论著

文章编号:1000-5404(2011)13-1358-04

大鼠胃溃疡自愈期间三叶因子2的变化

张 静,吴靖芳,任君旭,王志勇,王浩宇,张 耕 (075000 河北 张家口,河北北方学院基础医学院组织学与胚胎学教研室)

【摘要】 **目的** 研究大鼠实验性胃溃疡自愈期间三叶因子2(trefoil factor family 2,TFF2)在血清、胃液和胃黏膜组织中的变化及意义。**方法** SD大鼠按随机数字表法分为溃疡组($n=42$)、盐水组($n=42$)、正常组($n=6$),胃前壁黏膜下注射冰乙酸制备大鼠胃溃疡模型,免疫组织化学法检测各组大鼠胃黏膜组织TFF2的表达变化;ELISA法检测各实验组大鼠血清及胃液TFF2变化趋势。**结果** 胃黏膜、血液及胃液检测结果显示在溃疡术后早期(1、2、4、6 d)TFF2增多较为明显。胃黏膜TFF2原位表达以溃疡术后6 d阳性细胞最多(24.50±5.68)($P<0.01$),表达强度较强,可见以壁细胞、颈黏液细胞为主的阳性表达;血清TFF2以溃疡2 d含量最高(338.62±58.72) pmol/L($P<0.01$);胃液TFF2含量以溃疡术后1 d最高(5 021.65±291.69) pmol/L。胃黏膜、血液、胃液TFF2表达量自溃疡术后10 d有所下降,但均高于相应盐水组及正常组($P<0.05$,$P<0.01$)。**结论** 在胃溃疡自愈早期,TFF2在胃黏膜、血液和胃液表达水平均较高,其通过不同的表达途径参与了胃溃疡修复过程。

【关键词】 胃溃疡;三叶因子2;免疫组织化学;酶联免疫吸附实验;大鼠
【中图法分类号】 R573.1;R363.27;R364.3 【文献标志码】 A

Expression profile of trefoil factor family 2 during healing of gastric ulcer in rats

Zhang Jing, Wu Jingfang, Ren Junxu, Wang Zhiyong, Wang Haoyu, Zhang Geng (Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Hebei North University, Zhangjiakou, Hebei Province, 075000, China)

【**Abstract**】 **Objective** To explore the expression of trefoil factor family 2 (TFF2) in gastric mucosa, serum and gastric juice in rats with gastric ulcer. **Methods** Rat gastric ulcer was inflicted by injection acetic acid to submucosa of paries anterior gastricus. The expressions of TFF2 in gastric mucosa of gastric ulcer group (GU), normal saline group (NS) and normal group (N) were detected by immunohistochemical (IHC) staining. Its level in serum and gastric juice were detected by ELISA. **Results** The results of IHC and ELISA showed that the expression of TFF2 peptide was significantly increased in the early stage of healing of gastric ulcer (1, 2, 4 and 6 d). The immunohistochemical expression of TFF2 reached the peak on the day 6 in GU (24.50±5.68), and its immunostaining was more stronger near the muscularis mucosa, which mainly located in the cytoplasm of parietal cells and mucous neck cells. The serum level of TFF2 was the highest on the day 2 (338.62±58.72 pmol/L) and that of gastric juice was on day 1 (5 021.65±291.69 pmol/L), respectively, and both of them were significantly higher than those of normal saline group and normal group. **Conclusion** TFF2 is strongly expressed in the mucosa, serum and gastric juice in early stage of gastric ulcer healing. TFF2 might be involved in the healing of gastric mucosa through different expression ways.

【**Key words**】 gastric ulcer; trefoil factor family 2; immunohistochemistry; ELISA; rats

Supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2007000906). Corresponding author: Wu Jingfang, Tel: 86-313-4029346, E-mail: wjfxg@163.com

三叶因子家族(trefoil factor family, TFFs)是近年来发现的由胃肠道黏液细胞分泌的小分子多肽,具有黏膜保护与修复、肿瘤抑制、信号传导、调节细胞凋亡等功能[1]。三叶因子2(trefoil factor family 2,TFF2)是其中重要成员,又称为解痉多肽(spasmolytic polypeptide,SP),在胃肠道炎症损伤早期,TFF2即被诱导表达,是胃肠道重要的保护因子之一[2]。胃溃疡损伤后胃黏膜修复是一个复杂过程,可能与黏膜自身表达保护因子或者体液调节有关[3]。本实验通过建立大鼠实验性胃溃疡模型,动态检测在胃溃疡自愈过程中胃黏膜、血液、胃液中TFF2的表达变化,探讨TFF2通过不同的表达途径在胃黏膜修复过程中的意义。

