

· 论 著 ·

神经生长因子和表皮生长因子在衰老大鼠下颌下腺的表达*

李俊玫¹, 王振潮¹, 张茉莉¹, 郭 寅², 葛志华^{1△}

(1. 承德医学院附属医院, 河北承德 067002; 2. 河北省承德市口腔医院 067000)

摘要:目的 观察 D-半乳糖所致衰老大鼠下颌下腺神经生长因子(NGF)、表皮生长因子(EGF)表达的改变。方法 选取 18 只 SD 雌性大鼠, 随机分成正常组、模型组, 模型组大鼠每天腹腔注射 D-半乳糖, 连续 60 d, 制造亚急性衰老大鼠模型。用 SP 免疫组化法检测下颌下腺 NGF、EGF 的阳性表达。结果 NGF、EGF 阳性反应颗粒为浅棕色至深褐色, 主要分布于颗粒曲管细胞及纹状管细胞顶部胞质中, 腺泡细胞为阴性。正常组 NGF、EGF 表达明显高于模型组($P < 0.01$)。结论 D-半乳糖所致衰老大鼠下颌下腺 NGF、EGF 表达较正常大鼠明显减少, 说明 NGF、EGF 表达伴随衰老明显降低, 为延缓组织退行性改变、预防衰老性涎腺疾病研究提供了一定的实验资料。

关键词: 半乳糖; 大鼠, 裸; 神经生长因子; 表皮生长因子; 下颌下腺

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.22.005

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2011)22-2197-02

The expressions of NGF and EGF in submandibular glands of aging rats*

Li Junmei¹, Wang Zhenchao¹, Zhang Moli¹, Guo Yin², Ge Zhihua^{1△}

(1. Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, Hebei 067000, China;

2. Chengde Stomatological Hospital, Chengde, Hebei 067000, China)

Abstract: Objective To observe the expressions of NGF and EGF in submandibular glands of aging rats induced by D-galactose. Methods 18 female SD rats were randomly divided into normal and model groups. D-galactose senescence model was adopted in this research by continuous intraperitoneal injection of D-galactose for 60 days. SP immunohistochemistry technology was used to observe the expressions of NGF and EGF in submandibular glands. Results NGF and EGF immunopositive products were brown or dark brown granules and mainly appeared in the apical cytoplasm of GCT and secreting duct cells. NGF and EGF expressing in submandibular gland cells in the normal group were significantly higher than those of model group ($P < 0.01$). Conclusion The expressions of NGF and EGF in aging submandibular glands decrease obviously. It provides experimental data for the research on delaying tissue regression and prevention of aging submandibular gland disease.

Key words: galactose; rats, nude; nerve growth factor; epidermal growth factor; submandibular gland

本组先前研究已经发现伴随衰老, 大鼠下颌下腺实质成分逐渐减少而被脂肪和纤维间质所替代, 凋亡细胞明显增多, 超微结构也有明显衰老变化; 凋亡相关因子 Bcl-2 表达减少、Bax 表达增加^[1-3]。本研究继续观察 D-半乳糖所致衰老大鼠下颌下腺神经生长因子(nerve growth factor, NGF)、表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)表达改变, 探讨大鼠下颌下腺分泌功能与衰老的关系, 为下颌下腺衰老相关疾病的防治奠定理论基础和提供实验数据。

1 材料与方

1.1 材料 D-半乳糖由北京化学试剂公司生产, NGF、EGF、SP 试剂盒及 3,3'-二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色剂购于武汉博士德生物工程公司, 仪器 VT1000S 振荡切片机构于德国 LEICA 公司, OLYMPUS 显微镜购于日本奥林巴斯公司。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及模型制作 选用 8 周龄清洁级 SD 雌性大鼠 18 只, 体质量 180~220 g(由河北省实验动物中心提供, 合格证编号: 605106), 饲养室温度(22±2)℃, 相对湿度 50%~70%。将大鼠随机分为正常组、模型组, 每组 9 只。模型组大

