

•综述•

运用蛋白质组学研究中医学证候的思考

杨元宵, 李昌煜*

(浙江中医药大学, 浙江 杭州 310053)

[摘要] 目的: 讨论蛋白质组学与中医证候的相互关系。方法: 通过广泛查阅文献, 对中医证候的研究状况以及蛋白质组学应用于中医证候的实质研究的可行性进行分析。结果: 我国在中医证的本质研究方面取得了不少成绩, 但目前还没有揭示证的本质; 蛋白质组学技术研究中医学证候有其理论和实践基础。结论: 蛋白质组学的广泛应用将对中医证候本质的研究带来契机, 从而揭示疾病和生命活动的最终机制。

[关键词] 证候; 本质; 蛋白质组学

[中图分类号] R2-03 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2006)12-0069-04

The Thought of Applying Proteomics to Research The Syndrome of The Traditional Chinese Medicine

YANG Yuan-xiao, LI Chang-yu*

(Zhejiang Chinese Medical University, Zhejiang Hangzhou 310053, China)

[Abstract] **Objective:** To discuss the relation between proteomics and TCM syndrome. **Methods:** By broadly reference to literatures, to make an analysis on the current research status of TCM syndrome and the feasibility of the research aimed at finding out the essential of TCM syndrome by taking advantage of proteomics. **Results:** Although many achievements have been made in respect of TCM syndrome, but the essential has not been revealed so far; the study of TCM syndrome by proteomics is based on certain theories and practice. **Conclusion:** The wild use of proteomics is surely going to bring a turning point for studying of TCM syndrome, which contributes to the final discovery of mechanism of diseases and vital activities.

[Key words] syndrome; essence; proteomics

证候是在致病因素作用下, 机体内外环境各系统之间相互关系发生紊乱所产生的综合反应, 是反映疾病处于某一阶段病因、病性、病位、病势等病理要素的综合性诊断概念。而证候的多态性是指在目前所认为的某一最基本的证型中包含着若干可分辨的有意义的不同病理状态。蛋白质组学是研究细胞内全部蛋白质的组成及其规律的学科, 其不仅研究

蛋白质的构象, 更重要的是进一步阐明不同的蛋白质、不同的构象功能的表现; 它不是单纯地研究单个蛋白, 而是研究人体整体水平的蛋白质。证候是生命活动的表现特征, 而生命活动的主要执行者是蛋白质, 它是人体功能表现的物质载体。当内、外环境变化时, 人体“应变系统”产生各种应变活动, 包括各种症状表现。这些反应实质上是人体蛋白质正常或异常功能的宏观表现形式。下面将证的研究状况和蛋白质组学对证研究的可行性综述如下。

1 证候的研究现状和存在的问题

1.1 证候的研究现状 近半个世纪以来, 我国政府

[收稿日期] 2006-04-24

[通讯作者] * 李昌煜, Tel: (0571) 86613537; E-mail: Lcy@zjcm.

net

在中医证本质研究方面投入了巨大的人力和财力,对于各种有可能是证本质的物质都进行了较为充分的研究,并取得了不少成绩,观察到许多与中医证本质有关的现象和事实:①证与植物神经系统:实践表明,在证的发生发展过程中,植物神经系统的功能状态常有一定的异常改变,如叶雪清等^[1,2]对月经不调等妇科疾病阳虚和阴虚患者的观察,经植物性神经功能测定和 Wenger 植物性神经平衡因子分析,阳虚者大多数表现为交感神经功能减退或副交感神经功能增强;阴虚者的变化不明显。陆启滨等^[3]则报道绝经前后阴虚火旺者的植物性神经功能异常增强,经用滋阴降火药治疗后可获得显著改善。②证与免疫系统:各种虚证患者常有免疫功能的紊乱和降低。全建峰等^[4]在慢性肾炎及糖尿病患者中,肾阴虚证患者呈现体液免疫功能相对亢进的相似变化,其中以血清 IgM(免疫球蛋白 M)升高较为显著。蔡宛如等^[5]研究发现不论是痰热型还是痰热伤阴型其细胞免疫功能都是低下的,主要表现为 TH 细胞(辅助型 T 细胞)降低, T_4/T_8 (辅助性淋巴细胞/抑制性淋巴细胞)比例下降。③证与内分泌系统:许多研究报道虚证时常有激素分泌功能的异常,特别是下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴、下丘脑-垂体-甲状腺轴、下丘脑-垂体-性腺轴的功能失调等。秦路平等^[6]报道肾阳虚证血浆皮质酮、ACTH(促肾上腺皮质激素)浓度明显降低。樊蔚虹等^[7]研究发现肝肾阴虚模型大鼠下丘脑 TRH(促甲素释放激素)增高,血清 TSH(垂体促甲状腺素)、 FT_3 (游离甲状腺素)、 FT_4 (游离三碘腺原氨酸)水平均降低,而血清 rT_3 (反甲状腺素) T 细胞亚群浓度升高,说明此轴功能紊乱可能是肝肾阴虚证本质之一。丘瑞香等^[8]研究发现:肾阴虚患者血浆雌二醇(E_2)和 E_2/T (睾酮)均显著增高,肾阴虚的 E_2 值显著高于肾阳虚者。④证与环磷酸腺苷(cAMP)和环磷酸鸟苷(cGMP):1973 年美国生物学家 Goldberg 曾提出过“阴阳学说与 cAMP 和 cGMP 双向调节关系假说”。曾经一度有人把 cAMP、cGMP 认为可能是阴阳的本质,认为阴虚者 cAMP 占优势,阳虚者 cGMP 者占优势,两者在 cAMP/cGMP 比值上存在差别。但是后来的研究者在研究其它病种不同证型患者的环核苷酸变化时,却没有得出相同的结论。⑤证与其它实验指标:有研究表明阴虚时机体内常存在着微量元素代谢异常表现,薛沙等^[9]研究发现全血中微量元素铁、锌铜含量下降。

