

· 临床论著 ·

中药对脾胃湿热证患者胃黏膜水通道蛋白 3、4 基因表达的影响

陈更新¹ 劳绍贤² 黄志新² 胡玲² 胡斌³ 张诗军² 黄列平² 罗琦²

摘要 目的 探讨脾胃湿热证与胃黏膜水通道蛋白(AQP)3、4 基因表达的关系及中药清热化湿方对其影响。方法 选择慢性浅表性胃炎患者 68 例,属脾胃湿热证者 53 例(其中湿重于热 19 例,热重于湿 14 例,湿热并重 20 例),脾虚证者 15 例。脾胃湿热证患者予中药清热化湿方治疗。采用荧光定量 PCR 方法检测胃黏膜 AQP 3、4 的基因表达。结果 脾胃湿热证组患者 AQP 3 基因表达的水平高于健康人组(10 名)和脾虚证组,但 3 者比较,差异无显著性;AQP 4 基因表达的水平则显著高于健康人组和脾虚证组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。脾虚证组与健康人组比较差异无显著性;脾胃湿热证各亚型之间比较呈湿重于热 > 湿热并重 > 热重于湿的趋势;治疗后脾胃湿热证患者及湿重于热亚型 AQP 3、4 的基因表达水平显著下降($P < 0.01$),接近健康人组及脾虚证组水平。结论 AQP 3、4 的异常表达可能是脾胃湿热证的发生机制之一,中药可能通过影响 AQP 3、4 的表达而发挥治疗作用。

关键词 清热化湿方 脾胃湿热证 慢性浅表性胃炎 水通道蛋白 3、4

Effect of Chinese Herbs on Expression of Aquaporin 3,4 Gene in Gastric Mucosa of Patients with Pi-Wei Damp-Heat Syndrome CHEN Geng-xin, LAO Shao-xian, HUANG Zhi-xin, et al Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou (510120)

Objective To explore the relationship between Pi-Wei Damp-Heat Syndrome (PWDHS) with expression of aquaporin (AQP) 3,4 gene in gastric mucosa and the effects of Qingre Huashi Recipe (QHR) on the expression. **Methods** Sixty-eight patients with chronic superficial gastritis were differentiated into Pi-Wei Damp-Heat Syndrome group (PWDHS, $n = 53$, 19 cases with predominant Dampness, 14 cases with predominant Heat, 20 cases with Dampness equal to Heat) and Pi deficiency Syndrome group (PDS, $n = 15$). The PWDHS were treated with QHR. The expression of AQP 3,4 gene in the two groups were determined by fluorescence quantitative polymerase chain reaction (FQ-PCR). **Results** Expression of AQP 3 gene in PWDHS was higher than that in PDS and the healthy group, but the difference showed no statistical significance. Expression of AQP 4 gene in PWDHS was obvious higher than that in PDS and the healthy group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), but the difference of AQP 4 gene expression between PDS and the healthy group was insignificant. Comparison among various sub-types of PWDHS showed that the AQP 4 gene expression in the predominant dampness > dampness equal to heat > predominant heat. AQP 3,4 gene expression in PWDHS was significantly decreased after QHR treatment, especially in the cases with predominant dampness syndrome ($P < 0.01$), approaching that in the healthy group and PDS. **Conclusion** Abnormal expression of AQP 3,4 gene may be one of the possible mechanisms of PWDHS pathogenesis, Chinese herbs could influence AQP 3,4 gene expression to play a key role in treatment.

Key words Qingre Huashi Recipe; Pi-Wei Damp-Heat Syndrome; chronic superficial gastritis; aquaporin 3; aquaporin 4

基金项目 国家自然科学基金项目资助课题(No. 30271572)

作者单位 1. 广东省中医院(广州 510120) 2. 广州中医药大学脾胃研究所 3. 中山大学达安基因诊断中心

通讯作者 陈更新 Tel 020-81887233 转 39402 E-mail: cgx0101@

sohu.com 万方数据

脾胃湿热证是脾胃实证中的一个常见证型,在消化系统疾病中占有重要的地位,对它的深入研究,有助于脾本质研究的深入开展。本研究以“脾失健运,水湿内停,湿聚化热,湿热内生”为理论切入点,从水通道蛋

