

• 证的研究 •

胃癌晚期患者原肌球蛋白与中医证型的相关性

任华萍¹ 余 胜² 程旭锋³

(1. 复旦大学附属金山医院, 上海市金山区金一东路 391 号, 200540; 2. 北京中医药大学; 3. 河南中医学院第一附属医院)

[摘 要] **目的** 探讨原肌球蛋白(TM)表达与胃癌晚期不同证型的相关性。 **方法** 经胃部组织活检确诊的胃癌晚期患者 41 例(脾胃虚寒型 23 例,胃热伤阴型 18 例)和浅表性胃炎患者(对照组) 15 例,均应用免疫组织化学和酶链免疫反应测量脾胃虚寒型、胃热伤阴型胃癌患者及对照组患者活检组织的 TM 4 个基因(TM1、TM2、TM3、TM4)的表达及其含量。 **结果** 脾胃虚寒型胃癌患者 TM1 的表达明显高于胃热伤阴型, TM2 的表达明显低于胃热伤阴型($P<0.01$), 两型患者 TM3、TM4 的表达无明显差异($P>0.05$)。 **结论** 不同证型胃癌患者 TM 的表达存在差异, TM1、TM2 与胃癌证型有一定的相关性。

[关键词] 原肌球蛋白; 胃癌; 中医证型; 相关性

Research on the Relationship between Tropomyosin and TCM Syndromes of Terminal Gastric Cancer

REN Huaping¹, YU Sheng², CHENG Xufeng³

(1. Jinshan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200540; 2. Beijing University of Chinese Medicine; 3. The First Affiliated Hospital of Henna University of Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To study the expression of tropomyosin (TM) in different TCM syndromes of terminal gastric cancer to explore the relationship between TM and the TCM syndromes. **Methods** The 41 cases of terminal gastric cancer with spleen and stomach deficiency-cold syndrome and stomach heat damaging yin syndrome and the 15 cases of chronic superficial gastritis (control group) were selected. The expression and quantity of TM gene(TM1、TM2、TM3、TM4) were tested by immunohistochemistry and ELISA respectively. **Results** The expression of TM1 in the spleen and stomach deficiency-cold syndrome was higher significantly than that in the stomach heat damaging yin syndrome, and the expression of TM2 was lower significantly than that in the stomach heat damaging yin syndrome, and there was no significantly difference in the expression of TM3 and TM4 between the two syndromes ($P>0.05$). **Conclusion** The expression of TM in different TCM syndromes of gastric carcinoma was different. There exists a certain relation in the expression of TM1 and TM2 in different TCM syndromes of gastric cancer.

Key Words Tropomyosin; Gastric cancer; TCM syndromes; Relationship

胃癌是我国最常见的消化道肿瘤,其死亡率居恶性肿瘤首位。肿瘤转移是导致肿瘤患者死亡的主要原因之一,应用蛋白质组学技术研究肿瘤转移是当今肿瘤研究的热点,可为抗肿瘤转移药物提供作用靶点。近年来,许多学者对原肌球蛋白(tropomyosin, TM)与各种肿瘤的关系进行了研究,认为 TM 有可能成为一种新的肿瘤标记物,其表达水平有助于肿瘤的早期诊断、进展和预后的评估。目前,有关 TM 与胃癌证型的研究还很少,我们通过观察 TM 4 个基因(TM1、TM2、TM3、TM4)在不同证型胃癌晚期患者的表达,以探讨其与胃癌中医证型之间的相关性。

1 资料与方法

1.1 观察对象

41 例来自北京中医药大学东直门医院消化内科 2007 年 1~10 月经胃部组织活检确诊的胃癌晚期患

者,其中男 29 例,女 12 例;年龄 41~68 岁,平均 60.5 岁。对照组 15 例为同期经胃镜及病理检查确诊为浅表性胃炎患者,两组年龄、性别有可比性。辨证方法参照 1978 年全国第一届胃癌学术会议北京市胃癌协作组制定的分型方法,采用主次症计分法,具备主症 2 项,舌、脉象基本符合,或者主症 1 项,次症 2 项,舌脉象基本符合即可。我们主要选取脾胃虚寒型和胃热伤阴型患者进行研究,其中脾胃虚寒型 23 例,胃热伤阴型 18 例。脾胃虚寒型:主症为胃脘隐痛,胃痛喜按喜温,食后胀闷痞满,纳呆少食,便清腹泻;次症为朝食暮吐,暮食朝吐,面色苍白,肢冷神疲,便溏浮肿,舌淡而胖,苔白滑润,脉沉缓;胃热伤阴型:主症为胃脘灼热,食后疼痛,口干欲饮,大便干燥;次症为胃脘嘈杂,五心烦热,食欲不振,舌红少苔,或苔黄少津,脉弦细数。

