smad3 蛋白的表达 将胃黏膜组织块用眼科剪尽量剪碎，用移液管量取 0.1M 冰 PBS 缓冲液，按照组织块重量：缓冲液体积为 1:9 的比例加入组织碎块中。使用匀浆机在冰上以 10000r/min 将组织研磨成 10% 的组织匀浆（匀浆时间 10s/次，间隔 30s，反复 3-5 次）。将制备好的匀浆液移入干净的离心管中，放入冷冻离心机，以 4℃、3000rpm 离心 15min。将离心好的上清转移至新的洁净 EP 管中，放入 -80℃ 冰箱备用。按

照 ELISA 试剂盒说明书要求步骤配制各试剂及标准品，并测定蛋白浓度。将待测样本稀释至合适浓度后进行反应，在 450nm 紫外线下检测，建立标准曲线，计算各样本 Bcl-2、P53、PCNA、Ag-NORs、EGF、TGF-β1、Smad3 蛋白数值乘以稀释倍数，取得 Bcl-2、P53、PCNA、Ag-NORs、EGF、TGF-β1、Smad3 蛋白浓度。

2.6 统计方法 实验数据用 SPSS18.0 统计软件分析，数据结果以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较若满足正态性且方差齐时采用单因素方差分析 LSD 法和 SNK 法，方差不齐时选择 Tamhane T₂ 和 Dunnett T₃ 法进行方差检验和两两比较，若不满足正态性时采用秩和检验。

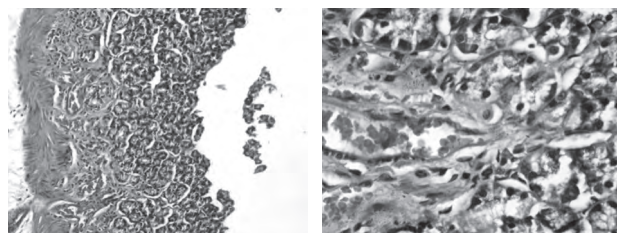
3 结果

3.1 胃黏膜组织病理学观察 正常组大鼠胃黏膜结构完整，表面无缺损，细胞排列整齐，黏膜层未见炎性细胞和红细胞。模型组大鼠胃黏膜表面有明显缺损，黏膜层变薄，腺体数目明显减少，排列紊乱，黏膜下小血管清晰可见，细胞核固缩且深染，核浆比例失调，提示成功复制慢性萎缩性胃炎大鼠模型；双蒲散组可见胃黏膜结构基本完整，腺体萎缩不明显，炎性细胞较少，无细胞核固缩；维酶素组可见炎性细胞浸润，细胞间隙增宽，腺体轻度萎缩，无细胞核固缩（图 1-8）。



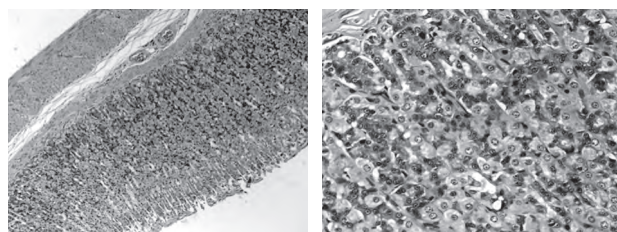
(1) 正常组 (×100)

(2) 正常组 (×400)



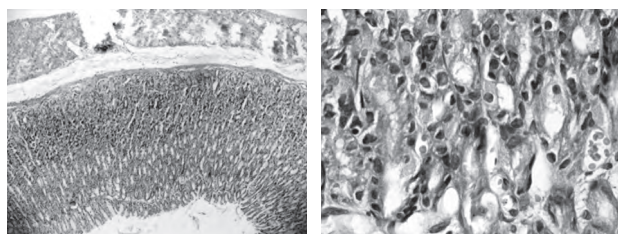
(3) 模型组 (×100)

(4) 模型组 (×400)



(5) 双蒲散组 (×100)

(6) 双蒲散组 (×400)



(7) 维酶素组 (×100) (8) 维酶素组 (×400)

图1-8 各组大鼠胃黏膜组织病理形态学比较

3.2 各组大鼠胃黏膜细胞 Bcl-2、P-53、PCNA、Ag-NORs 的表达 与正常组比较,模型组大鼠胃黏膜组织 Bcl-2、P-53、PCNA、Ag-NORs 的表达明显升高 ($p<0.05$);与模型组比较,双蒲散组大鼠胃黏膜组织 Bcl-2、P-53、PCNA、Ag-NORs 的表达明显下降,说明双蒲散能下调 CAG 大鼠胃黏膜组织 Bcl-2、P-53、PCNA、Ag-NORs 表达,抑制 CAG 大鼠胃黏膜细胞异型增生,促进胃黏膜细胞凋亡,阻断慢性萎缩性胃炎向胃癌前病变发展,其效应明显优于维酶素。见表 1。

