

不同气虚证小鼠甲状腺 G 蛋白通路 及相关基因转录特征^{*}

□卢文丽 方肇勤^{**} 刘小美 潘志强 梁 超 管冬元 吴中华
(上海中医药大学基础医学院 上海 201203)

摘 要:目的:观察不同气虚证小鼠甲状腺 G 蛋白信号通路及功能激素基因表达的特征。方法:采用小鼠计量化四诊和辨证方法,以及 GeneChip Mouse Exon 1.0 ST Array 等技术,观察正常小鼠、肿瘤气虚证荷瘤小鼠甲状腺 G 蛋白信号通路及相关基因表达特征。结果:不同气虚小鼠垂体 TSH 与甲状腺 TSH 受体(TSHR)表达量均增加,但正常气虚证小鼠甲状腺 G 蛋白通路的腺苷酸环化酶(AC)和蛋白激酶 A(PKA)未见相应的表达量增加;而肿瘤气虚证小鼠则相应增加、活跃,发生响应,Ras 基因亦如是。结论:正常气虚小鼠甲状腺 G 蛋白通路中大多基因表达不活跃可能是其部分物质基础,而荷瘤小鼠气虚证系因实致虚,因此表现与正常气虚证不同,即甲状腺尚处于代偿状态。

关键词:证候 气虚证 小鼠 肿瘤 甲状腺 G 蛋白 信号通路

doi: 10.3969/j.issn.1674-3849.2011.02.010

气虚证是中医临床常见证候,可见于正常人群和疾病人群,前者如亚健康人群,后者如肿瘤患者,中医药针对性的辨证论治往往可取得较好的疗效。为了探索气虚证发生的物质基础,以及鉴于以往研究提示虚证与下丘脑-垂体-内分泌轴的功能紊乱有关,我们采用小鼠标准化、计量化检测方法,从正常小鼠中筛选出正常气虚小鼠、H22 荷瘤小鼠中筛选出肿瘤气虚证小鼠用于实验,并采用 Affymetrix GeneChip 检测神

经-内分泌组织基因表达谱的变化^[1~3]。在神经-内分泌组织中,甲状腺是十分重要的器官,其分泌的甲状腺激素在生理上发挥重要的作用,其分泌量的异常与节律的紊乱可能导致病理现象的发生。因此,本文重点关注不同气虚证与甲状腺激素生成密切相关的 G 蛋白信号通路的基因转录特征。

一、材 料

1. 实验动物

昆明种雄性小鼠 250 只,体重 25 ± 1 g,购自上海

收稿日期:2010-07-11

修回日期:2010-09-13

* 科学技术部国家科技重大新药创制专项(2009ZX09502-018):基于动物表征与生物学指标特征组合的病证结合动物模型制备的关键技术研究-肝癌病证结合动物模型研究,子课题负责人:方肇勤。

** 通讯作者:方肇勤,教授,博士生导师,主要研究方向:证候与辨证论治基础研究,Tel:021-51322115,E-mail:zqfang@sh163.net。

斯莱克实验动物有限公司,动物生产许可证号为 SCXK(沪) 2008-0003,动物使用许可证号为 SYXK(沪) 2009-0069。

2. 主要试剂

Trizol(GIBCO BRC)、RNeasy Mini Kit(QIA-GEN),RNA 6000 Nano LabChip(Agilent)及 Gene-Chip Mouse Exon 1.0 ST Array(Affymetrix)等。

3. 主要仪器

Agilent-bioanalyzer 2100、Affymetrix 芯片杂交炉、芯片洗涤系统、芯片扫描仪等。四诊计量化检测设备见相关文献^[4,5]。

二、方 法

1. 动物分组及处理

随机取 60 只小鼠做正常对照,剔除其中 10 只体重过重与过轻小鼠,剩余正常小鼠 50 只。另取 190 只腋下接种 H22 肿瘤腹水癌细胞 0.2 mL(细胞浓度 4×10^7 个/mL),出瘤后淘汰 40 只出瘤不佳及畸形小鼠,余 150 只。共计 200 只用于四诊计量检测和辨证,清洁级条件下常规饲养。

