

围绝经期综合征舌苔脱落细胞凋亡调控蛋白与肝郁病理的相关性

梁文娜¹, 李灿东¹, 高碧珍², 廖凌虹¹, 张凌媛¹, 林雪娟¹, 李红³

1. 福建中医药大学中医证研究基地, 福州 350108

2. 福建中医药大学中西医结合学院, 福州 350108

3. 福建省立医院中医科, 福州 350007

摘要 通过研究围绝经期综合征舌苔脱落细胞凋亡调控蛋白与肝郁病理的相关性, 为临床诊疗提供实验依据。本研究采用随机数字表法, 选取 50 例健康妇女作为对照组, 150 例围绝经期综合征患者作为观察组, 证素辨证计算肝郁积分, 巴氏染色检测舌苔脱落细胞的成熟指数 (MI) 和成熟价值 (MV), 流式细胞仪检测舌苔脱落细胞凋亡指数, 免疫组化检测舌苔脱落细胞凋亡调控蛋白。结果显示, 围绝经期综合征肝郁积分明显高于健康妇女; 肝郁病理改变, 与舌苔脱落细胞 MI 的中层细胞数量呈正相关, 与舌苔脱落细胞 MI 的表层细胞数量及 MV 呈负相关; 肝郁病理改变, 与舌苔脱落细胞凋亡指数、Fas、Bax 的阳性率呈正相关, 与舌苔脱落细胞中 Bcl-2 的阳性率呈负相关。提示肝郁病理是围绝经期综合征的核心病机之一, 肝郁病理与舌苔脱落细胞的成熟度、凋亡指数及凋亡调控蛋白相关。

关键词 围绝经期综合征; 肝郁病理; 脱落细胞; 凋亡

中图分类号 R271.116

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2011.10.002

Interrelationship Between Tongue Epithelial Cell Apoptosis Regulation of Protein and Pathological Changes of Liver Depression in Perimenopausal Syndrome

LIANG Wenna¹, LI Candong¹, GAO Bizhen², LIAO Linghong¹, ZHANG Lingyuan¹, LIN Xuejuan¹, LI Hong³

1. *Research Base of Traditional Chinese Medicine Syndrome, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China*

2. *College of Integrated Traditional and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China*

3. *Department of Traditional Chinese Medicine, Fujian Provincial Hospital, Fuzhou 350007, China*

Abstract The interrelationship between tongue epithelial cell apoptosis regulation of protein and pathological changes of liver depression in perimenopausal syndrome is investigated to provide a solid experimental basis for related clinical diagnosis and treatment. 50 cases of healthy women and 150 cases of perimenopausal syndrome patients were randomly divided into the control group and experimental groups. Liver depression points were evaluated by syndrome element differentiation; Maturation Index (MI) and Maturation Value (MV) of tongue epithelial cells were determined by Papanicolaou staining; the apoptotic rate of tongue epithelial cells was measured by flow cytometric; and the apoptosis regulation of protein was determined by immunohistochemical. The results show that liver depression points of syndrome patients are significantly higher than those of healthy women; pathological changes of liver depression, and

收稿日期: 2010-10-07; 修回日期: 2011-03-07

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30772697); 福建省科技青年创新人才项目 (2008F3055)

作者简介: 梁文娜, 讲师, 研究方向为内分泌病证, 电子邮箱: liangwenna1979@163.com; 李灿东 (通信作者), 教授, 研究方向为内分泌病证, 电子邮箱: fjzyled@126.com

the middle cells MI of tongue epithelial cells are positively correlated, and the surface cells MI and MV of tongue epithelial cells are negatively correlated; pathological changes of liver depression, and apoptotic rate, Fas, Bax of tongue epithelial cells are positively correlated, and Bcl-2 of tongue epithelial cells are negatively correlated. It is concluded that the liver depression is one of the cores of pathogenesis in the perimenopausal syndrome, and the tongue epithelial cells maturity, apoptotic rate and apoptosis related regulation of gene are interrelated.

