

滋阴清热方对阴虚内热证 SLE 淋巴细胞 基因动态表达的影响*

范瑞强¹ 赖梅生² 陈达灿¹ 吴元胜¹ 禡国维¹ 李红毅¹ 吴晓霞¹
黄咏菁¹ 朱晓浚³ 韩凌⁴ 危建安⁴ 孙静⁴ 张娴⁴ 周丹⁴

1. 广东省中医院皮肤科; 2. 南方医科大学中医药学院中医外科教研室;
3. 中山大学第二附属医院皮肤科; 4. 广东省中医院中心实验室

摘要 本文应用基因芯片技术研究滋阴清热方配合皮质激素治疗阴虚内热证系统性红斑狼疮(SLE)前、中、后淋巴细胞基因表达的动态变化,应用自组图分析方法从 7458 个基因中筛选出 176 个基因,分为 25 类。并用 SPSS13.0 软件包对 25 类基因分别进行了统计处理,找到单个基因治疗前后表达有统计学意义的基因 20 个。结论:激素与滋阴清热方可以上调或下调许多基因的表达,从而调节 T、B 淋巴细胞的的分化与凋亡,减少补体级联反应等导致的炎症反应,调节机体免疫功能而改善病情。

关键词 滋阴清热方; 红斑狼疮(SLE); 基因芯片

SLE 是多基因相关的自身免疫性系统性疾病,SLE 的发生是由多基因共同作用的结果,在各种致病因素的作用下,多基因的活化或抑制,共同决定了 SLE 的产生、临床特征及转归。国内外研究主要集中在单个基因或某一基因家族与 SLE 发病易感性等方面,发现人类白细胞抗原(HLA)区域基因(A、B、C、DRB、DQ、DP、DO、DM 等基因位点,其中对 DRB、DQ 位点的研究较多),干扰素基因家族(IFIT1、IFIT4 等),干扰素调节因子家族(IRF1、IRF4、IRF8),白介素基因家族,Fc- γ 受体基因,TNF 和 TNF 受体家族,bcl-2, p53, myc, TCR 基因、热休克蛋白基因家族等与 SLE 的发病密切相关^[1-10]。

SLE 发病中多基因共同作用是明确的,各种药物对 SLE 的治疗必定对多个基因进行调节,故仅观察单一或某一基因家族未能全面地反映机体基因整体的变化,应用基因芯片技术研究 SLE 基因表达谱的动态变化显得非常必要。前期课题组已发现 SLE 不同证型间存在基因表达的差异^[11]。通过对中医理论与现代基因研究进行粗略的哲学思辨,我们提出以下假说:中医药的作用在于整体调节。对复杂的基因相互调节网络产生影响可能是中医药辨证治疗取得良好疗效的内在机制,基因网络调控平衡可能是中医基本理论“阴平阳秘”的现代内涵,中医症候是机体众多基因功能在特定时期的外在表现,而对中医症候进行辨证所得的证型是机体众多基因在一段时期中表达模式的归纳。阴虚内热证是 SLE 的最常见最基本的证型。广东省中医院皮肤科多年来应用滋阴清热方治疗阴虚内热证 SLE 取得良好效果,设计研究滋阴清热方干预阴虚内热证 SLE 后基因表达谱的动态变化,试图从基因水平探讨其现代分子机制,进而为中医理论研究提供新的基因研究信息。

1 研究对象

轻中度 ($5 \leq \text{SLEDAI} \leq 25$) 阴虚内热证 SLE 患者从 2005 年 11 月至 2006 年 11 月在广东省中医院门诊就诊的女性患者 (年龄在 18~50 之间) 中纳入, 总共纳入 18 例, 其中退出 2 例, 失访 1 例, 有效病例共 15 例。健康对照组来自于广州中医药大学健康大学生和健康志愿者, 共 15 例。纳入、排除、剔除、退出标准见赖梅生博士论文^[12]。

阴虚内热证 SLE 患者 15 例, 均为女性, 最大 48 岁, 最小 18 岁, 平均年龄: 31.60 ± 9.37 ; 健康对照组 15 例, 均为女性, 最大 42 岁, 最小 18 岁, 平均年龄: 28.40 ± 6.50 。两组年龄经两样本 t 检验, 方差齐性 ($F = 2.929, P = 0.098$), 差异无统计学意义 ($t = 1.087, P = 0.289$)。

2 研究方法^[12]

2.1 治疗方法

1. 滋阴清热方 (狼疮 II 号), 每次 5 粒, 每日 3 次口服。部分病人阴虚内热症候比较明显时, 短期配合使用滋阴清热方汤剂, 加强滋阴清热功效。

2. 一般治疗及对症处理: 保护胃粘膜、补钾、补钙、抗感染。西医药除激素外, 只根据患者激素用量配合使用泰胃美、雷尼替丁保护胃粘膜。

3. 激素治疗: 所有病例均维持纳入时的激素用量, 最高不超过 25mg。

4. 疗程 3 个月。

2.2 基因芯片实验方法

分别于治疗前、治疗中 (6 周) 和治疗后 (12 周) 采静脉血分离提取淋巴细胞, 然后按基因芯片技术要求提取总 RNA, -70°C 保存备用, 按完成 3 个月疗程的先后顺序送检 9 例患者的 27 个样本和 10 例正常人样本, 其中 4 例患者至少有一次样本不符合基因芯片实验要求, 最后选择了 3 次样本均合格的 5 例患者的 15 个样本 (见图 1) 及正常对照组 10 个样本进行基因表达谱实验, 具体方法见赖梅生博士论文。