2. 四诊计量化检测方法与气虚计量辨证方法 参见有关文献^[4,5]。

3. 荷瘤小鼠常见证候的确定

依据我们以往的研究^[4,5],于接种后第 8 d,筛选出气虚证荷瘤小鼠 8 只;第 15 d,筛选出正常气虚证小鼠 8 只、各证候值均接近 1.0 的正常无虚证小鼠 8 只,处死取甲状腺和垂体等组织。其余小鼠用于后续其他证候检测。

4. RNA 抽提及质量检测

采用 Trizol 及其方法抽提总 RNA 8 个组织样本 RNA 合并并混匀;采用 RNeasy Mini Kit 及其方法纯化 RNA;采用 RNA Nano LabChip 和方法及其配套的 Agilent-bioanalyzer 2100 检测 RNA 的质量和电泳图谱。

5. 芯片检测与数据处理

采用 Affymetrix 的 GeneChip Mouse 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 所建议的方法,iterPlier 计算核心基因表达读数计算值(芯片读数计算值)。以上 RNA 质量和芯片检测委托上海生物芯片有限公司(Shanghai Biochip Co. Ltd)完成。

6. 入选基因

以 GenMAPP 软件分别分析 G 蛋白信号通路基因正常气虚证和肿瘤气虚证与正常对照小鼠的比值,以不同颜色标示其上调和下调的倍数:其中比值 >1.3 (红色), >1.2 (粉红), >1.1 (玫瑰红);比值 <0.77 (紫色), <0.83 (青色), <0.91 (蓝灰色)。

三、结 果

1. 不同气虚证小鼠体重及气虚程度辨证

根据以往研究,正常及肿瘤小鼠存在证候及其演变,其中肿瘤小鼠可分为早、中及中晚期。肿瘤气虚证以早期最为集中、典型,因此,在接种后第 8 天(早期)筛选得到典型证候小鼠 8 只;考虑到在中期和中晚期尚需要筛选其他证候(本文不做介绍),在对照组中筛选正常气虚证和正常无虚证小鼠,则,在第 15 天(中期)中进行,各 8 只。筛选的不同气虚证小鼠体重及气虚程度辨证情况见表 1。

2. G 蛋白通路 AC-cAMP(腺苷酸环化酶)途径

(1) 激动型 G 蛋白(Gs)和抑制型 G 蛋白(Gi)的表达。

Gs 方面,Gnas(GNAS 复合体基因座)表达量高,但在两个气虚证未出现差异表达。在 Gi 方面,Gnai2(G 蛋白 α 抑制活性肽 2)和 Gnai3,正常气虚证中前者呈下调趋势而后者无差异表达,而肿瘤气虚证则前者上调,后者下调。见表 2 和图 1~2。

(2) AC(腺苷酸环化酶)的表达。

Gs 和 Gi 下游的 AC 中,以 Adcy4、Adcy5、Adcy6、Adcy7、Adcy9 的表达量稍高,可能在小鼠甲状腺中起主要功能。正常气虚证和肿瘤气虚证表现出不同的趋势:正常气虚证以下调为主,可能是正常气虚发生的内在物质基础之一,而肿瘤气虚证均呈上调趋势,提示具有积极的促进 cAMP 作用,处于活跃的代偿状态。见表 3 和图 1~2。

表 1 不同气虚证小鼠气虚程度及体重($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

	筛选量(n)	气虚程度
正常无虚证	40.8 $\pm$ 1.1	1.006 $\pm$ 0.049
正常气虚证	40.8 $\pm$ 1.0	0.585 $\pm$ 0.051 *
肿瘤气虚证	32.5 $\pm$ 2.0	0.504 $\pm$ 0.078 *

