

- 3 Solomon D, Davey D, Kaman R, *et al.* The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology[J]. JAMA, 2002, 287(16): 2114 - 2119
- 4 余巧梅. 阴道镜在宫颈上皮内瘤变中的诊断作用[J]. 医学研究杂志, 2006, 35(11): 100 - 101
- 5 谢红, 杨菊芳, 谢懿, 等. 宫颈细胞学涂片为 ASCUS 的处理方法探讨[J]. 实用医学杂志, 2006, 22(8): 699 - 700
- 6 古扎丽努尔, 阿不力孜, 地力努尔, 等. 未明确诊断意义的不典型鳞状上皮细胞患者 86 例病理分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2005, 21(11): 677 - 678
- 7 Song SH, Lee JK, Seok OS, Saw HS. The relationship between cytokines and HPV - 16, HPV - 16 E6, E7 and high - risk HPV viral load in the uterine cervix [J]. Gynecol Oncol, 2007, 104 (3): 732 - 738
- 8 Garcia Mediero JM, Ferruelo Alonso A, Paez Borda A, *et al.* Effect of polyphenols from the Mediterranean diet on proliferation and mediators of in vitro invasiveness of the MB - 49 murine bladder cancer cell line [J]. Actas Urol Esp, 2005, 29(8): 743 - 749
- 9 Chen D, Daniel KG, Chen MS, *et al.* Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells[J]. Biochem Pharmacol, 2005, 69(10): 1421 - 1432
- 10 Nifli AP, Kampa M, Alexaki VI. Polyphenol interaction with the T47D human breast cancer cell line[J]. J Dairy Res, 2005, 72: 44 - 50
- 11 Dechsupa S, Kothan S, Vergote J, *et al.* Quercetin, Siamois 1 and Siamois 2 induce apoptosis in human breast cancer MDA - Mb - 435 cells xenograft in vivo[J]. Cancer Biol Ther, 2007, 6: 56 - 61
- 12 Granado - Serrano AB, Martin MA, Bravo L, *et al.* Quercetin induce apoptosis via caspase activation, regulation of Bcl - 2, and inhibition of PI - 3 - kinase/Akt and ERK pathways in a human hepatoma cell line (HepG2) [J]. J Nutr, 2006, 136: 2715 - 2721
- (收稿: 2010 - 03 - 15)

大鼠乙酸胃溃疡愈合过程中 EGF 和 VEGF 对胃黏膜组织形态的影响

李成军 王丽萍 夏立丁 姜鑫 孙卉 刘晓维 李小伟 周丽 王国忠

摘要 目的 探讨表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)和血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)对再生胃黏膜形态的影响。**方法** 采用大鼠乙酸溃疡模型,用免疫组化方法观察了 EGF 和 VEGF 在溃疡 3 天、8 天、25 天时的表达,同时测定了再生黏膜厚度、腺体扩张数、胃黏液量,并分析了 EGF 和 VEGF 对再生黏膜厚度、腺体扩张数、胃黏液量的影响。**结果** 25 天组的 EGF 积分光密度高于 8 天组($P < 0.01$),8 天组的积分光密度高于 3 天组($P < 0.05$);25 天组的 VEGF 积分光密度高于 8 天组($P < 0.01$),8 天组的积分光密度高于 3 天组($P < 0.01$);25 天组的再生黏膜厚度高于 8 天组($P < 0.01$),8 天组的再生黏膜厚度高于 3 天组($P < 0.01$);25 天组的腺体扩张数低于 8 天组($P < 0.01$),8 天组的腺体扩张数低于 3 天组($P < 0.01$);25 天组的胃黏液含量高于 8 天组($P < 0.01$),8 天组的胃黏液含量高于 3 天组($P < 0.01$)。**结论** 随着溃疡的愈合,EGF 和 VEGF 促进了再生的异常胃黏膜向正常胃黏膜转化,并促进了再生胃黏膜功能的恢复。

关键词 溃疡 愈合 表皮生长因子 血管内皮生长因子

The Effect of EGF and VEGF on Morphology of Gastric Mucosal Tissue in Healing Process of Acetic - acid - induced Gastric Ulcer in Rats.

