

· 临床论著 ·

不同证型慢性非萎缩性胃炎患者唾液淀粉酶的活性、蛋白含量、比活力及其 N-糖基化程度

林传权 王东旭 梁雪丹 杨 龙 王丽辉 李茹柳 邱向红 陈蔚文

摘要 目的 分析不同证型慢性非萎缩性胃炎患者唾液淀粉酶(sAA)的活性、蛋白含量、比活力及其 N-糖基化程度。**方法** 68 例慢性非萎缩性胃炎患者按中医辨证分为脾气虚弱组(24 例)、脾虚湿热组(33 例)、肝胃不和组(11 例),另设健康对照组(36 名),采集各组酸刺激前后的唾液,检测 sAA 活性、蛋白含量、比活力及其 N-糖基化程度,并分析 sAA 活性、蛋白含量的酸刺激前后比值。**结果** 与本组酸刺激前比较,酸刺激后健康对照组 sAA 活性及蛋白含量均升高,sAA 比活力均明显下降($P < 0.05$)。与健康对照组比较,酸刺激后脾气虚弱组、脾虚湿热组 sAA 活性比值、蛋白含量比值 < 1 及糖基化缺失的例数均增高($P < 0.05$),酸刺激前脾虚湿热组 sAA 比活力高于健康对照组($P < 0.05$)。酸刺激后,健康对照组、脾虚湿热组、脾气虚弱组的 sAA 比活力均较酸刺激前明显下降($P < 0.05$),但组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。肝胃不和组的各项分析指标与健康对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 慢性胃炎脾气虚弱证及脾虚湿热证 sAA 的活性、蛋白含量及 N-糖基化程度发生异常改变,脾运化功能的强弱可在唾液蛋白质分泌中有较为客观的反映。

关键词 慢性非萎缩性胃炎;脾气虚弱;脾虚湿热;肝胃不和;唾液淀粉酶活性;N-糖基化

Preliminary Study on the Activity, Protein Content, Specific Activity and N-glycosylation Degree of Salivary Amylase in Chronic Non-atrophic Gastritis Patients with Different Syndromes LIN Chuan-quan, WANG Dong-xu, LIANG Xue-dan, YANG Long, WANG Li-hui, LI Ru-liu, QIU Xiang-hong, and CHEN Wei-wen *Piwei Institute, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou(510405)*

ABSTRACT Objective To analyze the activity, protein content, specific activity and N-glycosylation degree of salivary alpha-amylase (sAA) for chronic non-atrophic gastritis (CNAG) patients with different syndromes. **Methods** Saliva samples were collected from 68 CNAG patients with three types of syndrome, including 24 cases with Pi deficiency syndrome (PDS), 33 cases with dampness-heat due to Pi deficiency syndrome (DPDS) and 11 cases with disharmony between Gan and Wei syndrome (DGWS), as well as 36 cases in healthy control group (HCG) before and after citric acid stimulation. The activity, protein content, specific activity and N-glycosylation degree of sAA were detected. The ratio of sAA activity and protein content before and after acid stimulation were analyzed and compared respectively. **Results** Compared with pre-stimulation, activity and protein content of sAA were increased in HCG ($P < 0.05$) after acid stimulation, but sAA specific activity was decreased significantly ($P < 0.05$). Compared with HCG, the cases of patients with sAA activity ratio as well protein content ratio < 1 and N-glycosylation deletion in both PDS and DPDS were increased ($P < 0.05$), and sAA specific activity under resting situation was increased ($P < 0.05$) in DPDS. Compared with pre-stimulation, sAA specific activity was decreased ($P < 0.05$) in HCG, PDS and DPDS, without significant difference among these three

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81403297);广州中医药大学“薪火计划”项目(No. XH20170113);教育部博士点基金新教师系列项目(No. 20124425120017);广州中医药大学优秀青年学者科研基金项目(No. 2013-07);广州中医药大学“青年英才培养工程”项目(No. QNYC20140114)

作者单位: 广州中医药大学脾胃研究所(广州 510405)

通讯作者: 林传权, Tel: 020-36585444, E-mail: 88531138@qq.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20181029.228

groups ($P > 0.05$). There was no significant difference in the aforementioned salivary indicators between DGWS and HCG ($P > 0.05$). **Conclusions** The activity, protein content and N-glycosylation degree of sAA from CNAG patients with PDS and DPDS were altered abnormally after acid stimulation, compared with HCG. It suggests that the function of spleen governing the transportation of body fluid and nutrition may be reflected objectively from the altered results of salivary chemical composition.