申维玺等^[10]研究表明阴虚证的本质是细胞因子,其发病学机理是由于机体在各种致病因素的作用下,白细胞介素-1 和肿瘤坏死因子等炎性细胞因子基因的表达水平增强、生物学活性相对升高,引起细胞因子网络紊乱。

综述以上研究我们可以发现,在中医证候的发生发展过程中,人体的神经系统、内分泌系统、免疫系统及各器官、组织和细胞等的结构和/或功能大都发生了一定的变化,其相应的实验室指标也大都发生了相应的改变。

1.2 中医证候本质研究存在的问题 中医证候的本质研究,就是要用现代医学理论揭示出中医证理论中蕴藏的科学内涵、阐明中医诊断和治疗各种证及其相关疾病的分子机理,使得国内外医学界能够理解中医证的理论和复方中药治疗证及相关疾病的分子机理。虽然我国在中医证的本质研究方面取得了不少成绩,但是我们并没有揭示证的本质,证候实质研究的传统目标是追求研究指标的高特异性,而其研究结果的特点却恰恰是弱特异性^[11]。以脾虚证研究为例,实验指标有 70 余种,涉及消化系统、植物神经系统、能量代谢、免疫、内分泌、造血功能等方面,特异性相对较高的仅有酸刺激后唾液淀粉酶活性下降和木糖吸收率下降两个。弱特异性的克服是多年来证候实质研究的主攻方向,在研究方法上已做了很大努力,但实践结果表明,这一特点是不为研究者的主观能动性所改变的客观存在。

2 蛋白组学应用于证候实质研究的可行性

蛋白质组学是研究细胞内全部蛋白质的组成及其规律的学科,蛋白质组学的研究为揭示生命活动规律,探讨重大疾病机制、疾病诊断和防治、新药的开发提供重要的理论基础。随着分子生物学领域研究进一步的深入,人类基因组计划和后基因组时代、蛋白组时代将主领 21 世纪生命科学的旋律。将蛋白组学应用于证实质研究,这一方法是否可行,我们从以下两方面进行探讨。

2.1 认知上的可行性 中医理论认为,疾病的发生主要是机体整体功能的失调,证候是疾病在发生发展过程中某一阶段的病理变化实质的概括,是机体内因和环境外因综合作用的机体反应状态,随着病程的发展而发生相应的变化,可见证候有着明显的整体性。从中西医结合的角度,中医证本质的含义是指引起证发生发展的物质基础,这些物质决定着

证发生发展的动态变化过程,是在证发生发展过程中产生的特殊物质^[12]。申维玺等提出了中医证的本质是细胞内基因诱生性表达的细胞因子,中医证的基本发病学机理是由于细胞因子网络功能紊乱的结果;而细胞因子的本质是多肽,即蛋白质组研究的主要内容之一^[13,14]。因此有学者认为中药的基本作用机理是调节细胞因子网络的功能态平衡,从而起到治疗中医的“证”和相关的西医的“病”的目的和效果。可见蛋白质组学对蛋白质研究的整体观念同中医对疾病认识的整体性有很多的共同之处。采用对整个细胞甚至整个组织的全套蛋白质的蛋白组学研究方法,对证候研究有着重要意义^[15]。现代医学也认为疾病的发生大多数是多种病因通过多种途径导致整体功能紊乱的过程,在生命大系统中,如果仅用单因素分析思路来研究多因素系统中的各种关系,往往陷入网络式联系中,难以理出头绪来。因此中医证候理论研究作为中医理论现代化的突破口是理所当然的^[16],而蛋白质组学也是从整体水平上反映了疾病过程中蛋白质表达的动态演变过程,与中医的辨证论治的认识方法相似相通。

