

· 临床论著 ·

慢性萎缩性胃炎痰瘀互结证患者胃窦组织中 Lgr5、E-cad、N-cad、p65 蛋白及 miR-21 表达研究

张 伦^{1,2} 邱健行² 龚秀丽^{1,2} 罗聪玲¹ 李立平^{1,2}

摘要 目的 观察慢性萎缩性胃炎痰瘀互结证患者胃窦组织中 Lgr5、E-cad、N-cad、p65 蛋白及 miR-21 表达变化。方法 33 例慢性萎缩性胃炎痰瘀互结证患者(研究组)作为研究对象,33 名健康志愿者作为健康对照组(对照组)。电子胃镜组织活检获取两组胃窦黏膜组织,采用 Western Blot 技术观察两组胃窦黏膜组织中 Lgr5、E-cad、N-cad、p65 蛋白表达的差异;采用实时荧光定量 PCR 检测两组胃窦黏膜组织中 miR-21 表达变化。结果 研究组 Lgr5、N-cad、p65 蛋白相对表达量较对照组升高($P<0.01$),E-cad 蛋白相对表达量较对照组降低($P<0.01$);研究组 miR-21 相对表达量较对照组升高($P<0.01$)。结论 慢性萎缩性胃炎痰瘀互结证患者胃窦组织中 Lgr5、E-cad、N-cad、p65 蛋白及 miR-21 表达异常,可能与慢性萎缩性胃炎的发生有关。

关键词 慢性萎缩性胃炎;痰瘀互结证;Lgr5;E-cad;N-cad;miR-21

Expressions of Lgr5, E-cad, N-cad, NF- κ B, and miR-21 in the Gastric Antrum Tissues of Chronic Atrophic Gastritis Patients with Accumulation of Phlegm and Blood Stasis Syndrome ZHANG Lun^{1,2}, QIU Jian-xing², GONG Xiu-li^{1,2}, LUO Cong-ling¹, and LI Li-ping^{1,2} 1 Department of Gastroenterology, Guangdong Second Traditional Chinese Medicine Hospital (Guangdong Institute of Traditional Chinese Medicine Engineering), Guangzhou (510095); 2 QIU Jian-xing National Famous Chinese Medicine Studio of Guangdong Province, Guangzhou (510095)

ABSTRACT To observe the expressions of Lgr5 protein, E-cad protein, N-cad protein, p65 protein (NF- κ B), and miR-21 in gastric antrum tissues of chronic atrophic gastritis (CAG) patients with accumulation of phlegm and blood stasis syndrome (APBSS). **Methods** Totally 33 CAG patients with APBSS were recruited as the study group, while 33 healthy volunteers were recruited as the healthy control group (Control group). Their gastric antrum tissues were collected by biopsy under electronic gastroscope. The expressions of Lgr5 protein, E-cad protein, N-cad protein, and p65 protein (NF- κ B) in different gastric antrum tissues were observed by Western Blot, and the expressions of miR-21 in different gastric antrum tissues were detected by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** The relative expressions of Lgr5, N-cad protein, and p65 protein (NF- κ B) in the study group were higher than those in the control group ($P<0.01$), and the relative expressions of E-cad protein in the study group were lower than those in the control group ($P<0.01$). The relative expression level of miR-21 in the study group was higher than that in the control group ($P<0.01$). **Conclusion** The expressions of Lgr5 protein, E-cad protein, N-cad protein, p65 protein (NF- κ B), and miR-21 in the gastric antrum tissues of CAG patients with APBSS were related to the occurrence of CAG.

