

热水致大鼠慢性萎缩性胃炎胃黏膜组织细胞HSP-70及Fas蛋白表达

张玲霞, 张沥, 陶梅, 王春梅, 陈丹, 宋瑛, 江梅, 曹广周

■背景资料

慢性萎缩性胃炎属于胃癌前状态,他是胃癌发生的重要环节。如何预防萎缩性胃炎的发生、防止萎缩性胃炎向胃癌转变,已成为胃癌防治工作中的一项重要内容。本研究采用热水灌胃制成大鼠萎缩性胃炎的动物模型,证实食用过热饮食会造成胃黏膜损伤形成萎缩性胃炎,从而引起国人对于不良饮食习惯导致胃部疾病的重视并探讨建立科学合理的饮食方式。

张玲霞, 张沥, 陶梅, 宋瑛, 江梅, 曹广周, 西安市中心医院消化科 陕西省西安市 710003

王春梅, 陈丹, 第四军医大学电子显微镜室 陕西省西安市 710033

张玲霞, 1986年西安医科大学本科毕业, 主任医师, 主要从事消化系统疾病的基础与临床研究工作。

西安市科技局科研基金资助项目, No. GG-05127

通讯作者: 张玲霞, 710003, 西安市西五路161号, 西安市中心医院消化科。lingxia63@163.com

电话: 029-87268355-3061

收稿日期: 2006-05-20 接受日期: 2006-07-10

Expression of HSP-70 and Fas protein in gastric mucosa with chronic atrophic gastritis induced by hot water in rats

Ling-Xia Zhang, Li Zhang, Mei Tao, Chun-Mei Wang, Dan Chen, Ying Song, Mei Jiang, Guang-Zhou Cao

Ling-Xia Zhang, Li Zhang, Mei Tao, Ying Song, Mei Jiang, Guang-Zhou Cao, Department of Gastroenterology, Xi'an Municipal Central Hospital, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China

Chun-Mei Wang, Dan Chen, Center of Electron Microscopy, the Forth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China

Supported by the Fund from Xi'an Science and Technology Bureau, No. GG-05127

Correspondence to: Ling-Xia Zhang, Department of Gastroenterology, Xi'an Municipal Central Hospital, 161 Xiwu Road, Xi'an 710003, Shaanxi Province, China. lingxia63@163.com

Received: 2006-05-20 Accepted: 2006-07-10

Abstract

AIM: To observe the expression of HSP-70 and Fas in gastric mucosa with chronic atrophic gastritis induced by hot water perfusion in rats and study the relationship between the pathogenesis of chronic atrophic gastritis and hot high-salt diet.

METHODS: The rat model of atrophic gastritis was constructed by hot water perfusion (55°C, 2.5 mL each time, once a day for 8-65 wk). The expression of HSP-70 and Fas in gastric mucosa were detected by immunofluorescence method and laser scanning confocal microscopy.

RESULTS: There was no expression of HSP-70

and Fas protein in normal gastric mucosa. After hot water perfusion for 24 wk, HSP-70 and Fas protein were expressed in the cytoplasm, exhibiting as granules. After 32-65 wk, the expression of HSP-70 and Fas proteins were more clearly, and both of them were detected by double marker assay.

CONCLUSION: Long time perfusion with hot water may lead to atrophy of gastric mucosa and increase expression of HSP-70 and Fas proteins.

Key Words: Hot water; Gastric mucosa; HSP; Fas; Immunofluorescence; Laser scan focus microscope

Zhang LX, Zhang L, Tao M, Wang CM, Chen D, Song Y, Jiang M, Cao GZ. Expression of HSP-70 and Fas protein in gastric mucosa with chronic atrophic gastritis induced by hot water in rats. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(26):2586-2589

摘要

目的: 研究热水灌胃导致的大鼠萎缩性胃炎(CAG)时胃黏膜组织细胞HSP-70及Fas表达状态,以探讨CAG发病机制及长期热饮食与慢性萎缩性胃炎发生的关系。

方法: 采用热水(55°C, 2.5 mL, 1次/d×8-65 wk)灌胃建立大鼠萎缩性胃炎动物模型,免疫荧光及激光扫描共聚焦显微镜技术检测热水组和正常组大鼠胃黏膜组织细胞HSP-70和Fas蛋白的表达情况。

