

· 中医中药 ·

滋阴清热方对系统性红斑狼疮阴虚内热证患者 PBMC 基因表达谱的影响

范瑞强¹,程喜平²,赖梅生³,吴元胜¹,陈达灿¹,禩国维¹,陈明春⁴,朱晓浚⁴,许德清⁴

[摘要] 目的 观察滋阴清热方对系统性红斑狼疮(SLE)阴虚内热证患者PBMC基因表达谱的影响。方法 用滋阴清热含药血清孵化阴虚内热型SLE患者的PBMC,提取总RNA,用基因芯片检测孵化后PBMC基因表达谱。结果 研究发现滋阴清热方含药血清上调51个基因表达,下调92个基因表达,它们分属于21个基因功能簇,基因编码蛋白分布于细胞的8个部位。含药血清和地塞米松共同上调2个基因表达和下调12个基因表达;但是含药血清还下调12个基因表达和上调9个基因表达,而地塞米松对这21个基因无类似调控作用;同样,地塞米松下调11个基因表达和上调15个基因表达,而含药血清对这26个基因无类似调控作用。结论 滋阴清热方对SLE阴虚内热型基因表达谱影响是广泛和复杂的,涉及基因数目较多,基因编码蛋白在细胞中分布广泛,具有上调和下调功能簇内基因表达的作用。

[关键词] 滋阴清热;阴虚内热;系统性红斑狼疮;基因表达谱;基因芯片;含药血清

[中图分类号] R 593.24⁺¹

[文献标识码] A

[文章编号] 1001-7089(2011)03-0225-03

The Influence in Gene Expression Profiling on PBMC of Internal Heat Due to Yin Deficiency Type SLE Patients with Nourishing Yin Clearing Heat Formula

FAN Rui-qiang¹, CHENG Xi-ping², LAI Mei-sheng³, WU Yuan-sheng¹, CHENG Da-can¹, XUAN Guo-wei¹, CHEN Ming-chun⁴, ZHU Xiao-jun⁴, XU De-qing⁴

(1. Department of Dermatology, Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510120, China; 2. The First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, China; 3. Surgery of TCM, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 4. Department of Dermatology; the Second Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510515, China)

[Abstract] **Objective** To observed the influence of nourishing yin clearing heat formula in gene expression profiling on PBMC of internal heat due to yin deficiency type SLE patients. **Methods** Incubating PBMC of internal heat due to yin deficiency type SLE patients with medicated serum of the nourishing yin clearing heat formula, extracting total RNA and using genechip to detect gene expression profiling of PBMC after incubation. **Results** The research display: the medicated serum of nourishing yin clearing heat formula had up-regulated 51 genes expression, down-regulated 92 genes expression. all of the genes are belong to twenty-one gene function clusters. And the functional protein coded by this genes are located at 8 parts of cell. the medicated serum and dexamethasone up-regulated 2 genes expression, down-regulated 12 genes expression simultaneously. But medicated serum up-regulated 9 genes expression, down-regulated 12 genes expression the dexamethasone had no similar regulation, however dexamethasone up-regulated 15 genes expression, down-regulated 11 genes expression the medicated serum had no similar regulation too. **Conclusion** The influence of nourishing yin clearing heat formula in gene expression profiling on internal heat due to yin deficiency type SLE patients were wide and complex. A large number of genes expression were regulated. The functional protein coded by this genes distributed widely in cell.

[Key words] Nourishing yin clearing heat; Internal heat due to yin deficiency; SLE; Gene expression profiling genechip; Medicated serum

系统性红斑狼疮(SLE)是一种常见的多脏器多系统损害 的自身免疫性疾病,中西医结合治疗SLE有鲜明的特色。长期

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30472218)

[作者单位] 1. 广州中医药大学第二附属医院皮肤科,广东 广州 510500; 2. 广州医学院第一附属医院皮肤科,广东 广州 510500; 3. 南方医科大学中医学院中医外科教研室,广东 广州 510500; 4. 中山大学附属第二医院皮肤科,广东 广州 510500

的临床实践证明中西医结合治疗 SLE 不良反应少,中药可协助撤减激素。为了更好的了解中药治疗 SLE 的作用机理,本研究选择国家名老中医禩国维教授总结的治疗 SLE 滋阴清热方,观察其对 SLE 阴虚内热证患者外周血单个核细胞(PBMC)基因表达谱的影响。现将结果报告如下。

1 资料与方法

1.1 病例来源 入选的 15 例 SLE 患者来自广东省中医院和中山大学附属第二医院,为未使用过糖皮质激素治疗的初发患者,西医诊断符合 SLE 美国风湿学会 1997 年修订的诊断标准;中医阴虚内热证符合 2002 年国家药品监督管理局修订的《中药新药临床研究指导原则(试行)》系统性红斑狼疮中医阴虚内热证候诊断标准。将 15 例患者样本进行蛋白质组学研究,并随机抽取 3 例的 PBMC 进行基因表达谱研究。

