

专家论坛

中医证候与基因相关性研究的现状与反思

管冬元^{*} 方肇勤^{*}

管冬元(1969~),男,在读博士研究生,上海中医药大学副教授。1993年8月~1996年8月,于湖南省长沙市从事中医内科临床工作,1999年至今,在上海中医药大学从事《实验医学》、《分子生物学常用技术》的教学工作。主要从事中医基础理论的研究如治则治法、中医证候等及应用分子生物学技术开展中医药防治原发性肝癌的机理研究。发表学术论文20余篇,获国家自然科学基金资助2项。

摘要 从疾病相关基因的多态性、疾病相关基因表达的改变与中医证候的关系和证候与后基因组学的关系等三个方面,综述了国内中医证候与基因相关性研究的现状。提出中医证候的微观研究应当结合中医证候的客观化、标准化研究;研究中应注意“同病异治”、“异病同治”的结合,检测目标组织的合理选择,检测技术的选择和优化,以及排除盲从,注重锐意创新等。

关键词 证候 ④ 基因相关性研究

基因是生物遗传信息的携带者,在染色体上占有特定的位置,染色体上所有基因的总和称为基因组。各种生命现象都与不同组织的不同基因表达有关,因而揭示基因表达的奥秘才能从根本上解释复杂的生命现象,中医证候的形成与辨证论治的实现,亦符合这一规律。

1 进展与现状

近年来有关中医证候的基因水平的研究主要涉及以下3个方面。

1.1 疾病相关基因的多态性与中医证候的关系:两千多年前,中医学就有体质差异与易感疾病、多发疾病关系的记载,这样的认识一直延续下来,体质是证候形成的重要基础之一,体质与证候之间存在着固有的相关性、相应性^[1],证候常常具有体质的特点。基因多态性是指一种基因在人群中至少有2种表型,出现幅度均大于1%,它反映了进化过程中基因组与内、外环境相互作用的结果,是不同个体生物学性状和对疾病的易感性差别的原因之一。

(1)基因多态性与体质的关系:王文宝等采用补体依赖的微量淋巴细胞毒技术,探索了中国北方汉族健康人中医体质类型与人类HLA基因多态性的相关性。结果发现,HLA-A*0201基因与中国北方汉族人的阳多阴少型密切相关,HLA-B*0702基因则与阴多阳少型密切相关,而阴阳和平型未见与HLA-A、B、C基因相关。该研究进一步证明了中医体质差异与基因多态性的密切关系^[2]。(2)基因多态性与疾病发生后证候的关系:李显生等探讨了冠心病心血瘀阻证与纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1)基因启动子区4G/5G多态性的关系,结果表明,心血瘀阻证患者4G/5G基因型高于非心血瘀阻证,提示PAI-1基因4G/5G多态性可能与冠心病心血瘀阻证相关^[3]。李宜瑞等采用聚合酶链式反应——限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法,研究了注意缺陷多动障碍中医辨证分型与多巴胺D2受体TaqIA1等位基因多态性的相关性,结果发现,TaqIA1等位基因与肾虚肝阳上亢证关系极为密切,而心脾不足证则与健康人对照组间差异无显著性,提示该病临床最常见的这两种证候的发病机理在基因水平上并不相同^[4]。安胜军等从2500名中选取了长期居住在石家庄市的不同年龄段绝经后女性246例,测其腰椎、股骨骨密度,分为肾阴虚、肾阳虚、阴阳俱虚以及不确定型,检测其PvuII和XbaI的RFLP部位,与女性绝经后骨质疏松症证型关系的研究表明,PPxx基因型骨密度Z-score明显低于其他基因型,辨证属阴阳两虚^[5]。湛兵来等应用聚合酶链式反应,即单链构象多态性(PCR-SSCP)方法,对肝阳上亢和肝肾阴虚的高血压患者的酪氨酸羟化酶基因DHS4046、单胺氧化酶基因DxS6810、DxS993三种微卫星多态性进行了检测,结果发现,肝阳上亢证酪氨酸羟化酶基因中A1型明显高于健康人对照组及肝肾阴虚组,认为所导致的血浆去甲肾上腺素和肾上腺素含量的改变可能是肝阳上亢证分子机理之一^[6]。沈乃莹等采用聚合酶链式反应序列特异性引物(PCR-SSP)方法对急性脑梗死患者阴虚、阳虚、气虚、痰湿及血瘀证进行HLA-DQA1等位基因分型,提示HLA-DQA1*0501基因与阴虚体质相关联,HLA-DQA1*0301基因与气虚、痰湿及血瘀

