慢性萎缩性胃炎中医证型与 *Hp*、IL-1 β 及其基因多态性的相关性

张剑治 冯全林 胡漪璐 杨 悌 张 颖

摘要 **目的** 探讨慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)患者中医证型与幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *Hp*)感染、白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)及其基因(IL-1B)多态性的相关性。**方法** 招募 192 例 CAG 患者及 202 名健康对照者(正常对照组),采用¹³C 呼气法及金标法检测 *Hp*; ELISA 法检测外周血浆 IL-1 β 含量;采用聚合酶链式反应-限制酶切多态性(polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP)分析 IL-1B 基因多态性。**结果** CAG 患者证型以脾胃虚弱证(31.77%, 61/192)为主。CAG 患者 *Hp* 感染率为 53.65% (103/192),其中以脾胃湿热证(64.86%, 24/37)及肝胃不和证(66.67%, 24/36)患者感染率较高。与正常对照组比较,脾胃湿热、肝胃不和及瘀血阻络证 CAG 患者血浆 IL-1 β 水平明显升高(均 $P < 0.05$)。正常对照组与 CAG 病例组 IL-1B 基因多态性分布比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** CAG 的发病风险与 IL-1B 的基因多态性无相关性,但其中医证型与患者 *Hp* 感染及外周血 IL-1 β 水平相关。

关键词 慢性萎缩性胃炎;中医证型;*Hp* 感染;白细胞介素 1 β ;基因多态性

Correlation Study on Chinese Medical Syndrome Types of Chronic Atrophic Gastritis Patients, *Hp*, and IL-1 β Polymorphism ZHANG Jian-zhi, FENG Quan-lin, HU Yi-lu, YANG Ti, and ZHANG Ying Department of Laboratory Medicine, Kunshan Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu (215300)

ABSTRACT **Objective** To explore the correlation between Chinese medical (CM) syndrome types of chronic atrophic gastritis (CAG) patients and *Helicobacter pylori* (*Hp*) infection, polymorphisms of IL-1B, and IL-1 β . **Methods** Totally 192 CAG patients and 202 healthy subjects (as the healthy control group) were recruited in this case-control study. The *Hp* infection was tested by ¹³C-urea breath test and colloidal gold-labeled assay (GICA). The concentration of peripheral blood IL-1 β was measured by ELISA. The polymorphisms of IL-1B gene in the promoter region were analyzed using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). **Results** Pi-Wei weakness syndrome (PWWS) was dominant in CAG patients (31.77%, 61/192 cases). The *Hp* infection ratio in CAG patients was 53.65% (103/192 cases), of which, Pi-Wei damp-heat syndrome (PWDHS, 64.86%, 24/37 cases) and Gan-Wei disharmony syndrome (GWDS, 66.67%, 24/36 cases) were dominant. Compared with the health control group, the plasma concentration of IL-1 β was obviously elevated in CAG patients with PWDHS, GWDS, and static blood obstructing collaterals syndrome (SBOCS) (all $P < 0.05$). Additionally, there was no difference in the distribution of polymorphisms in the promoter region of IL-1B gene between the CAG patients and the healthy control group ($P > 0.05$). **Conclusions** The incidence risk of CAG was not associated with IL-1B polymorphism. But CM syndrome types of CAG patients was associated with *Hp* infection and peripheral blood IL-1 β levels.

KEYWORDS chronic atrophic gastritis; Chinese medical syndrome type; *Helicobacter pylori* infection; interleukin-1 β ; gene polymorphism

基金项目:江苏省中医药局科技项目(No.LZ13157);江苏省卫生计生委科研课题(No.YB2015105);昆山市科技发展项目(No.KS1361, No.KS1259)

作者单位:南京中医药大学昆山附属医院检验科(江苏 215300)

通讯作者:张颖, Tel: 0512-57310000 转 3398, E-mail: kszyy_zy@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.12.1433

慢性萎缩性胃炎 (chronic atrophic gastritis, CAG) 是消化系统的常见病与疑难病。临床研究表明, CAG 是由多种因素导致的胃黏膜上皮遭受反复损害导致固有腺体的减少, 并在此基础上伴发的肠上皮化生和异型增生, 因此被认为与胃癌的发生相关^[1]。中医对 CAG 进行辨证分型施治是获得良好治疗效果的前提, 此外结合幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 感染状态的检测对预测疾病的转归具有极其重要的意义^[2]。目前研究认为, Hp 感染引起患者免疫反应, 并对胃部疾病进展有重要影响^[3]。亦有研究显示, 患者的炎症相关基因的遗传背景差异导致疾病进展不同^[4]。近年来, 有关中医学对 CAG 治疗涉及患者的免疫状态及遗传背景的内容鲜有报道。本研究分析 CAG 中医证型与患者外周血白细胞介素 1 β (interleukin 1 β , IL-1 β) 含量及其基因 (IL-1B) 启动子区基因多态性和 Hp 感染的关系, 以期为中医辨证施治提供依据。