注:根据以往研究标准,以气虚程度接近于 1.0 为无虚证,*表示与正常无虚证组比较有统计学差异, $P<0.01$ 。体重由于在不同时期筛选,且不影响气虚辨证,不做统计比较。

表 2 荷瘤小鼠甲状腺 Gs、Gi 的表达量(芯片读数计算值)

编号	缩写	正常	正气虚	肿瘤气虚	正气虚/正常	肿瘤气虚/正常
NM_010309	Gnas	3395	3211	3569	0.95	1.05
NM_177137	Gnal	30	20	31	0.68	1.03
NM_008138	Gnai2	1722	1425	2490	0.83	1.45
NM_010306	Gnai3	1280	1258	1082	0.98	0.85
NM_010308	Gnao1	132	160	311	1.21	2.36
NM_010311	Gnaz	77	52	63	0.68	0.82
均数	1106	1021	1258	0.89	1.26	

注: * 表中正常代表正常对照组、正气虚代表正常气虚证组,肿瘤气虚代表肿瘤气虚组,下同。

表 3 荷瘤小鼠甲状腺 AC 的表达量(芯片读数计算值)

编号	缩写	正常	正气虚	肿瘤气虚	正气虚/正常	肿瘤气虚/正常
NM_153534	Adcy2	139	107	56	0.77	0.40
NM_138305	Adcy3	97	114	221	1.17	2.28
NM_080435	Adcy4	341	240	413	0.70	1.21
NM_001012765	Adcy5	144	150	353	1.04	2.45
NM_007405	Adcy6	624	653	981	1.05	1.57
NM_007406	Adcy7	266	163	380	0.61	1.43
NM_009623	Adcy8	25	15	35	0.62	1.41
NM_009624	Adcy9	258	230	398	0.86	1.56
均数		258	230	398	0.86	1.56