1.2 试剂

多聚甲醛:购自北京欣经科生物技术有限公司; TM1、TM2、TM3、TM4 免疫组化一抗为鼠抗人单克

表 1 各组患者 TM 蛋白阳性表达率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TM ¹	TM ²	TM ³	TM ⁴
脾胃虚寒型	23	80.67 $\pm$ 3.06 $\triangle\triangle$ *	58.23 $\pm$ 2.68 $\triangle$ *	55.78 $\pm$ 3.12	46.18 $\pm$ 2.98
胃热伤阴型	18	64.78 $\pm$ 3.43*	71.79 $\pm$ 3.00*	56.05 $\pm$ 3.22*	47.19 $\pm$ 3.31*
对照组	15	10.45 $\pm$ 3.68	6.54 $\pm$ 2.08	6.79 $\pm$ 1.80	8.90 $\pm$ 1.58

注:与对照组比较,* $P<0.01$;与胃热伤阴型比较, $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$

表 2 各组患者 TM 蛋白在胃癌组织中含量比较($\mu\text{g/ml}$, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TM ¹	TM ²	TM ³	TM ⁴
脾胃虚寒型	23	141.82 $\pm$ 4.84 $\triangle\triangle$ *	106.13 $\pm$ 4.22 $\triangle$ *	96.56 $\pm$ 3.40	89.03 $\pm$ 5.23
胃热伤阴型	18	123.10 $\pm$ 4.11*	120.85 $\pm$ 4.35*	94.62 $\pm$ 4.85*	89.43 $\pm$ 4.33*
对照组	15	19.53 $\pm$ 2.36	10.99 $\pm$ 1.13	8.12 $\pm$ 1.31	10.28 $\pm$ 1.68

注:与对照组比较,* $P<0.01$;与胃热伤阴型比较, $\triangle P<0.05$, $\triangle\triangle P<0.01$

隆抗体,二抗为 SP 免疫组化染色试剂盒,DAB 显色剂;均购自北京中杉金桥生物工程有限公司;TM¹、TM²、TM³、TM⁴ ELISA 试剂盒:购自晶美生物工程有限公司。

1.3 实验方法

活检组织标本一部分用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,4 μm 厚切片,贴于涂有 0.05% 多聚赖氨酸的载玻片,PBS 洗 3 分钟共 3 次,0.3% 的 H₂O₂-甲醇孵育 30 分钟,0.01M 枸橼酸钠溶液微波抗原修复 8 分钟,PBS 洗 3 分钟共 3 次,封闭液封闭 30 分钟,加入一抗,各种抗体稀释度均为 1:200,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,第二天 PBS 洗 3 分钟共 3 次,加入二抗,反应 30 分钟,PBS 洗 3 分钟共 3 次,DAB 显色 5 分钟,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,在图像分析软件下测量阳性表达率。另一部分组织块被切割,加入一定量 PBS,用匀浆器将组织块匀浆充分,2500r/min 离心 20 分钟,收集上清液,按照 ELISA 试剂盒说明书上的步骤进行检测。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 11.5 进行统计分析,计量数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验。

2 结果

2.1 不同证型胃癌患者 TM 的阳性表达率

表 1 示,胃癌患者 TM¹、TM²、TM³、TM⁴ 的阳性表达率均显著高于对照组($P<0.01$)。脾胃虚寒型胃癌细胞的 TM¹ 表达率明显高于胃热伤阴型($P<0.01$),胃热伤阴型胃癌的 TM² 表达率明显高于脾胃虚寒型($P<0.05$),两型患者 TM³ 和 TM⁴ 阳性表达率差异无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 不同证型胃癌患者 TM 含量比较

表 2 示,胃癌患者 TM¹、TM²、TM³、TM⁴ 的含量均显著高于对照组($P<0.01$)。胃热伤阴型胃癌的 TM² 的含量高于脾胃虚寒型胃癌患者($P<0.05$),胃热伤阴型胃癌的 TM¹ 的含量低于脾胃虚寒型胃癌患者($P<0.01$),两型患者 TM³、TM⁴ 的含量差异无统计

