

一个寒证家系中发现 15 个差异表达基因的报告

王米渠¹ 杨丽萍¹ 丁维俊¹ 高 泓¹ 王庆国²

摘要 目的:精选家系切入证候研究,深层次地探讨寒证的分子生物学基础。方法:应用基因芯片技术对同一家系中的 4 例虚寒证患者与 6 名正常人进行基因表达谱检测。结果:发现此寒证家系中的虚寒证患者与能量等代谢相关的差异表达基因达 15 个,占此实验中已知功能基因的 52%。结论:利用家系进行证候的基因组研究,可排除大量干扰因素,对于复杂的寒证可有效、集中地筛选目标基因,提示寒证家系患者机体能量异常、代谢减慢有相应的分子生物学基础。

主题词 寒证/遗传学 基因表达

A Report on 15 Differential Expression Genes Found in a Cold-Syndrome Genealogy

Wang Miqu, Yang Liping, Ding Weijun, et al.

(Chengdu University of TCM, Chengdu 610075)

Objective: To probe molecular biological basis of cold syndrome. **Methods:** Microarray technique was used for examination of the gene expression profiles in 4 cases of cold syndrome patient and 6 normal persons in a same family. **Results:** 15 differential expression genes associated with energy metabolism were found in the patients of deficiency-cold syndrome in the cold syndrome family, accounting for 52% of the known functional groups in this experiment. **Conclusion:** Using genealogy to study genomes of syndromes can eliminate a lot of interfering factors, and is benefit to effectively screen target genes for complicated cold-syndrome, suggesting that cold-syndrome family has corresponding molecular biological basis for lower energy metabolism.

Key Word Cold syndrome/genetics; Gene expression

寒热辨证是中医八纲辨证中基本的两大纲,在对寒证的系统研究中,我们发现在一个家系其成员中近一半是虚寒证患者,具有明显的家族聚集性^[1]。我们以该典型家系中虚寒证患者为实验组,正常人为对照组,利用基因芯片技术等新技术^[2],深层次地探讨虚寒证家系的分子生物学基础,现首次集中报道与寒证及能量等代谢相关的 15 个差异表达基因。

1 资料与方法

1.1 家系调查与选择:我们用自定的 40 个因子的虚寒证量表,在四川省彭州市小鱼洞乡集中调查了一个虚寒证家系,其家族祖孙三代 15 人中,虚寒证患者达 7 人。为了集约可比性,仅选择了男性先证者曹某,及其 2 女 1 子共 4 名虚寒证患者作为实验组;另以先证者的姐姐和 2 个妹妹,及其子辈 2 女 1 男共 6 名正常人为对照组。分别取实验组与对照组每人外周血 10ml 回收白细胞,加入白细胞 20 倍体积的 TRIzol 试剂,放入 -20℃ 冰箱中保存备用。

1.2 基因芯片实验:采用由上海博星基因芯片有限责任公司提供的 4000 点 cDNA 表达谱芯片,提出实验组及对照组细胞总 RNA,再逆转录标记 cDNA 探针并纯

化,用 cy³-dUTP 标记对照组细胞 mRNA,用 cy⁵-dUTP 标记实验组细胞 mRNA。探针溶解在 20 μl 5×SSC 与 0.2%SDS 杂交液中,基因芯片和杂交探针分别置于 95℃ 水浴中变性 5 分钟,立即将探针加在基因芯片上进行杂交,盖玻片封片,置于密封仓内 60℃ 杂交 15~17 小时。

1.3 差异表达基因的获得:用 SCANARRAY 5000 扫描仪扫描芯片,得到的 cy³/cy⁵ 图像文件,通过划格确定杂交点范围,提取基因表达的荧光信号强度值。用 ImaGene3.0 软件分析 cy³ 和 cy⁵ 两种荧光信号的强度和比值。用以下条件作为判定基因有无差异表达的标准:(1) cy³ 和 cy⁵ 两种荧光信号比值的自然对数绝对值大于 2 或小于 0.5;(2) cy³ 和 cy⁵ 信号值其中之一必须大于 2000^[3]。