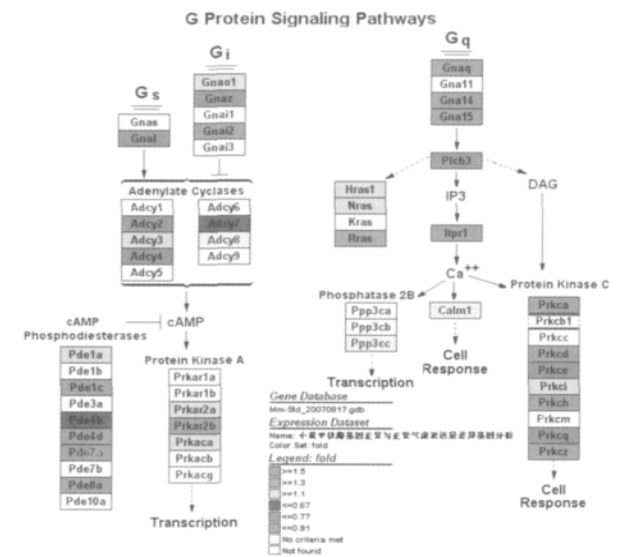


图 1 正常气虚小鼠甲状腺 G 蛋白信号通路图

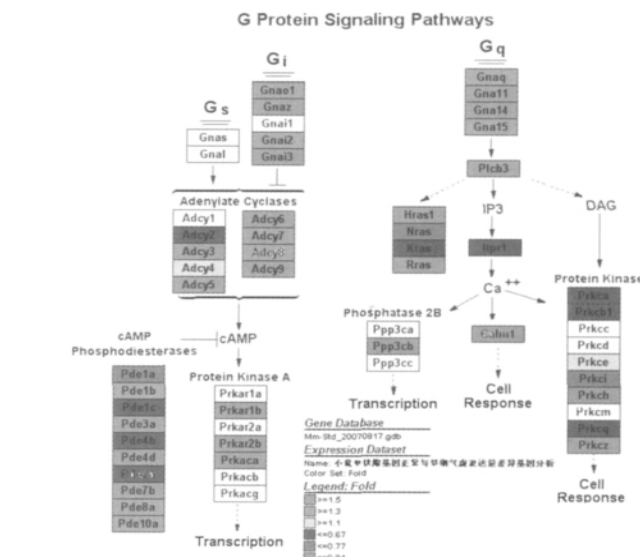


图 2 肿瘤气虚小鼠甲状腺 G 蛋白信号通路图

(3) 环腺苷酸磷酸二酯酶(cAMP phosphodiesterase, PDE)的表达。
PDE 可降解 cAMP 生成 5'-AMP,抑制 cAMP 对 PKA 的激活作用。Pde1a(磷酸二酯酶 1A)、Pde1b、Pde1c、Pde3a、Pde10a 等基因表达量偏低,而其余 5

个基因表达量相对较高。其中除 Pde8a(磷酸二酯酶 8A)在肿瘤气虚上调显著外,其余 4 个基因在正常气虚证及肿瘤气虚证多呈下调趋势,即抑制作用减弱。见下表 4 和图 1~2。

(4) 蛋白激酶 A (Protein Kinase A ,PKA) 的表达。

PKA 是 cAMP 依赖性的激蛋白激酶。PKA 是由两个调节亚基和两个催化亚基组成的全酶 , 全酶没有活性 ,在 cAMP 与 PKA 的两个调节亚基 Prkar1、Prkar2 结合后 ,其构象改变使得两个催化亚基 Prkaca(cAMP 依赖蛋白激酶 α 催化亚基)、Prkacb 被释放 ,活化的催化亚基影响细胞内某些蛋白磷酸化或蛋白合成 ,进而影响到相关基因的表达。表 5 和图 1 ~ 2 提示 ,正常气虚证 PKA 表达量变化不大 ,而肿瘤早期气虚证表达显著增加。

3. G 蛋白通路磷脂酶 C(PLC) 途径

TSH 浓度若继续增加 将启动本途径。

(1) 磷脂酶 C(PLC) 偶联的 G 蛋白(Gq) 的表达。

Gnaq(G 蛋白 q 肽)、Gna11 (G 蛋白 α 11) 表达量高 ,Gna14、Gna15 表达量低。正常气虚证该 4 个基因均呈下调趋势 ,而肿瘤气虚证则相反 ,显著上调。其下游的 Plcb3(磷脂酶 C , β 3) 的表达量与各自上游一致。见表 6 及图 1、2。

(2) 磷脂酶 C 偶联的 G 蛋白下游 Itpr1 等基因的表达。

Plcb3 被激活后产生的 IP3(肌醇 1、4、5 三磷

表 4 小鼠甲状腺环腺苷酸磷酸二酯酶(PDE)的表达(芯片读数计算值)

编号	缩写	正常	正气虚	肿瘤气虚	正气虚/正常	肿瘤气虚/正常
NM_016744	Pde1a	269	346	183	1.29	0.68
NM_008800	Pde1b	228	208	302	0.91	1.32
NM_011054	Pde1c	189	301	102	1.59	0.54
NM_018779	Pde3a	161	173	251	1.08	1.56
NM_019840	Pde4b	449	286	170	0.64	0.38
NM_011056	Pde4d	620	494	557	0.80	0.90
NM_001122759	Pde7a	399	332	266	0.83	0.67
NM_013875	Pde7b	1793	1915	1531	1.07	0.85
NM_008803	Pde8a	229	194	413	0.85	1.80
NM_011866	Pde10a	118	128	198	1.08	1.68
均数		446	438	397	0.98	0.89

表 5 小鼠甲状腺 G 蛋白通路(PKA)的表达量(芯片读数计算值)

编号	缩写	正常	正气虚	肿瘤气虚	正气虚/正常	肿瘤气虚/正常
NM_021880	Prkar1a	2390	2307	2317	0.97	0.97
NM_008923	Prkar1b	178	180	376	1.01	2.11
NM_008924	Prkar2a	449	499	420	1.11	0.94
NM_011158	Prkar2b	613	537	1411	0.87	2.30
NM_008854	Prkaca	804	911	1242	1.13	1.55
NM_011100	Prkacb	1874	1867	1734	0.99	0.93
均数		1051	1050	1250	1.00	1.19

