

痰湿体质的分子生物学特征

王琦¹, 董静², 吴宏东¹, 王东坡¹, 姚实林³, 任小娟¹

(1. 北京中医药大学, 北京 100029; 2. 中国人民解放军空军总医院, 北京 100036; 3. 安徽中医学, 合肥 230038)

[摘要] 文章以探索痰湿质的分子机制为目的, 在临床流行病学调查的基础上, 分别选择 6 例典型痰湿质和 6 例典型平和质受试对象, 采用 Affymetrix GeneChip Mapping 500K Array 检测技术检测基因组 DNA, 结合前期基因表达谱芯片分析痰湿质的差异表达基因结果, 筛选痰湿质相关基因及单核苷酸多态性位点。试验对痰湿质与平和质组间表达有显著差异的 442 个基因进行分析, 与平和质比较, 初步筛选出痰湿质 5 个相关基因共 6 个 SNP 位点。同时进一步对相关基因功能分析显示, 痰湿体质相关基因主要基因功能为酶活性、固醇运载体活性等功能, 参与糖异生途径、脂肪酸生物合成途径、胆固醇代谢过程、脂肪酸氧化作用、棕色脂肪细胞分化、细胞葡萄糖调节平衡作用、体温调节作用等生物学过程, 痰湿质者在分子水平上具有代谢紊乱的总体特征, 对其分子生物学特征进行了初步探索。

[关键词] 痰湿体质; SNP 基因分型芯片; 分子生物学特征

[中图分类号] R255.8; Q789 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1009-1742(2008)07-0004-04

中医体质学认为, 痰湿体质是由于津液运化失司而导致痰湿凝聚, 以粘滞重浊为主的体质状态^[1], 形体特征是形体肥胖, 腹部肥满松软, 常见表现有面部皮肤油脂较多、胸闷、痰多、喜食肥甘、舌苔白腻、脉滑等^[2]。单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 是指在基因组序列中由于单个碱基的变异、替换、翻转、删除或插入而导致的多态性。人类个体基因组之间的差异主要由 SNP 造成。由于 SNP 分布广泛, 在进化上比其他 Marker 更具遗传稳定性, 是某些遗传性疾病的分子生物学根源, 所以 SNP 研究逐渐成为生物学、遗传学等诸多领域如复杂性疾病病因研究、药物敏感性研究甚至人类进化史研究的主要工具^[3]。阐明其意义将有助于了解人类基因的功能, 对人类遗传性疾病的病因诊断、治疗和防治必将产生重大影响。近期研究显示 SNP 基因分型芯片结合基因表达谱芯片研究疾病/复杂性状的相关基因是临床研究的新方法, 两种技术方法相互印证, 有助于研究结果的确认。课题组前期应用 Affymetrix Gene Chip Human Genome U133+2.0 芯

片, 分析痰湿质与平和质外周血白细胞基因表达谱芯片检测结果, 显示痰湿体质与平和体质比较, 有显著差异表达基因共 442 个^[4]。研究在前期工作的基础上, 采用 Affymetrix GeneChip Mapping 500K Array 芯片检测技术针对痰湿质与平和质 442 个差异表达基因进行 SNP 分型比较研究, 旨在初步探索痰湿质的分子生物学特征。

1 受试人群筛选与样本获取

1.1 受试人群纳入标准和排除标准

1.1.1 纳入标准

1) 对象来源: 汉族, 20~45 岁的中国公民, 男女不限;

2) 符合《中医体质分类判定标准》中痰湿质与平和质判定标准。

1.1.2 排除标准

不符合痰湿质及平和质标准者; 兼夹其他体质类型者; 符合明显痰湿证者; 有器质性病变、传染病、发热者; 精神疾患者。

[收稿日期] 2008-05-23

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(“九七三”计划)基于因人制宜思想的中医体质理论基础研究(2005CB523501)

[作者简介] 王琦(1943-), 男, 江苏高邮市人, 硕士, 教授, 博士生导师, 国家重点学科中医基础理论学科带头人

1.2 受试人群筛选结果

在填写《9种中医体质调查问卷》的基础上,按照《中医体质分类判定标准》中平和质及痰湿质的判定标准,共筛选出12例研究对象。其中痰湿质6例,男性3例,女性3例;平和质6例,男性3例,女性3例。两组中位年龄均为29岁。6例痰湿质的标准分均高于60分,6例平和质的标准分均高于70分。受试人员的既往史、家族史、过敏史均无特殊发现,血压均在正常范围。