表1 各组大鼠胃黏膜组织中 Bcl-2、P-53、PCNA、Ag-NORs 的表达 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Bcl-2 (ng/L)	P-53 (ng/L)	PCNA (ng/L)	Ag-NORs (ng/L)
正常组	22.33±1.16	37.42±1.07	1.76±0.41	76.20±2.65
模型组	40.37±2.55 ^{▲▲}	55.36±1.23 ^{▲▲}	2.92±0.06 ^{▲▲}	116.57±2.72 ^{▲▲}
双蒲散组	28.45±1.36 [■]	37.15±2.95 [■]	1.96±0.14 [■]	84.43±5.76 [■]
维酶素组	39.64±1.34	46.76±1.32	2.32±0.05	95.91±1.72

注:与正常组比较,▲▲ $P<0.01$;与模型组比较,■ $P<0.01$

3.3 各组大鼠胃黏膜细胞 EGF、TGF- β 1 与 Smad3 的表达 与正常组比较,模型组大鼠胃黏膜组织 EGF、TGF- β 1 表达显著升高,Smad3 表达下降 ($P<0.05$);与模型组比较,双蒲散组和维酶素组大鼠胃黏膜组织 EGF、TGF- β 1 表达显著下降,Smad3 表达显著升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$);且双蒲散组的调节效应更为明显。说明双蒲散能下调 CAG 大鼠胃黏膜组织 EGF、TGF- β 1 的表达,上调 Smad3 的表达,从而抑制胃黏膜细胞的异型增生,阻断其向胃癌前病变发展。见表 2。

表2 各组大鼠胃黏膜组织中 EGF、TGF- β 1 与 Smad3 表达水平 ($\bar{x} \pm s$)

组别	EGF (ng/L)	TGF- β 1 (ng/L)	Smad3 (pg/mL)
正常组	2345.85±25.56	90.89±3.24	15.34±0.52
模型组	2797.65±29.68 ^{▲▲}	138.11±2.50 ^{▲▲}	9.55±0.34 ^{▲▲}
双蒲散组	2410.15±57.72 [■]	112.52±7.61 [■]	13.23±0.28 [■]
维酶素组	2554.37±18.43 [■]	128.02±5.42 [■]	11.29±0.29 [■]

注:与正常组相比,▲▲ $P<0.01$;与模型组相比,■ $P<0.05$,■ $P<0.01$

4 讨论

慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 是以胃黏膜萎缩变薄、胃肌层增厚、局部或广泛性固有腺体减少或消失或伴异型增生、肠上皮化生等为特征的消化系统常见病,是正常胃黏膜转化为胃癌的一个重要环节,CAG 临床患病率逐年增加。目前现代医学对 CAG 尚缺乏有效的防治方法,有研究表明维酶素、 β 胡萝卜素等对 CAG 的防治有一定的作用^[2]。

中医将慢性萎缩性胃炎归于“胃痞”、“胃脘痛”范畴,病程长,病机复杂,以本虚标实为主,虚为脾胃气虚,实则有气滞血瘀、湿阻痰凝等,且往往虚实夹杂、迁延难愈。双蒲散方是何晓晖教授通过 30 多年临床经验总结创立的验方,具有益气养阴、清热化痰、消瘀散结、和胃护膜之功,在临床上取得了良好疗效^[3]。前期的临床及动物实验也证实,双蒲散方可以改善慢性萎缩性胃炎模型大鼠胃分泌功能且增强大鼠的免疫力^[4-5],同时明显提高胃黏膜细胞脂质的抗氧化作用^[5],从而对 CAG 有良好的防治作用。

胃癌前病变是一个多因素、多步骤演化的过程,其中致癌基因、抑癌基因与细胞凋亡过程有着相当重要的联系。胃癌的细胞凋亡和增殖主要受致癌基因 Bcl-2 和抑癌基因 P53 的调控。Bcl-2 蛋白是 bcl-2 原癌基因的编码产物,是细胞存活促进因子,Bcl-2 能够阻止细胞色素 c 从线粒体释放到细胞质,从而抑制细胞凋亡。Bcl-2 蛋白的表达阳性率随肿瘤分级的恶性程度而增高。野生型 P53 是肿瘤抑制蛋白,变异的 P53 蛋白阳性表达率与胃黏膜异性增生程度呈正相关,而且药物干预会不同程度地降低变异 P53 蛋白的阳性表达程度。TGF- β 是一种多效性的细胞因子,以自分泌或旁分泌的方式通过细胞表面受体信号传导途径调节细胞的增殖、分化、凋亡,TGF- β 可以抑制正常细胞的生长并且促进肿瘤细胞的生长^[6]。Smad3 蛋白属受体调节型蛋白,是 TGF- β 信号传导通路中非常重要的蛋白之一,Smad3 的表达可以抑制 TGF- β /Smads 信号通路中细胞的活化及增殖功能^[7],在 TGF β 诱导的生长抑制中起着重要的调节作用^[8]。

