

证的研究

慢性浅表性胃炎脾胃湿热证与水通道蛋白 3 基因表达的相关性研究

张诗军¹ 劳绍贤² 周 正² 黄志新² 陈更新³ 傅肖岩² 胡 斌⁴

摘要 目的:探讨慢性浅表性胃炎脾胃湿热证与水通道蛋白 3(AQP3)基因表达的相关性。方法:随机选取 88 例慢性浅表性胃炎患者,其中脾胃湿热证 75 例,脾虚证组 13 例,另选择健康的本校学生 10 人作为正常对照组,采用荧光定量 PCR 法检测患者胃粘膜 AQP3 表达。结果:正常人与慢性浅表性胃炎患者 AQP3 阳性表达率差异有显著性($P<0.01$),正常人、脾胃湿热证患者 AQP3 阳性表达率差异有显著性($P<0.05$),脾胃湿热证、脾虚证患者 AQP3 阳性表达率差异无显著性($P>0.05$)。慢性浅表性胃炎脾胃湿热证中 AQP3 阳性患者出现口渴少饮、大便溏而不爽的比例要明显高于 AQP3 阴性患者($P<0.05$ 或 $P<0.01$),出现口干口苦、恶心、纳呆、腹胀或痛的比例两组无明显差异($P>0.05$)。慢性浅表性胃炎脾胃湿热证中 AQP3 阳性患者辨证为湿重于热的比例要明显高于 AQP3 阴性患者($P<0.05$)。结论:AQP3 与水液代谢关系密切,AQP3 在脾胃湿热证发生中起着某种作用。

主题词 胃炎/代谢;脾胃湿热/代谢;水通道蛋白质类/代谢;基因表达

Study on correlativity of Spleen-Stomach Damp-Heat Syndrome of Chronic Superficial Gastritis with AQP3 Gene Expression

Zhang Shijun¹, Lao Shaoxian², Zhou Zheng², et al.

(1. The First Affiliated Hospital of Sun Yat-Sen University, Guangdong 510080; 2. Institute of Spleen and Stomach, Guangzhou University of TCM)

Objective: To probe correlativity of Spleen-Stomach Damp-Heat Syndrome of chronic superficial gastritis with aquaporin 3 (AQP3). **Methods:** Among 88 cases of chronic superficial gastritis, 75 cases were spleen-stomach damp-heat syndrome and 13 cases were spleen deficiency, and 10 health students were selected as normal control group. AQP3 gene expression on gastric mucosa was detected by fluorescence quantitative PCR method. **Results:** there were significant differences between the normal persons and the patients with chronic superficial gastritis ($P<0.01$), and between the normal persons and the patient of spleen-stomach damp-heat syndrome ($P<0.05$) in the expression rate of AQP3 ($P<0.01$); and between the normal persons and the patient of spleen-stomach damp-heat syndrome ($P<0.05$), but there was no significant difference in AQP3 gene expression between the spleen-stomach damp-heat syndrome and spleen-deficiency syndrome ($P>0.05$); but the ratio of the AQP3 positive patients of chronic superficial gastritis of spleen-stomach damp-heat syndrome with the symptoms of dry mouth with little less drink, loose and sluggish stool were higher than that in AQP3 negative patients ($P<0.01$ or $P<0.05$); but there was no difference between the AQP3 positive patients and the negative patients in the symptoms of dry mouth, bitter mouth, nausea, anorexia, abdominal distention and pain ($P<0.05$); the ratio of AQP3 positive patients of chronic superficial gastritis with spleen-stomach damp-heat syndrome was higher than that of AQP3 negative group ($P<0.05$). The ratio of the AQP3 positive patients of chronic superficial gastritis with dampness over heat was higher than that of AQP3 negative patients of chronic superficial gastritis with spleen-stomach damp-heat syndrome ($P<0.05$). **Conclusion:** The AQP3 gene expression are closely related with most symptoms of spleen-stomach damp-heat syndrome, and AQP3 gene expression plays a certain role in the occurrence of spleen-stomach damp-heat syndrome.