1.3 样本采集

告知受试者实验目的、意义及相关注意事项,填写知情同意书。嘱采血前1天禁酒和劳累,女性避开月经期,早晨空腹抽取静脉血3 mL,EDTA抗凝,4 h内分离白细胞。分离后的白细胞保存在1 mL Trizol试剂中,零下80℃冰箱中贮存,1周内提取白细胞中的总DNA。

2 实验方法

使用美国Affymetrix公司提供的Affymetrix GeneChip Mapping 500K Array相关的试剂与仪器。实验由博奥生物有限公司和生物芯片北京国家工程研究中心进行。实验步骤包括:

1)人血液样品基因组DNA提取纯化、基因组DNA酶切、连接、PCR扩增、纯化定量、片段化、标记、杂交、芯片清洗扫描。

2)采用Affymetrix公司提供的GCOS v1.3得到各芯片分析结果,对芯片进行质量控制处理;采用Affymetrix公司提供的GTYPE 4.0软件进行基因型判断,并输出报告文件。

3)在前期痰湿质基因表达谱研究的基础上,针对痰湿质与平和质442个差异表达基因,根据美国国立生物技术信息中心(national center for biotechnology, NCBI)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中SNP数据库不同种族SNP分型特点进行SNP分型比较研究,初步筛选痰湿质相关基因及其SNP位点。

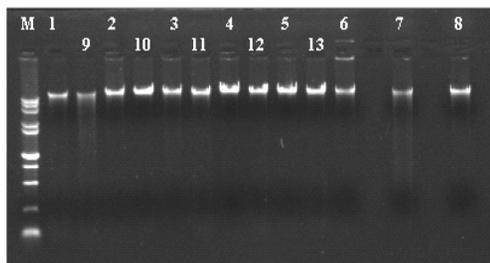
4)根据NCBI提供的数据,运用GO数据库和SNP数据库对初步筛选的痰湿质相关基因、SNP位点进行生理功能过程阐述。

3 实验结果

3.1 实验样品质量控制

实验中样品分为2组共12个样品,每张SNP芯片的Call Rate值均大于等于93.0%;同一批实验芯

片的阳性探针信号强度的线型一致;50个Shared SNP位点分型结果中,同一样品的两张芯片之间一致率大于99%;性别判断正确。各项质量控制指标符合要求,实验成功,见图1。



12个DNA样品质量符合检测要求。

图1 总DNA质量检测电泳图

Fig.1 Total DNA electrophoresis of quality testing

3.2 痰湿质相关基因及其SNP位点初步筛选

针对痰湿质与平和质442个差异表达基因进行SNP分型比较分析,根据NCBI中SNP数据库不同种族SNP分型特点及组间比较结果(与平和质比较痰湿质特有的SNP分型,并且出现该SNP分型频率大于等于50%)初步筛选出痰湿体质5个相关基因及其6个SNP位点,结果见表1。

表1 痰湿体质相关基因及其SNP位点

Table 1 Phlegm-dampness constitution-related genes and SNP sites

基因名称	基因ID	SNP ID(AFFY)	SNP ID(NCBI)
PRKCDBP	112 464	SNP_A-4274574	rs4237775
FADS3	3 995	SNP_A-1786271	rs174455
PLEKHA3	65 977	SNP_A-1893338	rs2303536
PLEKHA3	65 977	SNP_A-2090680	rs9967820
ABCA1	19	SNP_A-1871594	rs4149268
PPARGC1A	10 891	SNP_A-4276718	rs16873516

3.3 痰湿质相关基因与SNP位点的生理功能过程

根据NCBI提供的数据,运用GO数据库和SNP数据库对初步筛选的SNP位点相关基因进行基因功能分类研究显示:

1)痰湿质相关基因SNP位点主要位于内含子,部分SNP位于3'端和外显子,具有调控基因mRNA转录功能,影响基因表达,与基因表达谱研究结果一致。

2)相关基因的GO功能分类显示,涉及的主要基因功能为酶活性、固醇运载体活性等功能,参与糖异生途径、脂肪酸生物合成途径、胆固醇代谢过程、脂肪酸氧化作用、棕色脂肪细胞分化、细胞葡萄糖调节平衡作用、体温调节作用等生物学过程。其中

rs4237775 位于 PRKCDBP (protein kinase C, delta binding protein) 3' near gene。在痰湿质组中 83.3 % 为 BB 型 (T/T), 而平和质组为 0。rs4149268 位于