KEYWORDS chronic non-atrophic gastritis; Pi deficiency syndrome; dampness-heat due to Pi deficiency syndrome; disharmony between Gan and Wei syndrome; salivary alpha-amylase activity; N-glycosylation

唾液淀粉酶(salivary alpha-amylase, sAA)活性比值较健康者下降是脾气虚证疗效评价的重要参考指标^[1],该指标得到同行的广泛认同,但该指标尚未在临床广泛运用,临床检出率不高^[2]、特异性不强,其影响因素、调控因素仍有待深入分析。为此,本课题组前期围绕 sAA 活性的相关改变因素,分析慢性非萎缩性胃炎脾气虚弱证、脾虚湿热证患者在柠檬酸刺激前后的唾液分泌情况^[3],结果发现与健康志愿者比较,慢性胃炎脾气虚弱、脾虚湿热患者总体临床表现较为相近,除了 sAA 活性比值下降,流率、pH 值、总蛋白浓度及 Ca^{2+} 、 Cl^- 浓度等指标均发生异常改变且变化趋势一致。该研究同时发现,尽管两证型患者在临床表现、唾液分泌改变存在一定的差异,但差异尚不是十分明显,如能选择一个实证进行对照研究(如肝胃不和是慢性胃炎的最常见证型之一^[4]),可更全面反映慢性胃炎不同证型在柠檬酸刺激前后的唾液分泌改变情况,也有助于更全面地阐释 sAA 活性比值下降的影响因素、调控因素。

此外,sAA 作为一种常见的消化酶,除了上述的影响因素,sAA 蛋白的含量、纯度及其糖基化程度也是非常重要的影响因素。sAA 属 N-糖基化的一类蛋白质(N-糖基化的分子量 62 kD,非糖基化的分子量 57 kD)^[5],N-糖基化对 sAA 的活性、稳定性及酶的分泌有重要的影响^[6]。因此,本研究在原有脾气虚弱 sAA 活性改变的研究基础上,选择脾气虚弱、脾虚湿热及肝胃不和证的慢性非萎缩性胃炎患者,围绕 sAA 活性改变的影响因素,创新性地分析酸刺激前后 sAA 蛋白的含量、纯度及其 N-糖基化程度,以期更全面阐释 sAA 活性比值的影响因素,为提高该指标的临床检出率提供理论依据和技术参考,以便更好指导临床诊疗,同时也进一步丰富“脾主涎”的理论内涵。

资料与方法

1 诊断标准

1.1 慢性非萎缩性胃炎诊断标准 慢性非萎缩性胃炎的症状、体征及内镜检查诊断标准参考

2012 年《中国慢性胃炎共识意见》^[8];内镜下可见黏膜红斑,黏膜出血点或斑块,黏膜粗糙伴或不伴水肿,及充血渗出等基本表现;病理组织以慢性炎性细胞(单个核细胞,主要是淋巴细胞、浆细胞)浸润为主,活动性胃炎以慢性炎性细胞浸润同时见到急性炎性细胞浸润,并根据“直观模拟评分法”,本文主要选取病理组织学轻度、中度改变的慢性非萎缩性胃炎患者。

1.2 中医证型辨证标准 主要参考《中药新药临床研究指导原则》2002 版^[9]的有关诊断标准。(1)脾气虚弱证。主证:食少纳呆、体倦乏力、食后或午后腹胀,大便异常(溏、烂、先硬后溏、时硬时溏)。次证:神疲乏力,口淡不渴,腹痛绵绵,恶心呕吐,脘闷,肠鸣,面色萎黄,浮肿,排便无力,舌质淡,舌体胖或有齿痕,苔薄白,脉细数。诊断标准:具备主症 2 项;或主症 1 项加次症 2 项即可诊断。(2)脾虚湿热证。主证:脘腹胀满,口渴少饮,食少纳呆,大便溏而不爽,舌质红,舌苔黄腻或黄白腻。次证:身重困倦,胃脘灼热,口臭,尿黄,身热不扬或汗出不畅,脉濡、滑、数。诊断标准:具备舌苔黄腻,或黄白腻,同时见其余主症 3 项;或同时见其余主症 2 项个和次症 2 项;或同时见次症 3 项或 3 项以上以上即可诊断。(3)肝胃不和证。主证:胃脘胀满或胀痛、肋肋胀痛、症状随情绪波动、乏力、舌质淡,苔薄白、边有齿痕、脉弦。次证:胸闷、食少、喜叹息、大便不畅。诊断标准:具备主症,并具备次症中 1 项者,即可确诊为本证。

