

慢性乙型肝炎证候差异基因表达谱分析

管艳¹, 苏式兵²

1. 广州中医药大学 2012 级博士研究生, 广东 广州 510405

2. 上海中医药大学中医复杂系统研究中心, 上海 201203

[摘要] 目的: 通过检测分析慢性乙型肝炎(乙肝)肝肾阴虚证和肝郁脾虚证患者的差异基因表达谱, 探讨乙肝中医证候分型与基因表达之间的关联。方法: 采集乙肝患者和健康者的外周血样本, 提取白细胞中的总 RNA; 运用基因芯片技术检测基因表达, 并对其表达谱进行比较分析; 使用实时定量 RT-PCR 验证部分基因表达。结果: 在乙肝肝肾阴虚证和肝郁脾虚证者之间、乙肝患者与健康者之间, 基因表达谱都存在明显的差异表达。肝肾阴虚证单独调变的基因主要与氮氧化合物合成酶调节物活性、RNA 多聚酶 III 转录因子活性和神经递质转运体活性等相关; 肝郁脾虚证单独调变的基因主要与细胞动力学过程、多器官过程的调节和 cAMP 依赖性蛋白激酶 PKA 的活化等相关。实时定量 RT-PCR 的结果与基因芯片检测结果趋势一致。结论: 乙肝肝肾阴虚证和肝郁脾虚证患者白细胞中基因表达存在差异, 提示乙肝中医临床辨证分型具有分子生物学基础, 与基因差异表达密切相关。

[关键词] 慢性乙型肝炎; 肝肾阴虚; 肝郁脾虚; 基因芯片技术; 差异基因表达谱

[中图分类号] R575.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2014) 09-0058-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2014.09.028

慢性乙型肝炎(乙肝)是由乙肝病毒(HBV)引起的一种世界性疾病。中国属 HBV 感染的高发区, 一般人群的 HBsAg 阳性率为 9.09%, 乙肝患者约有 3 000 万, 已经成为严重的临床和公共卫生问题^[1]。中医辨证治疗乙肝有着独特的作用, 而确定中医证型是中医辨证施治的前提。因此, 对乙肝进行中医辨证客观化、规范化的研究具有重要意义。随着系统生物学研究和组学检测技术的发展, 运用大规模、高通量的基因芯片检测技术, 对乙肝证候的基因表达谱进行定量分析, 阐明证候分型的分子生物学基础, 已成为可能, 是研究证候客观化的基础工作之一。因此, 笔者采集乙肝肝肾阴虚证和肝郁脾虚证两种常见证候的临床信息和血液样本, 采用基因芯片技术, 检测并分析乙肝肝肾阴虚证和肝郁脾虚证的差异基因及其表达谱, 探讨乙肝中医证候分型与患者白细胞中基因表达之间的关联。

1 临床资料

1.1 诊断标准 慢性乙型肝炎诊断和分期标准参照中华医学会肝病学会、感染病学分会制订的《慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)》^[2]。证候诊断标准参照中华中医药学会内科肝病委员会提出的《病毒性肝炎中医辨证标准(试行)》^[3]。

1.2 一般资料 用于芯片检测的为 6 例乙肝患者(肝肾阴虚证者 3 例、肝郁脾虚证 3 例)和 3 例健康者; 用于验证芯片结果的为 20 例乙肝患者(肝肾阴虚证 10 例、肝郁脾虚证 10 例)和

10 例健康者。乙肝患者均来自上海中医药大学附属龙华医院肝病科, 健康者来自经体检证明健康的志愿者, 并签署知情同意书。乙肝患者年龄 30~50 岁, 平均 47.4 岁, 未经过治疗, 由上海龙华医院肝病科具有正高级职称的医师辨证, 均未合并它证。采集患者及健康者晨起空腹静脉血 3 mL, 保存于含有 150 μ L EDTA 的 2 mL 冻存管内, -20 $^{\circ}$ C 保存。

