

本文引用:李玉凤,陈亮亮,李学军.基于TGF- β 1/Smad3通路探讨脾胃培源方对慢性萎缩性胃炎大鼠干预作用[J].湖南中医药大学学报,2019,39(2):173-177.

基于 TGF- β 1/Smad3 通路探讨脾胃培源方对慢性萎缩性胃炎大鼠干预作用

李玉凤¹,陈亮亮²,李学军^{2*}

(1.安徽中医药大学,安徽 合肥 230038;2.安徽中医药大学第二附属医院,安徽 合肥 230061)

[摘要] **目的** 观察脾胃培源方对慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis,CAG)大鼠血清胃蛋白酶原 I(pepsinogen I, PG I)、胃蛋白酶原 II(pepsinogen II, PG II)、胃泌素(gastrin-17, G-17)水平的影响,通过研究转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)和 Smad3 蛋白在 CAG 大鼠胃组织中的表达,探讨 TGF- β 1/Smad3 信号传导通路在 CAG 发病过程中的作用以及脾胃培源方的治疗机制。**方法** 选用 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 100 只,随机分为:空白对照组、模型组、维酶素组、脾胃培源方(高、中、低剂量)组,采用幽门弹簧植入术配合高盐热淀粉糊灌胃法制备 CAG 大鼠模型。造模成功后,各组予以相关干预,连续灌胃 4 周,4 周后处死大鼠取血清及胃组织。通过 HE 染色观察大鼠胃组织病理学的改变,并采用 Elisa 法和 Western blot 法检测血清 PG I、PG II、G-17 水平及 TGF- β 1、Smad3 蛋白表达。**结果** 与空白对照组比较,模型组血清 PG I、G-17 水平及 Smad3 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$),TGF- β 1 蛋白表达明显上升 ($P < 0.05$);与模型组比较,脾胃培源方组和维酶素组血清 PG I、G-17 水平及 Smad3 蛋白表达明显上升 ($P < 0.05$),TGF- β 1 蛋白表达明显降低 ($P < 0.05$),血清 PG II 均未见明显变化,差异无统计学意义 ($P > 0.05$);维酶素组和脾胃培源方(高、中、低剂量组)4 组间采取两两比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 脾胃培源方能明显改善 CAG 大鼠的胃组织损伤,下调胃组织 TGF- β 1 蛋白表达及上调 Smad3 蛋白的表达,说明 TGF- β 1/Smad3 信号转导通路参与了 CAG 发病过程,脾胃培源方治疗 CAG 可能通过干预该通路的表达而实现。

[关键词] 慢性萎缩性胃炎;胃蛋白酶原;转化生长因子 β 1;Smad3;脾胃培源方

[中图分类号]R285.5;R573.3*2 **[文献标志码]**A **[文章编号]**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2019.02.006

Intervention Effect of Piwei Peiyuan Decoction on Rats with Chronic Atrophic Gastritis: An Analysis Based on the TGF- β 1/Smad3 Signaling Pathway

LI Yufeng¹, CHEN Liangliang², LI Xuejun^{2*}

(1. Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230038, China; 2. The Second Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230061, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of Piwei Peiyuan Decoction on the serum levels of pepsinogen I (PG I), pepsinogen II (PG II), and gastrin-17 (G-17) in rats with chronic atrophic gastritis (CAG), as well as the role of the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway in the development of CAG and the therapeutic mechanism of Piwei Peiyuan Decoction based on the expression of transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) and Smad3 in gastric tissue. **Methods** A total of 100 specific pathogen-

