

证的研究

肥胖人痰湿体质外周血基因表达谱特征研究

王琦¹ 龚海洋¹ 高京宏²

摘要 目的:采用基因芯片技术对痰湿型体质人的外周血基因表达谱进行研究 方法:挑选 3例非痰湿型体质肥胖人、2例痰湿型体质肥胖人和 3例正常体重者,取上述受试者的外周血,提取总 RNA 并进行扩增和标记,检测受试样品的质量,进行基因表达谱观察,从基因序列中查出具有显著统计学意义的序列所标志的基因 结果:痰湿型体质与非痰湿型体质相比,有 115 个差异表达探针组 结论:本研究发现痰湿型体质人的外周血相关基因表达与非痰湿型体质人有明显差异

主题词 肥胖症 遗传学 痰湿 遗传学 @ 基因表达谱

Study on Characteristics of Peripheral Blood Gene Expression Profile in the Obesity with Phlegm-Dampness Constitution

Wang Qi¹, Gong Haiyang¹, Gao Jinghong²

Objective To study on peripheral blood gene expression profile in the obesity with phlegm-dampness constitution by gene chip technique **Methods** Three cases of non-phlegm-dampness constitution, 2 cases of phlegm-dampness constitution, and 3 normal persons were selected and the extracted total RNA was magnified and labeled. Then the quality of samples was detected and the gene expression profile was investigated. The genes marked by the sequence with statistically significant difference were searched out from Gene Bank **Results** As the phlegm-dampness constitution compared with the non-phlegm-dampness constitution, there are 115 probe groups of differential expression **Conclusion** There were significant differences of peripheral blood relative genes expression between the phlegm-dampness constitution and the non-phlegm-dampness constitution.

Key Words Obesity/genetics; Phlegm-dampness/genetics; @ gene expression profile

现代医学认为,人类基因组 DNA 序列的差异在很大程度上决定了他们对疾病的易感程度。而以“因人制宜”为特色的中医学对个体差异则有一套独特的系统认识——中医体质学。中医体质学重视个体生命过程中的先天遗传和后天获得因素,中医体质类型的差异主要是由于人体内单个或多个相关基因的差异引起的。本研究旨在运用基因芯片技术,从整体上研究人体体质的差异,比较痰湿型体质与非痰湿型体质之间外周血基因表达谱的不同,以期对痰湿型体质的调治及其他中医体质类型的研究积累经验

1 材料

1.1 受试者:参考“痰湿体质 169 因素命名及其数量化处理表”^[1],依“痰湿型体质标准”^[1],在北京市工人疗养院按国际体重标准筛选 3 例肥胖人痰湿型体质受试者(男性 2 例,女性 1 例)、2 例肥胖人非痰湿型体质(均为男性)和 3 例正常体重者(男性 2 例,女性 1 例)。

肥胖人痰湿型体质受试者年龄(21.3±0.2)岁,体重(115.7±16.2)kg,身高(170±10)cm,体重指数(39.9±1.2)kg/m²,痰湿体质积分(16.7±1.2)分;肥胖人非痰湿型体质受试者年龄(21.5±0.7)岁,体重(130.0±7.1)kg,身高(180±10)cm,体重指数(42.0±1.7)kg/m²,痰湿体质积分(2.0±0)分;两组痰湿体质积分比较差异有显著性意义($P < 0.01$)。

1.2 试剂:提取总 RNA 用 Invitrogen 公司的 P/N 15596-018,纯化质粒用 QIAGEN 公司的 P/N 74104, RNase 游离保存液,标记物用 Invitrogen 公司的 P/N 18064-014,引物用 Oligo(dT) 15 Primer, HPLC 纯化的大肠杆菌序列为 5-GGCCAGTGAATTGT AATAC-GACTC ACT ATAGGGAGG CGG -(dT) 24-3,转录本用 Affymetrix 的 P/N 900182, IVT cRNA 清除用 QIAGEN 公司的 P/N 74104,所用基因芯片为 Affymetrix 人类全基因组芯片 U133A 总 RNA 提取、cRNA 的合成与标记、芯片杂交、芯片的荧光标记与扫描由中国基因有限公司、晶泰生物技术有限公司完成。

2 方法

2.1 血液样品的采集:受试者每人静脉取血,共 8 个样品。每个样品均取血 2.5ml,血样 1~8 并溶于 7.5

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271563)

1 北京中医药大学体质与生殖医学研究中心,北京市朝阳区北三环东路 11 号(100029)