结果: 正常组胃黏膜组织细胞未见HSP-70及Fas阳性表达,热水组在24 wk胃黏膜在组织细胞的细胞质中可见HSP和Fas阳性表达,呈均质颗粒状,到32-65 wk时表达更加明显。双标记中可见两者共同表达。

结论: 热水长期灌胃可导致胃黏膜萎缩,黏膜组织细胞的HSP及Fas表达增加。

关键词: 热水; 胃黏膜; HSP; Fas; 免疫荧光; 激光扫描共聚焦显微镜

张玲霞, 张沥, 陶梅, 王春梅, 陈丹, 宋瑛, 江梅, 曹广周. 热水致大鼠慢性萎缩性胃炎胃黏膜组织细胞HSP-70及Fas蛋白表达. 世界华人消化杂志 2006;14(26):2586-2589
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/2586.asp>

0 引言

细胞凋亡是细胞死亡中的一种与众不同的死亡形式,发生于各种生理和病理条件下. Fas作为一种细胞膜抗原,主要功能是介导细胞凋亡,具有抵抗Bcl-2蛋白抑制细胞凋亡的作用. 热休克蛋白(HSP)与细胞的转化和恶变过程密切相关,癌基因转化的细胞和人类恶性肿瘤细胞系中, HSP表达增高^[1-3]. HSP通过调控细胞周期所必需的蛋白构象参与细胞的增殖和死亡过程. 我们利用激光扫描共聚焦显微镜(laser scanning confocal microscope, LSCM)的高分辨性及同屏显示不同发射波长荧光色的特性,从形态学方面显示上述两种蛋白在大鼠萎缩性胃炎胃黏膜组织细胞中的共同表达.

1 材料和方法

1.1 材料 健康、性成熟的7 wk ♂ SD大鼠64只(由第四军医动物实验中心提供),体质量200-250 g,按随机化原则分为3组,即正常喂养组、正常对照组和热水组. 每组各20只. 采用架式笼养,恒温 $24\pm 1^{\circ}\text{C}$,湿度50%-60%. 正常喂养组为正常喂养,饮白开水;正常对照组为 25°C 白开水灌胃,每次2.5 mL,1次/d;热水组为 55°C 蒸馏水灌胃,每次2.5 mL,1次/d. 实验开始,先处死正常组大鼠4只,并留取胃大体标本作为对照. 以后各组分别于4, 8, 12, 24, 32, 65 wk各随机取4只,以观察黏膜萎缩情况^[4-5].

1.2 方法 100 g/L戊巴比妥钠5 mL/kg麻醉,取出鼠胃,沿大鼠胃小弯条状取材,包括胃窦及部分胃体,做组织切片. 胃黏膜组织HSP和Fas蛋白表达采用激光共聚焦免疫荧光双标方法. 所需仪器(荧光显微镜、恒温箱、荧光分光光度仪、电镜、共焦镜等)由第四军医大学提供,免疫荧光双标记检测试剂盒由武汉博士德公司提供. (1)将组织切片在二甲苯中浸3次,每次10 min;脱蜡后切片依次浸入梯度乙醇中脱二甲苯,至蒸馏水中浸5 min,0.01 mol/L的PBS振洗3次,每次5 min;正常山羊血清封闭, 37°C , 30 min; (2)分别滴加50 μL 的1:1混合的兔抗大鼠Fas (1:100)和小鼠抗大鼠HSP70 (1:200),设空白对照(无一抗,加PBS)和抗体特异性对照(加一抗不加二

抗,加二抗不加一抗),所有切片同时染色. 切片一抗加入后,置于湿盒内, 4°C , 过夜; (3)取出后 37°C 复温60 min, 0.01 mol/L的PBS振洗3次,每次5 min;免疫荧光双标记分别滴加50 μL 的1:1混合的FITC标记的羊抗小鼠IgG和罗丹明标记羊抗兔IgG, 37°C , 40 min; 0.01 mol/L的PBS振洗3次,每次5 min; 100 mL/L的缓冲甘油封片; (4)所用LSCM的型号为MRC-1024, 装有Zeis100显微镜,用于FITC的激发波长为488 nm, 568 nm用于激发Texas Red, 用于图像采集的显微镜物镜为Plan-Neofluar 40 \times 油浸镜,数值孔径(NA)为1.3,图像存为512 \times 512像素类型,焦距值设为1.0,若需要更大的放大倍数时,可以选择更大的焦距值范围,扫描所用的激光值依据样本不同可以在共聚焦系统提供的梯值中选择.

