

- 的影响及分子机制研究[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2004, 24(6):555.
- [23] 黄云剑,赵景宏,张 憬. smad6 和 smad7 基因治疗对肾小管间质纤维化进程的影响[J]. 中华肾脏病杂志, 2004, 20(5):358.
- [24] 冯 媛,刘 敏,张 苗,等. 黄蜀葵花总黄酮对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的影响[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2010, 11(11):1006.
- [25] 万毅刚,孙 伟,窦晨辉,等. 雷公藤多苷对阿霉素肾病模型鼠肾组织 TGF- β 1/Smad 信号通路的干预作用[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(4):517.
- [26] 仇 琪,赵宗江,杨美娟. 三七总皂苷对阿霉素肾病大鼠肾组织 CTGF 蛋白及其 mRNA 表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2008, 26(11):2358.
- [27] 陈 刚,张 权,张昕贤. 何立群教授应用抗纤灵系列方治疗肾脏纤维化经验[J]. 中国当代医药, 2012, 19(26):115.
- [28] 鲁科达,张冰冰,谢志军,等. 消痰泄浊饮对肾间质纤维化大鼠的肾脏保护作用研究[J]. 中华中医药学刊, 2011, 29(7):1537.
- [29] 严 冬,钱玉良,严士海,等. 降压益肾颗粒对自发性高血压大鼠早期肾损害中 TGF- β 1 表达的影响[J]. 中成药, 2013, 35(2):237.

基于基因组学的中医“证”本质的研究概况

齐 真¹,许家佗¹,周昌乐²

(1. 上海中医药大学,上海 201203; 2. 厦门大学,福建 厦门 361005)

摘要: 随着后基因组时代(即功能基因组学)的到来,基因组学使得现代分子生物学从局部观走向整体观,从线性思维走向复杂思维,因此成为生命科学的研究热点,并在中医药领域得到广泛的应用。文章从基因组学在中医证候本质研究中的理论探讨、应用实例、存在问题及展望等方面进行了系统性的文献研究,以探讨基因组学与中医证候本质的相关性及其意义。

关键词: 基因组学; 证; 整体观; 体质学说; 同病异证; 异病同证

DOI 标识: doi: 10.3969/j.issn.1008-0805.2014.08.064

中图分类号: R2-03 文献标识码: A 文章编号: 1008-0805(2014)08-1953-03

自 1990 年启动人类基因组计划(HGP)以来,人类进入结构基因组时代。随着 2000 年 6 月人类基因组工作草图的绘制完成,生命科学研究进入了以阐明基因组整体功能为特征的功能基因组学新阶段,即“后基因组时代”。功能基因组学是利用结构基因组学提供的信息系统地研究基因功能,包括:基因组的多样性;基因组在转录和翻译水平上的表达及其调控机制;通过对进化不同阶段的生物体基因组序列的比较,发现基因组结构组成和功能调节的规律,并利用各种模式生物体的基因剔除和转基因技术来揭示基因的功能等。由于基因组学是从整体基因组的层次来阐明所有基因在染色体上的位置、结构、基因产物的功能以及基因之间的关系^[1],因此基因组学是现代分子生物学从局部观走向整体观,从线性思维走向复杂思维以研究复杂生命现象的转变标志之一。

中医药作为几千年来古代中国人民防治疾病的主要武器,其主要特色之一就是辨证论治,由于“论治”的前提是“辨证”,因此有关“证”的研究是中医基础理论研究的基础环节及热点。然而何为“证”呢?所谓“证”是在广泛收集临床症状、体征的基础上,经过分析、综合、归纳而得出的对疾病发展过程中某一阶段的病理概括,由于“证”涵盖了疾病的病因、病性、病位、邪正关系,因此它反映了疾病发展过程中某一阶段的病理变化的本质。但是由于疾病的复杂性以及同病异治、异病同治等使得辨证论治具有很大的灵活性,因此“证”的客观化以及微观化本质研究始终是中医药研究领域的重点及热点,也成为影响中医药发展的瓶颈。过去,人们分别从生化、生理、超微结构等方面进行探讨,近年更有从神经-内分泌-免疫网络方面来探讨证的实质。然而,这些