基金项目:国家自然科学基金资助(30400582、30271576);上海市高等学校科学技术发展基金项目(04CB04)

* 上海中医药大学基础医学院实验中医教研室,上海市蔡伦路1200号(201203)

收稿日期:2004-11-25;修回日期:2005-03-14

体质相关联^[7]。孙伟正等采用微量淋巴细胞毒和PCR-SSP方法,研究了40例慢性再生障碍性贫血(简称慢性再障)患者的肾阴虚证和肾阳虚证与HLA基因多态性的关系,认为HLA-C1基因可能为肾阴虚型慢性再障易感基因的标志基因,或者是易感基因本身或其一部分,HLA-A30则可能为肾阳虚型慢性再障易感基因的标志基因,或者是易感基因本身或其一部分^[8]。也有学者从疾病相关基因中的等位基因的插入、缺失等方面检测,成玉斌等分析了非胰岛素依赖型糖尿病患者肾虚证与ACE基因多态性的关系,发现肾虚患者的ACE基因DD型和D等位基因的携带率明显增高,且肾阳虚DD型明显高于肾阴虚证^[9]。总之,已有的研究充分表明,目前一些比较热门的不同疾病基因的遗传改变与患病后中医证候的形成有一定的联系,一些基因的多态性改变与中医体质有关。

1.2 疾病相关基因表达的改变与中医证候的关系:现代医学研究证明,某个基因或某些基因在某种疾病的发生、发展及预后过程中起着至关重要的作用。(1)疾病相关基因与“同病异证”的关系:王东生等采用RT-PCR技术,观察了冠心病痰瘀辨证与c-myc基因表达的相关性,结果表明,痰凝心脉证、痰瘀痹阻证患者的c-myc基因表达显著增加,c-myc表达量按非痰非瘀、痰凝心脉、痰瘀痹阻的顺序递增^[10]。郭聂涛等探讨了2型糖尿病中医辨证分型与红细胞CRI分子基因型及数量表达的关系,发现红细胞CRI分子基因型及数量表达与2型糖尿病中医辨证分型,特别是肾阴亏虚型密切相关^[11]。(2)疾病相关基因与“异病同证”的关系。马民等应用免疫组织化学方法,研究了高血压病与Ⅱ型糖尿病血瘀证与非血瘀证患者白细胞c-fos基因表达的变化,认为c-fos基因的异常高表达可能是参与高血压病与Ⅱ型糖尿病血瘀证形成和演变过程的重要因素^[12]。(3)疾病相关基因与“同病同证”的关系。鄢东红等采用免疫组织化学方法和原位杂交法,研究自发性高血压大鼠(SHR)肝阳上亢证模型的酪氨酸羟化酶(TH)基因表达水平及潜阳方对其的影响,结果表明,SHR肝阳上亢证模型TH蛋白质及mRNA表达均明显增强,经用具有平肝熄风作用的潜阳方治疗后,其表达水平下降^[13]。以上研究表明,与一些疾病发生、发展及预后至关重要关系的基因或基因组表达的异常,与该病种固有证候或常见不同证候有着一定的关系。

1.3 中医证候与后基因组学的关系:随着生命科学的发展、生物技术的不断完善及中医证候研究的深化,证候与多基因表达的改变越来越受到重视。因此,近几年高通量基因表达改变检测技术——基因芯片或cDNA