白(aquaporins, AQP)途径探讨脾胃湿热证的生物学基础及发生机理,同时对清热化湿方治疗后的影响进行观察。

临床资料

1 病例选择 慢性浅表性胃炎诊断标准采用中华医学会消化病学分会 2000 年井冈山会议制定的标准^[1] 脾胃湿热证和脾虚证的诊断标准参照《中药新药临床研究指导原则(试行)》中的相关标准^[2] 制订。纳入标准 符合上述诊断标准,年龄在 18~65 岁之间,自愿且能够配合参加试验,并签署知情同意书的受试者。排除标准 近 1 个月内使用过抗生素和抗酸药;合并有严重心、肝、肾、肺系等疾病者及孕妇、哺乳期妇女;合并有消化性溃疡、萎缩性胃炎、食管炎、食管静脉曲张、肝炎、肝硬化等其他消化系统疾病者;不能配合研究,未按规定用药,无法判断疗效或资料不全等影响疗效或安全性判断者,皆不纳入研究。健康受试者的选择标准:(1)胃镜及病理检查胃黏膜基本正常;(2)中医四诊无异常;(3)无呼吸、消化、循环、泌尿、内分泌等疾病;(4)心、肝、肾、肺功能正常。

2 一般资料 选择 2003 年 3—12 月期间就诊于广州中医药大学第一附属医院消化内科门诊的慢性浅表性胃炎患者 68 例,中医辨证属于脾胃湿热证者 53 例,男 29 例,女 24 例;平均年龄 (32.25 ± 10.12) 岁;病程 0.1~10 年,平均 (2.62 ± 2.73) 年;其中湿重于热者 19 例,热重于湿者 14 例,湿热并重者 20 例。脾虚证者 15 例,男 7 例,女 8 例;平均年龄 (35.47 ± 12.93) 岁;病程 0.15~10.5 年,平均 (2.39 ± 2.60) 年。健康体检者 10 名,男 6 名,女 4 名;年龄 22~57 岁,平均 (34.70 ± 10.90) 岁,为测定指标的正常参考值。

方 法

1 治疗方法 脾胃湿热证组采用清热化湿方:白豆蔻、黄芩、滑石、厚朴、法半夏、郁金、猪苓、台乌药等组成,每日 1 剂水煎,分 2 次温服,连续治疗 4 周。在治疗期间停服其他任何药物。脾虚证患者采用中医辨证加减治疗。

2 测定指标与方法 受试对象进入观察时均行 GIF-240XQ 电子胃镜检查(脾胃湿热证组治疗后须行胃镜复查)。以病理活检钳在距胃底与胃体交界线约 2cm 处的胃体上部大弯侧钳取胃黏膜组织 2 块,每块约 0.4cm×0.4cm 大小,黏膜组织迅速放入液氮罐中,并转入 -70℃ 低温冰箱保存待测。采用荧光定量 PCR(FQ-PCR)法检测 AQP 3、4 的基因表达。参照

NCBI 的 Genebank 公布的 DNA、mRNA 基因序列, AQP 3、AQP 4 正义链引物、反义链引物、荧光探针的序列由广州中山大学达安基因诊断中心设计,采用 Primer express 2.0 软件,在 ABI 3900 台式高通量 DNA 合成仪中合成。具体引物和探针的序列如下:

Sequence Name: AQP 3

Forward Primer: 5'-ATAGTTTTTGGGCTGTATTA-TGATG-CA-3'

Reverse Primer: 5'-GGGCCCCGAAACAAAAAGC-3'

TaqMan Probe: 5'-FAM-TGGCACTTCGCCGAC-MGB-3'

Sequence Name: AQP 4

Forward Primer: 5'-GAATCCCGCCCGATCCT-3'

Reverse Primer: 5'-ATATCCAATGGTTTTCCCAATTTTC-3'

TaqMan Probe: 5'-FAM-TGGACCTGCAGTTATCAT-MGB-3'

经组织 RNA 的提取和鉴定,采用 PE9600PCR 基因扩增仪(美国 Perkin Elmer 公司)做逆转录反应,取逆转录反应产物 cDNA,进行荧光定量 PCR(FQ-PCR)反应,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(25μmol/L) 1μl,下游引物 R(25μmol/L) 1μl, dNTPs(10mmol/L) 1μl,荧光探针(20μmol/L) 1μl, Taq 酶(2U/μl) 2μl, cDNA 5μl, 双蒸水 29μl。反应条件为: 93℃ 2 min, 然后 93℃ 1 min, 55℃ 1 min, 共 40 个循环。采用 PE7000 全自动荧光定量 PCR 仪(美国 Perkin Elmer 公司)。反应结束后,由电脑自动分析并绘出阳性标准品的扩增曲线和定量标准曲线。