资料与方法

1 诊断标准 参照 2006 年 9 月上海第二届全国慢性胃炎诊治共识会议制定的《中国慢性胃炎共识意见》中 CAG 的诊断标准^[5], 所有患者经胃镜检查病理证实为胃黏膜上皮和腺体萎缩, 或伴有肠化及不典型增生。中医辨证分型参照中华中医药学会脾胃病分会制定的《慢性萎缩性胃炎中医诊疗共识意见》(2009, 深圳), 将其分为脾胃虚弱、肝胃不和、脾胃湿热、胃阴不足、瘀血阻络 5 型^[6,7]。

2 纳入与排除标准 纳入标准: (1) 年龄 18 ~ 70 岁; (2) 符合 CAG 诊断标准及中医辨证分型标准; (3) 患者知情同意。排除标准: (1) 2 周内服用治疗慢性胃炎相关药物者; (2) 合并其他消化道疾病者; (3) 病理诊断疑有癌变或接受外科手术者; (4) 严重心、肝、肾等重要脏器功能障碍者。

3 一般资料 192 例均为 2012 年 1 月—2013 年 12 月因胃部不适就诊于昆山市中医医院脾胃病科门诊, 并经电子胃镜活检及病理分析初次确诊为 CAG 的患者, 所有患者在诊断前均未接受药物治疗, 无其他重大疾病史。男性 117 例, 女性 75 例, 年龄 19 ~ 68 岁, 平均 (53.31 $\pm$ 13.23) 岁。其中脾胃虚弱证 61 例 (31.77%)、胃阴不足证 42 例 (21.88%)、脾胃湿热证 37 例 (19.27%)、肝胃不和证 36 例 (18.75%) 及瘀血阻络证 16 例 (8.33%)。同时招募本院体检中心健康对照 (正常对照) 组 202 名, 所有受试者均经临床体检未见异常结果, 体检结论为正常且主诉无胃部不适及胃疾病史。其中男性 128 名, 女性 78 名, 年龄

21 ~ 71 岁, 平均 (52.57 $\pm$ 11.23) 岁。两组性别、年龄比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

4 试剂 ¹³C 呼气实验试剂盒购自 Isodiagnostika 公司; IL-1 β ELISA 检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司; 金标法检测血清 Hp 抗体试剂盒购自北京康美天鸿生物科技有限公司; DNA 提取试剂盒为美国 Omega 公司产品; RNA 酶及蛋白酶 K 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; DNA 聚合酶由 Takara 公司提供; 限制性内切酶 Alu I 及 Ava I 均为 Fermentas Life Sciences 公司产品; PCR 扩增所用的引物由上海 Invitrogen 有限公司合成。

5 观察指标及检测方法

5.1 Hp 感染检测 受试者经 ¹³C 呼气实验及金标法检测 Hp 感染情况, 二者同时为阳性确认为 Hp 感染阳性, 实验均参照说明书步骤完成。

5.2 血浆 IL-1 β 含量检测 采集受试者全血, 经 EDTA-K₂ 抗凝, 并经离心分离血浆 (400 $\times$ g, 5 min)。采用 ELISA 法对 CAG 患者及正常对照组血浆 IL-1 β 含量进行检测, 实验操作步骤参照产品说明书进行。

5.3 基因组 DNA 提取及 IL-1B 基因分型检测

5.3.1 DNA 提取 受试者采集全血经 EDTA-K₂ 抗凝, 分离血浆后的血细胞直接冷冻于 -80 $^{\circ}$ C 保存, 用于后期基因组 DNA 提取, 实验步骤依照试剂盒说明书进行。

5.3.2 IL-1B 基因分型 采用聚合酶链式反应-限制酶切多态性 (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, PCR-RFLP) 技术分析 IL-1B (IL-1B-31、-511 位点) 基因多态性。经 PCR 扩增后产物分别用 Alu I (IL-1B-31)、Ava I (IL-1B-511) 限制性内切酶进行酶切, 然后进行琼脂糖凝胶电泳分型, 具体方法见表 1。