2 结果

2.1 15 个与能量等代谢相关的差异表达基因:实验结果筛选出该家系中虚寒证患者与正常人有 80 个差异表达基因,其中未知功能及功能尚不太明确的基因 51 个,已知功能的基因 29 个,其中与机体能量等代谢相关的 15 个(下调 8 个,上调 7 个),占这次实验中已知功能基因的 52%,它对虚寒证的分子生物学基础有重要的提示作用^[4],见表 1。

2.2 其他几类差异表达基因:家系中虚寒证患者与正常人有差异表达基因,已知功能的基因除表 1 中与机体能量等代谢相关的 15 个外,尚有与人体生长发育功

基金项目:国家科技部“973”项目(2003CB517105)、国家自然科学基金项目(90209013,30371709)

1 成都中医药大学中医遗传教研室,四川省成都市十二桥路 37 号(610075)

2 北京中医药大学

收稿日期:2005-05-30;修回日期:2005-07-14

表 1 虚寒证与代谢相关的差异表达基因

序号	基因库编号	差异比值	基因名称	方向
1	NM_00237	0.147	LPL 脂蛋白脂肪酶 1	表 达 下 调 的 基 因 — 表 达 上 调 的 基 因
2	NM_001873	0.226	1 羧肽酶 E	
3	NM_004845	0.285	磷酸盐转移酶、复合维生素 B	
4	NM_001914	0.362	细胞色素 B-5(核基因编码线粒体蛋白)	
5	NM_005956	0.369	亚甲四氢叶酸脱氢酶(NADP^+ 依赖性)、四清叶酸环加氢酶、甲酰四氢叶酸合成酶	
6	NM_006980	0.382	转录终止因素(线粒体 MTERF) (核基因编码线粒体蛋白)	
7	M37712	0.465	半乳糖基转移酶结合蛋白激酶	
8	NM_000709	0.466	酮酸脱氢酶 E1 支链, 多肽, 糖尿病相关	
9	NM_002543	2.098	氧化的低密度脂蛋白受体-1	
10	NM_000772	2.293	细胞色素 P450	
11	NM_032611	2.324	酪氨酸磷酸酶Ⅳ型 A, 成员 3 转录变异蛋白 1	
12	NM_013337	2.343	线粒体膜内转移酶 22(酵母) 同源	
13	NM_007051	2.350	脂肪酸合成酶结合因子 1	
14	NM_001354	4.104	醛—酮还原酶家族 1, 成员 C2(二氢醛脱氢酶; 胆酸蛋白质; 3α -羟化胆固醇脱氢酶 3 型)	
15	NM_004181	6.666	辅酶羧酰基—末端脂酶 L1	

表 2 虚寒证其他相关差异表达基因

基因库编号	差异比值	基因名称	相关功能类别
NM_001552	2.025	胰岛素生长因子结合蛋白 4	生长发育
NM_005259	2.052	人类生长分化因子 8	生长发育
NM_014451	0.482	骨肉瘤 B1 蛋白质	肿瘤发生
NM_003036	0.308	滤过性毒菌引起的恶性肿瘤致癌基因同族	肿瘤发生
NM_001630	0.346	膜联蛋白 A8	细胞信息传递
NM_004615	2.799	跨膜 4 超家族 2	细胞信息传递
NM_001036	0.247	雷诺啉受体 3	末梢循环障碍
NM_007317	0.363	细胞分裂中期, 染色体队列及维持	细胞分化
NM_006183	0.452	神经紧张肽(NTS)	神经紧张

能相关的 4 个, 与肿瘤发生相关的 2 个, 与细胞膜内外信息传递相关的 3 个, 与细胞分化、末梢循环障碍、神经紧张等相关的基因各 1 个, 表 2 各举例 1~2 个。如 NM-001036 雷诺啉受体 3 基因与末梢循环障碍疾病相关, 现代医学认为, 雷诺氏病是一种血管功能障碍性疾病引起的指(趾) 端局部血液供应障碍; 雷诺氏综合征以皮肤苍白、青紫而后潮红, 伴以疼痛和感觉异常, 并因温暖而缓解为特征, 发病与温度有关, 在寒冷季节发作频繁, 而且持续时间较长, 类似于中医寒证四肢肌肤症状中的“寒”、“逆”、“冷”、“厥”, 这对理解寒证的分子机理有所启示^[5]。