研究都只反映了部分已知基因表达产物(受体、酶、免疫分子等)的改变,未能反映该病证相关的总体基因表达的变化。然而随着基因芯片技术的日益成熟,有人提出开展疾病证型基因表达谱的研究。此项研究就是运用大规模、高通量的基因表达检测技术,对大量的同一证型疾病状态下的各类组织和细胞的 mRNA 进行定量分析,编制基因表达谱,经过生物信息学和统计学的比较分析,就可以建立疾病证型特定的基因表达谱数据库,以此可作为辨证的客观规范化标准,因此基因芯片技术为中医的客观化、微观化研究提供了思路与方法,有望成为中医现代化的有效手段^[2]。

目前认为,所有疾病均存在基因表达变化,病理变化实质上是由基因表达的改变所致,而证是患者某一阶段病理变化体现在外的综合描述。因此,可以认为基因表达的改变正是证的“内涵”。如李戎^[3]认为证候的形成是由先天的体质因素和后天的环境因素共同作用的结果,证候理论涉及到生命的整体,所以它牵涉到许多基因和蛋白质,中医证候可能是基因组和蛋白组背景的整体反应。

1 基因组学用于中医证本质研究的理论探讨

基因组学用于中医证本质的研究,即中医证候基因组学,是指在证候理论指导下,运用功能基因组学的方法探讨证候,特别是同病异证或异病同证时基因的变异及差异表达情况,揭示与某一证候形成相关的所有基因及其功能,以从整体基因表达的水平阐明证候的本质。

由于中医基础理论作为朴素辨证、宏观思辨、定性描述的思维过程,其采用了以形象思维、类比为主的方法,而基因组学与中医药学的学术思想具有一定的趋同性,笔者将从以下两方面来作论述。

1.1 证-整体观-基因组学 谈到证,中医辨证方法有八纲辨证、六经辨证、卫气营血辨证、脏腑辨证和三焦辨证等,它们无一

收稿日期: 2013-11-08; 修订日期: 2014-05-25

作者简介: 齐 真(1987-),女(汉族),湖北随州人,上海中医药大学在读博士研究生,主要从事中医诊断技术信息化研究与应用工作。

不体现了中医朴素的“整体观”,即认为人是一个有机的整体,构成人体的各个部分之间,结构上是相互联系的,功能上是相互协调和相互为用的,在病理上又是相互影响的,人体与自然环境有着密切的关系。而基因组学与过去的基因研究的一个重要区别就是摒弃单个基因的研究方式,充分认识到基因之间相互联系、相互作用的复杂性,即一种疾病可能由于多个基因的改变所致,而同一基因的不同表达状态又可能造成多种疾病,故从整体对基因的活动规律进行探讨,研究内容涉及基因组的表达、基因的多样性、基因组功能的阐释及蛋白质产物的功能等。由于从整个基因组的层面来阐释所有基因在染色体上的位置、结构、基因产物的功能及基因之间的关系,具有鲜明的整体性,因此人类基因组学研究的方法学内容与中医学的整体观却有许多相似之处。正如刘家强等^[4]认为这种宏观人体整体性和微观的人体基因组整体性是统一的和同源的。因此,引入基因组学方法研究中医证候本质,既不会脱离中医的整体观,又能使我们有可能更加客观化、定量化、微观化地认识中医证候本质。

