

· 证的研究 ·

冠心病血瘀证与肌动蛋白相关基因异常表达的相关性

杨 杰¹ 王米渠² 李炜弘² 丁维俊² 谭从斌² 罗再琼² 王 伟³

(1. 平凉医学高等专科学校药理教研室, 甘肃省平凉市柳湖路中段, 744000;
2. 成都中医药大学; 3. 北京中医药大学)

[摘 要] **目的** 探讨冠心病血瘀证与肌动蛋白相关基因异常表达的相关性。**方法** 依据病证结合的研究思路, 将 5 例患者样本混合与 5 名正常人样本混合并杂交制备芯片 (即病证结合芯片)。根据治疗前后血液黏度测试结果设计瓜蒌薤白半夏汤治疗前后自身对照芯片 (以下称“以药测证芯片”), 并对差异表达基因进行信号通路分析, 筛选出凝血、血液流变学相关差异表达基因及其与肌动蛋白细胞骨架调控相关的通路。**结果** 在两张芯片中共同表达的凝血、血流变功能方面差异表达的基因有肌动蛋白 (ACTA2)、纤维连接蛋白 (FN1)、结合珠蛋白 (Hp)、骨桥蛋白 (SPP)。其与细胞通讯、黏着斑、细胞外基质-受体相互作用、肌动蛋白细胞骨架调控、转化生长因子- β 信号通路 (TGF- β) 等 5 条通路有关。**结论** 冠心病血瘀证与肌动蛋白基因及其代谢调控相关, 介导了凝血、血流变异常基因的 5 条信号转导通路。

[关键词] 冠心病; 血瘀证; 基因芯片; 凝血; 血液流变学; 肌动蛋白

Correlation between Blood Stasis Syndrome of the Coronary Heart Disease and the Abnormal Expression of Actin-related Genes
YANG Jie¹, WANG Miqu², LI Weihong², et al.

(1. Pingliang Medical School of Gansu Province, Pingliang 744000; 2. Chengdu University of Traditional Chinese Medicine)

ABSTRACT **Objective** To study the correlation between the blood stasis syndrome of the coronary heart disease (CHD) and the abnormal expression of actin-related genes. **Methods** Based on the study of disease-syndrome combination, the 5 sample cases and the 5 normal samples were mixed respectively, and the disease-syndrome chips were made from hybridization of the mixed samples. The self control chips of Gualou Xiebai Banxia Decoction were designed according to the blood viscosity before and after treatment. The signal pathway was analyzed on the different expression genes to find out the hemagglutination and blood rheology related expression genes and the pathway of the regulation of actin cytoskeleton. **Results** In the two chips, ACTA2, fibronectin (FN1), haptoglobin (Hp), and secreted phosphoprotein (SPP) were those genes which had different expressions of hemagglutination and blood rheology. They were related with the five pathways, including the cell communication, focal adhesion, ECM-receptor interaction, regulation of actin cytoskeleton, and TGF-beta signaling pathway. **Conclusion** The blood stasis syndrome of CHD is correlated with actin gene and its metabolism regulation, introducing the 5 signal transmission pathways of abnormal genes of hemagglutination and blood rheology.

Key Words Coronary heart disease (CHD); Blood stasis syndrome; Gene chips; Hemagglutination; Blood rheology; Actin

肌动蛋白基因参与人类血管平滑肌细胞骨架的调控, 其含量直接影响着血管平滑肌细胞的增殖与迁移。而血管内皮细胞功能失调不仅认为是冠状动脉粥样硬化起始环节, 并与冠心病 (CHD) 发生、发展相关^[1]。血瘀证是冠心病常见的中医证型之一, 我们运用基因芯片技术和生物信息学方法, 发现冠心病血瘀证与凝血、血流异常表达基因相关^[2], 因此, 本研究拟探讨其所涉及的凝血、血流异常表达基因的肌动蛋白表达与冠心病血瘀证的关系。现报告如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取在成都中医药大学附属医院门诊部就诊的冠