Li Chengjun, Wang Liping, Xia Liding, Jiang Xin, Sun Hui, Liu Xiaowei, Li Xiaowei, Zhou Li, Wang Guozhong. Department of Function laboratory, Qiqihar Medical College, Heilongjiang 161006, China

Abstract Objective To explore the effect of EGF and VEGF on morphology of regenerative gastric mucosa. **Methods** Gastric ulcers were induced with acetic acid in rats, and the expression of EGF and VEGF was observed with immunohistochemistry method on day 3, 8 and 25 following ulcer induction. The regenerative mucosal thickness, the number of dilated gland and the volume of gastric mucus were also measured on day 3, 8 and 25 following ulcer induction. And the effects of EGF and VEGF on the regenerative mucosal thickness, the number of dilated gland and the volume of gastric mucus were analyzed. **Results** The integral light density of EGF on day 25 was more than that of EGF on day 8 ($P < 0.01$). The integral light density of EGF on 8 day was more than that of EGF on day 3 ($P < 0.05$).

基金项目:黑龙江省自然科学基金项目(D - 2007 - 111);齐齐哈尔医学院科研项目

作者单位:161006 齐齐哈尔医学院机能实验室(李成军、王丽萍、夏立丁、周丽、王国忠);齐齐哈尔医学院 2006 级学生(姜鑫、孙卉、刘晓维、李小伟)

通讯作者:王国忠,电子信箱:wgzbs@163.com

The integral light density of VEGF on day 25 was more than that of VEGF on day 8 ($P < 0.01$). The integral light density of VEGF on 8 day was more than that of VEGF on day 3 ($P < 0.01$). The regenerative mucosal thickness on day 25 was more than that on day 8 ($P < 0.01$). The regenerative mucosal thickness on day 8 was more than that on day 3 ($P < 0.01$). The number of dilated gland on day 25 was less than that on day 8. The number of dilated gland on day 8 was less than that on day 3 ($P < 0.01$). The volume of gastric mucus on day 25 was more than that on day 8 ($P < 0.01$). The volume of gastric mucus on day 8 was more than that on day 3 ($P < 0.01$). **Conclusion** With the ulcer healing, EGF and VEGF make regenerative deformans gastric mucosa convert to normal gastric mucosa, and make regenerative gastric mucosa restore its functions.

Key words Ulcer; Healing; EGF; VEGF

消化性胃溃疡是临床常见病、多发病,该病具有自限性,在没有攻击因子存在时,经过一段时间机会动员自身的功能自然愈合。在溃疡愈合过程中,再生的胃黏膜组织形态与正常胃黏膜有很大差异,如再生黏膜的厚度的改变、腺体扩张等,这种差异影响了胃黏膜的防御功能,差异越大越容易引起溃疡复发^[1]。随着溃疡逐渐愈合,这种差异也逐渐缩小,其发生的机制目前还不十分清楚。为了阐明这种差异的机制,本研究采用经典的大鼠乙酸溃疡模型,探讨了溃疡愈合过程中不同时间 EGF、VEGF 的表达对再生黏膜组织形态及其功能的影响,并对其机制进行了分析,这为临床上治疗溃疡病,防止溃疡复发具有重要意义。

材料与方法

1. 材料:(1)动物:实验用雄性清洁级 Wistar 大鼠(哈尔滨医科大学第二附属医院动物实验中心,生产许可证号:SCXK2006-010),体重 180 ~ 210g。(2)试剂:EGF 一抗、VEGF 一抗为 peprotech 公司产品。山羊抗兔酶标二抗、DAB 显色试剂盒为康为世纪公司产品。(3)仪器:日本产 Olympus 光学显微镜、Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统。

2. 方法:(1)动物模型的复制与分组:按文献[2]报道的方法并略加修改复制乙酸溃疡模型模型,即开腹后将胃拉出,用内径 6mm 的圆塑料管,紧贴于胃体与幽门交界处,向塑料管内注入 100% (V/V) 的乙酸 75 μ l,25s 后立即用棉签拭去塑料管内的乙酸,然后用生理盐水冲洗乙酸接触处,依次缝合腹壁各层,既复制出大鼠乙酸溃疡模型。然后随机分为 3 天组、8 天组、25 天组。手术的当天只给大鼠水,不给食物。(2)溃疡面积的测量:按照文献报道的方法测量溃疡面积,结果表示为 mm²^[3]。(3)胃黏液含量的检测:按文献报道的方法并略加修改检测胃黏液含量^[4]。简述如下:用过量的乙醚麻醉处死动物后,剖腹取出胃,沿胃小弯剪开并外翻,浸入 20ml 阿利斯蓝染液中(阿利斯蓝染液浓度:8mg/100ml,缓冲液:0.2mol/L Na₂HPO₄,0.1mol/L 柠檬酸,pH = 5.8),孵育 2h 后将胃取出,取 6ml 孵育液放入离心管中 3000r/min 离心 10min,取上清液,用 722 型分光光度计于 615nm 波长处进行比色,并计算出胃黏液含量。结果表示为:结合染料量/20ml 阿利斯蓝染液 (mg/20ml)。(4)溃疡边缘胃黏膜 EGF 和 VEGF 表达的检测:采用免疫组化 Elivison 二步法检测,简述