图 1 患者 15 个样品总 RNA 电泳照片 (数字为样品编号)

2.3 微芯人类基因表达谱芯片

人类基因表达谱芯片由微芯生物公司采用 cDNA 直接点样生产, 共点有 8064 个基因点。其中绝大部

分 cDNA 样品购自美国 Invitrogen 公司 (Invitrogen, CA), 共有 7488 个克隆片段, 其中 7458 个为表达基因片段, 长度在 500 个碱基对以上 (平均长度为 1.4kb); 其他 30 个为空白载体片段。内外参照标准基因样品由法玛西亚公司提供 (Amersham pharmacia, CA), 包括 120 个外参照标准基因和 132 个内参照标准基因以及其他阴性和阳性对照基因共 384 个基因。其他基因片段由微芯生物公司采用 RT-PCR 技术克隆纯化后并入基因样品库。

cDNA 样品抽干后溶于点样缓冲液 (Amersham pharmacia, CA), 采用 Arrayspotter (Amersham pharmacia, CA) 进行芯片自动点样, 点样结束后对芯片进行紫外交联 (400mJ) (Viber Lourmat, France), 处理后的芯片需保存在干燥环境中。

2.4 数据处理与统计分析

比值 (Ratio) 表示荧光信号通过 LOWESS 方法归一化后, 基因表达量在实验组 (对照组) 和对照组 (实验组) 间的变化倍数 (大于 1 的数值代表相应基因表达量上调的倍数, 小于 1 的数值则代表相应基因表达量下调, 其倍数则用 1 除以该数值后的负数来表示)。按两个样品信号强度间的比值 (Ratio) 大于 2 或小于 0.5 的数据作为表达有显著性差异的基因数据。

我们采用了 GeneCluster 2 软件对所有数据中至少三次独立实验处理过程中存在明显表达差异的数据共 167 个数据进行 SOMs (self-organizing maps; 自组图) 筛选分析。分类的参数选择为默认值, 分类类别设置为 5×5 共 25 类, 根据不同类别基因在实验处理间的表达变化规律筛选具有类似变化模式的基因类别。

我们用 SPSS13.0 软件对自组图筛选的 167 个基因前、中、后 3 次表达与正常人的表达的比值 (Ratio) 取常用对数后, 按上述 25 个类别 (见图 2) 进行重复测量方差分析和多元方差分析, 并进行不同时间点和不同组间的两两比较。同一基因三次表达差异比较若方差齐则用 ONE-WAY-ANOVA 分析, 两两比较用 Dunnett (2-sided)。

3 结果与分析

对治疗前、中、后 167 个基因 3 次表达差异有显著性意义 ($P = 0.000$)。结果按基因表达治疗前、中、后相对于正常人的不同特点分为上调、下调和其它三大类, 其中 20 个基因前后差异有统计学意义 (详细数据参见赖梅生博士毕业论文^[12]), 结果分述如下:

3.1 基因表达上调类模式

(1) 基因表达治疗前低, 治疗后高的上调模式

1) c0: 5 例患者有 6 个基因治疗前的表达大部分明显低于正常人, 治疗后表达明显高于正常对照, 差异有显著性 ($P = 0.004$), 基因间表达差异无统计学意义 ($P = 0.526$), 治疗对这些基因的影响为上调 (见图 3)。

2) c1: 5 例患者有 4 个基因治疗前的表达明显低于正常人, 治疗后表达明显高于正常对照, 这些基因三次差异有显著性 ($P = 0.009$), 基因间表达差异无统计学意义 ($P = 0.977$), 治疗对这些基因的影响为上调 (见图 4)。

3) c2: 5 例患者有 6 个基因治疗前的表达明显低于正常人, 治疗后表达明显高于正常对照, 这些基因三次差异有显著性 ($P < 0.0001$), 基因间表达差异无统计学意义 ($P = 0.791$), 治疗对这些基因的影响为上调 (见图 5)。