1.2 证-体质学说-基因组学 中医的“辨证”是指通过望、闻、问、切所收集的临床资料、症状和体征,整理归纳辨清疾病的证候,以了解疾病的病因、性质、部位等。然而同一种疾病在病程发展的不同阶段会出现不同的病理变化即“同病异证”;而不同种类疾病在病程发展的某一阶段可以出现相同的证候即“异病同证”。什么因素决定“同病异证”及“异病同证”?近年来中医体质学说的出现,使得我们进一步认识了中医证的宏观本质,体质指由先天遗传和后天获得所形成的,人类个体在形态结构和功能活动方面所固有的、相对稳定的特性,中华中医药学会把体质分为平和质、气虚质、阳虚质、阴虚质、痰湿质、湿热质、血瘀质、气郁质和特禀质等 9 种基本型,并从常见表现、心理特征、发病倾向、对外界环境适应能力等角度加以研究^[5]。个体体质的不同,不仅表现为在生理状态下对外界刺激的反应和适应上的差异,而且是机体发病的内部因素,它不但决定着对某些致病因素的易感性,而且决定着某些疾病的证候类型,故体质是“同病异证”、“异病同证”的重要物质基础,而证的“从体质而化”的过程形成了与体质类型相应的证,正如《医宗金鉴》注“人感邪气虽一,因其形脏不同,或从寒化,或从热化,或从虚化,或从实化,故多偏不齐也。”

然而中医体质学说认为先天禀赋与遗传是决定与影响体质形成的重要内在因素,这就使得从基因水平探索体质分型显得非常有必要;同时基因组多样性的研究对阐明不同人群和个体在疾病的易感性和抵抗性方面表现出的差异具有十分重要的意义,这也从人体的生理反应和发病倾向性方面揭示了基因组学与中医体质学说的相关性,如李光善等^[6]认为基因是决定人体不同体质表象的物质基础。故有人认为中医证候多样性及发生频率与特定基因及其多态性间可能存在某种关联,而这种关联可能是体质类型或先天禀赋与证候形成的分子基础^[7]。因而对不同体质分型基因芯片技术进行验证,寻找不同体质类型的特异性基因及表达差异,可以帮助我们进一步认识到中医证的微观本质。

2 基因组学用于中医证本质研究的应用实例

同一种疾病的不同阶段,其症状大相径庭,病理机制当然不同,即使是同一疾病的同一病期,存在着个体差异、季节差异,在不同的地区、气候条件下,其症状也不尽相同,这就是同病异证;相反,不同疾病,如其症状相似,“证”的属性相同,即具有共同的病理机制,这叫异病同证。

2.1 同病异证的基因组学研究 近几年来,不少学者对同病异证

的基因组学本质进行一定的研究。杨丽萍等^[8]用基因芯片技术检测肾阳虚证骨关节炎患者及正常人的基因表达谱,筛选出与肾阳虚骨关节炎免疫相关的基因 13 条,肾阳虚骨关节炎患者与正常人相比表达下调 4 条,上调 5 条。杨保林等^[9]通过对冠心病血瘀证、冠心病非血瘀证、非冠心病血瘀证患者和正常健康者的外周血白细胞 mRNA 检测后发现,差异表达的基因 b13 与冠心病血瘀证的病理改变密切相关。黄献平等^[10]通过对 330 例冠心病患者、100 例健康人静脉血血管紧张素转换酶基因型(DD、ID、II)和等位基因(D、I)及血管紧张素 II 活性检测发现,血管紧张素转换酶- DD 基因型和 D 等位基因型患者人数高于其他人群,可能与冠心病心血瘀阻证有一定内在联系。吕诚等^[11]通过检测类风湿性关节炎典型寒、热证 CD₄⁺T 淋巴细胞基因表达谱及血浆代谢谱,研究寒热证候的生物学差异,结果发现类风湿性关节炎寒热证候之间有 29 个差异基因表达,其中 7 个基因在寒证高表达,22 个基因在热证高表达。谢丽华等^[12,13]通过基因表达谱的差比性分析,探讨绝经后骨质疏松症肾阴虚证及肾阳虚证相关基因的信息学特征,结果发现,绝经后骨质疏松症肾阴虚证与 GPR27、ASB1、PROK2、CLCF1 和 GSTM5 基因的表达有关,并与谷胱甘肽代谢通路、细胞因子与其受体相互作用通路和 JAK-STAT 信号转导通路存在关联;而肾阳虚证的特有基因共 46 条,其中,表达水平上调的有 4 条,表达水平下调的有 42 条,这些差异表达的基因中,主要涉及到免疫功能、细胞信号转导、钙离子活性、神经内分泌相关的基因。杨婵娟等^[14]采用 Agilent 表达谱芯片进行基因芯片检测慢性乙型肝炎肝郁脾虚证与脾胃湿热证患者的差异表达基因,结果发现两证型间获得差异基因 125 个(其中 66 个为上调基因,59 个为下调基因),通过动态网络构建,寻找出共表达能力差异最显著的 9 个基因,其主要涉及免疫反应、细胞生长、DNA 损伤、信号转导、炎症反应等生命过程。翁莉等^[15]选用全基因组表达谱芯片,研究原发性肝癌肝肾阴虚证的基因表达谱,并进行差异表达基因分析,结果发现肝肾阴虚证组和非肝肾阴虚证组间存在差异基因表达特征图谱,获得差异表达的基因共 615 个。GO 注释后,差异基因表达具有 278 个显著性功能差异,主要涉及跨膜转运、细胞周期停滞、细胞转录、诱导凋亡等。Pathway 标记后,上调差异基因参与显著性信号转导通路 16 项,下调差异基因参与显著性信号转导通路 10 项,包括抗原加工与递呈转导通路、代谢途径转导通路、细胞周期转导通路、蛋白质输出转导通路等。

