

四 诊 研 究

消化系统疾病舌苔变化的凋亡相关基因分子机理研究

吴正治* 李 明* 张永锋* 陈曼茵*

摘要 目的:检测消化系统疾病常见舌苔舌上皮细胞凋亡情况及凋亡相关基因 TGF- β_3 与 Fas mRNA 和蛋白产物,探讨舌苔厚度变化与舌上皮细胞凋亡、凋亡相关基因表达的关系。方法:运用末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧尿嘧啶核苷三磷酸缺口末端标记(TUNEL)技术、原位杂交、免疫组化和图像分析技术。结果:与正常薄苔比较,剥苔 Fas 基因过度表达伴随细胞凋亡增多,而厚苔 TGF- β_3 基因低表达伴随细胞凋亡减少。舌苔上皮细胞中促凋亡基因 Fas、TGF- β_3 表达水平变化趋势与细胞凋亡水平变化趋势一致。结论:凋亡相关基因 Fas、TGF- β_3 表达水平的变化可能是影响舌苔上皮细胞凋亡并导致舌苔厚度变化的重要原因。

主题词 消化系统疾病/诊断 舌苔/免疫学

Study on Molecular Mechanisms of Apoptosis-Related Genes for Changes of Tongue Fur Thickness in the Disease of Digestive System

Wu Zhengzhi, Li Ming, Zhang Yongfeng, et al.

(Shenzhen Clinical Institute of Integrated Chinese Medicine and Western Medicine, Shenzhen 518035)

Objective: To study on relation of changes of tongue fur thickness with apoptosis of tongue epithelium and apoptosis-related gene TGF- β_3 expressions. **Methods:** Terminal deoxynucleotide transferase-mediated d-UTP nick-end labeling (TUNEL) technique, in situ hybridization, immunohistochemical technique and image analysis method were used in the study. **Results:** As compared with the normal tongue fur, an over-expression of Fas gene in the exfoliative fur of the tongue was accompanied with increase of apoptosis, while a lower expression of TGF- β_3 in the thick fur was accompanied with decrease of apoptosis. Changes of Fas, TGF- β_3 gene expression level had a same tendency with that of apoptosis level. **Conclusion:** Changes of expression level of Fas and TGF- β_3 genes are possibly important cause influencing apoptosis of the epithelium of tongue fur and leading to the change of thickness of tongue fur.

Key Words Diseases of digestive system/diagnosis; Tongue fur/immunology

舌苔变化是中西医结合临床诊疗的重要客观依据。有关舌苔变化机理的研究虽已深入到亚细胞水平^[1~4],但在基因水平的研究尚属罕见。近年来,随着对细胞凋亡研究的深入,发现正常表皮细胞依靠生长、分化、凋亡处于相对平衡的状态而维持生理功能^[5]。而与正常表皮同属复层扁平上皮的舌苔其变化是否与舌苔上皮细胞凋亡程度有关,以及不同类型舌苔其凋亡相关基因表达变化规律的研究目前国内外尚少见报道。中医学认为,舌苔乃胃气熏蒸而成,与脾胃关系密切。为此,本课题运用末端脱氧核苷酸转移酶介导的脱氧尿嘧啶核苷三磷酸(d-UTP)缺口末端标记(TUNEL)技术检测消化系统疾病舌苔上皮细胞凋亡情况,运用原位核酸分子杂交、免疫组织化学技术对凋亡相关基因 Fas、TGF- β_3 在正常及消化系统疾病病理舌苔上皮细胞中的 mRNA 转录水平及蛋白产物进行测定,以期从基因分子水平探讨舌苔形成的机理。

1 材料与方法

1.1 标本来源:76 例病理舌苔受检者均系深圳市第二人民医院门诊及住院的消化系统疾病患者,其中溃疡性结肠炎 15 例,消化道恶性肿瘤 13 例,习惯性便秘 13 例,消化性溃疡 15 例,慢性胃炎 14 例,肠息肉 6 例;正常组选择无全身各系统器质性病变,并排除近月内舌、口、鼻、咽等局部病变,舌质淡红、舌苔薄白而润者。根据《中医诊断学》舌诊标准选择舌苔^[6],分为 4 组:(1)正常薄白苔组 12 例,其中男 6 例,女 6 例,平均年龄(43.50±14.13)岁;(2)病理薄苔组 30 例,男 14 例,女 16 例,平均年龄(48.17±13.95)岁;(3)厚苔组 30 例,男 17 例,女 13 例,平均年龄(47.87±12.84)岁;(4)剥苔组 16 例,男 7 例,女 9 例,平均年龄(48.06±19.52)岁。经统计学分析,各组性别、年龄分布差异无显著性。