2 研究方法

2.1 RNA 抽提和质量检测 采用 TRIzol[®] Reagent (Invitrogen life technologies 公司)对每例样本分别进行全血白细胞 RNA 提取和纯化, 操作流程严格按照该试剂盒提供的说明书进行。使用 NanoDrop ND-1000(Thermo Fisher 科技公司)进行质量检测, A260/A280 在 1.8~2.1 之间为合格。

2.2 cDNA 合成 使用 First-Strand cDNA Synthesis Using M-MLV RT 试剂盒(Invitrogen life technologies 公司), 取 1 μ g RNA 在 20 μ L 反转录体系中合成 cDNA, 并加入 RnaseA 去除其中的 RNA。

2.3 芯片杂交及检测 芯片杂交由上海康成生物工程有限公司完成。所用的 NimbleGen Homo sapiens 12x135K Array 表达谱芯片(Roche, CAT No. A6484-00-01)共有 135 000 个探针, 可检测 44 049 个基因。使用 GenePix 4000B 芯片扫描仪(Axon 公司)扫描芯片的荧光强度, 并将实验结果转换成数字

[收稿日期] 2014-04-03

[基金项目] 国家科技重大专项课题(编号: 2009ZX10004-601)

[作者简介] 管艳(1985-), 女, 博士研究生, 研究方向: 肿瘤的基础及临床研究。

型数据保存,使用配套软件对原始数据进行分析运算。

2.4 芯片数据处理和分析 利用 GenePix 分析软件,对扫描的图像进行图像-数据的转换,剔除一些不可靠基因点值,包括剔除荧光值溢出点,荧光值低于 1.5 倍背景中位数值基因点,然后再根据转换数据中的 SNR(信噪比),剔除 SNR < 2 的位点,并对荧光数据进行标准化。使用上海伯豪生物技术有限公司的生物芯片分析系统(SAS)对标准化后的数据进行差异基因、聚类、功能以及信号传导通路(Pathway)等分析。

2.5 实时定量 RT-PCR 验证的基因及其引物 见表 1。RT-PCR 选择两证候之间差异倍数较高且功能可能相关的基因,进行 RT-PCR 实验。选用 ACTB(β -actin)作为内参。实时定量 RT-PCR 操作严格按照 Realtime PCR Master Mix (SYBR Green) 说明书 (TOYOBO 公司),使用仪器为 Roche LightCycler 1.5(Roche)。对每例样本进行单独检测。

表1 实时定量 RT-PCR 验证的基因及其引物

基因名称	引物	产物长度	Tm 值
RASSF5	Fwd : CACGGAGGTCCTCAGCTTTG	132	62.5/60.4
	Rev : GGTTTGCCCTGGGATTCTCTT		
PAG1	Fwd : AGCCGTTTCAGTTACTAGCCTG	129	61.5/60.2
	Rev : CTGGACTTCCTCGTAATGCTG		
ELOVL2	Fwd : CTTCTCTCCGCTACATGCTG	117	62.8/62.1
	Rev : CACCTTGCTACCCGGATG		
ACTB	Fwd : CAGAGCCTCGCCTTTGCCGAT	250	60.8/60.2
	Rev : GCGAAGCCGGCTTGCACAT		

2.6 统计学方法 运用 Microsoft Excel 计算每个基因在各组中的平均值和标准差,对同一个基因在两组间的结果做 *t* 检验。

3 研究结果

3.1 差异表达基因 见表 2、表 3、表 4。乙肝肝肾阴虚证与肝郁脾虚证之间共有 29 428 条共同表达的基因,713 条差异表达基因($P < 0.05$)。通过对 713 条差异表达基因的聚类分析发现,乙肝肝肾阴虚证与肝郁脾虚证能够完全区分。其中,上调的有 285 条,下调的有 428 条。435 条基因表达有显著性差异($|\text{foldchange}| \geq 2, P < 0.05$),其中上调的有 201 条,下调的有 234 条。肝肾阴虚证与健康者之间有 689 条基因表达有明显差异($|\text{foldchange}| \geq 2, P < 0.05$),其中上调的有 396 条,下调的有 293 条;肝郁脾虚证与健康者之间有 8 579 条基因表达有明显差异($|\text{foldchange}| \geq 2, P < 0.05$),其中上调的有 4 092 条,下调的有 4 487 条。从基因数目上看,肝郁脾虚证所调变的基因远多于肝肾阴虚证。