【基金项目】 河北省自然科学基金(C2007000906)
【通信作者】 吴靖芳,电话:(0313)4029346,E-mail:wjfxg@163.com

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

雄性 8 周龄 SD 大鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司)90 只,体质量 180 ~ 230 g,按随机数字表法分为实验性胃溃疡组 42 只,盐水组 42 只和正常组 6 只。

1.2 试剂

兔抗大鼠 TFF2 多克隆抗体购自武汉博士德生物技术有限公司,S-P 9001 试剂盒、DAB 显色剂购自北京中杉金桥生物技术有限公司,大鼠 TFF2 ELISA 试剂盒购自美国 ADL 公司。

1.3 动物模型建立及取材

溃疡组大鼠经 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,常规消毒,打开腹腔,在胃前壁近胃窦处,注射 0.01 ml 冰醋酸至胃黏膜下层,并将大网膜覆盖于注射部位,制成胃溃疡模型[4];盐水组模拟手术,注入等量生理盐水代替冰醋酸;正常组不做任何处理。溃疡组和盐水组分别于术后 1、2、4、6、10、14、23 d 7 个时间点取材,每次 6 只,正常组 6 只与术后 1 d 组同时取材。各组动物饲养条件相同,取材前将动物禁食 12 h,不限饮水,经 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉后,迅速开胸,主动脉插管,剪开右心耳,首先灌注生理盐水 100 ml,继之灌注 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液 250 ml,维持 20 min,开腹取胃。沿胃大弯剪开大鼠胃壁,溃疡组剪取溃疡边缘约 3 mm × 5 mm 的组织条,盐水组及正常组剪取近胃窦处胃组织,置于 Bouin's 液中,石蜡包埋,连续切片,厚 6 μm,裱贴于涂有 APES 的载片,行免疫组化染色;同时于灌注固定前心脏穿刺取血,2 000 r/min 离心 10 min,取血清;胃液收集方法于取材胃组织前,将胃残留内容物收集入离心管中,2 000 r/min 离心 10 min,取上清即为胃液,以备 ELISA 检测。

1.4 免疫组织化学(S-P)检测胃黏膜 TFF2 表达

石蜡切片常规脱蜡至水,枸橼酸缓冲液(pH = 6.0)微波热修复,3% 甲醇-H_2O_2 去除内源性过氧化物酶,滴加一抗(1∶100),4 ℃孵育过夜,次日滴加生物素化二抗,室温 30 min,滴加辣根酶标记链霉卵白素,室温 30 min,DAB 显色,苏木精复染细胞核,以 PBS 代替一抗作为阴性对照,光镜下观察,并用 Motic6.0 软件进行图像半定量分析,每张切片选取 5 个高倍视野(×400),测定各实验组大鼠胃黏膜 TFF2 阳性目标积分光密度。

1.5 血清及胃液 TFF2 水平

ELISA 法检测血清及胃液 TFF2 水平,严格按照说明书操作。以试剂盒提供标准品绘制标准曲线,利用 Excel 2003 并依据标准曲线计算 TFF2 含量(pmol/L)。

1.6 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,应用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 造模后胃组织大体形态改变

胃前壁溃疡形成在术后 1 d 即可见到,直径 3 ~ 6 mm,呈圆形或椭圆形,边界清楚,中心苍白,周围黏膜充血水肿。典型的龛形溃疡于术后 2、4 d 溃疡最为明显(图 1),并可见大网膜及周围部分肝脏粘连包裹溃疡底部。胃溃疡术后 6 d 起,溃疡面积逐渐减小,组织变硬,逐渐形成瘢痕组织。至溃疡术后 23 d,有的已经接近愈合。