KEYWORDS chronic atrophic gastritis; accumulation of phlegm and blood stasis; Lgr5; E-cad; N-cad; miR-21

基金项目:广东省科技计划项目(No. 2014A020212449);邱健行广东省全国名中医工作室项目(No. 2018050)

作者单位:1. 广东省第二中医院(广东省中医药工程技术研究院)脾胃病科(广州 510095);2. 邱健行广东省全国名中医工作室(广州 510095)

通讯作者:李立平, Tel: 020-83492982, E-mail: liliping2014@163.com

DOI: 10. 7661/j. cjim. 20200216. 308

慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 是以胃黏膜萎缩合并肠上皮化生和异型增生为特征性病变的一种常见性、多发性、难治性慢性胃炎。中医学认为, CAG 属“胃痞”“胃脘痛”范畴, 其病位以脾胃为中心, 病机为虚实夹杂, 因病久脾胃虚弱, 正气虚衰, 气血瘀滞, 脾虚生湿, 湿聚成痰, 痰瘀互阻。“痰饮”“血瘀”“气虚”等均为 CAG 常见的致病因素。有研究发现“血瘀”的患者胃黏膜细胞异型增生发生率较高^[1], 而唐伟等^[2]研究中发现 212 例胃癌癌前病变患者中有 17 例患者为痰瘀互结证, 但其研究并未对该证型与胃癌癌前病变风险作进一步探究。本研究以 CAG 痰瘀互结证患者为研究对象, 通过研究其胃窦黏膜组织中 Lgr5、E-cad、N-cad、p65 蛋白及 miR-21 表达情况, 来探讨 CAG 发生的内在机制。

资料与方法

1 诊断标准

1.1 CAG 诊断标准 参考《中国慢性胃炎共识意见》^[3]中诊断标准。

1.2 中医证型辨证标准 参照《中医病证诊断疗效标准》^[4]、《中医内科学》^[5], 并结合临床症状和体征制定痰瘀互结证辨证标准, 主症: 脘腹胀闷疼痛, 痞塞不舒, 或有刺痛, 痛有定处, 身重困倦, 纳呆, 舌质偏暗或有瘀点、瘀斑, 苔白厚或腻。次症: 黑便, 面色暗滞, 脉弦或涩。具备所有主症, 并具备次症中 1 项者, 即可确诊为本证。

2 纳入、排除标准 纳入标准: 符合 CAG 诊断标准及痰瘀互结证辨证标准; 患者知情同意并签署知情同意书。排除标准: 患严重心脑血管疾病、严重呼吸系统疾病、严重支气管哮喘发作期, 生命体征不平稳者; 上消化道肿瘤患者; 上消化道溃疡及溃疡性出血患者; 严重咽部疾病无法进行电子胃镜检查者; 对本研究所使用的中药成分过敏者。

3 一般资料 选取 2015 年 1 月—2017 年 1 月就诊于广东省第二中医院消化内科 CAG 痰瘀互结证患者 (研究组) 33 例。33 名健康志愿者作为对照组。研究组中男性患者 19 例, 女性 14 例, 年龄 37~66 岁, 平均 (49.66±6.58) 岁; 对照组中男性 17 名, 女性 16 名, 年龄 37~47 岁, 平均 (42.91±7.17) 岁。两组性别、年龄构成比较, 差异无统计学意义 ($P>0.05$)。本研究已通过广东省第二中医院伦理委员会批准 (No. 2015001)。

4 检测指标及方法

4.1 电子胃镜检查及标本获取 采用电子胃镜

(GIF0260J, Olympus, 日本) 进行操作, 电子胃镜镜端从患者口腔进入至十二指肠降段, 仔细观察各部位黏膜, 并采集图像。采用内镜一次性使用活检钳钳取胃窦黏膜组织 4 块作为实验材料与病理检查标本, 检查结束后将所留取的胃窦黏膜组织随机分为两组, 一组置于 10% 中性甲醛中固定并送至广东省第二中医院病理科进行病理学分析, 另一组保存于 -80 ℃ 冰箱中保存。

4.2 Western Blot 检测 Lgr5、E-cad、N-cad、p65 蛋白 取出组织置于研钵, 加入液氮, 液氮中充分研磨至粉末状态, 加入总蛋白提取试剂盒中的裂解液进行裂解及总蛋白的提取, ABC 法对提取蛋白进行定量, 样品蛋白适当稀释后进行沸水浴变性 (5 min) 后进行 SDS-PAGE 电泳、转膜, 使用脱脂奶粉进行封闭后一抗孵育 (Lgr5 鼠抗人 1:200、E-cad 鼠抗人 1:400、N-cad 鼠抗人 1:400、p65 鼠抗人 1:500, 内参 β -actin 抗体 1:500) (ABCam 公司, 英国), 洗涤后二抗孵育 (辣根过氧化物酶标记, 羊抗鼠 1:1 000) (ABCAM 公司, 英国), TBS 洗膜 3 次后使用 ECL 发光及显影, 使用胶片 (Eastman Kodak Company, 美国) 及暗盒曝光。使用 Alphaview SA 331 进行胶片图像摄影与条带灰度值的获取。

