

· 基础研究 ·

氦氖激光照射对萎缩性胃炎大鼠增殖细胞核抗原及 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 表达的影响

邵雪辉 王建国 张晓丽 杨跃平 戴洁

【摘要】目的 观察氦氖激光照射对慢性萎缩性胃炎(CAG)大鼠增殖细胞核抗原(PCNA)、B 细胞淋巴瘤/白血病-2(Bcl-2)蛋白表达的影响,从而探讨氦氖激光照射与胃黏膜癌前病变、细胞凋亡间的关系。**方法** 将实验大鼠随机分为正常组、模型组及激光组,模型组及激光组大鼠给予水杨酸钠和酒精混合溶液灌胃,并辅以劳累、饥饿失常等刺激因素以制作 CAG 模型。激光组大鼠于制模成功后给予氦氖激光照射,照射剂量为 3.36 J/cm^2 ,每次 7 min,每天 1 次,连续照射 20 d 为 1 个疗程。于激光照射 20 d 后通过光镜观察各组大鼠胃黏膜炎症程度及壁细胞形态、结构等,采用免疫组化法检测各组大鼠胃窦黏膜 Bcl-2、PCNA 表达。**结果** 光镜观察发现模型组大鼠胃黏膜腺体萎缩、炎性细胞浸润,激光组炎性细胞减少,细胞形态、结构均恢复或接近正常组水平。免疫组化结果显示在胃黏膜萎缩过程中,模型组 PCNA 及 Bcl-2 表达均较正常组升高($P < 0.05$),激光组大鼠经氦氖激光照射后,其 PCNA 及 Bcl-2 表达均明显降低,与模型组间差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** CAG 模型大鼠胃黏膜细胞处于高增殖状态,氦氖激光照射能降低 CAG 大鼠胃黏膜内 PCNA 及 Bcl-2 表达,强化细胞增殖调控功能,诱导细胞凋亡,阻止其向癌变方向发展。

【关键词】 慢性萎缩性胃炎; 氦氖激光; 上皮增殖细胞核抗原; B 细胞淋巴瘤/白血病-2; 癌前病变

Effects of He-Ne laser irradiation on the expression of proliferating cell nuclear antigen and B cell lymphoma/leukemia-2 protein in the gastric mucosa of rats with chronic atrophic gastritis SHAO Xue-hui*, WANG Jian-guo, ZHANG Xiao-li, YANG Yue-ping, DAI Jie. *Department of Medical Physics, Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

Corresponding author: DAI Jie, Email: sydaijie@cpums.edu.cn

【Abstract】Objective To study the effects of He-Ne laser irradiation on histological changes and the expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and B-cell lymphoma/leukemia-2 (Bcl-2) in the gastric mucosa of rats with chronic atrophic gastritis (CAG) so as to elucidate the relationship of He-Ne laser irradiation with precancerous lesions and apoptosis in the gastric mucosa. **Methods** The rats were divided into a normal group, a model group and a laser group. A model of CAG was established by gastric perfusion with a mixture of sodium salicylate and alcohol combined with irregular fasting and forced exercise. A He-Ne laser was used to irradiate the rats at 3.36 J/cm^2 for 7 min daily for 20 d. Histopathological changes including the severity of inflammation in the gastric mucosa and the morphology and structure of the parietal cells were observed with a light microscope, and the expression of PCNA and Bcl-2 was detected with immunohistochemical methods. **Results** The pathologic morphological changes in the gastric mucosa of the model group were atrophy of the glands of the gastric mucosa and notable inflammatory infiltration. But in the laser group inflamed cells decreased, and the morphology, structure and volume of the cells all recovered close to normal. The immunohistochemistry results showed that during the atrophy of the gastric mucosa the expression of PCNA and Bcl-2 was elevated, and it was significantly higher in the model group than in the normal group. After irradiation the expression of PCNA and Bcl-2 was significantly lower. **Conclusions** There was hyper-proliferation in the gastric mucosa of the CAG model rats, with high expression of apoptosis suppressor PCNA and Bcl-2 proteins. Laser irradiation can reduce the expression of PCNA and Bcl-2, enhance cell proliferation and induce apoptosis, preventing the development of cancer. Laser irradiation has a good adjuvant therapeutic effect for all the pathological changes observed.

