

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01081

## 大鼠舌下腺 TFF2、TFF3 在实验性胃溃疡愈合过程中表达的变化

顾彩霞, 吴靖芳\*, 张 静, 王浩宇, 张江兰, 任君旭

河北北方学院组织学与胚胎学教研室, 张家口 075029

**[摘要]** **目的** 探讨舌下腺三叶因子 2(TFF2)和三叶因子 3(TFF3)在大鼠实验性胃溃疡自愈期间表达的变化。**方法** 雄性 SD 大鼠分为溃疡组(42 只)和正常对照组(6 只)。溃疡组在胃前壁近胃窦处将 0.01 ml 冰醋酸注入黏膜下层制作实验性胃溃疡模型,对照组不作任何处理。分别以免疫组织化学 S-P 法和 RT-PCR 检测溃疡组和正常组舌下腺 TFF2 及 TFF3 基因和多肽表达情况。**结果** TFF2 及 TFF3 免疫反应阳性物质主要位于纹状管、闰管和肌上皮细胞,管腔内亦有阳性物质表达。TFF2 的积分光密度在溃疡第 1 天时与正常组相比明显增高,第 2 天最低,第 4、第 6 天逐渐升高( $P < 0.01$ ),第 10~23 天均维持在较高水平( $P < 0.05$ );而 TFF3 的积分光密度在溃疡第 1、第 2 天时接近正常组,第 4、第 6 天逐渐增强并高于正常组( $P < 0.05$ ),到第 10 天达高峰( $P < 0.01$ ),至第 23 天仍高于正常组( $P < 0.05$ )。RT-PCR 显示 TFF2 mRNA 和 TFF3 mRNA 的转录情况与相应多肽的表达趋势相似。**结论** 舌下腺 TFF2 和 TFF3 基因在大鼠实验性胃溃疡自愈期间表达增高,可能参与胃溃疡愈合过程的调节。

**[关键词]** 胃溃疡; 三叶因子 2; 三叶因子 3; 舌下腺

**[中图分类号]** R 573.11 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)10-1081-05

### Changes of TFF2 and TFF3 expression in sublingual gland during healing of experimental gastric ulcer in rats

GU Cai-xia, WU Jing-fang\*, ZHANG Jing, WANG Hao-yu, ZHANG Jiang-lan, REN Jun-xu

Department of Histology and Embryology, Hebei North University, Zhangjiakou 075029, Hebei, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the changes of TFF2 and TFF3 expression in sublingual gland during spontaneous healing of experimental gastric ulcer in rats. **Methods** A total of 48 male SD rats were divided into gastric ulcer group ( $n=42$ , ulcers were induced by injection of acetic acid to the submucosal of paries anterior gastricus) and normal group ( $n=6$ ). Immunohistochemical and RT-PCR methods were used to examine the expression of TFF2 and TFF3 in the sublingual gland in gastric ulcer group and normal group. **Results** Immunohistochemical staining showed that positive signals of TFF2 and TFF3 were mainly located in the striated duct, intercalated duct, myoepithelial cells, and some lumens. Compared with the control group, the integrated optical density (IOD) value of TFF2 was obviously increased on day 1 after gastric ulcer ( $P < 0.01$ ), and reached the bottom on day 2, then gradually increased again on day 4, 6 ( $P < 0.01$ ), and kept at a high level during day 10-23 ( $P < 0.05$ ). The IOD value of TFF3 was similar to that of the normal group on day 1, 2 after gastric ulcer, then gradually increased on day 4, 6 ( $P < 0.05$ ), reached the peak on day 10 after gastric ulcer ( $P < 0.01$ ), and kept at a high level till day 23 after gastric ulcer ( $P < 0.05$ ). The results of RT-PCR showed that the changes of TFF2 mRNA and TFF3 mRNA were basically consistent with the change of their corresponding peptides. **Conclusion** TFF2 and TFF3 expression is increased in the sublingual gland during the spontaneous healing of experimental gastric ulcer in rats, and they may participate in the healing process.

