

肾阳虚证骨关节炎温针疗效的差异基因表达谱研究*

谭从娥¹, 王米渠^{2△}, 陆明²

(1. 陕西中医学院, 陕西咸阳 712046; 2. 成都中医药大学, 四川成都 610075)

【摘要】目的: 探讨温针治疗肾阳虚证骨关节炎的分子机制, 为其疗效提供科学依据。方法: 根据肾阳虚证评定量表, 选取典型肾阳虚证患者10名给予温针治疗两周, 然后以其中疗效最好的4例治疗前后作基因芯片杂交测试, 采用SAM基因芯片数据分析软件, 筛选显著表达基因作进一步的基因功能分析。结果: 4例患者皆为典型肾阳虚证, 经温针治疗后效果明显。通过SAM软件筛选到32个显著表达基因, 基因功能注释结果提示炎症反应、信号转导类基因显著表达; 分子通路主要集中于免疫及信号转导通路。讨论: 温针治疗肾阳虚证膝骨关节炎的疗效的分子机制是多方面的, 涉及到炎症反应、免疫功能、信号系统等多方面的修复作用。

【关键词】肾阳虚证; 骨关节炎; 温针; 差异基因表达谱

中图分类号: R241 文献标志码: A 文章编号: 1000-2723(2011)04-0004-03

肾阳, 又称命门之火, 为人体阳气之根本, 肾阳虚的程度与疾病的发生发展有着密切的联系, 加之久病及肾, 故肾阳虚证在临床上极为常见。肾主骨生髓, 中医肾的概念与骨关节炎发病理论上有着密切的关系。因此, 本文借助中西医病证结合的方法, 选取中医证为典型的肾阳虚证, 西医诊断为单纯膝骨关节炎的患者作为研究对象给予温针治疗。选择其中疗效最佳的病例, 治疗前后对照作基因芯片, 对治疗前后的差异表达基因进行基因功能注释, 为温针分子疗效评定奠定基础。

1 资料与方法

1.1 研究对象

在中国四川省彭州市大保乡山区作肾阳虚证调查过程中, 根据自编的40项肾阳虚辨证因子量表^[1,2]为评分细则进行评分, 选取年龄为40岁以上, 男女比例相近的典型肾阳虚证患者10名, 符合1991年美国风湿病学会推荐的膝骨关节炎诊断标准^[3], 给予温针治疗, 然后以其中疗效最好的4例于温针治疗前后采血对照作基因芯片。

1.2 温针治疗方案

对上述10例肾阳虚证患者取关元、气海、足

三里(双)、膝眼(双)、阳陵泉(双)。选用华佗牌针具针刺穴位, 行针得气后留针, 将华佗牌艾条切成2cm 1个, 置于针柄上行温针灸, 每次2壮约40min。每日1次, 共治疗14次。

1.3 芯片实验

4例患者分别于治疗前、后采血10mL, 分离获得白细胞, 用TRIzol一步法提取细胞中的总RNA, 通过异丙醇沉淀法浓缩RNA, 使用10μg治疗前后的实验样品的RNA反转录为cDNA。采用北京博奥生物芯片有限公司制备的cDNA人类全基因组表达谱芯片, 将治疗前后的样品分别用cy3和cy5标记, 标记后的样品同时与芯片上的21 329克隆点进行杂交, 芯片用ScanArray急速的双通道激光扫描仪进行扫描。再采用GenePix 4.0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ratio值为治疗后/治疗前。差异基因筛选标准采用倍数分析的方法, 即以ratio > 或 = 2为上调基因, ratio < 或 = 0.5为下调基因。

1.4 基因芯片数据分析

采用SAM (Significant Analysis of Microarray)

• 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (NO: 81072731)

收稿日期: 2011-07-13

作者简介: 谭从娥 (1972~), 女, 陕西柞水人, 讲师, 博士。研究方向: 证的分子调控机制研究。△通讯作者: 王米渠, E-mail: miqiwang@163.com。

芯片数据分析软件分析家系差异表达基因。SAM是由Stanford大学开发的一个微阵列显著性分析软件,目前已广泛被学术界所采用。SAM采用基因特异性 t 检验,通过控制假阳性率(False Discovery Rate, FDR)来筛选统计显著性基因^[4,5]。对于大多数的基因芯片分析,通常要求FDR很小,这样才能保证较少的假阳性基因通过检验。但是如果FDR取值为0,则可能会有较多的假阴性错误,所以本文中FDR取一定Delta值控制下的非0最小值。对筛选到的差异表达基因进一步进行Gene Ontology (GO)和KEGG功能注释。