4.3 实时荧光定量 PCR 检测 miR-21 表达

4.3.1 总 RNA 的提取 胃黏膜组织冰冻研磨后加入 1 mL Trizol, 颠倒混匀后室温下裂解 5 min 后, 低温离心; 加入 0.2 mL 氯仿溶液, 混匀充分, 室温静置 5 min; 低温离心, 上层透明液体转移入新 EP 管中, 加入 0.2 mL 异丙醇, 静置 1 min 后低温离心; 弃上清加入 1 mL 75% 乙醇 (DECP 处理), 轻振荡, 离心弃上清; 40 μ L DEPC 处理无菌水溶解沉淀, 最终获得总 RNA 样品溶液。Nanodrop 2000 微量紫外分光光度计测定 RNA 样品浓度, -80 ℃ 保存样本。

4.3.2 RNA 逆转录实验 总反应体系 50 μ L。RNA template (500~550 ng/ μ L) 1 μ L, miR-21 RT Primer (62.5 nM, 锐博, 中国) 4 μ L, RNase-free H₂O 14 μ L, 70 ℃ 10 min, 0 ℃ 2 min; 5 $\times$ PrimeScript Buffer 10 μ L, Prime Script RT Enzyme Mix 2.5 μ L, Random 6 mers (100 μ mol/L) 10 μ L, template 19 μ L, RNase-free H₂O 8.5 μ L, 37 ℃ $\times$ 3, 85 ℃ 5 s。

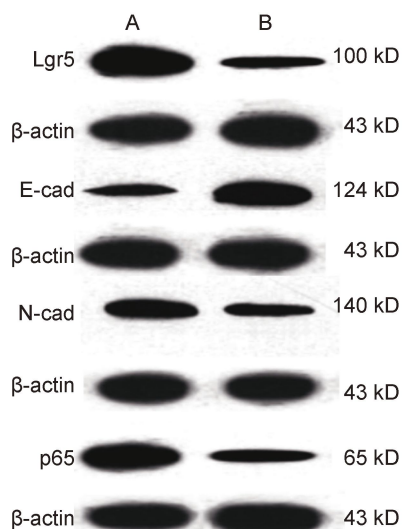
4.3.3 实时荧光定量实验 (总反应体系 20 μ L) SYBR Green Mix 9 μ L, MiR-21 Forward Primer 2 μ L (锐博, 中国), MiR-21 Reverse Primer 2 μ L (锐博, 中国), Template cDNA 2 μ L, RNase-

free H₂O 5 μ L; 反应条件为 95 $^{\circ}$ C 20 s 预变性; 95 $^{\circ}$ C 10 s、60 $^{\circ}$ C 20 s、70 $^{\circ}$ C 10 s 采集荧光, 共 40 cycles, 溶解曲线分析: 70~95 $^{\circ}$ C, 升温速率 0.4 $^{\circ}$ C/次, 恒温时间 1 s/次。同时进行内参 U6 的荧光定量检测。

5 统计学方法 应用统计学软件 SPSS 15.0 对数据进行统计学分析。计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间(两组)变量采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 两组胃窦组织 Lgr5、E-cad、N-cad、p65 蛋白表达比较(图 1, 表 1) 研究组 Lgr5、N-cad、p65 蛋白相对表达量较对照组相对表达量升高($P < 0.01$); 研究组 E-cad 蛋白相对表达量较对照组相对表达量降低($P < 0.01$)。



注: A 为研究组; B 为对照组

图 1 两组 Lgr5、E-cad、N-cad、p65 蛋白表达情况

表 1 两组 Lgr5、E-cad、N-cad、p65 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	Lgr5	E-cad	N-cad	p65
研究	33	24.32 $\pm$ 8.85*	14.67 $\pm$ 7.14*	33.80 $\pm$ 8.31*	31.98 $\pm$ 8.22*
对照	33	10.22 $\pm$ 0.54	30.86 $\pm$ 2.29	10.30 $\pm$ 0.72	10.65 $\pm$ 1.67

