

## 气虚证大鼠垂体高表达且上调的基因\*

□刘小美\*\* 方肇勤\*\* 卢文丽 潘志强 管冬元 梁超

(上海中医药大学基础医学院 上海 201203)

高必峰 (科罗拉多大学医学院 丹佛 CO 80262)

**摘要:**目的:通过筛选正常气虚、高血压气虚、糖尿病气虚等气虚大鼠垂体高表达且上调的基因,探索气虚证在垂体基因表达层面的物质基础。方法:采用16周龄Wistar大鼠、自发性高血压大鼠(SHR大鼠)、自发性糖尿病大鼠(GK大鼠),综合应用标准化大鼠诊法,及GeneChip Rat Gene 1.0 ST Array等技术,检测正常Wistar大鼠、正常气虚Wistar大鼠、SHR气盛大鼠、SHR气虚大鼠、GK气盛大鼠、GK气虚大鼠等垂体基因的表达,重点关注3个气虚证中垂体基因表达大于1000且较正常一致上调的基因。结果:共筛选得到34个基因:Arhgdia、Arfgap1、Rab 21、Arf5、Arf3、Cdipt、Cds2、Pld3、Ppp3ca、Ppp3cb、Trim35、Itm2b、Itm2c、Tob1、Oaz1、Maged1、Gpc4、Glg1、wdr6、Scarb2、Grn、Hnrpd、Hnnpab、Snrpb、Gtf2i、Ascl1、Pnrc1、Eef2、Eno2、Gls、Ucp2、Atp6v0c、Pomc、Syp。结论:鉴于以上基因中参与基因转录和翻译有关的基因,以及参与能量代谢相关基因表达活跃,一些调控有关靶器官的功能性基因,如POMC亦表达活跃,且大多与细胞活动有关的基因表达增加,提示气虚证大鼠垂体处于一种积极的代偿状态,这可能是气虚证在垂体层面的物质基础。

**关键词:**高血压 糖尿病 垂体 气虚 证候 基因 基因芯片

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2010.05.009

辨证论治是中医的特色。根据疾病的同病异证与异病同证,采用同病异治和异病同治之法。以往研究发现<sup>[1-3]</sup>,荷瘤小鼠、自发性高血压大鼠(SHR大鼠)、DOCA-盐及肾性高血压大鼠、自发性糖尿病大鼠(GK大鼠)、STZ造模糖尿病大鼠等均存在证候的自然演变,且同病异证、异病同证现象非常普遍。那么同病异证、异病同证是否存在内在共同的物质基础呢?以往

研究表明,证候,尤其是虚证,与下丘脑-垂体-内分泌轴的功能紊乱有关。我们已有的研究也显示,H22荷瘤小鼠在垂体、肾上腺、性腺等基因表达谱层次均显示了其同病异证的物质基础<sup>[4-6]</sup>,那么异病同证是否也具有其共同的物质基础呢?最近,我们综合采用了大鼠四诊工作站及其诊法和辨证标准,以及GeneChip Rat Gene 1.0 ST Array,对正常大鼠、正常气虚大鼠、SHR气盛大鼠、SHR气虚大鼠、GK气盛大鼠、GK气虚大鼠进行了下丘脑-垂体-内分泌轴基因表达谱的

收稿日期:2009-12-21

修回日期:2010-03-08

\* 上海市科委国际合作项目(064307052):中医药有关肿瘤辨证论治机制的系统生物学研究,负责人:方肇勤。

\*\* 联系人:刘小美,主要研究方向:证和辨证论治的基础研究,Tel:021-51322117,E-mail:wfjlxm2005@126.com;方肇勤,主要研究方向:证和辨证论治基础研究,Tel:021-51322115,E-mail:zqfang@sh163.net。

