

· 综 述 ·

# 舌苔生物信息研究方法与技术概况

赵 洁 李福凤\* 钱 鹏

(上海中医药大学基础医学院, 上海市浦东新区张江高科技园区蔡伦路 1200 号, 201203)

基金项目: 国家自然科学基金项目(30600796); 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金(szy08001)

\* 通讯作者: fufeng-lee@hotmail.com, (021) 51322447

**[摘 要]** 从细胞的形态学, 细胞生化成分, 微生态学研究, 免疫学研究, 基因表达与细胞凋亡, 蛋白组学及代谢组学等方面就舌苔细胞研究方法的进展进行了综述。

**[关键词]** 舌苔; 细胞; 中医; 客观化; 生物信息

舌诊是中医望诊的重要内容, 中医认为, 舌苔乃胃气所生, 病苔由胃气夹邪上蒸而成。《形色简摩·舌质舌苔辨》曰: “苔乃胃气之所熏蒸, 五脏皆禀气于胃, 故可借以诊五脏之寒热虚实也。”通过观察舌质、舌苔的变化可以了解机体生理功能和病理变化, 近年来, 利用现代科学技术手段对舌苔形成进行了广泛的研究, 取得了一定的成果。现就舌苔生物信息研究所采用的现代生物学技术方法概述如下。

## 1 舌苔形态学方法研究

正常舌苔形成的主要基础是舌上皮细胞的正常分裂增殖、分化迁移和角化脱落, 其组成成分主要是丝状乳头分化的角化树与填充其间的脱落上皮细胞、唾液、细菌、食物碎屑、渗出的白细胞等组成。观察舌苔形态学变化主要采用印片法和刮取法, 嘱患者晨起勿服用任何药物, 检测前以生理盐水漱口, 用干净玻片或小钥匙在被检者舌中部刮取适量舌苔, 用 95% 乙醇固定后, 采用巴氏染色。巴氏染色主要观察上皮细胞的角化程度包括角化前细胞, 角化细胞, 以及完全角化细胞及计算细胞的成熟指数及成熟价值。计算出每片表层、中层、底层细胞数, 细胞分类标准采用国际细胞学会议分类法, 以胞浆厚薄和核固缩情况进行区分并计算其成熟指数(MI)和成熟价值(MV)。MI: 计算表、中、底层细胞的百分比, 记为底/中/表, 表达了各层细胞构成和成熟情况。MV: 将 MI 数值中底层  $\times 0$  + 中层  $\times 0.5$  + 表层  $\times 1$ , 表达了上皮细胞成熟的趋势<sup>[1-5]</sup>。

舌印片法是对舌苔微观研究最直接的方法, 具有取材简单, 成本低廉, 直观易懂的优点, 疾病的变化可以反映在细胞形态的变化。其角化程度的不同

与中医证候辨证分型密切相关, 如李灿东等<sup>[1]</sup>通过对不孕症患者舌苔脱落细胞的观察能够反映机体性激素周期性变化, 作为不孕症中医诊断的客观依据之一; 梁岩等<sup>[3]</sup>观察慢性胃炎湿证患者舌苔脱落细胞为中医辨证提供了更为可靠的客观依据; 王学岭等<sup>[2]</sup>对重度烧伤患者舌诊的观察可以反映出重度烧伤不同时期如体液渗出期、感染期、恢复期的规律, 为疾病的进程做出客观诊断。

## 2 舌苔细胞生化方法研究

对于舌苔细胞生化成分的研究, 目前集中于舌苔细胞内几种大分子物质包括琥珀酸脱氢酶(SDH)、乳酸脱氢酶(LDH)、G-6-PDH、酸性磷酸酶(ACP)、ANAE、-SH、RNA、PAS 的检测研究。细胞生化成分变化在舌苔形成原理中有重要意义, 可望成为察舌辨证新的客观、微观化指标, 值得进一步结合临床病证进行深入研究。细胞酶活性的检测采用一般组织化学法, 应用一些化学试剂与组织细胞内的生物大分子或有机小分子等物质发生化学反应, 形成有色的反应沉淀物, 在显微镜下观察沉淀物的颜色、深浅或电子密度, 对组织活细胞内的化学成分及酶活性等进行定性、定位、定量研究。也可采用分光光度技术, 对反应物进行酶活性的检测。