Keywords perimenopausal syndrome; liver depression; tongue epithelial cell; apoptosis

0 引言

围绝经期综合征发病率高,严重影响妇女身心健康,已成为医学界研究的热点问题之一^[1-2],属于中医“脏躁”、“郁证”、“绝经前后诸证”等范畴,以多脏腑功能失调为根本病理改变,肾虚是发病基础,而肝郁是发病重要环节。舌诊是中医独具特色的诊断方法之一,可指导临床的辨证论治。舌苔变化与机体的生理和病理过程密切相关,可客观反映机体内部气血盛衰、寒热虚实、正邪斗争。舌苔变化受机体内外多种因素影响,其中肝功能变化是重要的影响因素之一^[3]。

舌苔变化的形成机制与疾病之间的内在联系,是目前中医舌诊研究的焦点问题之一。舌苔脱落细胞是舌苔的主要组成部分,因此舌脱落细胞功能变化可能是影响舌苔变化的主要因素,而舌苔脱落细胞的凋亡又是影响细胞功能的关键因素。对此,本文通过观察围绝经期综合征舌苔脱落细胞凋亡调控蛋白表达变化与肝郁病理之间的关系,探讨舌苔变化与肝郁病理的潜在联系,为中医舌诊的研究开辟一个新的视角。

1 资料与方法

1.1 病例选择标准

1.1.1 诊断标准

参照全国医药高等院校教材《妇产科学》(第6版)^[4]。
① 40—55 周岁的妇女; ② 临床表现为月经紊乱 3 月以上或闭经 3—12 月者; ③ 出现不同程度的临床症状,如潮热出汗、易激动等, 症状评分标准的制定采用改良 Kupperman 法, 总积分超过 6 分, 诊断为围绝经期综合征。

1.1.2 纳入标准

围绝经期综合征纳入标准: ① 符合围绝经期综合征西医诊断标准者; ② 未经过雌、孕激素替代治疗者; ③ 本人自愿加入, 并签署《知情同意书》。

健康女性纳入标准: 年龄 40—55 岁的妇女, 月经周期规律, 改良 Kupperman 法评分, 积分 ≤ 6 分的健康体检者, 且本人自愿加入, 并签署《知情同意书》。

1.1.3 排除标准

① 凡不符合围绝经期综合征纳入标准者; ② 原因不明的阴道不规则出血未治愈者; ③ 精神病患者; ④ 合并心脑血管、肝、肾、造血系统等严重疾病者; ⑤ 乳腺肿瘤、侧卵巢切除、卵巢器质性病变、卵巢功能早衰者。

1.2 一般资料

2008 年 7 月—2009 年 11 月在福建省立医院中医科住院部和门诊, 随机选取符合本研究纳入标准的围绝经期综合征患者 150 例, 年龄 46.32 ± 5.26 岁, 对照组为福建省立医院健康体检中心的健康女性 50 例, 48.18 ± 6.53 岁, 各组年龄和病程无显著性差异。

1.2.1 临床资料收集

采用改良 Kupperman 法与证素辨证量表相结合, 制定统一的科研调查问卷, 建立档案。观察对象填写答卷时, 由统一培训的专业人员做现场指导, 并采集四诊资料。

1.2.2 中医肝郁病理改变判断标准

根据证素辨证原理, 参照“600 种常见症状的辨证意义”^[5], 将观察对象的临床表现中属于肝郁要素的贡献度进行累积相加, 求出贡献度之和, 作为肝郁证素积分。将积分分级, 积分 < 70 , 为 0 级, 表明无肝郁病理改变; $70 \leq$ 积分 < 100 , 为 1 级, 表明存在轻度肝郁病理改变; $100 \leq$ 积分 < 150 , 为 2 级, 表明存在中度肝郁病理改变; 积分 ≥ 150 , 为 3 级, 表明存在重度肝郁病理改变。

1.3 观察方法

1.3.1 临床研究观察指标

证素辨证计算肝郁积分。

1.3.2 舌苔脱落细胞检测

临床四诊资料收集后, 刮取舌苔脱落细胞, 采用巴氏染色观察舌苔脱落细胞的成熟指数 (Maturation Index, MI)、成熟价值 (Maturation Value, MV), 流式细胞仪检测舌苔脱落细胞的凋亡指数, 免疫组化检测舌苔脱落细胞的凋亡基因, 透射电子显微镜观察舌苔脱落细胞的超微结构。

1.4 安全性指标

观察前分别检查血、尿、便常规, 肝、肾功能, 心电图, 妇科和乳腺彩超。

1.5 统计学处理

SPSS 13.6 统计软件处理数据, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计数资料采用卡方检验; 两因素之间的相关性用等级相关 (Spearman 法) 分析。

