

肺癌阴虚证炎性细胞因子基因表达谱的研究³

广州医学院临床肿瘤研究中心 广州市肿瘤医院 (510095)

刘晓燕 申维玺 刘玉梅 孙 燕¹ 陈萍萍² 王淑玲²

现代医学关于中医“证”的本质,长期以来未被完全阐明,申维玺等^[1-6]运用分子生物学的理论和方法进行研究,在国内外首先提出了:阴虚证的本质是细胞因子,其发病学机制是由于IL-1、TNF等细胞因子的生物学活性相对升高、引起细胞因子网络紊乱的结果。由于细胞因子网络的紊乱,引起机体内发生一系列复杂的病理生理学变化,从而出现阴虚证的临床表现。为证实这一理论研究结论,本文选择我院于2005年1月~2005年7月住院的肺癌阴虚证患者,以外周血单个核细胞为材料进行了肺癌阴虚证炎性细胞因子基因表达谱的研究,现将结果报告如下。

材料和方法

11 病例分组及诊断标准:肺癌阴虚证组:选用病理诊断为肺癌,且具有典型阴虚证候的病人;肺癌非阴虚组:选用病理诊断为肺癌,不伴有阴虚及其他见证的病人。肺癌的诊断以术后病理组织学诊断为准;中医虚证辨证标准按照中西医结合虚证和老年病专业委员会的标准,主证:①五心烦热;②咽燥口干;③舌红或少苔、无苔;④脉细数。次证:①午后升火;②便秘而尿短赤;③盗汗。具备主证三项,次证一项即为阴虚证。

21 外周血白细胞总RNA的提取:下午于病房采肺癌阴虚证患者的外周血约10ml,用淋巴细胞分离液从中分离外周血中的白细胞,Trizol一步法提取白细胞中的总RNA,通过异丙醇沉淀法浓缩RNA,并进一步采用RNeasy mini spin col2 umn试剂盒对总RNA进行过柱纯化,最后用分光光度计定量,甲醛变性胶电泳质检。

31 芯片制备:由北京博奥生物芯片有限责任公司提供包含495个与炎症有关的基因,将这些基因用Genomic Instrumentation Services公司芯片点样仪点制在一张75×25mm、经过化学修饰的载玻片上。

41 样品RNA进行荧光标记:①双链cDNA合成:取5μg total RNA,以T₇-Oligo (dT)₁₅, (5'-AAACGACGCCAGTGAATTGTAATAC-GACTCACTATAGGCGCTTTTTTTTTTTTTTTTIV-3, V可以是G、C和A,上海博亚生物技术有限公司)为引物,用cDNA Synthesis Kit (TaKaRa, Dalian, China)合成双

链cDNA;双链合成以后用QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)纯化;②体外转录合成cRNA:用T₇ RiboMAX Express Large Scale RNA Production System (Promega)将双链cDNA进行体外转录合成cRNA;然后用RNeasy Mini Kit (Qiagen)纯化;③随机引物反转录:取2μg cRNA,用Superscript II反转录酶,200 u/μl (Invitrogen),9 Random Primer进行反转录,反转录产物用QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)纯化;④cDNA用KLENOW酶标记:取1μg cRNA反转录产物,以9 Random Primer为引物进行KLENOW标记,标记产物用QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen)纯化,纯化后抽干。Cy5-dCTP、Cy3-dCTP (Amersham Pharmacia Biotech, Inc, Piscataway, NJ, USA); dNTP, 10mM each; Random Primer DNA Labeling Kit (TaKaRa, Dalian, China); Random Primer, 9mer。

标记的DNA溶于30ml杂交液中(3×SSC, 0.12% SDS, 5×Denhart's, 25%甲酰胺),于42℃杂交过夜。杂交结束后,先在42℃左右含0.12% SDS, 2×SSC的液体中洗5min,而后在0.12×SSC中室温洗5min。玻片电干后即可用于扫描。芯片用LuxScan 10K/A双通道激光扫描仪进行扫描。