检测。本文就其中 3 个气虚证大鼠垂体高表达且较正常一致上调的基因报道如下。

## 一、材料与方法

### 1. 材料

#### (1) 实验动物。

16 周龄 Wistar 雄性大鼠 63 只,16 周龄雄性 SHR 大鼠和 GK 大鼠各 52 只,购自上海斯莱克实验动物有限公司(动物生产许可证号:2007-0005)。每笼 5 只,自由饮水和摄食,光照明暗周期 12 h,室温  $(21\pm 1)^\circ\text{C}$ ,湿度  $(50\pm 10)\%$ 。

#### (2) 试剂。

Trizol(GIBCO BRC)、RNeasy Mini Kit(QIAGEN),RNA Nano LabChip 及 GeneChip Rat Gene 1.0 ST Array 及其试剂盒。

#### (3) 仪器。

大鼠四诊计量化检测设备见相关文献<sup>[7-8]</sup>; Agilent-bioanalyzer 2100,以及 Affymetrix 的芯片杂交炉、芯片洗涤系统、芯片扫描仪等。

### 2. 方法

#### (1) 入选实验的动物。

剔除体重过小或过大,以及状态不佳大鼠,最后用以辨证的大鼠为正常组 60 只,SHR 大鼠和 GK 大鼠各 50 只。

#### (2) 四诊计量化检测方法。

参见有关文献<sup>[7-8]</sup>。

#### (3) 气盛衰度计量化检测指标与辨证标准。

气盛衰度=各大鼠水平/正常均数 $\times 0.3$ +各大鼠直立/正常均数 $\times 0.2$ +各大鼠抓力/正常均数 $\times 0.5$ 。辨证标准:与正常组比较,大于 1.30 为气盛,小于 0.9 为气虚,小于 0.8 为气亏,小于 0.7 为气损。

于动物饲养后 1 周进行第 1 次四诊检测,记为 1st,第 24d 进行第 2 次检测,记为 2nd。

#### (4) 证候大鼠的确定。

以 1st 检测作为参考,以 2nd 检测为准。辨证并筛选出最为典型的正常、正常气虚证(简称正气虚)大鼠各 4 只,SHR 气盛大鼠(简称高气盛)、SHR 气虚大鼠(简称高气虚)、GK 气盛大鼠(简称糖气盛)和 GK 气虚(简称糖气虚)大鼠各 4 只。

#### (5) 不同证候大鼠处死与取材。

于 2nd 检测后处死以上各证候和正常对照大鼠,取下丘脑、垂体、甲状腺、肾脏、肾上腺、睾丸、胰腺 7

种组织,各组 4 个样本合并用于 RNA 抽提和芯片检测。

#### (6) 组织 RNA 的提取与检测。

以上共 6 组样本采用 Trizol 和 RNeasy Mini Kit 及其方法分离和纯化 RNA;采用 RNA Nano LabChip 和方法检测 RNA 的质量。

#### (7) 芯片检测。

采用 Affymetrix 的 GeneChip Rat Exon 1.0 ST Array 及其试剂盒所建议的检测方法。依据检测结果和 Affymetrix 建议的方法,采用 iterPlier 法计算核心基因表达读数。

以上 RNA 质量和芯片检测委托上海生物芯片有限公司完成。

(8) 3 个气虚证候垂体高表达且较正常一致上调基因的筛选。

基因芯片共得到 8260 个基因,筛选正常、正气虚、高气虚、糖气虚 4 组样本垂体基因表达量均大于 1000 的基因;筛选其中正气虚/正常、高气虚/正常、糖气虚/正常均大于 1.1 的基因;进一步筛选其中高气虚/高气盛、糖气虚/糖气盛大于 1.0 的基因。

#### (9) 统计方法。

以 Matlab7.0 对筛选得到的基因进行聚类,分析其表达模式的相似性。

#### (10) 基因功能的检索。

主要通过 NCBI 数据库中的 Entrez gene 检索大鼠某基因的分布、参与生物过程和简单功能等,其次通过 CNKI 数据库查找相关基因的综述,借以分析个别基因相互之间的作用关系。