2 结果与分析

2.1 围绝经期综合征肝郁病理改变情况

围绝经期综合征肝郁积分, 观察组明显高于对照组 ($P=0.000$); 肝郁病理改变分布情况, 观察组与对照组有明显差异 ($P=0.000$) (表 1)。

表 1 围绝经期综合征肝郁病理改变情况

Table 1 Liver depression change in perimenopausal syndrome

组别	例数	肝郁积分	肝郁病理改变例数			
			0级	1级	2级	3级
对照组	50	35.28±11.79	50	0	0	0
观察组	150	114.03±44.37*	22	43	59	26

注: * 为与对照组相比 $P < 0.01$ 。

Note: * means that compared with normal group, $P < 0.01$.

2.2 与舌苔脱落细胞 MI、MV 的关系

为观察不同肝郁病理改变围绝经期综合征患者舌苔脱落细胞的 MI 与 MV, 采用巴氏染色法检测。舌苔脱落细胞的表层细胞呈多边形, 胞质红染; 中层细胞呈圆形、椭圆形或舟形, 体积小于表层细胞, 边缘色较深, 胞质较亮、蓝染; 底层细胞未见。对照组(图 1(a))比肝郁 0—3 级(图 1(b)—图 1(e))的舌苔脱落细胞的中层细胞比例逐渐增加、表层细胞比例逐渐减少, MV 逐渐下降。肝郁病理改变, 与舌苔脱落细胞 MI 的中层细胞数量呈正相关($R=0.622, P=0.000$), 与舌苔脱落细胞 MI 的表层细胞数量呈负相关($R=-0.610, P=0.000$), 与舌苔脱落细胞 MV 呈负相关($R=-0.556, P=0.000$)(表 2)。

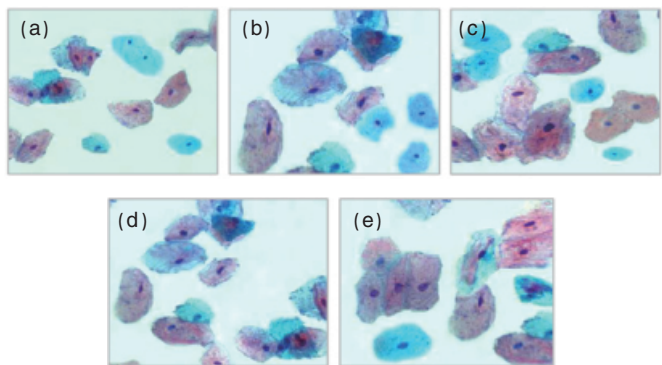


图 1 舌苔脱落细胞巴氏染色(200×)

Fig. 1 Tongue epithelial cell Papanicolaou staining (200×)

表 2 围绝经期综合征肝郁病理改变与舌苔脱落细胞 MI、MV 的关系 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Relationship between tongue epithelial cell MI, MV and liver depression pathological changes in perimenopausal syndrome ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	MI			MV
		底层细胞	中层细胞	表层细胞	
对照组	50	0	40.44±3.75	59.56±3.75	79.78±1.88
肝郁 0 级	22	0	42.27±4.00	57.91±3.79	79.05±3.18
肝郁 1 级	43	0	45.47±4.52	54.98±4.94	77.71±2.97
肝郁 2 级	59	0	48.37±4.88	51.59±5.05	75.78±2.69
肝郁 3 级	26	0	49.62±4.36	50.54±4.22	75.35±2.15

2.3 与舌苔脱落细胞凋亡指数的关系

采用流式细胞仪检测, 以观察不同肝郁病理改变围绝经期综合征患者的舌苔脱落细胞凋亡指数。图 2(a)为对照组, 图 2(b)—图 2(e)分别为肝郁 0—3 级, 舌苔脱落细胞的凋亡率逐渐升高, 提示肝郁病理改变, 与舌苔脱落细胞凋亡指数呈正相关($R=0.674, P=0.000$), 与舌苔脱落细胞 G_0/G_1 期、 G_2/M 期、S 期无明显相关性(表 3)。