每个观察对象用经高温高压消毒的丝瓜络用力刮取舌背中部(花剥苔者取无舌苔覆盖部位)舌苔,装于有预冷生理盐水[含 0.1% 二乙基焦碳酸酯(DEPC)]的 10 ml 具塞离心管中,洗涤、涂片后-70℃ 密闭保存备用。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39770890)

* 深圳市中西医结合临床研究所 广东省深圳市福田区笋岗西路 3002 号(518035)

收稿日期:2005-03-10;修回日期:2005-06-30

1.2 主要试剂:抗 Fas 蛋白多克隆抗体为美国 Onco-gene 公司产品,第二抗体 Envision⁺、抗体稀释液购自美国 DAKO 公司,TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒、Fas、TGF- β 3 原位杂交检测试剂盒、抗 TGF- β 3 多克隆抗体为武汉博士德公司产品,DEPC 购自华美生物工程公司,多聚-L-赖氨酸为 Sigma 公司产品,其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.3 方法

1.3.1 TUNEL 法:所有标本涂片用 4%多聚甲醛固定 15 分钟,PBS 洗涤 3 分钟 $\times$ 2 次,ddH₂O 洗涤 3 分钟 $\times$ 2 次;3% H₂O₂ 浸泡 30 分钟,ddH₂O 洗涤 5 分钟 $\times$ 3 次;涂片加标记缓冲液湿润后,加标记液 37℃ 标记 2 小时,TBS 洗涤 5 分钟 $\times$ 3 次;加封闭液封闭 30 分钟;加生物素化抗地高辛抗体,37℃ 孵育 30 分钟,TBS 洗涤 5 分钟 $\times$ 3 次;加 SABC,37℃ 孵育 60 分钟,TBS 洗涤 5 分钟 $\times$ 4 次;DAB 显色。阳性反应为细胞核中有棕黄色颗粒,阴性对照(以标记缓冲液代替标记液)为细胞核中无棕黄色颗粒。

1.3.2 原位杂交方法:所有标本涂片用 4%多聚甲醛固定 15 分钟,ddH₂O 充分洗涤;0.5% H₂O₂/甲醇溶液浸泡 30 分钟,ddH₂O 洗涤 5 分钟 $\times$ 3 次;胃蛋白酶 37℃ 消化 3 分钟,PBS 洗涤 5 分钟 $\times$ 3 次,ddH₂O 洗涤 1 次;40℃ 预杂交 4 小时;40℃ 杂交 17 小时;用 37℃ 水温和的 2 $\times$ SSC 洗涤 5 分钟 $\times$ 2 次,0.5 $\times$ SSC 洗涤 15 分钟 $\times$ 1 次,0.2 $\times$ SSC 洗涤 15 分钟 $\times$ 2 次;再进行地高辛-过氧化物酶显色反应。阳性杂交信号为棕黄色,阴性对照(用预杂交液代替杂交液)为无色。

1.3.3 免疫组化方法:采用 LDP 法。所有标本涂片以冷丙酮固定 15 分钟,ddH₂O 充分洗涤;0.5% H₂O₂/甲醇溶液浸泡 30 分钟,PBS 洗涤 5 分钟 $\times$ 3 次;加 TGF- β 3 多抗后,4℃ 孵育 17 小时,PBS 洗涤 5 分钟 $\times$ 3 次,加 Envision⁺ 37℃ 孵育 40 分钟,PBS 洗涤 5 分钟 $\times$ 3 次;DAB 显色。阳性反应信号为棕黄色,阴性对照(以 PBS 代替一抗)为无色。

1.3.4 图像定量分析和统计学处理:采用 CMIAS 真彩色病理图像分析系统,在光镜下($\times$ 400)每张涂片随机选取 5 个视野,对 TUNEL 法结果以平均每 100 个

细胞中所含凋亡细胞数作为凋亡指数(AI);对原位杂交和免疫组化涂片,测定每张涂片的阳性细胞率(%)和阳性单位(PU 值)。数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。结果中阳性细胞率的比较均先经过平方根反正弦变换($\sin^{-1} \sqrt{p}$)后采用方差分析、 q 检验(Newman-Keuls 法)。PU 值的比较直接进行方差分析、 q 检验。阳性率的比较采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 TUNEL 法结果:表 1 示,正常薄苔、病理薄苔、剥苔、厚苔的脱落细胞中均可检测到凋亡细胞。与正常薄苔比较,剥苔 AI 升高($P < 0.05$),而厚苔 AI 降低($P < 0.05$)。此外,病理薄苔与厚苔、剥苔间 AI 差异有显著性(均 $P < 0.05$),厚苔与剥苔间差异亦有显著性($P < 0.01$)。各组舌苔中以剥苔 AI 最高,其余依次为正常薄苔、病理薄苔、厚苔。