鼠称重后按 300 mg/kg/d 腹腔注射 6% D-半乳糖, 每天 1 次, 连续 60 d。正常组大鼠正常喂养 60 d。各组动物均不限制饮食和饮水。

1.2.2 衰老模型的评价 造模期间每天用电子天平测体质量以确定用药剂量, 同时观察大鼠毛色、行为等外观特征的改变。实验前, 各组大鼠毛色白, 有光泽, 精神状态良好。随着实验的进展, 第 60 天时, 模型组大鼠出现毛色变黄、无光泽、脱毛严重、行为迟缓等衰老体征。

1.2.3 标本的取材和处理 大鼠经 10% 水合氯醛(0.3 mL/100 mg)腹腔注射麻醉后, 开胸, 经左心室插管入主动脉, 生理盐水冲净血液后 4% 多聚甲醛灌注、固定取双侧下颌下腺, 4% 多聚甲醛后固定过夜。

1.2.4 免疫组化切片的制备及染色 组织固定 1~2 d 后, 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液漂洗 2~3 次, 置 70% 乙醇中。将固定好的组织块经常规梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋。用 Leica Ao860 型切片机行厚度为 6 μm 连续切片, 每隔 30 张取相邻 5 张贴于涂有多聚赖氨酸的载玻片上。置于 37℃ 温箱干燥, 切片干燥 24 h 后, 二甲苯 I、II 各 20 min 脱蜡, 梯度酒精脱水, 各 5 min。按试剂说明书的操作步骤, 用 SP 法行常规

免疫组化染色、光镜下控制显色,脱水透明,封片。

1.2.5 细胞计数 在 400 倍显微镜下进行阳性细胞计数,每只动物取 3 张切片,每一切片随机检查 3 个视野,计算导管细胞中阳性细胞率。

1.3 统计学处理 资料分析采用 SPSS11.0 统计软件完成。计量资料描述采用 $\bar{x} \pm s$, 组间比较行两样本比较的 t 检验,检验水准取 0.05。

2 结果

NGF、EGF 阳性反应颗粒呈浅棕色至深褐色,主要分布于 GCT 细胞及纹状管细胞顶部胞质中,腺泡细胞为阴性,提示 NGF、EGF 可能定位于 GCT 细胞分泌颗粒中,且同一导管内不同细胞的反应程度不同,有的细胞内颗粒清晰,着色深,有的着色浅,还有的不着色(封 3 图 1~4)。方差分析结果显示,组间 NGF、EGF 表达比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。NGF、EGF 表达以正常组最高,模型组最低(表 1)。

表 1 两组大鼠下颌腺 NGF、EGF 表达的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	NGF	EGF
正常组	9	91.00 ± 4.03*	68.56 ± 2.46*
模型组	9	36.22 ± 3.90	14.89 ± 2.37

*: $P < 0.01$, 与模型组比较。

4 讨论

NGF 是调节神经系统最重要的生物活性物质之一,它能够有效促进外周及中枢神经元的分化、生长,刺激胞体和树突的发育,影响神经细胞纤维支靶区的突变,提高神经递质活性,促进多种合成代谢,调节神经元的代谢,维持其存活、生长、分化、再生和成熟,能够防止损伤的神经细胞死亡,促进神经元的修复^[4-7]。目前,对 NGF 的研究已经进入临床实验阶段,有研究表明,NGF 在治疗早老性痴呆方面可以保护中枢胆碱能神经元,防止其发生退行性病变^[8]。刘少平等^[9]用小鼠观察了 NGF 可显著促进神经节细胞的生长、发育。还有文献报道,调节 NGF 水平可以从基因水平影响 T 细胞激活状态,影响哮喘的气道炎症^[10]。NGF 治疗新生儿缺氧缺血性脑病有明显疗效^[11]。