【Key words】 Chronic atrophic gastritis; He-Ne lasers; Proliferating cell nuclear antigen; B-cell lymphoma/leukemia-2; Precancerous lesions

DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1424.2012.03.007

基金项目:河北省卫生厅医学科学重点研究课题(20100478)

作者单位:075000 张家口,河北北方学院医学物理教研室(邵雪辉),电镜室(张晓丽),信息系(杨跃平);首都医科大学病理系(戴洁);张家口教育学院(王建国)

通信作者:戴洁, Email: sydaijie@cpums.edu.cn

慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 是由多种因素导致的消化系统常见疾病, 其中胃窦萎缩性胃炎与胃癌关系密切^[1]。胃黏膜在恶变过程中, 除了细胞增殖失控外, 细胞凋亡机制异常也发挥重要作用。本实验通过制作 CAG 大鼠模型并给予氩氦激光照射, 观察大鼠胃黏膜萎缩过程中增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 及凋亡抑制基因 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 (B-cell lymphoma/leukemia-2, Bcl-2) 蛋白表达的动态变化过程, 以探讨氩氦激光治疗 CAG 的相关机制。

材料与方法

一、实验大鼠分组与制模

共选取成年雄性 Wistar 大鼠 43 只, 体重 180 ~ 230 g, 由河北省实验动物中心提供, 大鼠经常规标准颗粒饲料喂养 1 周后, 其中 11 只纳入正常组, 剩余大鼠则制成 CAG 模型。CAG 制模共需时 8 周, 前 4 周大鼠每天上午 10 时用 2% 水杨酸钠和 30% 乙醇混合液灌胃, 每次每只大鼠 2.5 ml, 灌胃前 1 h 及灌胃后 1 h 禁食、禁水; 后 4 周每天继续灌胃 (方法同前), 而且单日禁食、自由饮水, 双日足量喂食、自由饮水, 并让大鼠在转笼中跑动, 每天 1 次, 每次持续 10 min。待造模流程结束后, 随机取 5 只大鼠进行胃黏膜病理组织学检查, 待确认制模成功后, 采用随机数字表法将余下的 CAG 模型大鼠分成模型组 (16 只) 及激光组 (11 只)。

二、氩氦激光照射

激光组大鼠给予氩氦激光照射, 选用南京产 HJ-3DB 型氩氦激光器 (发射激光波长为 632.8 nm), 经扩束镜扩束后, 垂直照射大鼠胃部投影区, 控制光斑直径为 1 cm, 输出功率由 SOLO PE 功率计 (加拿大 Gentec 公司生产) 实时监测, 调整激光功率密度为 8 mW/cm², 连续输出, 照射剂量为 3.36 J/cm², 每次照射 7 min, 每天照射 1 次, 连续照射 20 d 为 1 个疗程。模型组及正常组大鼠未给予特殊处理, 期间自由摄食、饮水。

三、取材与处理

各实验组大鼠于激光照射 20 d 后取材。取材前大鼠禁食 24 h, 不限饮水, 经乙醚麻醉后立即剖腹、结扎贲门, 摘出全胃后清洗表面血污, 再用滤纸吸干, 沿胃大弯剪开胃腔, 然后平行于胃小弯取前后胃窦部及部分胃体、胃壁组织 (取材面积约为 3 mm × 10 mm)。全部标本采用 10% 多聚甲醛液固定, 经常规石蜡包埋后进行 4 μm 厚连续切片, 其中 1 片用于病理形态学观察 (HE 染色), 余下切片则用于免疫组化检测。

四、免疫组化检测

本研究免疫组化检测所用试剂主要包括 PCNA、

Bcl-2 试剂盒、即用型 SABC 试剂盒、DAB 显色试剂盒等, 均购于武汉博士德生物制品有限公司。具体免疫组化染色步骤如下: 切片脱蜡至水, 经 3% 过氧化氢-90% 甲醇封闭内源性过氧化物酶 10 min, 枸橼酸盐高温抗原修复, 正常山羊血清封闭, I 抗 4℃ 冰箱内过夜, 生物素标记的 II 抗、III 抗于 37℃ 环境下各反应 30 min, DAB 显色。将 PCNA、Bcl-2 阳性细胞按数量及显色程度分为 3 级, 具体分级标准如下: 取 10 个高倍镜视野, 每个视野计数 100 个细胞, 如阳性细胞数量与细胞总数比值 < 25% 为阴性 (-), 25% ~ 50% 为弱阳性 (+), 50% ~ 75% 为阳性 (++) , ≥ 75% 为强阳性 (+++)。