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$

2 两组 miR-21 表达比较 研究组 miR-21 相对表达量为 34.06 $\pm$ 15.75, 对照组相对表达量为 14.76 $\pm$ 1.57。两组比较, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。

讨 论

CAG 是以胃黏膜细胞凋亡而导致腺体萎缩、腺体

数量减少为病理基础的慢性胃黏膜病变, 由于 CAG 与胃癌的发生及发展具相关性, 因此被定义为癌前病变, 其癌变几率与患者年龄呈正相关^[6,7]。目前药物干预与定期电子胃镜检查^[8], 是预防 CAG 向胃癌发展的最重要临床手段, 而药物干预的选择上, 中西医结合治疗模式为近年来临床治疗 CAG 的首选^[9,10]。CAG 属中医学“胃脘痛”“痞满”“胃痞”范畴, 痰湿、血瘀为病之标, 脾虚为病之本, 概括起来, 其主要病理基础是脾虚与痰瘀互结。“虚”与“痰”、“瘀”相互影响, 脾乃后天之本, 是水谷精微运化的场所, 脾虚乃水谷精微运化不足, 气血化生不足, 血虚而瘀生; 脾虚则水气运化不畅而水积于中焦化生为痰, 痰阻而瘀生, 胃络瘀血, 因此脾虚为痰湿、血瘀之本。瘀则不通, 不通则痛, 因此血瘀者胃脘痛也, 血瘀则血行不畅, 血不达于脾则脾失血养, 脾则虚^[11,12], 岭南气候以“湿”多见, 加上饮食不慎, 湿聚而成痰, 痰湿阻遏气机, 患者久病失治, 气机不畅, 血运无力, 瘀阻脉络, 亦可转化为痰瘀互结证。

Lgr5 是 G 蛋白偶联 7 次跨膜蛋白家族中一员, 被定义为一种干细胞标志物, Lgr5 阳性细胞可长期自我更新并具有多向分化潜能^[13]。但研究发现 Lgr5 与 wnt/ β -catenin 通路激活具相关性, 从而参与胃癌的发生与发展^[14]。本研究与健康对照组比较, CAG 痰瘀互结证患者胃黏膜组织存在 Lgr5 蛋白表达上调; E-cad 是一种跨膜糖蛋白, 广泛存在于人类上皮细胞中且具钙离子依赖性, 其生理活性在于保持细胞间及细胞与细胞外基质间的黏附能力, 从而保持组织结构完整性^[15]。研究发现 E-cad 在细胞中的表达下调与组织的坏死及癌变具相关性^[16]。本研究中发现 CAG 痰瘀互结证患者胃黏膜组织中 E-cad 蛋白相对表达水平较健康组织下调; N-cad 是一种具有传递信号的功能的跨膜蛋白, 目前研究发现 N-cad 蛋白在多种肿瘤细胞内表达上调, N-cad 的异常表达与肿瘤细胞的存活、迁移、浸润及增殖等具相关性^[17]。本研究结果显示 CAG 痰瘀互结证患者胃黏膜组织中 E-cad 蛋白相对表达水平较健康组织上调; NF- κ B 的活化与细胞炎症反应的激活相关, 其细胞内表达水平与组织炎症反应呈正相关, miR-21 是一种与 NF- κ B 的激活具相关性的小 RNA, miR-21 能通过激活上调 NF- κ B 表达参与组织的炎症反应甚至参与癌变的过程^[18]。本研究中, 与健康对照组比较, CAG 痰瘀互结证患者胃黏膜组织存在 p65 蛋白的过表达及 miR-21 的表达上调。