Key Words Gastritis/metabolism; Damp-Heat in the Spleen and Stomach; Aquaporins/metabolism; Gene Expression

基金项目:本课题为国家自然科学基金面上项目资助课题 (30271572)

1 中山大学附属第一医院中医科,广州市中山二路 58 号 (510080)

2 广州中医药大学脾胃研究所

3 广东省中医院

4 中山大学达安基因诊断中心

收稿日期:2003-08-08;修回日期:2004-03-10

本研究拟以脾失健运,水湿内停,湿聚生热,湿热内生为切入点,从水通道蛋白 3(AQP3)途径探讨了脾胃湿热证的生物学基础及发生机理,现将研究结果报告如下。

1 临床资料

1.1 病例选择:从 2002 年 6 月~2003 年 2 月,我们随机选择来源于广州中医药大学第一附属医院消化内科

的 88 例慢性浅表性胃炎患者,男性 48 例,女性 40 例,年龄 17~62 岁。在 88 例慢性浅表性胃炎患者中,脾胃湿热证 75 例,男性 43 例,女性 32 例,年龄 17~62 岁;脾虚证组 13 例,男性 5 例,女性 8 例,年龄 23~61 岁。另外,选择无消化系统疾病病史、一般检查正常的本校学生 10 人作为正常对照组,男性 8 人,女性 2 人,年龄 21~26 岁。

1.2 诊断标准:慢性浅表性胃炎诊断标准采用 2000 年 5 月中华医学会消化病学分会在江西井冈山举行的慢性胃炎研讨会的诊断标准^[1]。脾胃湿热证的诊断标准参照国家药品监督管理局为指导新药研究制定的《中药新药治疗湿热蕴脾证的临床研究指导原则》中的相关诊断标准^[2],脾虚证诊断标准参照广州中医药大学脾胃研究所制定的相关诊断标准^[3]。

健康受试者的选择标准:(1)胃镜检查胃粘膜基本正常;(2)年龄 8~50 岁的志愿者;(3)中医四诊未发现异常者;(4)无心、肝、肾、肺系等病史者,心、肝、肾、肺功能检查正常。

2 方法

2.1 取材方法:胃镜检查患者,在胃体上部距 EG 线 2cm 处取胃粘膜组织 2 块,每块 0.5cm×0.5cm 大小,放入液氮罐中保存,以进行 AQP3 基因表达检测。

2.2 AQP3:采用荧光定量 PCR 法检测 AQP3 基因表达。

2.2.1 荧光定量 PCR 原理:荧光定量 PCR 技术是指在进行荧光定量 PCR 检测时,在 PCR 反应体系中加入一条标记了 2 个荧光基团的荧光双标记探针,当有特异性 PCR 扩增发生时,探针会在 PCR 过程中被 Taq 酶的 5'→3' 活性作用切断(切口平移效应),抑制作用消失,从而引起报告基因荧光信号的增长。荧光信号伴随着 PCR 的进行,PCR 产物的增长而增长。实时定量荧光 PCR 方法就是利用此原理,在 PCR 过程中,连续不断地检测反应体系中的荧光信号的变化。该方法实现了 PCR 从定性到定量的飞跃,降低了 PCR 假阳性率,减少了人为误差,大大提高了结果的准确度。

2.2.2 荧光定量 PCR 法检测 AQP3 具体步骤:(1)AQP3 引物:正义链引物(Forward Primer):5'-ATAGTTTTTGGGCTGTA-TTATGATGCA-3';反义链引物(Reverse Primer):5'-GGGCCCCAAACAAAAGGC-3';荧光探针(Fluorescent Probe):5'-FAM-TGGCACTTCGCCGAC-MGB-3'。(2)组织 RNA 的提取:取胃粘膜组织块(约 100mg)置入匀浆器,加 TRIZol 2ml,冷冻匀浆,置入 Eppendorf 管,15~30℃ 孵育 5 分钟,加入 0.4ml 氯仿,盖紧盖子,用力摇动 15