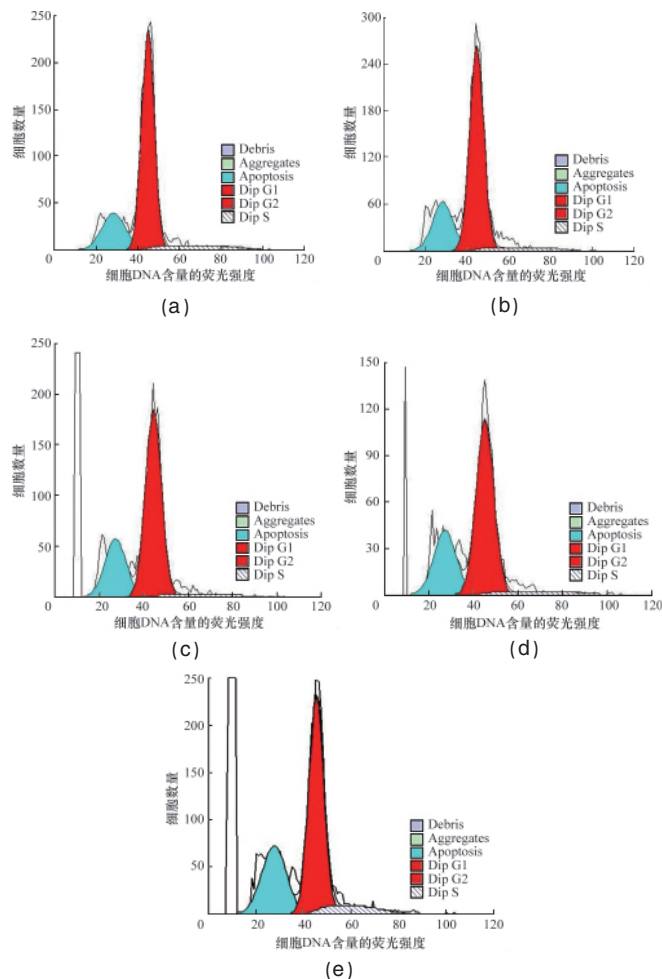


图 2 流式细胞仪检测舌苔脱落细胞凋亡率

Fig. 2 Flow cytometry tongue epithelial cell apoptosis rate

表 3 围绝经期综合征肝郁病理改变与舌苔脱落细胞凋亡指数的关系 ($\bar{x} \pm s$, 单位: %)

Table 3 Relationship between tongue epithelial cell apoptosis and liver depression pathological changes in perimenopausal syndrome ($\bar{x} \pm s$, unit: %)

组别	例数	舌苔脱落细胞周期分布			
		G_0/G_1	G_2/M	S	凋亡指数
对照组	50	91.58±1.36	3.05±0.97	5.37±1.30	15.62±1.65
肝郁 0 级	22	90.81±2.64	3.66±0.71	5.08±1.32	16.92±1.54
肝郁 1 级	43	91.10±2.45	3.08±0.83	5.89±1.40	18.78±2.34
肝郁 2 级	59	90.90±1.57	3.03±0.89	6.09±1.47	20.03±2.89
肝郁 3 级	26	91.99±2.05	3.16±1.19	5.18±1.58	21.73±2.48

2.4 与舌苔脱落细胞 Fas、Bax 和 Bcl-2 的关系

为探讨围绝经期综合征患者肝郁病理改变与舌苔脱落细胞凋亡调控蛋白表达之间的关系, 采用免疫组化法检测 Fas、Bax、Bcl-2 蛋白的表达, 可见其在舌苔脱落细胞中有表达, 胞浆呈棕黄色, 为阳性表达。图 3(a)、4(a)、5(a)分别为阴性对照, 舌苔脱落细胞胞浆中未见棕黄色; 图 3(b)、4(b)、5(b)分别为对照组, 舌苔脱落细胞胞浆中均可见棕黄色; 图 3(c)—图 3(f), 图 4(c)—图 4(f), 图 5(c)—图 5(f)分别为肝郁 0、1、2、3 级, 舌苔脱落细胞 Fas、Bax 蛋白表达阳性率逐渐升高, 而舌苔脱落细胞 Bcl-2 蛋白表达阳性率逐渐降低, 提示肝郁病理改变, 与舌苔脱落细胞中 Fas 的阳性率呈正相关 ($R=0.539, P=0.000$), 与舌苔脱落细胞中 Bax 的阳性率呈正相关 ($R=0.492, P=0.000$), 与舌苔脱落细胞中 Bcl-2 的阳性率呈负相关 ($R=-0.456, P=0.000$) (表 4)。