2 结果

正常对照组于灌胃4, 8, 12, 32 wk时黏膜表面光滑,无糜烂,固有层无炎细胞浸润,黏膜下层无水肿,肌层无炎细胞浸润. 正常对照组于灌胃65 wk时可见黏膜肌层平滑肌轻度增生,呈钉突状向黏膜肌层插入,黏膜出现轻度萎缩改变. 热水组于热水灌胃后第24周大鼠胃黏膜出现腺体明显缩小,黏膜肌层的平滑肌呈束状增生插入黏膜固有层中. 腺体上1/3至2/3腺上皮萎缩,腺管腔增宽,胃小凹颈部黏膜宽度变窄,第32周时大鼠胃黏膜萎缩更加明显(图1). LSCM观察显示,正常组胃黏膜组织细胞未见阳性表达,热水组第24 wk,在细胞质中可见HSP和Fas表达,呈均质颗粒状;到24, 32及65 wk时表达更加明显. 双标记中可见HSP和Fas共同表达(图2).

3 讨论

萎缩性胃炎确切的病因尚未完全阐明,已有的有关萎缩性胃炎病因和发病机制的研究资料多来自流行病学调查资料. 目前认为,萎缩性胃炎的发生与*H pylori*感染有关,其他如酗酒、十二指肠胃反流、长期服用非甾体类消炎镇痛药、吸烟、精神因素、重盐饮食及免疫因素等亦有关. 由于萎缩性胃炎病因的复杂性及其与胃癌的相关性,建立一种萎缩性胃炎的动物模型,对其病因及发病机制进行研究具有重要的意义. 目前,国内外制备萎缩性胃炎动物模型的方法较少,主要有3种: (1)生物制模法,即以*H pylori*感染动物; (2)多种各类理化因子同时反复损伤胃黏膜形成慢性炎症的模型; (3)免疫因素制模

■应用要点

通过免疫荧光染色及激光扫描共聚焦显微镜的高分辨性及同屏显示不同发射波长荧光色的特性,对胃黏膜上皮组织细胞HSP和Fas等蛋白进行了双标记表达,为细胞和组织内部超微结构的研究提供了新的技术和方法.

■同行评价

在萎缩性胃炎形成过程中,细胞凋亡及其调控基因起着极其重要的作用,本文通过热水灌胃后经激光扫描共聚焦显微镜检测到大鼠胃黏膜上皮组织细胞HSP和Fas表达增高,参与了细胞的增殖和凋亡过程,对于临床具有一定参考价值。

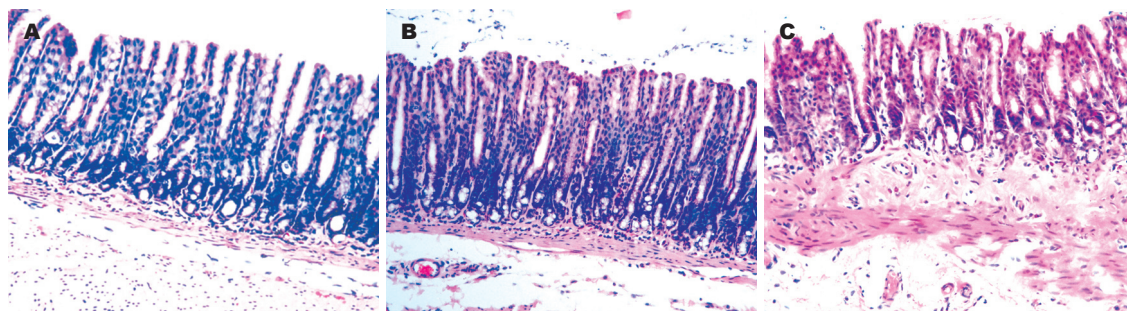


图1 大鼠胃黏膜病理变化($\times 200$). A: 正常对照组; B: 正常对照组65 wk; C: 热水组24 wk.