秒,15~30℃ 孵育 2~3 分钟,4℃ 12000r/min 离心 15 分钟,取上清液至新的 Eppendorf 管,加 0.5ml 异丙醇,15~30℃ 孵育样品 10 分钟,4℃ 12000r/min 离心 10 分钟,弃上清液,75%乙醇洗涤沉淀一次,4℃ 7500r/min 离心 5 分钟,弃乙醇,空气或真空干燥 5~10 分钟,加 DEPC 处理水溶解 RNA,-80℃ 保存备用。(3)RNA 样品鉴定:每样品取 5μl RNA 置于 1% 的琼脂糖凝胶上电泳,泳毕,溴化乙锭染色 20 分钟,置紫外灯下观察,紫外分光光度计扫描,每样品在紫外分光光度计上测定 260nm 和 280nm 吸光度值,计算 A 260nm/A 280nm 比值,比值大于 1.8,说明制备的 RNA 较纯,无蛋白质污染。(4)逆转录反应:①取 2μg 总 RNA 模板做逆转录反应,仪器为 PE9600PCR 仪(美国 Perkin Elmer 公司),反应体系如下:5× 逆转录 buffer 2μl,下游引物(25μM)0.5μl,dNTPs(10mM)1μl,MMLV(10U/μl)1μl,DEPC 水 3.5μl,RNA 模板(1μg/μl)2μl,总体积 10μl,逆转录 buffer 成分:50mM Tris-Hel(pH8.0),50mM KCl,4 mM MgCl₂,10 mM DTT。②反应条件:37℃ 1 小时,然后 95℃ 3 分钟。(5)荧光定量 PCR(FQ-PCR)反应:①阳性标准模板的制备:取逆转录反应产物 cDNA5μl,仪器为 PE9600 PCR 仪(美国 Perkin Elmer 公司),按以下体系反应:5× PCR buffer 10μl,上游引物 F(25μM)1μl,下游引物 R(25μM)1μl,dNTPs(10mM)1μl,Taq 酶 2μl,cDNA 5μl,ddH₂O30μl,总体积 50μl,PCR buffer 成分:10 mM Tris-HCl(pH8.0),50mM KCl,2mM MgCl₂。反应条件为:93℃ 2 分钟,然后 93℃ 1 分钟,55℃ 1 分钟,72℃ 1 分钟,共 40 个循环,最后是 72℃ 7 分钟延伸。PCR 扩增产物:AQP3 长 68bp,经过 2% 低熔点琼脂糖凝胶电泳(含溴乙锭,用 TAE 缓冲液配制),在长波紫外下,割下目的条带。用回收试剂盒(QIAquick Gel Extraction Kit)回收纯化。测定 OD 260/280>1.8,表明纯度合格。用 OD260 测定值和片段长度数据换算出浓度(copy/μl),再做梯度稀释,制备成阳性定量标准晶梯度。荧光定量阴性质控标准晶采用灭菌双蒸水。②FQ-PCR 测定:阳性定量标准品及样本均按以下反应体系进行:5× 定量 PCR buffer(美国 ABI 公司试剂盒)10μl,上游引物 F(25μM)1μl,下游引物 R(25μM)1μl,dNTPs(10mM)1μl,荧光探针(20μM)1μl,Taq 酶(2U/μl)2μl,cDNA 5μl,ddH₂O 30μl。反应条件为:93℃ 2 分钟,然后 93℃ 1 分钟,55℃ 1 分钟,共 35~40 个循环。反应结束后,由电脑自动分析并计算结果。

2.3 统计学方法:组间计数资料的比较用 χ^2 检验,若四格表中有理论频数小于 1,或总例数小于 40 时,采用

Fisher 精确检验(Fisher's exact test);计量资料以均数±标准差表达,组间计量资料比较用 *t* 检验,采用双侧检验,各统计资料处理均在 SPSS10.0 for Windows 上进行。