各待测样本经 FQ-PCR 反应后,与标准曲线比较,通过电脑自动分析和计算,得到各样本的 DNA 量(拷贝数),将各样本的拷贝数取对数,通过数据转换后,使服从正态分布,进行统计学分析。

3 统计学方法 等级资料采用 Ridit 检验;多组间计量资料的比较采用方差分析,治疗前后计量资料的比较采用配对 t 检验,显著性水平设 $\alpha=0.05$,采用 SPSS for Windows 11.0 统计软件包进行分析。

结 果

1 疗效标准 参照《中药新药治疗湿热蕴脾证的临床研究指导原则(试行)》^[2] 制订疗效标准。

2 不同证型患者疗效 见表 1。经 Ridit 检验,清热化湿方在 3 种亚型中的疗效比较差异无显著性。

3 各证型患者 AQP 3、4 基因表达的比较 见表 2。脾胃湿热证组 AQP 3、4 基因表达的水平均高于健康人和脾虚证组,其中 AQP 4 与健康人和脾虚证组比较差异有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$);脾虚证组 AQP3、4 基因表达的水平与健康人相当;脾胃湿热证

表 1 不同证型患者疗效比较 [例(%)]

证型	例数	痊愈	显效	有效	无效	总有效
脾胃湿热证	53	7(13.2)	23(43.4)	18(34.0)	5(9.4)	48(90.6)
湿重于热	19	2(10.5)	8(42.1)	8(42.1)	1(5.3)	18(94.7)
热重于湿	14	2(14.3)	6(42.9)	4(28.6)	2(14.3)	12(85.7)
湿热并重	20	3(15.0)	9(45.0)	6(30.0)	2(10.0)	18(90.0)

各亚型中,AQP 3、4 的基因表达水平均呈湿重于热>湿热并重>热重于湿的趋势,其中,湿重于热亚型的表达水平最高,与热重于湿亚型比较差异有显著性($P<0.05$)。

4 脾胃湿热证 AQP 3、4 基因表达的变化 见表 3。对 17 例慢性浅表性胃炎脾胃湿热证患者进行了治疗前后的观察,结果发现 AQP 3、4 基因表达水平均较治疗前显著下降($P<0.01$) 湿重于热、热重于湿和湿热并重三种亚型也较治疗前降低,湿重于热亚型与治疗前比较差异有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$),治疗后脾胃湿热证组及其各亚型与健康人及脾虚证组之间比较差异均无显著性。

5 不良反应情况 全部病例在治疗过程中均未见不良反应发生。

讨 论

水是生命中不可缺少的物质,是活细胞和细胞外间隙的主要组成成分,水的跨细胞转运对维持细胞内外环境的平衡起着重要作用。AQP_s 是与水通透有关的细胞膜上转运水的特异孔道,介导着不同类型细胞

膜的跨膜水转运,它是由美国化学家 Peter Agre 在 1988 年首先发现的,在过去的十几年中,水通道已经发展成高度经典的研究领域。AQP_s 存在于细菌、植物和动物中,是一个很大的蛋白质家族,迄今为止,仅在人体中已经发现有 AQP 0~10 共 11 种不同的变种。AQP_s 广泛分布于机体不同的组织器官,在消化系统中有着大量的表达,它们在消化系统水的代谢中起着关键的作用。目前已发现消化道黏膜上至少有 7 种 AQP 亚型的表达,在胃黏膜上有 AQP 3、AQP 4 两种亚型的表达。

Koyama Y 等^[3]研究发现大鼠从食管到结肠均有 AQP 3 表达,推测 AQP 3 在胃肠道内水的摄取和排泄中起重要作用。Silberstein C 等^[4]对人体胃肠道 AQP 3 的分布和功能进行了研究,结果发现在人的胃、空肠、回肠、结肠上均有 AQP 3 的表达,其中在结肠的表达局限在绒毛上皮细胞,其染色更集中在细胞的顶质膜上,而不是基侧膜,这提示 AQP 3 参与了人结肠表面上皮细胞水的吸收。AQP 4 也称为永不敏感水通道蛋白。Misaka T 等^[5]首先在人体胃黏膜上发现有 AQP 4 的表达,主要表达在黏膜层的胃底腺细胞中,包括分泌胃酸的壁细胞和分泌胃蛋白酶原的主细胞,其蛋白质主要表达在腺体的基膜上。结果提示,AQP 4 可能是维持胃内分泌胃蛋白酶原和盐酸的渗透压调节的主要因素。