ABCA1(ATP binding cassette transporter A1) intron。在痰湿组中 67.7 % 为 AB(C/T)型, 而平和质组为 0, 详细内容见表 2。

表 2 痰湿体质相关基因、SNP 位点的生理功能

Table 2 Physiological functions of phelgm-dampness constitution-related genes and SNP sites

SNP ID	功能位置	基因名称	Function	Process
rs4237775	3' near gene	PRKCDBP	磷酸激酶	—
rs174455	intron	FADS3	氧化还原酶活性	脂肪酸生物合成途径 脂类代谢过程
rs2303536	exon-4	PLEKHA3	磷脂酰肌醇结合 磷脂结合	—
rs9967820	intron	PLEKHA3	磷脂结合	—
rs4149268	intron	ABCA1	三磷酸腺苷酶活性 固醇载体活性	胆固醇代谢过程 脂类代谢过程 类固醇代谢过程
rs16873516		PPARGC1A	RNA 聚合酶 II 转录调节 活性 细胞核受体转录辅活化子 活性	棕色脂肪细胞分化 细胞葡萄糖调节平衡作用 脂肪酸氧化作用 糖异生作用 体温调节作用

4 讨论

4.1 SNP 基因分型芯片结合表达谱芯片

近年来, SNP 基因分型芯片与表达谱芯片结合发现疾病相关基因已经逐渐成为值得借鉴的临床研究新思路。Garraway 等利用 Affymetrix 100K SNP 芯片, 扫描 58 个 NCI60 细胞系, 在恶性黑色素瘤细胞系中发现 3 号染色体 3p13-3p14 区域(约 3.5 m)扩增^[5]。结合 Affymetrix 表达谱芯片技术, 发现这段染色体内的转录因子 MTF 基因表达异常高。进一步的功能试验确认 MTF 基因 DNA 拷贝数增加和 mRNA 表达量增加与黑色素瘤有关; 其研究进展对于中医证候、体质及中药的功能主治研究均值得借鉴。

4.2 痰湿体质在分子水平上具有代谢紊乱的总体特征

研究采用 SNP 基因分型芯片结合表达谱芯片的方法初步筛选出痰湿体质 5 个相关基因共 6 个 SNP 位点, 5 个相关基因分别为 PRKCDBP, FADS3, PLEKHA3, ABCA1, PPARGC1A, 6 个 SNP 位点分别为 rs4237775, rs174455, rs2303536, rs9967820, rs4149268, rs16873516。进一步对相关基因功能分析显示: 痰湿体质相关基因涉及的主要基因功能为酶活性、固醇载体活性等功能, 参与糖异生途径、脂肪酸生物合成途径、胆固醇代谢过程、脂肪酸氧化作用、棕色脂肪细胞分化、细胞葡萄糖调节平衡作用、体温调节作

用等生物学过程。研究结果表明痰湿体质者具有代谢紊乱的总体特征。

4.2.1 糖代谢相关的基因

糖代谢相关的基因主要为 PPARGC1A。PPARGC1A 又称为 PGC-1, 为过氧化物酶体增殖物活化受体 γ 协同刺激因子-1, 可增加肌肉葡萄糖转运子-4 的表达从而增强葡萄糖的转运, 使负荷后血糖快速下降; 激活肝脏糖异生的关键酶导致肝糖输出增加, 维持空腹血糖稳定, 可加速肝脏糖异生进程, 诱发肝内 IR, 同时又可通过影响胰岛 β 细胞葡萄糖刺激的胰岛素分泌引起胰岛 β 细胞 IR。PPARGC1A 表达增加可减少骨骼肌脂肪比重, 增加有氧肌肉类型和胰岛素敏感性, 从而减轻骨骼肌 IR。PPARGC1A 与糖尿病的发生、发展密切相关, 故通过调节其生理功能来治疗糖尿病已成为研究热点。

4.2.2 脂代谢相关的基因

脂代谢相关的基因主要为 ABCA1, FADS3, PPARGC1A。ABCA1 是 ATP 结合盒转运子家族中的一员, 它在胆固醇逆转运过程中起着关键性作用。ABCA1 的基因突变可导致 Tangier 病和家族性低 A 脂蛋白血症^[6], 表现为低高密度脂蛋白胆固醇血症和早发冠心病。流行病学研究证实, 高密度脂蛋白胆固醇具有抗动脉粥样硬化作用, 可抑制动脉粥样硬化的发生发展, 血清高密度脂蛋白胆固醇水平与冠心病呈显著负相关, 这主要归因于 HDL-C 在胆