Array技术开始引入证候的研究。

(1)“同病异证”不同证候基因表达的改变:刘莺等运用含有4096条人类全长基因的cDNA表达芯片技术,寻找不同胃癌证型组织中的相关基因表达谱差异表达,结果提示,胃癌中医临床常见热毒内蕴证与气虚夹瘀证都有免疫相关基因的下降,也有癌基因的上调,但热毒内蕴证基因表达提示了正气未虚,尚有防御能力,如nm23基因增高,P18基因表达增高;而气虚夹瘀证中则无此改变^[14]。吴元胜等用表达谱基因芯片筛选系统性红斑狼疮(SLE)差异基因,比较不同证型的基因表达的改变。结果共发现了涉及细胞因子及受体、免疫相关基因、细胞信号和传递蛋白、蛋白翻译合成、离子通道和运输蛋白、细胞周期蛋白、DNA和RNA结合、转录蛋白、细胞的外基质成分等16大类580条基因有显著差异表达;热毒炽盛型和阴虚内热型SLE大部分基因,特别是代谢相关基因表达具有一致性^[15]。(2)不同证候与辨证论治基因表达的改变:王肃等应用基因芯片技术研究利血平脾虚证大鼠模型海马基因表达谱的变化。结果在芯片4096条靶基因中,以正常组作对照,脾虚证差异表达的基因51条,占检测基因的1.25%,其中表达下调的基因37条,已知基因8条;表达上调的基因14条,已知基因6条。模型大鼠海马的基因表达改变涉及免疫、炎症反应、蛋白聚糖、细胞骨架、离子通道、信号传导等多方面^[16]。王米渠等采用基因芯片技术,研究热药有效调节的寒证差异表达基因,结果发现,所选5例典型寒证患者在使用热药有效治疗后,初步筛选出热药疗寒相关的59条差异表达基因。其中表达下调的有43条,表达上调的17条,这些基因表达涉及广泛,包括生理、病理等方面^[17]。

2 问题与反思

在取得以上研究进展的同时,也暴露出一些问题,值得反思。

2.1 中医证候的微观研究应当结合中医证候的客观化、标准化研究:中医证候与有关基因、基因表达谱的关系的研究,是从微观分子水平来揭示中医证候的本质。该研究的前提之一,是对中医证候和辨证论治理论与实践有一个完整、准确的认识,能够准确地辨证,从而保证纳入研究的患者和实验动物具有代表性^[18~21]。传统上,中医辨证主要依据四诊采集的资料,其采集存在客观化、标准化的要求;同时四诊信息变化的内在生物学变化也有待不断深入说明。近50年来,尽管不少学者从四诊八纲、脏腑经络气血、治则治法等角度及生理病理学、细胞与分子生物学、免疫学、血流动力学等方面对证候本质及其客观指标进行了研究,取得了较

大进展。但证候的客观化研究还是初步的、散在的,而公认的具有特异性的指标仍较少,且缺乏系统性、规范性和客观性。临床文献中辨证、分型标准不统一、证名不规范仍十分普遍。因此,在开展中医证候相关基因及基因组学研究的同时,应广泛开展有关证候的客观化与标准化研究。另外,“以方测证”是中医辨证论治理论历来重视的认知方法,在证候的标准化与客观化研究的同时,实际操作中可以结合有效方、经典方的验证,作为证候评判的参考。

