

证 的 研 究

高血压病和 2 型糖尿病血瘀证患者辨证分型与
白细胞中 c-fos 等基因表达的相关性研究马 民^{*}

摘要 目的:进一步探索血瘀证的微观机理,从基因水平探讨血瘀证微观实质。方法:以病证结合方式,严格按照诊断标准选取 160 例高血压病和 2 型糖尿病血瘀证和非血瘀证患者,用先进的血液生化指标和实验技术,进行了 c-fos 基因、c-jun 基因和 CD62p 基因表达的观察、对比、分析,并以健康人为对照,从基因水平对血瘀证形成的微观机理和演变规律进行探索。结果:通过对血瘀证密切相关的微观指标的观察和分析,提出了血瘀证患者存在 c-fos、c-jun、CD62p 基因异常表达,并且其指标的异常及基因表达水平的高低与血瘀证各型之间存在密切关系。结论:基因组学是血瘀证实质研究的最佳切入点。血瘀证现代研究应积极引进微观辨证学和基因科学的最新成果,以丰富和发展中医基础理论,并为中医临床治疗学提供分子生物学依据。

主题词 高血压/诊断 糖尿病,2 型/诊断 辨证分型

Study on Correlativity of TCM Syndrome Types with Expression of c-fos and Other Genes in Leukocytes in the Patient of Hypertension and Type II Diabetes with Blood Stasis

Ma Min

(Department of TCM, Medical College of Jinan University, Guangdong 510632)

Objective: To further probe into mechanism and essence of blood stasis from gene level. **Methods:** 160 cases of hypertension and type II diabetes with blood stasis or no blood stasis were strictly selected according to criteria of diagnosis and by combination of diseases with syndrome, and expressions of c-fos, c-jun and CD62p genes were investigated, compared and analyzed with healthy persons as controls. **Results:** There were abnormal expressions of c-fos, c-jun and CD62p genes in the patient with blood stasis, and there were close relation of the abnormality and expression levels of the genes with various types of blood stasis. **Conclusion:** Genomics is the best way for studies of essence of blood stasis syndrome, which can enrich and develop basic theory of TCM and provide a basis of molecular biology for clinical therapeutics of TCM.

Key Words Hypertension/diagnosis; Diabetes, type II /Diagnosis; Typing of TCM syndromes

血瘀证见于多种疾病,是一种综合性病理状态,其形成机理非常复杂。近年来,对血瘀证的基础研究取得了很大进展,已开始从神经、内分泌、免疫调节(NEI 网络)方面进行血瘀证形成机理的综合性研究工作,并且运用分子生物学的理论和技术从基因水平探索血瘀证的形成机理,逐步开展了相关基因表达与血瘀证形成关系微观机制的研究和探索,使对血瘀证的基础研究更加深入。我们在研究中为了避免动物模型的诸多不可靠性,采取了病证结合的研究方式,选择具有代表性的两种疾病——2 型糖尿病、高血压病,通过对两种疾病血瘀型与非血瘀型患者周围血白细胞 c-fos、c-jun 和 CD62p 基因表达的比较,进行血瘀证形成机理的研究。以求进一步探索血瘀证的微观实质,为“证”实质的研究及丰富和发展中医基础理论做有益的探索,同时为

高血压病、2 型糖尿病等血瘀相关性疾病的预防、诊断和治疗提供客观、有效的实验依据。

1 临床资料

1.1 病例来源:入选病例均来自 2001 年 3 月~2003 年 3 月收治的山东地区的高血压病及 2 型糖尿病患者。临床病例观察点设于山东中医药大学第二附属医院心血管内科及内分泌科,包括住院和门诊两部分患者。

