

• 综 述 •

冠心病血瘀证实质的系统生物学研究现状与思考

虞 桂 王 阶*

(中国中医科学院广安门医院,北京市西城区广安门内大街北线阁 5 号,100053)

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81173116)

* 通讯作者:wangjie0103@yahoo.com.cn

[摘 要] 冠心病血瘀证实质的研究存在客观指标特异性和可重复性差的问题,系统生物学补充了以往单一指标、单一组织、单一系统等研究方法的不足。目前冠心病血瘀证的基因组学、蛋白质组学和代谢组学研究在思路仍是还原分析的模式,与系统生物学的整合建模思想相差甚远。网络生物学和 microRNA 组学的出现为解决冠心病血瘀证实质研究的复杂性提供了新的思路和方法。

[关键词] 冠心病;血瘀证;系统生物学;网络生物学;microRNA

冠心病血瘀证实质的研究一直是证候实质研究最为活跃的领域之一,其目的是阐明血瘀证发生的机制,寻找能够反映血瘀证的生物标志物,对血瘀证进行定量诊断,实现辨证论治的客观化和规范化。并以血瘀证的生物标志物为突破点,为冠心病的治疗提供新的靶点。目前的研究主要集中在冠心病血瘀证与炎症、微循环、血小板功能、血管内皮细胞功能、血流动力学等相关性方面^[1]。这些研究取得了一定的成果,但也存在证候实质研究中的普遍问题。冠心病血瘀证作为一种复杂的病理生理变化,多项实验室检测指标发生改变。但这些指标的特异性差,单一指标的变化不足以判断血瘀证的发生,而指标正常又不能排除该证^[2]。

1 系统生物学及其研究思路

由于系统生物学强调整体与中医学的整体观有相似之处,系统生物学的出现给证候实质研究带来了新的希望^[3]。系统生物学的研究方法引入冠心病血瘀证实质研究后,研究者采用基因组学、蛋白质组学和代谢组学等高通量技术探索在血瘀证状态下基因、蛋白质的特异时空表达。这些研究解决了以往研究单一指标、单一组织、单一系统的研究方法,但其所采取的研究思路仍是还原分析方法,与系统生物学的核心研究思路相差甚远。系统生物学的研究思路本质上是多信息融合和体系模型构建,在实验结果的基础上寻找多个系统、多个层次之间的关联,把所有信息整合在一起,以揭示系统的行为方式^[4]。

由于科学水平的限制,在每一个阶段都只能在

当时的科学水平上对证候实质进行探索诠释。冠心病血瘀证已经取得的研究成果是前贤辛勤探索的结果,为后续的研究奠定了坚实的基础。系统生物学近年来取得了突飞猛进的发展,尤其是网络生物学(network biology)和 microRNA 组学的出现更引人瞩目。网络生物学将复杂网络的研究方法引入生物学,把生物系统的相互作用抽象表达为网络,通过分析生物网络的拓扑结构,找出具有特定生物功能的关键节点和模块,从而获得对生物系统更多新的认识^[5]。MicroRNA 是一类非编码小 RNA 分子,它的表达异常引起相应调控网络的紊乱,是疾病发生的重要原因^[6]。网络生物学和 microRNA 组学已成为现今生物医学研究的重要方法,将其引入冠心病血瘀证实质研究中,为克服目前研究中的问题带来了希望。

2 网络生物学和 microRNA 组学

复杂网络的理论研究进展使人们对复杂网络的认识上升到一个新的高度,研究发现,不同的复杂网络具有一些共同的属性,如小世界效应(small-world effects)、无标度效应(scale-free)、鲁棒性(robustness)、模块性(module)和网络模体(network-motif)等^[7]。Barabasi 等^[5]首先将复杂网络的理论应用在生物学研究中,提出了网络生物学。将生物系统抽象为一个复杂网络,通过分析网络的拓扑结构来研究生物系统的运行方式。借鉴系统生物学的研究方法^[8],网络生物学的研究分为 4 个步骤:①对该生物网络的所有组分进行了解和确定,通过文献

挖掘、实验研究或者计算预测等方法提取相应的关系,建立一个初步的网络模型。②系统地改变网络的内部组成成分或外部影响条件来扰动这个网络,运用初始网络模型预测扰动后网络的变化,然后观察生物网络的结构和功能实际发生的变化。③把通过实验得到的数据和根据初始网络模型预测的结果进行比较,并对初始模型进行修订。④根据修正后的网络模型进行预测,实施新的改变网络状态的实验。重复②和③,不断通过实验数据对模型进行修正,直到网络模型预测的数据和实验数据相符。一个合理的网络模型,可以解释生物系统的正常活动,对在扰动情况下生物系统可能出现的现象作出准确的预测。