**[Key words]** stomach ulcer; trefoil factor 2; trefoil factor 3; sublingual gland

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(10):1081-1085]

舌下腺是以黏液性腺泡为主的混合性腺体,导管系统包括闰管、纹状管、小叶间导管和总导管。贾友苏等<sup>[1]</sup>报道舌下腺分泌管上皮细胞含 P 物质、血管活性肽、神经肽 Y。我们发现舌下腺导管上皮细胞还含有胃泌素与  $\beta$ -内啡肽<sup>[2]</sup>。舌下腺与下颌腺

在胚胎发生、形态结构和功能方面关系密切。舌下腺纹状管细胞与下颌腺纹状管细胞的生理特征大致相同,其纹状管细胞的神经肽均参与多种组织和细胞的生理活动调节<sup>[3]</sup>。三叶因子 2(trefoil factor 2, TFF2)和三叶因子 3(trefoil factor 3, TFF3)是三

**[收稿日期]** 2010-03-10 **[接受日期]** 2010-08-03

**[基金项目]** 河北省自然科学基金(C2007000906), Supported by Natural Science Foundation of Hebei Province, China (C2007000906).

**[作者简介]** 顾彩霞,河北北方学院 2006 级临床本科 2 班学生。E-mail: caixiafeiwu0303@126.com

\* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 0313-4029346, E-mail: wjfxg@163.com

叶因子家族的2个重要成员,集中分布在消化性溃疡好发的胃窦和十二指肠。三叶因子与消化性溃疡和炎症性肠病的关系密切,且对幽门螺杆菌感染所致胃损伤有保护作用<sup>[4]</sup>。研究发现,人颌下腺、舌下腺和腮腺三叶因子家族分泌入唾液,并与黏液结合,保护口腔黏膜,促进溃疡愈合<sup>[5-7]</sup>。我们发现下颌下腺 TFF2 及 TFF3 参与大鼠实验性胃溃疡的愈合过程<sup>[8]</sup>,本研究旨在探讨舌下腺 TFF2 及 TFF3 在大鼠实验性胃溃疡愈合过程中的作用。

## 1 材料和方法

1.1 主要试剂 TFF2、TFF3 多克隆抗体(武汉博士德生物技术有限公司),SP9001 试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)。TRIzol、dNTP Mix(赛百盛生物工程有限公司),AMV 反转录酶(M9004),RNAase 抑制剂(Promega 公司)、2×Taq PCR(北京盛旭百川生物工程公司),TFF2、TFF3 及内参照 GAPDH 引物由赛百盛生物工程技术有限公司合成。SIGMA3K30 型低温高速离心机、UV-2000 型紫外分光光度计(美国 Labtech 公司)、Mastercycler 5331 PCR 扩增仪(Eppendorf 公司)、DYC-31D 型水平凝胶电泳仪(北京六一仪器厂)、凝胶分析系统(UVP GELDOC-IT, 美国)。

1.2 大鼠实验性胃溃疡模型的制作和实验分组<sup>[8]</sup> 雄性8周龄SD大鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司)共48只,体质量180~230g。大鼠分为实验性胃溃疡组(简称溃疡组)42只,空白对照组(简称正常组)6只。两组动物饲养条件相同。溃疡组用3%戊巴比妥钠(40mg/kg)腹腔麻醉。腹部剃毛,消毒,在无菌条件下(手术切口长约2cm)暴露胃。在胃前壁近胃窦处将0.01ml冰醋酸注入黏膜下层。注射后,胃壁表面立即形成一个圆形或椭圆形的隆起,然后该处变为一乳白色不透明区,直径约5mm。将大网膜覆盖于注射区后,逐层缝合腹壁切口。对照组为正常大鼠,不作任何处理。

1.3 取材 取材前禁食12h,不限饮水。动物用3%戊巴比妥钠麻醉后,迅速开胸,主动脉插管,剪开右心耳,首先灌注生理盐水100ml,继之灌注4%多聚甲醛磷酸缓冲液250ml,维持20min。对照组与溃疡组在手术后第1天同时取材;溃疡组在手术后第1、2、4、6、10、14和23天分批取材(每个时间点6只)。先打开腹腔,将胃取出,测量溃疡体积;然后将大鼠头部伸展,沿颈部前正中线切开皮肤,手术分离浅筋膜。可见舌下腺位于两侧下颌下腺的头侧,灰白色,直径约0.15cm。选用右侧舌下腺作免疫组化,左侧舌下腺提取总RNA,做RT-PCR。