## 二、结果

### 1. 动物的处理

于 2nd 检测结束后处死筛选得到的正常、正气虚、高气盛、高气虚、糖气盛及糖气虚大鼠各 4 只,剩余动物用于个体化辨证论治,实验结果另文介绍。

### 2. 气虚证大鼠垂体高表达且一致上调的基因数

在芯片 8260 个核心基因中,采用以上筛选条件,得到正气虚大鼠、高气虚和糖气虚大鼠垂体高表达且一致上调的基因 34 个。

### 3. 气虚证大鼠垂体高表达且一致上调基因的聚类分析

对所得 34 个基因进行组间聚类分析,发现这些基因在 3 个气虚证候间的相似性确实大于其与正常

组的相似性(如图1),且正气虚与高气虚的相似性最大,其次是糖气虚。

#### 4. 气虚证垂体高表达且一致上调基因的特征

(1)与细胞活动有关的基因。

34个基因中,共有21个基因与细胞的活动有关。具体表达情况见表1:

Rho GDP 解离抑制因子(GDI) $\alpha$ (Arhgdia)和ADP核糖基化因子GTP酶激活蛋白1(Arfgap1)均为Ras同源物Rho蛋白的负调控因子<sup>[9]</sup>,有活性的Rho蛋白与下游效应器结合,调节细胞骨架成分运动,改变细胞形态、极性以及促进细胞增殖等。Rho与表中的RAS癌基因家族成员(Rab21)、ADP核糖基化因子5(Arf5)、ADP核糖基化因子3(Arf3)均属于Ras家族成员,Rab21调节细胞的粘附与迁移,Arf5、Arf3均参与细胞内囊泡的形成和转运,目前对其具体的研究不多。

CDP二酰甘油肌醇3磷脂酰转移酶(Cdipt)、CDP二酰甘油合成酶2(Cds2)、磷脂酶D家族,成员3(Pld3)、蛋白磷酸酶3,催化亚基, $\alpha$ 同工型(Ppp3ca)和蛋白磷酸酶3,催化亚基, $\beta$ 同工型(Ppp3cb)均与磷脂酰肌醇途径有关。Cdipt可催化磷脂酰肌醇的生物合成以及磷脂酰肌醇与肌醇的交换,同时它又能减少细胞内过高的磷脂酰肌醇,即Cdipt在维持细胞内磷脂酰肌醇浓度稳定中发挥作用。而Cds2可提供磷脂酰肌醇合成的重要前体物质CDP-二酰甘油。Ppp3ca和Ppp3cb作为钙调磷酸酶存在于磷脂酰肌醇下游通路中。

含三联基元35(Trim35)和融入膜蛋白2B(Itm2b)可诱导细胞凋亡,融入膜蛋白2C(Itm2c)与Itm2b同属Itm2家族,但Itm2c的功能目前还不太清楚。ERBB2转导因子1(Tob1)编码的蛋白为一种抗增殖蛋白,主要是负性调控成骨细胞和T细胞的增殖。鸟氨酸脱羧酶抗酶1(Oaz1)为多胺合成调节酶(鸟氨酸脱羧酶)的抗酶,多胺是细胞增生、分化和移行的基础性物质,抗酶表达的上升可负反馈调节多胺功能的发挥。黑素瘤抗原家族D1(Maged1)可促进神经生长因子与其低亲和力受体p75NTR结合,同时对抗其与高亲和力受体Trk的结合,从而促进p75NTR介导的细胞凋亡。磷脂酰肌醇聚糖

4(Gpc4)常与硫酸乙酰肝素(HS)结合为硫酸乙酰蛋白聚糖,HS和高尔基器蛋白1(Glg1)均能与碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)结合,使bFGF保持在无活性状态(活性状态的bFGF能够促进细胞生长和血管生成),同时Glg1参与细胞内蛋白质的运输。WD重复域6(Wdr6)参与阻止细胞周期,从而负性调控细胞的分化。清道夫受体类B2(Scarb2)编码一种溶酶体膜蛋白CD36,参与细胞粘附,其上调可促进细胞的粘附。颗粒体蛋白(Grn)具有细胞因子样作用,在



