

· 临床论著 ·

慢性萎缩性胃炎患者腻苔优势菌群组成及 E-黏附因子和细胞间黏附因子-1 的水平

王慧雯¹ 李 莉² 李福凤¹ 郭春荣¹ 张红凯¹ 张伟妃¹ 李 雪¹ 孙祝美³

摘要 目的 分析慢性萎缩性胃炎患者腻苔优势菌群类型及下游黏附因子的变化情况。**方法** 实验分为 3 组:慢性萎缩性胃炎患者腻苔组(30 例)、慢性萎缩性胃炎患者非腻苔组(30 例)和健康对照苔组(30 名,均为薄白苔)。采用巴氏染色法观察舌苔脱落细胞形态学特征;采用 16S rRNA 基因测序技术对舌苔的菌群进行研究;运用 ELISA 对各组舌苔进行 E-黏附因子和细胞间黏附因子-1(ICAM-1)检测。**结果** (1)舌苔脱落细胞形态特征:腻苔组的细胞形态较小,胞浆呈橘红色,细胞核较模糊或已消失;非腻苔组中细胞多呈圆形或椭圆形,胞浆呈橘红色,细胞核大多固缩;(2)舌苔微生物菌群:属分类水平上相对丰度较高的物种依次是链球菌属、奈瑟氏菌属、普氏菌-7 属、韦荣球菌属、莫氏杆菌属、纤毛菌属。健康对照组的链球菌属含量高于其他两组($P < 0.01$);奈瑟氏菌属 3 组之间没有明显差异;普氏菌-7 属腻苔组较其他两组明显下降($P < 0.01$);韦荣球菌属非腻苔组较其他两组明显增加($P < 0.05$);莫氏杆菌属在腻苔组明显较其他两组增加($P < 0.01$);(3)舌苔液中 E-黏附因子和细胞间黏附因子-1 表达腻苔组较其他两组明显增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。**结论** 慢性萎缩性胃炎患者不同类型舌苔中的微生物优势菌属大致相同,但腻苔组患者舌苔中微生物的优势菌属(链球菌属、普氏菌-7 属和莫氏杆菌属)含量发生变化,下游的 E-黏附因子和细胞间黏附因子-1 在腻苔组患者中高表达,说明这些物质可能与腻苔的形成有密切关系。

关键词 慢性萎缩性胃炎;腻苔;16S rRNA;E-黏附因子;细胞间黏附因子-1

Study on the Compositions of Dominant Bacteria and Determination of E-adhesion Factor and ICAM-1 in Chronic Atrophic Gastritis WANG Hui-wen¹, LI Li², LI Fu-feng¹, GUO Chun-rong¹, ZHANG Hong-kai¹, ZHANG Wei-fei¹, LI Xue¹, and SUN Zhu-mei³ 1 Teaching Experimental Center, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (201203); 2 Department of Gastroenterology, Shuguang Hospital, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (200021); 3 Department of Biology, College of Basic Medical Sciences, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai (201203)

ABSTRACT Objective To analyze the types of dominant flora and changes of downstream adhesion factors in different tongue coatings of chronic atrophic gastritis (CAG) patients. **Methods** The subjects were assigned to 3 groups: CAG patients with greasy tongue coating group (30 cases), CAG patients with non-greasy tongue coating group (30 cases), and healthy subjects group with thin-white tongue coating (30 cases). The morphological features of cast-off cells of the tongue coating were observed using pap staining. The flora of tongue coating were analyzed by 16S rRNA gene sequence technique. Protein expressions of E- adhesion factor and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) were detected using ELISA. **Results** (1) The morphological features of cast-off tongue coating cells of CAG patients: In CAG patients with greasy tongue coating group, most cells were small, orange or pink was stained in the cytoplasm, cell nucleus was blurred or disappeared. In CAG patients with non-greasy

项目基金:国家自然科学基金资助项目(No. 81403273, 81373555);上海市卫计委青年基金资助项目(No. 2014JQ028A)

作者单位:1. 上海中医药大学教学实验中心(上海 201203); 2. 上海中医药大学附属曙光医院脾胃科(上海 200021); 3. 上海中医药大学基础医学院生物教研室(上海 201203)