1.4 溃疡局部测量 沿胃大弯剪开胃壁,洗去内容物,将其摊平,可见溃疡一般为圆形,用吸水纸将溃疡处的水吸净。用注射器向溃疡内注入水,使水与溃疡周围黏膜面平。所用的水量就代表溃疡的体积。

1.5 RT-PCR 检测舌下腺 TFF2 mRNA 和 TFF3 mRNA 的表达 取左侧舌下腺组织,在液氮中研磨成粉末,按 TRIzol 试剂盒提取总 RNA。取 2 μg 总 RNA 为模板,用 Random Primer 反转录合成 cDNA,进行 PCR 扩增,引物序列见表 1。PCR 扩增:反应总体积 20 μl,含有 cDNA 4 μl,上游、下游引物(10 mmol/L)各 0.5 μl,2×Taq PCR(北京盛旭百川生物工程公司)10 μl。PCR 条件:94℃预变性 5 min;94℃变性 30 s、72℃延伸 60 s,循环 35 次;72℃总延伸 1 min。PCR 反应产物于 1.5% 琼脂糖中电泳,用 UVP GELDOC-IT 凝胶成像系统观察并成像。根据 TFF2、TFF3 与 GAPDH 基因条带的光密度比值对 TFF2 mRNA 和 TFF3 mRNA 表达水平进行半定量分析。

1.6 免疫组化染色检测舌下腺 TFF2 和 TFF3 的表达 将右侧舌下腺置于 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。步骤:石蜡切片常规脱蜡至水;用甲醇-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭 10 min,消除内源性过氧化物酶;5%~10%正常羊血清室温孵育 30 min,倾去多余的血清,分别滴加兔抗人 TFF2 及 TFF3 多克隆抗体(工作浓度为 1:100),4℃湿盒中过夜;PBS 洗 5 min×3 次,滴加生物素标记二抗 37℃孵育 30 min, PBS 洗 5 min×3 次,滴加辣根过氧化物酶标记的链酶卵白素(三抗),37℃孵育 30 min;PBS 洗 5 min×3 次;DAB 显色,苏木精复染细胞核。对照实验用 PBS 代替一抗,其余步骤相同。用 OLYMPUS BH-2 显微镜拍照, MotiC Med 6.0 软件进行图像分析,每张切片随机取 5 个视野,测定溃疡组与正常对照组大鼠舌下腺 TFF2 和 TFF3 的阳性目标的积分光密度。

1.7 统计学处理 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 11.0 统计软件对数据进行方差分析和  $q$  检验。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 胃溃疡愈合过程局部体积的变化 胃溃疡术后第1天,大鼠胃体前壁即可见一个直径约4mm的溃疡,边界清楚,周围黏膜充血水肿。至术后第4天溃疡最为明显,可见周围大网膜包裹及粘连肝脏,难以分离。术后第10天,溃疡组织变硬,形成瘢痕,溃疡面积变小,至第14天左右溃疡面积缩小,第23天已经接近完全愈合。溃疡体积变化趋势见图1。

表 1 舌下腺 TFF2 和 TFF3 基因检测的引物序列及片段长度

Tab 1 Primer sequences and fragment length for detection of TFF2, TFF3 gene expression in sublingual gland

Gene	Sense(5'-3')	Anti-sense(5'-3')	Annealing temperature $\theta/^\circ\text{C}$	PCR product (bp)
TFF2	TCT TGG TAG TGG TCC TTG TCT TG	GAA GAT CAG GTT GGA AAA GCA G	55	297
TFF3	ATG GAG ACC AGA GCC TTC T	GGA TGC TGG AGT CAA AAC AG	57	193
GAPDH	CAG TGC CAG CCT CGT CTC AT	AGG GGC CAT CCA CAG TCT TC	58	595