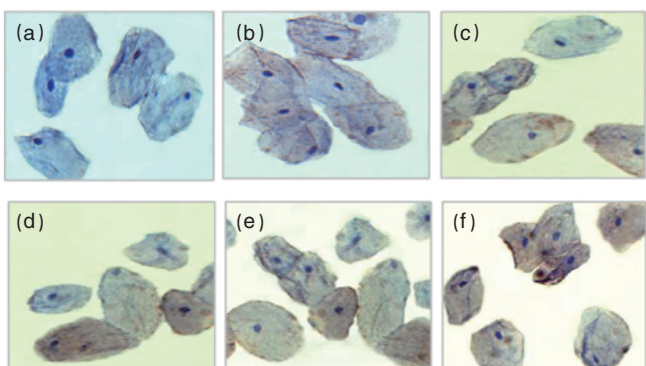


图 3 舌苔脱落细胞 Fas 免疫组化 (200×)
Fig. 3 Tongue epithelial cell Fas (200×)

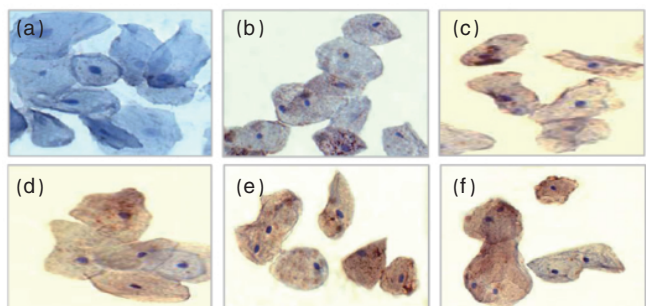


图 4 舌苔脱落细胞 Bax 免疫组化 (200×)
Fig. 4 Tongue epithelial cell Bax (200×)

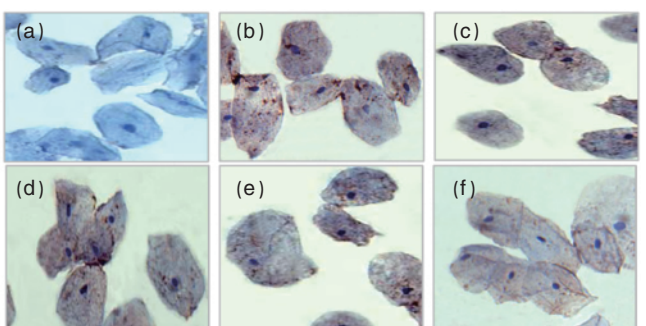


图 5 舌苔脱落细胞 Bcl-2 免疫组化 (200×)
Fig. 5 Tongue epithelial cell Bcl-2 (200×)

表 4 围绝经期综合征肝郁病理改变与舌苔脱落细胞 Fas、Bax 和 Bcl-2 的关系 ($\bar{x}\pm s$, 单位: %)

Table 4 Relationship between tongue epithelial cell Fas, Bax, Bcl-2 and liver depression pathological changes in perimenopausal syndrome ($\bar{x}\pm s$, unit: %)

组别	例数	Fas	Bax	Bcl-2
对照组	50	27.79±2.16	28.17±2.78	34.51±3.64
肝郁 0 级	22	28.02±3.65	29.61±2.51	33.78±3.41
肝郁 1 级	43	31.25±2.40	31.50±2.24	32.36±4.24
肝郁 2 级	59	32.21±4.21	31.55±2.89	30.55±4.29
肝郁 3 级	26	33.74±4.24	32.50±2.74	28.84±2.49

2.5 舌苔脱落细胞的超微结构观察

为观察舌苔脱落细胞超微结构变化与围绝经期综合征患者肝郁病理改变之间的关系, 采用透射电子显微镜观察舌苔脱落细胞的超微结构。舌苔脱落细胞均以表层细胞、中层细胞为主, 舌苔脱落细胞形态不规则、体积较大, 胞浆中细胞器的数量较少, 胞核较小、圆形或椭圆形、染色质浓聚, 核质比大。对照组 (图 6(a)) 舌苔脱落细胞, 可见少量凋亡、坏死的舌苔脱落细胞以及各种不同形态的细菌。观察组 (图 6(b)—图 6(e)) 肝郁 0、1、2、3 级患者的舌苔脱落细胞, 可见大量凋亡、坏死、碎裂的舌苔脱落细胞以及各种不同形态的大量细菌。

