

证的研究

慢性胃炎脾气虚证与胃粘膜细胞凋亡
调控基因的相关性研究徐珊^{*} 石君杰^{*} 杨季国^{*} 朱曙东^{*} 倪桂宝^{*} 聂红明^{*} 夏小芳^{*}

摘要 目的:研究探讨细胞凋亡调控基因蛋白 Bax、Fas、p16 在慢性胃炎脾气虚证患者胃粘膜的表达及其表达特征。方法:胃镜病理确诊和辨证设慢性胃炎脾气虚证、胃阴虚证、脾胃湿热证 3 组和正常对照组。胃粘膜病理切片,免疫组化法检测 Bax、Fas、p16 表达水平。结果:脾气虚证等 3 组 Bax、Fas 的表达率均高于正常对照组,p16 的表达率均低于正常对照组,差异有显著性;脾气虚证组与胃阴虚证组和脾胃湿热证组比较差异有显著性。标记指数结果亦与其相符。结论:慢性胃炎脾气虚证胃粘膜细胞增殖与凋亡平衡紊乱,细胞凋亡相对亢进,Bax、Fas、p16 与慢性胃炎脾气虚证有很强的相关性。

主题词 胃炎/病理学 脾气虚/病理学 细胞凋亡

随着生命科学的发展,人类基因蛋白质组学研究的方法学内容与中医药学的整体观、辨证观显现出较多相似之处。基因组学为中医证候的研究提供了一个切入点,拓展了中医证候实质研究的思路^[1,2]。

慢性胃炎脾气虚证在临床极为常见,目前的研究大多从功能、激素、免疫等方面开展,存在着低水平重复,难以揭示其证候的实质,也影响了有效的中药制剂的研究和开发。现代医学研究认为,在多种致病因素作用于生命机体时,能否发生慢性胃炎及产生病理损害,常常是受相关(易感)基因的影响而决定其转归,即致病因素需要通过影响生命机体的某些“受体”而引发一系列的胃粘膜损害反应而产生慢性胃炎的病理过程。因此,我们进行了慢性胃炎脾气虚证候与胃粘膜细胞凋亡调控基因表达的相关性研究,现报告如下。

1 临床资料

慢性胃炎的诊断和证候的辨证标准参照文献[3]。检测对象均接受电子胃镜和病理活检确诊,同时进行病史调查和其他实验室检查,排除消化性溃疡和其他胃肠道器质性病变,无肝、胆、胰和系统性疾病,近 2 周内未服用过制酸剂、抗生素及非类固醇类药物。纳入慢性胃炎脾气虚证、胃阴虚证、脾胃湿热证各 30 例,其

中浅表性胃炎 57 例,萎缩性胃炎 17 例,伴有肠腺化生或异型增生 16 例。选择健康人 30 例设正常对照组,胃镜和病理活检确诊无明显胃粘膜病变。脾气虚证组男 11 例,女 19 例;年龄 22~68 岁;病程 2~12 年。胃阴虚证组男 14 例,女 16 例;年龄 18~70 岁;病程 1~20 年。脾胃湿热证组男 12 例,女 18 例;年龄 20~58 岁;病程 2~11 年。正常对照组男 14 例,女 16 例;年龄 20~60 岁。经齐同性检验,各组的性别、年龄、病程均具有可比性($P>0.05$)。

2 方法

2.1 标本采集:上述病例在接受电子胃镜检查时,胃镜下观察胃粘膜象后,以活检钳在炎症部位钳取 2 或 3 块胃粘膜作为检测标本。

2.2 检测方法:钳取的胃粘膜组织均用 10%甲醛固定,常规脱水,石蜡包埋,连续切片,厚 5 μ m,S-P 法免疫组化染色,测定胃粘膜上皮细胞 Bax、Fas、p16 的表达水平(稀释度为:Bax:1:100,Fas:1:100,p16:1:30)。S-P 试剂盒及 Bax 单克隆抗体、p16 单克隆抗体为 Zymed 公司产品,Fas 单克隆抗体为 Santa 公司产品(均购自北京中山生物技术有限公司)。