图1 筛选得到的34个基因组间聚类分析图

表1 与细胞活动有关基因的表达情况(芯片读数计算值)

Mrna-accession	缩写	正常	正气虚	高气虚	糖气虚	糖气虚
NM_001007005	Arhgdia	1029	1891	1483	1663	1432
NM_145090	Arfgap1	1012	1473	1476	1835	1192
NM_024149	Arf5	1145	1461	1169	1564	1018
NM_080904	Arf3	1281	1894	1467	1751	1535
NM_001004238	Rab21	1008	1222	844	1163	964
NM_138899	Cdipt	1014	1201	994	1195	984
NM_053643	Cds2	1566	2084	1979	2204	1937
NM_001012167	Pld3	1297	2059	2062	2203	2049
NM_017041	Ppp3ca	1033	1207	1148	1263	861
NM_017042	Ppp3cb	1192	1325	954	1324	991
NM_001025142	Trim35	1194	1658	1309	1554	1111
NM_001006963	Itm2b	3035	3384	3148	3363	3246
NM_001009674	Itm2c	2231	3267	2579	2960	2773
NM_133317	Tob1	1615	2243	1624	1895	1547
NM_139081	Oaz1	1396	2193	1533	1980	1524
NM_053409	Maged1	2437	2972	2543	2848	2870
NM_001014108	Gpc4	1047	1230	1358	1598	1192
NM_017211	Glg1	1383	1845	1485	1662	1539
BC084708	wdr6	1105	1888	1397	1612	1502
NM_054001	Scarb2	1198	1389	1267	1336	1264
NM_017113	Grn	1009	1278	1153	1239	1029

炎症、损伤修复和组织重构中发挥重要作用。

以上 21 个基因涉及细胞增殖与抗增殖、粘附与迁移、分化与抗分化以及细胞内蛋白质的运输等功能,提示在气虚发生后,垂体细胞非常活跃。

#### (2)与基因转录和翻译有关的基因。

共有 7 个基因与基因的转录和翻译有关,其具体表达情况见表 2。

不均一核核糖核蛋白 D(Hnrpd)、不均一核核糖核蛋白 A/B(Hnrnpab)、小核核糖核蛋白 B 和 B1(Snrpb)共同参与 mRNA 的成熟过程,对其功能的研究也比较深入。普通转录因子 II<sub>i</sub>(Gtf2i)、无刚毛鳞甲复合体样 1(Ascl1)和脯氨酸丰富核受体辅激活蛋白 1(Pnrc1)参与基因的转录;而真核翻译延伸因子 2(Eef2)在蛋白的翻译过程中可催化 tRNA 由核糖体的 A 位转移至 P 位。

#### (3)与能量代谢有关的基因。

共有 4 个基因与能量代谢有关,其具体表达情况见表 3。

烯醇化酶 2( $\gamma$ , 神经元)(Eno2)参与糖酵解,可将 2,3-二磷酸甘油酸盐催化形成烯醇丙酮酸磷酸,糖酵解的过程可产生 ATP。谷氨酰胺酶(Gls)编码的蛋白可将谷氨酰胺分解代谢为谷氨酸,脑组织只能氧化谷氨酸,却不能氧化其它氨基酸,故 Gls 的上调可为脑组织的提供更多的能量物质。而解偶联蛋白 2(线粒体,质子载体)(Ucp2)的主要功能是调节 ATP 产生热量;ATP 酶, H<sup>+</sup>转运, 溶酶体 16kDa, V0 亚基 c(Atp6v0c)具有 ATP 酶活性,也可将 ATP 水解成 ADP 释放热量。