3 结果

3.1 慢性浅表性胃炎中医证型与 AQP3 基因表达的关系:10 个正常人中,有 5 例 AQP3 表达阳性,其起始拷贝数分别为 2.94×10^5 , 5.86×10^5 , 4.98×10^6 , 5.66×10^6 , 2.80×10^7 。75 例脾胃湿热证中,10 例 AQP3 表达阳性,其起始拷贝数分别为 3.84×10^6 , 2.25×10^5 , 5.35×10^5 , 3.04×10^3 , 2.68×10^5 , 4.96×10^5 , 1.18×10^5 , 5.21×10^5 , 1.19×10^5 , 8.19×10^5 。13 例脾虚证中,2 例 AQP3 表达阳性,其起始拷贝数分别为 1.48×10^5 , 3.1×10^5 。经 Fisher 精确检验,正常人、脾胃湿热证中 AQP3 测出例数相比较有显著差异($P < 0.05$);脾胃湿热证、脾虚证中 AQP3 测出例数相比较差异无显著性($P > 0.05$)。正常人、脾虚证因例数较少,多个方格的理论频数小于 5,最小的理论频数小于 1,不作卡方检验或 Fisher 精确检验。

3.2 慢性浅表性胃炎脾胃湿热证中 AQP3 阳性患者与 AQP3 阴性患者性别、年龄分布比较:65 例慢性浅表性胃炎脾胃湿热证中 AQP3 阴性表达患者中男性 20 例,女性 45 例,10 例慢性浅表性胃炎脾胃湿热证中 AQP3 阳性表达患者中男性 7 例,女性 3 例,经 Fisher 精确检验,慢性胃及十二指肠球部疾病脾胃湿热证中 AQP3 阳性患者与 AQP3 阴性患者男女比例无明显差异($P > 0.05$);65 例慢性浅表性胃炎脾胃湿热证中 AQP3 阴性表达患者中 ≤ 35 岁 37 例, > 35 岁 28 例,10 例慢性浅表性胃炎脾胃湿热证中 AQP3 阳性表达患者中 ≤ 35 岁 6 例, > 35 岁 4 例,经 Fisher 精确检验,两组患者两个年龄段的分布差异无显著性($P > 0.05$)。

3.3 慢性浅表性胃炎脾胃湿热证中 AQP3 阳性与 AQP3 阴性患者中各症状出现例数比较:附表示,慢性浅表性胃炎脾胃湿热证中 AQP3 阳性患者出现口渴少饮、大便溏而不爽的比例要明显高于 AQP3 阴性患者($P < 0.05$),出现口干口苦、恶心欲呕、食少纳呆、脘腹胀闷或痛、肢体困重的比例两组无明显差异($P > 0.05$)。

3.4 慢性浅表性胃炎脾胃湿热证不同证候 AQP3 表达例数比较:结果显示,慢性胃炎脾胃湿热证中 AQP3 阴性表达为 65 例,阳性表达为 10 例,其中湿重于热者 AQP3 阴性 20 例,阳性 7 例;检测出 HP 阳性者 AQP3 阴性 45 例, AQP3 阳性 3 例。经 Fisher 精确检验,慢性

胃炎脾胃湿热证中 AQP3 阳性患者辨证为湿重于热的比例要明显高于 AQP3 阴性患者($P < 0.05$);慢性胃炎脾胃湿热证中 AQP3 阳性患者中检测出 HP 阳性的比例与 AQP3 阴性组比较差异无显著性($P > 0.05$)。

附表 慢性浅表性胃炎脾胃湿热证中 AQP3 阳性与 AQP3 阴性患者中各症状出现例数比较

症状	AQP3 阳性(10 例)	AQP3 阴性(65 例)
口干口苦	9	38
口渴少饮	9	28
恶心欲呕	6	25
大便溏而不爽	7	20
食少纳呆	2	30
脘腹胀闷或痛	6	36
肢体困重	7	38

4 讨论

人体胃肠组织中存在 AQP 亚群,不同 AQP 在胃肠道不同器官吸收和分泌过程中的作用和调节机制不同,在体内液体转运和某些腺体分泌方面有重要生理作用^[4~6]。水通道的发现,深化了对水平衡紊乱所造成的某些疾病的病理生理学机制的认识,同时为研究脾胃湿热证提供了新的思路。