3.2 用基因本体论(GO)分析证候间的差异基因 对乙肝肝肾阴虚证和肝郁脾虚证 2 组相对于健康组的差异表达基因进行基因本体论(gene ontology)分析发现,两者之间共有的 GO 有 259 个,包括转录终止因子的活性、过氧化物酶活性、干

表2 肝肾阴虚证与肝郁脾虚证之间的差异表达基因

探针 ID	基因名称	差异倍数	基因表达
NM_182663	RASSF5	34.3453	上调
NM_017424	CECR1	28.3053	上调
NM_019043	APBB1IP	25.5165	上调
BC112159	PAG1	19.1735	上调
AL157480	SH3BP1	17.7785	上调
NM_001228	CASP8	15.4722	上调
XM_166227	MPEG1	10.3613	上调
NM_003407	ZFP36	8.1947	上调
BC020774	GNG2	7.7211	上调
BC050278	ELOVL2	4.2437	上调
NM_006607	PTTG2	0.1376	下调
NM_016343	CENPF	0.1272	下调
BC005871	C10orf58	0.0638	下调
BC005272	MGP	0.0545	下调
BC001422	PGF	0.0209	下调

表3 肝肾阴虚证与健康者之间的差异表达基因

探针 ID	基因名称	差异倍数	基因表达
NM_005561	LAMP1	8.2193	上调
BC041396	RANGAP1	7.0271	上调
XM_293943	LOC340096	0.1497	下调
NM_001011658	TRAPPC2	0.1454	下调
AK128235	FLJ43944	0.1308	下调
NM_003531	HIST1H3C	0.1303	下调
NM_005431	XRCC2	0.1193	下调
BC096124	CCL18	0.1188	下调
BC037870	C10orf81	0.1176	下调
XM_934733	LOC400927	0.1098	下调
NM_001001875	TPD52L3	0.1081	下调
NM_003537	HIST1H3B	0.1004	下调
NM_207491	KIAA1680	0.0949	下调
XM_372592	LOC145814	0.085	下调
NM_000761	CYP1A2	0.0724	下调

细胞的维持等;肝肾阴虚证独有的 GO 有 7 个,包括氮氧化物合成酶调节物活性、RNA 多聚酶 转录因子活性和神经递质转运体活性等;肝郁脾虚证独有的 GO 有 77 个,包括补体成分 C1 复合物、细胞动力学过程和多器官过程的调节等。

3.3 证候间差异表达基因的信号转导通路(Pathway)分析 对乙肝肝肾阴虚证和肝郁脾虚证相对于健康者的差异表达基因进行信号转导通路分析发现,两者之间共有的通路有 295 个,包括抗原处理与提呈、细胞因子-细胞因子受体反应和脂肪酸代谢等;肝肾阴虚证独有的通路有 23 个,包括 GPCR 信号的衰减、 γ -氨基丁酸受体存在周期和细胞老化等;肝郁脾虚

证独有的通路有 144 个, 包括 cAMP 依赖性蛋白激酶 PKA 的活化、花生四烯酸代谢和补体途径等。

表 4 肝郁脾虚证与健康者之间的差异表达基因

探针 ID	基因名称	差异倍数	基因表达
BC002576	MMP2	320.2125	上调
BC008849	PTRF	233.6297	上调
NM_001235	SERPINH1	138.3444	上调
NM_002291	LAMB1	134.0507	上调
NM_174896	C1orf162	0.0085	下调
BC025698	AOAH	0.0075	下调
NM_000560	CD53	0.0071	下调
NM_002985	CCL5	0.0069	下调
BC018749	IGLV2-14	0.0065	下调
NM_002125	HLA-DRB5	0.0052	下调
NM_000733	CD3E	0.0048	下调
NM_178272	PILRA	0.0044	下调
BC009956	HLA-DPA1	0.0043	下调
NM_002003	FCN1	0.0023	下调
NM_000239	LYZ	0.0019	下调