[收稿日期]2018-06-13

[基金项目]安徽中医药大学临床科研项目(2017fydz010)。

[作者简介]李玉凤,女,在读硕士研究生,研究方向:中医药防治脾胃疾病。

[通讯作者]*李学军,男,主任医师,硕士研究生导师,E-mail:lixuejun0308@126.com。

free male Wistar rats were randomly divided into blank control group, model group, vitacoenzyme group, and high-, middle-, and low-dose Piwei Peiyuan Decoction groups. A rat model of CAG was established by spring implantation at the pylorus and high-salt hot starch paste by gavage. After the model was successfully established, each group was given the corresponding treatment, and after 4 consecutive weeks of gavage, the rats were sacrificed to collect serum and gastric tissue. HE staining was performed to observe the pathological changes of gastric tissue, and ELISA and Western blot were used to measure the serum levels of PG I, PG II, and G-17 and the protein expression of TGF- β 1 and Smad3. **Results** Compared with the blank control group, the model group had significant reductions in the serum levels of PG I and G-17 and the protein expression of Smad3 ($P < 0.05$) and a significant increase in the protein expression of TGF- β 1 ($P < 0.05$). Compared with the model group, the Piwei Peiyuan Decoction groups and the vitacoenzyme group had significant increases in the serum levels of PG I and G-17 and the protein expression of Smad3 ($P < 0.05$) and a significant reduction in the protein expression of TGF- β 1 ($P < 0.05$). There was no significant change or difference in the serum level of PG II ($P > 0.05$). There were no significant differences in the above indices between any two of the vitacoenzyme group and the high-, middle-, and low-dose Piwei Peiyuan Decoction groups ($P > 0.05$). **Conclusion** Piwei Peiyuan Decoction can significantly improve gastric injury, downregulate the protein expression of TGF- β 1, and upregulate the protein expression of Smad3 in CAG rats, suggesting that the TGF- β 1/Smad3 signaling pathway may be involved in the development of CAG. Piwei Peiyuan Decoction may be therapeutic against CAG by exerting an intervention effect on this signaling pathway.

[**Keywords**] chronic atrophic gastritis; transforming growth factor- β 1; Smad3; Piwei Peiyuan Decoction

慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)是慢性胃炎的一种类型,呈局限性或广泛性的胃黏膜固有腺体萎缩(数量减少、功能减低),常伴有肠上皮化生及异型增生^[1],属临床常见病、多发病、疑难病,尤以脾胃虚弱型为常见,主要症状表现有上腹部胀满、疼痛,烧心及消化不良症状等^[2]。慢性萎缩性胃炎、肠上皮化生和异性增生与胃癌的发生关系密切,尤其肠上皮化生被认为是萎缩的典型标志及胃癌的前兆^[3]。现代医学对于 CAG 缺乏有效的治疗手段。脾胃培源方是首届全国名老中医马骏教授治疗 CAG 的有效经验方。研究证实^[4],转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)/Smad3 信号通路与 CAG 密切相关,通过调节此通路可以抑制异型增生细胞的增殖,促进胃萎缩黏膜的修复,从而达到治疗 CAG 的目的。因此,本实验研究旨在探讨 TGF- β 1/Smad3 信号通路在 CAG 发病中的作用,以及分析探讨脾胃培源方治疗 CAG 的分子生物学机制,为脾胃培源方临床治疗 CAG 提供实验依据。

1 材料

1.1 动物

选用 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 100 只,体质量(200 \pm 20)g,鼠龄 5~7 周,由南京医科大学实验动物

中心提供,许可证号:SCXK(苏)2016-0002,保持室温、自然光照周期,适应性喂养 1 周。

1.2 药品及主要仪器

脾胃培源方药物组方中各味饮片购自安徽中医药大学第二附属医院中草药房;维酶素片:广西大海阳光药业有限公司,0.2 g/片。352 型酶标仪(芬兰 Lab-systems 公司);JW3021HR 型离心机(安徽嘉文公司);LGJ-10 多歧管压盖型冷冻干燥机(北京松源有限公司);DMI-6000B 型倒置荧光显微镜(德国莱卡公司);垂直电泳装置(美国 Bio-Rad 公司);ELISA 试剂盒(上海源叶生物技术有限公司);兔抗鼠 TGF- β 1 单克隆抗体(Bioworld 公司);山羊抗鼠磷酸化 Smad2/3 多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司);辣根过氧化物酶标记 IgG 二抗(美国 KPL 公司)。