2.2 研究的一些基本注意点:(1)关于“同病异治”、“异病同治”的研究思路:从现有的研究报道看,大多集中在“同病异治”上,即在现代医学确诊为某一疾病的前提下,进行辨证,是辨证与辨病相结合,这样的研究结果易于比较和国际化。但是,辨证论治的另一特点是“异病同治”,欲全面从分子基因水平上揭示证候的本质,“异病同治”同样是重要的内容,甚至意义更大。而且我们认为,可能的话,把“同病异治”、“异病同治”结合研究更容易阐明证的本质。例如“肝气郁结证”、“脾虚证”等是慢性肝炎、肝硬化、原发性肝癌等疾病共有的常见证候,结合起来研究,更容易比较其中的异同。(2)关于检测的目标组织选择。目前通常采用两种目标组织:其一,抽取血液;其二,取病变组织。临床研究,大多采用抽取受检人员的血液(方便易得),而实验动物则大多采用有关组织。但是,临床采用受检人员血液的做法大多依据不足,其中作为遗传基因组学的检测是可以的,但由于疾病导致病变组织的基因组变异,以及病变组织的基因表达的差异,其病变或关键组织就不存在于血液中。国外在这方面的基础研究还不多,缺少广泛的理论支持。诚然,中医证候概括的是机体在疾病某一阶段生理病理状态的综合,部分在组织解剖位置上尚没有明确的定位,这从客观上给证候的微观研究带来了许多不确定的因素,也表明证候研究需要多学科、多技术的广泛持久的研究,并要求不断吸收国外最新研究进展。总之,所取组织的代表性直接影响到研究结果的意义。(3)关于检测技术的选择和优化:随着生物技术的不断完善与更新,给从基因水平上研究中医证候和辨证论治机理创造了空前优越的条件。例如,单基因研究可以选择 PCR 技术、分子杂交技术;基因组差异表达研究可选用基因表达芯片、cDNA Array、DDPCR、基因表达连续分析法(SAGE)、大规模 cDNA 测序、表达序列标签(EST)数据库的比较和蛋白质的二维凝胶电泳、差减文库的构建、抑制性消减杂交(SSH)等。这些技术与方法所要求的条件不一、耗资不一、效率不一、技术难度不同,不同研究者可以选择其

便于操作者,有条件的部门可以采用高效的技术如基因芯片,以及多技术联用,使研究的结果更为全面与可靠^[20]。

2.3 研究要排除盲从,锐意创新:证候和辨证论治蕴涵看丰富的生命信息和奥妙。证候和辨证论治与基因相关性研究,必然会触及这些内在丰富的生命信息,其研究结果可促进中医证候和辨证论治学说本身的发展,同时也会对生命科学产生积极的推动作用。因此,其研究不会仅局限于个别已知基因,而且会涉及广泛的未知基因,促使我们关心这些基因的表达改变、研究突变形成的原因,包括辨证论治取效的原因,还会涉及基因与基因的关系、基因与组织功能的关系等内容。这就要求我们不能总是跟在别人的后面走,而是要排除盲从、锐意进取,不断深入,走前人没有走过的道路,融入国际生命科学研究探索的前沿,去揭示新现象、解决新问题,积极创新。总之,观念的解放,投入的加大,是证候学说和辨证论治机理研究突破的基本保障。

