

· 临床 ·

细胞增殖抑制基因 HSG 与 COPD 中医证型的相关性

赵克蝉¹, 葛正行^{2*}, 李霄¹

(1. 贵阳中医学院, 贵阳 550002; 2. 贵阳中医学院附属第二医院, 贵阳 550002)

[摘要] **目的:**通过检测细胞增殖抑制基因(HSG)在慢性阻塞性肺病(COPD)不同中医证型组中表达的差异,为后续检测中药方剂治疗 COPD 奠定基础,并为 COPD 中医证型的诊断提供有说服力的客观标准。**方法:**选取 110 位 COPD 急性加重期患者及 30 位正常人为研究对象,随机分为痰浊组、痰热组、气虚组及正常组。所有入选者空腹抽取血液,用试剂盒提取血液总 RNA,采用实时荧光定量 PCR(Real-time PCR)检测各组慢性阻塞性肺病急性加重期(AECOPD)患者血清 HSG mRNA 表达;采用免疫印迹法(Western bolt)检测 AECOPD 患者血清 HSG 蛋白表达。**结果:**痰浊组、痰热组、气虚组与正常组比较有显著性差异($P < 0.05$);痰浊、痰热组与气虚组比较有显著性差异($P < 0.05$);痰浊与痰热组比较无显著性差异。**结论:**HSG 在 AECOPD 患者血液中低表达,在正常组血液中高表达;气虚组患者血液中 HSG 表达低于痰浊、痰热组;HSG 的表达水平可能影响了气道重建, HSG 与 COPD 病程发展可能存在着内在的关联,其参与了 COPD 不同中医证候群的形成。

[关键词] 细胞增殖抑制基因; 慢性阻塞性肺病急性加重期; 中医证型; 实时荧光定量 PCR; 免疫印迹法

[中图分类号] R287;R259 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)11-0152-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2016110152

Correlation Between Inhibitory Gene HSG and Traditional Chinese Medicine Syndrome Types of COPD

ZHAO Ke-chan¹, GE Zheng-hang^{2*}, LI Xiao¹

(1. Guiyang College of Traditional Chinese Medicine (TCM), Guiyang 550002, China;
2. Second Hospital Affiliated to Guiyang College of TCM, Guiyang 500002, China)

[Abstract] **Objective:** To provide foundation for further exploring the differences in hypervplasiassuppressorgene (HSG) expressions before and after Chinese medicine prescription treatment for different traditional Chinese medicine (TCM) syndromes of chronic obstructive pulmonary disease (COPD), and provide objective standards for diagnosis of COPD TCM syndromes by detecting the expression of HSG in different TCM syndromes of COPD. **Method:** The 110 patients with acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease (AECOPD) and 30 normal people were randomly selected as the study subjects. They were divided into normal group, Qi deficiency group, phlegm heat group, and phlegm turbidity group. Blood was taken in fasting state in all inductees. The kit method was used to extract total RNA from the blood, mRNA expressions of HSG under different groups of AECOPD patients was detected by Real-time PCR, the protein expression of HSG under different groups of AECOPD patients was detected by Western bolt. **Result:** There was significant difference between normal group and phlegm turbidity group, phlegm heat group, Qi deficiency group. **Conclusion:** The expression levels of HSG were low in AECOPD patients and high in normal group. Expression levels of HSG in

[收稿日期] 20151018(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81473533,81260599);贵州省省长基金项目(黔省专合字[2011]62号);贵州省攻关课题项目(黔科合SY[2010]3106号)

[第一作者] 赵克蝉, 硕士, 住院医师, 从事呼吸系统疾病的临床研究, E-mail:645008475@qq.com

[通讯作者] *葛正行, 主任医师, 教授, 从事呼吸系统疾病的临床与基础研究, E-mail:2562900350@qq.com

blood of Qi deficiency group were lower than those in phlegm turbidity group and phlegm heat group. HSG and COPD development may have an inherent correlation and HSG expression levels may affect airway reconstruction. It may be involved in the formation of different TCM syndromes in COPD.