EGF 是 Cohen 等在纯化神经生长因子的过程中从小鼠颌下腺中提取出来的,EGF 主要合成部位在下颌下腺,是由颗粒曲管上皮细胞自身合成的。EGF 合成后,释放到唾液、十二指肠液、尿液、乳汁以及血液等体液中^[12],它是一种强有力的细胞分裂因子,对细胞的生长和增殖有明显的调节作用。其最显著的生物学效应是促进上皮细胞增殖和分化,尤其对胃肠细胞具有明显的细胞保护作用。有文献报道,随胃黏膜病变的加重 EGF 表达增加,EGF 能保护黏膜微血管,改善微循环,增加胃黏膜黏液糖蛋白的合成和分泌,从而促进上皮组织的修复^[13-14]。EGF 可抑制某些表皮生长因子受体过度表达的人乳腺癌细胞的增殖,诱导其凋亡^[8]。由此可见,在机体生理及病理发生、发展过程中,下颌下腺所分泌的 NGF、EGF 具有很重要的作用。本实验结果显示 D-半乳糖所致衰老大鼠下颌下腺 NGF、EGF 表达伴随衰老明显降低,与正常组比较差异有统计学意义。

下颌下腺是具有外分泌和内分泌双重功能的腺体,能够分泌多种生物活性物质,对机体器官、系统有重要的支持、营养及调节作用^[15]。NGF、EGF 是发现最早、主要由下颌下腺产生并分泌、对机体有重要作用的生物活性物质,其表达的改变可反映颌下腺的功能状态。本实验结果证实,D-半乳糖诱发的大鼠衰老可明显影响下颌下腺生物活性物质 NGF 和 EGF 的功能,为延缓组织退行性改变、预防衰老性涎腺疾病研究与应用提供了一定的实验资料。

参考文献:

- [1] 于海忠,赵淑敏,葛志华. D-半乳糖衰老大鼠下颌下腺超微结构的改变[J]. 河北医药,2009,31(11):1287-1288.
- [2] 金小萍,王春艳,葛志华. D-半乳糖所致衰老大鼠下颌下腺 Bcl-2 和 Bax 的表达[J]. 河北医药,2009,31(10):1200-1201.
- [3] 李俊攻,高福祿,葛志华,等. 何首乌饮对衰老大鼠下颌下腺凋亡的影响[J]. 山东医药,2009,49(48):34-35.
- [4] 袁萍,雷婷婷. 神经生长因子治疗弥漫性轴索伤的疗效[J]. 重庆医学,2005,34(12):1877-1878.
- [5] 曹霞,何素蓉,刘艳,等. 神经生长因子治疗新生儿缺氧缺血性脑病的临床疗效观察[J]. 重庆医学,2008,37(20):2323-2324.
- [6] 杜金凯,王春艳,葛志华. db/db 糖尿病小鼠颌下腺内皮细胞生长因子和神经生长因子表达的研究[J]. 中国老年学杂志,2008,28(14):1390-1391.
- [7] 陈瑜,王大勇,翁政. PHB 导管复合神经生长因子在大鼠坐骨神经损伤模型中的疗效研究[J]. 重庆医学,2008,37(4):393-395.
- [8] 药立波. 医学分子生物学[M]. 3 版. 北京:人民卫生出版社,2008:118.
- [9] 刘少平,杨国成,孟祥平,等. 小鼠颌下腺 2.5S 神经生长因子生物活性评估标准的建立[J]. 广西医学,2005,27(1):50-51.
- [10] 郑晓晶,张桂蓉. NGF 参与支气管哮喘大鼠气道炎症的发生及作用机制[J]. 第三军医大学学报,2008,30(11):1058-1061.
- [11] 薛媛,尹晓娟,晏玲. 神经生长因子治疗新生儿缺氧缺血性脑病疗效观察[J]. 重庆医学,2006,35(22):2030-2031.
- [12] 刘岩,王献华,周玮玮. 表皮生长因子与器官纤维化[J]. 现代预防医学,2008,35(7):1398-1400.
- [13] 孙永红,孙良华,黄文波,等. 慢性萎缩性胃炎患者胃黏膜上皮细胞中 PCNA、EGF、VEGF 的表达及意义[J]. 山东医药,2008,48(40):4-6.
- [14] 何秋兰,杨拯,徐艳,等. 表皮生长因子及其受体在胃溃疡愈合中的作用[J]. 重庆医学,2008,37(19):2239-2242.
- [15] 谭一清,鲁际,覃晓燕,等. 下颌下腺的研究进展[J]. 医学综述,2009,15(19):2962-2965.