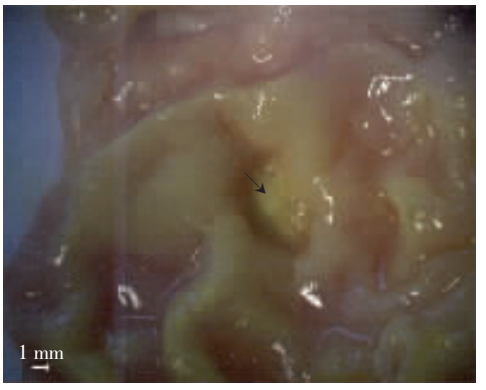
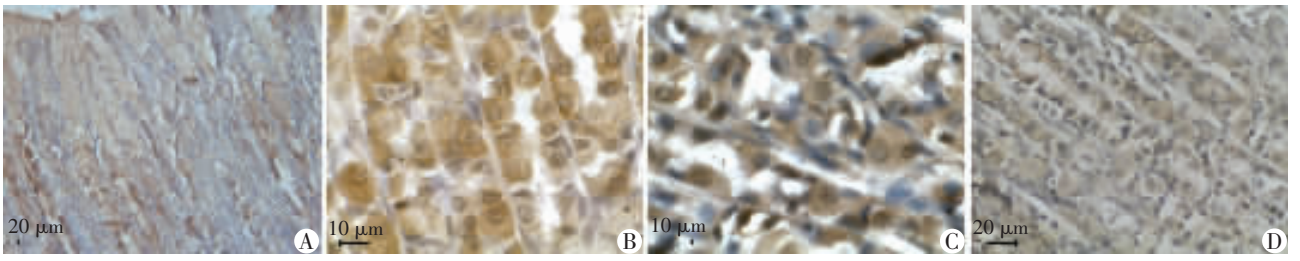


图 1 大鼠胃前壁注射水乙酸 4 d 黏膜大体形态 ↑:示龛形溃疡

2.2 免疫组织化学法检测胃黏膜 TFF2 表达变化

TFF2 蛋白阳性细胞为细胞质呈棕黄色。正常组大鼠胃黏膜 TFF2 蛋白有弱阳性表达,主要见于壁细胞及颈黏液细胞,细胞质着色较浅。溃疡组 1 d TFF2 阳性细胞显著增多,明显高于正常组及盐水组($P < 0.01$),阳性细胞主要分布于胃底腺中上部,可见腺腔内分泌物阳性表达(图 2A)。之后随溃疡术后时间的延长 TFF2 表达呈渐增趋势,溃疡 6 d TFF2 积分光密度值最高,阳性细胞以靠近黏膜肌层信号较强,可见以壁细胞为主的 TFF2 阳性表达(图 2B)。随后溃疡组 TFF2 表达渐弱,但仍维持于较高水平(图 2C),与正常组及相应盐水组相比均有统计学差异($P < 0.01$),溃疡 23 d 组 TFF2 积分光密度值显著降低(图 2D),但仍高于正常组及相应盐水组($P < 0.05$,$P < 0.01$)。见表 1。



A 1 d B 6 d C 10 d D 23 d

图 2 免疫组化(S-P)检测胃溃疡组大鼠胃黏膜中 TFF2 的表达

表1 大鼠胃溃疡自愈期间胃黏膜 TFF2 阳性细胞积分光密度值变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	1 d	2 d	4 d	6 d	10 d	14 d	23 d
溃疡组	42	10.05 ± 2.88^{bc}	11.20 ± 3.14^{bc}	14.79 ± 4.45^{bcd}	24.50 ± 5.68^{bcd}	17.26 ± 4.31^{bcd}	15.92 ± 3.49^{bc}	6.40 ± 1.34^{ac}
盐水组	42	7.19 ± 1.65^{b}	6.22 ± 1.42^{a}	5.01 ± 1.51	4.76 ± 1.19	4.91 ± 1.11	4.47 ± 1.00	4.28 ± 1.04
正常组	6	4.76 ± 1.21	4.76 ± 1.21	4.76 ± 1.21	4.76 ± 1.21	4.76 ± 1.21	4.76 ± 1.21	4.76 ± 1.21

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常组比较；c：$P<0.01$，与盐水组比较；d：$P<0.01$，与1 d比较

表2 大鼠胃溃疡自愈期间血清 TFF2 含量变化(pmol/L，$\bar{x} \pm s$)

组别	n	1 d	2 d	4 d	6 d	10 d	14 d	23 d
溃疡组	42	203.97 ± 47.20^{bc}	338.62 ± 58.72^{bce}	291.41 ± 56.63^{bce}	285.36 ± 51.34^{bce}	238.65 ± 46.29^{bc}	217.94 ± 66.54^{bc}	148.03 ± 34.21^{bcd}
盐水组	42	136.41 ± 14.46^{b}	187.22 ± 38.37^{b}	102.81 ± 14.71^{a}	85.86 ± 31.36	68.67 ± 29.56	59.37 ± 15.72	56.89 ± 14.78
正常组	6	52.69 ± 19.62	52.69 ± 19.62	52.69 ± 19.62	52.69 ± 19.62	52.69 ± 19.62	52.69 ± 19.62	52.69 ± 19.62