microRNA 是一类长约 19~24nt 的内源性非编码 RNA,主要通过结合于靶基因的 3'非翻译区导致其靶 mRNA 的降解或阻碍其靶 mRNA 的翻译。microRNA 具有高度保守性、表达时序性及器官组织特异性,通过精确地调控靶基因表达进而参与细胞的发育、分化、增殖、凋亡以及应激反应等生物学过程^[6]。microRNA 的表达上调导致相应靶蛋白的表达下调,相反地 microRNA 的表达下调导致相应靶蛋白的表达上调。因此,在生理状态下 microRNA 的表达量必须精确维持,其表达量的增加或减少均能引发严重的病理后果。冠心病患者的 microRNA 和健康人相比有明显的差异,Fichtlscherer 等^[9]研究发现,在冠心病患者的血液中,在内皮细胞中表达的 microRNA-126, microRNA-17~92a 显著下降;血管平滑肌细胞富含的 microRNA-14 和炎症细胞相关的 miR-155 也明显下降;而心脏富含的 miR-208a 和 miR-133a 却显著增加。这表明 miRNA 极有可能成为冠心病新的生物标记物。如何使异常表达的 microRNA 恢复正常,则可能成为冠心病新的治疗靶点,如在小鼠高脂血症模型中给予静脉或皮下注射 microRNA-122 反义寡核苷酸以沉默 microRNA-122,3 周后小鼠血浆胆固醇水平降低 35%,低密度脂蛋白、高密度脂蛋白、载脂蛋白 B100 (ApoB-100 protein)同时也降低^[10]。

3 冠心病血瘀证实质的系统生物学研究现状及存在问题

冠心病血瘀证实质研究始于 20 世纪,近年来,随着组学技术的广泛应用,取得了一定的成果。基因组学方面,马晓娟等^[11]应用寡核苷酸基因芯片 Affymetrix U133 Plus2.0 检测冠心病血瘀证组、非冠心病血瘀证组和健康对照组的基因表达谱,通过

差异基因筛选,发现与血瘀证相关的基因中上调基因 26 个,下调基因 22 个。通过基因本体(Gene Ontology)分析,发现和免疫相关的基因有 5 个,占 10.4%;通过通路分析,发现有意义的 10 条通路中有 5 条涉及炎症和免疫反应。蛋白质组学方面,李雪峰等^[12]用荧光差异显示二维凝胶电泳技术(2-DDIGE)对冠心病血瘀证患者进行了血小板差异功能蛋白筛选,用基质辅助激光解析/电离—飞行时间质谱技术(MALDI-TOF-TOF)对目标蛋白进行了鉴定。结果筛选出 13 个差异蛋白点,质谱成功鉴定 7 个。对目标功能蛋白在冠心病血瘀证发生发展中的作用进行了分析,发现 CD41 和 Actin γ 是冠心病血瘀证的标志蛋白。代谢组学方面,王勇等^[13]通过检测 Ameriod 环所致小型猪冠心病血瘀证模型的血清脂类代谢物谱群的变化,发现脂类代谢产物甘油三酯、低密度脂蛋白和极低密度脂蛋白、胆碱以及糖代谢葡萄糖、乳酸浓度上升,高密度脂蛋白等含量降低,表明在血瘀证早期葡萄糖代谢紊乱和脂类代谢障碍相互影响,最终加重并恶化了冠心病血瘀证的进程。

目前冠心病血瘀证实质的系统生物学研究中存在的问题主要有以下 3 个方面:①人类的基因、蛋白质和代谢物数量众多,导致不同研究者的结论相差甚大,缺乏可重复性。寻找和冠心病血瘀证相关的枢纽调节者,是揭示冠心病血瘀证实质的关键。②目前,对冠心病中医证候的研究多停留在证候与几个基因、蛋白质或代谢产物的相关性层面上,并未借助生物信息学技术,应用相关基因、蛋白质或代谢产物构建与证候相关的调控网络。由于冠心病血瘀证是一个复杂的病理生理过程,各种致病因子所造成的组织器官的缺血、缺氧、血循环障碍以及血液流变性和黏滞性异常而导致各组织器官水肿、炎症渗出、血栓形成、组织变性、结缔组织增生等一系列的病理变化,都可以概括在其中。冠心病血瘀证不仅涉及多个基因、蛋白质或代谢产物,更与它们之间的相互作用密切相关。只有构建相关的网络,并进行进一步的实验验证,才有可能阐明血瘀证的发生机制。③证候是对某一时空范围内人体病理生理反应状态的概括。证候具有“内实外虚、动态时空和多维界面”的特征,其中动态时空特征是导致证候复杂性的根本原因之一^[14]。目前对于冠心病血瘀证实质的系统生物学研究都采用横断面的研究方法,缺乏随时间的动态变化,不能反映证候的动态演变规律。在以后的研究中引入时间作为变量,对不同时间点