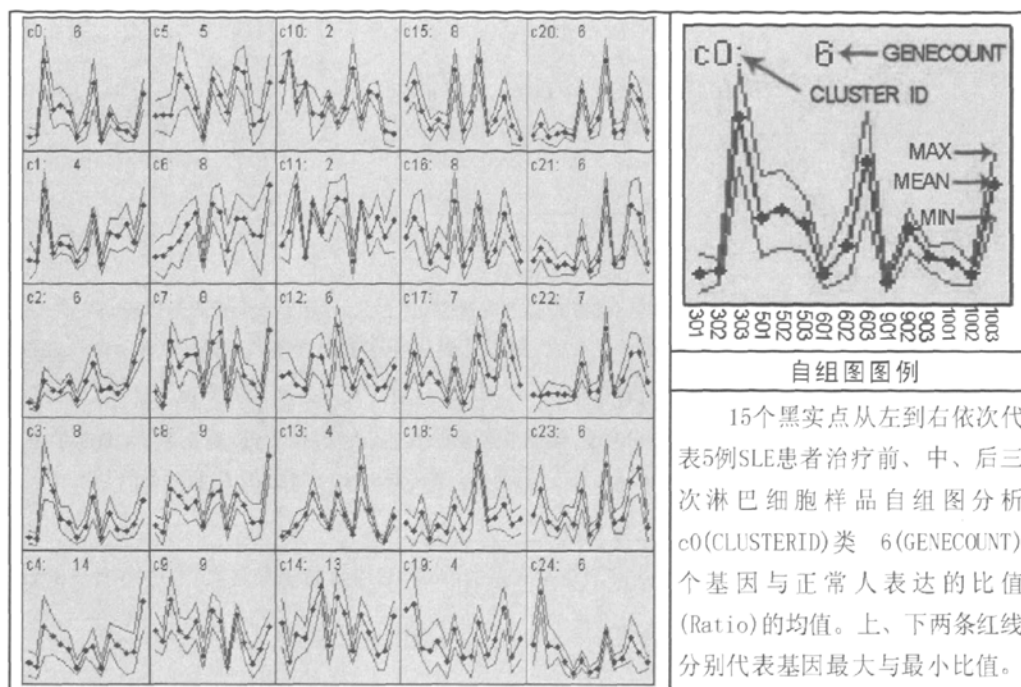


图2 自组图分析图

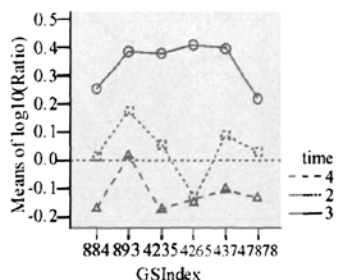


图3 c0模式基因表达变化

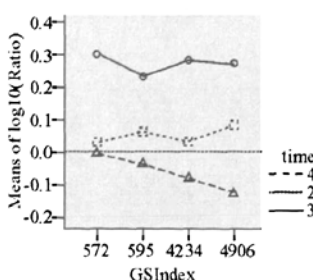


图4 c1模式基因表达变化

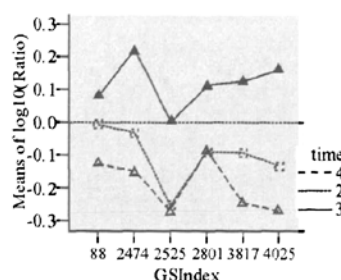


图5 c2模式基因表达变化

4) c7:有 8 个基因(见表 3-9)治疗前的表达低于正常人,治疗后表达明显高于正常对照,这些基因三次差异有显著性($P < 0.0001$),基因间表达差异无统计学意义($P = 0.680$),治疗对这些基因的影响为上调(见图 6)。

5) c8:有 9 个基因(见表 3-10)治疗前的表达低于正常人,治疗后表达高于正常对照,这些基因三次差异有显著性($P < 0.0001$),基因间表达差异无统计学意义($P = 0.699$),治疗对这些基因的影响为上调(见图 7)。

(2) 基因表达治疗前低,治疗后趋近正常的上调模式

1) c13:有 4 个基因表达治疗前大部分明显低于正常人的表达,治疗后表达接近正常,有显著性差异($P < 0.0001$),基因间表达差异无统计学意义($P = 0.499$),治疗对这些基因的影响为上调(见图 8)。

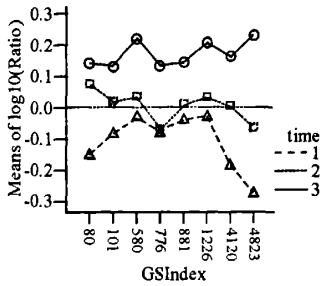


图6 c7模式基因表达变化

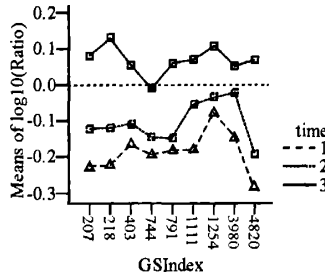


图7 c8模式基因表达变化

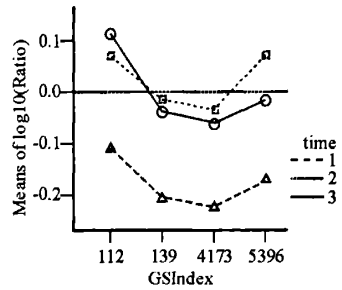


图8 c13模式基因表达变化

2) C3: 治疗前 8 个基因的表达明显低于正常人, 治疗后表达基本接近正常人, 这些基因三次表达有显著性差异 ($P < 0.0001$), 基因间表达差异有统计学意义 ($P = 0.04$), 治疗对这些基因的影响为上调 (见图 9)。

3) c14: 有 13 个基因表达治疗前大部分明显低于正常人的表达, 治疗后表达接近正常, 有显著性差异 ($P < 0.0001$), 基因间表达差异无统计学意义 ($P = 0.788$), 治疗对这些基因的影响为上调 (见图 10)。

(3) 基因表达治疗前高, 治疗后更高的上调模式

C5: 5 例患者有 8 个基因治疗前的表达高于正常人, 治疗后表达明显高于正常人, 这些基因三次表达有显著性差异 ($P = 0.019$), 基因间表达差异无统计学意义 ($P = 0.679$), 治疗对这些基因的影响为上调 (见图 11)。