3 讨论

证候是中医基础理论研究的瓶颈, 是一个复杂而又关键的科学问题, 40 年来人们用各种方法、从各种角度进行艰苦探索^[6], 如寒热证候的研究、细菌、动物模型^[7]、个体患者(个案、证型、体质、疗效)、群体调查等, 也从整体行为、系统组织、细胞病理、分子基因等进行多层次探索。

本研究抓住先证者这两兄妹切入此寒证家系, 其家系成员 15 人都是农民, 集中于四川彭州边远山区,

其遗传背景很接近, 生活环境很相似, 所以能用基因芯片高效率地筛选出寒证的 15 个与能量等代谢相关的差异表达基因。我们以前也在同一山区用基因表达谱芯片研究非家系 5 例寒证的热药疗寒的分子机理, 发现了 7 类以上的相关基因^[8], 但结果较散、较宽, 难于如此集约、典型。而采用家系来研究寒证等证候基因组是一个更集中、更有效的途径和方法。

虚寒证宏观症状主要有四肢厥冷、身体蜷卧、畏寒喜暖等, 现代生物学如果理解为能量代谢降低、植物神经紊乱^[1]、机体功能抑制、脏器活动下降的表现并不难, 但却难以对寒证这类概念复杂、涉及广泛的中医问题拿出科学依据。本研究集约于家系, 一次发现与机体能量等代谢相关的差异表达基因 15 个, 占这次实验中已知功能基因的 52%, 对虚寒证的分子生物学基础有重要的、方向性的提示作用。

在与人体能量等代谢相关的 15 个基因中, 有 8 个表现为下调, 如 NM_00237LPL 脂蛋白脂肪酶 1 下调, 其 S447X 突变导致反动脉粥样硬化甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL)、总胆固醇(TC) 改变, 从而影响心脏疾病的保护作用, 还与高脂血症及 2 型糖

尿病微观蛋白尿的发生及程度有关。该基因表达下调比值最大(0.147),为其功能活动相当低下,这可否考虑与中医寒证中的心肾阳虚证候相关,即与心悸胸闷、畏寒倦怠、夜尿频多、小便清长等症状有一定的联系。

通过家系的基因芯片来研究寒证证候的基因组,虽然有初步的新发现,但也面临许多复杂问题和前所未有的挑战,因为这是第一次用基因芯片来研究一个家族的证本质,将宏观与微观、经典与前沿相联系,跨度十分大,有一系列的方法需要改进及大量的问题需要深入研究。如这次是用虚寒证 4 人与正常人 6 人标本合并做一张基因芯片,若有经费应作两次前后对比,甚至应 10 人分别做芯片,再与合并的结果相比较。这样更为严谨,结论更为可靠。其余有 51 个基因功能尚不太清楚,其中必有相当多的与机体能量等代谢相关的差异表达基因,或可有新发现,需要逐个基因地下功夫研究。还应再寻找寒证家系,尤其是能够病证结合的家系重复验证,深入分析其与机体能量等代谢相关的基因,也便于与生物、西医学界相沟通,被主流医学所

接受。若能完善家系证候的研究方法,则可以成为中医基础科学研究的有力武器^[9],向当今科学前沿穿插^[10]。

参考文献

- 1 丁维俊,王米渠,胥方元.一个典型寒证家系的体温及植物神经系统分析.辽宁中医,2003,34(2):1.
- 2 王米渠,许锦文,林乔.中医研究与基因组学及基因芯片技术.江西中医,2002,14(3):1.
- 3 王米渠,张卫,李珉,等.用基因芯片筛选针刺衰老大鼠涌泉穴的 318 个差异基因初报.中国中西医结合杂志,2002,22(11):844~847.
- 5 赵晓珍,方肇勤,李晖.基因组学对中医证的研究启示.中医药信息,2002,19(3):1~2.
- 6 吴斌,温万芬.寒热实验研究进展及前瞻.四川中医,2002,42(1):45~47.
- 7 叶福媛,宋莉君.中医体质的实验研究:寒体和热体大鼠多元素多因子分析.广东微量元素科学,2000,7(2):16~18.
- 8 王米渠,冯韧,严石林,等.基因表达谱芯片与中医寒证的 7 类相关基因.中医杂志,2003,44(4):288~289.
- 9 王米渠,吴斌,严石林,等.论虚寒证基因芯片及生物信息的高起点切入研究.辽宁中医杂志,2003,30(3):166.
- 10 Galbraith DW, Elumalai R, Gong FC. Integrative flow cytometric and microarray approaches for use in transcriptional profiling. Methods Mol Biol, 2004, 263:259~280.