[Key words] hypervasculogenesis; chronic obstructive pulmonary disease; traditional Chinese medicine syndrome; Real-time PCR; Western blot

2020 年慢性阻塞性肺病 (COPD) 将位居全球人类死亡原因的第 3 位, 位居世界疾病经济负担的第 5 位, 对我国 7 个地区调查显示 40 岁以上人群中 COPD 的患病率高达 8.2%^[1]。2006 年调查结果显示, COPD 总花费占当年我国平均家庭总收入的 40%^[2]。目前研究认为, COPD 患者在病理上的改变主要包括慢性支气管炎、肺气肿、气道重建、肺动脉重建^[3]。气道重建是 COPD 的主要病理特点之一, 其使小气道阻力增加, 肺泡破裂融合, 形成肺气肿。此外气道重建致气道阻力增大, 引起低氧血症, 而慢性缺氧致肺微血管肌化而形成肺动脉高压。可见, 气道重建是 COPD 各种病理变化的导火索, 是 COPD 病理进展的关键。本课题组在临床工作中发现 COPD 不同中医证型所代表的证候群的分布有明显的个体差异, 而中医证候群的出现与气道功能受损程度密切相关, COPD 患者气道功能状态又与气道重建密切相关, 并最终受基因的调控。细胞增殖抑制基因 (HSG) 有抑制细胞增殖作用, 研究发现 HSG 在正常细胞高表达, 在增殖细胞中低表达^[4]。本课题组前期研究发现, HSG 表达与 COPD 气道重建密切相关; 正常大鼠气道成纤维细胞 rHSG 蛋白表达量明显高于 COPD 模型大鼠; 外源性 rHSG 基因转染到 COPD 大鼠气道成纤维细胞, 能够调节成纤维细胞功能, 诱导其凋亡、抑制其增殖; 调节转化生长因子- β_1 (TGF- β_1), 血小板衍生因子 (PDGF) 基因的过度表达, 进而使气道成纤维细胞增殖受到抑制, 表明 rHSG 基因与 TGF- β_1 , PDGF 基因的平衡关系被打破, 是 COPD 气道重建中关键因素; 苗药补气活血组能降低 TGF- β_1 水平, 并且能修复和缓解 COPD 模型的病理改变^[5-10]。COPD 患者多表现为“咳、痰、喘、满、闷”, 属中医学“肺胀”范畴。中医学对于 COPD 的中医证型概括为痰浊壅肺证、痰热郁肺证、痰蒙神窍证、阳虚水泛证、肺肾气虚证^[11]。COPD 患者中痰浊证、痰热证、气虚证较为常见, 而阳虚水泛证、痰蒙神窍证相对较少, 故本课题选择痰浊证、痰热证、气虚证证型, 检测 HSG 基因在 COPD 不同中医证型组中表达的差异, 为进一步检测中药方剂治疗 COPD 不同中医证型奠定基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集贵阳中医学院第二附属医院呼吸内科 2013 年 3 月—2015 年 5 月慢性阻塞性肺病急性加重期 (AECOPD) 男性患者 110 例, 所有病例均符合 2013 年中华医学会呼吸病学分会制定的《慢性阻塞性肺疾病诊治指南 (2013 修订版)》^[1] 诊断标准。正常组男性 30 例。随机分为痰浊组、痰热组、气虚组。痰浊组平均年龄 (73.73 ± 6.091) 岁, 痰热组平均年龄 (72.50 ± 7.404) 岁, 气虚组平均年龄 (72.53 ± 7.512) 岁, 正常组平均年龄 (69.33 ± 7.898) 岁, 病程 13 ~ 15 d; 因少数标本采集失败, 在实时荧光定量 PCR 检测中痰浊、痰热组各脱落 2 例, 免疫印迹检测中痰浊组脱落 2 例, 痰热组脱落 3 例, 气虚组脱落 5 例。各组之间年龄构成比无差异, 具有可比性。

1.2 诊断标准 COPD 诊断标准参照《慢性阻塞性肺疾病诊治指南 (2013 修订版)》^[1] 诊断标准。症状: 慢性和进行性加重的呼吸困难, 咳嗽和咳痰; 体征: 肺气肿相关体征 (早期体征可不明显); 辅助检查: 吸入支气管舒张剂后 1 s 用力呼气容积 (FEV₁) / 用力肺活量 (FVC) < 70% (必备), 影像学提示慢支炎、肺气肿 (早期表现可不典型)。肺胀中医证型诊断标准参照文献 [11], 出现咳、痰、喘、满、闷; 痰浊证痰量多呈白色或灰白色, 咳声重浊, 痰出嗽止, 舌质淡红, 舌苔白厚或白腻, 脉弦或滑; 痰热证痰量较少呈黄色或淡黄色, 黏稠难咯, 伴口干黏、面赤, 舌质红, 舌苔黄厚或黄腻, 脉弦或滑或数; 气虚证以气喘为主证, 呼多吸少, 乏力, 动则尤甚, 舌质淡, 苔薄, 脉弱。