通讯作者:孙祝美, Tel: 021-51322585, E-mail: sunzhumei2000@126.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180606.134

tongue coating group, most cells were round or oval, edge curl, orange or pink was stained in the cytoplasm, cell nucleus was observed. (2) We analyzed the tongue coating's dominant microbe. The results showed the higher relative abundance of genus were *Streptococcus*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Prevotella-7*, *Veillonella*, and *Leptotrichia* at genus level. At the same time, we compared the bacterial content among the three groups. *Streptococcus* content was significantly higher in the healthy subjects group than in the other two groups ($P < 0.01$). No obvious differences of *Neisseria* existed among the three groups ($P > 0.05$). The content of *Prevotella-7* in the greasy tongue coating group was significantly lower than that in the other two groups ($P < 0.01$). Compared with the other two groups, the content of *Veillonella* in the non-greasy tongue coating group increased ($P < 0.05$). *Moraxell* were significantly decreased in the greasy tongue coating group more than in the other two groups ($P < 0.01$). (3) The contents of tongue coating of E-adhesion factor and ICAM-1 were significant higher in CAG patients with greasy tongue coating group than in the other two groups ($P < 0.05$). Conclusions Similar dominant microbes exist in CAG patients with different tongue coatings. But contents of dominant microbes (*Streptococcus*, *Prevotella-7*, and *Moraxell*) changed in CAG patients with greasy tongue coating group. Downstream E-adhesion and ICAM-1 were highly expressed in them, indicating these substances might be closely correlated with the formation of greasy tongue coating.

KEYWORDS chronic atrophic gastritis; greasy tongue coating; 16S rRNA; E-adhesion factor; inter-cellular adhesion molecule-1

舌诊是通过观察舌苔、舌质的变化来了解机体生理功能和病理变化^[1]。近年来,国内外专家对舌苔客观化的研究主要采用细胞生化、代谢组学、蛋白组学、微生物学等方法和技术,并取得相应成果^[2-4]。但目前专门针对腻苔形成机制的研究报道较少,散见于一般的舌苔报道中。本课题组在研究中发现,脾胃疾病尤其是慢性胃炎患者中,腻苔比例高达 64%^[5]。慢性萎缩性胃炎(chronic atrophic gastritis, CAG)作为一种癌前状态,及早诊断、早期治疗对预防癌变意义重大^[6-9]。本次研究采用 16S rRNA 基因检测技术对舌苔中的微生物优势菌群进行研究,同时对下游黏附因子的含量进行测定,研究慢性萎缩性胃炎腻苔微生物菌群特点,以期了解腻苔形成的生物学基础。

资料与方法

1 诊断标准 参照 2012 年中华医学会消化病学分会制定的《中国慢性胃炎共识意见(2012 年,上海)》,结合内镜诊断与病理组织学诊断结果确诊为 CAG^[8]。

2 纳入、排除标准 纳入标准:(1)符合慢性萎缩性胃炎诊断标准;(2)年龄:18~80 岁;(3)签署知情同意书。排除标准:(1)合并胃息肉、胃出血、胃癌及肠道疾病患者;(2)合并严重的肝、心、肾、肺、脑等脏器疾病或精神病患者;(3)妊娠或准备妊娠妇女,哺乳期妇女;(4)过敏体质或多种药过敏的患者。

3 舌苔分类标准 参照《中医诊断学》舌苔分类标准^[10],腻苔的特征主要是苔质颗粒细腻致密紧贴于

舌面,刮之不易脱落。上海中医药大学附属曙光医院脾胃科病房及胃镜室进行样本采集,由 2 位有经验的医师采用盲法判读舌象;同时采用上海中医药大学自行研制的 DKF-II 型舌、面诊数字化分析仪自动检测判读舌象,判定不一致者,则该样本排除,最后选用判读一致的舌象样本。

4 一般资料 2015 年 3 月—2016 年 3 月在上海中医院大学附属曙光医院脾胃科病房及胃镜室收集内镜检查结合病理报告确诊为 CAG 患者 60 例,采集患者的舌象图片及舌苔样本,填写慢性胃炎量表记录内镜报告及病理组织学报告结果。健康对照组来源于上海中医药大学在校教师及学生(经常规体检报告结合填写的健康人调查表,显示没有全身各系统器质性病变,并排除近 1 个月内舌、口、鼻、咽等局部病变的正常人,舌质淡红、苔薄白而润)。