1.2 病例选择标准:2 型糖尿病诊断按 1980 年 WHO 制定的标准即空腹血糖 $>7.8\text{mmol/L}$ 或随机血糖 $>11.1\text{mmol/L}$;高血压病诊断标准采用卫生部、中国高血压联盟编写的《中国高血压防治指南》[与 1999 年 WHO/ISH(世界卫生组织/国际高血压学会)制定的高血压病诊断标准大致相同]:收缩压 $\geq 140\text{mmHg}$ 或舒张压 $\geq 90\text{mmHg}$ 为高血压。血瘀证诊断按我国活血化瘀专业委员会于 1982 年制定、1986 年修订的血瘀证诊断标准。

通过临床检查及实验室检测排除继发性高血压病

基金项目:国家中医药管理局立项课题(2000-J-B-18)

* 暨南大学医学院中医系,广东省广州市石牌(510632)

收稿日期:2004-02-19;修回日期:2004-04-01

及继发性糖尿病。

1.3 分组方法:按照随机原则,将入选患者分为血瘀型组 100 例及非血瘀型组 60 例,包括高血压病血瘀型 49 例,2 型糖尿病血瘀型 51 例;非血瘀型组包括高血压病非血瘀型 31 例,2 型糖尿病非血瘀型 29 例,血瘀型组与非血瘀型组例数之比为 1.67:1。

正常对照组来源于山东中医药大学第二附属医院健康体检者,男 7 例,女 8 例,平均年龄 56.9 ± 15.3 岁,与患者组相比差异无显著性($P > 0.05$)。无心、肺、肝、肾、脑等疾病,血压正常,无糖尿病和高脂血症,无吸烟史,1 周以上无服药史。

1.4 一般资料:本组 160 例中,男 86 例,女 74 例,男女例数比为 1.14:1,年龄 38~81 岁,平均 58.5 ± 16.5 岁;职业以脑力劳动者居多,占 2/3;病程 1~12 年,平均 7.52 ± 3.82 年。经统计学分析两组在年龄、性别、职业构成等方面差异无显著性($P > 0.05$)。

1.5 血瘀证中医证候学观察:根据临床表现,将患者分为气虚血瘀组 35 例,其中男 19 例,女 16 例;气滞血瘀组 31 例,其中男 17 例,女 14 例;阴虚血瘀组 19 例,其中男 7 例,女 12 例;痰浊血瘀组 15 例,其中男 8 例,女 7 例。发生率分别为 35%、31%、19%、15%。

2 检测方法

2.1 标本制备:所有受试对象取血时间限定在晨起 7:30~8:00 抽取空腹静脉血 4ml,2ml 注入已添加抗凝剂(10%EDTA-2Na30μl、抑肽酶 40μl)的试管中,轻轻混匀。然后将抗凝血标本 2ml 小心地加于 4ml 淋巴细胞分离液之液面上,1500r/min,离心 15 分钟,放入含 4ml Hank's 液的试管中,充分混匀,2000r/min 离心 10 分钟,吸去上清,沉淀经反复洗两次,即得所需的白细胞。将沉淀物吸取 50μl 滴于玻片上,推片、固定、吹干置于 4℃ 冰箱备用。另外 2ml 血标本放入 1:9EDTA 抗凝管内,轻轻混匀。抽血过程中,避免接触玻璃器皿。800r/min 离心,取上层血小板血浆,3500r/min 离心 15 分钟,弃上清,加入磷酸盐缓冲液(PBS),3000r/min 离心漂洗,每次 5 分钟,共 3 次,以 1%多聚甲醛 2ml,室温固定 30 分钟。

2.2 主要仪器及试剂:(1)仪器:切片机、恒温水浴箱、微量移液器、杂交炉、Olympus 光学显微镜、Olympus 照相显微镜。KDC-2046 型低温大容量离心机(中国科技大学科技实业总公司中佳光电仪器分公司生产),FACScan 型流式细胞仪(美国 BD 公司生产)。(2)试剂:兔抗人、鼠 c-fos 及 c-jun 单克隆抗体、正常山羊血清、生物素化羊抗兔、抗鼠 IgG、链霉菌抗生物素蛋白一过氧化物酶、DAB 二氨基联苯胺显色试剂盒。以上

