

· 实验研究 ·

内毒素血症幼年大鼠胃黏膜 pS2 TGF-α 和 PCNA 表达变化及意义

刘春英¹, 王丽杰², 王艳斌¹, 吕庆杰³, 姜卫国³, 孙梅²

(1. 解放军第 463 医院儿科, 辽宁 沈阳 110042; 2. 中国医科大学第二临床学院儿科, 辽宁 沈阳 110004; 3. 中国医科大学第二临床学院病理科, 辽宁 沈阳 110004)

[摘要] 目的 胃黏膜上皮的生长、更新和修复的过程是受到严格调控的,其修复能力可能与肽类物质的表达水平有关。该文探讨急性胃黏膜损伤修复中乳癌相关肽(pS2)、转化生长因子-α(TGF-α)及增殖细胞核抗原(PCNA)的作用。**方法** 18 日龄 Wistar 大鼠,随机分为实验组(LPS 组)和对照组,分别腹腔注射内毒素(5 mg/kg)及生理盐水,每一时相点 8 只,注射后 1.5, 3, 6, 24, 48, 72 h 观察胃黏膜损伤情况,苏木精-伊红染色观察形态学改变,免疫组化 SP 法检测胃黏膜 pS2、TGF-α 及 PCNA 蛋白表达变化。**结果** LPS 组 6 h 胃黏膜损伤最重,黏膜表面可见大片糜烂、出血、条索状坏死,与胃纵轴平行;光镜下黏膜表面上皮广泛脱落,黏膜内有出血,炎性细胞浸润,核碎裂、固缩,凋亡小体出现,腺体受损。LPS 组的 PCNA 在 3,6,24,48 h 胃黏膜组织细胞核表达较对照组明显减低($P<0.01$);pS2 在 1.5 h 胃黏膜组织细胞浆表达低于对照组,3 h 恢复正常,6,24,48,72 h 明显高于对照组($P<0.01$);TGF-α 在 6,24,48 h 胃黏膜组织细胞浆表达较对照组明显增强($P<0.01$)。**结论** PCNA 表达变化反映了胃黏膜损伤和修复过程中胃黏膜细胞的增殖活性;pS2 表达上调,可能通过介导细胞增殖参与急性胃黏膜细胞保护作用;TGF-α 表达增强,可能促进了胃黏膜上皮的代谢和生长,参与胃黏膜的修复。

[中国当代儿科杂志,2008,10(2):221-224]

[关键词] 急性胃黏膜损伤;pS2;TGF-α;PCNA;大鼠
[中图分类号] R-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2008)02-0221-04

Expression of pS2, TGF-α and PCNA in the gastric mucosa of young rats with endotoxemia

LIU Chun-Ying, WANG Li-Jie, WANG Yan-Bin, LU Qing-Jie, JIANG Wei-Guo, SUN Mei. Department of Pediatrics, 463 Hospital of Chinese People's Liberation Army, Shenyang 110042, China (Sun M, Email:sunm@cmu2h.com)

Abstract: Objective Growth, regeneration and reparation of gastric mucosal epithelium may relate to the expression of peptides. This study aimed to investigate the effect of pS2, TGF-α and PCNA in endotoxin-induced acute gastric mucosal injury in young rats. **Methods** Eighteen-day-old Wistar rats were randomly injected intraperitoneally with lipopolysaccharide (LPS) (5 mg/kg) or normal saline (control). The gastric mucosal specimens were harvested 1.5, 3, 6, 24, 48, and 72 hrs after LPS or normal saline injection ($n=8$ each). The pathological changes of the gastric mucosa were observed by hematoxylin-eosin staining. The expression of pS2, TGF-α and PCNA was measured by immunohistochemistry SP method. **Results** Gastric mucosal injuries were the most serious 6 hrs after LPS injection, characterized by massive erosion, bleeding and cord necrosis of the gastric mucosa paralleling with gastric longitudinal axis. PCNA expression in the gastric mucosa in the LPS group 3, 6, 24 and 48 hrs after LPS injection was significantly lower than that in the control group ($P<0.01$). pS2 expression in the gastric mucosa weakened 1.5 hrs after LPS injection, recovered to the control level at 3 hrs and was significantly higher than the control at 6, 24, 48 and 72 hrs of LPS injection ($P<0.01$). TGF-α expression in the gastric mucosa in the LPS group increased significantly 6, 24 and 48 hrs after LPS injection when compared with the control group ($P<0.01$). **Conclusions** PCNA expression may be associated with the proliferation activity of the gastric mucosa in the process of gastric mucosal injury/reparation. pS2 and TGF-α might participate in the defense and reparation of gastric mucosal cells through mediating cell proliferation following acute gastric mucosal injury.