表 1 4 组患者不同厚度舌苔舌上皮细胞 AI 值比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	AI
正常薄苔组	12	2.28 $\pm$ 1.57
病理薄苔组	30	2.27 $\pm$ 1.45
厚苔组	30	1.10 $\pm$ 0.67* Δ
剥苔组	16	3.99 $\pm$ 1.93* Δ ▲

与正常薄苔组比较,* $P < 0.05$;与病理薄苔组比较, $\Delta P < 0.05$;与厚苔组比较,▲ $P < 0.01$

2.2 TGF- β 3 原位杂交和免疫组化检测结果:TGF- β 3 mRNA 和蛋白在舌苔脱落细胞除完全角化细胞外的各层部分都可见阳性着色,但以颗粒层最明显。表 2 示,与正常薄苔比较,厚苔与剥苔 TGF- β 3 阳性细胞率均显著下降,差异有显著性($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。此外,病理薄苔与厚苔之间、厚苔与剥苔之间阳性细胞率差异均有显著性($P < 0.05$),病理薄苔与剥苔间差异亦有显著性($P < 0.01$)。PU 值各组间差异无显著性。

在病理薄苔组或厚苔组内部,不同颜色(黄、白)舌苔间 TGF- β 3 mRNA 和蛋白阳性细胞率、PU 值差异均无显著性。

2.3 Fas 原位杂交和免疫组化检测结果:表 3 示,Fas mRNA 和蛋白都只在部分观察对象舌苔脱落细胞中有微弱阳性表达,并且两个水平的表达情况一致。经

表 2 4 组患者舌苔上皮细胞 TGF- β 3 原位杂交和免疫组化图像分析结果($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	原位杂交		免疫组化	
		阳性细胞率(%)	PU 值	阳性细胞率(%)	PU 值
正常薄苔组	12	13.75 $\pm$ 3.08	9.36 $\pm$ 2.45	13.62 $\pm$ 3.82	9.49 $\pm$ 1.90
病理薄苔组	30	14.73 $\pm$ 3.89	9.03 $\pm$ 2.13	13.45 $\pm$ 4.84	9.31 $\pm$ 1.75
厚苔组	30	9.45 $\pm$ 3.72* Δ	7.92 $\pm$ 2.28	9.83 $\pm$ 2.70* Δ	8.07 $\pm$ 1.83
剥苔组	16	5.27 $\pm$ 2.18* Δ ▲	8.06 $\pm$ 1.42	5.62 $\pm$ 2.64* Δ ▲	8.85 $\pm$ 2.33

与正常薄苔组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与病理薄苔组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta P < 0.01$;与厚苔组比较,▲ $P < 0.05$

表 3 4 组患者不同厚度舌苔舌上皮细胞 Fas 表达水平比较(例)

组别	例数	阳性	阴性
正常薄苔组	12	1 *	11
病理薄苔组	30	4 *	26
厚苔组	30	3 *	27
剥苔组	16	7	9

与剥苔组比较, * $P < 0.05$

χ^2 检验, 剥苔组 Fas 阳性率高于其他各组(均 $P < 0.05$) 。

在病理薄苔组或厚苔组内部, 经四格表资料的精确概率法计算, 不同颜色(黄、白) 舌苔间 Fas mRNA 和蛋白阳性细胞率和 PU 值差异均无显著性。

3 讨论

中医学认为, 舌为脾胃之外候, 舌苔系胃气熏蒸而成, 舌苔的变化与消化系统生理病理关系最为密切。本研究探讨了消化系统常见舌苔形成和变化的基因分子机理。研究表明, 舌黏膜上皮系构成舌苔的主体。细胞凋亡是由基因控制的细胞主动死亡过程, 参与机体许多生理、病理过程, 如胚胎发育、免疫调节、衰老过程、肿瘤发生等^[7]。在正常表皮中, 上皮角质形成细胞通过调节其增殖、分化、凋亡的过程来维持表皮结构的动态平衡^[8]。对于同属于复层扁平上皮的舌黏膜上皮, 本研究用 TUNEL 技术证实了舌上皮细胞在增殖、分化的同时, 有一部分细胞发生了细胞凋亡。舌苔的厚度与舌上皮细胞的增殖、分化及凋亡之间的平衡密切相关。当舌上皮细胞增殖与分化、凋亡处于相对平衡状态时, 舌苔表现为薄苔。而当细胞增殖占优势, 细胞凋亡和分化相对占劣势时, 舌上皮细胞增多, 舌苔即变厚; 反之则出现剥苔。我们临床上常见到的痰湿患者, 其特征性的体征之一即为舌苔厚腻, 根据中医辨证给予化湿药后 1~2 天厚腻苔则开始消退。化湿药物及其他多类中药是如何影响舌苔消长的, 其中是否涉及到凋亡调控机制改变, 都值得进一步研究。