2.2 技术上的可行性 蛋白组研究是一个艰巨的生物工程。Patricko Farrell 等于 1975 年建立了双向电泳技术,可同时分离数千种蛋白质。目前应用于蛋白质组学的主要研究技术有(1)激光捕获切割技术(LCM):该技术减少了由于样本成分复杂而造成的干扰或个体差异,提高了样本的均一性。(2)表面增强激光解吸电离-飞行时间-质谱技术:该方法通过选择性吸附的途径大大降低了样品中蛋白质的复杂性,而同时又保持对多样品、多蛋白的同时分析,从而把每个蛋白放在一个具有相互参照的背景里。(3)荧光双向差异凝胶电泳(DIGE):该方法因为采用荧光染料,灵敏度高,故所需样品量非常少;而且,一张胶可同时分析 3 个样品,省去了不同胶之间的匹配问题,减少了工作量,不仅重复性显著提高,而且也提高了分析通量^[17]。同时,随着计量化学、统计物理学、信息学的发展,生物信息学家 Amos Bairoch 和 Appel 发展了一种蛋白质专业分析系统,该系统将 Geneva 2D gel 数据库与 SWISS-PROT 蛋白质序列数据库联网,帮助研究者从蛋白质序列预测其功能。分析化学的迅猛发展,生物信息技术日新月异的突破,相关学科交叉渗透,为蛋白组学应用于证研究奠定了技术基础。

证候是生命活动的表现特征,而生命活动的主要执行者则是蛋白质,基因决定蛋白质的表达,蛋白质的表达决定人的外表、特征、行为等,那么不同的“证”可能受不同的基因调控。从基因分子水平研究中医证候是目前热门的研究课题,而基因作为遗传信息的载体,均要表达为相应的蛋白质或修饰相关蛋白才能影响生物的功能,蛋白质组学正是从整体的角度,分析细胞内所有动态变化的蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态,是从基因层面向蛋白质层面的深化。可见,以蛋白质组学技术研究证候有其理论和实践基础。

3 运用蛋白质组学研究证候的进展

蛋白质组学技术在中医药领域的应用刚刚起步,目前多集中在病理、给药前后蛋白质组的变化等方面的研究,但已经展现了蓬勃的生命力和广阔的前景。主要表现在(1)筛选诊断标志物:吴红金等^[18]运用蛋白质组学研究发现冠心病血瘀证病人血浆与正常相比有 3 个蛋白质下调和 6 个蛋白质上调,胶内酶切提取蛋白进行质谱鉴定,其中冠心病血瘀证病人血浆与正常相比升高的蛋白质有免疫球蛋白、纤维蛋白原、粒酶,冠心病血瘀证病人血浆与正常相比降低的蛋白质有 CD44SP,纤维蛋白原、粒酶有望作为诊断冠心病血瘀证的标志物。(2)研究发病机制:卢德赵等^[19]应用凝胶内差异显示电泳技术研究肾阳虚大鼠肝线粒体蛋白质组,并从肝线粒体蛋白质组角度阐述肾阳虚与能量代谢的关系。结果表明肾阳虚动物能量代谢相关酶的变化与肾阳虚的临床虚寒症状有关。(3)研究药物作用机制:郭平等^[20]利用双向电泳、图像分析、胶内酶切、质谱鉴定等蛋白质组学技术研究四物汤对血虚证小鼠骨髓蛋白质表达的影响。结果显示,四物汤可以逆转放射线致血虚证小鼠骨髓 10 个上调和 5 个下调的蛋白质。其中 8 个蛋白质可能分别是淋巴细胞特异性蛋白-1、蛋白酶体 26S ATP 酶亚组分 4、造血细胞蛋白质酪氨酸磷酸酶、H-ras、3-磷酸甘油醛脱氢酶、生长因子受体结合蛋白-14 及 Igals-12。

总之,随着蛋白质组学研究的深入和细化,一些新技术与传统蛋白质组学技术相结合,实现优势互补,逐渐实现自动化和高通量分析差异蛋白,为蛋白质组学在生命科学和实验和临床研究中开辟了更广阔的应用前景。

