

证的研究

冠心病痰瘀辨证与外周血单个核细胞 c-myc mRNA 表达的相关性研究

王东生¹ 袁肇凯² 黄献平² 谢梦洲² 卢芳国² 郭志华² 谭光波² 毛以林²

摘要 目的:观察冠心病痰瘀辨证与外周血单个核细胞 c-myc mRNA 表达的相关性。方法:以辨证属非痰非瘀、痰凝心脉、痰瘀痹阻证的冠心病患者各 10 例,健康志愿者 10 例为对象,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)技术,检测外周血单个核细胞 c-myc mRNA 的表达。结果:痰凝心脉组、痰瘀痹阻组与健康对照组差异有显著性(P 均 <0.01),冠心病 3 组间比较,差异亦有显著性($P<0.05$ 或 $P<0.01$),c-myc mRNA 表达量依非痰非瘀、痰凝心脉、痰瘀痹阻的顺序递增。结论:外周血单个核细胞 c-myc mRNA 表达异常可能是冠心病痰瘀演变的重要机制之一。

主题词 冠状动脉疾病/病理学 痰郁/病理学 辨证分型

冠心病(CHD)是严重危害人类健康的疾病之一。中医学历来非常重视痰瘀在冠心病发生发展中的作用,认为痰凝血瘀是其主要病理改变。基因 c-myc 表达上调使血管平滑肌细胞(VSMC)过度增殖^[1,2],它对 CHD 发病的影响日益受到关注。本研究采用逆转录-聚合酶链反应方法,以外周血单个核细胞 c-myc mRNA 表达水平为指标,观察与中医痰瘀辨证的相关性。

1 对象和方法

1.1 病例选择标准:冠心病诊断参照《3200 个内科疾病诊断标准》^[3],中医辨证参照《中医病证诊断疗效标准》^[4]。

1.2 一般资料:长沙冶金研究设计院正常体检者 10 例为健康对照组。2001 年 11 月湖南中医学院附属第二医院诊断为冠心病且符合中医辨证标准的患者 30 例,包括非痰非瘀、痰凝心脉、痰瘀痹阻 3 组,各 10 例。痰凝心脉证:男性 6 例,女性 4 例,年龄 48~79 岁,平均 57.2 ± 7.83 岁;痰瘀痹阻证:男性 6 例,女性 4 例,年龄 48~79 岁,平均 58.4 ± 8.11 岁;非痰非瘀证:男

性 6 例,女性 4 例,年龄 47~79 岁,平均 57.03 ± 8.05 岁;健康对照组 10 例,男性 6 例,女性 4 例,年龄 49~79 岁,平均 56.8 ± 7.96 岁。经询问无心血管病史,体格检查无阳性体征。以上 4 组性别、年龄经统计学检验,差异无显著性($P>0.05$)。

1.3 总 RNA 提取:取肘静脉抗凝血 5ml,加 4ml 淋巴细胞分离液(Ficoll),离心,取中间单个核细胞层,转入另一管,生理盐水洗涤,取 8×10^6 个细胞,加 1ml Trizol 振荡,加 0.2ml 氯仿振荡,12000×g 4℃ 离心 15min,取上层水相于另一管中,加 0.5ml 异丙醇,室温孵育 10min,12000×g 4℃ 离心 10min 弃上清,RNA 沉淀于管底,加 1ml 75%酒精洗涤,7500×g 4℃ 离心 10min,弃上清,室温干燥 20min,加 20μl DEPC 处理水溶解 RNA。

1.4 逆转录:各取 RNA 15μl,加 Oligo (dT) 1μl,65℃ 5min 冰上骤冷,加 DEPC 处理水 20μl, Rnasin 1μl 10mM DNTPs 2μl,5 倍反应缓冲液 10μl,逆转录酶 1μl,42℃ 孵育 2h。取出后置冰上骤冷,-86℃ 贮存备用。

1.5 PCR 扩增:内参照 β-肌动蛋白(β-actin)上游引物 5'-GAGCACCCTGTGCTGCTCACCCTAGG-3',下游引物 5'-GTGGTGGTGAAGCTGTAGCCACGCT-3',c-myc 基因上游引物 5'-TGCTGCATGAAGAGACA CCG-3',下游引物 5'-TTTCAACTGTTCTCGCCGTT-3'。在 PCR 管中,各加入 10×dNTPs(2mM)10μl,RT 产物 5μl,10×PCR 缓冲液 5μl,c-myc 上下游引物各 1μl,β-actin 上下游引物各 1μl,taq 酶 2μl,DEPC 处理水 24μl,反应参数 94℃ 45s,60℃ 45s,72℃ 90s,35 个循环,72℃ 延伸 10min。

1.6 琼脂糖凝胶电泳及图像分析:取 RT-PCR 产物电泳,用凝胶分析软件测灰度值,以目的基因与内参照灰度比值作为目的基因相对表达量的计量资料,进行半定量分析。用方差分析进行统计。

2 结果

CHD 痰瘀辨证与外周血单个核细胞 c-myc mRNA 表达的关系见附表。c-myc mRNA 表达量依

基金项目:湖南省教育厅重点项目(99A03),湖南省卫生厅资助项目(200215)

1 中南大学湘雅医院血液科,湖南省长沙市湘雅路 141 号(410008)