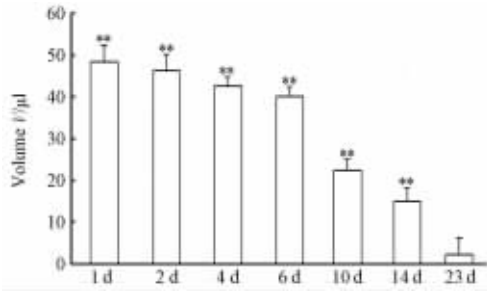


图 1 造模后胃溃疡体积的变化

Fig 1 Changes of gastric ulcer volume after establishment of gastric ulcer model

\*\*  $P < 0.01$  vs 23 d;  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ 

2.2 胃溃疡愈合过程中舌下腺 TFF2 及 TFF3 多肽的变化 免疫组化结果显示, 正常组 TFF2 及 TFF3 免疫反应阳性物质呈弱阳性, 主要位于舌下

腺的纹状管、少数闰管和肌上皮细胞, 管腔内亦有阳性信号分布, 且近腔面处尤多(图 2A、2E)。溃疡组和正常组大鼠的舌下腺 TFF2 及 TFF3 多肽阳性物质平均光密度有统计学差异 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。其中 TFF2 在制模后的第 1 天阳性信号表达增强, 平均光密度明显增高; 第 2 天最低, 接近正常组; 第 4、第 6 天逐渐升高, 第 6 天达高峰, 明显高于正常组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 第 10~23 天均维持在较高水平, 与正常组间存在差异 ( $P < 0.05$ , 图 2B、2C、2D, 图 3)。而舌下腺 TFF3 阳性表达在溃疡组术后第 1、第 2 天时接近正常组, 术后第 4、第 6 天平均光密度逐渐增强并高于正常组 ( $P < 0.05$ ), 到术后第 10 天达高峰 ( $P < 0.01$ ), 第 23 天平均光密度值仍高于正常组 ( $P < 0.05$ ), 见图 2F、2G、2H 及图 3。

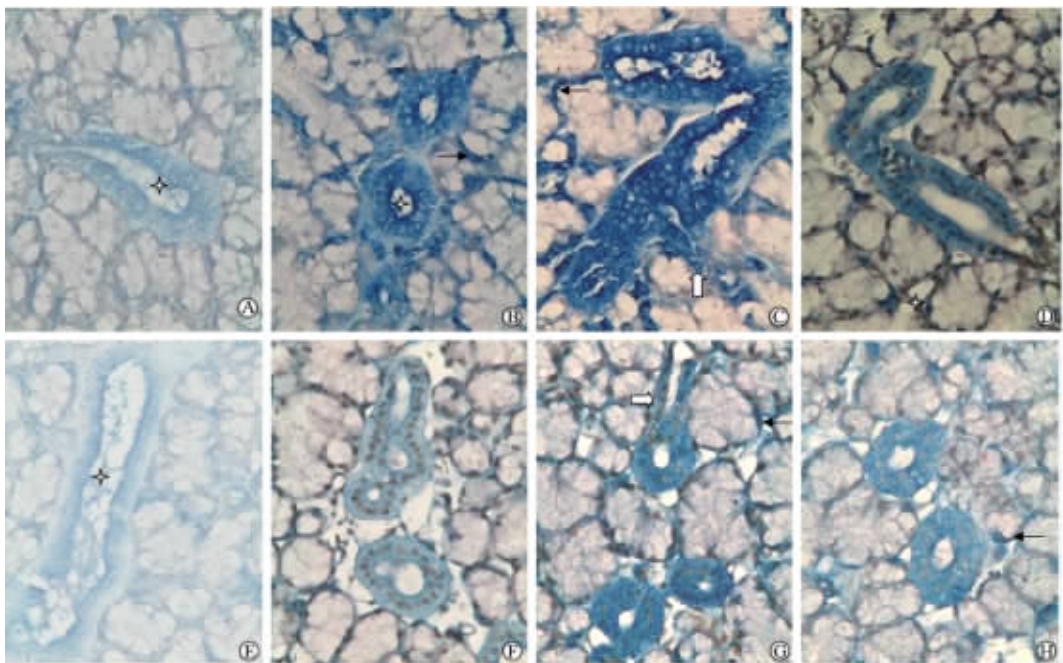


图 2 舌下腺 TFF2 和 TFF3 阳性物质在胃溃疡愈合过程中的变化

Fig 2 Expression of TFF2 and TFF3 peptides in sublingual gland during healing of gastric ulcer