细胞凋亡的调控是多种基因综合作用的结果, 在上皮细胞中 Fas、TGF- $\beta 3$ 等基因均起促进凋亡的作用^[9,10]。本研究首次从 mRNA 和蛋白质两个水平探讨了 Fas、TGF- $\beta 3$ 基因在舌苔上皮细胞凋亡中的变化规律。我们发现, 与正常薄苔比较, 剥苔 Fas 基因过度表达伴随细胞凋亡增多, 而厚苔 TGF- $\beta 3$ 基因低表达伴随细胞凋亡减少。舌苔上皮细胞中促调基因 Fas、TGF- $\beta 3$ 表达水平变化趋势与细胞凋亡水平变化趋势一致。结果提示, 凋亡相关基因 Fas、TGF- $\beta 3$ 表达水平的变化可能是影响舌苔上皮细胞凋亡并导致舌苔厚度变化的重要原因。深入研究凋亡相关基因在常见舌苔舌上皮细胞中的表达规律, 对阐明舌苔形成的基因水平的物质基础和机理具有重要意义。

非消化系疾病与消化系统疾病之间、以及消化系疾病病种之间舌苔细胞凋亡特点及其相关基因表达差异与变化规律均值得进一步深入研究。

参考文献

- 1 吴正治, 郭振球, 李新华, 等. 舌苔原理的综合实验研究. 中国中医药科技, 1996, 3(4) : 5~8.
- 2 吴正治, 郭振球, 谢锦玉. 胃脘痛属脾虚者舌苔上皮的细胞化学研究. 中医杂志, 1992, 33(2) : 41~42.
- 3 吴正治. 舌苔原理研究. 广州: 中山大学出版社, 1998: 9~10.
- 4 吴正治, 周小青, 郭振球, 等. 虚寒薄白苔的细胞化学初步研究. 中国中西医结合杂志, 1993, 13(11) : 649~651.
- 5 Gandarillas A. Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways? Exp Gerontol, 2000, 35(1) : 53~62.
- 6 朱文锋主编. 中医诊断学. 上海: 上海科学技术出版社, 1998: 42.
- 7 Gastman BR, Futrell JW, Manders EK. Apoptosis and plastic surgery. Plast Reconstr Surg, 2003, 111(4) : 1481~1496.
- 8 Takahashi H, Aoki N, Nakamura S, et al. Cornified cell envelope formation is distinct from apoptosis in epidermal keratinocytes. J Dermatol Sci, 2000, 23(3) : 161~169.
- 9 Teraki Y, Shiohara T. Apoptosis and the skin. Eur J Dermatol, 1999, 9(5) : 413~425.
- 10 Rosfjord EC, Dickson RB. Growth factors, apoptosis and survival of mammary epithelial cells. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1999, 4(2) : 229~237.

中国中医研究院培训中心 2006 年上半年招生通知

1. 针灸名家临床随诊提高班: 3 月 6~16 日, 6 月 12~22 日, 1780 元, 20 学分。言传身教并重, 见习 5~10 人 1 组, 名家辨证取穴、配伍、手法及专科专病经验。2. 名中医临证经验汇讲: 3 月 20~27 日, 6 月 22~29 日 1280 元。经方派、时方派、温病学派、辨证辨病结合派等辨证、组方用药、疑难杂症治验, 专病专方。3. 颈肩腰腿痛特效疗法班: 4 月 10 日~17 日, 7 月 10~17 日, 1280 元。颈椎病、腰椎间盘突出、腰椎管狭窄、骨性关节炎、梨状肌综合征、肩周炎、跟痛症等。针刀、长圆针、手法、骶管疗法。见习 5~10 人一组。4. 男科疾病最新进展高级班: 4 月 18~24 日, 1180 元。传染病、前列腺疾病、男性不育、男性功能障碍(阳痿、早泄、性交焦虑恐惧、阳强、遗精) 等诊治, 见习 3~5 人一组。5. 针灸、中医药美容减肥综合疗法班: 3 月 27~4 月 7 日, 6 月 29~7 月 9 日, 1820 元。中药针灸推拿埋线减肥、火针、舌诊、甲诊、食疗等技术。6. 中医传统制药技术培训班: 5 月 15~24 日, 1650 元。丸散膏丹等传统制药炮制技术, 结合操作。7. 风湿病(痹证) 诊疗经验高级进修班: 5 月 24~31 日, 1280 元。风湿性、类风湿性关节炎、痛风等中西医结合和名老中医经验。

见习请自带白大衣。联系电话: 010-64062096, 64028399, 网址: www.medboo/tccatcm