

· 临床报道 ·

慢性浅表性胃炎脾胃湿热证与 HSP70 基因表达的关系

马剑颖¹ 胡 玲² 劳绍贤² 黄烈平³ 胡 斌⁴

证候研究是中医理论研究的突破口之一。脾胃湿热证是脾胃实证中的一个常见证型,在消化系统中占有重要的地位。热休克蛋白 70(HSP 70)是生物体在不良环境作用下产生的一种应激蛋白,它对于维持胃黏膜完整和减轻黏膜炎症有重要作用。本研究通过探讨慢性浅表性胃炎脾胃湿热证与 HSP 70 基因表达的关系,进一步揭示中医证候形成的机制,对于脾胃实质的研究有着重要的意义。

资料与方法

1 诊断标准 慢性浅表性胃炎诊断采用中华医学会消化病学分会 2000 井冈山会议标准^[1];中医辨证分型诊断参照《中药新药临床研究指导原则》(试行)标准^[2];脾胃湿热证亚型的判断按广州中医药大学脾胃研究所拟定的方案进行(热重于湿:舌红苔黄腻而干,胃脘胀痛,大便偏干,或口苦而渴,或小便黄而短;湿热并重:舌苔黄腻,胃脘痛或胀痛,大便黏滞不爽,口苦而黏,或渴而少饮;湿重于热:舌淡红苔厚腻微黄,脘痞恶心或痛,大便溏滞,或口黏不渴,或肢体困重)。

2 纳入标准 符合上述诊断标准;年龄 18~50 岁;自愿且能够配合参加试验的受试者,并签署知情同意书。

3 排除标准 不符合上述诊断标准者;近 1 月内使用过抗生素、铋剂、H₂ 受体拮抗剂及质子泵抑制剂治疗者;合并有严重心、肝、肾、肺系等疾病者,及孕妇、哺乳期妇女等;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;年龄在 50 岁以上或 18 岁以下者;不能配合研究,不能按规定用药者。

4 一般资料 38 例均为 2005 年 6—10 月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,按中医辨证分组,其中属于脾胃湿热证者 22 例,男 14 例,女 8 例;年龄 21~45 岁,平均

(33.59±9.82)岁;病程 6~37 个月,平均(21.72±14.40)个月;属脾虚证者 16 例,男 6 例,女 10 例;年龄 27~42 岁,平均(37.81±6.30)岁;病程 11~39 个月,平均(25.08±12.48)个月;两组的性别、年龄、病程情况比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。以健康体检者 10 名作为健康对照组,其中男 4 名,女 6 名;年龄 26~40 岁,平均(37.40±7.12)岁。

5 方法

5.1 标本的收集及准备 所有受试对象均需行电子胃镜(GIF-XQ240 型)检查,以病理活检钳在胃窦距幽门 2~3 cm 处大弯和小弯各钳取胃黏膜组织 1 块,每块约 0.3~0.4 cm×0.3~0.4 cm 大小,并迅速放入液氮罐保存以备 HSP70 基因表达检测。

5.2 HSP 70 基因表达检测 采用荧光定量 PCR 法^[3,4]。

5.2.1 HSP 70 引物和探针的设计合成 采用 Primer express 2.0 软件,在 ABI 3900 台式高通量 DNA 合成仪中合成。HSP 70 引物和探针的序列如下:

Forward Primer: 5'-AAGCAGACACAGACCTTCAC-TACCTAT-3', Reverse Primer: 5'-GGCACGCTCGCCT-TCAT-3', TaqMan Probe: 5'-FAM-ACAACCAGCCTGGT-GTGCTTATTCAGGTT-TAMRA-3'。

5.2.2 组织 RNA 的提取 组织块(约 100 mg)置匀浆器,加 Trizol 2 mL,冷冻匀浆,置 Eppendorf 管中,15~30℃ 孵育 5 min,加入 0.4 mL 氯仿,盖紧盖子,用力摇动 15 s,15~30℃ 孵育 2~3 min,4℃ 12 000 r/min 离心 15 min,取上清液置新的 Eppendorf 管中,加 0.5 mL 异丙醇,15~30℃ 孵育样品 10 min,4℃ 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,75% 乙醇洗涤沉淀 1 次,4℃ 7 500 r/min 离心 5 min,弃乙醇,空气或真空干燥 5~10 min,加 DEPC 处理水溶解 RNA, -80℃ 保存备用。