51 芯片图像的采集与数据分析:采用GenePix Pro 410图像分析软件对芯片图像进行分析,把图像信号转化为数字信号;然后对芯片上的数据用Lowess方法进行归一化;最后以差异为两倍的标准来确定差异表达基因。

结 果

11 总RNA提取结果:RNA样品电泳条带清晰,28S比18S的亮度接近2:1,样品质量符合实验要求。

21 生物信息学分析结果:筛选出肺癌无阴虚与肺癌阴虚证组间表达差异相差两倍以上基因有120条,肺癌阴虚证较肺癌非阴虚证表达上调的炎性细胞因子基因有86条,肺癌阴虚证较肺癌非阴虚证表达下调的炎性细胞因子基因有34条。本实验筛选出来基因隔(以Genbank号表示)初步归类为:(1)表达增加的基因:白细胞介素(interleukin, ILs)类,IL-1、IL-8及其受体、IL-6、IL-7、IL-25等;肿瘤坏死因子(Tumor necrosis factor)超家族, TNFα、TNFβ等;干扰素(Interferon)家族, IFN-γ等;其他类:如趋化因子(MCP)、成纤维细胞生长因子(FGF)超家族成员及细胞因子上下游信号传导过程中相关的酶、激酶、转录因子等的基因表达谱等等。(2)表达降低的基因:白细胞介素类, IL-1Ra、IL-2、IL-11受体、IL-24;肿瘤坏死因子超家族成员, Fas配体, TNF受体相关因子;其他基因:转化生长因子β受体III,趋化因子受体,淋巴细胞毒素, CD3E抗

3 国家自然科学基金资助,科技部重大基础研究前期专项计划资助

11 中国协和医科大学、中国医学科学院肿瘤医院; 21 郑州大学医学院

原,骨形态蛋白6等等。

讨 论

实现中医药的现代化和国际化是我国政府的一贯要求,半个世纪以来,国家投入了巨大的财力进行研究,但至今未能取得根本性突破。国内外西医学界至今仍然不能理解中医证药理论的科学内涵,阻碍了国家中医药现代化事业的前进步伐。因此,用现代医学理论和技术研究和阐明中医证的本质,以早日实现中医证理论的现代化是国家的重大战略性需求。本研究以继承和发展中医基础理论为主旨,以中西医结合基础的创新性研究为主题,在继承原有中医阴虚证理论的基础上,以肺癌阴虚证为突破口,采用现代医学理论和技术研究和阐明阴虚证的本质和发病学机制,为中医其他证型本质的研究提供可以借鉴的模式,对于早日实现中医证理论的现代化具有重要意义。

本研究利用含495个与炎症有关基因的基因芯片,对肺癌阴虚证患者外周血白细胞炎性细胞因子的基因表达谱进行研究,发现肺癌阴虚证病人中 $TNF\alpha$ 、 $TNF\beta$ 等的表达较对照组均升高, $IL-1$ 、 $IL-8$ 及其相应受体、 $TNF\alpha$ 、 $TNF\beta$ 等的表达较对照组均升高,而 $IL-1Ra$ 、 $IL-2$ 等的表达较对照组降低,这说明在肺癌阴虚证的发生发展过程中 $IL-1$ 、 $TNF\alpha$ 、 $IL-8$ 等致炎因子和 $IL-1Ra$ 、 $IL-6$ 等抑炎因子可能起着更重要的作用。

综上所述,机体内的 $IL-1$ 、 TNF 等和 $IL-1Ra$ 、 $IL-6$ 等相互影响、相互作用形成了免疫调节网络。肺癌阴虚时,

$IL-1$ 、 TNF 等细胞因子基因表达增强,其生物学活性相对或绝对升高,而 $IL-6$ 、 $IL-1Ra$ 、血中可溶性细胞因子受体等不能有效地予以拮抗时,就会出现 $IL-1$ 、 TNF 等细胞因子活性升高的病理改变和临床症状;同时,由于整个免疫网络失衡,导致阴虚症候的出现。