☆: Lumen; ♯: Intercalated duct; ←, →: Myoepithelial cells. A, E: TFF2(A) and TFF3(E) peptides are mainly expressed in the cavosurface of the striated duct in normal group; B-D: Different expressions of TFF2 peptide on the 1<sup>st</sup>, 6<sup>th</sup>, and 23<sup>rd</sup> day after gastric ulcer; F-H: Different expressions of TFF3 peptide on the 1<sup>st</sup>, 10<sup>th</sup>, and 23<sup>rd</sup> after gastric ulcer. IHC, Original magnification:  $\times 200$

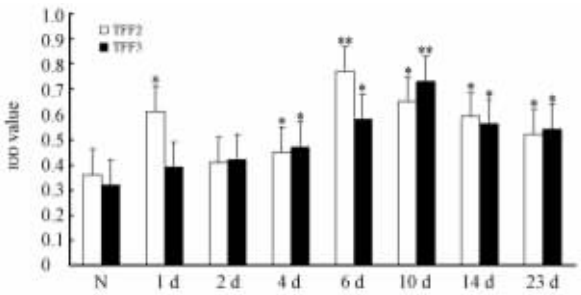


图3 溃疡愈合期间舌下腺 TFF2 和 TFF3 表达的半定量分析

Fig 3 Changes of TFF2 and TFF3 expression in sublingual gland during healing of gastric ulcer

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs normal group(N);  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

2.3 胃溃疡愈合过程中舌下腺 TFF2 及 TFF3 mRNA 表达 TFF2、TFF3 及 GAPDH 的 RT-PCR 产物分别为位于 250~500 bp、100~250 bp 和 500~750 bp 的清晰扩增带(图 4A、4B), 将所得条带进行光密度检测, TFF2/GAPDH 和 TFF3/GAPDH 比值结果见图 4C, 其变化趋势与 TFF2 及 TFF3 多肽的免疫组化结果类似。

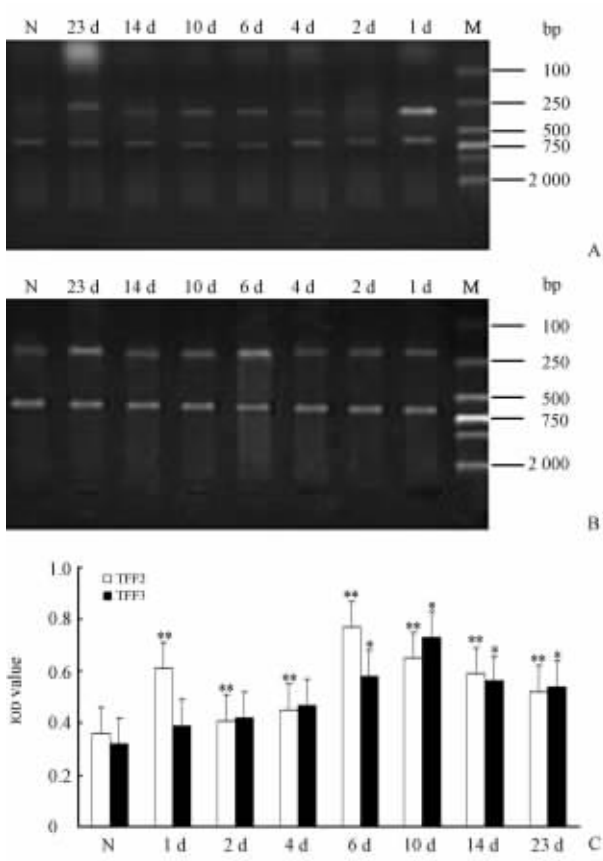


图4 舌下腺 TFF2、TFF3 mRNA 在溃疡愈合期间的变化

Fig 4 Changes of TFF2, TFF3 mRNA in sublingual gland during healing of gastric ulcer

