

基因芯片技术用于中医药治疗类风湿性关节炎的研究进展

刘 静¹, 刘东博¹, 申秀萍¹, 应森林^{2*}

1. 天津药物研究院, 天津 300193

2. 天津中医药大学, 天津 300193

摘要: 类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种致残率极高、临床治愈率低的自身免疫性疾病, 被认为是一种多因素参与、多基因改变协同作用的结果。如何有效治疗 RA 值得医药界研究人员的探讨。随着中医药技术的发展, 基因芯片技术已从基础研究逐步应用于新药研发和临床诊断, 为进一步研究治疗 RA 提供了新的思路及方法。

关键词: 类风湿性关节炎; 基因芯片; 基因表达谱

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2011)06-0453-04

Advances in studies on gene chip technology used in treatment of rheumatoid arthritis by traditional Chinese medicine

LIU Jing¹, LIU Dong-bo¹, SHEN Xiu-ping¹, YING Sen-lin²

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune diseases of high morbidity and low clinical cure rate, which is considered to be the results of multi-factor and multi-gene interacting. It is worth for the researchers in pharmaceutical field to explore how effective treatment of RA. With the development of traditional Chinese medicine technology, gene chip and other advanced technology have been gradually applied to new drug discovery and clinical diagnosis from basic research with providing a new approach of thought and method for RA further research.

Key words: rheumatoid arthritis (RA); gene chip; gene expressing profiling

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种以关节滑膜炎为主的慢性多发性自身免疫性疾病, 目前其病理机制尚未完全明确, 是一种以关节病变为主的全身性疾病, 对人体健康危害极大, 致残率极高, 其遗传率达 30%~50%。RA 的治疗贵在早期发现、早期治疗, 急性活动期的有效治疗是减轻病残的关键, 但目前尚缺乏特异性的治疗方法。现代医学探索各种联合用药治疗 RA, 虽然有一定的疗效, 但长期服用不良反应较大, 许多患者不能坚持治疗; 而中医药疗效肯定, 不良反应较少, 因此国内采用中医中药治疗 RA 日益受到患者的欢迎。中医药在长期的临床实践中积累了治疗 RA 的丰富经验, 并取得了较好的临床效果。如何更为有效治疗 RA 值得医药界研究人员的探讨。

随着医药技术的发展, 基因芯片技术、代谢组

学技术、蛋白质组学技术等先进技术已从基础研究逐步应用于新药研发和临床诊断。基因芯片技术也称之为 DNA 微阵列 (DNA array), 寡核苷酸微芯片 (oligo nucleotide microchip) 或寡核苷酸微阵列 (oligo nucleotide microarray), 其最显著的特点是高通量、高集成、多样化和自动化^[1-3]。本文综述了基因芯片技术在中医药治疗 RA 中的研究进展。

1 RA 动物模型

在中医药防治 RA 的实验研究中, 首先不可回避 RA 的模型问题, 而中医又具有辨证论治的特殊性, 因此在造模上给研究者提出了更高的要求。而利用基因芯片技术可以分析不同 RA 模型动物与正常动物表达基因的差异, 探讨不同动物模型与人类 RA 的相似程度, 从而为研究 RA 的治疗药物提供实验基础。RA 属于中医“痹证”范畴, 目前中医

收稿日期: 2011-08-21

作者简介: 刘 静 (1980—), 女, 从事药理毒理研究工作。Tel: (022)23006905 E-mail: liuj@tjipr.com

*通讯作者 应森林, 男, 教授, 研究方向为类风湿性关节炎临床及药理研究。E-mail: yingsl888@163.com

药治疗 RA, 临床上多在明确西医诊断的基础上进行辨证论治, 即辨病与辨证相结合, 同时中药药理学研究使用的 RA 模型也多为西药研究的 RA 模型, 缺乏病证结合模型的特点。目前国内外学者研究较多的也是常用的几种 RA 模型的基因表达图谱, 如 Wester 等^[4]分析了朴日斯烷诱导的 RA 模型大鼠腹股沟淋巴结组织基因表达情况, 结果发现 Mhc II、Mmp9、Ptpn16 表达上调, 免疫球蛋白、CD28、Ces2、cyclin G1 等表达下调。Rioja 等^[5]分析了链球菌细胞壁诱导的 RA 模型大鼠踝关节的基因表达, 发现 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 、TNFRSF1b、IL-1Rn、NOS2、CD8a、VAV1、LST1、LCP2、FCGR2、PTGES、MHC 等与免疫和炎症反应相关的基因表达上调, TNFIP6、FCNB、versican、ICAM1、ITGAM 等参与细胞黏附的基因表达上调。Shou 等^[6]分析了 CIA 模型大鼠外周血单核细胞与对照组的基因表达, 发现 Fibrillarlin、Mpeg1、Cspg2、Lst1、Bzrp、Sepr、Usp10、Veriscan 等基因表达上调。