五、统计学分析

本研究选用 SPSS 16.0 版统计学软件包进行数据分析, 组间比较采用卡方检验, 多样本间比较采用非参数秩和检验, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

结 果

一、各组大鼠胃黏膜病理组织学观察

通过光镜观察发现, 正常组大鼠胃黏膜较厚, 上皮完整, 固有膜内有密集排列的腺体, 仅散在分布极少数炎性细胞, 无明显炎性细胞浸润 (图 1), 胃黏膜可见壁细胞体积较大, 呈锥体形, 细胞边缘圆滑、饱满、数量多、排列整齐 (图 2)。模型组胃黏膜较正常组明显变薄, 有大量炎性细胞浸润, 主要为淋巴细胞和浆细胞 (图 3), 壁细胞体积相对较小, 细胞边缘呈不规则多边形, 胞浆皱缩, 排列不整齐, 细胞间隙较大, 腺腔增宽, 并可见大量壁细胞呈空泡样变性 (图 4)。激光组胃黏膜较模型组变厚, 炎性细胞明显减少 (图 5), 其壁细胞形态、体积、结构等均接近正常组 (图 6)。

二、各组大鼠免疫组化检测结果比较

通过光镜观察发现, 各组大鼠 PCNA 阳性表达呈棕黄色颗粒, 主要位于细胞核内, 也可见于胞浆中, 呈棕黄色细颗粒状 (图 7~9); 各组大鼠胃黏膜 PCNA 表达强度结果详见表 1, 以模型组 PCNA 阳性率最高, 与正常组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 激光组大鼠经氩氦激光照射后, 其 PCNA 阳性率明显低于模型组 ($P < 0.05$), 与正常组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。各组大鼠 Bcl-2 阳性表达位于细胞膜、胞浆或核膜上, 呈棕黄色颗粒, 细胞核内未见表达 (图 11)。各组大鼠胃黏膜中 Bcl-2 表达情况详见表 2 及图 10~12, 可见 Bcl-2 在正常组胃黏膜中呈低水平表达, 模型组胃黏膜中 Bcl-2 阳性率明显增加, 与对照组间差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 激光组大鼠经氩氦激光照射后, 其胃黏膜中 Bcl-2 阳性率较模型组明显降低 ($P < 0.05$), 与正常组间差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