2 方法

2.1 动物分组与模型建立

健康雄性 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 100 只,随机分为:空白对照组、模型组、维酶素组、脾胃培源方(高、中、低剂量组:简称为高剂量组、中剂量组、低剂量组)组,每组 15 只,其中,选取空白对照、假手术组、模型组大鼠各 3 只,用来验证 CAG 脾胃虚弱证模型是否复制成功。采用幽门弹簧植入术配合高盐

热淀粉糊灌胃法制备 CAG 大鼠模型^[5]:(1)制备幽门弹簧:将金属环型宫内节育器中硅橡胶和铜丝去掉,拉直,并剪成小段弹簧,将两边断端弯入弹簧内;(2)弹簧幽门植入术:腹腔麻醉后,在无菌条件下开腹,暴露胃,在胃前壁距幽门环 0.2 cm 处切一小口,金属弹簧前 1/3 插过其幽门环进入十二指肠,用缝线将弹簧两端及中央固定,按手术常规缝合;(3)药物造模方法:术后第 2 周开始药物造模,给予高盐热淀粉糊(含 15%氯化钠,25%可溶性淀粉,60~70 °C)灌胃,每只 2 mL/d,每周 2 次(周二、周五),连续 10 周。

2.2 药物干预及标本采集

造模成功后,空白对照组和模型组予 3 mL 生理盐水灌胃;维酶素组予维酶素悬浊液 3 mL/d 灌胃;脾胃培源方(高、中、低剂量组)予 3 mL/d 灌胃,分别按相当于人临床等效剂量的 2 倍、4 倍、8 倍 \times 人与大鼠药物剂量换算系数 6.71 倍,以成人体质量 60 kg 计算,分别予 20、10、5 g/kg,连续灌胃 4 周。4 周后禁食不禁水 24 h 经腹主动脉采血,分离血清后,置于-20 °C 低温冰箱待检测。采血后,处死大鼠,取幽门与前胃及腺胃交界线连线的 2/5 部分,其一,取一部分组织标本,浸入甲醛中固定,石蜡包埋、切片后行 HE 染色;其二,剩余一部分标本放入液氮冰冻保存用于 Western blot 检测。

2.3 组织病理学检测

取大鼠胃标本置于 4% 甲醛溶液中固定,常规脱水、石蜡包埋、切片,行 HE 染色,观察大鼠胃黏膜组织病理学改变。

2.4 ELISA 法检测大鼠血清胃蛋白酶原 I(pepsinogen I, PG I)、胃蛋白酶原 II(pepsinogen II, PG II)、胃泌素(gastrin-17, G-17)水平变化

冰箱取出经腹主动脉采血分离后的大鼠血清 PG I、PG II、G-17 试剂盒及大鼠血清,具体操作按试剂盒要求操作,放入酶标仪在 10 min 内用双波长即检测波长 450 nm 和校正波长 620 nm 同时读板,采集实验数据,制作标准曲线,计算各样本实际浓度。

2.5 Western Blot 法检测胃组织标本中 TGF- β 1、Smad3 蛋白的表达

提取胃黏膜组织蛋白,蛋白浓度由 BCA 法检测,在收集的蛋白样品中加入蛋白上样缓冲液,混

匀,100 °C 加热 7 min 使蛋白质变性。按顺序加入蛋白样品,经 SDS-PAGE 电泳后,电转膜至 PVDF 膜,室温封闭 2 h, TBST 洗涤 3 次,10 min/次,分别加入 1:500 兔抗鼠 TGF- β 1、Smad3 一抗,4 °C 摇床过夜,加入辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗(1:2 000),置室温作用 2 h, TBST 洗涤 3 次,每次 10 min,滴入 Super Signal West Femto 高灵敏度化学发光底物显影 1 min,采用凝胶图像处理系统进行吸光度扫描,将 TGF- β 1、Smad3 蛋白条带的吸光度与 β -actin 比值作为其蛋白的表达值。