2 湖南中医学院

收稿日期:2002-11-08;修回日期:2002-12-30

附表 各组 CHD 外周血单个核细胞 c-myc mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	c-myc mRNA
健康对照组	10	1.44 ± 0.21
非痰非瘀组	10	1.53 ± 0.16
痰凝心脉组	10	1.70 ± 0.16*△
痰瘀痹阻组	10	1.89 ± 0.23*△△

与健康组比较, * $P < 0.01$; 与非痰非瘀组比较, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$

健康对照组→非痰非瘀组→痰凝心脉组→痰瘀痹阻组的顺序递进,且组间两两比例均有显著性差异。表明 CHD 发病由非痰非瘀→痰凝心脉→痰瘀痹阻 c-myc mRNA 表达量逐渐增加。

3 讨论

从基因水平看,CHD 的形成与 c-myc 异常表达相关,这与文献相符^[5]。通过细胞内基因 mRNA 表达水平的检测。可以了解该基因在细胞功能活动中的作用。运用 RT-PCR 对细胞内某一特定基因序列进行大量扩增后,检测该基因 mRNA 在细胞中的表达水平,在实验条件控制一致时,可半定量对比细胞内的 mRNA 含量的多寡,从而判断细胞基因的表达水平^[6]。本实验表明,健康人 c-myc 基因表达微弱,而 CHD 由非痰非瘀→痰凝心脉→痰瘀痹阻变化中表达逐渐增加,证型间比较差异有显著性,由此可知 CHD 痰瘀病理变化的机制。与 c-myc mRNA 异常表达有关。脂质代谢的异常是痰凝心脉的物质基础,血液流变学的异常是痰瘀痹阻的客观指征。从生物化学角度看痰是机体物质

(脂质)代谢过程失控生成并过量积累的各种病理产物,且可以在一定条件下转化成新的致病因素的那些物质的总称。痰瘀同源,并非同物,从各自的理化性质看,痰属于病理性生化物质在体内堆积的结果,存在一个量变过程,在其物理化学性质未发生变化之前尚不是致病因子,而只是疾病的表现形式和物质基础,瘀则是病理性生化物质的物理化学性质和生物学功能发生了改变或同时伴有相关细胞结构和功能改变的结果。外周血单个核细胞 c-myc mRNA 的异常表达是痰瘀病理改变的分子生物学基础,从非痰非瘀→痰凝心脉→痰瘀痹阻,基因表达量依次增加,很可能是 CHD 因虚(非痰非瘀)致实(痰瘀),因实致虚,终致虚实夹杂的分子生物学机制。

参考文献

- 1 Hamon M, Bauters C, McFadden EP, et al. Restenosis after coronary angioplasty. Eur Heart J, 1995, 16(Suppl 1): 33-48.
- 2 Ross R. Atherosclerosis, an inflammatory disease. N Engl J Med, 1999, 14: 115-126.
- 3 贝政平主编. 3200 个内科疾病诊断标准. 北京: 科学出版社, 1998: 49-53.
- 4 国家中医药管理局发布. 中国病证诊断疗效标准. 南京: 南京大学出版社, 1994: 18-19.
- 5 Taubman MB, Rollins BJ, Poon M, et al. JE mRNA accumulates rapidly in aortic injury and in platelet-derived growth factor-stimulated vascular smooth muscle cells. Circulation, 1992, 70(2): 314-325.
- 6 Goswami PC, Albee LD, Spitz DR, et al. A polymerase chain reaction assay for simultaneous detection and quantitation of proto-oncogene and GAPD mRNAs in different cell growth rates. Cell Prolif, 1997, 30(6-7): 271-282.

北京市东方中医药培训中心手穴诊疗培训班 招 生 通 知

为发掘民族瑰宝、弘扬中医精粹,满足广大学员开展特色诊疗的需求,北京市东方中医药培训中心将于 2004 年 5 月 26 日至 5 月 31 日(5 月 26 日报到)在北京举办“手穴诊疗培训班”。由中国老年教授协会医学专业委员会手诊分会副会长、江苏省常州市手穴诊疗研究所所长刘浩兴主讲,传授“望诊、触诊、压诊”的手穴诊病方法。

该法以中医动态整体观念为基石,交融西医静态组织解剖论,率先运用阴阳理论,将现代基因观点应用于手诊,数分钟即可概知家族遗传性疾病及自身健康状况,鉴别诊断及对诸多疑难病症的诊治观点,方法独特。并能根据掌、指的各种特征预示部分隐患。该手诊法采用中西医结合理论,直观明了、易学易用。为广大医务工作者诊病寻根、治病求本,不治已病治未病提供了一条新思路、新方法。

学费 680 元,学期 5 天,结业后颁发中英文对照(盖钢印)的结业证书和继续教育学分证书,凡参加专修班学员的优秀论文,《中医杂志》将择优发表或在当年增刊上发表。欲学习者请先交报名费 10 元(注明班别)并附个人简况(注明通讯地址、邮政编码、联系电话、从事职业等)。同一地区同时 4 人以上团体报名,每人可免学费 100 元。我中心收到报名函后即做排名安排,经审查合格发入学通知。

报名联系地址:北京东城区北新仓 18 号中医杂志社内北京东方中医药培训中心,邮编:100700,电话:(010)64013009,传真:(010)64050201。联系人:梅丽。

京教社广字(东城)2004003 号