2 结果

2.1 肾阳虚证候与温针疗效的评分结果

由表1可见4例患者主症定性分皆为4分,肾阳虚证总积分分别为70,57,71,51分,根据上述肾阳虚证诊断标准,均为典型肾阳虚证,两例为重度肾阳虚证。治疗后主症定性分别为2,2,3,2项,肾阳虚证总积分分别降为12,17,18,12分,属于肾阳虚证体质。

表1 治疗前后肾阳虚证量表积分

编号	治疗前				治疗后			
年龄	58	65	62	57	58	65	62	57
性别	女	女	男	女	女	女	男	女
肾阳虚证候定性分	22	19	22	15	6	9	8	6
肾阳虚证候定量分	48	38	49	36	6	9	9	6
肾阳虚证候总积分	70	57	71	51	12	18	17	12
肾阳虚主症定性分	4	4	4	4	2	2	3	2
肾阳虚主症定量分	13	11	10	12	2	2	3	2

2.2 基因芯片检测结果

2.2.1 显著表达基因筛选

4例患者温针治疗前后样品杂交,基因芯片数据得到4组基因表达数据。将4组基因表达信号值输入SAM分析软件,取FDR为非0最小值时的基因数目为入选基因,当Delta=0.70,FDR=0.15时共筛选到特征表达基因32个,其中上调基因4个,下调基因28个。SAM输出散点图见图1,红色原点表示表达上调基因,绿色原点表示表达下调基因。

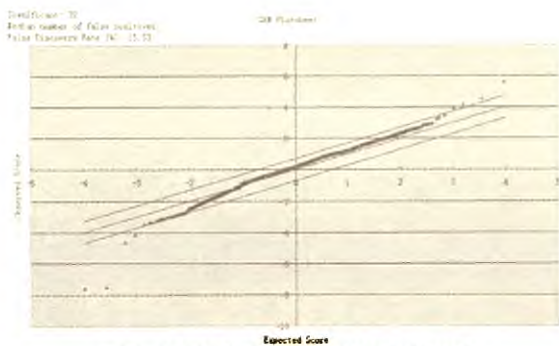


图1 32个显著表达基因分布散点图

2.2.2 显著表达基因GO功能注释

将筛选到的4例患者治疗前后显著表达的32个基因通过GO数据库进行生物学过程(Biological Process)分类,以 P 值小于0.005为显著性标准,结果32个基因在生物学过程层次上有8个具有显著性的GO类,其生物学过程主要涉及到炎症反应、信号转导、细胞分化等,其中HEX(Hematopoietically expressed homeobox)基因参与了多个生物学过程。32个显著基因及其所涉及的GO类见表2。

表2 32个显著基因GO功能注释结果(P-value<0.005)

GO Term	Biological Process	Count	P-Value	Gene name
GO: 0001889	inflammatory response (炎症反应)	2	2.42E-06	RELA; IL8
GO: 0007420	signal transduction (信号转导)	3	1.18E-04	PDE2A; ARHGAP6; CNTNAP2
GO: 0030154	cell differentiation (细胞分化)	3	1.75E-04	HEX; WHSC1L1; BEX1
GO: 0006954	regulation of transcription, DNA-dependent (DNA依赖的转录调节)	2	3.16E-04	HEX; WHSC1L1; ZNF141
GO: 0006355	liver development (肝发育)	3	9.30E-04	HEX; RELA
GO: 0007165	brain development (脑发育)	3	0.003172	CA10; PHGD
GO: 0006508	Proteolysis (蛋白质水解)	2	0.003321	CPB2; PRSS16
GO: 0009653	Morphogenesis (形态发生)	2	0.003567	ZNF141; CLTCL1

2.2.3 显著基因 KEGG 通路注释

以 P 值小于 0.01 为显著性标准, 筛选到 6 条具有统计学意义的差异表达基因通路, 结果见表 3。

将筛选到的 32 个显著表达基因注入 KEGG 数据库, 结果 32 个基因可注释到 18 条 KEGG 通路。

表 3 32 个显著基因 KEGG 通路注释 (P -value <0.005)