6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计学软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验; 计数资料采用 χ^2 检验, 并通过比值比 (odds ratio, OR) 计算进行相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 CAG 患者与正常对照组 Hp 感染情况及血清 IL-1 β 含量比较 (表 2) 在 CAG 患者中共检出 103 例 (53.65%) Hp 感染, 其感染率明显高于正常对照组 (87 例, 43.07%, $P = 0.036$)。CAG 患者各证型中, 肝胃不和证 (24/36, 66.67%) 及脾胃湿热证患者 (24/37, 64.86%) Hp 感染率明显高于正常对照组 ($P < 0.05$)。其余各证型 CAG 患者 Hp 感染率与正

表 1 PCR-RFLP 法分析 IL-1B 基因多态性

多态性位点	引物序列	限制性内切酶	酶切片段 (bp)	基因型
IL-1B-31	上游:5'-AGAAGCTTCCACCAATACTC-3' 下游:5'-AGCACCTAGTTGTAAGGAAG-3'	Alu I	137, 97, 5	T/T
			234, 137, 97, 5	C/T
			234, 5	C/C
IL-1B-511	上游:5'-GCCTGAACCCTGCATACCGT-3' 下游:5'-GCCAATAGCCCTCCCTGTCT-3'	Ava I	156	T/T
			156, 88, 68	C/T
			88, 68	C/C

常对照组比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

与正常对照组比较,CAG 组患者外周血 IL-1 β 浓度明显升高($P < 0.05$)。在 CAG 各分型中,脾胃湿热、肝胃不和及瘀血阻络证患者 IL-1 β 浓度亦高于正常对照组(均 $P < 0.05$)。

讨 论

CAG 因与胃癌的发生关系密切,因此受到临床普遍关注。近年来报道显示,中医在治疗 CAG 上显示一定优势^[8]。中医治疗 CAG 注重辨证施治,针对不同患者的具体体征进行方药及剂量的调整,因此获得较好的疗效。本次调查的 192 例 CAG 患者中证型以脾胃虚弱证为主,其他证型依次为胃阴不足、脾胃湿热、肝胃不和及瘀血阻络证。脾胃湿热、肝胃不和及瘀血阻络证患者 IL-1 β 呈较高水平,且 Hp 感染率相对较高,然而正常对照组及 CAG 组 IL-1B 启动子区基因多态性分布比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 CAG 患者与正常对照组 Hp 感染情况及血清 IL-1 β 含量比较

组别	例数	Hp 感染 [例(%)]	IL-1 β (ng/L, $\bar{x} \pm s$)
正常对照	202	87(43.07)	14.79 $\pm$ 12.71
CAG	192	103(53.65)*	28.32 $\pm$ 11.24*
脾胃虚弱	61	28(45.90)	14.81 $\pm$ 10.89
胃阴不足	42	18(42.86)	16.32 $\pm$ 12.63
脾胃湿热	37	24(64.86)*	27.35 $\pm$ 9.97*
肝胃不和	36	24(66.67)*	30.39 $\pm$ 15.52*
瘀血阻络	16	9(56.25)	24.51 $\pm$ 13.38*

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$

2 CAG 患者及正常对照组 IL-1B 基因多态性分析(表 3) 正常对照组 3 个位点的基因型分布频率符合哈温-伯格平衡,具有群体代表性。CAG 组与正常对照组 3 个基因多态性位点的基因型分布频率比较,差异无统计学意义($P > 0.05$),杂合突变型及纯合突变型与野生基因型比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 CAG 患者与正常对照组 IL-1B 基因多态性与 CAG 发生的风险分析

基因型	CAG 组 [例数(%)]	正常对照组 [人数(%)]	OR (95% CI)*	P 值
IL-1B-31				
TT	30(15.3)	42(22.8)	参照	0.122
CT	100(51.0)	112(55.1)	1.26(0.71, 2.16)	
CC	62(33.7)	48(22.1)	1.82(0.98, 3.32)	
IL-1B-511				
CC	34(18.4)	44(29.1)	参照	0.149
TC	98(50.0)	112(55.9)	1.14(0.66, 1.93)	
TT	60(31.6)	46(15.0)	1.69(0.92, 3.05)	

注:* 指经性别、年龄、吸烟、饮酒调整后

本研究中 192 例 CAG 患者的证型分析与魏玉霞等^[9]报道的结果一致。脾胃虚弱为多数 CAG 患者的特征,此可能与 Hp 感染相关。本研究显示 CAG 的 Hp 感染率明显高于正常对照组。陈润花等^[10]对 200 例 CAG 病例观察亦发现 Hp 感染率相对较高,与本研究结果相一致。相关研究报道证实, Hp 菌体表面的脂多糖、脲素酶及细胞毒素是引起患者免疫反应的因素,决定患者感染后的疾病进展^[11]。