#### (4)其它基因。

剩余 2 个基因,难以将其分入以上 3 类功能中,具体表达情况见表 4。

阿黑皮素原(Pomc)编码的阿黑皮素原是一种肽激素前体,在垂体 Pomc 主要编码促肾上腺皮质激素(ACTH),ACTH 促进肾上腺糖皮质激素的分泌。正常和疾病气虚大鼠该基因一致上调,提示肾上腺皮质功能减退可能是大鼠气虚的内在物质基础,而垂体处于积极的调控之中。

突触泡蛋白(Syp)可通过将突触小泡锚定于质膜来调节突触的可塑性,突触在神经细胞持续活动影响下可发生特异性的结构

和功能变化,与学习记忆功能关系密切。

### 三、讨论

中医学辨证论治注重同病异证、异病同证。那么异病同证是否存在共同的物质基础呢?如果存在,那么它的物质基础又是什么呢?以往的研究表明,中医证候,尤其是虚证,与下丘脑-垂体-内分泌轴的功能紊乱有关,其中垂体是关键的一环。因此,本文观察并报道了在正常、正常气虚、高血压气虚和糖尿病气虚大鼠垂体中表达均较高(表达高的基因往往具有较为重要的功能),且 3 个气虚证候较正常一致上调的基因,发现异病同证的大鼠垂体基因表达均有较多差异表达一致的基因,提示异病同证是存在某些共同的物质基础的。

无论是正常大鼠,还是疾病大鼠,出现气虚证后,垂体出现大量的基因表达差异,本文重点关注的高表达且一致上调的 34 个基因具有一些普遍的特征:①1/2 以上的基因与细胞增殖与抗增殖、粘附与迁移、分化与抗分化以及细胞内蛋白质的运输等功能有关,提示气虚大鼠垂体处于一种积极的代偿状态,垂体细胞非常活跃,而且一些调控有关靶器官的

表 2 与基因转录和翻译有关基因的表达情况(芯片读数计算值)

Mrna-accession	缩写	正常	正气虚	高气盛	高气虚	糖气盛	糖气虚
NM_024404	Hnrpd	1458	1882	1534	1862	1735	1799
NM_031330	Hnrnpab	1367	1605	1410	1630	1618	1672
NM_134358	Snrpb	1112	1326	1234	1343	1277	1287
NM_001001512	Gtf2i	1291	1747	1456	1519	1362	1590
NM_022384	Ascl1	1635	5238	1965	2288	2754	4324
NM_173322	Pnrc1	1053	1615	1304	1542	1081	1536
NM_017245	Eef2	1530	2756	2777	3041	2395	2668

表 3 与能量代谢有关基因的表达情况(芯片读数计算值)

Mrna-accession	缩写	正常	正气虚	高气盛	高气虚	糖气盛	糖气虚
NM_139325	Eno2	1263	1580	1363	1591	1489	1707
NM_012569	Gls	1246	1503	1263	1566	1160	1397
NM_019354	Ucp2	1358	2292	1864	1920	1543	2116
NM_130823	Atp6v0c	1672	2204	1932	1979	1471	2168

表 4 不属于以上 3 种功能分类基因的表达情况(芯片读数计算值)

Mrna-accession	缩写	正常	正气虚	高气盛	高气虚	糖气盛	糖气虚
NM_139326	Pomc	4454	5863	4252	4925	4838	5519
NM_012664	Syp	2013	2441	2218	2469	2106	2456