学意义($P>0.05$)。

3 讨论

肿瘤转移过程是多因素综合作用的结果,TM 是肌肉收缩过程中重要的调节蛋白质,广泛分布于各种真核细胞中。目前,哺乳动物中的 4 个 TM 基因已被确认,分别为 TM¹、TM²、TM³、TM⁴[1]。其中,研究较多的是 TM²,Bottinelli R 等[2]认为其大量存在于骨骼肌、平滑肌和成纤维细胞中,参与肌肉收缩及细胞运动等功能;TM³ 和 TM⁴ 的研究相对较少,其作用机制尚不清楚。Hughes JA 等[3]报道,TM 可能参与星型胶质细胞的分裂,在星型胶质细胞瘤中发现有大量的 TM 表达。Jiang DF[4]等应用蛋白质组学技术比较了肺癌高转移和低转移倾向细胞,发现 TM 在高转移肺癌细胞中表达上调。

中医学认为,胃癌是在脾胃阴阳气血失调,正气虚弱的基础上,外邪入侵,痰、湿、气、瘀、毒等搏结日久,积渐而成,胃癌晚期更是邪毒耗损,正气虚衰。“有诸内者形诸外”,特定疾病的不同中医证型必定存在着其内在的不同病理生理变化及其不同基因表达的差异,探明这些差异是探讨中医证内涵的关键。在胃癌中医证型与西医疾病关系的研究中已发现,其中不仅涉及组织病理、免疫生化、血液流变学等多个方面,这些组织病变和功能改变均与中医辨证分型存在一定关系而且与某些基因病变关系密切。如陈文等[5]发现胃癌虚证 CD44v6 低表达,胃癌实证 CD44v6 高表达;黎才海等[6]发现胃癌虚证组患者 CD4、CD8T 细胞亚群、CD4/CD8 比值明显低于实证组。

胃癌晚期患者常见有阴虚和阳虚两种不同的病机特征,阴虚常表现为胃热伤阴,阳虚则表现为脾胃虚寒。本研究结果显示,胃癌晚期患者 TM¹、TM²、TM³、TM⁴ 的表达均显著高于对照组($P<0.01$),脾胃虚寒型胃癌细胞的 TM¹ 表达明显高于胃热伤阴型($P<0.01$),胃热伤阴型胃癌的 TM² 表达明显高于脾胃虚寒型($P<0.05$)。说明 4 种 TM 均是肿瘤转移相关基因调控的蛋白,在胃癌的转移中均发挥着重要的作用;

TM1、TM2 与胃癌证型有一定的相关性。在脾胃虚寒型胃癌患者的组织中, TM1 可能在细胞发生转移的过程中起着主要的作用; 在胃热伤阴型患者的胃癌组织中, TM2 在细胞向其他细胞的浸润转移中可能起主要作用。因此, 通过研究胃癌不同证型与 TM 的关系, 不仅为各证型胃癌转移机制的研究提供了分子生物学依据, 而且为胃癌证候本质的研究开拓思路。

参考文献

[1]张轶, 刘文韬, 李强, 等. 肿瘤转移相关基因原肌球蛋白[J]. 中华肿瘤杂志, 2007, 29(9) : 644-648.

[2]Bottinelli R, Coviello DA, Redwood CS, et al. A mutant tropomypsin that causes hypertrophic cardiomyopathy is expressed in vivo and associated with an increased calcium sensitivity[J]. Circ Res, 1998, 82(1) : 106-115.

[3]Hughes JA, Cooke-Yarborough CM, Chadwick NC, et al.

High-molecular-weight tropomyosins localize to the contractile rings of dividing CNS cells but are absent from malignant pediatric and adult CNS tumors[J]. Glia, 2003, 42(1) : 25-35.

[4]Jiang DF, Ying WT, Lu YL, et al. Identification of metastasis-associated proteins by proteomic analysis and functional exploration of interleukin-18 in metastasis[J]. Proteomics, 2003, 3(5) : 724-737.

[5]陈文, 欧阳学农, 林求诚. 胃癌不同中医证型的细胞粘附分子表达[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2007, 13(3) : 207-210.

[6]黎才海, 魏辉. 胃癌中医证型与细胞免疫功能关系初探[J]. 江苏中医药, 2006, 27(7) : 21-23.