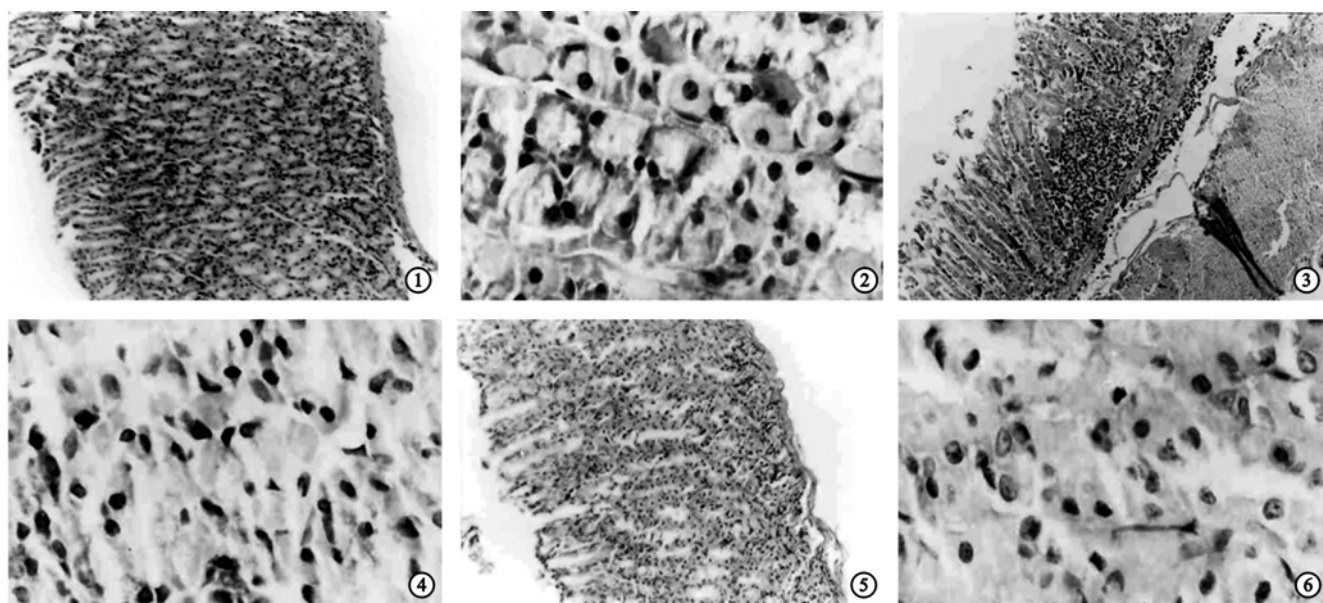


图1 正常组胃黏膜组织学观察(HE 染色, $\times 100$) 图2 正常组胃黏膜壁细胞组织学观察(HE 染色, $\times 400$) 图3 模型组胃黏膜组织学观察(HE 染色, $\times 100$) 图4 模型组胃黏膜壁细胞组织学观察(HE 染色, $\times 400$) 图5 激光组胃黏膜组织学观察(HE 染色, $\times 100$) 图6 激光组胃黏膜壁细胞组织学观察(HE 染色, $\times 400$)

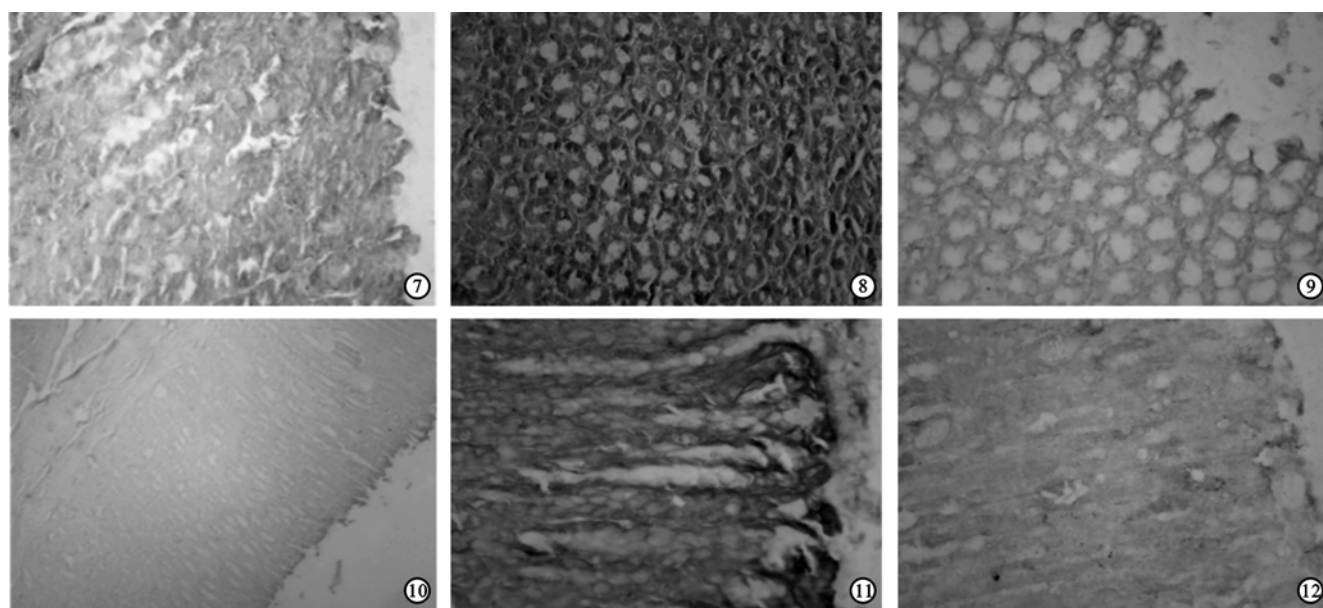


图7 正常组 PCNA 阳性细胞表达(免疫组化染色, $\times 400$) 图8 模型组 PCNA 阳性细胞表达(免疫组化染色, $\times 400$) 图9 激光组 PCNA 阳性细胞表达(免疫组化染色, $\times 400$) 图10 正常组 Bcl-2 阳性细胞表达(免疫组化染色, $\times 100$) 图11 模型组 Bcl-2 阳性细胞表达(免疫组化染色, $\times 400$) 图12 激光组 Bcl-2 阳性细胞表达(免疫组化染色, $\times 400$)