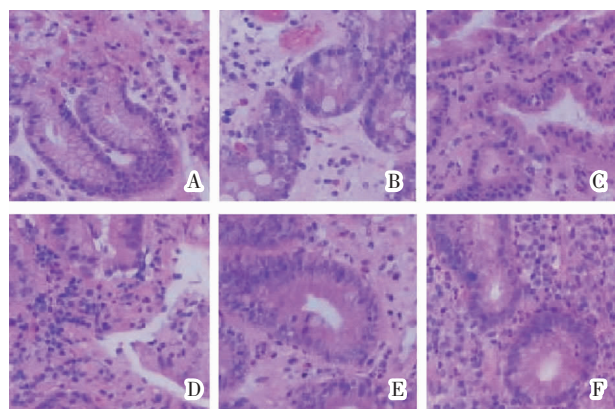
2.6 统计学方法

采用 SPSS 23.0 统计软件进行统计学分析,计量资料采用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示。实验结果多组间均数比较采用单因素方差分析,两组间均数比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 胃组织病理学改变

空白对照组大鼠胃黏膜结构完整,胃黏膜表面正常,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相对明显缺损,黏膜层变薄,腺体数目明显减少,排列较紊乱,黏膜下小血管清晰可见,细胞核固缩且深染,核浆比例失调;脾胃培源方组和维酶素组胃黏膜结构较完整,但 4 组间胃黏膜组织腺体萎缩不明显,与模型组相比可见炎性细胞数目较少,无细胞核固缩。见图 1。



注:A.空白对照组;B.模型组;C.维酶素组;D.脾胃培源方高剂量组;E.脾胃培源方中剂量组;F.脾胃培源方低剂量组

图 1 各组大鼠胃组织病理学光镜图(HE, $\times 400$)

3.2 大鼠血清 PG I、G-17、PG II 水平变化

与空白组比较,模型组血清 PG I、G-17 水平均

显著降低($P<0.05$);与模型组比较,脾胃培源方组和维酶素组 PG I、G-17 水平显著上升($P<0.05$);但维酶素组和脾胃培源方(高、中、低剂量组)4 组间采取两两比较,差异无统计学意义($P>0.05$);其中 PG II 均未见明显变化($P>0.05$),差异无统计学意义。见表 1。

表 1 各组大鼠血清 PG I、PG II、G-17 水平变化比较($\bar{x}\pm s, n=15$)

| 分组 | PG I/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | PG II/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | G-17/($\text{pmol}\cdot\text{L}^{-1}$) |
|-------|--|---|--|
| 空白对照组 | 125.87 \pm 30.03 | 11.15 \pm 2.76 | 4.37 \pm 3.22 |
| 模型组 | 63.27 \pm 15.54* | 10.53 \pm 3.57 | 2.75 \pm 2.08* |
| 维酶素组 | 70.38 \pm 3.72 [#] | 11.35 \pm 2.83 | 3.59 \pm 2.64 [#] |
| 高剂量组 | 73.09 \pm 4.34 [#] | 10.79 \pm 4.32 | 3.36 \pm 2.98 [#] |
| 中剂量组 | 79.26 \pm 2.82 [#] | 11.26 \pm 2.98 | 3.93 \pm 1.63 [#] |
| 低剂量组 | 75.52 \pm 3.56 [#] | 10.76 \pm 3.12 | 3.71 \pm 1.08 [#] |

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$

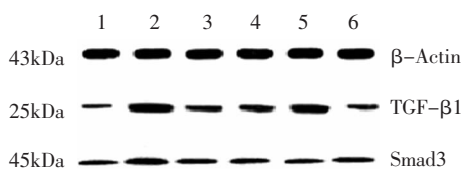
3.3 大鼠胃组织中 TGF- β 1、Smad3 蛋白表达

与空白对照组比较,模型组胃组织 TGF- β 1 蛋白表达显著升高($P<0.05$),胃组织 Smad3 蛋白表达明显降低($P<0.05$);与模型组比较,脾胃培源方组和维酶素组 TGF- β 1 蛋白显著降低($P<0.05$),胃组织 Smad3 蛋白表达显著升高($P<0.05$),但维酶素组和脾胃培源方(高、中、低剂量组)4 组间采取两两比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 2 及图 2。