1.3 纳入标准 符合临床诊断标准; 男性; 依从性好, 能配合样品采集及肺功能血气分析的检查; 年龄 55 ~ 90 岁; 获得本单位伦理学委员会批准, 研究对象签署知情同意书。

1.4 排除标准 近 1 周全身使用糖皮质激素的患者; 合并心脑血管、消化、内分泌系统原发疾病的患者; 合并其他原因的呼吸系统疾病如支气管扩张、间质性肺疾病、弥漫性泛细支气管炎、肺结核、肺癌等患者; 合并精神疾病或不能配合检查的患者。

1.5 方法及检测指标 从 110 例患者中随机选取 106 例,痰浊组 39 例,痰热组 32 例,气虚组 35 例,正常对照组 30 例,用于实时荧光定量 PCR (Real-time PCR)检测 HSG mRNA 表达。从 110 例患者中随机选取 100 例,痰浊组 38 例,痰热组 30 例,气虚组 32 例,正常对照组 30 例,用于免疫印迹法 (Western blot)检测 HSG 蛋白表达。所有受测者晨起空腹抽取肘静脉血液约 5 mL 置于抗凝管中,3 000 r·min⁻¹离心 15 min。吸取上层血清,-80 ℃保存备用。

1.5.1 Real-time PCR 检测患者血清 HSG mRNA 表达 主要试剂和仪器,Prime Script™ RTreagent Kit with gDNA Eraser, SYBR Premix EX Taq™, Takara RNAiso Plus Reagent, Easy dilution (for Real-time PCR), DL2000 DNA Marker(日本 Takara 公司,批号分别为 RR047A, RR820A, 9108, 9160, 3427A)。引物序列由日本 Takara 公司合成,HSG(104 bp):上游 5'-CACATGGAGCGTTGTACCAG-3',下游 5'-TTGAGCACCTCCTTAGCAGAC-3;GAPDH(101 bp):上游 5'-CTGGGCTACACTGAGCACC-3',下游 5'-AAGTGGTCGTTGAGGGCAATG-3'。2720 型 PCR 仪,7500 型荧光定量 PCR 仪均购自美国 ABI 公司。

RNA 提取:用 RNAiso Plus Reagent 充分裂解细胞;三氯甲烷分层;取上清液;加入等体积异丙醇沉淀 RNA;乙醇洗涤;室温干燥后溶解沉淀,-80 ℃保存。测定并计算 RNA 浓度。cDNA 合成按照试剂盒说明书,反应条件:42 ℃ 2 min,4 ℃ 保存,37 ℃ 15 min,85 ℃ 5 s,-20 ℃ 保存。绘制标准曲线。PCR 按照试剂盒说明书,反应条件:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,60 ℃ 34 s,40 个循环,95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,95 ℃ 15 s。用 2^{-ΔΔC_t}表示 HSG mRNA 相对表达。

1.5.2 Western blot 检测患者 HSG 蛋白的表达 主要试剂和仪器,HSG 抗体,内参 GAPDH 抗体 (Abcam 公司,批号分别为 ab37168, ab50838)。Xcell Surelock 型蛋白电泳槽(美国 Life technologies 公司),Mini-PROTEAN Tetra C 型转移电泳槽(美国 Bio-Rad 公司),Multiskan MK3 型酶标仪(美国 Thermo Scientific 公司)。

血浆蛋白测定浓度,蛋白样品上样,电泳,转膜,封闭,一抗(1:3 000)孵育 6 h 后洗涤,二抗(1:5 000)孵育 2 h 后洗涤,化学发光,显影,定影。扫描 X 光胶片,采用图像分析软件 Image J 采图系统对蛋白条带进行半定量分析。用目的蛋白/内参蛋白表示 HSG 蛋白相对表达。