图9 c3模式基因表达变化

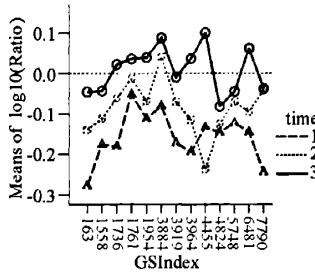


图10 c14模式基因表达变化

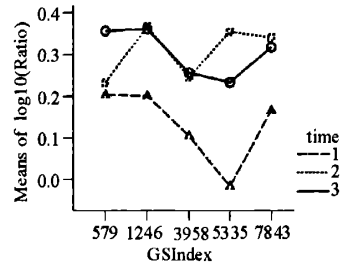


图11 c5模式基因表达变化

(4) 基因表达治疗前低, 治疗后仍低的上调模式

1) C9: 治疗前 9 个基因的表达明显低于正常人, 治疗后表达升高但仍低于正常人, 这些基因三次表达有显著性差异 ($P < 0.0001$), 基因间表达差异无统计学意义 ($P = 0.865$), 治疗对这些基因的影响为上调 (见图 12)。

2) C4: 治疗前 14 个基因的表达明显低于正常人, 治疗后表达升高但仍低于正常人, 这些基因三次表达有显著性差异 ($P < 0.0001$), 基因间表达差异无统计学意义 ($P = 0.651$), 治疗对这些基因的影响为上调 (见图 13)。

(5) 基因表达治疗前接近正常, 治疗后升高的上调模式

1) c6: 有 8 个基因治疗前表达与正常人接近, 治疗后表达上调, 这些基因三次表达有显著性差异 ($P < 0.0001$), 基因间表达差异无统计学意义 ($P = 0.221$), 治疗对这些基因的影响为上调 (见图 14)。

2) c11: 有 2 个基因治疗前表达与正常人接近, 治疗后表达上调, 差异有统计学意义 ($P = 0.028$), 基因间表达差异无统计学意义 ($P = 0.394$), 治疗对这些基因的影响为上调 (见图 15)。

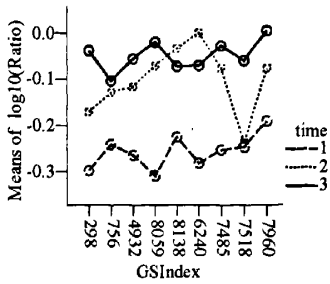


图12 c9模式基因表达变化

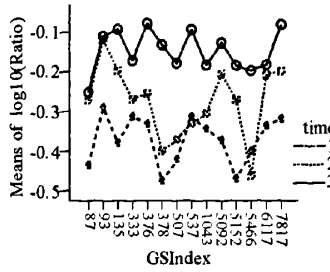


图13 c4模式基因表达变化

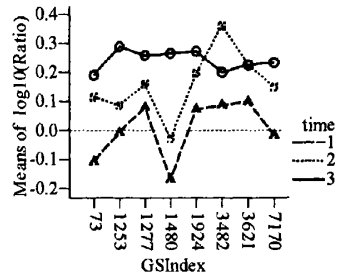


图14 c6模式基因表达变化

3) c12: 有 6 个基因治疗前表达与正常人接近, 治疗后表达上调, 差异有统计学意义 ($P = 0.002$), 基因间表达差异无统计学意义 ($P = 0.997$), 治疗对这些基因的影响为上调 (见图 16)。

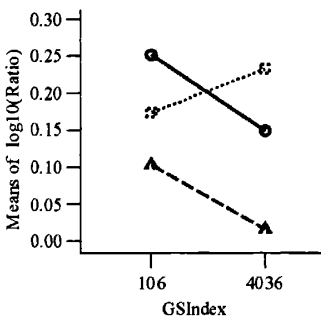


图15 c11模式基因表达变化

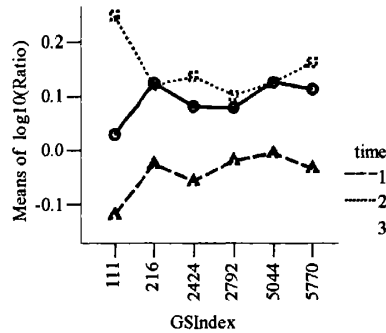


图16 c12模式基因表达变化

3.2 下调模式

(1) 基因表达治疗前高, 治疗后接近正常的下调模式

1) C16: 有 8 个基因治疗前的表达基本高于正常人, 治疗后接近正常, 三次表达有显著性差异 ($P < 0.0001$), 基因间表达差异无统计学意义 ($P = 0.291$), 治疗对这些基因的影响为下调 (见图 17)。

2) C17: 有 7 个基因治疗前的表达高于正常人, 治疗后均下调, 三次表达有显著性差异 ($P < 0.0001$), 基因间表达差异无统计学意义 ($P = 0.518$), 治疗对这些基因的影响为下调 (见图 18)。

3) C20: 有 3 个基因治疗前的表达明显高于正常人, 治疗后基因表达明显下调, 接近于正常人, 三次表达有显著性差异 ($P < 0.0001$), 基因间表达差异无统计学意义 ($P = 0.477$), 治疗对这些基因的影响为下调 (见图 19)。