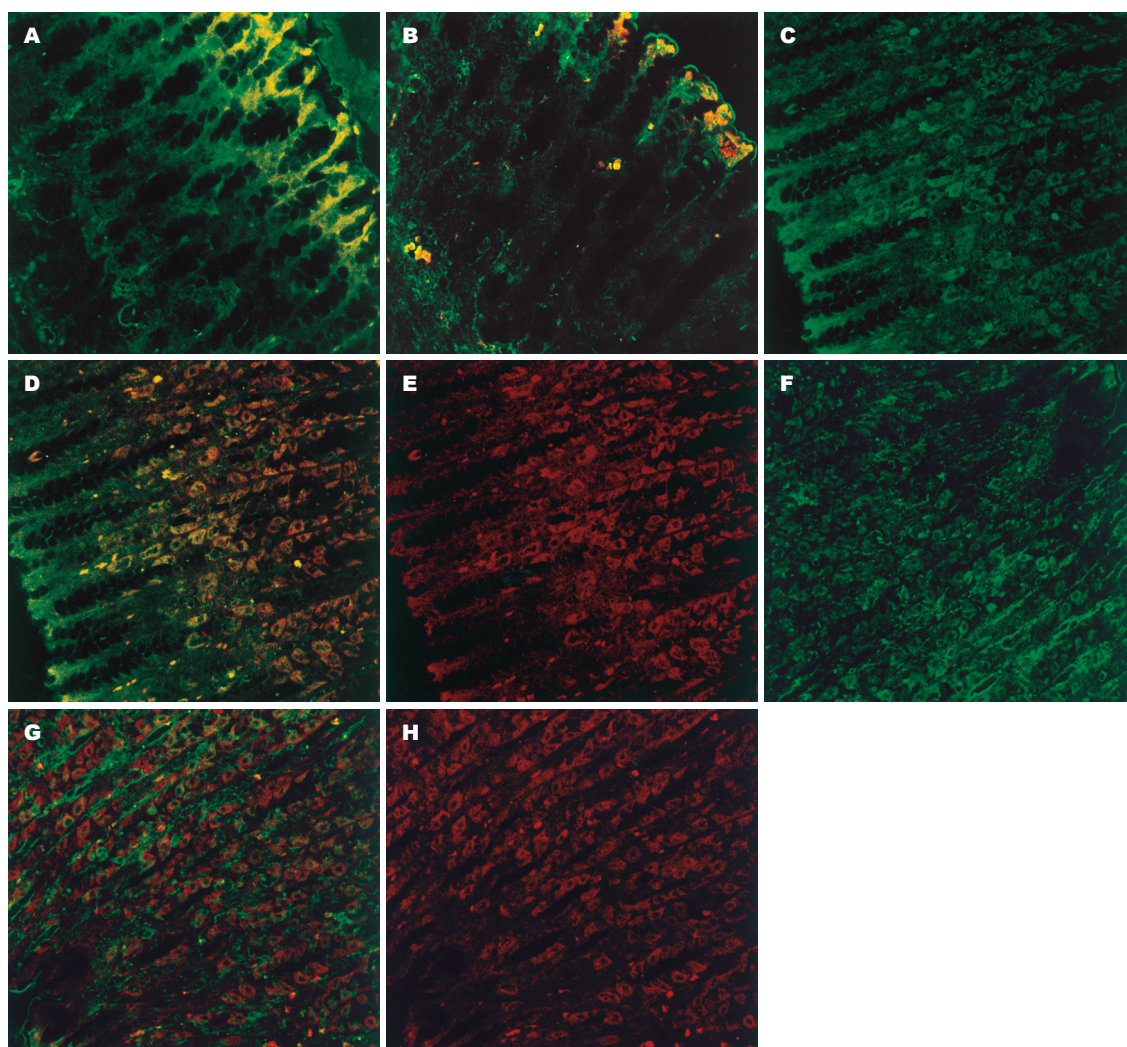


图2 大鼠胃黏膜HSP-70和Fas表达. A: 正常组(24 wk); B: 正常组(65 wk); C: 热水组, HSP-70单标(24 wk); D: 热水组, HSP-70和Fas双标(24 wk); E: 热水组, Fas单标(24 wk); F: 热水组, HSP-70单标(65 wk); G: 热水组, HSP-70和Fas双标(65 wk); H: 热水组, Fas单标(65 wk).