临床采集慢性萎缩性胃炎腻苔 30 例为腻苔组,男性 13 例,女性 17 例,以白厚腻苔为主,平均年龄(58.25 ± 11.28)岁;慢性萎缩性胃炎非腻苔 30 例为非腻苔组,男性 16 例,女性 14 例,以薄苔为主,平均年龄(48.23 ± 15.53)岁;健康对照组 30 名,男性 11 名,女性 19 名,均为薄白苔,平均年龄(45.50 ± 8.90)岁。3 组病例在年龄、性别的分布上比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。本研究经上海中医药大学伦理委员会批准(审批号:[2014]科研备一号)。

5 舌苔样本采集 嘱患者用 100 mL 生理盐水漱口 2 次后,医生使用经高温高压消毒的不锈钢小药

匙分两次在患者舌苔较厚部位刮取适量舌苔样本,采集后立即置放于保温桶中,待全部采样结束后,最后置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱冷冻保存备用。

6 观察指标及方法

6.1 舌苔脱落细胞形态学特征 采用巴氏染色法,观察各组舌苔脱落细胞的形态学特征。

6.2 腻苔的优势菌群研究 采用 QIAGEN DNeasy Blood&Tissue KIT 对舌苔样本进行 DNA 的提取,抽提好的微生物的 DNA 进行 PCR 扩增,反应程序如下:预变性温度 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min, 1 个循环;变性温度 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s, 30 个循环;退火温度是 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s, 30 个循环,延伸的温度是 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 30 s, 30 个循环;终末延伸温度 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 min, 1 个循环。引物 V4 区 515F: GTGCCAGCMGCCGCGGTAA 和 806R: GGACTACHVGGGTWTCTAAT。扩增后配置 2% 的琼脂糖电泳对 PCR 的产物进行电泳质检后待用。扩增后的 DNA 基于 Illumina HiSeq 测序平台,利用双末端测序的方法,构建小片段的文库进行双末端测序,对所获得测序片段拼接过滤。物种丰度分析主要是选取每组样品在属水平上最大丰度排名前十的物种,生成物种相对丰度柱形累加图,以便直观查看在属分类水平上相对丰度较高的物种揭示样品物种组成。

6.3 舌苔的下游黏附因子测定 通过酶联免疫检测试剂盒测试舌苔液中的 E-黏附因子和细胞间黏附因子-1 (ICAM-1) 含量。

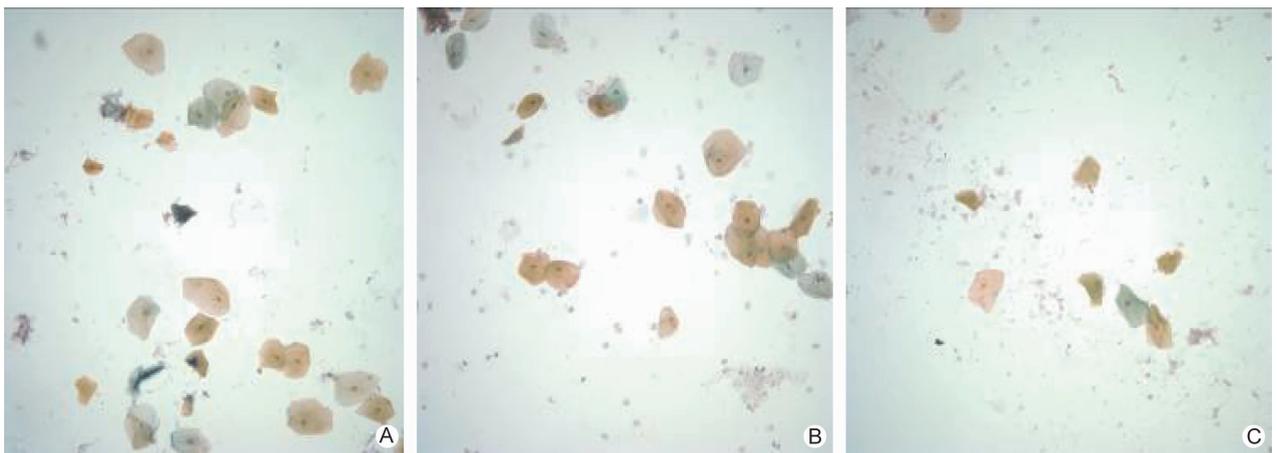
7 统计学方法 用 GraphPad Prism5 软件统计,数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析及 t 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