2 纳入标准 (1)符合轻、中度慢性非萎缩性胃炎诊断标准,脾气虚弱证、脾虚湿热证或肝胃不和证的辨证标准;(2)年龄 20 ~ 40 岁;(3)患者知情同意并签署知情同意书。

3 排除标准 伴有心、脑、肾、肝脏功能不全患者;有精神疾病患者;妊娠及哺乳期女性。

4 一般资料 将 2015 年 12 月—2016 年 12 月广州中医药大学在校师生,由临床医师确认受试者平素无消化系统、循环系统、免疫系统等疾病,无家族遗传史,无烟酒嗜好,无龋齿,无口腔溃疡,再进行四诊检查未发现明显异常体征后,选取 36 名健康受试者为健

康对照组,其中男性 18 名,女性 18 名,年龄 20 ~ 40 岁,平均(28.36 ± 5.81)岁。68 例慢性非萎缩性胃炎患者均同期来自于广州中医药大学一附院门诊部,其中男性 32 例,女性 36 例,年龄 20 ~ 60 岁,平均(40.91 ± 12.53)岁,按中医辨证分为脾气虚弱、脾虚湿热及肝胃不和 3 组,具体见表 1。

为避免饮食及服药对唾液指标的干扰,患者及健康者均选择采集唾液前未进食未服药者,采集样品时间段为上午 9:00 ~ 10:30。既往研究发现,成人(25 ~ 60 岁)唾液分泌、sAA 活性与年龄无明显关联性^[7],本课题组前期观察到较多志愿者(40 岁以上者)存在不同程度的症状体征,或者兼有烟酒嗜好,未能达到健康者的纳入标准。因此,本研究降低健康志愿者筛选的年龄界限至 20 ~ 40 岁,未与患者组的年龄段(20 ~ 60 岁)平行。本研究经广州中医药大学第一附属医院伦理委员会审核通过(No. 2015 - 10 - 20)。

5 检测指标及方法

5.1 唾液采集方法 采集唾液前,操作者询问受试者基本情况。参照本课题组前期优化的口中转动棉柱法分别采集柠檬酸刺激前后的唾液(均为 1.5 min)^[7, 10],采集完毕后立即离心(5 000 r/min, 10 min),离心后液体即为酸刺激前、后唾液样品。

5.2 单位体积 sAA 活性(sAA 活性) 采用 Bernfeld 法^[11]检测,在分光光度计 540 nm 处检测吸光度值,建立标准曲线并计算相应的 sAA 活性;活性单位定义:1 活性单位(U)为在 37 ℃、pH 6.9 的情况下 3 min 淀粉酶消化淀粉释放 1 mg 麦芽糖。

5.3 sAA 蛋白含量及糖基化程度 采用 Western Blot 的方法检测^[12],具体如下:按照总蛋白等体积等浓度的上样方法进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,并上样已知浓度的人 sAA 蛋白作为标准对照品。电泳后,经过转膜,封闭,抗体孵育后,用 ECL 显色。Western Blot 结果用 Image Lab 软件(Bio-Rad)进行灰度值分析。获得待测样品条带灰度值后,再与标准对照品灰度值对比,并以 Image Lab 软件计算得到待测样品的 sAA 蛋白含量(mg/mL)。sAA 分为糖基化(分子量 62 kD)与非糖基化(分子量 57 kD)两种亚型,人 sAA

标准对照品的 Western Blot 结果可出现条带有糖基化与非糖基化两个条带,当待测样品的 Western Blot 结果未出现糖基化条带即判定为糖基化缺失。