中医学认为, Hp 属于中医学“邪气”、“热毒”范畴,脾胃亏虚是 Hp 能侵入体内引起疾病的前提之一,且 CAG 病程一般较长,日久则正气渐虚而致脾胃虚弱。此与现代医学中的免疫反应、Hp 感染、疾病进展基本相同。然而,CAG 患者证型与 Hp 感染因果关系较为复杂。本研究结果显示,192 例 CAG 患者中, Hp 感染率在各证型中分布依次为肝胃不和、脾胃湿热、瘀血阻络、脾胃虚弱、胃阴不足,此与刘兴山等^[12]对 287 例 CAG 患者研究发现 Hp 感染与 CAG 证型分布结果相近,但该研究报道 Hp 的总体感染率为 69.34%,较本研究的总体感染率高,此可能因 Hp 感染率地区差异所致。

IL-1 β 是由辅助性 T 细胞亚群 Th1 细胞分泌的一种促进炎症反应的细胞因子。本研究结果显示,在 CAG 患者血清中 IL-1 β 含量较正常对照组高,且 Hp 感染率较高的脾胃湿热组、肝胃不和组及瘀血阻络组 IL-1 β 含量较正常对照组高。这提示 Hp 感染

后,刺激机体分泌炎症因子 IL-1 β ,进而引起炎症反应。动物实验研究亦证实, *Hp* 感染后会导致 IL-1 β mRNA 水平增高而胃酸分泌却显著减少,提示 IL-1 β 在胃部疾病进展中起着重要的作用^[13]。然而本研究并未发现 IL-1B 启动子区的基因多态性与 CAG 发病的相关性,本研究结果与 Murphy G 等^[14]的研究结果相一致。

综上所述,本研究结果提示中医 CAG 的证型与 *Hp* 的感染及患者外周血清 IL-1 β 水平相关,提示中医治疗 CAG 时应关注患者的 *Hp* 感染状况及患者的 IL-1 β 水平。

参 考 文 献

- [1] 黄永辉,周丽雅,林三仁,等.胃黏膜萎缩、肠上皮化生及异型增生的放大内镜表现及其诊断价值[J].中华消化内镜杂志,2005,22(4):231-235.
- [2] Terasawa T, Nishida H, Kato K, et al. Prediction of gastric cancer development by serum pepsinogen test and *Helicobacter pylori* seropositivity in Eastern Asians: a systematic review and meta-analysis[J]. PLoS One, 2014, 9(10): e109783.
- [3] 王冬青,丁西平,殷实.促炎细胞因子在胃癌前病变中的作用[J].世界华人消化杂志,2014,22(1):39-45.
- [4] Yin M, Hu Z, Tan D, et al. Molecular epidemiology of genetic susceptibility to gastric cancer: focus on single nucleotide polymorphisms in gastric carcinogenesis[J]. Am J Transl Res, 2009, 1(1): 44-54.
- [5] 中华医学会消化病学分会.中国慢性胃炎共识意见[J].

- 胃肠病学和肝脏学杂志,2006,11(11):674-684.
- [6] 中华中医药学会脾胃病分会.慢性萎缩性胃炎中医诊疗共识意见(2009,深圳)[J].中国中西医结合消化杂志,2009,18(5):345-348.
- [7] 丁成华,李晶晶,方芳,等.慢性萎缩性胃炎中医病机与证候分布规律研究[J].中华中医药杂志,2011,26(3):582-586.
- [8] 周阿高,李琰.中医药治疗慢性萎缩性胃炎文献荟萃分析[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(1):120-123.
- [9] 魏玉霞.慢性萎缩性胃炎近10年中医文献研究[D].北京:北京中医药大学,2012.
- [10] 陈润花,张厂,苏泽琦,等.幽门螺杆菌相关性慢性胃炎中医证候分类研究[J].北京中医药大学学报,2014,37(3):156-159.
- [11] Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer[J]. J Clin Invest, 2007, 117(1): 60-69.
- [12] 刘兴山,郝筱倩,杨斌.中医舌诊、辨证在幽门螺旋杆菌相关慢性萎缩性胃炎诊治中的意义[J].中医研究,2010,23(1):32-34.
- [13] Takashima M, Furuta T, Hamai H, et al. Effects of *Helicobacter pylori* infection on gastric acid secretion and serum gastrin levels in Mongolian gerbils[J]. Gut, 2001, 48(3): 765-773.
- [14] Murphy G, Thornton J, McManus R, et al. Association of gastric disease with polymorphisms in the inflammatory-related genes IL-1 β , IL-1RNIL-10, TNF and TLR4[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2009, 21(3): 630-635.

(收稿:2014-09-05 修回:2015-8-10)