参考文献

- 1 颜德馨. 中医辨证思维与临床诊疗决策之优化. 上海中医药杂志, 2000, 34(5): 4.
- 2 王文宝, 曹峰林, 李辉. 北方汉族健康人的中医体质类型与 HLA 基因多态性的相关研究. 哈尔滨医药, 2002, 22(2): 1~2.
- 3 李显生, 洗绍祥. 冠心病心血瘀阻证与血液纤溶酶原激活物抑制剂-1 基因的关系. 广西中医药大学学报, 2002, 19(4): 261~264.
- 4 李宜瑞, 陈晓刚, 李迎敏, 等. 不同证候的注意缺陷多动障碍患儿多巴胺 D2 受体基因携带情况检测. 广州中医药大学学报, 1999, 16(1): 17~20.
- 5 安胜军, 李思, 佟晓旭, 等. 雌激素受体基因多态性与女性绝经后骨质疏松症中医辨证分型关系的研究. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(12): 907~910.
- 6 湛兵来, 唐发清, 金益强, 等. 高血压病肝阳上亢证酪氨酸羟化酶及单胺氧化酶微卫星多态性分析. 湖南中医学院学报, 2001, 20(1): 37~38.
- 7 沈乃莹, 阎征, 金字安, 等. HLA-DQA1 等位基因与急性脑梗塞多种中医体质类型的相关性研究. 中医杂志, 2001, 42(4): 237~238.
- 8 孙伟正, 王春梅, 庞爱明, 等. 慢性再生障碍性贫血中医辨证与 HLA 基因相关性研究. 中国医药学报, 2002, 17(3): 167~169.
- 9 成玉斌, 罗仁, 薛耀明, 等. 肾虚型糖尿病肾病与 ACE 基因多态性相关研究. 中国中医基础医学杂志, 2002, 8(5): 349~350.
- 10 王东生, 袁肇凯, 黄献平, 等. 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. 中医杂志, 2004, 15(3): 210~211.
- 11 郭聂涛, 祝向红, 林棉, 等. 2 型糖尿病中医辨证分型与红细胞 CR1 分子基因型及数量表达的相关性研究. 中国医药学报, 2004, 19(4): 215~216.
- 12 马民, 陈利国, 屈媛, 等. 高血压病、2 型糖尿病血瘀证与非血瘀证患者白细胞中 c-fos 基因表达的研究. 新中医, 2004, 36(5): 22~23.
- 13 鄯东红, 金益强, 唐发清, 等. 自发性高血压大鼠肝阳上亢证模型肾

(下转第 597 页)

UIP 的特征。

现有的西医治疗手段尚不能改善 IPF 患者的生存率。糖皮质激素为治疗 IPF 的主导药物,但它仅对 20% 的 IPF 患者有效,而且常常为一过性反应^[9]。免疫抑制剂及细胞毒性药物不仅存在潜在的严重毒副作用,而且对特发性肺纤维化治疗基本无效。近年来,随着分子生物学的发展与完善,对肺间质纤维化形成中细胞因子网络及其作用机制有了初步认识,并尝试应用于干预细胞因子中一个或几个关键成分的方法治疗肺纤维化,取得了一定的成效。

中药对肺间质纤维化虽有一定的疗效,但缺乏大组病例,及应用现代公认的客观检测指标检测疗效与通过动物实验探讨疗效机理的研究。肺间质纤维化属中医学“肺萎”范畴,对其症状、病因、病机与西医论述有相似之处,亦认为肺萎是由肺内多种疾患演变发展而成。肺萎早期,肺气虚冷,气滞痰阻;病变进展,气虚血瘀,外界致病邪毒内侵,导致肺内宣降失司,壅郁不宣,气滞血瘀,肺络受阻;病损后期,正气内虚,肾不纳气。总之,其病机以“虚”、“瘀”、“痰”为关键,治则当以益气、活血、健脾为基本大法,达到治疗气虚、血瘀、痰阻之目的。

本制剂是由黄芪、丹参、川芎、半夏等多种中草药加工提纯后制成的细粉剂。黄芪可促进机体非特异性免疫和细胞免疫功能,具有抗衰老和抗疲劳作用;丹参可活血化瘀,明显抑制平阳霉素所致的肺纤维化,并有抗病原微生物作用,对体外培养成纤维细胞的研究表明,丹参可明显抑制成纤维细胞的生长和繁殖,同时可增强机体免疫力;半夏可化痰。全方活血化瘀,可改善微循环,温肾健脾,能调节机体免疫功能,延缓或阻断肺纤维化进展。动物实验显示该方药可明显减轻肺间质纤维化的程度^[10],疗效明显优于对照组,提示该方药具有多靶点多部位的作用,减弱或阻断了肺内持续进展的微小上皮损伤,减少了炎性细胞肺内聚集,并使

多种细胞因子尤其是致纤维化关键性细胞因子如转化生长因子 β (TGF- β) 的合成与分泌减少,而抗纤维化的细胞因子合成增加,调整了致纤维化细胞因子与抗纤维化细胞因子之间的平衡,减弱或阻断了肺损伤后的异常修复过程,最终减少了成纤维细胞增殖与细胞外基质沉积,延缓或阻断了肺纤维化的发生与发展。