CIA 模型原理是皮内注射同源或异源性 II 型胶原(与弗氏完全佐剂或弗氏不完全佐剂混匀、乳化)从而引起实验动物的多发性关节炎。众多研究发现 CIA 模型与 RA 的发病较为相似, 而且模型动物滑膜等组织取材容易, 因而研究 CIA 的基因表达图谱同样有利于研究 RA 的发病机制。Gierer 等^[7]分析了 CIA 模型早期小鼠关节滑膜组织的基因表达, 发现细胞黏附分子和促炎因子基因表达增加。目前国内学者也开始研究 CIA 模型大鼠滑膜组织基因的表达情况。如王安宇等^[8]利用基因芯片技术研究 CIA 模型组大鼠与对照组滑膜基因表达的区别, 以期从众多基因中找到 CIA 致病的靶基因, 为探讨 RA 的发病机制及临床治疗找到切入点, 结果发现 TGF- β 3、MMP10、MMP11、TNF- α 、CD44、IL-2、Pdgfrb、Csf3 基因表达上调, 而表达下调的基因有 Pde4a、Pde4d、Pde3b、IL-10、IFN- γ 。其差异表达基因与人 RA 差异表达基因存在关联性, 但与人易感基因同源的鼠类易感基因 RT1E、H2r、H2q 未见差异表达, 提示 CIA 发病机制可能与易感基因无关。

中医 RA 证候的动物模型现在研究的比较少, 仅有部分学者进行了寒湿、肾虚等因素对 CIA 模型动物的影响及寒湿对正常动物免疫系统影响的研究^[9-13]。如何利用基因芯片技术研究中医 RA 证候动物模型, 探讨动物模型与中医证候的相关性需要中医药学者进一步研究。

2 药物治疗 RA 的机制

中药与西药相比, 具有所含有效成分多样化、作用多靶点、双向性、量效关系复杂性等特点, 难以用现代医学理论解释。现阶段中药复方配伍只能根据传统的中医理论进行辨证论治, 其治疗机制利用传统生物学方法难以研究透彻, 不利于中医药的发展。而基因芯片技术的迅速发展, 可以监测机体所有基因的表达变化, 使得建立中药基因表达差异谱数据库成为可能, 将中药与现代基因组学的疾病相关基因图谱统一起来, 能够在中药和基因表达之间架起一座桥梁, 在基因表达水平上解释中药理论和中药的作用机制, 最终实现 RA 证候基因组与中药基因组的对接, 形成防治 RA 的新的病证结合理法方药系统。目前国内学者利用基因芯片技术研究中药复方治疗 RA 的作用机制刚刚起步, 如王安宇等^[14]研究了痹肿消汤对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜基因表达谱的影响, 发现差异表达基因主要涉及一些生长因子、癌基因、细胞因子及基质金属蛋白酶家族; 痹肿消汤主要下调 TNF- α 、基质金属蛋白酶 II、c-fos 诱导生长因子等。黄闰月等^[15]则探讨了复方丹参注射液对类风湿关节炎基因表达影响研究的可行性。

中药多成分、多途径、多靶点的作用特点决定了其系统化研究的趋势, 基因芯片技术以其高通量、高内涵的优势介入了现代中药研究, 能够针对中药的特点进行深入系统的研究, 同时能够建立中药的不同有效成分、不同配伍与药理作用之间的联系, 这非常符合中医重视整体治疗、纠正阴阳平衡失调的治疗观, 也为成分复杂的中药及中药复方药理作用机制的研究提供了新思路。

3 RA 不同证型与基因多态性的关系

对于 RA 等病因复杂、多因素参与、多基因改变的全身免疫性疾病, 西医药治疗仅能对症治疗, 不能做到彻底治愈, 而且长期服用甾体抗炎药、非甾体抗炎药等西药不良反应较大, 不利于提高患者的生活质量。RA 属中医理论中痹证范畴, 中医治疗痹证, 一般根据局部症状、体征以及全身表现、舌苔、脉象进行辨证论治, 常分为风寒湿痹、风湿热痹、痰瘀痹阻证和肝肾两虚证 4 个基本证型, 证型不同治法也不同, 中医的这种辨证论治的治疗理念最能体现中医诊治特色, 同时也取得了很好的治疗效果。但中医辨证施治侧重于宏观调控, 诊断疾病的依据往往显得较为笼统, 其基础理论尚未被现

