

不同舌苔舌上皮细胞的凋亡及相关基因分子机理研究

吴正治¹ 李明¹ 张盛薇² 蔡英³ 张永锋¹ 陈媛茵¹

摘要 目的 探讨不同舌苔舌上皮细胞凋亡及其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技术、原位杂交、免疫组化和图像分析技术,检测常见舌苔舌上皮细胞凋亡及凋亡相关基因 bax、fas、TGF- β 3 mRNA 和蛋白产物。**结果** 4 种常见舌苔舌上皮细胞均可见细胞凋亡发生,不同舌苔变化趋势与凋亡指数变化趋势相反。与正常及薄苔比较,剥苔 bax、fas 基因过度表达伴随细胞凋亡增多,而厚苔 bax、TGF- β 3 mRNA 低表达伴随细胞凋亡减少。舌苔上皮细胞中促凋亡基因 bax、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 bax、fas、TGF- β 3 表达水平的变化可能是影响舌苔舌上皮细胞凋亡,并导致不同舌苔变化的重要原因。

关键词 舌苔;原位缺口末端标记技术;原位杂交;免疫组织化学;图像分析

Study on the Molecular Mechanism of Lingual Epithelial Cell Apoptosis and its Related Genes in Different Tongue Furs WU Zheng-zhi, LI Ming, Sheng Wei, et al *Clinical Institute of Integrative Traditional Chinese and Western Medicine of Shenzhen City, Guangdong (518031)*

Abstract Objective To investigate the molecular mechanism of lingual epithelial cell (LEC) apoptosis and its related genes expression in different tongue furs. **Methods** The LEC apoptosis and its related genes expression including bax, fas, TGF- β 3 mRNA and protein product in tongue fur was determined using terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate nick end labelling technique (TUNEL), in situ hybridization, immunohistochemical technique and image analysis. **Results** LEC apoptosis could always be seen in 4 types commonly encountered tongue fur. The tendency of changing in thickness of tongue fur was opposite to that of apoptotic index. Compared with normal thin fur, bax and fas genes were over-expressed in exfoliative fur with increased apoptosis, while in thick fur, bax and TGF- β 3 genes were low-expressed and accompanied with decreased apoptosis. The level of apoptosis promoting genes, bax, fas, TGF- β 3 gene expression in LEC showed a tendency parallel to that of LEC apoptosis. **Conclusion** Change of apoptosis related genes expression, bax, fas and TGF- β 3 may effect the LEC apoptosis and be the important factor for changing of the thickness of tongue fur.

Key words tongue fur; TUNEL; in situ hybridization; immunohistochemical; image analysis

舌苔变化能较为客观地反映病情,察舌辨证能指导临床用药^[1]。有关舌苔变化机理的研究虽已深入到亚细胞水平^[2-4],但在基因水平的研究尚属罕见。为此,本课题自 2000 年 1 月—2003 年 12 月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)缺口末端标记技术(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated d-UTP nick-end labelling tech-

nique, TUNEL 技术)检测舌苔上皮细胞凋亡情况,并用原位核酸分子杂交、免疫组织化学技术对凋亡相关基因 bax、fas、TGF- β 3 在正常及常见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阐明常见舌苔的形成机理和影响因素。

资料与方法

1 资料来源 病理舌苔受检者均系深圳市第二人民医院门诊及住院患者,病种不限,但注意各组病种分布的平衡;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。参考《中医诊断学》舌诊标准辨舌苔^[5],

其金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 39770890)

作者单位:1. 广东省深圳市中西医结合临床研究所(广东 518031);2. 广东省深圳市中医院;3. 深圳市第二人民医院口腔科

通讯作者:吴正治, Tel: 0755-83246393, E-mail: zhengzhw@yahoocom.cn

分为 4 组:正常组 12 例,男 6 例,女 6 例;年龄 24~68 岁。薄苔组 30 例,男 14 例,女 16 例;年龄 21~73 岁。厚苔组 30 例,男 17 例,女 13 例;年龄 24~68 岁。剥苔组 16 例,男 7 例,女 9 例;年龄 19~75 岁。经统计学分析,各组性别、年龄分布比较差异无显著性。

取材:每位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表层)舌苔,装于有预冷生理盐水(含 0.1%DEPC)的 10 ml 具塞离心管中,洗涤、涂片后-70℃密闭保存备测。