1.2 含药血清制备及实验浓度选定 含药血清制备:滋阴清热方(本院自制剂,组分:山萸肉、生地、茯苓、泽泻、丹皮、青蒿和甘草)购于广东省中医院中药房,含药血清制备按王钦茂等^[1]的方法制备。含药血清实验浓度选定:以含药血清对 SLE 患者 PBMC 的抗 ds-DNA 抗体(REAADS 抗 ds-DNA 抗体检测试剂盒,美国 Corgenix 公司产品)浓度影响作为条件,并以 10×10^{-6} mg/mL 地塞米松对抗 PBMC 的 ds-DNA 抗体浓度影响作参照,选用高剂量和等效剂量含药血清,分别以 10%,20% 和 30% 的含药血清进行预试验,根据预实验结果选定 20% 高剂量含药血清量为实验用浓度和剂量。

1.3 SLE 的 PBMC 分离与孵化 抽取阴虚内热证的 SLE 患者静脉血,分离 PBMC。实验分为 4 组:含药血清组、地塞米松组、空白血清组和 RPMI1640 培养液空白对照组,加入 PHA $10 \mu\text{g}/\text{mL}$,PBMC 细胞数的终极浓度为 $1.0 \times 10^6/\text{mL}$,置于含 5% CO_2 的 37°C 培养箱中孵化 24h。含药血清组加入 20% 高剂量的含药血清;地塞米松组加入终极浓度为 1.0×10^{-6} mg/mL 的地塞米松,空白血清组加入 20% 空白血清,空白对照组加入 20% RPMI1640 培养液。孵化 48h,搜集样本,3 000r/min 离心 5min,收集细胞和上清液,细胞用作基因表达谱和表面加强激光解吸电离-飞行时间质谱(Surface Enhanced Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry SELDI-TOF-MS)检测,上清液用作抗 ds-DNA 抗体检测。

1.4 总 RNA 提取及基因表达谱检测 按 TRIZOL 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)要求充分裂解 PBMC,提取总 RNA。样本送深圳微芯公司进行基因表达谱检测。芯片为美国 Invitrogen 公司人类基因表达谱芯片,共 8 064 个基因点,按基因芯片操作规程完成检测。

1.5 统计学处理 含药血清组、地塞米松组及空白血清组实验样品的杂交信号均与空白对照组样品杂交信号进行比较得出基因表达信号强度比值。①基因表达各实验组有效调节的入选标准:3 例患者该基因在相同实验组表达信号强度比值均 >1.5 为该基因受该实验条件上调;3 例患者该基因在相同实验组表达信号强度比值均 <0.667 为该基因受该实验条件下调;3 例患者该基因在相同实验组表达信号强度比值为 $1.5 \sim 0.667$ 为该实验条件对该基因既不下调也不上调,不符合上述条件的基因表达信号强度比值的数据不纳入本次数据分析。

②基因表达聚类分析:采用深圳微芯公司的 GeneCluster 2 软件进行 SOMs(self-organizing maps)分析,对 3 例患者具有类似表达规律的基因,结合与 SLE 发病关系密切的基因功能簇进行聚类分析。

2 结果

2.1 含药血清对 SLE 患者 PBMC 基因表达的影响 共上调 51 个基因的表达,下调 92 个基因的表达。被含药血清调控表达的基因分属以下功能簇(括号内数据前者为上调表达的基因数,后者为下调表达的基因数):细胞表面抗原(2,4),细胞转录(3,7);细胞周期(2,2),细胞黏附受体/蛋白(3,4),免疫系统蛋白(0,5),细胞外转运蛋白(1,3),肿瘤抑制(3,3),反应抑制蛋白(4,2),膜通道和转运(4,2),新陈代谢(5,22),DNA 合成重组和修复(2,2),蛋白翻译(1,1),蛋白翻译后修饰(1,3),凋亡有关基因(1,1),RNA 的转位和转移(3,10),细胞配体受体(1,11),细胞信号细胞信使蛋白(6,7),细胞内转录/效应/调节因子(5,12),蛋白周转(2,5),细胞受体(1,5),细胞骨架/动力蛋白(3,0),功能未定(8,11),未归类(3,5)和未命名基因(7,0)。其中上调表达的基因中有 17 个同时分属 2 个基因簇,有 2 个同时分属 3 个基因簇,下调表达的基因中有 25 个同时分属 2 个基因簇,有 5 个同时分属 3 个基因簇。被含药血清调控表达的基因编码的功能蛋白位于细胞部位(括号内数据前者为上调表达的基因数,后者为下调表达的基因数):细胞质膜蛋白(11,23),胞质蛋白(8,24),胞外分泌的蛋白质(7,11),内质网(0,1),细胞骨架蛋白(3,0),线粒体蛋白(1,1),核蛋白(12,19),微粒体蛋白(0,1),细胞外基质和未分部位(11,13)。被上调和下调表达的基因均有 3 个基因编码的蛋白位于细胞 2 个不同部位。