李福凤等<sup>[6-7]</sup>采集慢性肾功能衰竭患者舌苔将其制成细胞悬液涂片, 进行去底物显色, 用 MPIAS-500 多媒体图像分析仪测量舌苔上皮细胞中 SDH、G-6-PDH、PAS 的平均灰度, 随机检测视野中 10 个大小、形状基本相似的舌苔脱落上皮细胞, 最后算出每例单个细胞该物质的平均含量, 以灰度值来判断酶含量的高低。王大江等<sup>[8]</sup>用酶染色方法研究急性

心肌梗死厚苔及薄苔患者细胞中SDH、ACP、LDH的酶活性,包括取材,生化标本制作,进行玻片酶染色。同时利用细胞HE染色计数细胞,光镜下随即计数100个细胞观察染色深浅以达到细胞定量研究,结果显示,厚苔组SDH、LDH活性强于薄苔组。陈宇等<sup>[9]</sup>将舌苔样本制成细胞悬液,进行超声细胞破碎,根据LDH、ACP、SDH、-SH测定慢性胃炎患者舌苔脱落细胞酶含量。结果显示,LDH、SDH、ACP含量与正常组比较差异均有统计学意义,舌苔脱落细胞理化指标可作为慢性胃炎中医辨证客观参考指标。

### 3 舌苔微生物学方法研究

微生物学是生态学从细胞水平和分子水平研究正常微生物群之间及其与宿主相互关系的生命科学,是研究微观生态平衡、生态失调和生态调整的一门新兴学科。医学微生物学研究表明,在人的胃肠微生态系统中存在许多生理性细菌,其在代谢过程中可产生许多酶类和维生素,不仅参与机体的消化吸收,还构成胃肠道的生物屏障。中医认为,舌为脾之外候,舌苔是胃气、胃阴上蒸于舌面而生成,当胃肠道的微生态有所变化时,就会反映到舌象上。

肖正华等<sup>[10]</sup>研究证实,胃炎患者黄苔所含细菌的种类和数量及炎性细胞和上皮细胞均较白苔多,认为微生物分泌物可以导致舌苔染色。对脱落细胞进行菌落培养是初步确定菌种的基本方法,适当用力刮取足够的舌苔,用无菌棉拭子将其接种于血琼脂平板上,37℃培养24h,挑取不同的菌落,进行革兰染色后,直接镜检。吕军影等<sup>[11]</sup>对湿热证患者舌苔进行研究发现,湿热证黄腻苔细菌总数明显多于正常薄白苔,两者的革兰阳性小球菌和微球菌差异有统计学意义,湿热证黄腻苔中革兰阳性小球菌和微球菌的量较多。湿热证黄腻苔组发现,真菌的例数和真菌种类明显多于对照组。而对于不能确定的成分,多聚酶链反应-变性梯度凝胶电泳分析技术(PCR-DGGE)可以直接利用DNA及RNA对微生物组成的遗传特性进行检测,可以鉴定出无法利用传统方法分离出来的菌种<sup>[12]</sup>,并可进一步对新菌种进行DNA技术鉴定,发现未知品种,从而使舌苔微生态研究进一步深入。

### 4 舌苔免疫学方法研究

免疫学技术分为细胞免疫检测法和体液免疫检测法,细胞免疫学是研究各类免疫细胞的发生、分化和介质的功能以及各类免疫细胞的相互作用。目前

多集中于免疫细胞与舌苔变化关系的研究,不仅具有发病学的理论意义,同时也具有重要的临床意义。李新华等<sup>[13]</sup>研究了6种舌苔患者的红细胞采用红细胞C3b受体花环试验(RCR)、免疫复合物花环试验(RICR)和用Muller改良法检测外周血淋巴细胞酸性 $\sim\alpha$ -醋酸萘酯酶(L-ANAE)活性。陈文强等<sup>[14]</sup>采用流式细胞仪观察传染性非典型肺炎(SARS)患者T细胞亚群CD3<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>变化,同时观察患者舌苔变化。结果表明,SARS患者所表现的薄苔、白苔或腐腻苔与体内细胞免疫功能低于正常有关。周凡等<sup>[15]</sup>对舌苔细胞利用免疫化学方法进行抗原抗体反应,显示CDK4和CDK6在脾胃湿热证舌苔脱落细胞保持高表达,可能与中医证型有关。李福凤等<sup>[16]</sup>采用流式细胞术及相关受体试剂盒检测了1562例剥苔与非剥苔儿童血液中T、B淋巴细胞亚群、细胞趋化因子受体3(CCR3)、细胞趋化因子受体-5(CCR5)表达量,为花剥苔形成的免疫学机制提供了客观依据。