2.2 异病同证的基因组学研究 目前关于异病同证的基因组学本质研究相对较少,如王米渠等^[16]对寒证基因芯片的检测数据提出了分析方法,包括纵向发展的聚类分析(个体用药后的连续追踪,进而研究家系寒证)、横向互比的聚类分析(利用树状分层图等有关证候的调查数据)、分证候的聚类分析(如肢冷单个证候的疗效分析)及合寒证聚类分析(研究寒证证候变异主因素及其主效基因组之关系)。倪红梅等^[17]研究青少年肾阳虚体质差异表达基因,发现符合标准的差异表达基因涉及到免疫、发育、细胞生长、细胞受体、信号与传递蛋白、蛋白翻译合成等。罗云坚等^[18]采用 cDNA 芯片技术分别提取脾气虚证慢性胃炎与溃疡性结肠炎患者(6 例)以及健康人(3 名)外周血白细胞总 RNA,检测结果显示慢性胃炎脾气虚证和溃疡性结肠炎脾气虚证异常表达的免疫相关基因分别为 68 条和 57 条,两者相同的差异表达基因为 7 条,主要是与免疫相关的基因。提示脾气虚证发生有其免疫相关基因组学基础,是细胞免疫、体液免疫以及非特异性免疫功能等方面发生功能紊乱。陈晓玲等^[19]对一个典型的肾阳虚

家系 15 个成员,同时采用人类 Oligo 芯片杂交技术对其外周血单个核细胞的差异基因表达谱进行分析研究,结果:①典型肾阳虚证/正常对照组:上调基因 100 条,下调基因 33 条。②肾阳虚证/正常对照组:上调基因 148 条,下调基因 31 条。③典型肾阳虚证治疗显效者治疗前后:上调基因 12 条,下调基因 47 条。④典型肾阳虚证/正常配偶:上调基因 66 条,下调基因 44 条。这些基因主要为:物质代谢、信号转导、能量代谢和免疫调节等,初步反映出肾阳虚证患者恶寒喜暖、肢冷蜷卧、面色淡白等宏观证候在微观基因表达的分子生物学基础。杨裕华等^[20]使用肾阳虚小鼠模型脑基因芯片研究差异表达基因,显著下调的前 5 位依次为:糖蛋白激素 O_t 链前体(FSH、CG)、泌乳素前体(PRL)、生长激素前体(GH)以及下丘脑素和黑色素(MCH)前体基因下调,后两者与下丘脑分泌有关,其余则与下丘脑—垂体的促性腺、促甲状腺的调节有关。

3 展望与存在问题

基于基因组学的中医证候本质研究不仅可以从整体基因表达的水平阐明证候的本质,也为中医证的客观化、微观化研究提供了思路与方法,也预示着宏观现象研究与微观机理探讨可以很好地结合,它对于中医基础理论的现代发展具有十分重要的意义,也有助于整个生命科学的发展。