在本研究中,胃粘膜组织取自泌酸腺所在位置,它们分别由分泌盐酸、胃蛋白酶原、粘液的壁细胞、主细胞、粘液颈细胞 3 种细胞组成。胃内消化腺每天分泌的消化液总量达 1.5~2.5L,主要由水、有机物、离子组成,在吸收方面,胃对食物的吸收很少,可吸收酒精和少量水分。也就是说,胃粘膜内水的适时适量的流动有助于消化过程中盐酸、胃蛋白酶原、粘液的分泌。本研究发现,在 10 例正常人中有 5 例可测出 AQP3 表达,在 88 例慢性浅表性胃炎患者中有 12 例测出 AQP3 表达,两者相比较差异有显著性,提示 AQP3 表达一方面有助于粘液的分泌,另一方面有助于水的吸收,但胃粘膜有炎症或胃内环境发生改变时 AQP3 关闭,导致粘液的分泌及水的吸收障碍。

本研究中 75 例慢性浅表性胃炎脾胃湿热证患者均有不同程度的胃粘膜充血水肿,甚者出现糜烂,粘液湖量也较正常人增多,提示脾胃湿热证与炎症病变的关系密切^[10,11]。而炎症的渗出与体液代谢关系密切,因此脾胃湿热证的发生可能与胃粘膜内水 AQP 的表达有关。其中 10 例检测出 AQP3 表达,10 例正常人胃粘膜均无明显充血水肿,有 5 例检测出 AQP3 表达,两者相比较差异显著。提示慢性浅表性胃炎脾胃湿热证的发生可能与 AQP3 的低表达有关。

慢性浅表性胃炎脾胃湿热证中 AQP3 阳性患者出

现口干口苦、恶心、纳呆、腹胀或痛的比例两组无明显差异,但出现口干少饮、大便溏而不爽的比例要明显高于 AQP3 阴性患者。而口干少饮、大便溏而不爽是以湿为表现特征的,进一步的研究发现,慢性浅表性胃炎脾胃湿热证中 AQP3 阳性患者辨证为湿重于热的比例要明显高于 AQP3 阴性患者,提示 AQP3 与水液代谢关系密切,AQP3 高表达可能为内湿导致的渗透压变化诱导而致,同时 AQP3 的高表达可能有助于水液的流动及内湿的清除。

慢性浅表性胃炎脾胃湿热证中,AQP3 阳性患者中检测出 HP 阳性的比例与 AQP3 阴性组比较无显著性差异,提示 AQP3 的变化可能与患者 HP 感染无明显关系。

本研究中同为脾胃湿热证,大部分患者的 AQP3 表达呈阴性,提示可能由于 AQP3 表达低下,导致胃内水液代谢障碍,而形成脾胃湿热证;小部分患者的 AQP3 呈阳性,提示可能由于 AQP3 高表达的原因可能为内湿导致的渗透压变化诱导,同时 AQP3 的高表达有助于水液的流动及内湿的清除,有湿去热清康复之机,也就是说同为脾胃湿热证,可能存在不同的水液代谢状态或变化趋势。另外,本研究的初浅研究将脾胃湿热证分为热重于湿和湿重于热两型,发现其 AQP3 表达有所不同,慢性胃炎脾胃湿热证中 AQP3 阳性患者辨证为湿重于热的比例要明显高于 AQP3 阴性患者。那么,逐步增加病例数,还可将脾胃湿热证分为热重于湿、湿热并重和湿重于热 3 型或更多类型,或对湿与热的程度更精确定量,其 AQP3 的表达水平也可能