由于慢性胃炎脾胃湿热证患者的细胞内能量代谢

表 2 各证型患者 AQP 3、4 基因表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

证型	例数	AQP 3		AQP 4	
		拷贝/ $\mu\text{g RNA}(\times 10^4)$	拷贝数的对数	拷贝/ $\mu\text{g RNA}(\times 10^6)$	拷贝数的对数
脾胃湿热证	53	9.215 $\pm$ 29.091	3.374 $\pm$ 1.395	2.894 $\pm$ 2.939	6.155 $\pm$ 0.614* $\Delta\Delta$
湿重于热	19	11.943 $\pm$ 17.361	4.004 $\pm$ 1.461 $\Delta\Delta$	4.274 $\pm$ 2.644	6.450 $\pm$ 0.555 Δ
热重于湿	14	0.298 $\pm$ 0.503	2.825 $\pm$ 0.865	1.659 $\pm$ 2.892	5.757 $\pm$ 0.641
湿热并重	20	12.864 $\pm$ 44.164	3.161 $\pm$ 1.459	2.449 $\pm$ 2.839	6.152 $\pm$ 0.507
脾虚证	15	9.486 $\pm$ 33.388	2.976 $\pm$ 1.354	1.214 $\pm$ 1.591	5.291 $\pm$ 1.324
健康人	10	1.112 $\pm$ 1.984	2.968 $\pm$ 1.185	0.924 $\pm$ 1.041	5.459 $\pm$ 1.034

注 与健康人比较,* $P<0.05$ 与脾虚证比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 与热重于湿证比较, $\Delta P<0.05$

表 3 各证型患者治疗前后 AQP 3、4 基因表达的比较 ($\bar{x} \pm s$)

证型	例数	时间	AQP 3		AQP 4	
			拷贝/ $\mu\text{g RNA}(\times 10^4)$	拷贝数的对数	拷贝/ $\mu\text{g RNA}(\times 10^6)$	拷贝数的对数
脾胃湿热证	17	治疗前	3.54 $\pm$ 5.64	3.51 $\pm$ 1.26	2.75 $\pm$ 2.74	6.24 $\pm$ 0.43*
		治疗后	0.92 $\pm$ 2.13	2.83 $\pm$ 1.05 $\Delta\Delta$	1.21 $\pm$ 1.27	5.85 $\pm$ 0.52 $\Delta\Delta$
湿重于热	6	治疗前	8.25 $\pm$ 7.34	4.41 $\pm$ 1.10	5.57 $\pm$ 2.89	6.66 $\pm$ 0.35
		治疗后	2.21 $\pm$ 3.32	3.18 $\pm$ 1.39 Δ	1.70 $\pm$ 1.61	6.01 $\pm$ 0.59 $\Delta\Delta$
热重于湿	4	治疗前	0.20 $\pm$ 0.22	2.95 $\pm$ 0.77	0.79 $\pm$ 0.42	5.85 $\pm$ 0.25
		治疗后	0.11 $\pm$ 0.13	2.68 $\pm$ 0.79	0.46 $\pm$ 0.29	5.55 $\pm$ 0.42
湿热并重	7	治疗前	1.41 $\pm$ 2.22	3.05 $\pm$ 1.29	1.45 $\pm$ 0.71	6.10 $\pm$ 0.26
		治疗后	0.27 $\pm$ 0.51	2.62 $\pm$ 0.92	1.21 $\pm$ 1.23	5.89 $\pm$ 0.49
脾虚证	15		9.49 $\pm$ 33.39	2.98 $\pm$ 1.35	1.21 $\pm$ 1.59	5.29 $\pm$ 1.32

注 与脾虚证比较,* $P<0.05$ 与本证型治疗前比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

呈病理性亢进状态,而脾虚证细胞内能量代谢则有所降低^[6-8]。脾虚证患者细胞线粒体能量传递低下,胃黏膜分泌功能障碍,胃酸分泌不足^[9]。因此,我们推测慢性浅表性胃炎脾胃湿热证患者细胞内能量代谢处于亢进状态,细胞分泌旺盛,水跨细胞膜的转运活跃,AQP 3、4 基因的表达水平升高,以协同完成亢进的细胞分泌,从而维持细胞黏膜的稳定性。而脾虚者的细胞代谢则处于相对低下的状态,AQP 3、4 基因的表达水平只轻度升高或降低。由于脾胃湿热证的基本病机是“脾失健运,水湿内停,湿聚化热,湿热内生”,脾胃湿热证在发病时多表现为湿重于热,此时胃黏膜充血水肿明显,胃液分泌增多,AQP 3、4 的基因表达升高;随后,由于湿聚化热,湿热内生,逐渐出现湿热并重、热重于湿的病证,胃黏膜炎症加重,多出现糜烂,甚至可伴有出血点,但水肿可有所减轻,此时 AQP 3、4 的基因表达水平下降。