2.2 含药血清和地塞米松对 SLE 患者 PBMC 基因表达谱的影响 地塞米松上调表达的基因 85 个,下调表达的基因 126 个。含药血清和地塞米松同时上调 2 个基因的表达和下调 12 个基因的表达;含药血清下调表达、地塞米松无上调也下无调表达的基因 12 个;含药血清上调表达的、地塞米松同时无上调也无下调表达的基因 9 个;含药血清同时无上调也无下调表达、地塞米松下调表达的基因 11 个;含药血清同时无上调也无下调表达、地塞米松上调表达的基因 15 个。

2.3 含药血清和空白血清对 SLE 患者 PBMC 基因表达谱的影响 空白血清上调 147 个基因表达,下调 100 个基因表达。含药血清和空白血清同时上调 8 个基因的表达和下调 16 个基因的表达。

2.4 含药血清、地塞米松和空白血清三者基因表达的比较 含药血清、地塞米松和空白血清均下调表达的基因有 6 个;含药血清、地塞米松上调,空白血清无上调和下调表达的基因 2 个;含药血清上调,空白血清和地塞米松无上调和下调表达的基因是 FGFR1;含药血清下调,空白血清和地塞米松无上调和下调表达的基因是 DDX6。

2.5 用 GeneCluster 2 软件分析含药血清和地塞米松对 SLE 发病相关基因功能簇基因表达的影响 见表 1。

3 讨论

SLE 是一种难治性累及多系统多器官的疾病,中西医结合治疗 SLE 具有优势。阴虚内热型是 SLE 常见的中医证型,笔者

表 1 用 GeneCluster 2 软件分析含药血清和地塞米松对 SLE 发病相关基因家系的影响

Tab. 1 Influence of medicated serum and dexamethasone on gene clusters related to SLE by GeneCluster 2

	* S ↑ D ↑	S ↓ D ↓	S ↑ D ↓	S ↓ D ↑	S - D ↓	S - D ↑	S ↓ D -	S ↑ D -
Antigen	1	1	1	0	2	1	1	1
Cell apoptosis	5	7	0	0	1	2	3	0
Cell cycle	4	2	2	0	6	4	5	2
Cytokines	5	4	0	1	6	8	0	1

* S: medicated serum, D: dexamethasone, ↑: up-regulate, ↓: down-regulate, -: not up-regulate nor down-regulate

选用国家名老中医禩国维教授总结的对 SLE 有确切疗效的滋阴清热方^[2],通过基因芯片方法研究滋阴清热方对 SLE 患者 PBMC 基因表达谱影响,广角度的研究和筛选滋阴清热方治疗 SLE 可能的机理。PBMC 的主体是淋巴细胞,淋巴细胞是身体的细胞免疫和体液免疫核心参与者。SLE 主要特征是免疫系统紊乱,淋巴细胞的基因表达谱所传递信息与自身免疫疾病关系密切,较其他细胞更接近疾病的本质^[3-4],故选择 PBMC 来研究 SLE 基因表达谱^[1,5-6]。结果显示:滋阴清热方含药血清上调了 51 个基因的表达,下调了 92 个基因的表达。下调表达的基因中有干扰素家族 IRF1 和 IRF5,主要组织相容复合体 HLA-DRB,免疫球蛋白(Ig) Fc 段的特异性受体基因 FCGR1A,上调表达的基因中有肿瘤坏死因子家族的 TNFAIP3。这些基因和 SLE 发病关系密切^[7-10],滋阴清热方含药血清对这些基因表达的调控有助于缓解 SLE 的发病。这与临床上滋阴清热方对 SLE 良好疗效互为印证^[11-12]。