表 2 各组大鼠胃组织 TGF- β 1、Smad3 蛋白表达($\bar{x}\pm s, n=15$)

| 分组 | TGF- β 1/ β -actin | Smad3/ β -actin |
|-------|--------------------------------|------------------------------|
| 空白对照组 | 0.213 \pm 0.47 | 1.34 \pm 1.72 |
| 模型组 | 1.21 \pm 1.67* | 0.84 \pm 1.02* |
| 维酶素组 | 0.376 \pm 0.35 [#] | 1.13 \pm 1.26 [#] |
| 高剂量组 | 0.484 \pm 0.73 [#] | 1.63 \pm 2.31 [#] |
| 中剂量组 | 0.343 \pm 0.26 [#] | 1.42 \pm 0.82 [#] |
| 低剂量组 | 0.336 \pm 0.54 [#] | 1.21 \pm 1.05 [#] |

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$;与模型组比较,# $P<0.05$



注:1.空白对照组;2.模型组;3.维酶素组;4.脾胃培源方高剂量组;5.脾胃培源方中剂量组;6.脾胃培源方低剂量组

图 2 大鼠胃组织中 TGF- β 1、Smad3 蛋白表达电泳图

4 讨论

CAG 的发病机制与很多因素相关,其中幽门螺旋杆菌感染为主要因素^[6]。临床上主要将胃功能三项作为监测、筛查与诊断的依据,其中包括 PG I、PG II 与 G-17^[7]。许多临床研究证实,CAG 发生与 PG I、PG II 和 G-17 关系密切。孙雪飞等^[8]通过胃镜及病理诊断筛选出 CAG 及慢性非萎缩性胃炎患者各 100 例,通过酶联免疫吸附法(ELISA)来定量测定患者空腹血清 PG I、PG II 和 G-17 的水平,结果 CAG 患者血清 PG I、G-17 数值明显低于慢性非萎缩性胃炎患者,且还发现幽门螺旋杆菌感染与 PG 水平有关。姚文君等^[9]通过临床研究亦发现 CAG 患者血清 PG I、G-17 水平较健康体检者、胃溃疡、十二指肠球部溃疡患者均偏低。以上均表明胃蛋白酶原和胃泌素能够明显影响 CAG 的发生。

CAG 发生是多因素、多环节的演变过程,TGF 是人体中的一种多功能生长调节因子,其中 TGF- β 在此过程中有着相当重要的作用。TGF- β 是一类细胞因子家族具有多种不同的生物学功能,其中以 TGF- β 1 含量最高,最具有代表性^[10]。TGF- β 1 调节着细胞生长和分化,能使正常的成纤维细胞的表型发生转化,抑制癌变早期细胞^[11]。TGF- β 1 在细胞凋亡中起传导信号的作用,能调节正常免疫稳态,调节细胞凋亡,控制肠上皮化生,而 Smad3 蛋白属受体调节型蛋白,与 TGF- β 1 共同参与胃黏膜细胞的生长抑制调节,是 CAG 形成的重要指标^[12]。CAG 发生的原因之一为随着胃内 pH 值的增加,TGF- β 1 因子含量增加^[13],TGF- β 1 成纤维细胞因子可促进人体有丝分裂原以及趋化因子运作,Smad3 蛋白参与并加速 TGF- β 1 成纤维细胞因子的作用,有效促进胃部内间质纤维化生成^[14],从而人体纤维细胞被同时激活,进而导致平滑肌细胞增生,最终导致 CAG 发生^[15]。