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常组比较；c：$P<0.01$，与盐水组比较；d：$P<0.05$，e：$P<0.01$，与1 d比较

表3 大鼠胃溃疡自愈期间胃液 TFF2 含量变化(pmol/L，$\bar{x} \pm s$)

组别	n	1 d	2 d	4 d	6 d	10 d	14 d	23 d
溃疡组	42	$5\,021.65 \pm 291.69^{bd}$	$4\,764.97 \pm 520.41^{bd}$	$4\,210.55 \pm 647.77^{bdf}$	$4\,272.76 \pm 855.32^{bde}$	$2\,551.75 \pm 634.02^{bdf}$	$2\,333.21 \pm 515.03^{acf}$	$2\,229.46 \pm 409.31^{acf}$
盐水组	42	$3\,417.42 \pm 506.52^{b}$	$2\,902.67 \pm 682.58^{b}$	$2\,355.52 \pm 569.06^{a}$	$1\,817.73 \pm 356.39$	$1\,591.47 \pm 403.94$	$1\,594.64 \pm 284.76$	$1\,609.75 \pm 361.37$
正常组	6	$1\,588.26 \pm 353.52$	$1\,588.26 \pm 353.52$	$1\,588.26 \pm 353.52$	$1\,588.26 \pm 353.52$	$1\,588.26 \pm 353.52$	$1\,588.26 \pm 353.52$	$1\,588.26 \pm 353.52$

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与正常组比较；c：$P<0.05$，d：$P<0.01$，与盐水组比较；e：$P<0.05$，f：$P<0.01$，与1 d比较

2.3 ELISA 法检测血清 TFF2 表达水平

溃疡组于术后1 d即显著增多，2～6 d维持于较高水平，以2 d含量最高，之后虽呈下降趋势，但仍高于正常组、盐水组($P<0.01$)。盐水组TFF2含量较正常组在1、2、4 d有所升高($P<0.05$，$P<0.01$)，之后与正常组相比无统计学差异($P>0.05$)。见表2。

2.4 ELISA 法检测胃液 TFF2 表达水平

溃疡组于术后1～4 d即保持较高水平，以1d含量最高，6 d后略有下降，但仍高于正常组、盐水组($P<0.05$，$P<0.01$)。盐水组TFF2含量较正常组在1、2、4 d有所升高($P<0.05$，$P<0.01$)，之后与正常组相比无统计学差异($P>0.05$)。见表3。

3 讨论

TFFs包括乳癌相关肽(pS2或TFF1)、解痉多肽(SP或TFF2)和肠三叶因子(ITF或TFF3)，具有黏膜保护功能和损伤后修复作用[5]。TFF2是三叶因子家族中唯一具有2个三叶草型结构域(P结构域)和糖基化的小分子蛋白质[6]，集中分布在消化性溃疡好发的胃窦和十二指肠。实验表明TFF2基因敲除的小鼠对非甾体药物诱导的溃疡更加敏感[7]，提示TFF2在维持胃肠道黏膜的完整性起重要作用。同时在急性胃损伤时TFF2分泌量增多，对胃肠黏膜具有保护作用，因此TFF2也是重要的促黏膜修复因子。胃溃疡修复是一个动态的过程，涉及局部保护以及神经内分泌调节过程，因此研究胃溃疡自愈过程中TFF2在胃黏膜自身以及血液、胃液中的表达变化，旨在从局部及整体因素探讨TFF2对胃黏膜修复的意义。