在痰瘀互结证患者胃黏膜组织中存在 Lgr5 蛋白表达上调、E-cad 蛋白表达下调及 N-cad 蛋白表达上

调,提示这三种蛋白的表达异常间接参与 CAG 痰瘀互结证患者的发生;而组织中 p65 蛋白过表达及 miR-21 表达上调进一步提示这一类患者胃黏膜组织具有较高的炎症性反应,而反复的炎症反应亦为 CAG 发生的重要因素。Lgr5、E-cad、N-cad 蛋白均为肿瘤相关性蛋白,而高炎症性反应同样与组织癌变具有相关性,因此本研究下一步将与其他中医临床证型相比较,探究 CAG 痰瘀互结证患者是否具有更高的癌变的风险。

利益冲突: 本文所有署名作者对文稿内容及作者排序无异议,本研究不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 程若东,崔一鸣,陈璐,等. 基于 Logistic 回归模型的慢性萎缩性胃炎癌前病变中医证型规律研究[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(8): 3623-3626.
- [2] 唐伟,马燕,陈久红,等. 胃癌癌前病变患者中医体质类型与证型相关性研究[J]. 安徽中医药大学学报, 2017, 36(4): 30-33.
- [3] 房静远,刘文忠,李兆申,等. 中国慢性胃炎共识意见(2012 年,上海)[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2013, 5(7): 44-55.
- [4] 国家中医药管理局. 中华人民共和国中医药行业标准: 中医病证诊断疗效标准[M]. 南京: 南京大学出版社, 1994: 6.
- [5] 吴勉华,王新月主编. 中医内科学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2012: 190-192.
- [6] Rosania R, Varbanova M, Wex T, et al. Regulation of apoptosis is impaired in atrophic gastritis associated with gastric cancer[J]. BMC Gastroentero, 2017, 17(1): 84.
- [7] Cheng HC, Tsai YC, Yang HB, et al. The corpus-predominant gastritis index can be an early and reversible marker to identify the gastric cancer risk of *Helicobacter pylori*-infected nonnuclear dyspepsia[J]. Helicobacter, 2017, 22(4): 1-8.
- [8] 徐婷婷,苏克雷,李春婷,等. 胃萎 II 号免煎颗粒治疗肝胃不和型慢性萎缩性胃炎的多中心临床研究[J]. 广州中医药大学学报, 2013, 30(6): 779-782, 785.
- [9] Zhang Y, Zhou A, Liu Y, et al. Exploratory factor analysis for validating traditional Chinese syndrome patterns of chronic atrophic gastritis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016: 6872890.
- [10] 魏玮,杨洋,史海霞. 慢性萎缩性胃炎中医诊疗现状、挑战及展望[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(12): 1424-1426.
- [11] 潘华峰,刘友章,王超,等. 慢性萎缩性胃炎虚瘀毒病机及健脾化瘀解毒干预的探讨[J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(5): 1236-1238.
- [12] 沈丽萍. 从“虚、瘀、热”病机论慢性萎缩性胃炎的发病机制[J]. 临床医药文献电子杂志, 2016, 3(1): 194-195.
- [13] 蒋振华,李修岭,丁松泽,等. Lgr 5 与胃癌发生关系的研究进展[J]. 医药论坛杂志, 2016, 37(12): 17-18.
- [14] Zhang Y, Zhou A, Liu Y, et al. Exploratory factor analysis for validating traditional Chinese syndrome patterns of chronic atrophic gastritis[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016: 6872890.
- [15] 刘博,吕洋,刘军超,等. 食管鳞癌组织中 ASPP2、p53、E-cad 表达及其与预后的相关性[J]. 山东医药, 2017, 57(6): 80-82.
- [16] Zhuang GF, Tan Y, Yang YZ, et al. Experiment research of cisplatin implants inhibiting transplantation tumor growth and regulating the expression of KLK7 and E-cad of tumor-bearing mice with gastric cancer[J]. Asian Pac J Trop Med, 2016, 9(6): 606-609.
- [17] 韩雪晶,吴克俭,肖烨,等. N-cad 和 PCNA 在胃癌组织中的表达及临床意义[J]. 世界华人消化杂志, 2011, 19(34): 3477-3482.
- [18] 李立平,吴炜景,赵亚刚. MicroRNA 与胃癌的最新研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2013, 20(4): 312-316.

(收稿: 2019-07-03 在线: 2020-03-20)

责任编辑: 李焕荣

英文责编: 张晶晶