(收稿日期: 2007-12-27; 修回日期: 2008-01-27)

[编辑: 行 之]

桂枝茯苓丸在心房颤动抗凝治疗中的应用

毛秉豫¹ 毛绍芬²

(1. 南阳理工学院医学院, 河南省南阳市长江路 80 号, 473004; 2. 南阳市中心医院心内科)

心房颤动并发血栓栓塞事件在临床较常发生, 抗凝治疗对此类心房颤动患者血栓形成有预防和治疗作用。目前首选用药是香豆素类的华法林。然而因其使用剂量的不确定性, 使治疗窗口狭窄, 并有较高出血风险。张仲景《金匮要略方论》中的桂枝茯苓丸是常用的活血化瘀药物, 我们将其与华法林合用, 观察用药后的抗凝疗效及安全性, 现报道如下。

1 临床资料

收集 2004 年 1 月~2006 年 6 月诊断为非瓣膜性房颤住院及门诊患者共 81 例, 男 51 例, 女 30 例, 年龄 33~74 岁, 平均(51. 36 ± 7. 5) 岁; 平均随访(1. 30 ± 0. 62) 年。病因包括冠心病、高血压病、肺心病、甲状腺功能亢进、心肌病等。既往无出血倾向, 无凝血障碍, 无消化道溃疡, 6 个月内无颅内出血、无严重高血压未控制情况、无慢性肝肾功能不全、恶性肿瘤等病史。入选患者不能应用或停用其他抗栓、抗凝药物及非甾体类抗炎药。患者心脏病理原有治疗用药不变。按数字表法将患者随机分为观察组 41 例, 对照组 40 例, 两组临床资料比较, 差异无统计学意义($P > 0. 05$)。

2 治疗方法

观察组使用桂枝茯苓丸, 每粒 6g(陕西华西制药股份有限公司生产, 每次服用 1 粒, 每日 2 次。对照组仅服用华法林); 华法林片, 每片 2. 5mg(上海信谊九福药业有限公司生产)。华法林使用方法: 两组患者用药前均先测定国际标准化比值(INR)。观察组初始剂量为每日 1. 25mg, 对照组初始剂量为每日 2. 5mg。服药以后均根据 INR 调整华法林用量, 每次以 0. 5mg 为最小调整单位, 每周检测一次 INR, 若连续两次 INR 稳定在 2. 0~3. 0 的目标值内, 则维持给药不再调整。此后无特殊情况每间隔 1~3 个月复测一次 INR。

3 治疗结果

3. 1 两组抗凝治疗后各项实验室指标比较

观察组、对照组 INR 首次达标时间分别为(8. 30 ± 3. 68 天)、(7. 78 ± 4. 55) 天; 稳定值时间分别为(1. 95 ± 0. 45) 天、(2. 34 ± 0. 51) 天; 获 INR 稳定值时间分别为(13. 52 ± 4. 37) 天、(12. 73 ± 3. 91) 天。3 项指标比较观察组低于对照组, 但差异无统计学意义($P > 0. 05$)。

3. 2 两组治疗后血栓和出血发生率的比较

观察组和对照组的血栓发生率分别为 7. 59% 与 7. 31%, 差异无统计学意义($P > 0. 05$); 观察组和对照组的出血发生率分别为 2. 5% 与 8. 76%, 两组比较差异有统计学意义($P < 0. 05$), 观察组以皮肤黏膜散在瘀斑, 牙龈及结膜出血为多, 对照组则有严重消化道出血发生。

4 讨论

心房颤动抗凝治疗的目的是既有效降低栓塞发生又避免引起严重出血并发症。华法林虽然是首选药, 但该药致出血发生率随用量、抗凝强度的增加明显增高, 而使用过小剂量往往达不到有效抗凝目标而增加血栓栓塞发生。为获得有效、安全的治疗, 我们在临床中把具有活血化瘀、散结消癥的桂枝茯苓丸用于这类患者, 并配合小剂量华法林, 使保持抗凝抗栓疗效又减少出血发生。应用结果显示, 观察组虽减少了华法林的剂量, 平均为(1. 87 ± 0. 85) mg, 明显低于未使用桂枝茯苓丸的对照组的(3. 75 ± 0. 64) mg 的平均剂量, 但两组 INR 首次达标时间、获 INR 稳定时间等没有明显差别, 血栓发生率亦大致相当。这些表明两种治疗的抗凝作用基本相同, 但前者的出血风险则显著低于后者。提示桂枝茯苓丸与小剂量华法林合用在房颤的抗凝治疗中具有实用价值。