2 中国人民解放军武装警察部队北京市总队医院

收稿日期:2004-12-15;修回日期:2006-02-20

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

ml的 RNase游离保存液中,4℃冰箱保存,5天内提取总 RNA

2.2 总 RNA的提取和纯化:用 PAXGEN 公司的血 RNA试剂盒纯化总 RNA 用紫外分光光度计检测 RNA的产量,在 260nm处的吸光度,10D= 40 μ g/ml 根据在 260nm和 280nm处的吸光值检测 RNA的纯度

2.3 cDNA的合成和纯化:总 RNA 5~ 16 μ g, RNase游离水补至 10 μ l, T7-(dT) 24引物 (100pmol μ l) 1 μ l,混匀,70℃温浴 10分钟,置于冰上至少 2分钟,离心片刻;5倍第一链缓冲系 4 μ l, DTT (0.1M) 2 μ l, dNTP (10mM) 1 μ l,混匀,42℃温浴 2分钟;放射性同位素 II RT(200U μ l) 2 μ l,混匀,42℃温浴 1小时。将 cDNA合成产物置于冰上,加入下列试剂: RNase游离水 92 μ l, 5倍第二链缓冲系 30 μ l, dNTP (10mM) 3 μ l,大肠杆菌 DNA连接酶 (10U μ l) 1 μ l,大肠杆菌 DNA聚合酶 (10U μ l) 4 μ l,大肠杆菌核糖核酸酶 (10U μ l) 0.2 μ l,混匀,16℃反应 2小时;加入 3.3 μ l T4 DNA聚合酶,混匀,16℃反应 5分钟;加入 10 μ l EDTA (0.5M),混匀,终止反应 - 20℃保存或进行下一步纯化。12000转/分钟离心 PLG管 30秒;酚:氯仿:异戊醇为 25:24:1,加入反应产物中剧烈振荡;将全部液体移入 PLG管中,不振荡,12000转/分钟室温离心 2分钟;吸取上层液体,加入新的离心管;加入 0.5倍体积 NH4OAc (7.5M, pH8.0)和预冷 2.5倍体积无水乙醇,振荡混匀;12000转/分钟室温离心 20分钟;倒出上清,加入 500 μ l 75%的乙醇,12000转/分钟室温离心 5分钟;重复用 75%的乙醇洗涤 cDNA沉淀 1次;倒出离心管中的液体,晾干;沉淀用 12 μ l RNase游离的水溶解。

2.4 IVT合成 cRNA和纯化用 ENZO IVT试剂盒体外转录 cRNA (40 μ l), RNase游离水补至 22 μ l, 10 $\times$ HY试剂缓冲系 (Vial 1) 4 μ l, 10 $\times$ 被标记的核苷酸 (Vial 2) 4 μ l, 10 $\times$ DTT (Vial 3) 4 μ l, 10 $\times$ 核糖核酸酶混合抑制剂 (Vial 4) 4 μ l, 20 $\times$ T7聚合酶 (Vial 5) 2 μ l,混匀,稍离心,37℃温浴 4.5小时,每隔 35分钟以 600转/分钟振荡 10秒。合成产物可保存在 - 20℃或直接进行下一步纯化。用 QIAGEN公司的纯化 cRNA,方法同纯化总 RNA 用紫外分光光度计测量 cRNA的浓度。

2.5 芯片杂交和洗脱:按芯片说明书要求进行 cRNA片段化、配制杂交液。先进行测试芯片的杂交、洗染和分析,根据测试芯片的结果再杂交表达谱芯片。杂交结

束后,吸出芯片中的杂交液,加入洗液 A,进行洗染。在洗脱工作站上按照芯片类型运行洗脱程序。

2.6 数据处理与分析:用 MAS5.0统计软件对原始数据进行预处理和常态化校正。为了从 17874个探针组鉴别差异表达基因,我们应用了单变量方差分析。差异基因的显著水平确定在 0.01 ($P < 0.01$),并且表达的平均值有 2倍以上的差别。对受试者进行的聚类分析依据泊松关联相似标准量值。对差异表达基因的生物功能主题分析则是用 EASE¹²软件完成。