表 6 小鼠甲状腺 Gq 的表达(芯片读数计算值)

编号	缩写	正常	正气虚	肿瘤气虚	正气虚/正常	肿瘤气虚/正常
NM_008139	Gnaq	959	740	1292	0.77	1.35
NM_010301	Gna11	716	678	1719	0.95	2.40
NM_008137	Gna14	112	97	286	0.86	2.55
NM_010304	Gna15	54	46	71	0.85	1.32
NM_008874	Plcb3	704	523	1328	0.74	1.89
均数		509	416	939	0.83	1.90

酸) 其受体 Itpr1(肌醇 1,4,5-三磷酸受体 1) 在正常气虚与上游一致,在肿瘤气虚却相反。此后正常气虚证 Calm1(钙调蛋白)和 Ppp3c(蛋白磷酸酶 3/钙调磷酸酶)在正常气虚无差异表达,肿瘤气虚呈下调趋势。见下表 7 和图 1~2。

(3) 磷脂酶 C 偶联的 G 蛋白下游的 Ras 基因的表达。

虽然 Ras 基因在两个气虚证均以上调趋势居多,但与上游 Plcb3 基因的变化趋势相比较,正常气虚证与上游趋势相反,在肿瘤气虚证却与上游趋势同,提示正常气虚与肿瘤气虚 Ras 基因可能存在不同的调控模式。见表 6、表 8 及图 1~2。

(4) 磷脂酶 C 偶联的 G 蛋白下游的 PKC(蛋白激酶 C) 的表达。

PKC 是一类磷脂依赖的丝氨酸/苏氨酸酶,活化的 PKC 使多种信号蛋白磷酸化,对胞浆到细胞核

的信号传导起重要作用。PKC 正常气虚证多下调,而疾病早期两个证候互有上下调。PKC 目前发现至少有 12 种亚型,主要分为 3 类:经典型 PKC 类,包括 α (Prkca)、 β I(Prkcb1)、 β II 和 γ 亚类;新型 PKC 类,包括 δ (Prkcd)、 ϵ (Prkce)、 η (Prkch) 和 θ (Prkcg) 亚类;非典型 PKC,由 ζ (Prkcz) 和 λ (Prkci) 亚类组成。PKC 总体在正常气虚证和肿瘤气虚证多呈下调趋势,且后者程度重于前者。见表 9 和图 1~2。

4. 相关基因表达量(见表 10)

垂体分泌的促甲状腺激素 Tsh 与甲状腺细胞上 Tshr 受体相结合,G 蛋白通路启动,Tshb(促甲状腺激素 β) 为其主要活性成分。二者在气虚证产生后均出现不同程度的上调,垂体 Tshb 肿瘤气虚程度高于正常气虚,甲状腺 Tshr 则反之。

表 7 小鼠甲状腺 Gq 下游 Itpr1 等基因的表达(芯片读数计算值)

编号	缩写	正常	正气虚	肿瘤气虚	正气虚/正常	肿瘤气虚/正常
NM_010585	Itpr1	1851	1530	1147	0.83	0.62
NM_009790	Calm1	1854	1832	1582	0.99	0.85
NM_008913	Ppp3ca	758	772	797	1.02	1.05
NM_008914	Ppp3cb	1593	1626	1297	1.02	0.81
NM_008915	Ppp3cc	1183	1170	719	0.99	0.61
均数		1447	1386	1108	0.97	0.79

表 8 小鼠甲状腺 Gq 下游 ras 基因的表达(芯片读数计算值)