心病患者 5 例, 男性 2 例, 女性 3 例; 年龄 61~68 岁, 平均 (64.8±2.49) 岁。

1.2 纳入与排除标准

依照文献[3]制定纳入标准: ①连续 3 年以上心电图诊断心肌缺血。②有半年以上心前区憋闷疼痛病史。③诊断冠心病或心肌缺血的病史半年以上。④血脂或血液流变学异常。⑤根据陈可冀等编制的血瘀证标准^[4]进行评分。⑥年龄 60~70 岁。⑦签署知情同意书。

排除标准: 经检查证实为冠心病急性心肌梗死以及其他心脏疾病、重度神经官能症、更年期症候群、甲状腺机能亢进症、颈椎病、胆心病、胃及食管反流所致胸痛者; 合并重度高血压, 重度心肺功能不全, 重度心律失常, 肝、肾、造血系统等严重原发性疾病; 糖尿病患者和精神病患者。

1.3 治疗方法

经成都中医药大学严石林教授辨证处方,选用瓜蒌薤白半夏汤(重用三七、丹参等)加味治疗 14 天,其主要方剂组成为:桂枝 20g,瓜蒌 10g,薤白 10g,半夏 10g,三七 1.5g,丹参 20g 等。

1.4 实验材料

淋巴细胞分离液(天津 TBD 生物技术发展中心);Trizol 试剂(Invitrogen 公司);RNeasy mini spin column 试剂盒(Qiagen 公司产品)。此实验由北京博奥生物芯片有限公司负责参与。

1.5 血液黏度检测

于治疗前后对选取的病例进行血液黏度测试,选择变化明显的病例进行基因芯片检测。

1.6 芯片设计

依据病证结合研究思路,将 5 例患者样本混合与 5 名正常人样本混合并杂交制备芯片(以下称病证结合芯片)。根据治疗前后血液黏度测试结果设计瓜蒌薤白半夏汤治疗前后自身对照芯片(以下称“以药测证芯片”^[5])。

1.7 基因芯片制备与分析

用 Trizol 一步法^[6]提取所有患者的白细胞总 RNA,通过异丙醇沉淀法浓缩 RNA,并进一步采用 RNeasy mini spin column 试剂盒(Qiagen 公司产品)对总 RNA 进行 RNeasy mini 柱纯化,最后用分光光度计定量,甲醛变性胶电泳质检。采用北京博奥生物芯片有限公司基因芯片(21,329 点),将标记的 DNA 溶于 30ml 杂交液中,于 42℃ 环境下杂交过夜。杂交结束后,先在 42℃ 左右含 0.2%SDS、2×SSC 的液体中洗 5min,而后在 0.2×SSC 中室温洗 5min。玻片甩干后即可用于扫描。芯片用 ScanArray Express 双通道激光扫描仪(Packard Bioscience 公司)进行扫描。采用 GenePix Pro4.0 图像分析软件(Axon 公司)对芯片图像进行分析,将图像信号转化为数字信号;然后对芯片上的数据进行归一化;最后以差异为 2 倍的标准来确定差异表达基因。

1.8 基因功能与信号通路分析

对获得的差异表达基因在斯坦福大学 SOURCE 数据库(<http://smd.stanford.edu/cgi-bin/source/sourceSearch>)和 NCBI 的 OMIM(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库中查询基因功能,提取与凝血、血液流变学异常相关的基因。同时在 KEGG(<http://www.genome.jp/kegg>)数据库内进行信号通路分析。

2 结果

2.1 治疗前后冠心病血瘀证评分比较

所选取的 5 例患者治疗前由血瘀证(28.00±3.74

分)转化为治疗后非血瘀证(9.60±0.89 分),提示瓜蒌薤白半夏汤对这 5 例患者的血瘀证有改善作用。

2.2 治疗前后血液黏度测试结果比较

在 5 例患者治疗前后的血液黏度测试结果中,有 1 例患者变化最明显,见表 1,同时该患者无并发症,故选择该患者进行治疗前后自身对照芯片杂交。

表 1 治疗前后变化最明显患者血液黏度测试结果(mPa·s)

时间	例数	血浆黏度	全血高切还原黏度	全血低切还原黏度
治疗前	5	1.71	7.23	52.19
治疗后	5	1.42	6.53	47.93

2.3 与凝血、血流变相关的差异表达基因

以药测证基因芯片中差异表达基因有 196 个,其中表达上调的基因有 133 个,表达下调的基因有 63 个。同时,在病证结合芯片中差异表达基因有 231 个,其中表达上调的基因有 161 个,表达下调的基因有 70 个。与凝血、血流变异常等相关的基因各有 17 个;而在两张芯片中共同差异表达的凝血、血液流变学相关基因有 4 个,见表 2。