5.2.3 RNA 样品鉴定 每样品取 5 μL RNA 置 1% 的琼脂糖凝胶上电泳,泳毕,溴化乙锭染色 20 min,置紫外灯下观察。每样品在紫外分光光度计上测定波长为 260 nm 时的吸光度值。浓度计算公式:浓度(g/L) = OD₂₆₀ × 稀释倍数 × 40/1 000。

5.2.4 逆转录反应 取 5 μL RNA 模板做逆转录反应,5× 逆转录 buffer 4 μL,上游引物 0.4 μL,下游

基金项目:广东省中医药管理局科研资助课题(No. 2050026)

作者单位:1. 南方医科大学中医药学院(广州 510515);2. 广州中医药大学脾胃研究所;3. 广州中医药大学第一附属医院胃镜室;4. 中山大学达安基因诊断中心

通讯作者:胡 玲, Tel: 020-36585110, E-mail: pqhl@yahoo.com.cn

引物 0.4 μL , dNTPs (25 mmol/L) 0.2 μL , MMLV (10 U/ μL) 1 μL , DEPC 水 9 μL , RNA 模板 5 μL , 总体积: 20 μL [逆转录 buffer 成分: 50 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 50 mmol/L KCl, 4 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L DTT], 反应条件: 37 $^{\circ}\text{C}$ 1 h, 然后 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min。

5.2.5 荧光定量 PCR 反应 5 $\times$ 定量 PCR buffer 10 μL , 上游引物 F (25 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , 下游引物 R (25 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL , 荧光探针 (20 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , Taq 酶 1.5 μL , cDNA 5 μL , ddH₂O 30 μL , 总体积: 50 μL , PCR buffer 成分: 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl_2 , 反应条件为: 93 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 然后 93 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 40 循环。反应结束后, 由电脑自动分析并计算结果。

5.3 统计学方法 采用 SPSS 11.5 统计软件包进行统计学处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组均数间比较采用 t 检验, 多组间计量资料比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

各组 HSP 70 基因表达比较 (表 1) 经荧光 PCR 定量检测得到各组 HSP 70 基因表达的原始拷贝数, 经对数转换后, 进行统计学分析。结果发现: 脾胃湿热证组和脾虚证组 HSP 70 基因表达的水平均高于健康对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与脾虚证组比较, 脾胃湿热证组 HSP 70 基因表达稍高, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 脾胃湿热证组各亚型中, HSP 70 基因的表达水平呈热重于湿 > 湿热并重 > 湿重于热的趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 各组 HSP 70 基因表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HSP 70mRNA (拷贝数/ μgRNA , $\times 10^4$)	拷贝数的对数
脾胃湿热证	22	11.401 $\pm$ 15.095	4.835 $\pm$ 0.406**
湿重于热	4	4.649 $\pm$ 2.703	4.617 $\pm$ 0.237*
湿热并重	12	10.295 $\pm$ 17.568	4.756 $\pm$ 0.410**
热重于湿	6	18.113 $\pm$ 13.582	5.103 $\pm$ 0.445**
脾虚证	16	6.966 $\pm$ 7.177	4.627 $\pm$ 0.549**
健康对照	10	1.091 $\pm$ 0.595	3.979 $\pm$ 0.373

注: 与健康对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

讨 论 HSP 是古老且进化上高度保守的基因调控蛋白, 当机体受到各种有害因素刺激时, 细胞内蛋白质构象发生改变, 产生应激反应, 激活热休克基因, 编码合成 HSP; 而 HSP 作为分子伴侣能促进细胞内蛋白质合成, 从而在维持细胞正常形态和功能, 对抗有害因素方面有重要作用。HSP 70 是 HSP 家族中表达最多, 也是最重要的可诱导性应激蛋白, 基本上在所有细胞 (包括胃黏膜细胞) 中表达, 因而受到学术界的广泛关注。