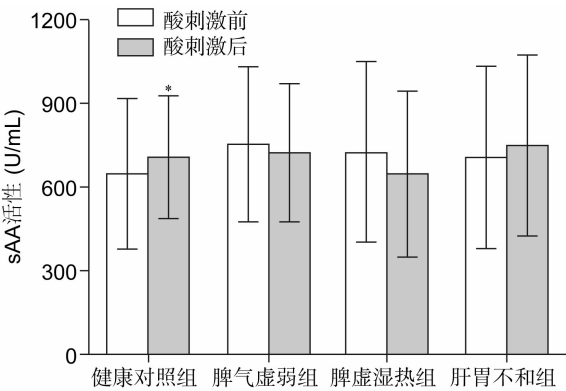
5.4 sAA 比活力 sAA 比活力是衡量蛋白质纯度的量度单位,比活力越高,则蛋白质越纯;sAA 比活力(U/mg) = sAA 活性/sAA 蛋白含量。

5.5 sAA 活性与 sAA 蛋白含量的相关性 运用 Pearson 分析健康志愿者、慢性胃炎各证型患者在柠檬酸刺激前后两种状态下 sAA 活性与其蛋白含量的相关性,并探讨酸刺激及疾病状态是否影响 sAA 活性与 sAA 蛋白含量的相关性。

6 统计学方法 采用 SPSS 17.0 进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,酸刺激前后组内比较采用配对 t 检验,组间比较采用单因素方差分析,计量资料采用 χ^2 检验。指标间的相关性分析运用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组酸刺激前后的 sAA 活性及其比值比较 (图 1, 2) 与本组酸刺激前比较,健康对照组 sAA 活性明显升高($P < 0.05$),肝胃不和组 sAA 活性也有相似的趋势,但差异无统计学意义($P > 0.05$),脾气虚弱组、脾虚湿热组 sAA 活性则呈现下降趋势,差异无统计学意义($P > 0.05$);与健康组比较,三种证型患者在酸刺激前及刺激后的 sAA 活性差异均无统计学意

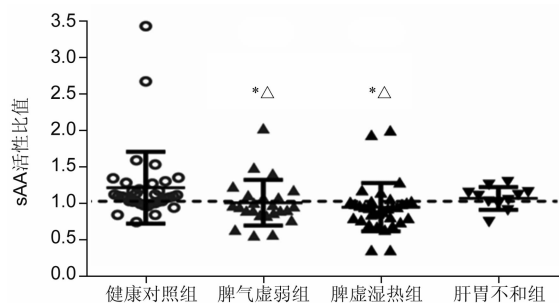


注:与本组酸刺激前比较,* $P < 0.05$

图 1 各组酸刺激前后的 sAA 活性比较

表 1 慢性非萎缩性胃炎患者一般资料

组别	例数	性别(例)		年龄 (岁, $\bar{x} \pm s$)	病程 (月, $\bar{x} \pm s$)	活动性胃炎(例)		病理组织学变化程度(例)		
		男性	女性			是	否	轻度	中度	重度
脾气虚弱	24	13	11	40.7 ± 13.3	8.5 ± 3.8	5	19	14	10	0
脾虚湿热	33	16	17	41.1 ± 12.2	7.7 ± 4.3	9	24	13	20	0
肝胃不和	11	3	8	40.8 ± 10.9	7.2 ± 2.7	6	5	5	6	0

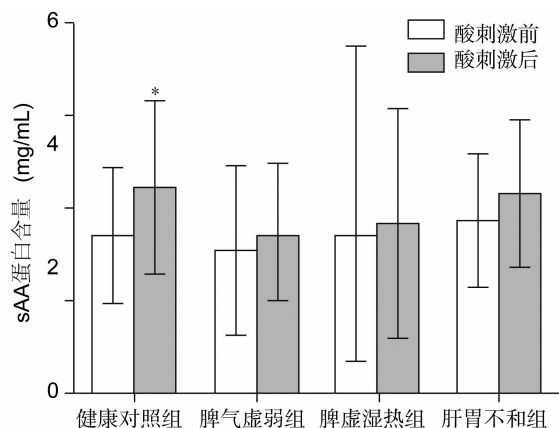


注:与健康对照组比较,* $P < 0.01$;与肝胃不和组比较, $\Delta P < 0.01$;健康对照组 36 例,脾气虚弱组 24 例,脾虚湿热组 33 例,肝胃不和组 11 例