[Chin J Contemp Pediatr, 2008, 10 (2):221-224]

Key words: Acute gastric mucosal injury; pS2; TGF-α; PCNA; Rats

[收稿日期]2007-08-20;[修回日期]2007-09-28
[作者简介]刘春英,女,博士,副主任医师。主攻方向:儿科危重症及胃肠功能障碍的研究。
[通讯作者]孙梅,教授,中国医科大学第二临床学院儿科,邮编:110004。

胃黏膜上皮的生长、更新和修复的过程是受到严格调控的,这一调控机制主要来自黏膜本身,有多种肽类物质参与,其修复能力可能与这些肽类物质的表达水平有关^[1]。乳癌相关肽(pS2)即三叶因子1(TFF₁)为三叶肽家族一成员,属于生长因子家族。转化生长因子-α(TGF-α)是表皮生长因子家族中一类胃黏膜损伤后修复的主要调节肽。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen,PCNA)是反映细胞增殖性重要的生物学指标。本文在内毒素血症幼年大鼠模型中观察急性胃黏膜损伤和修复过程,免疫组化染色检测胃黏膜TGF-α,pS2及PCNA蛋白表达变化,探讨在急性胃黏膜损伤修复中TGF-α,pS2及PCNA的作用,研究肽类物对胃黏膜的保护作用,为胃黏膜损伤的预防和治疗提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

健康18日龄清洁级Wistar大鼠,不分雌雄,平均体重32.37±6.32g,与母鼠共同饲养,由中国医科大学第二临床学院实验动物中心提供。随机分为实验组(LPS组)和对照组,每组每一时相点(1.5,3,6,24,48,72h)各8只。LPS组腹腔注射内毒素(O₅₅:B₅脂多糖,美国Sigma公司产品)5mg/kg(1mL/kg),用生理盐水溶解。对照组腹腔注射生理盐水1mL/kg。用药后各组均放回鼠笼,继续哺乳。分别于注射后1.5,3,6,24,48,72h处死动物,迅速开腹取胃,沿胃大弯剪开,在腺胃区胃大弯处取0.5cm×0.5cm胃组织置入4%甲醛溶液中固定。

1.2 方法

1.2.1 组织病理学检测 大体观察胃黏膜损伤情况。取胃组织在4%甲醛溶液中固定24h后,石蜡包埋、切片,常规苏木精-伊红染色,光镜观察形态学改变。

1.2.2 免疫组化SP法检测胃黏膜pS2,TGF-α及PCNA蛋白表达 切片常规脱蜡,二甲苯各浸泡10min,四缸酒精(浓度依次为:100%,95%,85%,75%)各浸泡5min,用蒸馏水冲洗。将切片擦干,3%新配制H₂O₂孵育,室温放置10min,灭活内源性酶,蒸馏水洗涤2min,3次。热修复抗原,高温高压修复(EDTA),放置室温自然凉,用蒸馏水冲洗,0.01MPBS(pH7.4)冲洗。滴加10%正常山羊血清,室温温育10min;倾去血清,直接滴加稀释的第一抗体,抗体的工作浓度为:兔抗鼠-pS2IgG即