2.3 判断标准

2.3.1 Bax、Fas、p16:Bax、Fas 阳性物定位细胞浆,呈棕黄色。p16 阳性物定位细胞核、细胞浆,呈棕黄色。取无组织折叠、无边缘效应等影响读片结果的典型部位,随意选取 5 个高倍视野并计数 100 个细胞,以其平均数作为最后评定结果。以 PBS 代替一抗作阴性对照,以已知阳性染色的大肠癌组织作阳性对照。阳性细胞 $<5\%$ 为(-), $5\% \sim 25\%$ 为(+), $26\% \sim 50\%$ 为(++), $>50\%$ 为(+++)。

2.3.2 标记指数(LI):显微镜下计算 500 个细胞,以标记指数(Labeling Index,LI,亦称 Weighted Score)作为定量指标。LI 计算方法参照文献[4]略作修改:染色强度(淡为 1 分,中为 2 分,强为 3 分) $\times$ 阳性细胞数($<5\%$ 为 1 分, $5\% \sim 25\%$ 为 2 分, $26\% \sim 50\%$ 为 3 分, $>50\%$ 为 4 分)。

2.4 统计学方法:所有数据统计用统计学软件包 SP

基金项目:浙江省中医药管理局科研基金(2000-C-38)

* 浙江中医学院,杭州市滨江区滨文路(310053)

收稿日期:2003-06-25;修回日期:2003-08-15

表 1 各组胃粘膜上皮细胞 Bax、Fas、p16 表达比较

组别	例数	Bax					Fas				p16		
		—	+	++	+++	表达率(%)	—	+	++	表达率(%)	—	+	表达率(%)
脾气虚组	30	6	17	5	2	80.00*▲▲	13	15	2	56.67*▲	27	3	10.00*▲
胃阴虚组	30	7	19	4	0	76.67*▲	16	13	1	46.67*	23	7	23.33*
脾胃湿热组	30	16	12	2	0	46.67*	21	9	0	30.00*	21	9	30.00*
正常对照组	30	21	6	0	0	20.00	27	3	0	10.00	13	17	56.67

与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与脾胃湿热证组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$

表 2 各组胃粘膜上皮细胞凋亡调控基因蛋白的定量表达(LI 值, $\bar{x}\pm s$)

组别	例数	细胞凋亡调控基因蛋白		
		Bax	Fas	p16
脾气虚组	30	1.20±1.61*▲▲	3.27±1.23*▲	2.27±0.99*▲
胃阴虚组	30	5.80±1.21**	2.80±1.37**	2.47±0.86*▲
脾胃湿热组	30	3.21±1.06*	2.10±0.48*	3.54±0.27*
正常对照组	30	2.03±0.75	1.26±0.52	4.18±0.35

与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与脾胃湿热证组比较,▲ $P<0.05$,▲▲ $P<0.01$

表 3 不同胃粘膜病变胃粘膜上皮细胞凋亡调控基因表达的比较

胃粘膜病变	例数	表达率(%)		
		Bax	Fas	p16
浅表性胃炎	37	56.14△△	33.33△△	10.53△△
萎缩性胃炎	17	88.24	64.71	35.29
肠化或增生	16	87.50	62.50	43.75

与萎缩性胃炎比较,* $P<0.05$;与肠化或增生比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$

SS 10.0 版统计。率的比较采用 χ^2 检验;均数以 $\bar{x}\pm s$ 表示,不配对非参数检验,两组间比较用 t 检验。

3 结果

3.1 慢性胃炎不同证候组胃粘膜病理检查:脾气虚证组中浅表性胃炎 21 例,萎缩性胃炎 3 例,肠化或异型增生 6 例。胃阴虚证组浅表性胃炎 19 例,萎缩性胃炎 6 例,肠化或异型增生 5 例。脾胃湿热证组浅表性胃炎 17 例,萎缩性胃炎 8 例,肠化或异型增生 5 例。不同证候的病理诊断的分布构成比差异无显著性($P>0.05$)。

3.2 慢性胃炎不同证候组胃粘膜细胞凋亡调控基因蛋白的表达率:慢性胃炎各证候组胃粘膜上皮细胞 Bax、Fas 的表达率均高于正常对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其中脾气虚证组 Bax、Fas 的表达率高于胃阴虚证组和脾胃湿热证组(与脾胃湿热证组比较, $P<0.01$)。慢性胃炎各证候组胃粘膜上皮细胞 p16 的表达率均低于正常对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其中脾气虚证组 p16 的表达率低于胃阴虚证组和脾胃湿热证组(与脾胃湿热证组比较, $P<0.05$),见表 1。