功能性基因表达活跃,如 *Pomc*;②参与基因转录和翻译有关的基因表达活跃是其佐证之一;③参与能量代谢相关的基因表达活跃,更为以上假设提供了佐证。

### 参考文献

- 1 潘志强,方肇勤,卢文丽. H22 肝癌与 Lewis 肺癌荷瘤小鼠证候特征比较研究.北京中医药大学学报,2008,(3):184-189.
- 2 卢文丽,方肇勤,潘志强,等. SHR、DOCA-盐及肾性高血压大鼠的证候特征及比较.四川中医,2008,(11):25-28.
- 3 刘小美,方肇勤,卢文丽,等. 糖尿病大鼠的同病异证与异病同证的研究.浙江中医杂志,2008,43(1):10-13.
- 4 刘小美,方肇勤,潘志强,等. 不同证候 H22 荷瘤小鼠垂体一致上调或下调的基因.上海中医药大学学报,2008,22(4):75-79.
- 5 潘志强,方肇勤,卢文丽,等. 肝癌小鼠不同阶段有关证候肾上腺差异表达的基因分析.中西医结合学报,2008,6(8):843-851.
- 6 陈宝英,方肇勤,卢文丽,等. 不同证候荷瘤小鼠睾丸差异表达基因的特征.浙江中医杂志,2009,(8):564-567.
- 7 方肇勤,潘志强,汤伟昌,等. 小鼠四诊工作站构建与操作标准探讨.上海中医药大学学报,2006,20(1):42-46.
- 8 方肇勤,潘志强,卢文丽,等. 大鼠、小鼠常见证候计量化辨证及方法的建立及其评价.中国中医基础医学杂志,2007,13(7):502-505.
- 9 徐艳群,康俊升. Rho/ROCK 蛋白与恶性肿瘤发病机制及靶点治疗的研究近况.实用医药杂志,2009,26(4):68-70.

Highly Expressed and Up-regulated Genes in the Pituitary of Rats with Qi Deficiency  
Liu Xiaomei<sup>1</sup>, Fang Zhaoqin<sup>1</sup>, Lu Wenli<sup>1</sup>, Pan Zhiqiang<sup>1</sup>, Guan Dongyuan<sup>1</sup>, Liang Chao<sup>1</sup>, Gao Bifeng<sup>2</sup>  
(1. School of Preclinical Medicine, Shanghai University of Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;  
2. Medical College of Colorado State University, CO 80262, USA )

**Abstract:** This study aimed to explore the material base of qi deficiency in pituitary gene expression by screening highly expressed and up-regulated genes in pituitary of qi deficiency rats with hypertension, diabetes mellitus or no disease. Sixteen weeks old healthy Wistar rats, spontaneously hypertensive rats (SHR rats) and spontaneous diabetic rats (Goto-Kakizaki rats, GK rats) were used. The standardized quantitative four diagnosis methods and GeneChip Rat Gene 1.0 ST Array were adopted to test the pituitary gene expression of normal Wistar rats, normal Wistar rats with qi deficiency, SHR rats with qi deficiency, and GK rats with qi deficiency, especially focusing on the genes with expression more than 1000 and up-regulated consistently in three qi deficiency syndromes compared with normal Wistar rats. Thirty-four genes were obtained, including *Arhgdia*, *Arfgap1*, *Rab21*, *Arf5*, *Arf3*, *Cdpt*, *Cds2*, *Pld3*, *Ppp3ca*, *Ppp3cb*, *Trim35*, *Itm2b*, *Itm2c*, *Tob1*, *Oaz1*, *Maged1*, *Gpc4*, *Glg1*, *wdr6*, *Scarb2*, *Grn*, *Hnrpd*, *Hnrnpab*, *Snrpb*, *Gtf2i*, *Ascl1*, *Pnrc1*, *Eef2*, *Eno2*, *Gls*, *Ucp2*, *Atp6v0c*, *Pomc*, *Syp*. Some up-regulated genes were related to gene transcription and translation as well as energy metabolism. Some functional genes such as POMC were actively expressed; moreover, some genes associated with cell activity were expressed at a higher level. The results suggest that the pituitary is in an actively compensational condition when a rat is suffering from qi deficiency. This may be the material base of qi deficiency in pituitary gene expression.

**Keywords:** Hypertension, Diabetes mellitus, Pituitary, Qi deficiency, Gene, Gene microarray

(责任编辑:李沙沙,责任译审:张立崑)