用型,兔抗鼠-TGF-αIgG1:100,兔抗鼠-PCNAIgG1:100,4℃过夜。0.01MPBS(pH7.4)冲洗2min,3次。滴加生物素化山羊抗兔IgG(第二抗体),37℃反应30min,0.01MPBS(pH7.4)冲洗2min,3次。滴加辣根酶标记链酶卵白素(SP),室温温育30min;0.01MPBS(pH7.4)冲洗2min,3次。DAB显色剂显色3~5min,蒸馏水冲洗。苏木素复染5min,水洗。蒸馏水冲洗30min后脱水、透明、封片,显微镜观察。细胞浆中有棕褐色颗粒者为pS2、TGF-α阳性表达,细胞核中有棕褐色颗粒者为PCNA阳性表达,以PBS代替一抗作为阴性对照。应用OLYMPUS-BX41图像采集系统,MetaMorph/DP10/BX41软件分析系统测定pS2,TGF-α及PCNA平均光密度值。

1.3 统计学处理

数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用SPSS10.0软件系统对实验结果进行统计学分析,组间比较采用方差分析, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 胃黏膜组织病理学改变

大体观察见LPS组1.5h胃黏膜轻度水肿,3h胃黏膜充血、水肿,6h胃黏膜损伤最重,黏膜表面可见大片糜烂、出血、条索状坏死,与胃纵轴平行,损伤主要见于腺胃区,窦部少见,前胃部无损伤,24h黏膜糜烂、出血、坏死灶陈旧,48h黏膜轻度萎缩,72h胃黏膜基本恢复正常;光镜下1.5h黏膜上皮细胞水肿,3h组织充血、水肿,6h黏膜表面上皮广泛脱落,黏膜内有出血,炎性细胞浸润,核碎裂、固缩,凋亡小体出现,腺体受损,24h上皮脱落、中性粒细胞浸润,48h黏膜层变薄、腺体少,72h未见明显异常。对照组胃黏膜表面上皮隐窝细胞形态学正常,腺体结构完整(图1)。

2.2 胃黏膜PCNA的表达

对照组胃黏膜组织细胞核PCNA阳性染色很多,棕褐色,位于胃黏膜基底部。LPS组内毒素腹腔注射后3hPCNA的表达就明显减低,6h最低,24~48h有所上升,但仍低于对照组($P < 0.01$);72h继续上升(图2,表1)。

2.3 胃黏膜pS2蛋白表达

对照组胃黏膜组织细胞浆有pS2表达,LPS组内毒素腹腔注射后1.5h胃黏膜pS2蛋白表达低于对照组,3h恢复正常,6h明显高于对照组,24~72h仍明显高于对照组($P < 0.01$;图3,表2)。

表 1 两组胃黏膜组织细胞核 PCNA 蛋白的表达 (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

分组	1.5 h	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h
对照组	31.2 ± 1.6	32.0 ± 2.5	31.1 ± 3.3	30.9 ± 2.1	31.7 ± 1.7	32.5 ± 2.6
LPS 组	28.2 ± 3.1	22.6 ± 2.1 ^a	19.5 ± 3.1 ^a	20.9 ± 2.2 ^a	23.1 ± 1.0 ^a	27.0 ± 1.3

a: 与对照组比较 P < 0.01

表 2 两组胃黏膜组织细胞浆 pS2 蛋白的表达 (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

分组	1.5 h	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h
对照组	25.3 ± 2.1	25.9 ± 1.9	24.9 ± 2.3	25.7 ± 3.1	24.9 ± 2.7	25.0 ± 2.6
LPS 组	21.9 ± 3.2 ^a	24.7 ± 2.1	28.7 ± 3.3 ^a	31.9 ± 2.2 ^b	30.2 ± 3.0 ^b	31.4 ± 3.3 ^b

a: 与对照组比较, P < 0.05; b: P < 0.01

表 3 两组胃黏膜组织细胞浆 TGF-α 蛋白的表达 (n = 8, $\bar{x} \pm s$)