编号	缩写	正常	正气虚	肿瘤气虚	正气虚/正常	肿瘤气虚/正常
NM_008284	Hras1	601	745	917	1.24	1.53
NM_010937	Nras	623	708	465	1.14	0.75
NM_021284	Kras	263	243	136	0.92	0.52
NM_009101	Rras	667	887	1146	1.33	1.72
均数		538	646	666	1.20	1.24

表 9 小鼠甲状腺 Gq 下游 PKC 基因的表达(芯片读数计算值)

编号	缩写	正常	正气虚	肿瘤气虚	正气虚/正常	肿瘤气虚/正常
NM_011101	Prkca	493	386	264	0.78	0.54
NM_008855	Prkcb1	558	548	329	0.98	0.59
NM_011103	Prkcd	913	789	961	0.86	1.05
NM_011104	Prkce	297	219	370	0.74	1.24
NM_008856	Prkch	598	518	523	0.87	0.88
NM_008859	Prkcg	946	693	275	0.73	0.29
NM_008860	Prkcz	103	160	156	1.56	1.52
NM_008857	Prkci	753	830	563	1.10	0.75
均数		583	518	430	0.89	0.74

表 10 相关基因表达量(芯片读数计算值)

编号	缩写	正常	正气虚	肿瘤气虚	正气虚/正常	肿瘤气虚/正常
NM_009432	垂体 Tshb	2460	5121	6396	2.08	2.60
NM_011648	甲状腺 Tshr	1033	1424	1194	1.38	1.16

四、讨 论

就研究方法而言,首先,我们所观察的正常气虚证及荷瘤小鼠气虚证等证候,以及所建立的小鼠四诊工作站及其标准,业已通过大量重复的实验验证,是稳定且可重复的^[4,5]。其次,我们采用先进的 Affymetrix GeneChipMouse Exon 1.0 ST Array 进行检测,同时将 8 个同一证候小鼠组织 RNA 合并,避免了个别小鼠可能带来的误差,使芯片检测的结果具有代表集中的趋势,贴近真实。

1. G 蛋白通路途径

G 蛋白通路主要包含以上两个途径:腺苷酸环化酶 AC-cAMP 途径和磷脂酶 C(PLC)途径^[6,7]。

(1) 腺苷酸环化酶 AC-cAMP 途径。

该通路大部分的生物效应是通过 AC-cAMP 途径。TSH 与甲状腺上其受体 TSHR 相结合,刺激性 G 蛋白(G_s)激活 AC(腺苷酸环化酶),刺激 cAMP 生成;抑制性 G 蛋白(G_i)则抑制 AC 活性,使 cAMP 减少;TSH 通过 G_s 引起 cAMP 合成增多,并激活蛋白激酶 A,从而促进甲状腺激素的合成和分泌。

(2) 磷脂酶 C(PLC)途径。

在 PLC(磷脂酶 C)偶联的 G 蛋白(G_q)方面,此途径需要更高于 AC-cAMP 途径的 TSH。此途径中心环节是:质膜上的磷脂酶 C($PLC\beta$)被激活,使得质膜上的 PIP_2 (4,5-二磷酸磷脂酰肌醇)水解,产生 IP_3 (1,4,5-三磷酸肌醇)和 DAG(二酰基甘油)两个第二信使, IP_3 作用于内质网膜的 IP_3 受体($IP_3R/ITPR$),使胞内游离 Ca^{2+} 增多,活化钙调蛋白,激活钙调磷酸酶,而 DAG 则激活蛋白激酶 C,与其底物作用而发挥生理作用。从而影响甲状腺功能,包括碘有机化、细胞中碘外移到滤泡腔,甲状腺球蛋白碘化和 H_2O_2 生成等。

2. 甲状腺功能调节及气虚证发生可能存在的不同机制

甲状腺功能的调节主要包括 3 个方面:下丘脑-甲状腺调节、自身调节和自主神经调节,其中以第 1 个为主。下丘脑-腺垂体通过释放 Trh 和 Tsh 激素,

通过与其受体相互作用而达到调控甲状腺的目的。甲状腺上 Tshr 为 G 蛋白耦联受体,垂体释放的 Tsh 与甲状腺细胞上 Tshr 受体相结合,通过 G 蛋白耦联启动该通路,从而促进甲状腺水平激素的合成和分泌。该通路又以 AC-cAMP 途径为主。