本实验研究结果显示:双蒲散方可显著促进 CAG 大鼠胃黏膜正常细胞的增生,抑制异型增生细胞的增殖、促进其凋亡,对慢性萎缩性胃炎癌前病变有很好的治疗作用。同时该研究发现双蒲散能有效地下调 CAG 大鼠胃黏膜细胞中 Bcl-2、P53、PCNA、Ag-NORs、EGF、TGF- β 1 的表达和上调

子宫内膜异位症发病的相关因素调查*

★ 詹瑾 指导：须义贞**（上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院 上海 200437）

摘要：目的：研究子宫内膜异位症发病的相关因素。方法：对 100 例子宫内膜异位症患者及 200 例非内异症女性进行问卷调查。了解患者年龄、身高、体重、月经情况、婚育史、职业性质、文化程度、长期用药、受孕方式、避孕措施、宫腔操作、饮食习惯、运动习惯、作息、经期卫生、家族史、合并其他妇科疾病、血型等，采用 X^2 检验、t 检验、秩和检验和 logistic 回归分析数据。结果：子宫内膜异位症的危险因素有行经时间长、熬夜、经期受凉淋雨涉水，伴有原发性痛经、子宫肌腺症、乳腺疾病，经常食用豆制品、快餐，人流次数多，其 OR 值分别为 13.827、3.432、24.543、5.734、26.173、2.820、3.167、8.614、2.244，其保护因素有初潮年龄大、月经周期长，其 OR 值分别为 0.360、0.408。结论：子宫内膜异位症的危险因素有行经时间长、熬夜、经期受凉淋雨涉水，伴有原发性痛经、子宫肌腺症、乳腺疾病，经常食用豆制品、快餐，人流次数多，其保护因素有初潮年龄大、月经周期长。

关键词：子宫内膜异位症；相关因素

中图分类号：R711.71 **文献标识码：**B

子宫内膜异位症（以下简称内异症）是目前妇科临床常见疾病，目前临床可见的西医病因病理学说主要有种植学说、体腔上皮化生学说、诱导学说及在位内膜学说等，然而至今尚未完全被阐明。尽管目前对该病的治疗已有药物及手术等多种方法，但均为起到根治的效果，其术后 5 年复发率仍

高达 36%~57%^[1]。《素问·四气调神大论》有言：“是故圣人不治已病治未病，不治已乱治未乱，此之谓也。”因此，对子宫内膜异位症的疾病预防意义重大。本研究通过病例对照调查，挖掘子宫内膜异位症发病相关因素，为健康女性以及疾病状况人群提供有效的预防指导方案。

Smad3 的表达，说明双蒲散通过调节慢性萎缩性胃炎大鼠胃黏膜细胞 TGF- β 1/Smad3 信号通路抑制异型增生细胞的增殖、促进胃黏膜损伤的修复。该研究为双蒲散治疗慢性萎缩性胃炎、阻断其向胃癌发展提供了科学的实验依据。

参考文献

- [1] JI Livingstone, M I Filipe, C Wastell. Expression of transforming growth factor alpha in experimental gastric carcinogenesis. *Gut*. 1994, 35(5):604-607.
- [2] 朱舜时, 周怡和, 夏德凤, 等. 天然 β 胡萝卜素对胃癌前期病变的逆转作用. *中华消化杂志*, 2009, 16(1):56-57.
- [3] 何晓晖, 陈文, 陈建章, 等. 双蒲散治疗大鼠慢性萎缩性胃炎的实

验研究 [J]. *上海中医药杂志*, 2012, 42(3):66-68.

- [4] 周玉平, 黄勇, 邓其位. 双蒲散治疗慢性萎缩性胃炎的临床研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2012, 39(8):1 554-1 556.
- [5] 陈文, 何晓晖, 徐泽宇, 等. 双蒲散抗溃疡作用的实验研究 [J]. *中成药*, 2008, 30(5):654-657.
- [6] 李晓茹, 李玉红, 徐倩, 等. TGF- β 1 对绒癌 JEG-3 细胞增殖及其 Smad3, 7 mRNA 表达的影响 [J]. *中国妇幼保健*, 2010, 25(12):1 685-1 689.
- [7] Letterio JJ. TGF- β signaling in T cells: roles in lymphoid and epithelial neoplasia. *oncogene*, 2005, 24(37):5 701-5 712.
- [8] 陈峰, 郑敏, 陈智. Smad2 和 Smad3 在 TGF- β 1 信号传导中的作用 [J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2006, 33(3):187-189.

（收稿日期：2015-12-29）编辑：王河宝

* 基金项目：上海市卫生局：加味没竭片治疗子宫内膜异位症痛经的规范化研究（2011ZJ017）；国家中医药管理局“朱氏妇科流派传承研究工作室”项目；上海市进一步加快中医药事业发展三年行动计划“朱氏妇科流派传承研究基地”项目；上海中医药三年行动计划“朱氏妇科流派传承研究基地”项目（ZYSNXD-CC-HPGC-JD-008）。

** 通信作者：须义贞。Tel: 18930562661, E-mail: 13162287959@163.com。