3 结果

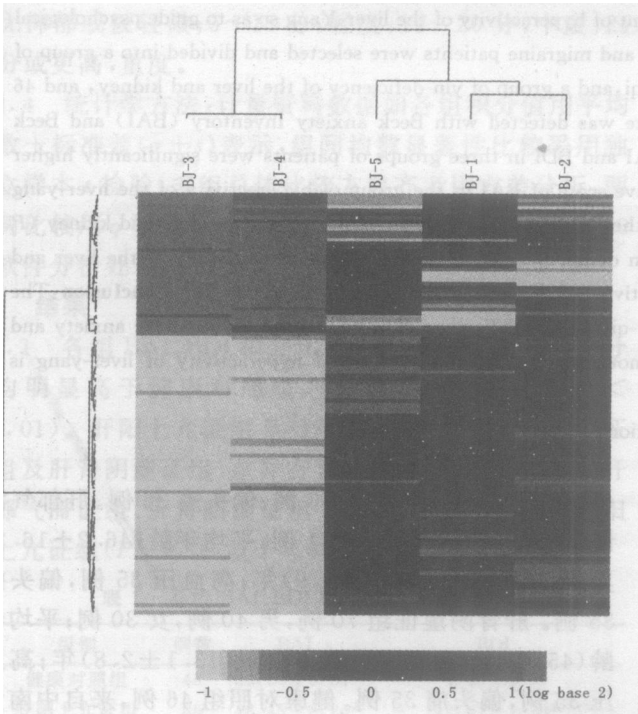
3.1 3组差异性表达探针组的聚类分析:在 5例肥胖人中,3例为痰湿体质者,2例为非痰湿体质者。这两组间在年龄、体重、身高和肥胖程度方面均较为相似,而痰湿体质组的积分与非痰湿体质组比较,差异具有显著性意义。对比 3例正常体重者和 5例肥胖人外周血基因表达谱的 18000多个基因 (22283个探针组),59个探针组有显著差异性表达 ($P < 0.01, \geq 2$ 倍) 表达上调的有 15个,下调的 44个。用这 59个差异性表达的探针组对所有 8例受试者进行聚类分析,3例正常体重者 (BJ-6 BJ-7 BJ-8)和 5例肥胖人 (BJ-1 BJ-2 BJ-3 BJ-4 BJ-5)各自形成一个独立的聚类组。在肥胖人聚类组内,又出现 2个独特的分支。一个分支包括了 2例非痰湿体质者 (BJ-3 BJ-4),而 3例痰湿体质者 (BJ-1 BJ-2 BJ-5)则组成了另一个分支。这两个分支间关联程度弱 (相关指数 0.3)。说明肥胖痰湿体质者和肥胖非痰湿体质者有各自独特的基因表达谱。相比之下,3例正常体重者聚类组内形成的 2个分支 (BJ-6 BJ-7和 BJ-8)之间则具有较强的关联性 (相关系数 0.9)。说明他们之间的基因表达谱没有明显区别。

虽然同为肥胖人,痰湿体质者和非痰湿体质者在聚类分析中各自形成独立的分支。为进一步探讨痰湿体质者的生物学特征,我们对比了痰湿和非痰湿者外周血 18000多个基因 (22283个探针组)的表达水平,结果发现 115个差异表达探针组 ($P < 0.01, \geq 2$ 倍)。这些基因在痰湿和非痰湿体质者当中形成独特的表达谱 (附图)。

3.2 差异基因的生物功能分析:为了从众多的差异基因中寻找有意义的生物功能主题,我们用 EASE对 115个差异性探针组的生物功能进行分析,15个 ATP结合基因有统计学意义 (EASE积分 = 0.0215),见附表。

附表 肥胖人痰湿体质者和非痰湿体质者之间差异性基因的生物功能分析

探针编号	基因名	痰湿/非痰湿	痰湿均值	非痰湿均值	P值	生物功能
201976-s-at	M YO 10	2.55	5.19	7.74	0.0017	ATP binding
203119-at	M GC2574	1.28	8.55	9.83	0.0048	ATP binding
204685-s-at	ATP2B2	-2.52	8.58	6.07	0.0084	ATP binding
205607-s-at	PACE-1	-1.58	7.84	6.26	0.0001	ATP binding
205842-s-at	JAK2	-1.60	7.45	5.85	0.0079	ATP binding
209246-at	ABC F2	-1.38	8.40	7.02	0.0095	ATP binding
212954-at	DYRK 4	-1.89	8.18	6.29	0.0027	ATP binding
214683-s-at	CLK1	-3.37	7.02	3.65	0.0012	ATP binding
215980-s-at	IGHMBP2	-1.11	7.59	6.48	0.0066	ATP binding
217731-s-at	ITM2B	-1.18	11.26	10.08	0.0039	ATP binding
217765-at	N RBP	-1.75	8.49	6.74	0.0052	ATP binding
218943-s-at	DDX 58	-1.59	7.98	6.39	0.0041	ATP binding
219654-at	PTPLA	1.16	7.20	8.35	0.0076	ATP binding
220137-at	FLJ20674	1.21	6.71	7.92	0.0017	ATP binding
220302-at	MAK	-3.12	8.08	4.96	0.0043	ATP binding