在舌苔免疫学研究过程中流式细胞术具有其独特的优势,它运用荧光化学、免疫荧光技术对细胞或亚细胞结构进行快速测量和分选,可同时测量细胞大小、DNA、RNA含量细胞表面的抗原表达、癌基因蛋白、PH、Ca<sup>2+</sup>浓度等。具有测量速度快、进行多参数测量、快速完成细胞的分析和分选等优点。

### 5 舌苔分子生物学方法研究

分子生物学技术发展比较迅速,其实验条件便于控制,实验稳定,重复性好,实验周期短,仪器、试剂发展快,手段丰富如酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫组化和蛋白质印迹等为中医舌诊客观化发展提供了很好的契机<sup>[17]</sup>。目前对于舌苔研究最常用的是从细胞凋亡方面出发。吴正治等<sup>[18-21]</sup>采用TUNEL技术研究凋亡相关基因bax、fas、TGF- $\beta$ ,原位核酸分子杂交鉴定其mRNA、免疫组化技术分析表达蛋白成分和蛋白图像,对舌苔形成机理进行了研究。佟书娟等<sup>[22]</sup>对病理舌苔进行RNA样品反转录,荧光定量PCR反应,在Fas基因实时荧光定量PCR反应标准曲线上可见Fas在黄厚苔中表达最高,胎儿舌苔表达最低。吕军影等<sup>[23]</sup>仍采用苏木素染色法对类风湿性关节炎患者舌苔上皮细胞阳性凋亡指数的观察得到湿热郁型患者ESR与舌苔变化一致的结论。詹臻等<sup>[24]</sup>对舌癌切除术患者的舌背黏膜运用基因芯片和实时荧光定量RT-PCR技术检测E-cadmRNA在不同舌苔中的表达水平,提取总RNA,

用于检测。

## 6 蛋白质组学技术和方法研究

蛋白质组学是研究细胞内全部蛋白质的组成及其规律的学科,不同于传统的蛋白质学科之处在于它的研究是在生物体或其细胞的整体蛋白水平上进行的,它是从一个机体或一个细胞的蛋白质整体活动的角度来解释和阐明生命活动的基本规律。因此,蛋白质组学是基于整体、动态、联系的观点认识生命本质的科学。生命科学的研究进入了后基因组时代,基因功能的研究越来越重要,分析基因功能的最直接的方法是现代蛋白质组研究。目前应用于蛋白质组学的研究技术主要有:二维聚丙烯酰胺凝胶电泳、激光捕获切割术(LCM)、新型质谱技术、荧光双向差异电泳及数据库设置与检索系统等。LCM-二维电泳-质谱的技术路线。整个研究过程包括:样品处理、蛋白质分离、蛋白丰度、蛋白质鉴定等步骤。

张晓丽等<sup>[25]</sup>对舌苔的蛋白组学技术进行了优化,对以固相 pH 梯度等电聚焦为第一向、垂直 SIYS-PAGE 为第二向的双向电泳技术中的关键因素与环节进行研究和实验条件进行改善。王忆勤等<sup>[26]</sup>对慢性胃炎湿证患者血清蛋白组学进行了分析,采用表面增强激光解吸离子化蛋白质芯片分析仪对 18 例慢性胃炎湿证、17 例非湿证患者及 8 例正常人血清蛋白质表达谱进行研究,探讨了慢性胃炎湿证的微观信息。

舌苔的蛋白质组学研究可以为中医临床辨证、中医疗效评价、中药药效学研究及中药新药筛选研究提供具有中医特色的微观指标和科学依据。

## 7 代谢组学技术和方法研究

代谢组学是继基因组学、蛋白组学之后基于对这两门学科的补充而新近发展起来的一门学科,是系统生物学的重要组成部分。代谢物整体水平的检测所依赖的方法是分析化学中的各种谱学技术,如核磁共振波谱、质谱、高效液相色谱、红外光谱、紫外可见光谱及各种原子光谱。主要技术手段是核磁共振、液-质联用,气-质联用,色谱等。此外,分析化学在代谢组学中发挥着不可取代的作用。

代谢组学是一门新兴的学科,中医中药已经涉足该领域。徐舒等<sup>[27]</sup>从病因学、行为学和病理表现上用慢性束缚的方法成功构建了肝郁证大鼠模型。代谢组学得出肝郁证模型与对照组大鼠血清代谢组分存在明显差异,这些差异小分子物质构成“肝郁证”的代谢标志物群,成为肝郁证代谢水平的物质基