如下:切片脱蜡至水,高压修复抗原,加 1 滴 3% H₂O₂,室温下孵育 10min,以阻断内源性过氧化物酶的活性。加 1 滴第一抗体(EGF 一抗 1:50 稀释,VEGF 一抗 1:200),室温下孵育 2h,然后再加 1 滴酶标二抗(山羊抗兔酶标二抗,1:50 稀释),37℃ 温箱孵育 1h,PBS 冲洗,然后再加 1 滴 DAB 液(二氨基联苯胺),苏木素复染,0.1% HCl 分化,蓝化,切片经梯度乙醇脱水,干燥,二甲苯透明,中性树胶封固。每组随机抽取 8 只大鼠的切片各 1 张,每张随机选取 2 个视野做图像分析,用 Motic Med 6.0 数码医学图像分析系统测量阳性目标积分光密度。(5)再生黏膜厚度的测定:在光学显微镜下放大 100 倍,测量 H-E 染色切片中再生黏膜上皮细胞表面到黏膜肌层之间的距离,结果表示为 μ m。(6)再生黏膜扩张腺体数量的测定:将腺腔内径大于 8 μ m 作为判断腺体囊状扩张的标准。在光学显微镜下放大 400 倍,测量 H-E 染色切片中再生黏膜内扩张的腺体数,结果表示个/高倍视野。(7)统计学分析:所得数据为计量数据,用均数 $\pm$ 标准差表示,用 SPSS16.0 统计分析软件进行统计学分析,组间差异比较采用单因素方差分析中的 LSD 方法。