附图 肥胖人痰湿体质者和非痰湿体质者之间的 115个差异性探针组形成独特的表达谱

4 讨论

人群中任何两个个体之间的 DNA 序列有大约 0.1% 的差别^[3],在基因组范围内,这对应于约 300 万个碱基对。现代医学认为,这种遗传上的差异性在很大程度上决定了个体之间对疾病的易感程度,如吸烟对肺癌的影响,会随着遗传背景而变化^[4]。个体之间对治疗药物的反应也存在可遗传的变异。医学界已经注意到这种现象,并在此基础上发展成为药物遗传学^[5]。随着近 10 年来基因组学、蛋白组学的飞速发展,现代医学对人群个体之间疾病易感性和药物反应性的认识有

了长足的进展^[6],为未来的个体医学奠定了基础。

中医学对人们体质差异性的认识已有 2 000 多年的历史,并在近年来分化成中医理论的一个独立分支——中医体质学。中医体质类型是以临床实践为依据,对人群中不同个体特殊性的归纳总结。体质学说认为疾病的发生、转归与个体的体质密切相关。这些理论贯穿在中医的生理、病理、诊断和治疗的各个方面,有效地指导着中医的临床实践,体现了中医临床医学“因人制宜”的重要特色。20 世纪 70 年代,我们通过对不同患者的体质调研和文献研究,将人的体质分为正常质、阴虚质、阳虚质、痰湿质、湿热质、气虚质、瘀血质 7 种类型^[7]。除正常体质外,不同的病理性体质对特定致病因子或疾病有不同的易感性,并对病情的转归和治疗有着重要的影响。其中痰湿型体质以津液运化不全为内在病理机制,以“苔白腻、舌胖、痰多黏白”等四诊特征为外在表现;在临床上易感湿邪,湿聚生痰,易患冠心病、高血压、中风等以痰湿证候为主要表现的疾病;用药宜健脾芳化,忌阴柔黏滞,在处方用药时适当加用祛湿化痰药,有利于疗效的提高。尽管中医学对各类型体质有较系统的认识和阐述,但对不同体质类型的现代生物学基础尚缺乏较多研究。

我们对痰湿型体质外周血的基因表达谱进行分析,选用的 Affymatrix 人类全基因组芯片 U133A 代表了 18 000 多个基因(22 283 个探针组)。这种全面检测避免了基因选取过程中的可能偏差和漏选。

本研究结果表明,中医体质学定义的肥胖痰湿人与普通肥胖人有截然不同的生物学基础。对比正常体重者和肥胖人外周血细胞的基因表达谱,59 个探针组

(下转第 858 页)

皮细胞排列紊乱,呈束状稀疏分布。透射电镜示 AS 组及自然消退组内皮细胞不完整,平滑肌细胞呈分泌表型,并大量积聚,胞浆内充满脂肪空泡,线粒体水肿,内质网池状扩张,胞核内可见异染色体边聚。中药组泡沫细胞减少,脂肪空泡明显减少,平滑肌细胞形态基本正常,线粒体轻度空泡变性,内质网轻度肿胀。

4 讨论

本研究中我们将祛瘀消斑胶囊应用于兔易损斑块模型中,发现该药能预防 AS 斑块的破裂,增强斑块的稳定性。近年研究表明,易损斑块的破裂是急性冠脉综合征最根本的始动因素^[3],易损斑块具有较薄的纤维帽,脂质聚集及大量炎性细胞浸润等明显的形态学特点^[4,5]。决定斑块易损性的主要因素是聚集的脂质的增多以及炎症造成的纤维帽变薄,调脂治疗能够减少斑块内脂质含量和张力,减轻炎症,改善血栓形成和纤溶活性之间的平衡。本研究中,祛瘀消斑胶囊治疗后血脂显著降低,病理学及电镜检测结果同时提供了形态学方面的证据,提示该药能显著降低血脂水平,从而增加斑块的稳定性。