础,有助于阐释肝郁证的本质。王广基等<sup>[28]</sup>采用基于 GC~TOF/MS 测定技术的代谢组学研究手段对痰阻心脉和气阴两虚型冠心病患者血浆中小分子化合物进行全面检测,利用多变量数据分析和方差分析等统计方法研究血浆内源性化合物在各组间差异。结果显示,代谢组学分析不但可把痰阻心脉型和气阴两虚型冠心病患者区别分开,且可以与健康组明显区分。

## 8 小结

随着现代生物科学技术的发展,目前舌苔细胞学的研究主要集中体现在对于细胞形态、细胞生化和细胞凋亡及基因表达这几方面,目的是为了探讨舌苔形成的相关机制及其与临床诊断、治疗等的内在联系,从而体现舌苔细胞学检查的充分性与重要性,对疾病的预防、早期诊断、疗效判断、预后评估等具有重要应用价值。随着研究的深入,研究方法趋于多样化,手段更先进,舌苔细胞学的研究将在更微观、更本质上进行下去。在蛋白质组学、代谢组学、舌苔微生态指纹图谱等方面研究技术的发展和它们之间的关联研究将会给舌苔脱落细胞学研究提供更加广阔的空间,使舌苔诊断达到真正客观化,为走进临床应用奠定坚实的理论基础。

## 参考文献

- [1]李灿东,高碧珍,兰启防,等. 不孕症患者证与舌象及舌印片的对照观察[J]. 中国医药学报, 2004, 19(12): 739-741.
- [2]王学岭,刘群,曲年震,等. 重度烧伤患者微观舌诊的研究[J]. 天津中医药, 2008, 25(3): 186-188.
- [3]梁岩,冯奇刚,李志明. 慢性胃炎湿证患者舌苔脱落细胞的检测分析[J]. 宁夏医学杂志, 2007, 29(9): 795-796.
- [4]邓伟哲,岳小强,刘庆,等. 原发性肝癌患者和健康人“正常舌象”的对比研究[J]. 中西医结合学报, 2006, 4(1): 13-16.
- [5]马树恒,张远炎,谭德银,等. 气虚证舌苔脱落细胞学研究[J]. 成都中医药大学学报, 2000, 23(1): 9-10.
- [6]李福凤,王忆勤,李果刚,等. 慢性肾衰舌脉象与肾功能的相关性分析[J]. 中医医学刊, 2003, 21(12): 2042-2050.
- [7]郭丽,李福凤,等. 102 例慢性胃炎患者舌象定量分析[J]. 上海中医药大学学报, 2003, 17(3): 32-34.
- [8]王大江,梁嵘,王召平,等. 急性心肌梗死患者舌苔变化的细胞化学研究[J]. 中医药学报, 2005, 33(1): 18-21.
- [9]陈宇,任健,刘家义. 120 例慢性胃炎患者舌苔脱落细胞理化指标与中医辨证相关性研究[J]. 长春中医药大学学报, 2008, 24(3): 273-274.
- [10]肖正华,林长喜,陈激扬,等. 胃病患者不同舌苔的细菌

学及炎性细胞对比[J]. 中国中西医结合消化杂志, 2005, 13( 6) : 395-396.

[11]吕军影, 黄李平, 阙铁生, 等. 湿热证患者舌苔微生态的研究[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35( 4) : 487-488.

[12]杨玲, 俞妹娟, 杨卫景. PCR-DGGE 技术及其在微生态研究中的应用[J]. 浙江畜牧兽医, 2009, ( 4) : 8-10.

[13]李新华, 吴正治, 周小青, 等. 六种舌苔患者红细胞免疫功能及淋巴细胞ANAE 活性观察[J]. 湖南中医药导报, 2000, 6( 1) : 35-37.

[14]陈文强, 李宗信. SARS 患者舌苔与 T 细胞亚群的相关分析[J]. 中国中医药信息杂志, 2004, 11( 6) : 514-515.

[15]周凡, 葛振华, 等. 慢性浅表性胃炎脾胃湿热证患者舌苔脱落细胞CDK4 和CDK6 的表达及意义[J]. 福建中医学院学报, 2004, 14( 4) : 6-7.

[16]李福凤, 庄燕鸿, 王忆勤, 等. 小儿花剥苔形成的相关因素及其免疫学机制[J]. 中医杂志, 2006, 47( 7) : 531-534.