分组	1.5 h	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h
对照组	24.3 ± 2.1	23.9 ± 1.2	24.5 ± 1.9	25.0 ± 1.6	24.6 ± 2.3	24.7 ± 2.6
LPS 组	25.9 ± 3.1	26.7 ± 2.1	28.5 ± 3.3 ^a	30.7 ± 2.2 ^b	29.2 ± 2.9 ^b	26.4 ± 3.1

a: 与对照组比较, P < 0.05; b: P < 0.01

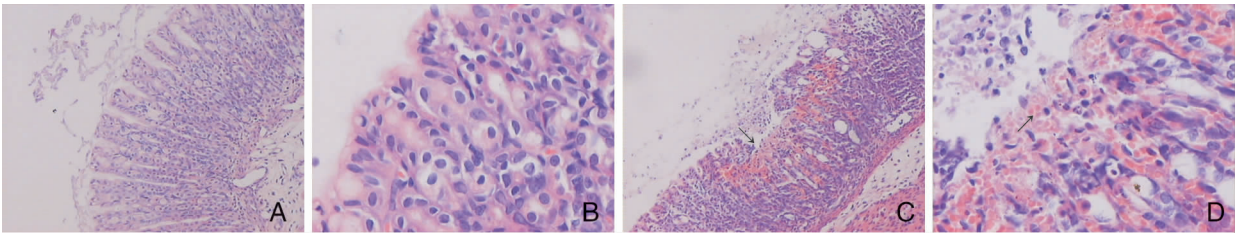


图 1 胃黏膜组织病理学改变(苏木精-伊红染色, ×100, ×400) A,B:对照组胃黏膜表面上皮细胞形态学正常,腺体结构完整;C,D:LPS 组 6 h 黏膜表面上皮广泛脱落,黏膜内有出血,炎性细胞浸润,核碎裂、固缩,凋亡小体出现,腺体受损。

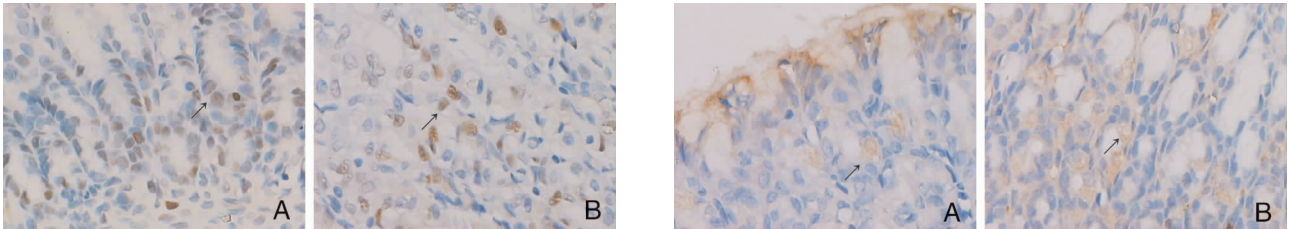


图 2 胃黏膜 PCNA 的表达变化(免疫组化 SP 法, ×400) A:对照组胃黏膜组织细胞核 PCNA 阳性染色很多,棕褐色,位于胃黏膜基底部分;B:LPS 组 6 h PCNA 表达明显减低。