KEGG Pathway	Count	P - Value	Gene name
T cell receptor signaling pathway (T 细胞受体信号通路)	2	6.22E -04	RELA; IL8
Prostate cancer Citrate cycle (TCA cycle) (前列腺癌柠檬酸循环)	2	9.80E -04	PDGFRA; RELA
Toll - like receptor signaling pathway (Toll 受体信号通路)	2	0.001313	RELA; IL8
Focal adhesion (黏着斑)	2	0.005156	PDGFRA; COL5A2
Cytokine - cytokine receptor interaction (细胞因子受体信号通路)	2	0.008279	PDGFRA; IL8
MAPK signaling pathway (MAPK 信号通路)	2	0.009085	PDGFRA; RELA

3 讨论

既往研究^[6]表明肾阳虚证是骨关节炎发生频率最高的中医证型, 肾阳虚证的分子基础主要涉及到免疫和代谢功能异常^[7]。本实验将中医的证与西医的病相结合, 采用传统的温针疗法, 针对肾阳虚证的病因病机及骨关节炎的发病特点, 取主穴关元、气海、足三里, 配穴左右阳陵泉及左右膝眼以起到温补肾阳、激发肾中阳气以温煦全身的作用。临床疗效可见温针疗法对肾阳虚证的症状有明显的改善作用, 4 例患者的肾阳虚证症状积分均显著降低。在临床疗效的基础上, 本文又进一步利用基因芯片技术分析了 4 例患者温针治疗前后的差异基因表达谱。通过 SAM 分析软件得到 4 例患者治疗前后对照的 32 条显著表达基因, 经过 GO 数据库信息挖掘, 发现 32 条基因功能主要集中在炎症反应、信号转导及细胞分化等生物学过程。研究^[8]表明针灸能通过影响多靶点和疾病过程的多个环节来激发机体自身内在的调整能力而达到治疗目的, 本实验结果也提示温针疗效的生物学基础是多方面的, 涉及到炎症反应、免疫功能、信号系统等多方面的基因表达。

另外, 对 32 个差异表达基因涉及的显著 KEGG 通路进行分析, 得到有统计学意义的 KEGG 通路 6 条 ($P < 0.005$)。其中与免疫功能有关的通路有 3 条 (T 细胞受体信号通路、Toll 受体信号通路及细胞因子受体信号通路), 信号转导通路 1 条 (MAPK 信号通路), 其次为粘着斑和前列腺癌柠檬酸循环。通路功能分类最多的是免疫功能相关通路, 说明温针对肾阳虚证骨关节炎的疗效基础之一

是整体调节患者的免疫功能。

总之, 本实验应用基因芯片技术研究温针治疗肾阳虚型骨关节炎患者的基因表达谱, 将中医的脏腑辨证、经络腧穴与现代分子生物学研究有机结合起来, 探索肾阳虚证的分子基础, 并为针灸的临床疗效提供科学佐证。

[参考文献]

[1] 严石林, 张连文, 王米渠, 等. 肾虚证辨证因子等级评判操作标准的研究 [J]. 成都中医药大学学报, 2001, 24 (1): 56 - 39.

[2] 严石林, 高峰, 吴斌, 等. 肾阳虚证半定量操作标准的研究 [J]. 现代中西医结合杂志, 2003, 13 (6): 701 - 702.

[3] 施桂英. 关节炎概要 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2000: 227 - 348.

[4] Tusher V, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to transcriptional responses to ionizing gradiation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2001, 98: 5116 - 21.

[5] Efron B, Tibshirani R. Empirical bayes methods and false discovery rates for microarrays [J]. Genet Epidemiol, 2002, 23 (1): 70 - 86.

[6] 杨锦华, 曹慧英, 冯仲锺, 等. 原发性膝关节骨关节炎中医证候流行病学调查 [J]. 中医正骨, 2005, 17 (7): 19 - 22.

[7] 谭从娥, 李炜弘, 汤朝晖, 等. 肾阳虚证发生与免疫功能类基因的关联性研究 [J]. 江苏中医杂志, 2009, 41 (2): 22 - 24.

[8] 洪净. 中医药防治疾病的优势与学术发展切入点的探讨 [J]. 中医杂志, 2000, 41 (12): 751 - 762.