[17]方肇勤. 分子生物学技术在中医药研究中的应用[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2002: 3-11.

[18]吴正治, 李明, 张盛薇, 等. 不同舌苔舌上皮细胞的凋亡及相关基因分子机理研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2005, 25( 11) : 986-988.

[19]吴正治, 李明, 陈光, 等. 常见舌苔上皮细胞凋亡与 bax、bc1-2 基因表达关系的研究[J]. 中国中医药科技, 2004, 11( 4) : 193-195.

[20]盛光, 吴正治, 李明, 等. 舌苔变化与凋亡相关基因分子机理的研究[J]. 中国中医药科技, 2005, 12( 4) : 201-202.

[21]吴正治, 李明, 张永锋, 等. 消化系疾病舌苔变化的凋亡相关基因分子机理研究[J]. 中医杂志, 2006, 47( 1) : 50-52.

[22]佟书娟, 许冬青, 詹臻, 等. 舌苔形成与 Fas 基因表达关系的初步研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13( 10) : 753-754.

[23]吕军影, 黄李平, 阙铁生, 等. 类风湿关节炎风湿热郁型患者 ESR 与舌苔微生态及细胞凋亡的关系探讨[J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36( 4) : 503-504.

[24]詹臻, 张军峰, 范媛, 等. E-钙黏蛋白 mRNA 的表达与舌苔形成的关系研究[J]. 陕西中医, 2007, 28( 8) : 1088-1091.

[25]张晓丽, 王济国, 吴正治. 几种常见舌苔蛋白质组学的初步研究[J]. 中国中医药科技, 2008, 15( 4) : 241-243.

[26]王忆勤, 李福凤, 王文静, 等. 慢性胃炎中医湿证血清蛋白组学研究[J]. 中西医结合学报, 2007, 5( 5) : 514-516.

[27]徐舒, 陈合兵, 李洪, 等. "肝郁证"大鼠模型的建立及代谢组学的初步研究[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24( 6) : 787-791.

[28]王广基, 阿基业, 严蓓, 等. 代谢组学研究冠心病中医分型的体内物质基础[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2009, 11( 1) : 127-133.

( 收稿日期: 2010-03-01; 修回日期: 2010-09-10)

[编辑: 李  巍]

( 上接第 598 页)

阴阳不调, 脏腑功能失其常度, 每易藏邪, 对此, 当运筹帷幄、讲究策略, 切忌急功近利、药石乱投、伐害正气; 特别是胃气虚弱不胜药力者, 更当调养中土, 缓缓图之, 不可孟浪, 待正气来复, 脏腑机能恢复, 气血和调, 则邪无可藏, 病可恢复。《珍珠囊指掌》云: "用药之忌, 在乎欲速, 欲速则寒热温凉行散补泻未免过当, 功未获奏, 害已随之。夫药无次序, 如兵无纪律, 虽有勇将, 适己勇而愤事。又如理丝, 缓则可清其绪, 急则欲坚其结矣! "可为其例证。此即后人评论李东垣之学乃"医之王道"的道理所在。所谓"王道"者, 乃黄老"无为而治"之术, 无为并非不为, 而是寓有于无为之中, 深藏不露、默运神功, 最终成其大为。吴鞠通言: "坐镇从容, 神机默运, 无功可言, 无德可见, 而人登寿域。"即此谓也。

总之, 李东垣是中国医学史上一代名家, 其所倡导的脾胃内伤学说对后世医家产生了极大的影响,

其总结归纳的治疗脾胃内伤病, 以脾胃虚弱、清阳下陷、阴火上乘为主要病机, 以益气、升阳、泻火、除湿为主要治法, 在临床用药上重视升清降浊, 顺乎脾胃生理功能, 所立治法和所创方剂, 至今仍然被广泛应用。其处方特点是药味多、剂量小, 每日服量少、循序渐进, 缓缓以图功, 且制成粗末, 水煎分服, 根据病情需要灵活掌握服药时间, 反对用药过当, 损伤脾胃, 这些都比较适合内伤杂病的调治。

参考文献

[1]张年顺. 李东垣医学全书[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2006.

[2]张元素著. 任应秋点校. 医学启源[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1978: 168-200.

[3]陈修园. 医学三字经[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2008: 2.

( 收稿日期: 2010-08-26; 修回日期: 2010-12-27)

Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

[编辑: 崔京艳]