虽然证的基因组学研究揭示了证的部分实质,但尚存在以下问题:一是证的基因组学本质研究普遍存在病例样本量少、中医辨证标准不统一(证候资料可随着各医师经验的不同具有较强的主观性,缺乏可比性),因而可能出现同一证候与同一致病基因的相关性结论往往不一致,可重复性不强,使研究结论缺乏说服力;二是基因之间相互关系的复杂性决定了某一证候可能与多个基因相关,而某一基因可能与多个证候相关,故证候与基因及其表达产物相关性具有一定的复杂性,使得研究结论常常缺乏特异性和敏感性,难以指导临床实践。

参考文献:

- [1] 简维雄,袁肇凯.中医证候的组学研究进展[J].上海中医药大学学报,2008,22(2):69.
- [2] 黄闰月,黄清春,沈鹰,等.利用基因芯片技术探讨类风湿关节炎证候基因组学的建立[J].中华中医药学刊,2007,25(10):2107.
- [3] 李戎,闫知勇,李文军,等.创建中医证候基因组学的可行性[J].

- 中国中医药现代远程教育,2003,6(2):34.
- [4] 刘家强,王大鹏,王米渠,等.论整体医学对中医未来发展的影响[J].时珍国医国药,2008,19(5):1251.
- [5] 中华中医药学会.中医体质分类与判定[J].世界中西医结合杂志,2009,4(4):303.
- [6] 李光善,张红,任志雄,等.基于辨证论治和药物基因组学的个体化诊疗探讨[J].北京中医药,2012,31(6):424.
- [7] 宋剑南,陈皋.论载脂蛋白 E 基因多态性与中医痰瘀证候的关系[J].中国中医基础医学杂志,2002,8(12):13.
- [8] 杨丽萍,王明臣,王米渠,等.基因芯片技术研究针灸对肾阳虚证骨关节炎患者免疫相关基因表达的影响[J].辽宁中医杂志,2006,33(3):257.
- [9] 杨保林,王阶,姜燕,等.冠心病血瘀证相关基因 b13 的筛查和临床验证[J].中国中医基础医学杂志,2007,13(1):69.
- [10] 黄献平,袁肇凯,谭光波,等.冠心病血瘀证患者血管紧张素转换酶基因多态性的检测分析[J].中医杂志,2007,48(1):65.
- [11] 吕诚.风湿性关节炎寒热证候分类的系统生物学基础[J].北京:中国中医科学院博士学位论文,2010:5.
- [12] 谢丽华,赵毅鹏,陈可,等.绝经后骨质疏松肾阴虚证相关基因的信息学分析[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(15):2833.
- [13] 葛继荣,谢丽华,陈可,等.绝经后骨质疏松症肾阴虚证差异表达基因分析[J].中国骨质疏松杂志,2012,18(2):134.
- [14] 杨婵娟,刘宏伟,王丽春,等.慢性乙型肝炎肝郁脾虚证和脾胃湿热证患者的差异表达基因研究初探[J].中国中西医结合杂志,2012,32(8):1032.
- [15] 翁莉,杜娟,何文婷,等.原发性肝癌肝肾阴虚证外周血单个核细胞特征性差异基因[J].中西医结合学报,2012,4(10):406.
- [16] 王米渠,张敬远,丁维俊,等.寒证基因芯片的数据库的纵横分合聚类方法研究[J].中国中医基础医学杂志,2002,18(12):59.
- [17] 倪红梅,吴艳萍,何裕民,等.用基因芯片技术研究青少年肾阳虚体质差异表达基因[J].上海中医药杂志,2004,38(6):3.
- [18] 罗云坚,修宗昌,黄穗平,等.脾气虚证免疫相关基因组学机制初探[J].中国中西医结合杂志,2005,25(4):311.
- [19] 陈晓玲,高志芬,丁维俊,等.肾阳虚证患者血液生化、免疫指标与基因表达谱结果的对比研究[J].四川中医,2007,25(5):11.
- [20] 杨裕华,李震.“劳倦过度、房室不节”肾阳虚小鼠模型脑基因芯片研究[J].中华中医药杂志,2008,23(5):396.