茵栀黄治疗新生儿高胆红素血症 105 例

宁 顺 华*

我科近年来对 105 例新生儿高胆素血症采用中西医结合治疗,取得较好的疗效,现报告如下。

1 临床资料

我科近年来,确诊为新生儿高胆红素血症共 203 例,其中治疗组 105 例,男 50 例,女 55 例;黄疸类型:感染性 43 例,母乳性 25 例,肝炎 30 例,ABO 溶血 7 例。对照组 98 例,男 46 例,女 52 例;黄疸类型:感染性 36 例,母乳性 31 例,肝炎 28 例,ABO 溶血 3 例。

2 治疗方法

两组均予抗感染,酶诱导剂,苯巴比妥 $5 \sim 8 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 天,尼可刹米 $100 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,均分次口服;蓝光照射,连续照射 24 小时为 1 个疗程,必要时予 2 个疗程,保护肝脏,纠正酸中毒。治疗组在常规治疗基础上用茵栀黄注射液。用法:茵栀黄注射液 10ml,每日 1 次,加入 5% 葡萄糖溶液 100ml 静脉滴注,5 天为 1 个疗程,茵栀黄为常州康普药业有限公司生产,用至黄疸消失,复查肝功能恢复正常。

3 治疗结果

3.1 两组患儿治疗前后血清总胆红素水平比较:结果显示,治疗前及治疗后 24 小时、72 小时两组患儿血清总胆红素值治疗组分别为 $(289.56 \pm 61.33) \text{Hmol/L}$ 、 $(228.75 \pm 42.15) \text{Hmol/L}$ 、

$(156.85 \pm 46.32) \text{Hmol/L}$,对照组分别为 $(293.12 \pm 59.17) \text{Hmol/L}$ 、 $(243.36 \pm 54.82) \text{Hmol/L}$ 、 $(210.2 \pm 53.71) \text{Hmol/L}$ 。治疗组血清总胆红素水平治疗后较对照组明显降低,差异有显著性($P < 0.05$)。

3.2 两组患儿蓝光照射总时间及黄疸消退时间比较:两组光照射总时间分别为治疗组 (36.57 ± 19.27) 小时,对照组 (50.02 ± 23.59) 小时;皮肤黄疸消退时间治疗组 (3.76 ± 1.53) 天,对照组 (6.13 ± 2.65) 天。对照组明显为优($P < 0.05$)。

4 讨论

茵栀黄注射液由茵陈、栀子、大黄组成,具有利胆退黄,降低转氨酶作用。茵陈有显著利胆作用,在增加胆汁分泌的同时,也能增加胆汁中固体、胆酸、胆红素的排出量。因此,有清热、利湿、退黄的功效。茵陈退黄的主要成分含在挥发油内的 β -蒎烯茵陈酮中,故服用三黄汤者,先煎会使有效成分挥发过多,应另包后下煎至 10 分钟左右为宜。栀子含有栀子素、栀子甙、熊果酸、鞣酸等,可利胆及降低血中胆红素,也有清热利湿作用。大黄主要含大黄素及大黄鞣酸,可促进胆汁分泌、利胆排石和增进消化,抗感染消炎,对湿热黄疸有泻火凉血的作用。大黄能入血分破一切瘀血,因其气香故兼入气分,少用也能调气,治气瘀作痛,其力沉而不浮,以攻下为主,破症瘕积聚,留饮宿食,能荡涤肠胃,用之得当,有推陈致新,安和五脏之功。茵陈、栀子、大黄三种药物同用,其利湿退黄及促进肝功能恢复作用大大增强,故制成茵栀黄注射液治疗新生儿高胆红素血症,在退黄及促进肝功能恢复方面均有显著疗效。

* 贵州省黔南布依族苗族自治州人民医院儿科,贵州省都匀市民族路 54 号(558000)

收稿日期:2005-12-13