代医学手段证明, 缺少与现代医学的衔接。

国内外研究资料表明, 人类许多疾病的发生发展都与某些相应的基因出现异常的扩增、重排、缺失、突变、功能异常或表达异常有关。其中, 基因表达水平的变化反映了机体特定阶段的生命特征, 对疾病的诊断和临床分型等有重要意义。随着基因芯片技术的发展, 具有高通量、机体信息完整优点的基因芯片在中医药领域中的应用也逐渐增加。已有研究证实特异疾病的证候与基因存在明确的相关性。柴可夫等^[16-17]研究了气阴两虚证、湿热困脾证 2 型糖尿病患者的基因表达图谱, 发现有 2 条特异性上调表达基因 CD28、ADRB3 和 1 条特异性下调表达基因 PIK3RI, 仅存在于气阴两虚证 2 型糖尿病患者中, 而在其他证型中未见异常表达; 同时发现有 5 条特异性下调表达基因, 仅存在于湿热困脾证中, 而在其他证型中未见有异常表达, 它们分别是 CCR2、INPPI1、AKT2、CEACAM1、NFKB1。

随着对基因组结构和功能研究的逐渐深入, 基因芯片技术也逐渐应用于 RA 的诊断治疗。利用基因芯片技术, 从基因水平着手研究探讨中医对 RA 证型分类的基因基础及中医药对 RA 患者的整体调控作用的机制, 将中医药治疗 RA 的理论基础与现代医学相结合, 可能是中医药治疗 RA 的发展方向。赵林华等^[18-20]研究比较了早期与非早期 RA 患者、寒证与热证候患者、活动期与稳定期患者 3 组不同证候, 不同分型 RA 患者外周血 CD4⁺T 淋巴细胞之间的基因表达差异, 结果发现不同证候、不同分型的 RA 患者基因表达存在差异。研究发现早期患者与非早期患者比较, $\beta 2$ 微球蛋白表达上调, 激酶锚定蛋白 9、磷脂酶 A2、肿瘤坏死因子受体相关因子 1 等基因表达下调。寒、热证候 RA 患者基因表达谱存在的差异与 RA 患者和健康人之间的差异有所不同, 说明中医证候分类学具有基因表达谱依据; 另外 RA 患者寒、热证型差异基因表达所涉及的基因中与免疫相关的基因不占大多数, 提示 RA 寒、热证候的差别可能与免疫因素的相关性不大。研究还发现活动期与稳定期 RA 患者相比, 有 63 个基因表达存在显著性差异, 主要涉及免疫应答基因, 如集落刺激因子受体、Mhc II、补体 C 段、干扰素等基因。以上研究初步证实了不同证候的 RA 患者具有不同的基因表达, 说明可以利用基因芯片技术研究 RA 患者基因表达图谱, 对基因表达图谱进行聚类分析, 将基因多态性与中医临床证候进行关联性

分析, 寻找 RA 不同证候特异的差异表达基因, 从而将中医的诊断标准与特定基因组结合, 利用微观的基因组学来阐明宏观的中医理论。

但是, 由于中医证候的实质研究在临床设计上很难做到完全严谨, 如中医证候的诊断标准常常缺乏客观性, 存在很多模糊性以及 RA 患者基因的多态性和复杂性, 在利用基因芯片技术进行证候分析时常出现患者的选择或分层不够准确及干扰因素多等问题。Haas 等^[21]分析了双胞胎 (双胞胎之一为 RA 患者) 之间 B 淋巴细胞的基因表达差异。寻找了 11 对双胞胎, 分析双胞胎中 RA 患者及非 RA 患者的差异表达基因, 结果共发现了 1 163 个基因表达差异, 其中表达上调最显著的 3 个基因是 FLJ90650、HSD11B2 和 CYR61, 表达下调显著的基因有 IRF7 和 MYO1B 等。这些表达差异显著的基因可能作为类风湿性关节炎的标志基因。分析 RA 患者与其双胞胎或亲属之间的差异表达基因, 排除其他因素的干扰, 寻找 RA 特异的差异表达基因, 再将这些差异表达基因按证候进行聚类分析, 这样找到的每一证候特异的差异表达基因组更为准确。

4 结语

基因芯片技术凭借其表达信息的丰富性和完整性在研究中医证候的分型、RA 的发病机制以及中药治疗 RA 作用机制的研究中具有很好的优势, 打开了利用现代生物医学手段研究中医基础理论的大门, 实现了中西医思维的交融, 并达成了微观与宏观现象的融合, 进一步促进中医药防治 RA 取得突破性进展, 也为中药的物质作用基础与功效的联系找到了一个切实可行的研究方法。