图2 各组 sAA 活性比值分布比较

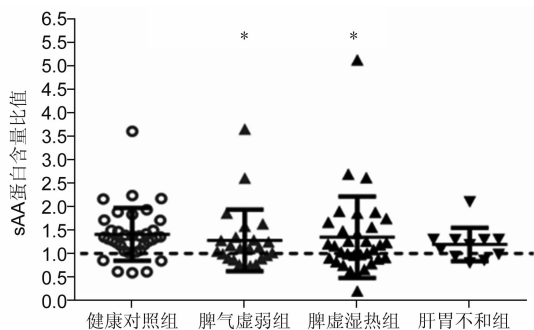
义($P > 0.05$)。活性比值 < 1.0 (即酸刺激后,sAA 活性下降)的患者,脾气虚弱组[66.67% (16/24)]与脾虚湿热组[72.73% (24/33)]明显多于健康对照组[25.00% (9/36)]及肝胃不和组[27.27% (3/11)], $P < 0.01$,肝胃不和组与健康组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2 各组酸刺激前后 sAA 蛋白含量及其比值比较 (图 3,4) 与本组酸刺激前比较,健康对照组 sAA 蛋



注:与同组酸刺激前比较,* $P < 0.05$

图3 各组刺激前后的 sAA 蛋白含量比较

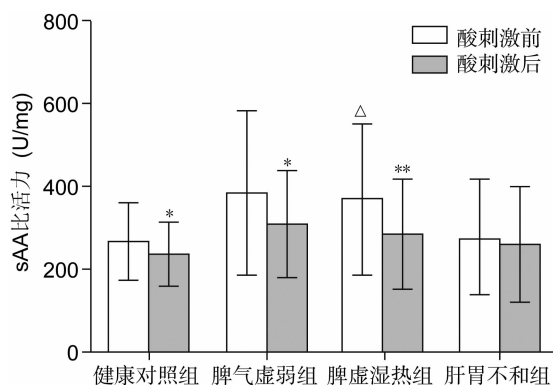


注:与健康对照组比较,* $P < 0.05$

图4 各组 sAA 蛋白含量比值分布

白含量明显升高($P < 0.05$),其他各组差异无统计学意义($P > 0.05$)。蛋白含量比值 < 1.0 (即酸刺激后,sAA 蛋白含量下降)的分布结果表明,脾气虚弱组[37.5% (9/24)]与脾虚湿热组[39.39% (13/33)]的患者显著多于健康对照组[13.89% (5/36)], $P > 0.05$,而肝胃不和组[36.36% (4/11)]与健康对照组、脾气虚弱组及脾虚湿热组之间差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

3 各组酸刺激前后 sAA 比活力比较(图 5) 与本组酸刺激前比较,健康对照组、脾气虚弱组、脾虚湿热组的 sAA 比活力明显下降($P < 0.05$),肝胃不和组差异无统计学意义($P > 0.05$)。酸刺激前脾虚湿热组 sAA 比活力明显高于健康对照组($P < 0.05$),而与其他组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。酸刺激后,各组 sAA 比活力与健康对照组的差异无统计学意义($P > 0.05$)。



注:与本组酸刺激前比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与健康对照组酸刺激前比较, $\Delta P < 0.05$

图5 各组 sAA 比活力比较

4 各组 sAA 的 N-糖基化程度比较(表 2) 与健康对照组比较,脾气虚弱组与脾虚湿热组 sAA 的 N-糖基化缺失明显增多($P < 0.05$),肝胃不和组差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表2 各组 sAA 的 N-糖基化缺失情况比较

组别	例数	糖基化未缺失(例)	糖基化缺失(例)	缺失比例(%)	χ^2 值	P 值
健康对照	36	32	4	11.11	—	—
脾气虚弱	24	16	8	33.33	4.44	0.035
脾虚湿热	33	21	12	36.36	6.16	0.013
肝胃不和	11	11	0	0.00	1.34	0.248

5 各组酸刺激前后 sAA 活性与其蛋白含量的相关性分析(表 3) 健康对照组酸刺激前 sAA 活性与其蛋白含量呈正相关性($r = 0.367$, $P = 0.028$),其

余各组的相关性差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 各组酸刺激前后 sAA 活性与其蛋白含量的相关性分析

组别	例数	时间	r	P 值
健康对照	36	酸刺激前	0.367	0.028
		酸刺激后	0.259	0.127
脾气虚弱	24	酸刺激前	0.002	0.991
		酸刺激后	0.031	0.886
脾虚湿热	33	酸刺激前	0.163	0.364
		酸刺激后	0.135	0.453
肝胃不和	11	酸刺激前	-0.272	0.418
		酸刺激后	-0.262	0.437