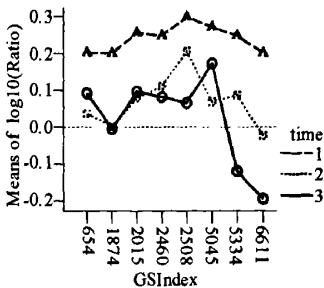


图17 c16模式基因表达变化

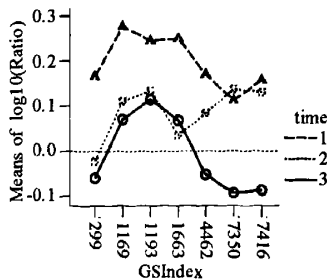


图18 c17模式基因表达变化

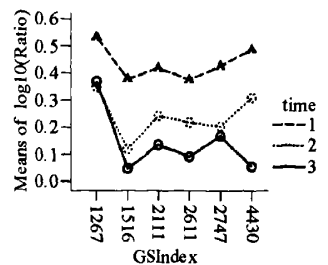


图19 c20模式基因表达变化

4) C21:有 6 个基因治疗前的表达高于正常人,治疗后接近于正常人,有显著性差异($P < 0.0001$),基因间表达差异无统计学意义($P = 0.579$),治疗对这些基因的影响为下调(见图 20)。

(2) 基因表达治疗前接近正常,治疗后低于正常人的下调模式

1) c19:4 个基因治疗前表达接近正常人,治疗后低于正常人,差异有显著性($P < 0.0001$),基因间表达差异无统计学意义($P = 0.114$),治疗对这些基因的影响为下调(见图 21)。

2) c23:6 个基因治疗前表达接近正常人,治疗后低于正常人,差异有显著性($P < 0.0001$),基因间表达差异无统计学意义($P = 0.135$),治疗对这些基因的影响为下调(见图 22)。

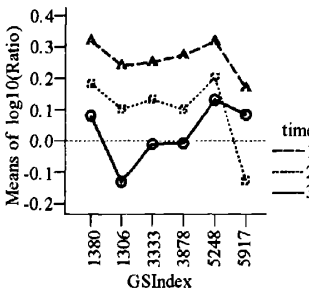


图20 c21模式基因表达变化

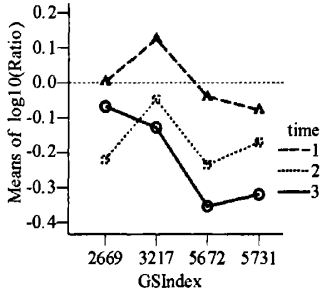


图21 c19模式基因表达变化

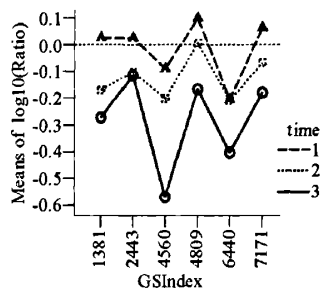


图22 c23模式基因表达变化

3) c24:6 个基因治疗前表达接近正常人,治疗后低于正常人,差异有显著性($P < 0.0001$),基因间表达差异无统计学意义($P = 0.444$),治疗对这些基因的影响为下调(见图 23)。

(3) 基因表达治疗前高,治疗后低的下调模式

C22:有 8 个基因治疗前的表达高于正常人,治疗低于正常人,三次表达有显著性差异($P = 0.001$),基因间表达差异无统计学意义($P = 0.819$),治疗对这些基因的影响为下调(见图 24)。

(4) 基因表达治疗前高,治疗后仍高的下调模式

1) C10:有 2 个基因治疗前的表达明显高于正常人,治疗后降低,但仍高于正常人,这些基因三次表达有显著性差异($P = 0.004$),基因间表达差异无统计学意义($P = 0.908$),治疗对这些基因的影响为下调(见图 25)。

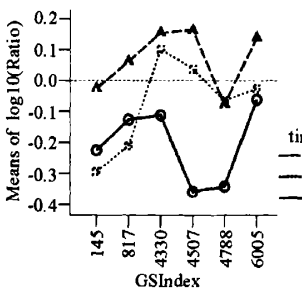


图23 c24模式基因表达变化

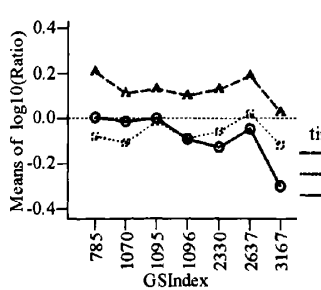


图24 c22模式基因表达变化

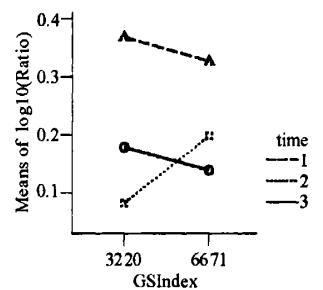


图25 c10模式基因表达变化

2) C15:有 8 个基因治疗前的表达明显高于正常人,治疗后降低,但仍高于正常人,这些基因三次表达有显著性差异($P < 0.0001$),基因间表达差异无统计学意义($P = 0.970$),治疗对这些基因的影响为下调(见图 26)。