表 2 以药测证芯片与病证结合芯片均差异表达及凝血、血流异常相关基因表达

基因库编号	基因	基因名称	差异比值	
			病证结合	以药测证
NM_001613	ACTA2	α-肌动蛋白(平滑肌,主动脉)	3.19	2.23
AK055872	Hp	结合珠蛋白	0.21	0.36
NM_002026	FN1	纤维连接蛋白 1	19.9	3.2
NM_000582	SPP1	分泌蛋白 1(骨桥蛋白)	8.11	13.9
NM_002305	LGALS1	可溶性半乳糖苷凝集素 1	2.37	—
NM_003248	THBS4	血小板反应蛋白 4	2.78	—
NM_006498	LGALS2	可溶性半乳糖苷结合凝集素 2	—	0.46
NM_003247	THBS2	血小板反应蛋白 2	—	4.4

注:后 4 个基因分别是与凝血、血流变密切相关的可溶性半乳糖苷结合凝集素和血小板反应蛋白的 2 个亚型。

2.4 KEGG 信号转导通路分析结果

KEGG 通路分析结果显示,两张芯片均差异表达的 4 个凝血、血流异常相关基因和两对凝血、血流功能密切相关的涉及 5 条信号转导通路,见表 3。

表 3 以药测证芯片与病证结合芯片共同差异表达基因的通路分析

基因库编号	基因	信号转导通路
NM_002026	FN1	细胞通讯,黏着斑,细胞外基质-受体相互作用;肌动蛋白细胞骨架调控通路
NM_000582	SPP1	细胞通讯,黏着斑,细胞外基质-受体相互作用
NM_003247	THBS2	细胞通讯,黏着斑,细胞外基质-受体相互作用,TGF-β 信号通路
NM_003248	THBS4	细胞通讯,黏着斑,细胞外基质-受体相互作用,TGF-β 信号通路

3 讨论

ACTA2 基因是血管平滑肌细胞(VSMC)行使其功能的重要分子基础,也是 VSMC 分化的最早标志物。而血管平滑肌细胞的功能失调与冠心病的发生发展相关。同时,我们前期的研究已发现,冠心病血瘀证与凝血、血流异常相关基因密切相关^[2]。因此,从基因芯片与生物信息等方法着手研究肌动蛋白基因的异常表达更有助于探讨冠心病血瘀证的分子机制。ACTA2 是人类主动脉平滑肌上的肌动蛋白基因,是目前已确定的 6 种肌动蛋白基因亚型之一,是由一个大而保守的基因家族编码而成。ACTA2 其功能主要涉及细胞运动和细胞骨架的构成,是主动脉平滑肌的标志性蛋白,在不同表型的血管平滑肌具有不同的表达比例,尤其在主动脉血管平滑肌中含量最高^[7]。因此,冠心病血瘀证的宏观症状可体现为体内微观的血液循环障碍,即血管平滑肌细胞内肌动蛋白基因的异常表达。

血管内皮细胞中肌动蛋白基因的含量将影响到血管内皮细胞的形状和内皮细胞的迁移性。表 2 中的 FN1、SPP1 和 LGALS 等基因所编码的蛋白是细胞外基质蛋白,而细胞外基质蛋白是这种连接的一种重要成分,同时参与信号转导通路,如 ECM 受体通路、TGF- β 信号通路等^[8],共同调控肌动蛋白基因的代谢。整合素受体在参与肌动蛋白代谢调控中起重要作用^[9],它介导血管内皮细胞黏附,使造血细胞作用于肌动蛋白位点上,并将这些生物学信号由细胞外传入细胞内,参与其他细胞受体的作用,如鸟嘌呤核苷酸交换因子^[10]可调节微管蛋白与肌动蛋白细胞骨架之间的相互作用。因此,肌动蛋白基因的异常表达将影响血管内膜的厚度,影响血流正常运行,表现为血瘀证症状。总之,通过设计以药测证和病证结合基因芯片,本研究提示了冠心病血瘀证与肌动蛋白基因及其代谢调控相