3.3 慢性胃炎不同证候组细胞凋亡调控基因蛋白的定量表达:按 LI(标记指数)定量指标测定慢性胃炎不

同证候组和正常对照组 Bax、Fas、p16 的表达,结果与 χ^2 检验结果相符合,见表 2。

3.4 不同胃粘膜病变细胞凋亡调控基因蛋白的表达率:浅表性胃炎与萎缩性胃炎比较,胃粘膜上皮细胞 Bax、Fas、p16 的表达水平差异有显著性($P<0.05$)。与肠化增生比较,Bax 的表达水平差异有显著性($P<0.05$),Fas、p16 的表达水平差异有显著性($P<0.01$),见表 3。

4 讨论

证候研究一直是中医基础理论研究的核心问题,病证结合也是目前采用较多的研究方法。目前对于慢性胃炎证候的研究大多是从胃粘膜象、HP、血液流变学、胃肠道功能、胃肠激素、细胞膜酶、免疫功能、植物神经功能等方面进行研究,难以揭示其证候实质。近年来,随着基因组学研究的不断深入,不少专家学者呼吁将基因组学引入中医证候实质的研究之中,这很可能是中医药现代化的一个切入点[5]。虽然从分子水平研究证候比从系统、器官、组织层次更微观,但由于基因的研究忽略器官组织的解剖定位,强调生物化学的某一环节的改变和疾病过程的内在联系,从而与中医整体的生理病理观有更多的切合点。因此,基因的研究有可能从根本上揭示辨证的奥秘和证候的实质。有学者认为,基因表达的改变是证的“内涵”[1],也有学者认为,基因的正常表达就是“正气”,基因表达的变异就是“内邪”,“证”就是基因型及其表达,是个体差异的基础[2]。通过研究证候和基因及其表达模式之间的内在联系,探寻证候相关基因表达谱,是研究中医证候实质的有效途径。

研究表明,细胞增殖与凋亡平衡紊乱是胃粘膜病变的分子生物学基础,细胞凋亡受到许多基因的调控。Bax 是第一个被分离到的 Bcl-2 家族成员之一。Bax 在体内广泛表达,在凋亡旺盛的细胞中表达更强。其生物学作用是拮抗 Bcl-2,抑制或促进细胞凋亡。Bax 蛋白水平高低与凋亡调控直接相关,Bax 增高,促进细胞凋亡,Bax 降低,细胞凋亡受抑制。促凋亡基因 Bax 表达变化可能是胃粘膜恶性转化过程中细胞凋亡异常的主要机制之一[4]。

Fas 基因属于肿瘤坏死因子(TNF)和神经生长因子(NGF)受体的超家族成员,是一种具有重要功能作用的细胞表面受体^[6]。Fas 广泛表达于机体多种组织细胞,尤其是免疫细胞膜表面,它可与抗 Fas 抗体或 FasL(Fas 配体)结合,使表达 Fas 的细胞凋亡,故 Fas 又称死亡受体。研究表明,Fas 蛋白诱导细胞凋亡,参与了胃炎的发病过程。p16基因参与了细胞周期的调控。目前认为,p16蛋白通过与细胞周期素 D₁竞争性结合细胞周期蛋白依赖激酶(CDKs),抑制 CDKs 活性,从而阻止 Rb 蛋白的磷酸化,去磷酸化 Rb 蛋白结合的转录因子(E₂F)不能被释放活化,使细胞停滞于 G₀期或 G₁期,抑制细胞分裂增殖^[7]。当 p16基因出现异常改变时,失去上述对细胞生长的负调控作用,细胞过度增殖生长,导致肿瘤的发生发展。p16作为一个直接参与细胞增殖的负调控基因,在人类许多恶性肿瘤中的表达情况已逐渐被人们所了解,但在正常组织、良性病变中的研究较少。

本研究发现,浅表性胃炎、肠化增生与萎缩性胃炎比较,胃粘膜上皮细胞 Bax、Fas、p16的表达水平差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);慢性胃炎不同证候组 Bax、Fas、p16的表达率较正常对照组差异亦有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。说明 Bax、Fas 和 p16基因蛋白调控胃粘膜上皮细胞凋亡可能参与了胃炎的发病过程,与文献报道结果相一致^[6,7]。