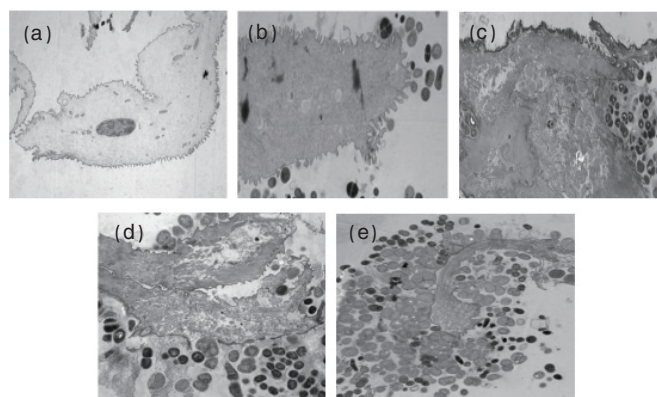


图 6 透射电子显微镜观察各组舌苔脱落细胞的超微结构 (8000×)

Fig. 6 Transmission electron microscope observations of the ultrastructure of tongue epithelial

3 讨论

本研究表明, 肝郁通过影响舌苔脱落细胞的凋亡调节围绝经期综合征患者的舌苔变化。围绝经期综合征虚实夹杂, 病情复杂, 传统的辨证难以兼顾各种兼夹证, 而证素辨证则以临床症状为基础, 其各种证名均由各证素互相组合而成, 抓住各证素的临床表现、证候属性, 并根据症状积分及贡献度, 可以依次计算病位和病性的积分, 才能全面地把握病理变化为临床的诊疗提供科学依据^[6]。因此, 本研究采用证素积

分方法,从肝郁病理角度深入分析围绝经期综合征的中医病理特点与舌苔变化之间的关系。

围绝经期女性天癸渐竭,肾精亏虚,肝体失于柔养,疏泄失常,肝失条达,则情志抑郁、烦躁易怒,气机运行不畅,产生肝气郁结或升泄太过的病理变化^[7]。舌苔变化与机体的生理和病理过程密切相关,可客观反映机体内部气血盛衰、寒热虚实、正邪斗争。舌苔变化受机体内外多种因素影响,其中肝功能变化是重要的影响因素之一。从现代生物全息律的角度来看,任何局部变化都近似于整体变化的缩影,舌也是人体的一部分,故舌苔变化可体现机体内部脏功能的变化。本研究结果显示,围绝经期综合征患者中肝郁证素积分均大于70分,提示肝郁是引发围绝经期临床表现的重要病理环节,也是引起舌苔变化的重要因素之一。

舌苔是一层分布均匀的苔状物,平铺于舌体表面,由胃气蒸腾脾湿上潮于舌而生^[8]。脱落舌上皮细胞是舌苔的主要成分之一,舌上皮细胞的增殖、分化、凋亡又是调节舌苔变化的主要因素。舌上皮细胞从基层层转变为脱落细胞具有一定规律性,受内外环境中多种因素的调控,生理情况下,舌上皮细胞的增殖、分化、凋亡在维持正常舌苔形成过程中发挥重要作用;病理情况下,舌上皮细胞的异常增殖、分化、凋亡是影响舌苔变化的重要因素^[9]。目前研究表明,舌苔厚薄与舌苔脱落细胞凋亡指数有一定关系,若舌上皮细胞的增殖与分化、凋亡处于相对平衡状态,舌苔表现为薄苔;当舌上皮细胞的凋亡占优势,细胞分化相对占劣势时,舌苔变厚,反之为剥苔^[10]。凋亡相关蛋白是调控舌苔脱落细胞凋亡的重要因素,其中Fas是启动舌苔脱落细胞凋亡的重要调控蛋白^[11],Bax是促凋亡蛋白,Bcl-2则是抗凋亡蛋白,Bax、Bcl-2各自可形成同源二聚体,也可互相作用形成异二聚体,Bax、Bcl-2之间的比例是决定细胞是否凋亡的关键因素^[12-13]。

本研究结果显示,舌苔脱落细胞MI、MV变化与肝郁病理变化密切相关。流式细胞仪检测证实舌苔脱落细胞同时存在增殖、分化和凋亡现象,而肝郁病理改变,与舌苔脱落细胞凋亡指数呈正相关,表明舌苔脱落细胞的凋亡是反映肝郁病理变程度的重要指标。免疫组化检测显示,肝郁病理改变与舌苔脱落细胞中Fas、Bax的阳性率呈正相关,与舌苔脱落细胞中Bcl-2的阳性率呈负相关,表明Fas、Bax、Bcl-2蛋白表达水平的变化可能是影响舌苔脱落细胞凋亡程度的重要依据。