1.6 统计学方法 采用 SPSS 19.0 统计学软件,计

量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同证型中 HSG mRNA 表达比较 痰浊组、痰热组、气虚组 HSG mRNA 表达均明显低于正常组 ($P < 0.05$);痰浊、痰热组 HSG mRNA 表达分别高于气虚组 ($P < 0.05$);痰浊与痰热组 HSG mRNA 比较差异无统计学意义。见表 1。

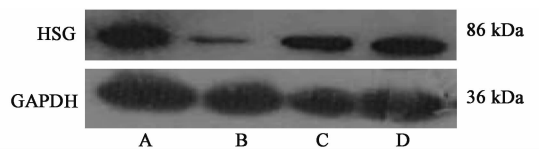
表 1 各组患者年龄构成比及 HSG mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Age constitution ratio and HSG mRNA expressions in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	平均年龄/岁	HSG mRNA
痰浊	39	73.95 ± 5.986	0.540 ± 0.020 ^{1,2)}
痰热	32	72.50 ± 7.404	0.540 ± 0.021 ^{1,2)}
气虚	35	72.50 ± 7.404	0.513 ± 0.016 ¹⁾
正常	30	69.33 ± 7.898	0.569 ± 0.018

注:与正常组比较¹⁾ $P < 0.05$;与气虚组比较²⁾ $P < 0.05$ (表 2 同)。

2.2 不同证型中 HSG 蛋白表达比较 痰浊组、痰热组、气虚组 HSG 蛋白表达均明显低于正常组 ($P < 0.05$);痰浊组、痰热组 HSG 表达高于气虚组 ($P < 0.05$);痰浊与痰热组比较差异无统计学意义。见图 1,表 2。



A. 正常组;B. 气虚组;C. 痰热组;D. 痰浊组

图 1 各组患者 HSG 蛋白表达

Fig. 1 Scanning images of HSG protein expression in different groups

表 2 各组患者年龄构成比及 HSG 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Age constitution ratio and HSG protein expressions in different groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	平均年龄/岁	HSG 蛋白/GAPDH 蛋白
痰浊	38	73.50 ± 6.195	0.557 ± 0.040 ^{1,2)}
痰热	30	72.50 ± 7.404	0.556 ± 0.035 ^{1,2)}
气虚	32	72.55 ± 7.620	0.516 ± 0.030 ¹⁾
正常	30	69.33 ± 7.898	0.593 ± 0.022

3 讨论

中医发展需要融入现代社会,尝试与现代科技交融,用新的知识技术来诠释祖国的传统医学,探索疾病的内在规律,促进辨证论治的客观化。伴随着现代科技的飞速发展,对疾病本质的认识也越来越清晰。苏梅者等^[12]在关于肺功能与中医证型关系的研究中发现:以咳嗽为主证的慢性肺病患者,从肺

气虚开始,由肺及脾,再由脾及肾,最终肺脾肾三脏俱虚,肺功能减退随着脏腑虚证的加重而加重。陈瑾^[13]在关于肺功能与中医证型关系的研究中发现,肺气虚型患者的肺功能常规指标高于脾和(或)肾阳虚患者。余朝骏等^[14]在关于血气分析与中医证型的关系研究中发现,阳虚水泛组 pH 明显低于痰浊、痰热及肺肾气虚组;阳虚水泛组二氧化碳分压(PCO₂)高于肺肾气虚组,且二者均高于痰浊、痰热组,阳虚水泛组血氧分压(PaO₂)最低,阳虚水泛组二氧化碳结合力(CO₂CP)最高,与其他 3 组比较差异显著。毛兵等^[15]在关于血气分析与中医证型的关系研究中发现,PaO₂ 随着脏腑虚证的加重而逐渐降低;不同证型组间 PCO₂ 无差异,但随着脏腑虚证的加重有上升的趋势。董祥等^[16]关于血气分析与中医证型的关系研究中发现,PCO₂ 在肺阳虚组明显高于气虚组、正常组,PaO₂,动脉血氧饱和度(SaO₂)则相反。另有关于胸部 X 片表现、心指数、骨吸收指标、胃电图等与肺胀中医证型关系的研究,为客观量化研究 COPD 中医证型提供了良好的思路和参考指标,但肺功能、血气分析等传统检测手段受患者主观意识、检测环境等多方面影响,误差较大,且相关研究不够系统,在用于中医诊疗方面说服力不足。