本研究中，免疫组化结果显示，自溃疡术后1 d起胃黏膜TFF2肽表达即呈增高趋势，至溃疡术后6 d，积分光密度值达到高峰，随后呈下降趋势，但仍保持较高水平，至溃疡术后23 d TFF2表达虽明显下降，但仍高于正常组表达($P<0.05$)，提示在胃溃疡损伤早期，TFF2即作为早期反应因子即参与黏膜的快速修复过程，此种作用在损伤后早期最为明显，而在后期TFF2表达有所减弱，此时修复作用趋于稳定，有学者认为如果在损伤修复后期TFF2仍持久性表达上调实际容易导致肿瘤的形成[7]。同时从定位结果看自溃疡术后6 d起，TFF2阳性表达以胃黏膜中下层为主，以靠近黏膜肌层胃腺细胞阳性信号较强。Yamaguchi等[8]发现在大鼠胃损伤后，TFF2表达存在于胃底腺基部，并伴有细胞核增殖抗原阳性，提示此阶段TFF2表达可能与胃腺增殖有关，从而促进黏膜的修复。此外我们的实验显示TFF2阳性细胞多见于壁细胞，推测可能与其抑制胃酸分泌密切相关[9]，参与胃黏膜的保护。

国外学者研究发现在人体多种器官及组织均有三叶因子的分布及表达[9]。Thim等[10]发现猪胰腺组织、胰液及血清中TFF2变化是一致的；Vestergaard等[11]在对胃肠道炎性或伴有溃疡的患者研究中发现血清TFF2水平是增高的，并且其水平与临床及生化指标具有相关性。因此在胃溃疡发生及自愈过程中胃以外的器官所表达的TFF2可能作为一种激素入血。我们通过ELISA法检测血清TFF2表达变化，发现TFF2在早期增高较为明显，说明TFF2作为早期反应因子在全身其他器官及组织亦有表达，通过内分泌作用进入周围血管中，从而通过血液循环参与胃黏膜修复；此外我们也考虑胃本身TFF2表达升高，也可分泌或扩散入血。

肠三叶因子能与黏蛋白中的糖链结合，形成稳定的复合物，对维持肠黏液稳定性及增强肠道防御能力具有重要意义[12]。而我们的免疫组化结果显示，溃疡术后1 d TFF2阳性细胞主要表达于胃黏膜中上部，胃腺腔及黏膜表面，推测胃黏膜损伤早期TFF2即可被释放入腺腔或黏膜表面并与黏蛋白结合，能减少胃酸

渗透及蛋白酶、有害物质对黏膜的损伤，因此 TFF2 可作为一种快速反应肽发挥对胃黏膜的保护作用。此结果提示胃黏膜自身分泌的保护因子 TFF2 可能是胃液中 TFF2 来源之一，同时我们课题组在对大鼠颌下腺、舌下腺免疫组化研究中也均发现在导管上皮细胞中均有 TFF2 阳性细胞，且在早期表达较强[13]，而在本研究中 ELISA 检测胃液结果也显示在胃溃疡修复早期 TFF2 含量较高，因此我们推测，在胃溃疡自愈期间唾液腺内所含 TFF2 可随唾液进入消化道，可能是胃液中 TFF2 的另外来源途径，通过胃液在胃肠道中发挥作用，参与胃黏膜损伤后的修复。

本研究结果显示，在溃疡愈合早期，胃黏膜、血液、胃液 TFF2 表达水平均较高，因此 TFF2 作为一种早期黏膜保护因子在胃溃疡自愈过程中的修复作用具有重要意义。它不仅可在胃黏膜局部分泌表达，亦可通过内分泌入血，也可进入胃液参与胃黏膜的修复作用，其作用的不同途径对临床研究 TFF2 生物制剂及给药途径具有提示作用。