基因表达谱研究的目的之一是筛查疾病新的候选致病基因、候选易感基因和药物作用的候选基因靶点。本研究结果显示:滋阴清热方含药血清对 SLE 患者 PBMC 的基因表达谱的影响广泛,涉及众多基因家族和功能簇,对和 SLE 关系密切的基因功能簇表达的调控关系非常复杂,可上调和下调功能簇内基因的表达。被调控表达的基因作用位点遍及细胞和众多细胞器,调控关系非常复杂。一些基因功能及它们与 SLE 发病的关系目前还不清楚,有些可能是 SLE 新的致病基因、易感基因或药物治疗的基因靶点,值得筛选和深入研究。地塞米松对 SLE 患者 PBMC 基因表达谱调控中可上调 85 个基因的表达,下调 126 个基因的表达,故地塞米松是临床有效治疗和实验研究 SLE 的常用药物^[13-14]。滋阴清热方含药血清和地塞米松同时上调 2 个基因的表达,下调 12 个基因的表达,相似基因的表达调控为滋阴清热方和激素对在临床治疗上 SLE 协同有效,提供了基因表达调控的依据。滋阴清热方含药血清和地塞米松对基因表达的调控作用也有不同,值得认真甄别并寻找对治疗 SLE 更为有效和不良反应更少的新途径。

本研究结果还显示,滋阴清热方含药血清还有不同于地塞米松及空白血清的基因表达的调控作用,单独上调表达的基因是 FGFR1,下调表达的基因是 DDX6,二者与 SLE 的关系目前未检索到文献报道。FGFR1 是编码碱性成纤维细胞生长因子受体 1 的基因,DDX6 是编码解旋酶基因启动子结构蛋白,血液中发

育成熟的疟原虫的雌性配体中 DDX6 有较高表达^[15],女性 SLE 发病率较高,二者有相似之处,同时 DDX6 编码的是解旋酶基因启动子结构蛋白,是基因表达调控过程中的上游调控基因。总之,本研究提示滋阴清热方具有自己独特的作用途径和靶点,开启了新的研究方向。

[参 考 文 献]

[1] 王钦茂,陈光亮,高美华,等. 胃泰胶囊治疗萎缩性胃炎的实验研究[J]. 中药新药与临床药理,1999,10(6):21-24.

[2] 黄咏菁,范瑞强,禩国维. 狼疮 II 号胶囊辅助治疗中度活动性系统性红斑狼疮 36 例疗效观察[J]. 国际医药卫生导报,2004,10(1):101-105.

[3] Gladkevich A, Nelemans SA, Kauffman HF. Microarray profiling of lymphocytes in internal diseases with an altered immune response: potential and methodology [J]. Mediators Inflamm, 2005,2005(6):317-330.

[4] 程喜平,范瑞强,许德清. SLE 基因芯片表达谱研究进展 [J]. 国际皮肤性病学杂志,2006,32(6):346-348.

[5] 吴元胜,范瑞强,陈达灿,等. 基因芯片技术分析系统性红斑狼疮患者外周血白细胞基因表达谱的初步研究[J]. 第一军医大学学报,2005,25(8):929-934.

[6] 韩光明,陈顺乐,沈南,等. 系统性红斑狼疮患者及其家庭成员外周血基因表达谱的研究[J]. 中华皮肤科杂志,2004,37(1):8-11.

[7] Akahoshi M, Nakashima H, Shirakawa T. Roles of genetic variations in signalling/immunoregulatory molecules in susceptibility to systemic lupus erythematosus [J]. Semin Immunol, 2006, 18(4):224-229.

[8] 陶玉芬,许绍斌,黄小琴. 云南汉族系统性红斑狼疮与 HLA-B 等位基因相关性的研究[J]. 中华微生物学和免疫学杂志,2005,25(6):450-451.

[9] Nagai T, Arinuma Y, Yanagida T. Anti-ribosomal P protein antibody in human systemic lupus erythematosus up-regulates the expression of proinflammatory cytokines by human peripheral blood monocytes [J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(3):847-855.

[10] Plenge RM, Cotsapas C, Davies L. Two independent alleles at 6q23 associated with risk of rheumatoid arthritis. [J]. Nat Genet, 2007, 39(12):1477-1482.

[11] 赖梅生,范瑞强. 滋阴清热方治疗对 SLE PBMC 基因表达的影响 [J]. 中国皮肤性病学杂志,2009,23(11):753-759.

[12] 范瑞强,赖梅生,程喜平. 阴虚内热证 SLE 患者 PBMC 蛋白表达动态研究 [J]. 中国中西医结合皮肤性病学杂志,2008,7(3):133-136.

[13] Cheng RYS, Birely LA, Lum NL. Expressions of hepatic genes, especially IGF-binding protein-1, correlating with serum corticosterone in microarray analysis [J]. J Mol Endocrinol, 2004,32(1):257-278.

[14] Wang JC, Derynck MK, Nonaka DF. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) scanning identifies primary glucocorticoid receptor target genes [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004,101(44):15603-15608.

[15] Mair GR, Braks JA, Garver LS, et al. Regulation of sexual development of Plasmodium by translational repression [J]. Science,2006, 313(5787):667-669.

[收稿日期] 2010-09-03 [修回日期] 2010-12-03