3.4 RASSF5、PAG1、ELOVL2 mRNA 的表达 见表 5。为了验证基因芯片的结果, 笔者选择了 RASSF5、PAG1 和 ELOVL2 三个基因进行了实时定量 RT-PCR 检测, 其结果与基因芯片结果趋势一致。由于个体差异较大, 无论在乙肝肝肾阴虚证与肝郁脾虚证之间, 还是在乙肝患者与健康者之间, 尽管 RASSF5、PAG1、ELOVL2 mRNA 的差异表达明显, 但均无显著性意义($P > 0.05$)。

表 5 RASSF5、PAG1、ELOVL2 mRNA 的表达($\bar{x} \pm s$)

基因	肝郁脾虚证	肝肾阴虚证	健康者	基因表达	P 值	基因表达(芯片)
RASSF5	0.0511±0.0365	0.0134±0.1700	0.106±0.0677	上调	0.15	上调
PAG1	0.0063±0.0060	0.0075±0.0120	0.0185±0.0156	上调	0.78	上调
ELOVL2	0.0000±0.0001	0.0043±0.0125	0.0000±0.0000	上调	0.29	上调

4 讨论

“有诸内必形诸外”, 疾病的外在发展必有其内在规律。证候体现着全身不同系统、不同组织及细胞、分子水平的综合

变化, 而基因表达谱的变化反映的细胞或组织特异性表型和表达模式, 与临床上出现的症状和体征有着必然的内在联系。因此, 从分子水平探讨基因表达与中医证候表型的关联, 阐明证候的分子生物学基础, 是实现中医临床及其理论突破的关键科学问题之一^[4~5]。

本研究采用基因芯片技术, 比较乙肝两个常见证候肝肾阴虚证和肝郁脾虚证中基因差异表达, 探讨乙肝中医临床证候分型与患者白细胞中 mRNA 表达之间的关联。结果发现, 乙肝肝肾阴虚证和肝郁脾虚证患者之间, 乙肝患者与健康者之间的基因表达谱都存在明显的差异表达。这提示乙肝中医临床辨证分型具有分子生物学基础, 与基因差异表达密切相关; 其肝肾阴虚证和肝郁脾虚证之间基因的功能差异主要体现在炎症反应、免疫和细胞动力学等方面。

本研究存在的不足之处及今后需要解决的问题有: 用于芯片检测的样本例数太少, 结果说服力不强。今后须开展多中心、大样本量的研究, 建立数据库, 为乙肝及其证候的诊断和分子生物学机制的研究提供可靠的依据。影响疾病及证候发生发展的因素很多, 不是仅用基因表达就可以解释清楚的, 本研究仅仅为证候的研究提供一些参考。

[参考文献]

- [1] 陈益水, 张国梁. 慢性乙型肝炎中医证候学研究进展[J]. 中华实用中西医杂志, 2008, 21(8): 620-621.
- [2] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010年版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2011, 4(1): 1-13.
- [3] 中华中医药学会内科肝病专业委员会. 病毒性肝炎中医辨证标准(试行)[J]. 中医杂志, 1992(5): 39-40.
- [4] 苏式兵, 胡义扬, 赵立平, 等. 慢性乙型病毒性肝炎中医证候生物学基础的研究思路[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(2): 252-255.
- [5] 刘心亮, 熊益群, 晏雪生, 等. 基因表达谱芯片在乙型肝炎肝硬化生物学信息的研究[J]. 实用医学杂志, 2005, 21(13): 1384-1385.

(责任编辑: 骆欢欢)