本研究发现,不论是正常气虚证小鼠,还是肿瘤早期气虚证小鼠,垂体 Tshb 表达量是增加的,而且后者大于前者,提示垂体-甲状腺轴的上游是处于兴奋的代偿状态。而两者甲状腺 Tsh 受体表达量增加,亦提示对垂体 Tsh 表达增加总体上有响应的。但结果和机制有所差异:正常气虚证小鼠甲状腺 G 蛋白通路的腺苷酸环化酶和蛋白激酶 A 未见相应的表达量增加。甲状腺这些基因表达的不活跃,缺乏相应,即甲状腺本身存在问题,这可能是正常气虚证发生的部分物质基础;肿瘤气虚证小鼠与正常气虚证小鼠不同,甲状腺 G 蛋白通路的腺苷酸环化酶和蛋白激酶 A,以及 ras 家族表达量相应增加、活跃,存在响应。提示荷瘤小鼠气虚证系因实致虚,甲状腺尚处于代偿状态。

但是,本文所观察到的现象,仅限于基因转录水平,而实际涉及机制可能更为复杂,尚有待后续进一步研究和验证。

参考文献

- 1 方肇勤,潘志强,卢文丽,等.荷瘤小鼠常见证候在神经-内分泌-免疫网络组织基因转录的特征.中国中医基础医学杂志,2010,16(1):33~38.
- 2 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.
- 3 刘小美,方肇勤,潘志强,等.不同证候 H22 荷瘤小鼠垂体高表达基因分析.中西医结合肝病杂志,2009,19(5):290~294.
- 4 方肇勤主编.大鼠/小鼠实验辨证论治方法学.北京:科学出版社,2009:56~86.
- 5 方肇勤主编.辨证论治实验方法学——实验小鼠诊法和辨证.上海:上海科学技术出版社,2006:45,132~153.
- 6 Franklyn F. Bolander 主编.分子内分泌学.第 3 版.北京:科学出版社,2007:235~272.
- 7 白耀主编.甲状腺病学-基础与临床.北京:科学技术文献出版社,2004:51:88,110~124.

Characteristics of G Protein Signaling Pathway and Related Gene Expression in Thyroid of Mice with Different Qi-Deficiency Syndromes

*Lu Wenli , Fang Zhaoqin , Liu Xiaomei , Pan Zhiqiang , Liang Chao , Guan Dongyuan , Wu Zhonghua
(Preclinical Department , Shanghai University of Traditional Chinese Medicine , Shanghai 201203 , China)*

Abstract: This study aimed to analyze characteristics of G protein signaling pathway and related gene expression in thyroid of mice with different qi-deficiency syndromes (QDS) . Quantitative four diagnosis , syndrome differentiation methods , and Affymetrix GeneChip Mouse Exon 1.0 ST Array were used. Thyroid gene expression of normal mice and tumor mice with QDS were detected. Genes of G protein signaling pathway and related hormones in gene chips were selected. And then , characteristics of gene expression were analyzed. The results showed that the expression of thyroid stimulating hormone (TSH) and TSHR were increased in thyroid of QDS mice. And the adenylate cyclase (AC) and protein kinase A (PKA) in G protein signaling pathway were increased in thyroid of QDS tumor mice , but not in the normal QDS mice. The Ras genes also follow the same trend. It is concluded that most inactive genes may be the material base of QDS among normal mice. However , QDS among tumor mice was different from normal QDS mice. Since the QDS in tumor mice is caused by excess , and the thyroid was in compensation condition.

Keywords: Syndrome , qi-deficiency syndrome , mice , tumor , thyroid , G protein , signaling pathway

(责任编辑: 李沙沙 张志华 , 责任译审: 王 晶)