讨 论

蛋白质的含量、纯度(即比活力)及糖基化程度是其活性的重要影响因素,既往研究鲜有关注这 3 个指标在脾气虚证的改变情况及其对 sAA 活性的影响。本文初次从 sAA 的蛋白含量、比活力及其 N-糖基化程度等角度探讨慢性非萎缩性胃炎脾气虚证 sAA 活性比值改变的影响因素。与前期研究结果^[3]相一致,本研究发现,柠檬酸刺激后,健康对照组 sAA 活性升高,而脾气虚弱组与脾虚湿热组的 sAA 活性比值下降,明显高于肝胃不和组。此外,酸刺激后,脾气虚弱组及脾虚湿热组的 sAA 蛋白含量下降、N-糖基化缺失情况亦明显多于健康对照组和肝胃不和组。结果再次验证了脾气虚证 sAA 活性比值下降的客观存在,并且 sAA 分泌改变还包含有 sAA 的蛋白含量、N-糖基化程度;结果也说明存在脾运化功能低下的脾气虚弱组与脾虚湿热组的慢性活动性胃炎比例 [20.83% (5/24)、27.27% (9/33)] 明显少于肝胃不和组 [54.55% (6/11), $P < 0.05$], 此外均出现唾液蛋白分泌的异常改变,这提示脾运化功能的强弱可通过唾液蛋白分泌变化情况能够客观地反映出来。

蛋白质含量与蛋白质生物活性密切相关。既往研究发现,sAA 活性与 sAA 蛋白含量存在正相关($r = 0.61$, $P < 0.01$)^[13]。本研究亦发现,在酸刺激后,脾气虚弱组及脾虚湿热组患者 sAA 蛋白含量与 sAA 活性的改变趋势相一致,比值均明显下降,而肝胃不和组及健康对照组改变不明显。这提示 sAA 蛋白含量比值可考虑作为反映脾气虚证本质的又一客观指标,与 sAA 活性比值相互合参,可更全面揭示脾气虚证的本质。本研究分析了健康对照组与不同证型慢性胃炎患者在酸刺激前、后 sAA 蛋白含量与 sAA 活性的相关性,仅健康对照组在酸刺激前,两者有正相关性,其余均无明显

相关性。结果表明,酸刺激、疾病状态均可能干扰了 sAA 蛋白含量与 sAA 活性的相关性,后续探讨 sAA 蛋白含量比值反映脾气虚证本质的机制及其影响因素,需关注酸刺激本身、疾病病理等因素。另外,慢性胃炎各证型组的病例样本量不够大,也可能是慢性胃炎患者在酸刺激前后 sAA 蛋白含量与 sAA 活性无明显相关性的主要原因之一,后续可扩大样本量进一步分析两者的关联性。

比活力是指每毫克蛋白质所具有的活性单位数,是反映酶纯度的一个指标,比活力越高,酶纯度越高^[14]。本研究发现,在酸刺激后,健康对照组、慢性胃炎脾气虚弱组及脾虚湿热组的 sAA 比活力均明显下降,且这三组间差异无统计学意义,而肝胃不和组亦有下降趋势,可能因样本量较小,差异无统计学意义。该结果与上述 sAA 活性及其蛋白含量结果的变化趋势不相同,未能较好地地区分出健康对照组与慢性胃炎患者的唾液分泌差异;结果提示,sAA 比活力可能与酸刺激关系更密切,而与疾病或证型关系不大。此外,杨泽民等^[15]发现,同等柠檬酸浓度刺激脾气虚证患儿及健康对照组儿童后,两组的 sAA 比活力均明显上升,但脾气虚证患儿的比活力比值较健康对照组明显降低。这提示 sAA 比活力对柠檬酸刺激的反应情况,可能与年龄因素有密切的关联,在成年人和儿童分别表现出不同的结果。