2 主要试剂 抗 Bax、Fas 蛋白多克隆抗体为美国 Oncogene 公司产品;第二抗体 Envision +、抗体稀释液均购自美国 DAKO 公司;TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒, bax、fas、TGF-β3 原位杂交检测试剂盒、抗 TGF-β3 多克隆抗体均为武汉博士德公司产品;二乙基焦碳酸酯(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。

3 方法

3.1 细胞凋亡的测定 采用 TUNEL 法。所有标本涂片用 4%多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗涤 3 min, 共 2 次, 双蒸水洗涤 3 min, 共 2 次; 3% H₂O₂ 浸泡 30 min, 双蒸水洗涤 5 min, 共 3 次; 涂片加标记缓冲液湿润后, 加标记液 37℃ 标记 2 h, TBS 洗涤 5 min, 共 3 次; 加封闭液封闭 30 min; 加生物素化抗地高辛抗体, 37℃ 孵育 30 min, TBS 洗涤 5 min, 共 3 次; 加 SABC, 37℃ 孵育 60 min, TBS 洗涤 5 min, 共 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)细胞核中无棕黄色颗粒。

3.2 bax、fas、TGF-β3 mRNA 的测定 采用原位杂交法, 按试剂盒说明书操作。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。

3.3 bax、fas、TGF-β3 蛋白的测定 采用免疫组化标记葡聚糖多聚体(labelled dextran polymer, LDP)法。所有标本涂片以冷丙酮固定 15 min, 双蒸水充分洗涤; 0.5% H₂O₂/甲醇溶液浸泡 30 min, PBS 洗涤 5 min, 共 3 次; 加第一抗体后, 4℃ 孵育 17 h, PBS 洗涤 5 min, 共 3 次, 加 Envision + 37℃ 孵育 40 min, PBS 洗涤 5 min, 共 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。

3.4 图像半定量分析 采用 CMIAS 真彩色病理图像分析系统(空军总医院生物医学工程研究所研制), 在光镜下(×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)。

4 统计学方法 结果中阳性细胞率的比较均先经过平方根反正弦变换后采用单因素方差分析和 *q* 检验(Newman-Keuls 法)。PU 值的比较则直接进行单因素方差分析和 *q* 检验。阳性率的比较采用 χ^2 检验。

结 果

1 不同舌苔舌上皮细胞 AI(%, $\bar{x} \pm s$)测定结果 AI:与正常组(2.28±1.57)和薄苔组(2.27±1.45)比较, 剥苔组(3.99±1.93)升高(*P*<0.05), 而厚苔组(1.10±0.67)降低(*P*<0.05), 厚苔组与剥苔组间比较差异有显著性(*P*<0.01)。各组舌苔中以剥苔组 AI 最高。

2 不同舌苔舌上皮细胞 TGF-β3 原位杂交和免疫组化测定结果 见表 1。TGF-β3 mRNA 和蛋白质在舌苔脱落细胞除完全角化细胞外的各层部分细胞都可见阳性着色, 但以颗粒层最明显, 原位杂交和免疫组化方法中阳性细胞率:厚苔组和剥苔组与正常组和薄苔组比较, 差异有显著性(*P*<0.05 或 *P*<0.01); 厚苔组和剥苔组阳性细胞率比较差异也有显著性(*P*<0.05)。PU 值各组间比较差异均无显著性。在薄苔组或厚苔组中, 不同颜色(黄、白)舌苔间 TGF-β3 mRNA 和蛋白阳性细胞率和阳性单位值差异均无显著性。

表 1 不同舌苔舌上皮细胞 TGF-β3 原位杂交和免疫组化测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

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	12	13.75±3.08	9.36±2.45	13.62±3.82	9.49±1.90
薄苔	30	14.73±3.89	9.03±2.13	13.45±4.84	9.31±1.75
厚苔	30	9.45±3.72 ^{*△}	7.92±2.28	9.83±2.70 ^{**△}	8.07±1.83
剥苔	16	5.27±2.18 ^{**△▲}	8.06±1.42	5.62±2.64 ^{**△▲}	8.85±2.33

注:与正常组比较, * *P*<0.05, ** *P*<0.01; 与薄苔组比较, △ *P*<0.05, △△ *P*<0.01; 与厚苔组比较, ▲ *P*<0.05

3 不同舌苔舌上皮细胞 bax 原位杂交和免疫组化测定结果 见表 2。bax 基因在 mRNA 和蛋白质两个水平的表达趋势一致, 在舌苔脱落细胞各层部分细胞(完全角化细胞除外)均有弱阳性表达。两种方法中