慢性浅表性胃炎在中医多属“胃痞”之证。脾胃湿热证是慢性浅表性胃炎的常见中医证型。中药清热化湿方治疗慢性浅表性胃炎脾胃湿热证有着良好的疗效。方中以气味芳香之白豆蔻芳化湿浊、行气消痞,黄芩苦寒清热燥湿、泻火解毒,共为方中君药。滑石甘淡寒,既助白豆蔻利水渗湿,又可助黄芩清热泻火;厚朴燥湿行气、消积除痞;半夏燥湿消痞、降逆止呕;猪苓利水渗湿,共为方中臣药。因湿性黏滞,湿阻则气滞,治湿而不行气则湿不易化,故方中加以郁金、乌药行气解郁,以使气行则湿化,为方中佐助之药。诸药相合,升降有制,寒温并调,共收清热化湿、行气消痞之功。本次临床观察表明疗效确切,且无不良反应。

慢性浅表性胃炎脾胃湿热证患者采用清热化湿方治疗后,AQP 3、4 基因的表达水平均较治疗前显著下降,其各亚型也较治疗前降低,治疗后与正常对照组和脾虚证组比较差异均无显著性。因此,我们推测中药清热化湿方可能通过影响 AQP 3、4 的基因表达,导致细胞分泌和水的跨膜转运趋于正常,抑制了脾胃湿热证患者亢进的细胞能量代谢,减轻了胃黏膜的充血水肿等炎症反应,从而明显改善脾胃湿热证患者的临床症状。

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.

Society of Gastroenterology, Chinese Medical Association. The

general opinion acquired in the national meeting of chronic gastritis. Chin J Digest 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, 2002:361—364.

Zheng XY. Guidelines for clinical research of traditional Chinese medicine and new drugs (Trial). Beijing:China Medical Pharmaceutical Science and Technology Publishing House, 2002:361—364.

- 3 Koyama Y, Yamamoto T, Tani T, et al. Expression and localization of aquaporins in rats' gastrointestinal tract. Am J Physiol 1999 276(3 Pt 1):c621—627.

- 4 Silberstein C, Kierbel A, Amodeo G, et al. Functional characterization and localization of AQP 3 in the human colon. Braz J Med Biol Res 1999 32(10):1303—1313.

- 5 Misaka T, Abe K, Iwabuchi K, et al. A water channel closely related to rat brain aquaporin 4 is expressed in acid- and pepsinogen-secreting cells of human stomach. FEBS Lett 1996 381(3):208—212.

- 6 祁建生,杨春波,汪碧萍,等. 慢性胃炎脾胃湿热证红细胞膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 与血清 DBHase 关系探讨. 新中医 2001 33(10):30—31.

Qi JS, Yang CB, Wang BP, et al. Studies on the relationship between $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ of red blood cell membrane and DBHase of blood serum in chronic gastritis with damp-heat in spleen and stomach. New J TCM 2001 33(10):30—31.

- 7 祁建生,李秀娟,杨春波,等. 红细胞膜 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 与慢性胃炎中医辨证分型关系的研究. 新中医 1999 31(1):34—35,40.

Qi JS, Li XJ, Yang CB, et al. Studies on the relationship between type according to syndrome differentiation of chronic gastritis and $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ of red blood cell membrane. New J TCM 1999 31(1):34—35,40.

- 8 祁建生,李秀娟,杨春波,等. 慢性胃炎脾胃虚实证红细胞游离 Ca^{2+} 及膜 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 研究. 中国中西医结合脾胃杂志 1999 7(1):16—18.

Qi JS, Li XJ, Yang CB, et al. Experimental research of Ca^{2+} in red blood cell and $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ in cellular membrane in chronic gastritis with deficiency and excess syndrome of spleen and stomach. Chin J Integr Tradit West Med Gastro-spleen 1999 7(1):16—18.

- 9 王兆青. 脾与胃液分泌功能关系的初探——附 341 例. 中西医结合杂志 1984 4(1):36.

Wang ZQ. A preliminary study on the relationship between the “Spleen” and gastric acid secretion function——A report of 341 cases. Chin J Integr Tradit West Med 1984 4(1):36.

(收稿 2004-08-18 修回 2004-12-24)