试剂均购自武汉博士得生物工程公司。异硫氰酸荧光素(FITC)标记的单克隆抗体,鼠抗人 CD62p-FITcMcAb 及阴性对照羊抗鼠 IgGFITcMcAb,均为美国贝克曼库尔特有限公司 Immunotech 产品。

2.3 实验方法

2.3.1 c-fos、c-jun 基因的检测方法:(1)主要步骤:切片,3%过氧化氢孵育 10 分钟,以消除内源性过氧化物酶的活性;以蒸馏水冲洗 3 次,每次 5 分钟;滴加复合消化液,室温下 10 分钟;蒸馏水冲洗 3 次,每次 5 分钟,滴加山羊血清封闭,室温孵育 20 分钟,倾去,不洗;滴加一抗,稀释 c-fos、c-jun 均为 1:100,4℃ 过夜;PBS 冲洗 3 次,每次 3 分钟;滴加试剂 2 生物素化羊抗兔 IgG,37℃ 孵育 30 分钟,PBS 冲洗 3 次,每次 3 分钟;滴加链霉菌抗生物素蛋白一过氧化物酶,37℃ 孵育 20 分钟。以 PBS 冲洗 4 次,每次 3 分钟;显色剂(DAB)显色,室温下 20 分钟;自来水充分冲洗,苏木素复染,脱水、透明、封片。(2)结果判定:由 2 名病理医师在不知道任何临床资料的情况下进行评估,每张切片至少观察 5 个视野,阳性细胞着色呈棕黄色。评价标准:阴性表达(-):未见棕黄色染色的细胞;阳性表达(+):每高倍视野阳性细胞数 $< 20\%$;显性表达(++):每高倍视野阳性细胞数 $20\% \sim 50\%$;强阳性表达(+++):每高倍视野阳性细胞数 $> 50\%$ 。

2.3.2 血小板 CD62p 基因的检测方法:将固定的血小板悬液以 2500r/min 离心 10 分钟,弃上清,加入相应荧光标记抗体,置室温 30 分钟,加入 PBS2ml,2500r/min 离心 10 分钟,弃上清,加入 1mlPBS 将血小板悬浮,上机检测^[1,2]。

2.4 统计学处理:数据以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 Ridit 分析、方差分析、q 检验进行统计学分析。

3 结果

3.1 c-fos、c-jun 基因在高血压病和 2 型糖尿病血瘀证和非血瘀证患者白细胞中表达比较:表 1 示,c-fos 基因表达在高血压病组明显强于正常对照组($P < 0.05$),而 2 型糖尿病组与正常对照组相比较,有升高趋势,但差异无显著性($P > 0.05$)。c-jun 基因的表达在高血压组和 2 型糖尿病组均有升高趋势,但差异无显著性($P > 0.05$)。与正常对照组比较,血瘀证组白细胞中 c-fos、c-jun 基因表达水平均明显增高($P < 0.05$);与非血瘀证组相比,血瘀证组白细胞中 c-fos、c-jun 基因表达水平差异也均有显著性($P < 0.05$)。

3.2 血瘀证各型白细胞中 c-fos、c-jun 及血小板 CD62p 基因表达水平比较:表 2 示,与正常对照组相比,气虚血瘀组、气滞血瘀组、阴虚血瘀组、痰浊血瘀组

表 1 c-fos、c-jun 基因在高血压病和 2 型糖尿病血瘀证和非血瘀证患者中的表达比较(例)

组别		例数	c-fos				c-jun			
			—	+	++	+++	—	+	++	+++
正常对照组		15	12	3	0	0	13	2	0	0
血瘀证组	高血压病	49 ^{△★}	6 [△]	18 [△]	20 [△]	5 [△]	12	27	8	2
	2型糖尿病	51 ^{△★}	10	28	13	0	17	30	1	3
非血瘀证组	高血压病	31	23 [△]	8 [△]	0	0	24	7	0	0
	2型糖尿病	29	20	9	0	0	25	4	0	0