参考文献

- [1] 张仲林, 彭成. 基因芯片技术在中医药研究领域中的应用 [J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(2): 190-192.
- [2] 石恩林. 基因芯片技术在法医毒理学中的应用前景 [J]. 中国医学理论与实践, 2005, 15(10): 1540-1541.
- [3] 刘静, 张金晓, 胡金芳, 等. 基因芯片技术在药物毒理学研究中的应用 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(2): 115-119.
- [4] Wester L, Koczan D, Holmberg J, et al. Differential gene expression in pristane-induced arthritis susceptible DA versus resistant E3 rats [J]. *Arthritis Res Ther*, 2003, 5(6): 361-372.
- [5] Rioja I, Clayton C L, Graham S J, et al. Gene expression

- profiles in the rat streptococcal cell wall-induced arthritis model identified using microarray analysis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(1): 101-117.
- [6] Shou J, Bull C M, Li L, *et al*. Identification of blood biomarkers of rheumatoid arthritis by transcript profiling of peripheral blood mononuclear cells from the rat collagen-induced arthritis model [J]. *Arthritis Res Ther*, 2006, 8(1): 1-14.
- [7] Gierer P, Ibrahim S, Mittlmeier T, *et al*. Gene expression profile and synovial microcirculation at early stages of collagen-induced arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(4): 868-876.
- [8] 王安宇, 梁清华, 李春燕. 胶原诱导性关节炎大鼠滑膜基因表达谱的 cDNA 微阵列研究 [J]. 中华风湿病学杂志, 2005, 9(1): 31-33.
- [9] 王安民, 吕爱平, 曾晓莲. 大鼠实验性痹证模型建立及其病理学研究 [J]. 中华中医骨伤科杂志, 1988, 4(2): 8-11.
- [10] 徐世杰, 吕爱平, 张春英, 等. 切除卵巢致肾虚对 II 型胶原诱导的关节炎小鼠 IL-2 和 IL-6 含量的影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1998, 4(10): 33-35.
- [11] 徐世杰, 吕爱平, 王安民, 等. 卵巢切除所致肾虚对免疫性关节炎小鼠血清骨钙素和肿瘤坏死因子的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(1): 34-36.
- [12] 陈 新, 区永欣, 陈洁文. 人工风寒环境对小鼠单核巨噬细胞系统吞噬功能的影响 [J]. 中国中西医结合杂志, 1993, 13(12): 739-740.
- [13] 陈 新, 区永欣, 陈洁文, 等. 亚急性风寒环境对小鼠免疫功能影响 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1998, 4(3): 18-20.
- [14] 王安宇, 梁清华, 唐发清, 等. 痹肿消汤对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜基因表达谱的影响: cDNA 微阵列研究 [J]. 中国临床康复, 2005, 9(11): 42-43.
- [15] 黄闰月, 黄清春, 沈 鹰. 复方丹参注射液对类风湿关节炎基因表达影响研究可行性探讨 [J]. 中国中医药信息杂志, 2008, 15(1): 91-92.
- [16] 柴可夫, 黄晓玲, 钱俊文. 2 型糖尿病中医气阴两虚证的基因表达研究 [J]. 中华中医药学刊, 2009, 27(7): 1351-1354.
- [17] 柴可夫, 黄晓玲, 钱俊文, 等. 2 型糖尿病中医湿热困脾证的基因表达研究 [J]. 浙江中医药大学学报, 2009, 33(5): 688-692.
- [18] 赵林华, 吕 诚, 肖 诚, 等. 早期和非早期类风湿关节炎患者外周血 CD4⁺T 细胞基因表达差异 [J]. 现代免疫学, 2006, 26(4): 336-339.
- [19] 肖 诚, 吕 诚, 赵林华, 等. 活动期和稳定期类风湿性关节炎寒热证候患者外周血 CD4⁺T 淋巴细胞基因表达谱探索 [J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(3): 14-16.
- [20] 吕 诚, 肖 诚, 赵林华, 等. 寒热证候类风湿性关节炎患者外周血 CD4⁺T 淋巴细胞基因表达谱初步探索 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2006, 12(2): 130-133.
- [21] Haas C S, Creighton C J, Pi X J, *et al*. Identification of genes modulated in rheumatoid arthritis using complementary DNA microarray analysis of lymphoblastoid B cell lines from disease-discordant monozygotic twins [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54(7): 2047-2060.