我们利用已建立的易损斑块的动物模型,应用血管内超声对 AS 斑块进行了动态检测。AS 组实验兔可见增生的内中膜和隆起的斑块,多为低回声的脂质斑块,出现此类型斑块分析与动物模型种类有关;药物触发后中药组实验兔 EEM/APA/LAS 百分率较造模后显著降低,血管内超声显示中药组有 3 只实验兔斑块破裂,自然消退组有 5 只斑块破裂,与病理学检查结果一致,两组间差异无显著性意义的原因考虑与样本数较少有关,但中药组斑块破裂率明显低于自然消退组,

进一步证实了该药稳定斑块的作用。

近年来,关于 AS 病变痰浊血瘀的理论受到许多学者的重视。根据中医理论,AS 的病理机制多为气虚日久,瘀阻脉络,邪气深入经隧,瘀浊胶结而形成痰痕积聚,如王清任所言:“元气既虚,必不能达于血管,血管无气,必停留为瘀。”痰浊阻滞血气的运行,则易形成血瘀;血瘀阻滞则使津液停蓄化而为痰,痰瘀互结而导致 AS,引发中风、冠心病诸病。关于中药治疗 AS 的文献很多^[6],但这些研究大多针对稳定性斑块的消退,中药针对不稳定性斑块的治疗少见报道。祛瘀消斑胶囊是本课题组近年来开发的具有调脂、保护血管内皮功能的中成药。方中黄芪大补元气以帅血运为君药;莪术、大黄、山楂破血通脉,化瘀泻浊,消滞散结为臣药;片姜黄辛香走串,散寒通络,领诸药直达络中为使药,诸药合用,共奏补气逐瘀、化浊通络之功。

参考文献

- 1 Constantinides P, Chakravarti RN. Rabbit arterial thrombosis production by systemic procedures. *Arch Pathol*, 1961, 72: 197~208.
- 2 李莉,翟同钧,陈融,等. Movat 五色套染法的改进及应用. *临床与实验病理学杂志*, 2002, 18(6): 660~662.
- 3 Falk E. Why do plaques rupture? *Circulation*, 1992, 86(6 Suppl): III 30~III 42.
- 4 Davies MJ. Pathophysiology of acute coronary syndromes. *Indian Heart J*, 2000, 52(4): 473~479.
- 5 Falk E. Morphologic features of unstable atherothrombotic plaques underlying acute coronary syndromes. *Am J Cardiol*, 1989, 63(10): 114E~120E.
- 6 荆涛. 血管平滑肌细胞凋亡与动脉粥样硬化及其中药防治. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11(3): 271~273.

(上接第 853 页)

有差异性表达。说明肥胖痰湿人有着不同于正常体重者和肥胖非痰湿人的独特的基因表达谱。依据这些差异基因进行的聚类分析,又准确地将肥胖人中痰湿体质者与非痰湿体质者分成了两组。说明肥胖痰湿体质者在外周血细胞中有区别于普通肥胖人的基因表达特征。进一步对痰湿肥胖人和非痰湿肥胖人之间的 115 个差异表达探针组的生物功能进行主题分析,发现 ATP 结合基因在两组间有显著性差异。这些 ATP 结合基因包括了 Janus 蛋白激酶 2 类、CDC 蛋白激酶 1 蛋白 tyrosine 去磷酸化酶、核受体结合蛋白等。提示肥胖痰湿体质人外周血细胞可能存在某些生物功能的紊乱。这为痰湿体质的判定,临床上对此类病理体质的调整,改善提供了初步的客观分子生物学依据。

参考文献

- 1 王琦. 中医体质学. 北京: 中国医药科技出版社, 1995: 99~102, 118.
- 2 Hosack DA, Dennis G Jr, Sherman BT, et al. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. *Genome Biol*, 2003, 4(10): R70.
- 3 Stoneking M. Single nucleotide polymorphisms from the evolutionary past... *Nature*, 2001, 409(6822): 821~822.
- 4 Wu X, Zhao H, Suk R, et al. Genetic susceptibility to tobacco-related cancer. *Oncogene*, 2004, 23(38): 6500~6523.
- 5 Goldstein DB, Tate SK, Sisodiya SM. Pharmacogenetics goes genomic. *Nat Rev Genet*, 2003, 4(12): 937~947.
- 6 Roses AD. Pharmacogenetics and drug development: the path to safer and more effective drugs. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(9): 645~656.
- 7 王琦, 盛增秀. 中医体质学说. 南京: 江苏科学技术出版社, 1982: 50~51.