与正常对照组比较,△*P*<0.05;与非血瘀证组比较,★*P*<0.05

表 2 血瘀证各型白细胞中 c-fos、c-jun 及血小板 CD62p 基因表达水平比较

组别	例数	c-fos(例)				c-jun(例)				CD62p(%, $\bar{x}\pm s$)
		—	+	++	+++	—	+	++	+++	
正常对照组	15	12	3	0	0	13	2	0	0	2.06±1.09
气虚血瘀组	35 [△]	7	21	7	0	10	22	2	1	5.26±2.89 [△] ★
气滞血瘀组	31 [△]	2 [*]	9 [*]	15 [*]	5 [*]	10	16	3	2	8.21±2.02 [△]
阴虚血瘀组	19 [△]	4	9	6	0	5	11	2	1	5.66±2.83 [△] ★
痰浊血瘀组	15 [△]	3	7	5	0	4	8	2	1	5.74±2.92 [△] ★

与正常对照组比较,△*P*<0.05;与气虚血瘀组比较,**P*<0.05;与气滞血瘀组比较,★*P*<0.01

白细胞中 c-fos、c-jun、血小板 CD62p 基因表达水平均显著增高(*P*<0.05)。而血瘀证各型之间相比较,气滞血瘀组白细胞中 c-fos 基因表达水平明显高于气虚血瘀组(*P*<0.05),而气虚血瘀组和阴虚血瘀组白细胞中 c-fos 基因表达水平较弱。而血瘀证各型之间相比较,c-jun 基因表达水平差异均无显著性(*P*>0.05)。气滞血瘀组与气虚血瘀组、阴虚血瘀组和痰浊血瘀组相比较,血小板 CD62p 的表达水平差异有极显著性(*P*<0.01),气滞血瘀组明显高于其它各组,而气虚血瘀组、阴虚血瘀组和痰浊血瘀组之间相比较,血小板 CD62p 的表达水平差异无显著性(*P*>0.05)。提示血小板 CD62p 的表达水平升高与气滞血瘀证关系更为密切。

3.3 高血压和 2 型糖尿病组血小板 CD62p 的表达水平比较:高血压和 2 型糖尿病组血小板 CD62p 的表达水平显著高于正常对照组(*P*<0.01),提示高血压病和 2 型糖尿病与血小板活化有关。

3.4 血瘀证组、非血瘀证组血小板 CD62p 的表达水平比较:血瘀证组和非血瘀证组血小板 CD62p 的表达水平均高于正常对照组(*P*<0.05 或 *P*<0.01),而血瘀证组血小板 CD62p 的表达水平显著高于非血瘀证组(*P*<0.05)。提示血瘀证比非血瘀证患者血小板活化和破坏更严重。

4 讨论

本研究结果表明,高血压病患者白细胞 c-fos 基因表达明显增强,显著强于正常对照组,提示 c-fos 基因的表达与高血压病的发生发展关系密切,进一步研究发现,高血压病和 2 型糖尿病血瘀证组 c-fos、c-jun 基

因表达明显强于正常对照组和非血瘀证组,表明 c-fos、c-jun 基因的异常表达是参与血瘀证的形成和演变的重要因素。现代分子生物学研究认为,c-fos、c-jun 基因能编码具有生长因子、生长因子受体、G 蛋白、细胞内信息分子及转录调节因子功能的蛋白质,其实际上是编码调控蛋白质的正常细胞基因。它们与正常细胞的生长、分化、胞内信息传递密切相关,二者可能是维持动脉管壁细胞正常生长及功能的“管家基因”,它们的低水平表达对维持动脉壁细胞的正常生长及功能具有重要作用^[3]。正常情况下,常规实验手段一般测不到 c-fos、c-jun 基因的表达,而 c-fos、c-jun 基因的表达产物是与细胞增殖调控有关的主要核蛋白,它们在血管平滑肌细胞(VSMC)增殖调控中的作用日益引起人们的关注。内皮素-1(ET-1)是强效丝裂原,可使 VSMC 的合成增强 2~3 倍,VSMC 在受到刺激后,c-fos、c-jun 基因的表达活性明显增强^[4]。