关,介导了凝血、血流异常基因的 5 条信号转导通路,其内在机制有待进一步研究。

参考文献

- [1] Akpolat N, Yahsi S, Godekmerdan A, et al. The value of alpha-SMA in the evaluation of hepatic fibrosis severity in hepatitis B infection and cirrhosis development: a histopathological and immunohistochemical study [J]. Histopathology, 2005, 47(3): 276-280.
- [2] 杨杰, 王米渠, 李松波, 等. 冠心病血瘀证与凝血、血流异常基因研究. 国际系统生物信息与中医药论丛[M]. 新加坡: 新加坡医药卫生出版社, 2007: 118-121.
- [3] 陈灏珠. 实用内科学[M]. 12 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1015-1467.
- [4] 陈可冀, 史载祥. 实用血瘀证学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 6-8.
- [5] 杨裕华, 李震. 肾虚证及其“以药测证”的基因芯片研究进展[J]. 天津中医药, 2008, 25(4): 348.
- [6] 梁德勇, 徐国恒, 崔振中, 等. RNA 快速提取一步法的建立[J]. 北京医科大学学报, 1999, 31(5): 461-463.
- [7] 温进坤, 韩梅. 血管平滑肌细胞[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 49.
- [8] Batut J, Schmierer B, Cao J, et al. Two highly related regulatory subunits of PP2A exert opposite effects on TGF-beta/Activin/Nodal signalling [J]. Development, 2008, 135(17): 2927-2937.
- [9] Schade AE, Levine AD. Cutting edge: extracellular signal-regulated kinases 1/2 function as integrators of TCR signal strength[J]. J Immunol, 2004, 172(10): 5828-5832.
- [10] Krendel M, Zenke FT, Bockch GM. Nucleotide exchange factor GEF-H1 mediates cross-talk between microtubules and the actin cytoskeleton[J]. Nat Cell Biol, 2002, 4(4): 294-301.

(收稿日期: 2007-12-05; 修回日期: 2008-11-25)

[编辑: 行之]

第三届扶阳论坛暨扶阳学派培训班通知

由中华中医药学会主办, 广西中医学院经典中医临床研究所、世界华人协会协办的“第三届扶阳论坛暨扶阳学派培训班”定于 2009 年 10 月 22~26 日在上海举行。此次会议为国家级中医药继续教育项目(项目编号 330101003)。现将有关事项通知如下。

一、征文内容: 扶阳学派源流探讨; 扶阳学派学术思想与特色研究; 扶阳学派用药经验总结; 扶阳学派辨证治疗技巧研究。中医各家学说学术经验探讨; 中医各家学说理论临床应用体会; 名老中医、民族医药及特色疗法等经验总结; 附子等扶阳药物临床应用总结; 中医学术流派研究等。二、征文要求: 每篇论文 3000 字左右为宜, 200 字摘要; 报名及截稿日期: 2009 年 9 月 1 日; 会务培训费用: 每人 1200 元(会员 800 元), 食宿自理, 会议统一安排。三、联系方式: 地址: 北京市朝阳区樱花园东街甲 4 号(邮编 100029) 中华中医药学会学术部, 联系人: 孙永章 13901230469, 64210755; 刘平 13910218162, 64210755; 刘延华 13671372358, 64205508; 杨光 13381403638, 64212828, 传真: 010-64210755, E-mail: xueshubu205@yahoo.com.cn; syz516@sina.com。四、说明: 为了保证培训效果, 此培训班限 300 人。务请参会者于 9 月 1 日前将会务培训费用 1200 元(会员 800 元)通过邮局汇款至学术部; 回执请通过电话、传真、电子邮件、短信等方式通知学术部, 我部将按邮寄培训费的先后顺序依次排定座位(会员优先), 额满为止。未寄培训费者会议期间将不再接收报名及安排座位。回执请到中华中医药学会网站 www.cacm.org.cn 下载。

欲加入中华中医药学会会员的学员请填写《会员申请登记表》可在中华中医药学会网站 <http://www.cacm.org.cn> 下载, 并 2 寸照片 1 张及 5 年会费 350 元寄至中华中医药学会学术部审批。