1 各组舌苔脱落细胞形态学特征(图 1) 健康对照组(图 1A)大多数细胞呈椭圆形,胞浆呈橘红色,细胞核染色深,一部分细胞胞浆呈浅蓝色;非腻苔组(图 1B),细胞多呈圆形或椭圆形,部分边缘卷曲,胞浆呈橘红色,细胞核大多固缩,说明未完全角化上皮细胞占绝大多数,并且有部分表层角化前细胞和淋巴细胞,涂片背景清晰,杂质少;腻苔组(图 1C),细胞形态大多较小,胞浆呈橘红色,细胞核较模糊或已消失,说明完全角化上皮细胞占绝大多数。从舌苔脱落细胞染色可见,腻苔组的细胞形态发生变化,角化细胞占较大比例。

2 各组舌苔的优势菌群和优势菌群的含量(图 2,表 1) 舌苔微生物菌属排名前五名的分别是链球菌属、奈瑟氏菌属、普氏菌-7 属、韦荣球菌属和莫氏杆菌属等,但是同一菌属在不同组中的含量并不相同。

健康对照组链球菌属的含量明显高于其他两组 ($P < 0.01$);奈瑟氏菌属 3 组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$);普氏菌-7 属腻苔组较其他两组明显下降 ($P < 0.01$);韦荣球菌属非腻苔组较其他两组明显



注:A 为健康对照组;B 为非腻苔组;C 为腻苔组

图 1 舌苔脱落细胞形态学特征 (巴氏染色, $\times 400$)

表 1 各组舌苔优势菌群含量比较 ($\%$, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	链球菌属	奈瑟氏菌属	普氏菌-7 属	韦荣球菌属	莫氏杆菌属
健康对照	30	26.88 ± 12.78	16.48 ± 10.26	13.38 ± 6.52	5.21 ± 2.47	0.45 ± 0.22
腻苔	30	$16.02 \pm 9.25^{**}$	18.22 ± 7.54	$6.45 \pm 3.56^{**}$	4.90 ± 2.56	$3.44 \pm 1.36^{**}$
非腻苔	30	$18.92 \pm 12.41^{**}$	14.09 ± 8.64	13.12 ± 9.51	$7.46 \pm 4.68^*$	0.85 ± 0.47

注:与健康对照组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$

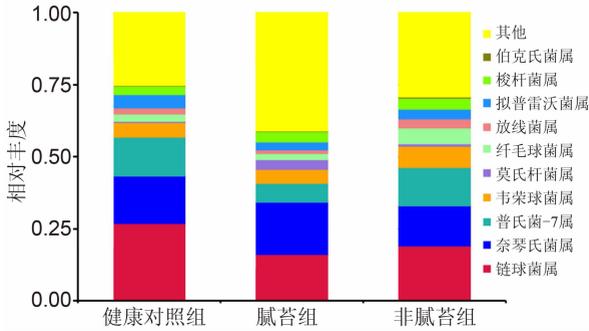


图2 各组舌苔 Top10 的优势菌属

增加($P < 0.05$)；莫氏杆菌属腻苔组较其他两组明显增加($P < 0.01$)。

3 各组舌苔 E-黏附因子和 ICAM - 1 含量比较 (表 2) ICAM-1 和 E-黏附因子含量腻苔组明显高于非腻苔组和健康对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$)，而健康对照组与非腻苔组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组舌苔 E-黏附因子和 ICAM - 1 含量比较 (ng/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	ICAM - 1	E - 黏附因子
健康对照	30	292.2 ± 94.1 *	1 825.4 ± 329.6 **
非腻苔	30	295.4 ± 91.7 *	1 889.5 ± 254.4 **
腻苔	30	390.0 ± 105.8	2 367.4 ± 404.7