法,形成自体免疫性胃炎模型。仅有的制造萎缩性胃炎动物模型的研究方法多为多因素造模,造模方法复杂、或造模因素较多,或造模时间较长,使模型推广、应用受到限制。本研究采用与人类饮食结构密切相关的因素——温度,制备大鼠萎缩性胃炎动物模型,与国内外其他模

型相比,造模因素的选择更贴近人类饮食习惯,具有造模因素单一、造模时间短、造模方法简单(单纯热水)、造模成功率高、重复性好、病理结果可靠等优点。对于温度与萎缩性胃炎关系的研究提供了可靠的实验方法。

我国最新的一项流行病学调查研究显示,

热、烫饮食是上海市居民胃癌发生的重要危险因素^[6], 长期热、烫饮食可以导致慢性萎缩性胃炎. 研究表明, 慢性萎缩性胃炎与胃癌发生密切相关, 其被列为胃癌前状态^[7]. 在萎缩性胃炎形成过程中, 细胞凋亡及其调控基因起着极其重要的作用. Fas是细胞表面可以传递死亡信号的受体, 其作为一种细胞膜抗原, 主要功能是介导细胞凋亡, 具有抵抗Bcl-2蛋白抑制细胞凋亡的作用^[8-9]. 我们发现, 随着热水灌胃时间延长, 胃黏膜逐渐出现萎缩, 黏膜组织中Fas蛋白表达亦呈逐渐增加趋势, 提示在热盐水灌胃导致胃黏膜组织细胞病变的早期阶段Fas蛋白表达较高^[9]. HSP通过细胞信号转导、细胞周期调控、DNA损伤修复等多途径参与细胞生长繁殖. HSP与细胞的转化和恶变过程密切相关, 癌基因转化的细胞和人类恶性肿瘤细胞系中, HSP表达增高^[1-3], HSP通过调控细胞周期所必需的蛋白构象参与细胞的增殖和死亡过程. 我们发现, 随着热水灌胃时间延长, 胃黏膜组织细胞中HSP-70表达水平逐渐升高, 与正常对照组相比具有非常显著的差异, 其在胃黏膜组织细胞中的高表达可能起着与多种癌基因产物结合形成异源蛋白复合体, 介导癌蛋白构象成熟及转运, 从而参与细胞转化过程的作用.

采用LSCM检测技术对胃黏膜上皮组织细胞HSP和Fas等蛋白进行了双标记表达, 利用计

算机控制及图像处理技术, 实现图像的优化、三维重建和时空的程序控制, 从而得到了细胞内部超微结构的荧光图像, 其分辨率比以往光学成像的分辨率高出30%-40%, 灵敏度高, 为细胞和组织内部超微结构的研究提供了新的技术和方法.

4 参考文献

- 1 郭建成, 张学庸, 杨云生, 叶苓, 李继昌, 樊代明. 热休克蛋白70在人胃癌中呈过度表达. 癌症 1999; 18: 45-46
- 2 程书榜, 洪建琴, 王元和. 胃癌癌变过程中热休克蛋白70、p53蛋白的表达及其意义. 实用癌症杂志 2000; 15: 241-242
- 3 乔绘红, 赵玫, 袁兴华, 施一江, 周纯, 范云霞, 黄常志. 热休克蛋白90 α 的表达及其对体内肿瘤生长的影响. 中华肿瘤杂志 1999; 21: 19-21
- 4 张沥, 张玲霞, 徐俊荣, 曹广周, 江梅, 张宁霞, 贾长河. 热盐水致大鼠萎缩性胃炎动物模型建立. 世界华人消化杂志 2002; 10: 571-574
- 5 Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1161-1181
- 6 鲍萍萍, 高立峰, 刘大可, 陶梦华, 金凡. 上海市居民饮食与胃癌关系的病例对照研究. 中国肿瘤 2003; 12: 66-70
- 7 Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988; 48: 3554-3560
- 8 张玲霞, 张沥. 细胞凋亡及其调控基因与萎缩性胃炎. 世界华人消化杂志 2002; 10: 581-583
- 9 张沥, 张玲霞, 徐俊荣, 贾长河, 张宁霞, 曹广周. 热盐水致胃黏膜细胞凋亡及对热休克蛋白表达影响. 世界华人消化杂志 2003; 11: 2038-2040

电编 张敏 编辑 潘伯荣