3.3 其它

C18: 治疗前有 5 个基因的表达接近正常人, 治疗后下调, 但前后差异无统计学意义 ($P = 0.176$), 基因间差异无统计学意义 ($P = 0.922$), 治疗对这些基因表达无影响 (见图 27)。

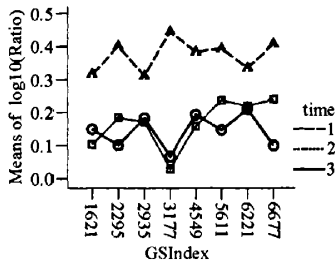


图26 15模式基因表达变化

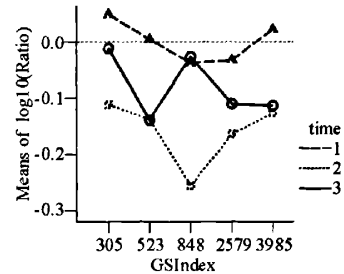


图27 18模式基因表达变化

3.4 20 个前后表达差异有统计学意义基因汇总分析

我们对自组图分析中的前后差异表达有统计学意义 ($P < 0.05$) 的 20 个基因进行了汇总, 结果如图 29。其中 4507 对应的人免疫球蛋白 K 链 c 区 (IGKC) 基因, 治疗后下调, 低于正常人, 该基因编码免疫球蛋白轻链, 广泛参与免疫应答、抗原递呈、抗原加工等免疫过程, 该基因表达减少与减少 SLE 患者自身抗体产生的治疗目的相一致。其余 19 个基因表达以上调为主, 分析如下:

5059 治疗前低于正常人, 治疗后接近正常人, 对应的 ACTR2 基因编码肌动蛋白相关蛋白 2 (Arp2)。Arp2 和 Arp3 复合物在真核生物中对控制肌动蛋白动态平衡起核心作用, 具有使肌动蛋白聚合和使肌动蛋白纤维尖端加帽及交联肌动蛋白纤维成网状结构的能力。肌动蛋白是一类高度保守的蛋白质, 存在于所有真核细胞中, 参与细胞分裂、运动、迁移、形态的维持、生长等多种重要生理活动。肌动蛋白可能参与了大多数 RNA 聚合酶 II 介导的基因转录活动、RNA 的加工与运输。细胞核中的肌动蛋白, 不仅作为一种结构蛋白参与核骨架和染色质骨架的组成, 更重要的是作为一种功能蛋白, 参与调整染色质结构和调控基因转录活动^[13]。王展、曾凡钦^[14]的研究认为 SLE 患者血中脱氧核糖核酸酶 1 基因 (Deoxyribonuclease I, DNase I) 活性与肌动蛋白浓度之间呈负相关, 提示血中肌动蛋白浓度的增高可能是 DNase I 活性降低的原因之一。冯学兵等^[15]的研究发现 SLE 患者 DNASE1 基因表达水平显著高于正常对照 ($P < 0.001$), 未发现 SLE 疾病活动性指数积分与基因表达水平存在相关性, 但性别分析显示女性患者 DNASE1 基因表达水平高于男性患者 ($P < 0.01$), 提示 DNASE1 基因与 SLE 发病相关。提示 Arp2 合成低下可能与 SLE 的发病有关, 通过提高 Arp2 合成以调节肌动蛋白功能, 可能可以降低 DNase I 的活性, 减少抗双链脱氧核糖核酸抗体 (ds-DNA) 的生成而达到改善病情的目的, 它们间的关系有待进一步研究证实。

古蛋白 1 (ARCN1) 基因参与细胞内蛋白运输, 与热休克蛋白有类似作用, 与高尔基内质网膜泡介导运输有关。治疗前接近正常, 治疗 6 周上调, 治疗 12 周又下调, 提示 ARCN1 可能作为辅助因子参与 SLE 病理过程。

隐花色素 2 基因 (cryptochrome 2, CRY2) 参与 DNA 的修复。CRY2 作为不依赖于光照的昼夜节律钟的一个部件, 可能通过与激活剂和反馈抑制剂相作用而调节周期同族体 1 (PER1) 转录子的周期循环^[16], 而 PER1 是生理循环的转录因子, 作为一种负性调节元件, 其启动子可作为多个信号分子的传感器, 但不能与

DNA 直接结合,提示其可能通过间接方式发挥转录抑制效应。CRY2 在植物中是蓝光受体(blue light receptor)或蓝光/紫外光 A 受体(BL/UVA receptor)。它是吸收蓝光(400~500nm)和近紫外光(320~400nm)而引起光变态反应的一类光敏受体。它在红斑狼疮中的作用有待进一步研究。