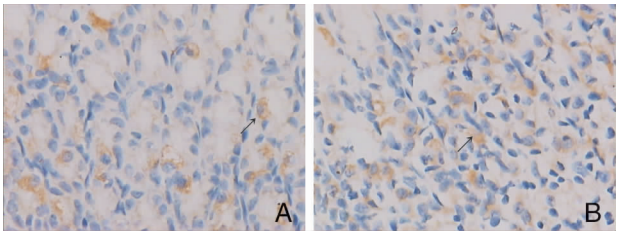


图 3 胃黏膜 pS2 表达变化 A:对照组胃黏膜组织细胞浆有 pS2 表达;B:LPS 组 6 h pS2 表达明显增高。

2.4 胃黏膜 TGF-α 蛋白表达

对照组胃黏膜组织细胞浆有 TGF-α 表达。LPS 组内毒素腹腔注射后 6 h TGF-α 的表达明显增强,

图 4 胃黏膜 TGF-α 表达变化 A:对照组胃黏膜组织细胞浆有 TGF-α 表达; B:LPS 组 6 h TGF-α 表达明显增强。

24 ~ 48 h 最强,明显高于对照组(P < 0.01); 72 h 有所下降(图 4,表 3)。

3 讨论

PCNA 是一种分子量为 36 000 道尔顿核蛋白,是细胞 DNA 合成不可缺少的因子,存在于细胞核内不同部位,其量在静止期细胞中很少,G₁晚期开始增加,S 期达高峰,G₂、M 期则明显减少,这表明 PCNA 的出现与细胞增殖周期密切相关,是反映细胞增殖活性的重要生物学指标^[2]。本研究中幼年大鼠腹腔注射内毒素后 3 h 胃黏膜组织细胞核 PCNA 的表达就明显减低,6 h 最低,24 h 有所恢复,

72 h 未完全恢复。胃黏膜损伤后的修复过程是胃黏膜增殖细胞先游走增殖,即腺颈部成体干细胞首先迁移至缺损黏膜的表面重建黏膜上皮,然后具有多分化潜能的成体干细胞在重建的黏膜中分化成表层上皮细胞并分裂和增殖,最终恢复黏膜的完整性^[3]。内毒素血症时胃黏膜损伤越重,胃黏膜组织细胞核 PCNA 的表达越低;随着胃黏膜损伤的逐渐恢复,PCNA 的表达也逐渐上升。反映了胃黏膜损伤和修复过程中胃黏膜细胞的增殖活性。

有文献报道^[4] pS2 是 1982 年从乳癌细胞系 MCF-7 中克隆了一个雌激素诱导 cDNA pS2,其编码 84 个残基蛋白开放阅读框架,代表一个前肽,当信号肽细胞分裂后产生一个 58 氨基酸分泌蛋白,这种 pS2 氨基酸序列后证实是一个三叶草肽类物质^[5]。pS2 是三叶肽家族成员之一,三叶肽家族主要由乳癌相关肽(pS2)即 TFF1、解痉多肽(SP)即 TFF2 和肠三叶因子(ITF)即 TFF3 组成,其结构都是 6 个半胱氨酸残基形成 3 个链内二硫桥,似 3 片叶子一样结构,又称 P 结构域^[6]。三叶肽对黏膜的保护作用,可能在于增强受损黏膜周围完好的上皮细胞向黏膜损伤表面迁移覆盖,或与黏液中的糖蛋白相互作用,加强黏液凝胶层,抵抗黏膜表层有害物质损伤等。三叶肽对胃黏膜有两个重要功能,即上皮保护和促进黏膜愈合。三叶肽可以看作黏膜损伤的快速反应肽,在黏膜修复的早期阶段上调表达。pS2 通过调节细胞增殖而使胃黏膜具有防御和修复功能^[7],其对不同细胞系具有促有丝分裂作用^[8]。由此推测,pS2 可能参与胃黏膜细胞有丝分裂,使细胞增殖,从而修复胃黏膜。本研究结果显示:幼年大鼠腹腔注射内毒素后 1.5 h 胃黏膜组织细胞浆中 pS2 蛋白表达明显减弱,3 h 恢复正常,6 h 明显高于正常,24 ~ 72 h 仍明显高于对照组。这表明 pS2 在黏膜修复的早期阶段上调表达并刺激细胞移行,可能调节急性胃黏膜损伤早期愈合即重建^[9]。幼年大鼠内毒素血症时,pS2 表达上调,可能通过介导细胞增殖参与急性胃黏膜细胞保护作用。