研究表明, HSP 70 在减轻胃黏膜炎症和维持胃黏膜完整中有重要作用^[5]。胃黏膜对阿司匹林诱导胃黏膜损害的抵抗力增强与胃黏膜 HSP 70 表达增加密切相关; 离体培养胃黏膜上皮经高温、低浓度乙醇、健脾益气中药等预处理后, HSP 70 合成增加, 细胞对随后无水乙醇、水浸等刺激的耐受力也明显加强^[6,7]。本研究初步证实, 慢性浅表性胃炎 (包括脾胃湿热证及脾气虚证) 患者 HSP 70 表达水平明显高于健康对照组, 这应该与炎症诱导机体加快合成 HSP 70 以保护细胞和减轻炎症导致的胃黏膜损伤有关。《素问·生气通天论》: “阳者, 卫外而为固也”, 当机体受到刺激时, 阳气奋起抗邪以保护机体免受侵袭, 这与 HSP 70 在不良环境因素刺激下高表达以提高细胞对应激原的耐受能力, 使机体免受应激所引起的损伤等功能有相似之处。《素问·阴阳应象大论》: “阳胜则热”、“气有余便是火”; 《医编·气》: “阳气者, 温暖之气也”, 研究发现, HSP 70 表达与中医的“热证”有一定的相关性, 具有证的特异性^[8,9]。本研究中脾胃湿热证各亚型胃黏膜 HSP 70 表达水平呈热重于湿 > 湿热并重 > 湿重于热的趋势, 也提示机表现出“热证”越明显, HSP 70 的表达可能会越多。同时由于“湿胜则阳微”, 湿为阴邪, 易损伤阳气, 脾胃湿热证各亚型 HSP 70 表达趋势也提示: “湿邪”可能会在一定程度上抑制 HSP 70 的表达。至于脾气虚证 HSP 70 的表达低于脾胃湿热证, 则可能与气虚不足以奋起抗邪有关。总之, 根据 HSP 70 本身的功能、特点以及在本组病例的上述研究结果, 本研究初步提出 HSP 70 可能属于人体正气中“阳气”范畴的观点。为进一步探讨中医证候形成的机制, 揭示脾胃虚实证候的实质提供一定的研究思路。

参 考 文 献

[1] 中华医学会消化病学学会. 全国慢性胃炎研讨会共识意见[J]. 中华消化杂志, 2000, 20(3): 199-201.
Speciality Committee of Chinese Medical Association on the Digestive Disease. The common opinion on chronic gastritis at nation-wide academic seminar, China[J]. Chin J Dig, 2000, 20(3): 199-201.

[2] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则 (试行)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 362-371.
Zheng XY, ed. Guiding principle of clinical research on new drugs of traditional Chinese medicine[S]. Beijing: China Medic-Pharmaceutical Sciences and Technology Publishing House, 2002: 362-371.

- [3] Morris T, Robertson B, Gallagher M. Rapid reverse transcription-PCR detection of hepatitis C virus RNA in serum by using the TagMan fluorogenic detection system[J]. J Clin Microbiol, 1996, 34(12): 2933-2936.
- [4] Gelmini S, Orlando C, Sestini R, et al. Quantitative polymerase chain reaction-based homogeneous assay with fluorogenic probes to measure c-erbB-2 oncogene amplification[J]. Clin Chem, 1997, 43(5): 752-758.
- [5] Pierzchalski P, Krawiec A, Ptak-Belowska A, et al. The mechanism of heat-shock protein 70 gene expression abolition in gastric epithelium caused by *Helicobacter pylori* infection[J]. Helicobacter, 2006, 11(2): 96-104.
- [6] Konturek JW, Fischer H, Konturek PC, et al. Heat shock protein 70 (HSP70) in gastric adaptation to aspirin in *Helicobacter pylori* infection[J]. J Physiol Pharmacol, 2001, 52(2): 153-164.
- [7] Yi P, Li GC, Liu SH, et al. Effect of Xiaokuiling Prescription on the expression of HSP 72, HSP B in gastric mucosa of patients with *Helicobacter pylori* - associated duodenal ulcer[J]. J Tongji Med Univ, 2001, 21(4): 310-311.
- [8] 王洪琦, 邹素芬, 李建国. 清热复方对热休克大鼠肝、肺组织热休克蛋白基因表达的调控作用[J]. 广州中医药大学学报, 2004, 21(1): 37-39.
- Wang HQ, Zou SF, Li JG. Regulatory effect of prescriptions for clearing away heat on gene expression of heat shock proteins in liver and lung tissues of heat shock rats[J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med, 2004, 21(1): 37-39.
- [9] 胡晨霞, 王静元, 唐远. 广东凉茶对热休克大鼠肝组织 HSP70 基因表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(5): 1079-1080.
- Hu CX, Wang JY, Tang Y. Effects of herbal tea of Guangdong on expression of HSP 70 in liver tissues of heat shock rats[J]. China Arch Tradit Chin Med, 2008, 26(5): 1079-1080.
- (收稿: 2009-03-23 修回: 2009-09-20)