参考文献

- 1 Laserna Martinez E, Lopez Campos Bodineau JL, Rodriguez Becerra E, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis in a 14-year-old girl. Arch Bronconeumol, 1999, 35(8): 404~406.
- 2 American Thoracic Society, European Respiratory Society. International multidisciplinary consensus classification of the idiopathic interstitial pneumonias. Am J Respir Crit Care Med, 2002, 165(1): 277~304.
- 3 中华医学会呼吸病学分会. 特发性肺(间质)纤维化诊断和治疗指南(草案). 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(7): 387~389.
- 4 Watters LC, King TE, Schwarz MI, et al. A clinical, radiographic, and physiologic scoring system for the longitudinal assessment of patients with idiopathic pulmonary fibrosis. Am Rev Respir Dis, 1986, 133(1): 97~103.
- 5 American Thoracic Society. Lung function testing: selection of reference values and interpretive strategies. Am Rev Respir Dis, 1991, 144(5): 1202~1218.
- 6 American Thoracic Society. Single breath carbon monoxide diffusing capacity (transfer factor): recommendation for a standard technique. Am Rev Respir Dis, 1987, 136(5): 1299~1307.
- 7 Hunninghake GW, Lynch DA, Galvin JR, et al. Radiologic findings are strongly associated with a pathologic diagnosis of usual interstitial pneumonia. Chest, 2003, 124(4): 1215~1223.
- 8 Flaherty KR, Thwaite EL, Kazerooni EA, et al. Radiological versus histological diagnosis in UIP and NSIP: survival implications. Thorax, 2003, 58(2): 143~148.
- 9 Selman M, King TE, Pardo A, et al. Idiopathic pulmonary fibrosis: prevailing and evolving hypotheses about its pathogenesis and implications for therapy. Ann Intern Med, 2001, 134(2): 136~151.
- 10 辛洪涛, 宋秀杰, 徐少华, 等. 芪丹(颗粒剂)对大鼠肺间质纤维化时 TGF- β 、TNF- α 表达的影响. 首都医科大学学报, 2004, 25(1): 49~52.

(上接第 571 页)

- 上腺组织的酪氨酸羟化酶基因表达研究. 中国现代医学杂志, 2000, 10(8): 21~26.
- 14 刘莺, 李俊军, 朱文锋, 等. 胃癌中医证型相关基因的表达谱. 世界华人消化杂志, 2003, 11(9): 1318~1321.
- 15 吴元胜, 范瑞强, 陈红, 等. 基因芯片技术分析 SLE 证候基因表达的初步研究. 现代中西医结合杂志, 2003, 12(16): 1683~1684, 1886.
- 16 王肃, 邹世洁, 陈小野, 等. 利血平脾虚证模型海马基因表达谱变化的研究. 现代中西医结合杂志, 2004, 13(7): 841~844.
- 17 王米渠, 冯切, 严石林, 等. 5 例寒证的宏观疗效及基因表达谱芯片分析研究. 浙江中医学院学报, 2003, 27(6): 60~63.

- 18 方肇勤. 辨证标准的基本要素与构成. 上海中医药杂志, 2001, 38(1): 3~6.
- 19 方肇勤. 开拓证研究新途径的思考. 上海中医药杂志, 2001, 36(4): 4~5.
- 20 方肇勤. 中医基础证的一原三维研究. 中国中西医结合杂志, 2002, 23(4): 250~251.
- 21 方肇勤, 李永健, 管冬元, 等. 原发性肝癌中医辨证标准的建议. 上海中医药杂志, 2003, 37(5): 11~13.
- 22 方肇勤. 基因芯片技术现状及其在中医基础实验研究中的应用. 上海中医药大学学报, 2001, 36(5): 17~19.