表1 各组大鼠胃黏膜 PCNA 阳性表达情况比较

组别	只数	PCNA 表达强度(只)				阳性率(%)
		-	+	++	+++	
正常组	9	7	1	1	0	22.2 ^a
模型组	16	6	5	3	2	62.5
激光组	11	8	2	1	0	27.3 ^a

注:与模型组比较, ^a $P < 0.05$

表2 各组大鼠胃黏膜 Bcl-2 阳性表达情况比较

组别	只数	Bcl-2 表达强度(只)				阳性率(%)
		-	+	++	+++	
正常组	11	7	3	1	0	28.6 ^a
模型组	14	4	3	4	3	71.4
激光组	8	6	1	1	0	25.0 ^a

注:与模型组比较, ^a $P < 0.05$

讨 论

目前临床对于 CAG 的病因及发病机制尚未完全明了,一般认为该症是多因素综合作用的结果,主要与免疫、胆汁返流、幽门螺旋杆菌感染及饮食、烟酒、药物等因素有关。本实验采用水杨酸钠和酒精对大鼠进行持续灌胃,并加予劳累、饥饱失常等刺激,促使大鼠胃黏膜出现 CAG 病变^[2],光镜下可见大鼠胃黏膜壁细胞数量减少及变性,腺体变小、萎缩,使胃黏膜分泌酸液及消化酶功能出现障碍,从而诱发机体一系列消化、吸收功能减弱等症状。

氦氖激光是波长为 632.8 nm 的低强度红色激光,利用低强度激光的光化学作用治疗疾病是目前常用方法之一。近年来国内、外已开展了大量关于弱激光在创伤愈合、镇痛等方面的研究^[3-4],其生物学效应已越来越受到科研及临床医生重视^[5-6]。大量文献报道,氦氖激光照射具有改善局部微循环、增强机体免疫力、促进组织生长、消炎等生物学效应^[3,6-7]。本研究也有类似结果发现,如 CAG 模型大鼠经氦氖激光照射后,在光镜下可见大鼠胃黏膜变厚,炎症减轻,壁细胞增生,其细胞数量、形态结构等均有不同程度恢复^[8]。

CAG 一直被认为在胃黏膜癌前病变中占有重要地位,其经过多阶段、多基因变异累积过程可发展成胃癌^[1,9]。大量研究表明,肿瘤的发生、发展与细胞凋亡及增殖失衡密切相关^[10-11],PCNA 是反映细胞增殖水平的重要参考因素^[11],同时也是评价肿瘤恶性潜能的敏感指标,对胃癌前病变的诊断、分级、治疗、预后判断等均具有临床意义。正常大鼠胃黏膜及胃黏膜非典型增生处均有 PCNA 阳性细胞出现,提示 PCNA 阳性表达与否并不反映细胞本质上的差异;但当细胞正常增殖与分化被扰乱时,PCNA 在胃黏膜中表达出现异常,并随胃黏膜病变加重,其表达水平逐渐增强^[12-13]。本研究也得到类似结果,如模型组 PCNA 阳性率显著高于正常组($P < 0.05$),提示随着胃黏膜病变加重,细胞增殖调节逐渐失去控制。CAG 大鼠经氦氖激光照射后,发现其 PCNA 阳性率较模型组显著降低($P < 0.05$),提示氦氖激光照射对 CAG 大鼠胃黏膜细胞过度增殖具有抑制作用,可阻止其向癌变方向发展。