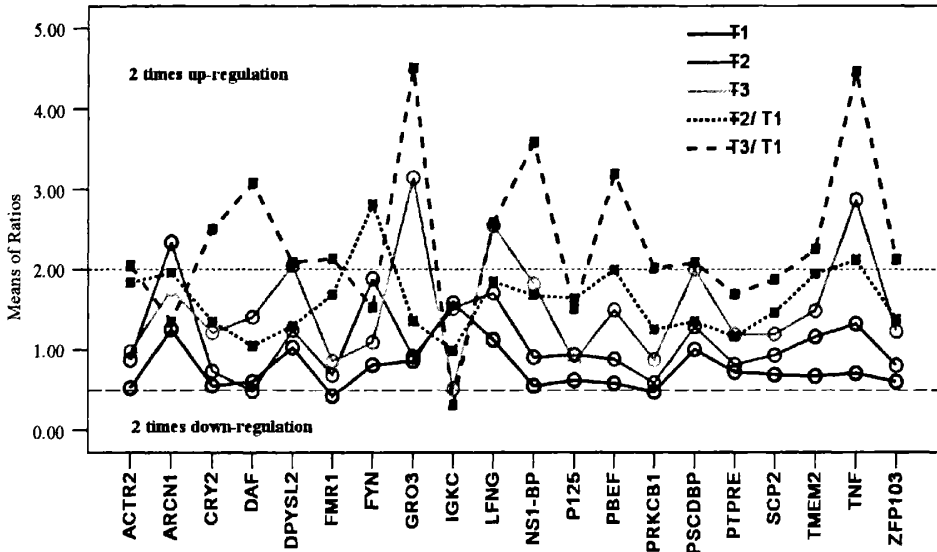


图28 20个治疗前后差异表达的基因变化总趋势图

T1、T2、T3 分别代表治疗前、治疗 6 周及治疗 12 周与正常人基因表达的比值

T2/T1、T3/T1 分别表示治疗 6 周、治疗 12 周与治疗前基因表达的比值

补体促衰变因子(DAF,CD55 分子),是一种免疫调节因子,属膜蛋白,是补体激活途径中的一个重要膜调节蛋白,可通过与 C2 竞争与 C4b 结合,从而抑制 C3 转化酶形成并促进其分解而调节经典途径或通过竞争性抑制 B 因子与 C3b 结合而干扰旁路途径 C3 转化酶的组装,从而阻断补体级联反应,从而保护自身细胞。在 SLE 弥漫增生性肾小球肾炎患者中红细胞和肾小球细胞中高表达,提示对补体介导的损伤起积极的防护作用^[17]。本研究中治疗前明显低于正常人,治疗后明显高于正常人,治疗前后有显著性差异,提示中药等综合治疗可能通过上调 DAF 而对抗由补体介导的损伤,与文献研究一致。

二氢嘧啶酶样 2(DPYSL2)参与核苷酸和核酸代谢、信号转导、神经系统发育等,可能与其它候补基因相互作用引起精神分裂症^[18,19]。本研究中,治疗前基本接近正常人,治疗后高于正常人,前后差异有统计学意义,它在 SLE 发病中的作用有待进一步研究探讨。

脆性 X 智力低下基因(FMR1)参与 mRNA 加工、运输,有研究认为 FMRP 缺失可导致树突棘密度增高和感觉皮质功能柱区域树突棘修剪异常。治疗前显著低于正常人,治疗后明显上调而接近正常人,其在 SLE 发病中的作用有待进一步探讨。

激活酪氨酸激酶基因 FYN 是经典的 src 激酶家族成员,在细胞生长,分化和转化的调节中起重要作用。具有核苷酸结合、蛋白酪氨酸激酶、非膜跨越蛋白酪氨酸激酶、蛋白结合等活性,参与蛋白氨基酸磷酸化、钙离子运输、细胞内信号转导级联、蛋白激酶级联、T 细胞受体信号转导途径等。本研究中治疗前低于正常人,治疗后高于正常人,提示 FYN 可能通过 T 细胞受体信号转导等途径参与自身免疫的调节过程。

4265 对应的是趋化因子配体 3(GRO3)基因。参与趋化、炎症应答、G 蛋白偶联受体蛋白信号转导途径及应答刺激等。治疗前低于正常人,治疗后显著高于正常人,提示 GRO3 可能是治疗相关的效应蛋白,它在 SLE 发病进程中的作用有待进一步深入研究。

极端同源物(LFNG)基因,编码一种信号传导膜蛋白,位于高尔基体,可减少 JAGGED1 与 NOTCH2 结合。JAGGED1 是 Notch 信号通路中的一个配体,近来许多研究表明,它能诱导树突状细胞的成熟,并通过促使 T 淋巴细胞分化成调节性 T 细胞或 II 型 T 辅助细胞,从而诱导免疫耐受^[20]。本研究中,SLE 患者治疗前 LFNG 表达接近正常人,治疗后显著上调,提示可能通过上调 LFNG 的表达而抑制 SLE 患者 T 淋巴细胞成熟与分化,从而调节免疫应答。

NS1-BP 基因为流感病毒 NS1A 结合蛋白(IVNS1ABP)基因。NS1-BP 与细胞核剪接体组成相关,参与 mRNA 前体的剪接过程^[21],在 SLE 患者治疗前明显低于正常人,治疗后高于正常人,而提示治疗可能通过上调 NS1-BP 的表达,影响淋巴细胞内前 mRNA 剪接成熟,进而调控基因的表达。