中医学将 CAG 归属于“胃脘痛”“痞满”等范畴。本病的病机多为“脾胃虚弱,气滞血瘀”。脾胃培源方是首届全国名老中医马骏教授结合临床经验制定的治疗脾胃病的经验方,主要由炙黄芪、石斛、桂枝、白术、香附、莪术等组成,有益气和中、培补脾胃之功。炙黄芪与白术益气补中、补脾益胃共为君药,石斛与莪术合用厚肠胃、化滞消积、散结止痛为臣药,桂枝

解表和营、温化水气、补脾益气为佐药,香附具有和胃理气、疏肝止痛为使药。诸药结合,相辅相成,共奏培源固本、培补脾胃之功效。

本次实验从信号传导通路层面研究脾胃培源方对 CAG 大鼠的干预作用,结果显示脾胃培源方是通过有效下调 TGF- β 1 的表达和上调 Smad3 的表达,从而达到治疗效果。总之,CAG 的发病是多因素、多环节作用的结果,可以初步推断脾胃培源方通过对 TGF- β 1/Smad3 信号通路及其下游的相关细胞因子的影响发挥其治疗作用,抑制异型增生细胞的增殖、促进胃黏膜损伤的修复。

参考文献

- [1] 李军祥,陈 諝,吕 宾,等.慢性萎缩性胃炎中西医结合诊疗共识意见(2017年)[J].中国中西医结合消化杂志,2018,26(2):121-131.
- [2] 张声生,李乾构,唐旭东,等.慢性萎缩性胃炎中医诊疗共识意见[J].中医杂志,2010,51(8):749-753.
- [3] 李仲启,傅汉中.胃肠道癌前病变和癌前疾病研究现状[J].临床消化病杂志,2015,27(3):183-185.
- [4] 杨宗保,葛来安,何晓晖,等.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[J].江西中医药,2016,47(1):34-37.
- [5] 史 瑞,李晓红,方 蕾,等.弹簧幽门植入术结合高盐热淀粉糊灌胃诱导大鼠萎缩性胃炎模型的方法及评价[J].世界华人消化杂志,2011,19(10):1001-1008.
- [6] 陈 佳,李守英,徐 红,等.慢性萎缩性胃炎的研究进展[J].中国老年学杂志,2013,33(14):3540-3542.
- [7] 朱春平,赵建业,申晓军,等.血清胃泌素-17 联合胃蛋白酶原检测对胃癌诊断价值的多中心临床研究[J].中华消化内镜杂志,2017,34(1):19-23.
- [8] 孙雪飞,何 旭.血清胃蛋白酶原与胃泌素检测对慢性萎缩性胃炎的诊断价值[J].湖南师范大学学报(医学版),2016,13(5):115-117.
- [9] 姚文君,郑学东,苗得露.血清胃蛋白酶原、胃泌素-17 与胃癌及慢性萎缩性胃炎的相关性研究[J].临床合理用药杂志,2017,10(8):108-109.
- [10] 陈仁龙.健脾活血法治疗慢性萎缩性胃炎的疗效观察及对转化生长因子(TGF- β 1)、Smad3 表达的影响[D].南京:南京中医药大学,2017:11-13.
- [11] 蔡 蔚,谢海平,龙 鑫,等.马归液对腺性膀胱炎模型大鼠 TGF- β 1、EGF- β 的影响[J].湖南中医药大学学报,2018,38(8):870-874.
- [12] 刘 镛,赵琴平,董惠芬,等.TGF- β 信号传导通路及其生物学功能[J].中国病原生物学杂志,2014,9(1):77-83.
- [13] 谢晶日,孙健伟,梁国英.益气养阴活血法对慢性萎缩性胃炎胃黏膜细胞凋亡和基因调控的影响[J].时珍国医国药,2011,22(9):295-296.
- [14] 刘海燕,陈军贤.香砂养胃丸对慢性萎缩性胃炎患者胃黏膜 TGF- β 1、Smad3 表达的影响[J].中药材,2014,37(3):540-542.
- [15] 戴卫波,梅全喜,曾聪彦,等.布渣叶不同提取部位对大鼠胃液分泌功能的影响研究[J].时珍国医国药,2015,21(3):34-36.

(本文编辑 杨 瑛)