结 果

1. 溃疡愈合过程中溃疡大体形态变化:剖腹取出正常大鼠和溃疡愈合不同时间大鼠的胃,观察其大体形态,见第 140 页彩图 10。

2. 溃疡愈合过程中溃疡组织形态的变化:剖腹取出正常大鼠和溃疡愈合不同时间的溃疡部位的胃黏膜,做组织切片,显微镜下观察,见封三彩图 11。

3. 溃疡愈合过程中胃黏膜 EGF 表达:结果见封三彩图 12、图 1。

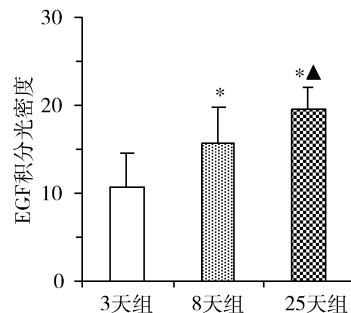


图 1 溃疡愈合过程中胃黏膜 EGF 积分光密度的变化

* 表示与 3 天组相比较, $P < 0.01$;▲ 表示与 8 天组相比较, $P < 0.05$

4. 溃疡愈合过程中胃黏膜 VEGF 表达的变化, 见封三彩图 13、图 2。

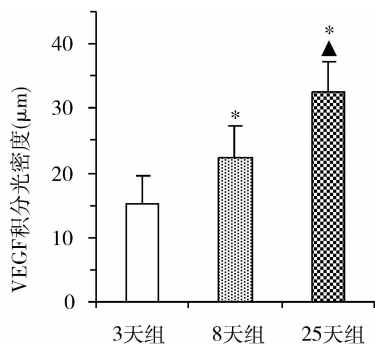


图 2 溃疡愈合过程中胃黏膜 VEGF 积分光密度的变化

* 表示与 3 天组相比较, $P < 0.01$; ▲ 表示与 8 天组相比较, $P < 0.01$

5. 溃疡愈合过程中再生黏膜厚度的变化, 结果见图 3。

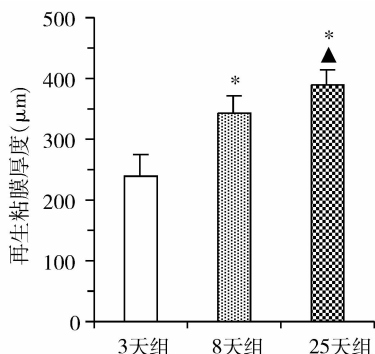


图 3 溃疡愈合过程中再生黏膜厚度的变化

* 表示与 3 天组相比较, $P < 0.01$; ▲ 表示与 8 天组相比较, $P < 0.01$

6. 溃疡愈合过程中扩张腺体数量变化: 结果见图 4。

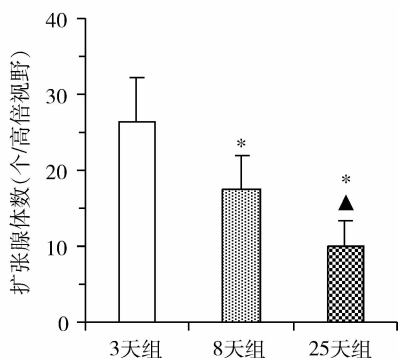


图 4 溃疡愈合过程中扩张腺体数量变化

* 表示与 3 天组相比较, $P < 0.01$; ▲ 表示与 8 天组相比较, $P < 0.01$

7. 溃疡愈合过程中胃黏液含量变化: 结果见图 5。

讨 论

消化性胃溃疡是一种胃黏膜及黏膜肌层坏死性

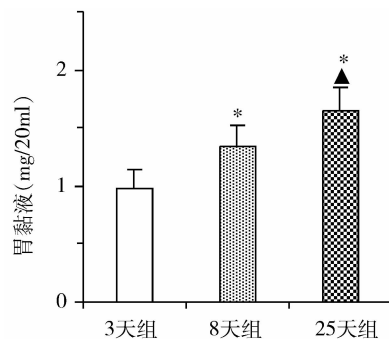


图 5 溃疡愈合过程中胃黏液含量的变化

* 表示与 3 天组相比较, $P < 0.01$; ▲ 表示与 8 天组相比较, $P < 0.01$

病理损伤, 大约 10% 的人在其一生中患此病。溃疡愈合机制十分复杂, 涉及坏死组织的清除、黏膜的再生、血管的再生以及组织的重构等。大鼠乙酸溃疡模型是经典的溃疡模型, 溃疡复制方法简单可靠, 且溃疡的形态与人的消化性溃疡十分相似^[2]。本实验在模型复制的第 3 天出现典型的溃疡, 面积约 27mm^2 (第 140 页彩图 10B), 镜下溃疡边缘黏膜扩张, 溃疡呈火山口状 (封三彩图 11B); 而后溃疡逐渐缩小, 至第 8 天溃疡面积为约 8mm^2 (第 140 页彩图 10C), 镜下溃疡边缘再生黏膜腺体扩张, 并向新生的肉芽组织移行 (封三彩图 11C); 至第 25 天溃疡完全愈合, 但黏膜苍白 (第 140 页彩图 10D), 镜下可见原溃疡部位再生黏膜腺体扩张, 结构紊乱 (封三彩图 11D), 而正常胃黏膜表面光滑红润、组织结构清晰, 黏膜皱襞规则 (第 140 页彩图 10A), 镜下黏膜结构规则 (封三彩图 11A)。这与我们先前报道的相似^[5]。

胃黏膜表面有“黏液屏障”和“黏膜屏障”, 覆盖在黏膜表面的“黏液屏障”是防御有害因子损伤胃黏膜的第一道屏障, 胃黏膜表面的黏膜上皮细胞和细胞间的紧密连接是防御有害因子损伤胃黏膜的第 2 道屏障。这两道屏障能有效地保护胃黏膜。溃疡发生后, 机体会动员各种防卫力量进行胃黏膜的修复, 进而再形成这两道防御屏障。影响胃溃疡修复的因素有多种, 其中胃黏膜血流和生长因子是主要的影响因素。EGF 有促进细胞生长、分化、迁移、更新的作用^[6]。本实验从溃疡愈合过程中胃黏膜内 EGF 表达的变化来看, 25 天组 EGF 表达高于 8 天组, 8 天组又高于 3 天组 (封三彩图 12、图 1), 此结果表明 EGF 促进了溃疡的修复。VEGF 有促进毛细血管生成、增加胃黏膜血流的作用^[7]。本实验从溃疡愈合过程中胃黏膜内 VEGF 表达的变化来看, 25 天组 VEGF 表达高于 8 天组, 8 天组又高于 3 天组 (封三彩图 13、图