这一实验研究结果与申维玺等提出的阴虚证本质的理论研究结论相符合^[1~3]:阴虚证的本质是由于细胞因子调控网络的本质性功能紊乱,引起机体各个系统、器官、组织和细胞都发生一系列的继发性变化,从而出现阴虚的各种病理生理改变和临床表现等理论研究结果基本相符。初步验证了阴虚证的本质是细胞因子网络紊乱的理论研究结果。

参 考 文 献

- 1 申维玺 1再论中医证的本质是细胞因子 1 中医杂志, 2002, 43 (12): 888 - 8911
- 2 申维玺, 孙燕, 刘晓燕等 1用现代医学理论阐明阴虚证本质和发展学机理 1 医学与哲学, 2005, 11 (26): 67 - 691
- 3 申维玺, 孙燕, 张叔人 1白细胞介素 1 等细胞因子与肺阴虚证本质的相关性研究 1 中医杂志, 2000, 41 (7): 423 - 4251
- 4 申维玺, 孙燕, 张叔人 1 $IL-1\alpha$ 、 $IL-1\beta$ 基因 mRNA 表达与肺阴虚证的研究 1 医学研究通讯, 2000, 29 (8): 5 - 71
- 5 申维玺, 孙燕, 张叔人 1 $IL-8$ 、 $IL-10$ 与阴虚证关系的研究 1 医学研究通讯, 2003, 32 (5): 62 - 641
- 6 申维玺, 孙燕 1细胞因子网络紊乱是疾病的基本发病学机理 1 医学研究通讯, 2000, 29 (7): 1 - 41

(收稿: 2005 - 10 - 20)

玉丹荣心丸治疗儿童病毒性心肌炎疗效观察

大连市友谊医院儿科 (116001) 杨霏霏

小儿病毒性心肌炎是临床上心肌炎中最常见的一种。所谓病毒性心肌炎,即病毒侵犯心肌,造成心肌细胞变性、坏死和间质炎症。当机体抵抗力下降时(如细菌感染、营养不良、精神创伤、不合理的运动等),病毒急剧繁殖,大肆进攻,直接损害心肌,造成心肌病变。尤其是重型即暴发型心肌炎,常以其他系统症状其病,容易造成漏诊和误诊,且病情进展快,病死率高,引起关注。

引起心肌炎的病毒甚多,特别是柯萨奇病毒B组引起的心肌炎最多见^[1]。典型的病儿在心肌炎出现前数日或1~3周,有呼吸道及胃肠道症状,如发热、咳嗽、咽喉疼痛、恶心、呕吐、腹胀、腹痛、腹浮等,常伴肌痛、关节痛或皮疹,随之而来的可有心肌炎表现:年长儿自诉头晕、心悸、心慌、胸闷、心前区不适或疼痛;一般病儿仅表现为乏力、苍白、多汗、神萎、食欲不振。严重者除上述表现外,还出现呼吸困难以及心脏衰竭表现。有时骤然发病,出现胸痛、面色灰白、冷汗、四肢厥冷、皮肤花斑、脉细而不规则、血

压下降等心源性休克的危险症状。

我院儿科2002年6月~2004年1月共收治病毒性心肌炎患儿54例,其中配合玉丹荣心丸治疗28例,获得较好疗效,现总结如下。

资料与方法

11一般资料:选择2002年6月~2004年1月于我院诊治并坚持随访的病毒性心肌炎(VMC)患儿54例,男29例,女25例。均符合1999年在昆明召开的全国儿科心血管学术会议上制订的诊断标准^[2]。按单纯随机抽样法分成观察组和对照组,其中观察组28例,男15例,女13例,2~6岁9例,7~15岁19例。对照组26例,男14例,女12例,2~6岁8例,7~15岁18例。两组患儿病程及病情分布经统计学处理差异无显著性(均 $P>0.05$)。所有患儿近1个月内未应用免疫抑制剂和抗氧化剂药物。

21方法:观察组和对照组的治疗均采用抗病毒、抗生素预防和控制感染、维生素C、能量合剂、116二磷酸果糖