不一样。因此,脾胃湿热证也存在多态性。

参考文献

- 1 中华医学会消化病学分会.全国慢性胃炎研讨会共识意见.中华消化杂志,2000,20(3):199-201.
- 2 郑筱萸.中药新药临床研究指导原则(试行).北京:中国医药科技出版社,2002:362.
- 3 张向菊,劳绍贤,罗琦,等.慢性浅表性胃炎脾胃湿热证患者胃电图与胃排空的关系.广州中医药大学学报,2001,18(1):43-45.
- 4 Gelmini S,Orlando C,Sestini R,et al. Quantitative polymerase chain reaction-based homogeneous assay with fluorogenic probes to measure C-erbB-2 oncogene amplification. Clin Chem,1997,43(5):752-758.
- 5 Holland PM, Abramson RD, Watson R, et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of the Thermus aquaticus DNA polymerase. Proc Natl Acad Sci USA,1991,88(16):7276-7280.
- 6 Ramirez-Lorca R, Vizuete ML, Venero JL, et al. Localization of aquaporin-3 mRNA and protein along the gastrointestinal tract of Wistar rats. Pflugers Arch,1999,438(1):94-100.
- 7 Silberstein C, Kierbel A, Amodeo G, et al. Functional characterization and localization of AQP3 in the human colon. Braz J Med Biol Res, 1999,32(10):1303-1313.
- 8 Ishibashi K, Sasaki S, Saito F, et al. Structure and chromosomal localization of a human water channel(AQP3)gene. Genomics 1995,27(2): 352-354.
- 9 Itoh A, Tsujikawa T, Fujiyama Y, et al. Enhancement of aquaporin-3 by vasoactive intestinal polypeptide in a human colonic epithelial cell line. J Gastroenterol Hepatol, 2003,18(2):203-210.
- 10 王启章,陈金炉,王洋,等.慢性胃炎中医证型与胃镜象关系的探讨.福建中医药,1994,25(2):20-21.
- 11 李长生.胃痛中医辨证分型的 X 线征象.山东中医学院学报,1994, 18(1):30-32

防治乙肝

“家庭医生”普及工程启动

中国中医药科技开发交流中心与北京华神制药有限公司联合举办的“全国农村基层医生专科专病培训班”近日结束。来自乡镇卫生院及村卫生室的 130 余名乡医参加了学习。针对当前肝病医疗市场混乱,患者盲目求医的情况,针对基层医生急需更新知识的特点,培训班邀请知名肝病专家作了专题学术报告,中国中医研究院的专家还重点介绍了该院治疗乙肝科技成果双虎清肝颗粒的临床应用情况。

北京华神制药有限公司诚聘“家庭医生”顾问(兼职医生、包括乡医),年龄不限,待遇优厚。免费培训、免费索取《乙肝康复》手册、VCD 光盘。

来信请寄北京东直门内南小街 16 号华神制药有限公司武宇宏收,邮编:100700。联系人:杜主任、武小姐,电话:(010)84035349、84032002。

关于发展中华中医药学会会员的通知

为了加强学会与会员的联系,促进中医药学术交流和整体学术水平的提高,我会现在全国范围内发展会员。凡具有中级以上职称的中医药工作者,自愿填写入会申请登记表,即可入会(已在各省中医药学会入会者,不要重复入会)。入会者需交 1 张 2 寸照片、费用 350 元(5 年会费 300 元,注册费 50 元)、职称证书复印件、1~3 篇代表性学术文章寄

至北京市朝阳区樱花东路甲 4 号,中华中医药学会学术部高扬收。邮政编码:100029,电话:(010)64212828。

· 征 文 ·

从以往的来稿中可以看出部分医家的自拟(研)方、丸、膏具有一定的市场开发前景,为了推广、交流、转化这些临床应用经验与成果,使之更好地为健康事业服务,我们拟于 2005 年 3 月在南京召开“传统医药科技成果推广与应用学术交流会”。征稿内容:自拟(研)方、丸、膏、散剂、剂、胶囊的临床应用心得、实验研究、与其它疗法对比、疗效分析;传统医药在未来的发展趋势与回顾总结。

华夏医药网 www. huaxia120. com《名医风采》栏目常年诚邀各地区临床诊治经验丰富的医学专家加盟,以便及时向本站点咨询的患者提供权威性、专业性的解答疑问或提供治疗方案。同时也可各从业专家展示技术实力与特色专长提供一个宣传平台,使更大范围的患者获得准确就医信息。

请将简历(或事迹)及来稿寄至:南京市商埠街 27 号,南京聚杰医药信息科技中心刘凤国收 邮编:210011,电话:(025)58820656。会议截稿日期 2005 年 1 月 16 日。每份会议稿件须附寄处理费 30 元,请在来稿上注明“传统医药”字样;在个人简历(或事迹)上注明“名医风采”字样。会议稿件一经录用,即免费刊登在华夏医药网(http://www. huaxia120. com)。