注：与腻苔组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

讨 论

中医学认为，舌苔是“胃气之所熏蒸”，“舌为脾之外候，苔乃胃之明徵”，根据中医学理论的整体观念，舌通人体五脏六腑、连四肢百骸，是“观测人体内脏变化的一面镜子”。在舌与脏腑关系中，舌和脾胃的关系最密切，舌为脾胃的外候，舌诊与消化系统关系密切^[11]。舌苔由脾胃之气上熏而成，由于胃气的强弱不同，病邪的性质不同，故形成不同的病理舌苔。有研究表明，慢性胃炎的舌诊特点是舌质暗红或有瘀斑，舌苔腻，舌有齿痕或裂纹等^[12]。腻苔是指舌面上覆盖着一层浊而滑腻的苔垢，苔质至密，颗粒细腻，擦之不去，刮之不脱，呈油腻状，故称腻苔。

目前关于慢性胃炎腻苔形成的现代生物学机制，已经深入到细胞、亚细胞和分子水平，证实舌苔的类型与舌背黏膜上皮细胞的增殖、分化、凋亡和脱落密切相关^[13]。本课题组前期针对慢性胃炎腻苔的形成机制进行了系列研究，探讨了腻苔与胃镜病理的关系，初步筛选出了慢性胃炎患者腻苔的蛋白标志物，并发现慢

性胃炎腻苔与某些代谢物质变化有关，这些代谢物质主要参与能量代谢^[14]。随着医学微生态技术发展迅速，发现人的口腔、胃肠系统都存在天然菌群，他们在人体的健康过程中都起着重要作用，而舌背黏膜这种特殊结构导致舌背表面形成很多裂缝和皱褶，再加上食物残渣的氧化和腐败作用，形成良好的微氧环境，为微生物的定植、生长和繁殖提供适宜的场所^[15]。许多研究表明，疾病与中医舌苔及人体菌群结构关系密切^[16,17]。Hullar MA 等^[17]认为癌症与肠道微生物密切相关，某些细菌菌种直接启动胃肠道恶性肿瘤；赵立平等^[18]在研究肥胖相关的代谢疾病时鉴定出 65 个细菌类群与饮食结构差异或宿主健康状况相关；Jiang B 等^[19]用微生态学方法研究中医寒证(白腻苔)与热证患者(薄白苔)舌苔微生物群变化时发现热证与寒证对应一群特定的微生物特征群，他们构建了舌菌群的失衡网络的寒/热症候相关群。近年来，Cani PD 等^[20]找到一类细菌相关因子——脂多糖将菌群与机体代谢联系起来。

在本研究中，笔者从舌苔微生态学角度出发，利用 16S rRNA 基因测序技术来研究舌苔中的微生物的特征菌群。16S rRNA 是原核细胞生物所共有的核糖体序列，在进化过程中相当保守，既含保守序列又含可变序列，可变序列可用于精确的分类鉴定细菌，可变区所包含的信息足以物种属及属以上分类单位的比较分析，而保守区能反映细菌之间的亲缘关系，故 16S rRNA 基因是微生态研究中常用的靶基因^[21,22]，本选用 V4 的高变区来鉴定细菌的多样性，从研究结果来看，舌苔中的优势菌群的组成基本相同，但是不同菌属的含量在 3 组之间的含量并不相同，其中链球菌属、莫氏杆菌属、普氏菌-7 属、韦荣球菌属在 3 组之间具有明显差异，不同的菌在组间分布并不相同，具有一些特异性差异。特别是莫氏杆菌属在腻苔组的含量远远高于其他组，莫氏杆菌属存在于人和温血动物的器官黏膜上，可发生各种炎症，亦可引起鼻、耳、口腔、肺部等处的炎症，腻苔患者中该类菌群明显增高，可能说明腻苔的形成与这些微生物菌属密切相关。

目前微生物通过 Toll 受体(Toll-like receptor, TLR)来影响机体是较公认的途径。TLR 是一类在天然免疫反应中发挥着极重要作用的受体，此受体最早的发现与果蝇有关，随着研究的深入，发现哺乳动物也有类似的受体，后来统称为 TLR 家族。其中 TLR4 主要识别呼吸道和胞病毒、分支杆菌成分、热休克蛋白、饱和及不饱和脂肪酸等物质，这些都跟体内的微生物密切相关。本研究发现 TLR4 信号通路下游的细胞因