高血压病和 2 型糖尿病在其发生发展及演变过程中均与血管平滑肌细胞(VSMC)异常增殖关系密切,表现以 VSMC 异常增殖为主要特征。其既符合中医学“血瘀证”的临床特征,又符合痰瘀为病的病机特点。大量文献报道^[5]证实,血浆 ET-1 水平的异常升高是血瘀证形成的重要病理生理学基础。而血浆高水平的 ET-1 可反射性刺激 c-fos、c-jun 基因表达增强,提示 c-fos、c-jun 基因异常表达是血瘀证形成的分子生物学基础之一。本研究在比较血瘀证各型 c-fos、c-jun 基因表达水平后发现,气滞血瘀组、气虚血瘀组、阴虚血瘀组和痰浊血瘀组 c-fos、c-jun 基因表达均较正常对照组增强。而血瘀证各型之间,c-fos 基因表达以气滞血瘀组

较为显著,c-jun 基因表达以痰浊血瘀组最高。现代研究认为,在细胞程序化死亡即凋亡发生时存在着 c-fos、c-jun 基因表达的调节。当血瘀患者表现为气滞血瘀或痰浊血瘀证候时,其为标本俱实,可认为血瘀证的前期或早期阶段,其表现可能为 c-fos 和(或)c-jun 基因转录和翻译水平均明显增强,而表现为 c-fos 蛋白、c-jun 蛋白增加。同时,c-fos 蛋白和 c-jun 蛋白又作为“第三信使”,调控其它靶基因和迟发基因的表达,如 bcl-2 即可能是其调控的基因之一^[6],发挥其抑制凋亡的作用。而伴随着血瘀证的发展演变或加重,患者出现气虚血瘀或阴虚血瘀证候表现时,其为本虚标实,由气虚或阴虚血瘀而致血细胞能量供应障碍,c-fos 和(或)c-jun 基因可发生转录水平增高而翻译水平轻度增高或只能高水平转录 mRNA 而不能高水平翻译成蛋白质,表现为 c-fos 蛋白、c-jun 蛋白水平较低。本组研究中,c-fos 基因表达气滞血瘀组与阴虚血瘀组和痰浊血瘀组相比,有升高趋势,但无显著差异;c-jun 基因表达血瘀证各组均无明显差异,其可能与样本含量有关,有待于增加各组样本数量以进一步研究和讨论。同时,统计学分析获得 c-fos、c-jun 基因表达相关系数为 0.401,具有非常显著性意义($P<0.01$)。证实了现代分子生物学关于“c-fos 蛋白能与其他种类的含有亮氨酸拉链结构的蛋白形成异二聚体结构,c-fos 即为其中最为重要的一种”的理论认识^[7]。

血小板活化分子颗粒膜蛋白(CD62p)是目前所知最能反映血小板活化的特异性指标,静息状态血小板浆内颗粒膜上的糖蛋白(CD62p),在血小板激活“脱颗粒”的过程中发生移位,与血小板外膜融合,表达于血小板的表面膜上,成为识别活化血小板的分子标记物。检测表达活化标志物的血小板数量,可以特异地评价血小板活化程度。血小板活化的最主要表现是粘附