的证候进行比较,才可能真实客观地反映冠心病血瘀证的发生变化。

4 网络生物学、microRNA 组学与冠心病血瘀证实质研究

复杂网络为刻画生物系统提供了一种简明有力的方式,使得研究生物系统成分之间的相互作用成为可能。通过基因转录调控网络、蛋白质相互作用网络、代谢网络和信号传导网络揭示不同时空下生命系统的动力学特征。冠心病血瘀证可以看作危险因素持续干扰心血管网络,造成网络中某些关键的位点和通路发生异常紊乱,最终导致网络损伤后出现的表型。在冠心病血瘀证实质研究中引入网络生物学,根据以往的组学研究结果,构建相应的网络。通过分析网络的拓扑结构,在网络中寻找和冠心病血瘀证相关的关键的结点、通路和模块,作为生物标志物。将这些生物标志物和细胞的反应、表型的变化、生化检测及临床表现结合在一起,形成冠心病血瘀证的生物标志物网络,并通过实验进一步验证。通过对患者的冠心病血瘀证的生物标志物网络的评价,选择更具针对性的治疗方法,实现个体化治疗。

microRNA 是一种重要的转录后调控的因子,在心血管网络中起着关键的调控作用。microRNA 及其调控网络的紊乱导致靶基因产生异常的蛋白质,最终在宏观的层次上可能表现为血瘀证的症状和体征。将其引入血瘀证实质的研究中,为揭示血瘀证的发生机制提供了新的方向。人类只有 1048 条 microRNA(microRNA Base release 16.0),但调控人类基因组中三分之一以上的基因^[15]。由于其数量较少,且处于基因网络调控的枢纽地位,变动的范围较小,有利于进一步深入研究。此外,microRNA 只在特定的时间和空间表达,时空条件不同,其表达模式也不同。这与证候的动态时空特征极其相似。通过研究不同时空条件下与冠心病血瘀证相关的 microRNA,运用生物信息学软件可以预测其靶基因,构建出与冠心病血瘀证相关的 microRNA 调控网络,诠释其发生变化的规律。和以往的基因组学、蛋白质组学和代谢组学相比,microRNA 组学和冠心病血瘀证实质研究相关性和特异性可能更高。

5 展望

冠心病血瘀证实质研究已有 60 多年,取得了很多规范化、标准化成果,在中医现代化研究中具有重要影响。目前冠心病在我国的患病率和死亡率仍然位居前列,而血瘀证是冠心病的主要证候。在后基因组时代,结合前贤辛勤研究的成果和系统生物学

的最新进展,进一步深入探索冠心病血瘀证实质具有重要意义。新近出现的网络生物学和 microRNA 组学为解决冠心病血瘀证实质研究的复杂性提供了新的思路和方法,但相关研究的开展仍需要多学科的交叉合作。在冠心病血瘀证实质研究的道路上,需要不断创新和突破,在时代的坐标里与时俱进,最终实现冠心病的有效防治。

参考文献

- [1]王阶,姚魁武. 血瘀证证候实质研究进展与思考[J]. 中国医药学报,2003,18(8):490-493.
- [2]蒋跃绒,殷惠军,刘颖,等. 血瘀证基础研究的若干思考[J]. 中国中医基础医学杂志,2005,11(8):561-563.
- [3]熊绍权,林丽珠,龙奇达. 中医药系统生物学研究现状评析[J]. 中医杂志,2010,51(5):392-394.
- [4]王娟,尚彤. 心血管系统生物学研究进展[J]. 生理科学进展,2009,40(2):111-116.
- [5]Barabási AL, Oltvai ZN. Network biology: understanding the cell's functional organization[J]. Nat Rev Genet, 2004,5(2):101-113.
- [6]Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay[J]. Nat Rev Genet,2010,11(9):597-610.
- [7]Boccaletti S, Latora V, Moreno Y, et al. Complex networks: structure and dynamics [J]. Physics Reports, 2006,424 (4-5): 175-308.
- [8]Ideker T, Galitski T, Hood L. A new approach to decoding life: systems biology[J]. Annu Rev Genomics Hum Genet, 2001,2:343-372.
- [9]Fichtlscherer S, De Rosa S, Fox H, et al. Circulating microRNAs in patients with coronary artery disease [J]. Circ Res,2010,107(5):677-684.
- [10]Esau C, Davis S, Murray SF, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting[J]. Cell Metab,2006,3(2):87-98.
- [11]马晓娟,殷惠军,陈可冀. 血瘀证患者差异基因表达谱研究[J]. 中西医结合学报,2008,6(4):355-360.
- [12]李雪峰,蒋跃绒,高铸桦,等. 冠心病血瘀证血小板差异功能蛋白筛选、鉴定及功能分析[J]. 中国中西医结合杂志,2010,30(5):467-473.
- [13]王勇,李春,郭淑贞,等. 扩散编辑实验分析慢性心肌缺血血瘀证模型血清脂类代谢变化[J]. 中华中医药杂志, 2011,26(5):919-922.
- [14]郭蕾,王永炎,张志斌. 关于证候概念的诠释[J]. 北京中医药大学学报,2003,22(2):5-7.
- [15]Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep sequencing data[J]. Nucleic Acids Res,2011,39 (Database issue): D152-D157.

(收稿日期:2012-03-26;修回日期:2012-07-03)

[编辑:崔京艳]