胃复春对胃黏膜不典型增生中 iNOS、COX-2 表达的影响

王绍华 何生华

胃黏膜不典型增生也称异型增生, 是一种常见的消化系统疾病, 属癌前病变。幽门螺杆菌(Hp)感染是胃黏膜不典型增生的重要发病因素^[1]。近年的研究表明, 环氧化酶-2(cyclooxygenase-2, COX-2)的过度表达与许多肿瘤的发生、发展和转移有关^[2], 为了探讨诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、COX-2 与胃黏膜不典型增生的关系及胃复春的保护作用, 我们采用免疫组化技术对用药前后的胃黏膜组织中 iNOS、COX-2 的表达进行了检测, 现报告如下。

资料与方法

1 一般资料 46 例为本院 2006 年 4 月—2007 年 10 月消化内科住院和门诊患者, 均经快速尿素酶试验、病理学及免疫组化检测, 确诊为胃黏膜不典型增生。其中男 32 例, 女 14 例; 年龄为 35~78 岁, 平均(57.40±6.53)岁; 病程 8 个月~28 年, 平均(10.60±3.74)年; 其中 Hp 阳性者 38 例, Hp 阴性者 8 例。患者均有食欲减退、恶心、嗝气、上腹部饱胀或钝痛等症状中的一项或多项。

2 用药方法 口服胃复春片(主要成分: 菱角、三七、香茶菜、枳壳等, 杭州胡庆余堂制药厂生产, 每片

0.359 g, 生产批号: 20060120), 每次 4 片, 每日 3 次。治疗期间停用其他相关药物, 3 个月为 1 个疗程, 连服 2 个疗程。

3 观察项目及检测方法 采用 SP 免疫组化法, 检测胃复春治疗前后胃黏膜组织中 iNOS、COX-2 的表达水平及 Hp 阳性患者的转阴率。

4 计算机图像分析 COX-2 的蛋白表达免疫组化结果分析: iNOS、COX-2 的免疫组织化学半定量分析采用 HPIAS 2000 型图像分析软件(同济千屏影像工程公司研制), 分析方法为在放大 400 倍图像的区域每个标本依次选取 5 个视野, 染色阳性部位的深浅及范围以平均光密度(IDP)表示。

5 统计学方法 采用 SPSS 10.0 统计软件, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 治疗前后比较采用 *t* 检验, 对组间比较进行 χ^2 检验, iNOS 与 COX-2 表达相关性用 Spearman 等级相关分析, 检验水平 $\alpha = 0.05$ 。

结果

1 46 例患者用药前后 iNOS、COX-2 在组织细胞中的表达(表 1) iNOS 表达阳性细胞为细胞浆染成棕黄色细颗粒状, 用药后明显减少($P < 0.01$); 而 COX-2 阳性染色于细胞浆中呈棕黄色分布, 用药前后表达亦有明显变化($P < 0.05$); 且 iNOS 与 COX-2 的表达呈正相关($r = 0.785, P < 0.05$)。

作者单位: 湖北省中山医院急诊科(武汉 430030)

通讯作者: 王绍华, Tel: 15871381045, E-mail: wsh7755@126.com