凋亡是细胞受到某种信号刺激后而进行的一种程序化死亡,对于多细胞生物的个体发育及细胞平衡具有重要作用^[12-14]。bcl-2 是 Tsujimoro 等学者于 1984 年最先从滤泡性 B 细胞淋巴瘤中分离出来的凋亡抑制基因,可延长细胞存活期,抑制物理、化学、生物等因素诱导的细胞凋亡^[13-14]。Bcl-2 虽然不影响细胞的增殖速率及分裂率,但可使细胞存活时间延长,增加肿瘤发生机会。据报道,随着胃黏膜病变加重,Bcl-2 表达也会

逐渐增强^[14-15]。本实验也发现 Bcl-2 在正常组大鼠胃黏膜中呈低水平表达,模型组胃黏膜中 Bcl-2 阳性率则明显提高($P < 0.05$),与相关报道基本一致^[14-15]。CAG 大鼠经氦氖激光照射后,其 Bcl-2 阳性率较模型组明显降低($P < 0.05$),提示氦氖激光照射能降低 CAG 大鼠胃黏膜中 Bcl-2 含量,减轻细胞凋亡受抑程度,从而在一定程度上抑制胃黏膜组织向异型增生、甚至癌变发展。

综上所述,本研究结果表明,CAG 模型大鼠胃黏膜中 PCNA 及 Bcl-2 蛋白均呈现高水平表达,提示细胞处于高增殖状态;氦氖激光照射可促进 CAG 大鼠胃黏膜修复,降低胃黏膜中 PCNA 及 Bcl-2 表达,有助于调控细胞增殖、诱导细胞凋亡,阻止其向癌变方向发展。

参 考 文 献

- [1] 赵林胜,张维铭. 胃癌前病变研究进展. 国外医学肿瘤学分册, 2005,32:775-778.
- [2] 邵雪辉,王建国,戴洁,等. 大鼠实验性慢性萎缩性胃炎的建立. 张家口医学院学报,2002,19:11-13.
- [3] 李成,李迎新. 弱激光生物刺激效应在创伤治疗中的作用. 医疗卫生装备,2007,27:26-28.
- [4] Posten W, Wrona DA, Dover JS, et al. Low-level laser therapy for wound healing: mechanism and efficacy. Dermatol Surg, 2005,31:334-340.
- [5] Yasukawa A, Hrui H, Koyama Y, et al. The effect of low reactive-level laser therapy (LLLT) with helium-neon laser on operative wound healing in a rat model. J Vet Med Sci, 2007,69:799-806.
- [6] 杨在富,杨景庚,高光煌. 低能量激光免疫调节作用研究进展. 中华理疗杂志,2001,23:244-247.
- [7] 李海涛,肖丹,屈学民,等. 低强度 532 nm 绿激光照射对小鼠腹腔巨噬细胞功能的影响. 激光杂志,2008,29:78-79.
- [8] 邵雪辉,杨跃平,王建国,等. 氦氖激光治疗大鼠慢性萎缩性胃炎的病理学研究. 中华物理医学与康复杂志,2004,26:499-501.
- [9] 王健,杨忠亮,朱耀环. 慢胃灵合剂对大鼠慢性萎缩性胃炎治疗的实验研究. 大连医科大学学报,2009,31:274-277.
- [10] 宋福林,林一帆,李昊燃,等. 加味四君子汤三联疗法对萎缩性胃炎及癌前病变 PCNA 表达的影响. 中华中医药杂志,2009,24:367-369.
- [11] 卢书明,张竹青,刘丽娜,等. 胃癌及癌前病变中 P57KIP2 和 PCNA 的表达. 胃肠病学和肝病杂志,2010,19:969-971.
- [12] 陈海金,王惠吉. 大鼠胃黏膜萎缩过程中的组织学变化和 p16、Bcl-2、增殖细胞核抗原表达. 胃肠病学,2008,13:22-26.
- [13] 季万胜,冯腾,孙良华,等. PCNA 和 Bcl-2 在慢性胃炎中的表达. 潍坊医学院学报,2008,30:169-170.
- [14] Maor-Kendler Y, Gabay G, Bernheim J, et al. Expression of bcl-2 in autoimmune and helicobacter pylori-associated atrophic gastritis. Dig Dis Sci, 1999,44:680-685.
- [15] 王建敏,莫耘松,张桂珍,等. 胃黏膜病变组织 PCNA、Bcl-2 和 BAX 的表达及意义. 实用中西医结合临床,2006,5:4-6.

(修回日期:2012-01-16)

(本文编辑:易 浩)