TGF- α 是 EGF 家族中一类参与胃黏膜损伤后修复的主要调节肽。1978 年 Delarco 等从 Rous Sarcoma 病毒转化的成纤维细胞培养上清液中提取出 TGF。后来研究发现,TGF 分 TGF- α 和 TGF- β 两型。TGF- α 能促进胃黏膜上皮的代谢和生长。由于胃黏膜本身合成 TGF- α ,合成部位见于粘液上皮、壁细胞和主细胞等多种胃黏膜细胞成分,所以 TGF- α 是维持胃黏膜完整性最重要的肽类物质^[10]。胃黏

膜对胆酸、盐酸、乙醇和阿司匹林等多种损伤,可迅速引起黏膜 TGF- α 的反应性表达^[8]。本研究结果显示:幼年大鼠腹腔注射内毒素后 6 h 胃黏膜组织细胞浆中 TGF- α 蛋白表达明显增强,24 ~ 48 h 最强,72 h 有所下降,仍明显高于正常对照组。因此,内毒素血症时胃黏膜损伤,胃黏膜中 TGF- α 表达增强,可能促进了胃黏膜上皮的代谢和生长,参与胃黏膜的修复。

综上所述,幼年大鼠内毒素血症时,胃黏膜 PCNA 表达变化反映了胃黏膜损伤和修复过程中胃黏膜细胞的增殖活性;pS2 表达上调,可能通过介导细胞增殖参与急性胃黏膜细胞保护作用;TGF- α 表达增强,可能促进了胃黏膜上皮的代谢和生长,参与胃黏膜的修复。pS2、TGF- α 等肽类物质对胃黏膜的保护和修复作用十分重要,对肽类物质的研究有可能为胃黏膜损伤的预防和治疗开辟新的途径。

参 考 文 献

[1]

任建林,潘金水,卢雅丕. 三叶因子与胃黏膜保护的研究进展[J]. 世界华人消化杂志, 2005, 13(21):2575-2577.

[2]

Waga S, Hannon GJ, Beach D, Stillman B. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA[J]. Nature, 1994, 369(6481): 574-578.

[3]

曾冬竹,余佩武,蔡志民. 严重腹腔感染时急性胃黏膜损伤的实验研究[J]. 重庆医学, 2002, 31(4):288-290.

[4]

Nie SN, Qian XM, Wu XH, Yung SY, Tang WJ, Xu BH. et al. Role of TFF in healing of stress-induced gastric lesions[J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(8):1772-1776.

[5]

Bossenmeyer-Pourie C, Karman R, Ribieras S, Wendling C, Stoll I, Thim L, et al. The trefoil factor 1 participates in gastrointestinal cell differentiation by delaying G1-S phase transition and reducing apoptosis[J]. J Cell Biol, 2002, 157(5): 761-770.

[6]

Farrell JJ, Taupin D, Koh TJ, Chen D, Zhao CM, Podolsky DK, et al. TFF2/SP-deficient mice show decreased gastric proliferation, increased acid secretion, and increased susceptibility to NSAID injury[J]. J Clin Invest, 2002, 109(2): 193-204.

[7]

聂时南,孙海晨,吴学豪,钱晓明. 三叶肽对胃黏膜适应性细胞保护的调节[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(5):302-306.

[8]

Podolsky DK. Mechanisms of regulatory peptide action in the gastrointestinal tract: trefoil peptides[J]. J Gastroenterol, 2000, 35 (Suppl 12):69-74.

[9]

Nie SN, Sun HC, Wu XH, Qian XM. Cyclooxygenase 2, pS2, inducible nitric oxide synthase and transforming growth factor alpha in gastric adaptation to stress[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(23): 3537-3541.

[10]

王春虹,刘丽娜,吕申. 胃癌组织中转化生长因子- α 、表皮生长因子受体和增殖细胞核抗原的表达[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(31):3026-3029.

(本文编辑:吉耕中)