(编辑: 岳胜难)
(英文摘要见第 10 页)

- 版社, 2004: 16.
- [9] 李经纬, 张志斌. 中医学思想史 [M]. 长沙: 湖南教育出版社, 2006: 78.
- [10] 王睿杜, 文斌, 赵宜军. 关于中医药学百年纷争的断想 [J]. 北京中医药大学学报, 2004, 27 (3): 1-6.
- [11] 潘菽. 心理学简札 (上册) [M]. 北京: 人民教育出版社, 1984: 2.
- [12] 高晨阳. 中国传统思维方式研究 [M]. 济南: 山东大学出版社, 1994, 12: 170.
- (编辑: 李 平)

Mental Substance Research for Chinese Original Thinking “Image”

LU Jie, ZHANG Qi - Cheng

(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[ABSTRACT] The Chinese medical image thinking is one of the Chinese original thoughts which have most outstanding feature and advantage. To explore deeply the “image” mental substance can help to promote Chinese modernization process. As a Chinese traditional medical original thought, based on the overall concept of “Holism of human being and universe” and cognition main body of universe life sight, “image” is a unique and profound thought. Through psychology methodology to elucidate “image”, the results indicate that “image” is one kind of thinking path of the inside source and objective subjectiveness and humanism directed cognition psychology.

[KEY WORDS] The chinese medical image thinking; holism of human being and universe; image; cognition main body; mental substance

(原文见第 4 页)

Differential Gene Expression Profile of Therapeutic Effect of Warm Needling Treatment on Knee Osteoarthritis with Kidney - yang Deficiency

TAN Cong - e¹, WANG Mi - qu², LU Ming²

(1. Department of TCM Diagnostics, Shanxi University of TCM, Xianyang Shanxi 712046, China;

2. Institute of Basic Medicine, Chengdu University of TCM, Chengdu Sichuan 610072, China)

[ABSTRACT] Objectives: To investigate the molecular mechanisms behind warm needling using Cdna microarray technology, thus providing further scientific evidence for its efficacy. Method: Ten patients with knee OA of kidney - yang deficiency were selected for 2 weeks of warm needling treatment. This treatment involved stimulating the selected acupoints using needles with a burning moxa stick on their handle for 40 minutes per session. Accumulated clinical scores of kidney - yang deficiency were assessed pretreatment and posttreatment using a 40 - factor questionnaire of OA with kidney - yang deficiency. Four patients with the best therapeutic efficacy were selected for cDNA microarray testing. The significantly expressed genes were screened through Significance Analysis of Microarray (SAM) for further functionally annotated. Results: 32 significantly expressed genes were screened. GO and PATHWAY annotation results of these genes showed that immune and signal transduction functional genes and pathways significantly expressed. Conclusion: This work demonstrates that the molecular mechanism behind warm needling treatment may be associated with the regulation of immune and signal transduction genes and pathways.

[KEY WORDS] kidney - yang deficiency; osteoarthritis; warm needling; differential gene expression profile

作者: 谭从娥, 王米渠, 陆明, TAN Cong-e, WANG Mi-qu, LU Ming
作者单位: 谭从娥, TAN Cong-e (陕西中医学院, 陕西咸阳, 712046), 王米渠, 陆明, WANG Mi-qu, LU Ming (成都中医药大学, 四川成都, 610075)
刊名: 云南中医学院学报 
英文刊名: Journal of Yunnan University of Traditional Chinese Medicine
年, 卷(期): 2011, 34(4)
被引用次数: 1次

参考文献(8条)

1. 严石林;张连文;王米渠 肾虚证辨证因子等级评判操作标准的研究[期刊论文]-成都中医药大学学报 2001(01)
2. 严石林;高峰;吴斌 肾阳虚证半定量操作标准的研究[期刊论文]-现代中西医结合杂志 2003(06)
3. 施桂英 关节炎概要 2000
4. Tusher V;Tibshirani R;Chu G Significance analysis of microarrays applied to transcriptional responses to ionizing gradiation[外文期刊] 2001(9)
5. Efron B;Tibshirani R Empirical bayes methods and false discovery rates for microarrays[外文期刊] 2002(01)
6. 杨锦华;曹慧英;冯仲锴 原发性膝关节骨关节炎中医证候流行病学调查[期刊论文]-中医正骨 2005(07)
7. 谭从娥;李炜弘;汤朝晖 肾阳虚证发生与免疫功能类基因的关联性研究[期刊论文]-江苏中医 2009(02)
8. 洪净 中医药防治疾病的优势与学术发展切入点的探讨[期刊论文]-中医杂志 2000(12)

引证文献(1条)

1. 韩科. 杨咏红. 樊小农. 王舒. 张俊清. 牟蛟. 张超. 焦洋. 赵帅. 孟智宏 基因芯片技术在针灸领域的应用和研究现状[期刊论文]-针灸临床杂志 2012(7)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_ynzyxyxb201104002.aspx