子如 ICAM-1、E-黏附因子等在腻苔组中的含量明显增加,这些因子都与细胞的趋化黏附相关,这也与中医腻苔的本质不谋而合,说明该条信号通路确实与腻苔的关系密切。笔者在以后的工作中会继续对这些因子进行深入研究,为慢性萎缩性胃炎的临床诊断与辨证治疗提供了一定的试验依据,有一定的临床意义,对丰富中医学舌诊理论有良性作用,也为实现用现代语言阐释“舌诊”理论提供了研究思路和方法。

利益冲突:无。

参 考 文 献

- [1] 赵洁,李福凤,钱鹏.舌苔生物信息研究方法与技术概况[J].中医杂志,2011,52(7):612-615.
- [2] 赵立平,张晨虹,费娜,等.以肠道菌群为靶点的代谢病营养干预研究进展[J].中国食品学报,2014,14(1):1-5.
- [3] Kim J, Han GJ, Chio BH, et al. Development of differential criteria on tongue coating thickness in tongue diagnosis [J]. *Complementary Therapies Medicine*, 2012, 10(5): 316-322.
- [4] Wang HH, Pan CH, Wu PP, et al. Alteration of the tongue manifestation reflects clinical outcomes of peptic ulcer disease [J]. *J Alternat Complement Med*, 2012, 18(11): 1033-1044.
- [5] 付晶晶,王忆勤,陆雄,等.慢性胃炎舌象与胃镜象及病理指标的关系研究[J].上海中医药大学学报,2009,23(4):66-67.
- [6] 罗云坚主编.消化科专病中医临床诊治[M].北京:人民卫生出版社,2000:75-77.
- [7] 张小萍,严小军,楚瑞阁.中医对胃癌前期病变机理的探讨[J].江西中药,2003,34(246):13-14.
- [8] 房静远,刘文忠,李兆申,等.中国慢性胃炎共识意见(2012年,上海)[J].中国医学前沿杂志,2013,5(7):44-55.
- [9] 丁成华,李晶晶,方芳,等.慢性萎缩性胃炎中医病机与症候分布规律研究[J].中华中医药杂志,2011,26(3):582-586.
- [10] 朱文峰主编.中医诊断学[M].北京:中国中医药出版社,2002:35-49.
- [11] 戴豪良主编.舌诊研究与临床应用[M].上海:上海科学技术出版社,2006:187-188.
- [12] 林秀平,王慧娟,姚保泰.慢性萎缩性胃炎癌前病变舌诊检测指标研究[J].浙江中西医结合杂志,2006,16(2):73-75.
- [13] 戴豪良,刘耿,陈依萍,等.小型猪腻苔模型的超微结构和组织学研究[A].第七次全国中西医结合四诊研究学术会议论文汇总[C],2004:17-19.
- [14] 李福凤,赵洁,钱鹏,等.慢性胃炎患者腻苔的代谢指纹图谱研究[J].中西医结合学报,2012,10(7):757-765.
- [15] 李响,张军峰,杨亚平.舌苔形成的微生物学机制探讨[J].辽宁中医杂志,2014,41(6):1102-1106.
- [16] 张晨虹,赵立平.肠道菌群在肥胖及相关代谢性疾病发生发展中的地位和作用[J].前沿科学,2007,1(3):75-80.
- [17] Hullar MA, Burnett-Hartman AN, Lampe JW, et al. GUT microbes, diet, and cancer [J]. *Cancer Treatment Res*, 2014, 159(1): 377-399.
- [18] 赵立平,张晨虹.肥胖相关的肠道微生物群落结构动力学与功能解析研究[J].生命科学,2010,22(12):1247-1253.
- [19] Jiang B, Liang X, Chen Y, et al. Integrating next-generation sequencing and traditional tongue diagnosis to determine tongue coating microbiome [J]. *Sci Reports*, 2012, 2(936): 1019-1029.
- [20] Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance [J]. *Diabetes*, 2007, 56(7): 1761-1772.
- [21] 肖飞,周东蕊,徐征,等.肺癌患者不同舌苔类型菌群结构分析[J].南京晓庄学院学报,2010,11(6):4-7.
- [22] 朱旭芬主编.现代微生物学实验技术[M].杭州:浙江大学出版社,2011:150-152.

(收稿:2017-01-05 在线:2018-06-22)

责任编辑:李焕荣

英文责编:张晶晶