A: TFF2 mRNA; B: TFF3 mRNA; C: Relative expression of TFF2 and TFF3 mRNA versus GAPDH. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs normal group(N);  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$

### 3 讨论

实验性胃溃疡虽是局部病变,但受全身神经内分泌免疫系统的调节。本实验应用敏感的免疫组织化学 S-P 法观察到:舌下腺 TFF2 肽在制模后的早期,除第 2 天时阳性信号较弱外,第 1、4、6 天溃疡组 TFF2 的表达均显著强于正常组,且第 6 天最高 ( $P < 0.01$ ),第 10~23 天其表达仍维持较高水平。TFF2 的 RT-PCR 结果显示 TFF2 mRNA 与免疫组化结果一致,也在第 1 天转录水平较高,说明 TFF2 在大鼠实验性胃溃疡修复早期表达增强。推测一方面由于应激性引起,另一方面 TFF2 和 c-fos、c-jun 一样属早期反应基因,有胃溃疡实验表明,损伤后 0.5~2 h,首先表达 TFF2,48 h 后再表达 TFF3,可能 TFF2 的高表达是对损伤的快速反应<sup>[9]</sup>。术后第 2 天可能由于分泌活动大量增加,分泌活动优于合成活动,导致溃疡组 TFF2 肽低表达;术后第 4~6 天溃疡开始愈合,细胞合成开始明显增强,第 10~23 天为溃疡愈合较平稳时期,合成和分泌都高于正常组。TFF2 在导管上皮细胞靠近腔面处阳性信号聚集及导管腔内有少量阳性信号表达。可推测,舌下腺内所含 TFF2 随唾液进入消化道,在胃肠道中发挥作用,参与胃黏膜损伤后的修复。张绍荣等<sup>[10]</sup>研究证实了 TFF2 基因治疗没有减少大鼠的胃酸分泌,而是通过增加胃壁黏液糖蛋白促进溃疡愈合。推测舌下腺 TFF2 可能主要通过唾液进入胃增加胃壁黏液层,保护胃黏膜。

本研究还发现,实验性溃疡期间舌下腺内的 TFF3 肽是在第 4~6 天开始增强,与正常组相比显著增加 ( $P < 0.05$ ),同时 TFF3 的 RT-PCR 结果显示 TFF3 mRNA 与其免疫组化结果一致。提示舌下腺导管细胞内合成功能达高峰;而分泌功能也较活跃,所以 TFF3 阳性信号并未达到顶峰。而第 10 天时,其阳性信号达高峰,提示舌下腺的合成活动优于分泌释放,此时胃溃疡处于平稳的愈合再生期,在大量 TFF3 作用下胃溃疡大部分修复;至第 23 天,舌下腺分泌活动仍高于正常组,提示肉眼看胃溃疡部位虽基本恢复正常,但组织结构仍在修复和愈合。近期有研究检测了水浸束缚大鼠胃黏膜,在早期和晚期均发现 TFF3 表达增强,故认为 TFF3 在早期细胞迁移和晚期细胞增殖中均起重要作用<sup>[5,11]</sup>。国外学者对 HT29/B6 研究发现: TFF3 是通过下调 E-钙黏蛋白、加强细胞间连接、促进细胞迁徙,上调上皮细胞中 tightening claudin-1 的含量、下调 tightening claudin-2 的含量,增强表层细胞的抵抗力、降低上皮的渗透性来达到黏膜修复的目的<sup>[12]</sup>。有实

验证明,非甾类抗炎药物、乙醇以及应激导致的胃黏膜损伤均能通过外源性 TFF3 的应用而减轻<sup>[13]</sup>。结合我们的结果,可以推论:TFF3 可能通过增加胃表面黏液层和通过循环转运两条途径对胃肠上皮起保护和修复作用。