和聚集,在这个过程中,血小板膜表面的粘附分子起着关键作用。本研究结果显示,高血压病和 2 型糖尿病患者血小板 CD62p 的表达水平较正常人显著升高,且两疾病间差异无显著性。提示了两种疾病的患者都存在血小板活化现象,血小板活化和破坏是高血压病和 2 型糖尿病共同的病理生理基础。进一步研究发现,血瘀证患者血小板 CD62p 的表达水平明显高于非血瘀证患者,而血瘀证组和非血瘀证组血小板 CD62p 的表达水平均高于正常对照组,提示了有血瘀证表现的患者血小板活化和破坏程度比无血瘀证表现的患者更为严重。血小板活化是血瘀证产生的重要病理基础之一。而高血压病和 2 型糖尿病非血瘀证患者血小板 CD62p 的表达水平也明显升高,说明两种疾病非血瘀证患者同样存在血小板的活化和破坏,但程度较血瘀证患者为弱。从微观辨证方面分析,可以认为此组患者已经处于亚临床血瘀证状态中,即虽然没有血瘀证的宏观表现,微观指标的异常却提示患者处于前瘀血状态,伴随着疾病的发展,患者即可出现血瘀证的宏观临床表现。

参考文献

- 1 尹格平.流式细胞术检测化疗前后卵巢癌细胞凋亡的临床意义.癌症.2000,19(4):383.
- 2 尹格平.实体瘤组织细胞粘附分子流式细胞研究方法的建立.中华医学检验杂志.1997,20(1):9.
- 3 汪浩川.癌基因及抗癌基因在实验性动脉硬化斑块中的转录表达.华西医科大学学报.1996,27(2):117-121.
- 4 温进坤,石缨,韩梅,等.原癌基因和在血管平滑肌细胞增殖调控中的作用.河北医科大学学报.1996,17(1):1-3.
- 5 朱建红,朱起贵.中医对微循环的若干认识.微循环杂志.2002,12(2):41-43.
- 6 信照亮,金莉,崔刚,等.局灶脑缺血再灌注后 c-fos 和 c-jun 基因的表达.西安医科大学学报.1999,20(2):248-250.
- 7 方慧,张军.c-jun 原癌基因及其表达产物的研究进展.国外医学分子生物学分册.2002,24(5):263-266.

(上接第 899 页)

脑,令人头痛”。张教授对于痰厥头痛,临证必先因势利导,开结降逆,随之温补培元,以固其本。

例 3:李某,女,5 岁。因头痛、呕吐反复发作 4 年而再发,百治不效,于 1996 年 12 月 14 日来诊。患儿头痛剧烈,呕吐倾胃而出,至胆汁咖啡样物,甚则昏厥,无明显诱因,每 1~2 周发作 1 次,每次发作呕吐 50~100 次不等,发作后悉为常人。曾在某医院诊断为“变异性偏头痛综合征”。诊见患儿头痛剧烈而呕吐不止,面色萎黄,舌苔薄白,脉细小数。此痰厥头痛也。张教授先以甘遂半夏汤开结降逆,攻下逐饮。处方:制甘遂 0.9g,生半夏 4.5g,生姜 4.5g,茯苓 15g,炒白芍 18g,

炙甘草 6g,吴茱萸 3g,姜黄连 3g,赭石 30g,白蜜(冲)1 匙,水煎服。连服 5 剂后,头痛、呕吐著减,唯清涎仍多,脉细,舌净苔嫩,此脾虚饮逆、中阳未和,再拟大建中汤温中补虚,以图固本。处方:党参 10g,炒花椒 3g,干姜 3g,茯苓 15g,生半夏 4.5g,生姜 4.5g,炙甘草 4.5g,赭石 30g,乌梅肉 9g,黄连 2.5g,饴糖(冲)1 匙,水煎服。继服 2 个月,患儿饮去症平,恢复日常生活。

按:方中利用甘遂与甘草相反之性,来增强逐饮之力,又佐以白芍、白蜜甘酸缓中,以防伤正。继予大建中汤温中散寒、振奋中阳,补脾以缓急,使阴寒消、浊阴降而厥逆除。更与二陈汤相配,以和胃降逆。全方共奏开结降逆、温阳健脾之功。