2),此结果表明 VEGF 促进了溃疡的修复。溃疡愈合过程不同时期胃黏膜组织形态与正常胃黏膜有很大差异,随着溃疡的愈合,再生黏膜厚度逐渐增加(封三彩图 11);25 天组的再生黏膜厚度高于 8 天组的,8 天组又高于 3 天组的(图 3);而再生黏膜扩张腺体数 25 天组的少于 8 天组,8 天组的又少于 3 天组(封三彩图 11、图 4),表明随着溃疡的愈合,再生胃黏膜的组织形态也逐渐趋于正常。胃黏膜上皮的黏液腺细胞具有分泌黏液的功能,在胃黏膜表面形成黏液层(黏液屏障),约相当于胃腺深度的 $1/4 \sim 1/2$,具有润滑作用,可防止食物等机械的损伤,此外能够有效地抵抗胃酸、胃蛋白酶的消化作用和其他有害因子的侵袭。本实验 25 天组的胃黏液高于 8 天组,8 天组又高于 3 天组(图 5),此结果表明随着溃疡的愈合,再生黏膜细胞分泌胃黏液逐渐增多,“黏液屏障”的功能也逐渐向正常恢复。

由此我们可以推断:溃疡发生后,通过机体的调节,EGF 和 VEGF 逐渐增多,促进了溃疡部位胃黏膜细胞的再生,血管生成增加,继而胃黏膜血流增加,为胃黏膜的再生提供氧和营养物质,溃疡逐渐愈合。同时 EGF 和 VEGF 也促进扩张的腺体逐渐减少,黏膜厚度逐渐增加,缩小了与正常胃黏膜的差异;胃黏

液生成逐渐生成增多,“黏液屏障”的功能也逐渐恢复。

参考文献

- Wallace JL. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the gastrointestinal tract. Mechanisms of protection and healing: current knowledge and future research. *Am J Med*,2001,110: 19S-23S
- Okabe S, Amagase K. An overview of acetic acid ulcer models - the history and state of the art of peptic ulcer research. *Biol Pharm Bull*, 2005,28(8): 1321-1341
- Ma L, Wang WP, Chow JY, *et al*. Reduction of EGF is associated with the delay of ulcer healing by cigarette smoking. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*,2000,278: G10-G17
- Piper DW, Whitecross D, Leonard P, *et al*. Alcian blue binding properties of gastric juice. *Gastroenterology*,1970,59: 534-538
- Wang GZ, Huang GP, Yin GL, *et al*. Aspirin can elicit the recurrence of gastric ulcer induced with acetic acid in rats. *Cell Physiol Biochem*, 2007,20(1-4):205-212
- Konturek PC, Konturek SJ, Brzozowski T, *et al*. Epidermal growth factor and transforming growth factor- α : role in protection and healing of gastric mucosal lesions. *Eur J Gastroenterol Hepatol*,1995,7: 933-937
- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*,1997,18: 4-25

(收稿:2010-03-25)

精子透明质酸酶活性与精液动态参数的相关性

杨建辉 高晓勤 陈利红

摘要 目的 探讨不育男性精子顶体内透明质酸酶活性与精液有关参数的关系,以期为临床男性不孕不育的病因分析、诊断、治疗及精子的功能检查提供理论及实验依据。**方法** 收集 81 例精液标本,其中正常生育对照组为 20 例,不育男性 61 例,以精子质量分析仪对每份标本进行计算机辅助精液分析(CASA)。并利用改良明胶底物膜法检测精子顶体内透明质酸酶活性。**结果** ①不育组与对照组相关动态参数的分析结果:VCL、VSL、VAP、LIN、WOB 的数据不育组与对照组具有统计学意义,表明不育组精子综合质量与对照组间存在差异;②精子运动活力的参数即精子的 VCL、VSL、VAP 以及 ALH 等精子参数与精子顶体内透明质酸酶活性有显著相关性,与 LIN、STR、WOB、BCF 及 STR 无统计学意义。**结论** ①不育组与对照组相关动态参数 VCL、VSL、VAP、LIN、WOB 数据具有统计学意义,精子综合质量与对照组间存在差异;②精子参数 VCL、VSL、VAP 及 ALH 与精子顶体内透明质酸酶活性有显著相关性。

关键词 精子 透明质酸酶 精液参数 关系

Relationship between Sperm Acrosin Hyaluronidase Activity and Conventional Semen Parameters. Yang Jianhui, Gao Xiaoqin, Chen Lihong. *Qiannan Medical College for Nationalities, Guizhou 558000, China*

基金项目:贵州省省长专项基金(黔省专合字 2007 46 号);贵州省科技厅攻关项目(黔科合 S 字 20071030);黔南州科技项目(黔南科合 2008 5)

作者单位:558000 都匀,黔南民族医学高等专科学校(杨建辉、陈利红);550003 贵阳医学院(高晓勤)

通讯作者:高晓勤,电子信箱:gyxkt@163.com