α -淀粉酶属于 N-糖基化类型的一类蛋白质,N-糖基化是其主要蛋白修饰形式,且存在 N-糖基化与 N-糖基化缺失的两种形式。N-糖基化程度对 sAA 的折叠、分泌及活性有重要的影响^[16]。本研究采用 Western Blot 法分析 N-糖基化缺失与 N-糖基化未缺失的 sAA 含量,在酸刺激前后均发现,脾气虚弱组与脾虚湿热组 N-糖基化缺失的比例明显高于健康对照组,而肝胃不和组(11 例)均未发生 N-糖基化缺失的情况。结果表明,脾气虚弱组与脾虚湿热组的 sAA N-糖基化程度明显降低,这与本课题组前期研究结果相符^[12, 17],提示 sAA N-糖基化蛋白的缺失与酸刺激关系不大,而与疾病或证型关系更密切,它可能是脾运化功能低下的脾气虚弱证与脾虚湿热证患者 sAA 活性改变的病理背景之一。本课题组的早期实验研究发现,2 型糖尿病脾气虚证患者编码糖基化的基因下调^[18],从另一角度提示脾气虚证与糖基化改变存在密切关联。但慢性胃炎脾气虚弱组及脾虚湿热组出现 sAA 糖基化缺失比例并不高,说明 N-糖基化程度反映脾气虚证病理改变的特异性有待提高,后续可进一步分析该指标的影响因素,如,腹痛、腹胀、纳差等临床症状,亦可选取其他 N-糖基化程度的其他检测方法(如凝集素亲和沉淀

法),更全面客观地获取 N-糖基化与脾气虚证的内在关联,进一步丰富“脾主涎”的理论内涵。

利益冲突: 本文所有署名作者对文稿内容及作者排序无异议,本文不存在利益冲突。

参 考 文 献

- [1] 中华人民共和国卫生部. 中药新药临床研究指导原则[M]. 中华人民共和国卫生部制定发布, 1993: 91-95.
- [2] 李常青. 唾液淀粉酶活性比值、D-木糖排泄率和胃电图三者合参对脾气虚证的研究[J]. 湖南中医学院学报, 1998, 18(2): 9-10.
- [3] 王丽辉, 杨龙, 林传权, 等. 慢性胃炎脾气虚证及脾虚湿热患者唾液分析[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(3): 1324-1327.
- [4] 李培彩, 丁霞, 郭强, 等. 慢性浅表性胃炎中医证候、证素分布特点的文献研究[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(12): 2532-2534.
- [5] Bank RA, Hettema EH, Arwert F, et al. Electrophoretic characterization of posttranslational modifications of human parotid salivary alpha-amylase[J]. Electrophoresis, 1991, 12(1): 74-79.
- [6] de Barros MC, Do NSR, Ramada MH, et al. The influence of N-glycosylation on biochemical properties of Amy1, an alpha-amylase from the yeast *Cryptococcus flavus* [J]. Carbohydr Res, 2009, 344(13): 1682-1686.
- [7] Rohleder N, Nater UM. Determinants of salivary alpha-amylase in humans and methodological considerations [J]. Psychoneuroendocrinology, 2009, 34(4): 469-485.
- [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(电子版), 2013, 5(7): 44-55.
- [9] 郑筱萸主编. 中药新药临床研究指导原则[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2002: 362-372.
- [10] 王丽辉, 林传权, 杨龙, 等. 3 种唾液采集方法对唾液分泌的影响[J]. 上海口腔医学, 2015, 24(5): 563-568.
- [11] Bernfeld P. Amylases α and β [J]. Methods Enzymol, 1955, (1): 149-158.
- [12] 杨龙, 王丽辉, 林传权, 等. 从 N-糖基化探讨重症肌无力脾气虚证患者唾液淀粉酶活性改变机制[J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(9): 3516-3521.
- [13] Mandel AL, Peyrot DGC, Plank KL, et al. Individual differences in AMY1 gene copy number, salivary alpha-amylase levels, and the perception of oral starch[J]. PLoS One, 2010, 5(10): 1-9.
- [14] 周晓云主编. 酶学原理与酶工程[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2005: 54.
- [15] 杨泽民, 陈龙辉, 林静, 等. 柠檬酸刺激对脾虚患儿唾液淀粉酶、总蛋白、唾液流率及 pH 值的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2015, 35(2): 188-192.
- [16] Doyon Y, Home W, Daull P, et al. Effect of C-domain N-glycosylation and deletion on rat pancreatic alpha-amylase secretion and activity[J]. Biochem J, 2002, 362(Pt 1): 259-264.
- [17] 杨龙. 基于 N 糖基化探讨脾气虚证患者 sAA 活性改变的机制[D]. 广州: 广州中医药大学, 2016.
- [18] 陈龙辉, 杨泽民, 陈蔚文, 等. 2 型糖尿病脾虚证免疫与物质代谢相关基因差异表达的研究[J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(10): 3634-3638.

(收稿: 2018-01-31 在线: 2019-08-02)

责任编辑: 白 霞