参考文献：

[1] 周学文，周天羽，才丽萍，等. 三叶因子2在胃黏膜病变中的表达[J]. 中国中西医结合消化杂志，2010，18(2)：95－98.
[1] Hoffmann W. Trefoil factors TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution [J]. Cell Mol Life Sci, 2005, 62(24)：2932－2938.
[3] Schubert M L. Gastric exocrine and endocrine secretion[J]. Curr Opin Gastroenterol, 2009, 25(6)：529－536.
[4] 张静，吕洋，吴靖芳，等. 大鼠实验性胃溃疡自愈期间胃黏膜三叶因子2的变化[J]. 解剖学报，2010，41(4)：581－586.
[5] Vestergaard E M, Nexo E, Torring N, *et al*. Promoter hypomethylation and upregulation of trefoil factors in prostate cancer[J]. Int J Cancer, 2010, 127(8)：1857－1865.
[6] Michelis R, Sela S, Sbeit W, *et al*. Decreased TFF2 expression in the gastric antrum in patients infected with CagA-positive Helicobacter pylori[J]. Isr Med Assoc J, 2009, 11(1)：11－15.
[7] Farrell J J, Taupin D, Koh T J, *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.
[8] Yamaguchi H, Goldenring J R, Kaminishi M, *et al*. Association of spasmolytic polypeptide-expressing metaplasia with carcinogen administration and oxyntic atrophy in rats[J]. Lab Invest, 2002, 82(8)：1045－1052.
[9] Kjellev S. The trefoil factor family - small peptides with multiple functionalities[J]. Cell Mol Life Sci, 2009, 66(8)：1350－1369.
[10] Thim L, Jorgensen K H, Jorgensen K D. Pancreatic spasmolytic polypeptide (PSP)：II. Radioimmunological determination of PSP in porcine tissues, plasma and pancreatic juice[J]. Regul Pept, 1982, 3(3/4)：221－230.
[11] Vestergaard E M, Brynskov J, Ejskjaer K, *et al*. Immunoassays of human trefoil factors 1 and 2：measured on serum from patients with inflammatory bowel disease[J]. Scand J Clin Lab Invest, 2004, 64(2)：146－156.
[12] 王臻，王林，万千雪，等. 含hITF启动子的荧光素酶报告质粒的构建及活性检测[J]. 第三军医大学学报，2010，32(10)：1024－1027.
[13] 吴靖芳，杨明月，张静，等. 三叶因子2在大鼠下颌下腺内的表达及其与实验性胃溃疡愈合的关系[J]. 解剖学报，2010，41(5)：724－727.

(收稿：2011-01-01 修回：2011-02-12)
(编辑 王小宴)

(上接1357页)

型可以分为血管肉瘤、横纹肌肉瘤、骨肉瘤、纤维肉瘤、平滑肌肉瘤以及未分化肉瘤等。原发性心脏肿瘤患者的症状与肿瘤的大小、位置以及组织学类型有关，但大多数患者无特殊症状。右房和右室肿瘤可能会造成肺栓塞[2]，并且右室流出道或肺动脉梗阻可能会造成右室增大以及右心衰。而我们报道的这例患者正是以右心衰为先发症状。原发心脏肿瘤的诊断并不困难，依靠心脏超声、CT或MRI就可以确诊。恶性肿瘤的影像学表现和良性有一定区别，表现在恶性肿瘤与心脏的连接部位比较宽大，有时缺乏明显的蒂部，可以向肺静脉、房间隔甚至向心外浸润[3]。与良性肿瘤相比，恶性肿瘤常常累及多个心腔，并且可以破坏瓣膜。

原发性心脏肉瘤的治疗策略包括外科切除、化疗以及放疗。其中又以外科手术切除为首选。即便是对于那些有远处转移的患者，为了维持相对正常的血流动力学状态，也应该积极的行手术治疗。也有报道对于肿瘤巨大，预计手术切除困难的患者，可以首先采用化疗治疗，待肿瘤缩小后再行手术切除。也有报道单独采用大剂量放疗而长期存活的个案[4]。对于手术切除彻底的患者术后是否需要辅助化疗或放疗，目前尚无统一意见。由于原发性心脏肉瘤在发现时多处于进展明显的阶段，所有愈后极差，平均存活时间9～11个月[5]，影响远期生存的因素包括心功能状况、病变位置、是否存在坏死或转移以及低有丝分裂计数等。

参考文献：

[1] Zhang P J, Brooks J S, Goldblum J R, *et al*. Primary cardiac sarcomas：a clinicopathologic analysis of a series with follow-up information in 17 patients and emphasis on long-term survival [J]. Hum Pathol, 2008, 39 (9)：1385－1395.
[2] Simpson L, Kumar S K, Okuno S H, *et al*. Malignant primary cardiac tumors：review of a single institution experience[J]. Cancer, 2008, 112(11)：2440－2446.
[3] Thomas-de-Montpreville V, Nottin R, Dulmet E, *et al*. Heart tumors in children and adults：clinicopathological study of 59 patients from a surgical center[J]. Cardiovasc Pathol, 2007, 16(1)：22－28.
[4] Movsas B, Teruya-Feldstein J, Smith J, *et al*. Primary cardiac sarcoma：a novel treatment approach [J]. Chest, 1998, 114(8)：648－652.
[5] Kim C H, Dancer J Y, Coffey D, *et al* . Clinicopathologic study of 24 patients with primary cardiac sarcomas：a 10-year single institution experience[J]. Hum Pathol, 2008, 39(6)：933－938.

(收稿：2011-02-14 修回：2011-03-14)
(编辑 王小宴)