4 展望

虽然蛋白组学在未来的生命科学研究将会占有越来越重要的地位,尤其是在探讨重大疾病机制、疾病诊断和防治、新药的开发上有着广阔的前景。但是,蛋白质组学毕竟处于起步阶段,该技术仍然存在很多不足:操作步骤自动化程度低;重复性差;等电点较大(大于 9)或较小(小于 4)的点不易得到分离,疏水的蛋白和难溶的膜蛋白以及大分子量、低丰度蛋白都不能被检测到,使得在其后的分析中忽略了这些蛋白;一张胶上只能最多检测到 3 000 个左右的蛋白点,很多蛋白点可能共同移到一个点上,造成了定量和质谱分析的准确性降低;细胞和组织蛋白质水解消化非常复杂,往往在一个样品上就产生上千个肽段,这给研究工作带来很多的困难,等等。但是,在短短的几年内,蛋白质组学的技术和方法有了很大发展,并不断与其他学科相整合,一个不断成熟的蛋白质组学方法技术体系正在形成。我们有理由相信,蛋白质组学的应用将不断扩大,对中医证候的本质研究将进入更加深入,更加全面的阶段,将推动从细胞和分子水平上探讨人类重大疾病的机制、诊断、防治,为新药开发提供重要的理论基础,为中医药的研究开辟一个崭新的局面。

[参考文献]

[1] 叶雪清,曾淑华,张宛明,等. 月经失调的八纲辨证与植物神经系统功能关系的研究[J]. 中西医结合杂志, 1984, (4) 4: 198.

[2] 叶雪清,杨少文,李安,等. 阳虚患者植物神经系统功能、甲微循环和血液流变学的改变及相互作用[J]. 中西医结合杂志, 1989, 9(10): 618.

[3] 陆启滨,夏桂成,陈丹华,等. 159 例绝经前后诸证阴虚火旺型患者的植物神经功能观察[J]. 上海中医药杂志, 1990, (2): 12.

[4] 全建峰,吴晓康,孙晓虹. 肾阴虚证患者的血清免疫球蛋白 G、A、M 及补体 C3、C4 相关性研究[J]. 现代中医药, 2004, 5(2): 53-54.

[5] 蔡宛如,汤军,徐志瑛,等. 肺心病痰热型与痰热伤阴型的免疫学指标观察[J]. 中国医药学报, 2000, 15(2): 43.

[6] 秦路平,张家庆. 蛇床子香豆素对肾阳虚模型大鼠腺

垂体-肾上腺皮质轴功能的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 1997, 17(4): 227-229.

[7] 樊蔚虹,岳广欣,任小巧,等. 肝肾阴虚证大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴的变化及中药对其调节作用[J]. 中国中医药信息杂志, 2001, 8(10): 21.

[8] 丘瑞香,吴国珍,金明华. 性激素对肾虚患者阴阳平衡的调节作用[J]. 中国中医基础医学杂志, 1999, 5(3): 46.

[9] 薛沙,汤学军. 右归丸对肾阳虚动物模型血液微量元素含量的影响[J]. 中国中医药科技, 2002, 7(3): 168-169.

[10] 申维玺,孙燕,刘晓燕,等. 用现代医学理论阐明肾阴虚证的本质和发病学机制[J]. 医学与哲学, 2005, 26(11): 67-69.

[11] 陈小野. 证候实质研究中弱特异性的正面观[J]. 医学与哲学, 1995, 16(6): 311-313.

[12] 申维玺. 论中医“证本质”的科学内涵[J]. 中国中医基础医学杂志, 2001, 7(6): 410.

[13] 申维玺,孙燕. 论中医药的化学本质是蛋白质和肽及证本质的分子标准[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(11): 696.

[14] 申维玺,孙燕. 用分子生物学理论阐释阴虚证的本质[J]. 医学研究通讯, 1998, 27(8): 1.

[15] 刘为民. 中医证候学研究 with 证候蛋白质组学[J]. 中医药学报, 2003, 31(3): 1.

[16] 邱德有,吴小红,黄璐琦. 现代生命科学技术对中医药发展的影响[J]. 世界科学技术, 2001, 3(2): 12.

[17] TONGE R, SHAW J, MIDDLETON B, *et al.* Validation and development of Fluorescence two dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology[J]. Proteomics, 2001, 1(3): 377-396.

[18] 吴红金,马增春,高月,等. 蛋白质组学技术对冠心病血瘀证相关蛋白的研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2005, 3(3): 189-191.

[19] 卢德赵,沃兴德,施孟如,等. 激素型肾阳虚动物肝线粒体蛋白质组与能量代谢相关性[J]. 中国生物化学和分子生物学报, 2005, 21(6): 807-814.

[20] 郭平,马增春,李鹰飞,等. 四物汤对放射线致血虚证小鼠骨髓蛋白质表达的影响[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(9): 893-896.