综上所述,本研究发现在胃溃疡愈合过程中舌下腺 TFF2 和 TFF3 的表达增加,认为胃溃疡愈合过程中舌下腺可能通过 TFF2 及 TFF3 的合成和释放起到了保护胃黏膜,促进溃疡修复的作用,但其调节机制有待进一步深入研究。

## [参考文献]

- [1] 贾友苏,贾雪梅,王惠珠,齐威卿. P 物质、血管活性肠肽和神经肽 Y 在大鼠舌下腺的免疫组织化学定位[J]. 解剖学报,1998, 29:213-215.
- [2] 吴靖芳,薛刚,任君旭,周济远.  $\beta$ -EP 和胃泌素在大鼠舌下腺的免疫组织化学定位[J]. 动物学报,2003,49:534-536.
- [3] 成令忠. 现代组织学[M]. 3 版. 上海:上海科技文献出版社, 2003:755.
- [4] Fox J G, Rogers A B, Whary M T, Ge Z, Ohtani M, Jones E K, et al. Accelerated progression of gastritis to dysplasia in the pyloric antrum of TFF2<sup>-/-</sup> C57BL6<sub>x</sub> Sv129 Helicobacter pylori-Infected mice[J]. Am J Pathol,2007,171:1520-1528.
- [5] Storesund T, Schenck K, Osmundsen H, Røed A, Helgeland K, Kolltveit K M. Signal transduction and gene transcription induced by TFF3 in oral keratinocytes[J]. Eur J Oral Sci,2009, 117: 511-517.
- [6] Madsen J, Nielsen O, Tornøe I, Thim L, Holmskov U. Tissue localization of human trefoil factor 1, 2, and 3[J]. J Histochem Cytochem,2007,5: 505-513.
- [7] Kutta H, May J, Jaehne M, Münscher A, Paulsen F P. Antimicrobial defence mechanisms of the human parotid duct[J]. J Anat,2006,208: 609-619.
- [8] 吴靖芳,顾彩霞,张静,郑慧娥,王浩宇,张江兰. 大鼠实验性胃溃疡期间下颌腺 TFF3 基因的变化[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2010,19: 26-31.
- [9] Taupin D, Wu D C, Jeon W K, Devaney K, Wang T C, Podolsky D K. The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes; EGF receptor- and MAP kinase-dependent interregulation[J]. J Clin Invest,1999,103: R31-R38.
- [10] 张绍荣,宋于刚,陈学清,林英卓. 三叶因子 2 基因治疗对实验性大鼠胃溃疡愈合影响的研究[J]. 中国实用内科杂志,2006, 26: 1418-1420.
- [11] Nie S N, Qian X M, Wu X H, Yang S Y, Tang W J, Xu B H, et al. Role of TFF in healing of stress-induced gastric lesions[J]. World J Gastroenterol,2003,9: 1772-1776.
- [12] Meyer zum Büschenfelde D, Tauber R, Huber O. TFF3-peptide increases transepithelial resistance in epithelial cells by modulating claudin-1 and -2 expression[J]. Peptides,2006,27: 3383-3390.
- [13] Babyatsky M W, deBeaumont M, Thim L, Podolsky D K. Oral trefoil peptides protect against ethanol and indomethacin-induced gastric injury in rats[J]. Gastroenterology, 1996, 110: 489-497.

[本文编辑] 孙岩

## · 书 讯 ·

### 《医用化学·生物化学实验指导》已出版

该书由李凤丽、张玮玮主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-5481-0101-7,16 开,定价:14.00 元。

该书以人民卫生出版社新版大专教材为蓝本,根据教学大纲,结合实际情况,组织有丰富教学经验的教师编写。全书分两部分,共 19 个实验,介绍了医用化学和生物化学的典型实验,各实验均按实验目的、原理、器材与试剂、内容及方法、注意事项、思考题等进行介绍。旨在巩固学生的实验操作技能和验证课堂理论,从而使学生扎实地掌握基础知识和基本理论,掌握基本操作技术和测定方法,培养学生求真务实、独立思考及严谨的科学作风。该书适于医学院校学生及具有中等文化程度以上的化学爱好者阅读。

该书由第二军医大学出版社出版发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路 800 号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>