表 2 不同舌苔舌上皮细胞 bax 原位杂交和免疫组化测定结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

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	12	2.86±0.98	4.11±1.27	2.87±0.96	4.81±1.63
薄苔	30	2.49±1.02	4.31±1.53	2.21±1.15	4.74±1.91
厚苔	30	1.12±0.67 ^{*△}	4.05±1.17	1.16±0.67 ^{*△}	4.54±1.76
剥苔	16	4.77±2.02 ^{*△▲}	4.70±2.08	4.82±2.18 ^{*△▲}	4.42±2.06

注:与正常组比较, * *P*<0.05; 与薄苔组比较, △ *P*<0.05; 与厚苔组比较, ▲ *P*<0.01

bax 阳性细胞率:剥苔组和厚苔组与正常组和薄苔组比较,差异均有显著性($P<0.05$),厚苔组与剥苔组间比较差异有显著性($P<0.01$),但以剥苔组 bax 阳性细胞率最高。PU 值各组间比较差异无显著性。在薄苔组或厚苔组中不同颜色(黄、白)舌苔间 bax mRNA 和蛋白阳性细胞率和阳性单位值比较差异无显著性。

4 不同舌苔舌上皮细胞 fas 原位杂交和免疫组化测定结果 见表 3。fas mRNA 和蛋白质都只在部分观察对象舌苔脱落细胞中有微弱阳性表达,并且原位杂交和免疫组化阳性表达情况一致。剥苔 fas 阳性率高于其他各组($P<0.05$)。

表 3 不同舌苔舌上皮细胞 fas 原位杂交和免疫组化测定结果比较 (例)

组别	例数	原位杂交、免疫组化	
		阳性	阴性
正常	12	1*	11
薄苔	30	4*	26
厚苔	30	3*	27
剥苔	16	7	9

注:与剥苔组比较,* $P<0.05$

在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阳性单位值比较差异均无显著性。

讨 论

细胞凋亡是由基因控制的细胞主动死亡过程,它参与机体许多的生理、病理过程,如胚胎发育、免疫调节、衰老过程、肿瘤发生等^[6]。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^[7]。对于同属于复层扁平上皮的舌黏膜上皮,本课题用 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。而我们临床上常见到痰湿证患者,其特征性的体征之一是舌苔厚腻。根据中医辨证给予化湿药后 1~2 天左右厚腻苔开始消退。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,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 bax、fas、TGF- β 3 等基因起促进凋亡的作用^[8,9]。本课题首次从 mRNA 和蛋白质两个水平探讨了 bax、fas、TGF- β 3 基因在舌苔上皮细胞凋亡中的变化规律。我们发现,与正常及薄苔比较,剥苔 bax、fas 基因过度表达伴随细胞凋亡增多,而厚苔 bax、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 bax、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。结果提示凋亡相关基因 bax、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。深入研究其他凋亡相关基因特别是抑制凋亡的 bcl-2 等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有重要意义。

参 考 文 献

- 1 李乃民主编.中国舌诊大全.北京:学苑出版社,1994:545-588.
Li NM,editor. Chinese collection of tongue diagnosis. Beijing: Academy Press, 1994:545-588.
- 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.
Wu ZZ, Guo ZQ, Xie JY. Cytochemical study of tongue fur in patients with stomachache of spleen deficiency syndrome. J TCM 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.
Wu ZZ. On mechanism of tongue furs. Guangzhou: Zhongshan University Press,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.
Wu ZZ, Zhou XQ, Guo ZQ, et al. A primary study on cytochemical of thin and white tongue fur in patients with cold of insufficiency type. Chin J Integr Tradit West Med 1993;13(11):649-651.
- 5 朱文锋主编.中医诊断学.上海:上海科学技术出版社,1998:42.
Zhu WF,editor. Diagnostics of traditional Chinese medicine. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers,1998:42.
- 6 Gastman BR, Futrell JW, Manders EK. Apoptosis and plastic surgery. Plast Reconstr Surg 2003;111(4):1481-1496.
- 7 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.
- 8 Terakiy, Shiohara T. Apoptosis and skin. Eur J Dermatol 1999;9(5):413-425.
- 9 Rosfjord EC, Dickson RB. Growth factors, apoptosis and survival of mammary epithelial cells. J Mammary Gland Biol Neoplasia 1999;4(2):229-237.

(收稿:2005-04-02 修回:2005-06-20)