4 结论

肝郁病理是围绝经期综合征的核心病机之一,与舌苔脱落细胞MI的中层细胞数量呈正相关,与舌苔脱落细胞MI的表层细胞数量及MV呈负相关。

肝郁病理改变与舌苔脱落细胞凋亡指数呈正相关,与舌苔脱落细胞中Fas、Bax的阳性率呈正相关,与舌苔脱落细胞中Bcl-2的阳性率呈负相关。

参考文献 (References)

- [1] Hakimi S, Mirghafurvand M, Seiedin S A. Comparative study of climacteric symptoms in perimenopausal and postmenopausal women in Tabriz, Islamic Republic of Iran[J]. *East Mediterr Health J*, 2010, 16(11): 1165-1169.
- [2] Timur S, Sahin N H. The prevalence of depression symptoms and influencing factors among perimenopausal and postmenopausal women[J]. *Menopause*, 2010, 17(3): 545-551.
- [3] 梁文娜, 李灿东, 高碧珍, 等. 围绝经期综合征患者舌苔脱落细胞成熟度与肝郁病理的关系研究 [J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25 (12): 2199-2201.
Liang Wenna, Li Candong, Gao Bizhen, et al. *China Journal of Traditional Chinese Medicine and Pharmacy*, 2010, 25(12): 2199-2201.
- [4] 乐杰. 妇产科学[M]. 6版. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 350-351.
Le Jie. *Obstetrics and gynecology* [M]. 6th ed. Beijing: People's Medical Publishing House, 2004: 350-351.
- [5] 朱文锋. 证素辨证学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 36-77.
Zhu Wenfeng. *Syndrome element differentiation* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 36-77.
- [6] 梁文娜, 李灿东, 李西海. 围绝经期综合征证素规律的临床研究[J]. *福建中医学院学报*, 2009, 19(6): 3-5.
Liang Wenna, Li Candong, Li Xihai. *Journal of Fujian University of Traditional Chinese Medicine*, 2009, 19(6): 3-5.
- [7] 梁文娜, 李灿东, 李西海. 疏肝补肾法治疗围绝经期综合征的临床研究[J]. *光明中医*, 2009, 24(8): 1421-1422.
Liang Wenna, Li Candong, Li Xihai. *Guangming Journal of Chinese Medicine*, 2009, 24(8): 1421-1422.
- [8] 李灿东, 高碧珍, 兰启防, 等. 原发性不孕症舌印片与阴道脱落细胞的对照观察[J]. *福建中医学院学报*, 2004, 14(2): 3-6.
Li Candong, Gao Bizhen, Lan Qifang, et al. *Journal of Fujian University of Traditional Chinese Medicine*, 2004, 14(2): 3-6.
- [9] Ahmed M M. Expression profile of apoptotic mediators and proliferative markers in oral squamous cell carcinoma [J]. *J Egypt Natl Canc Inst*, 2009, 21(2): 85-92.
- [10] Wu Z, Li M, Zhang Y, et al. Study on relationship between the thickness of tongue fur and the expressions of apoptosis-related genes of the tongue epithelial cells in patients with diseases of the digestive system[J]. *J Tradit Chin Med*, 2007, 27(2): 148-152.
- [11] Lopez A D, Avsarala S, Grewal S, et al. Differential role of the Fas/Fas ligand apoptotic pathway in inflammation and lung fibrosis associated with reovirus 1/L-induced bronchiolitis obliterans organizing pneumonia and acute respiratory distress syndrome [J]. *J Immunol*, 2009, 183(12): 8244-8257.
- [12] Del Puerto H L, Martins A S, Moro L, et al. Caspase-3/-8/-9, Bax and Bcl-2 expression in the cerebellum, lymph nodes and leukocytes of dogs naturally infected with canine distemper virus[J]. *Genet Mol Res*, 2010, 9(1): 151-161.
- [13] Hasnan J, Yusof M I, Damitri T D, et al. Relationship between apoptotic markers (Bax and Bcl-2) and biochemical markers in type 2 diabetes mellitus[J]. *Singapore Med J*, 2010, 51(1): 50-55.

(责任编辑 吴晓丽)