中医学认为,胃之功能全赖脾之运化,脾与胃,一属脏,一属腑,同居中焦,互为表里。胃主受纳、腐熟,以通降为顺,脾主运化、转输,以升为健,脾与胃,一升一降,共同完成水谷的消化吸收。脾胃脏腑阴阳互为联

系,升降相因,燥湿相济,才能维持水谷饮食的消化吸收。这种生理功能失调,就会出现病变上的互相影响。虽然慢性胃炎表现为胃脘症状,但其根本在于脾虚,健脾益气法是临床治疗慢性胃炎的主要方法。本实验进行慢性胃炎脾气虚证与胃粘膜细胞凋亡调控基因表达的相关性研究,结果表明,慢性胃炎脾气虚证胃粘膜细胞凋亡调控基因 Bax、Fas 表达增强,p16表达减弱,细胞增殖与凋亡平衡紊乱,细胞凋亡处于相对亢进状态。提示胃粘膜上皮细胞凋亡调控基因蛋白 Bax、Fas 和 p16与慢性胃炎脾气虚证有很强的相关性,慢性胃炎脾气虚证的实质可能体现于胃粘膜上皮细胞凋亡水平及调控基因的变化。在此基础上进一步深入研究,有望从基因分子水平揭示慢性胃炎脾气虚证实质,为中医基础理论的研究开辟新的途径。

参考文献

- 1 李杰芬.基因组学发展对中医证实质研究的启示.上海中医药杂志,2001,35(2):11-13.
- 2 宋为民,王明艳,徐力.基因组学是中医现代化的最佳切入点.南京中医药大学学报,1999,15(4):193-195.
- 3 周建中,陈泽民,危北海.慢性胃炎中西医结合诊断、辨证和疗效标准试行方案.中西医结合杂志,1990,10(5):318-319.
- 4 陈奕贵,郑天荣,郑雄伟,等. Bcl-2、Bax、p21-WAF₁、p16-MTS₁蛋白在胃癌癌演化系列中的表达.胃肠病学和肝病学杂志,1999,8(4):261-264.
- 5 沈自尹.基因科学和21世纪中医药学的走向.上海中医药杂志,2000,34(10):7-9.
- 6 贾百灵,李继昌,黄河,等.胃癌发生过程中 fas、bcl-2、bax 蛋白表达的变化.中华消化杂志,1999,19(4):267-269.
- 7 游犁汀,周桂兰,刘勇. p16、cyclinD 和 PCNA 表达在胃癌早期诊断中的意义.中国普通外科杂志,2000,9(4):351-353.

《中医杂志》将从2004年第10期起进行栏目调整

《中医杂志》是由中华中医药学会和中国中医研究院联合主办的国家级中医药学术期刊。创刊于1955年,现为月刊,是建国以后我国中医药界创刊最早、发行量最大、最具权威和影响的中医药学术刊物。根据广大读者的要求,《中医杂志》将从2004年第10期起对期刊栏目设置做如下调整。

1. 新增设栏目:(1)专家论坛:每期将约请有关专家就中医药学术发展的热点问题发表见解。(2)学术争鸣:将定期刊载内容选题广泛的争鸣文章,增加作者读者间的交流。(3)当代名医:主要介绍20世纪90年代以来由国家两部一局认定的名老中医的学术思想和经验。(4)医经研读:中国古代医学经典研讨。(5)海外中医:海外中医学者研究成果及发展信息。(6)验案采撷:中医临床疑难验案解析。(7)经验方荟萃:经方及个人验方的应用体会。(8)中医与写作:约请名家分析中医科技论文的写作技巧。

2. 栏目名称变动:(1)“学术探讨”改为“理论探讨”:内容为中医现代化研究、中医病证研究、中医现代医学的学术思想研究等。(6)“针灸经络”改为“针灸推拿”:内容为针灸推拿临床经验总结、理论研究等。

3. 调整栏目内容:(1)临证心得:老中医经验或普通作者个人临床经验总结。(2)专题笔谈:除中药应用专题以外,将陆续推出中医病证专题、中医治法专题等。