本研究结果显示,痰浊组、痰热组、气虚组 HSG 基因及蛋白的表达均低于正常组,痰浊、痰热组表达较低,气虚组最低;痰浊、痰热组之间比较无差异。可以认为 HSG 在 AECOPD 患者血液中低表达,在正常组血液中高表达;气虚组患者血液中 HSG 表达低于痰浊、痰热组。临床发现,气虚组患者体质最弱、气喘最严重,且病程比较长,生活自理能力较差;痰浊组、痰热组患者体质相对强健,病程比较短,生活自理能力相对较好。COPD 以持续气流受限为特征,其气流受限多呈进行性发展,与气道和肺组织对刺激因素的慢性炎症反应增强有关;慢性炎症反应导致气道重建,气道重建造成气道狭窄,引起固定性气道阻塞^[1]。而患者的气道功能状态又直接参与了咳嗽、咯痰、气喘等临床症状的发生。结合本课题组的研究结果,笔者认为 HSG 的表达水平可能影响了气道重建;HSG 与 AECOPD 病程可能存在着内在的关联,其参与了 COPD 不同中医证候群的形成。

本课题组从基因和蛋白水平认识中医证候发生的本质,为后续通过基因检测手段建立中药方剂疗效评价体系提供依据。本研究尚存在一些问题,如人体肺部活组织研究涉及伦理问题且标本获得困

难、技术要求高;研究对象中女性患者较少;肺胀的中医证型采集不够全面且例数较少等。

[参考文献]

- [1] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病诊治指南(2013 年修订版)[J]. 中华结核和呼吸杂志,2013,36(4):255-264.
- [2] 中华医学会呼吸病学分会慢性阻塞性肺疾病学组. 慢性阻塞性肺疾病的中国梦[J]. 中华结核和呼吸杂志,2013,36(12):902-906.
- [3] Churg A, Wright J L. Testing drugs in animal models of cigarette smoke-induced chronic obstructive pulmonary disease[J]. Proc Am Thorac Soc,2009,6(6):550-552.
- [4] 温绍君,王佐广,陈光慧,等. HSG 基因单核苷酸多态性与原发性高血压的相关性研究[J]. 中华预防医学杂志,2005,39(1):15-18.
- [5] 李常. 转染 HSG 基因干预气道成纤维细胞的研究[D]. 贵州:贵阳中医学院,2010.
- [6] 葛正行,李波,周海,等. rHSG 基因调控 COPD 大鼠气道成纤维细胞增殖凋亡[J]. 基础医学与临床,2013,33(10):1021-1027.
- [7] 李波. COPD 大鼠气道成纤维细胞转染 rHSG 基因后观察细胞增殖、凋亡及 TGF-β₁、PDGF 表达水平关系[D]. 贵州:贵阳中医学院,2012.
- [8] 陈平. 苗药对 COPD 气道平滑肌增生过程中 PDGF 作用的干预研究[D]. 贵州:贵阳中医学院,2005.
- [9] 葛正行,范新明. 止咳化痰苗药及中药配伍对 COPD 大鼠模型中 TGF-β₁ 因子的拮抗[J]. 中国中医基础医学杂志,2006,12(4):289-291.
- [10] 袁霞. Wnt 信号通路在慢性阻塞性肺疾病大鼠气道重建中调控作用及苗药紫金牛、铁扫帚干预研究[D]. 贵州:贵阳中医学院,2014.
- [11] 周仲瑛. 中医内科学[M]. 北京:中国中医药出版社,2007:112-119.
- [12] 苏梅者,金晨曩,方文贤,等. 慢性咳喘的肺气盛衰与肺功能关系的临床研究[J]. 北京中医药大学学报,1994(2):45-48.
- [13] 陈瑾. COPD 患者中医辨证分型与有关指标相关性分析[J]. 辽宁中医药大学学报,2006,8(4):7-8.
- [14] 余朝骏,侯键,陈楠,等. 肺胀各证胸部平片 X 线征象及与血气分析关系的研究[J]. 中国中西医结合急救杂志,1999,6(11):493-498.
- [15] 毛兵,李文,梁文琼. 慢性阻塞性肺疾病稳定期中医脏腑辨证与营养状态、血气分析的变化[J]. 中西医结合学报,2007,5(5):506-509.
- [16] 董祥,任中代,王鹏. 慢性阻塞性肺疾病肺阳虚证临床客观指标的探讨[J]. 湖北中医杂志,2005,27(9):9-10.

[责任编辑 张丰丰]