P125 基因,又名 sec23ip,编码 SEC23 结合蛋白。囊胞分子复合体(Sec23/24-Sar1)是 COP II 衣被小泡的重要组成成分,参与蛋白从内质网转运出来的重要生理过程。P125 负责 SEC23 的结合与固定^[22]。在本研究中 SLE 患者治疗前显著低于正常人,治疗后高于正常人,治疗后比治疗前表达显著增多,提示 P125 可能参与了 SLE 的发病进程,治疗可能通过上调 P125 而增强 SEC23 蛋白与 SEC24 蛋白结合与固定形成囊胞分子复合体,改善蛋白的转运有关,有必要进一步研究 P125 在 SLE 中表达低下在 SLE 发病中的作用以及促进 P125 表达在治疗中的作用。

前 B 细胞克隆增强因子(PBEF)表达治疗前低于正常人,治疗后上调接近正常人。PBEF 受 IL-6 和 IL-6 相关细胞因子 OSM 的调节,在关节炎期间表达增高,PBEF 可能与关节炎的发病有关^[23],PBEF 与 SLE 的关系有待进一步研究。

蛋白激酶 C- β 1(PRKCB1)基因,编码一种在糖尿病相关肾病起重要作用的信号分子,可以作为预测日本 2 型糖尿病患者肾病恶化的因子^[24]。我们的研究中发现,治疗前 PRKCB1 表达明显低于正常人,治疗后上调接近正常人,治疗前后差异有显著性,说明 PRKCB1 在 SLE 的发病中起重要作用,是否与狼疮肾的发生与发展有关需进一步研究。也可能是药物治疗的一个靶基因。

PSCDBP 基因是白介素-12 诱导而表达的细胞色素 C 家族,它可激活树突状细胞并促进其与 T 细胞的粘附。PSCDBP 治疗前接近正常,治疗后上调,前后差异有统计学意义。

蛋白酪氨酸磷酸酶受体 E(PTPRE)基因,参与蛋白氨基酸去磷酸化,对细胞信号传导、细胞生长与分化及免疫应答有重要作用。蛋白酪氨酸磷酸酶受体 O(PTPRO)具有维持 B 细胞静止,抑制其生长及促进其分化的作用^[25]。在本研究中治疗前低于正常人,治疗后高于正常人,提示 PTPRE 可能参与 SLE 患者淋巴细胞病理过程,SLE 的治疗是否通过上调 PTPRE 来抑制 B 细胞增殖并促进分化有待进一步研究证实。

固醇载体蛋白 2(SCP2)基因,可能通过增强过氧化物酶体多功能酶 2(MFE2)与脂酰 CoA 的结合力,使得 MFE2 发挥最有效的催化活力,在哺乳类动物的脂类代谢中发挥其重要作用。本研究中,治疗前低于正常人,治疗后高于正常人,前后差异有统计学意义,中药等综合治疗对该基因的表达有上调作用。

跨膜蛋白 2(TMEMP2)基因,治疗后表达显著高于治疗前,提示 TMEMP2 参与到 SLE 的发病过程,具体作用有待进一步研究以证实。

肿瘤坏死因子基因(TNF)。TNF在SLE发病中的作用目前研究不一致。TNF可通过与(肿瘤坏死因子受体)TNFR结合而起广泛的生物学活性,如参与炎症反应和免疫应答,同时TNF与TNFR也是重要的死亡配体和死亡受体,两者结合后可诱导细胞凋亡^[26]。本研究中发现TNF治疗前低于正常人,治疗后显著高于正常人。可能TNF表达的增高,通过介导过度增生的异常B淋巴细胞的凋亡而起调节自身免疫的功能。TNF在SLE发病中的作用可能是多方面的,一方面它可以介导炎症的发生,引起组织损害,另一方面可通过加速病变细胞的凋亡。治疗可能通过调节两种不同作用起改善病情的作用。

ZFP103基因为抗抑郁相关基因,是抗抑郁药的新靶点,编码的锌指蛋白在泛肽-蛋白酶系统起重要作用^[27]。在SLE患者中ZFP103总体表达低于正常人(Ratio=0.724),治疗后ZFP103表达上调,由治疗前低于正常人上调到治疗后高于正常人。这与多数患者中医药干预前表现出的狂躁或精神抑郁以及中医药治疗后患者自觉明显好转相一致,提示滋阴清热方可能通过提高抗抑郁相关基因的表达达到缓解精神神经症状,有待进一步研究证实。

4 结论

1. 阴虚内热证SLE患者淋巴细胞许多基因治疗前、中、后表达有上调或下调,激素与滋阴清热方可能通过调控相关基因的表达而达到改善病情的作用。

2. 激素与滋阴清热方可以提高Arp2合成以调节肌动蛋白功能,进而降低DNase I的活性,减少抗双链脱氧核糖核酸抗体(ds-DNA)的生成而达到改善病情的目的。

3. 激素与滋阴清热方可以上调DAF的表达拮抗由补体介导的损伤,从而改善病情。

4. 激素与滋阴清热方可能通过上调LFNG的表达而抑制SLE患者T淋巴细胞成熟与分化,从而调节免疫应答。

5. 激素与滋阴清热方可能通过上调PTPRE来抑制B细胞增殖并促进分化,以及TNF等因子的表达来诱导异常增生的B细胞克隆的凋亡,减少自身抗体的产生。

总之,激素与滋阴清热方可以上调或下调许多基因的表达,调节T、B淋巴细胞的分化与凋亡,减少补体级联反应等导致的炎症反应,调节机体免疫功能而改善病情。