固醇代谢尤其是胆固醇逆转运中所发挥的重要作用。FADS3 是脂肪酸去饱和酶(fatty acid desaturase, FAD)家族一员,具有氧化还原酶活性,参与脂肪酸生物合成途径、脂肪酸去饱和和脂类代谢过程。PPARGC1A 是一种转录辅助激活因子,可受多种因素调节,有多种核激素受体的结合位点,除能调节适应性产热外和糖代谢外,与脂肪酸的氧化有密切关系。能增加脂肪酸氧化酶的转录活性使脂肪酸 β 氧化速率增加,其水平的改变与肥胖及脂代谢紊乱密切相关。

文章研究结果还将继续扩大样本进行分子流行病学调查以进行确认。

4.2.3 探索中医体质类型分子生物学特征的意义

探索中医体质类型分子生物学特征在体质分类研究、预防学研究等方面均具有重要的意义。

1)分类研究。在基因水平获取中医体质类型相关的分子标志物,将使中医体质分类更加客观化,也使包括中医证候、体质在内的复杂性状、复杂疾病的特征基因定位成为可能^[7]。

2)预防学研究。体质是个体在遗传的基础上,在内外环境的影响下,在生长发育的过程中形成的。不同体质类型是一个多性状复合体,对各种病邪有不同的反应性和易感性,即体质的差异性影响着个体对疾病的易感性,关系到人体是否发病、发病倾向和既病之后疾病的发展、变化、转归。目前医学界普遍认为绝大多数疾病的发生与环境因素和遗传因素

的综合作用有关,即在个体具有遗传易感性的基础上,环境有害因素作用而导致疾病。易感基因的特点是基因的变异本身并不直接导致疾病的发生,而只造成机体患病的潜在危险性增加,一旦外界有害因素介入,即可导致疾病发生。通过探索影响不同体质类型形成的相关基因,分析其易感程度,明确遗传和环境因素在体质形成中的作用和意义。根据不同体质的特点,运用相应的调体原则和方法,通过纠正偏颇体质进行相关疾病的预防,从而贯彻中医学“治未病”的疾病预防观^[7]。

参考文献

- [1] 王琦. 9种基本中医体质类型的分类及其诊断表述依据[J]. 北京中医药大学学报, 2005, 28(4): 1-5
- [2] 王琦. 中医体质学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005
- [3] Landegren U, Nilsson M, Kwok P Y. Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis [J]. Genome. Res, 1998, 8: 769-776
- [4] 王东坡. 痰湿体质及其基因表达特征研究[D]. 北京中医药大学学报, 2006, 72-91
- [5] Garraway L A, Widlund H R, Rubin M A, et al. Integrative genomic analyses identify MITF as a lineage survival oncogene amplified in malignant melanoma [J]. Nature, 2005, 436(7047): 117-122
- [6] Guo Zhigong, Inazu A, Yu Wenxin, et al. Double deletions and missense mutations in the first nucleotide binding fold of the ATP binding cassette transporter A1 (ABCA1) gene in Japanese patients with Tangier disease [J]. J Hum Genet, 2002, 47(6): 325
- [7] 董静. 痰湿体质基础研究及其与代谢综合征相关性的探索[D]. 北京中医药大学学报, 2007, 63-64

Study on the molecular characteristic in phlegm-dampness constitution

Wang Qi¹, Dong Jing², Wu Hongdong¹, Wang Dongpo¹,
Yao Shilin³, Ren Xiaojuan¹

(1. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China; 2. The Air Force General Hospital of PLA, Beijing 100036, China; 3. Anhui College of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230038, China)

[Abstract] To investigate the molecular mechanism for phlegm-dampness constitution, examining the genome DNA of peripheral blood cells of six phlegm-dampness constitution and six normal constitution by using Affymetrix GeneChip Mapping 500K Array. We had identified 442 genes with significant differences between the phlegm-dampness constitution and the normal constitution by using Affymetrix Gene Chip Human Genome U133 plus-2, base on research results of prophase, sieve the related gene and characteristics of single nucleotide polymorphisms (SNP) of phlegm-dampness

(下转 111 页)