

· 学术探讨 ·

衰老—生理性肾虚证的 HPAT 轴分子网络调控研究

沈自尹

国内对于证本质的研究积累了大量奠基性的成果,中西医结合工作者结合时代的特征,将研究工作通过证的研究介入到生命科学的领域,这样就从“证明性研究”开始进入“创新发展研究”,而且使得分子水平上的所见与整体水平上的人,相互之间的距离不是越来越大,而是越来越小,宏观与微观的结合点将要落在建立“证”的基因表达谱和以药测证的基因调控网络。中医药学与现代生命科学求得同步发展,定能加速实现中医药现代化。

人体生命活动是有机体在内外环境作用下,由多种因素相互作用而维持动态的相对平衡过程。人体是一个统一的整体,机体各个系统虽各有独特的生理功能,但是它们都受神经—内分泌系统的支配。现在已经证实神经内分泌系统与免疫系统之间存在双向信息传递机制,即免疫系统不仅受神经、内分泌系统的调控,而且还能调节神经、内分泌系统的某些功能,它们拥有一套共同的化学信息分子与受体,使这三个系统之间得以相互交通和调节,呈现多维立体网络状的联系。1977 年 Basedovsky 首次提出体内存在神经内分泌免疫(NEI)网络的假说,已成为当前医学、生物学研究的前沿领域之一。

1984 年 Jerne 因提出免疫网络学说而获得诺贝尔奖,该学说提出抗体分子具有双重性,既可特异性识别并结合外来抗原,它的可变功能区(V区)又成为独特型抗原,导致另一些淋巴细胞一系列互补的抗独特型抗体以级联方式不断产生,从而构成了免疫分子网络。过去认为单一效应的细胞却被证明无一例外都是多种功能的,而每种功能又可由多种细胞因子所介导,在不同因子之间还有相互协调或相互制约的效应,这也是免疫网络调节的基础。

近年生命科学最热门的 3 个领域是基因组研究、细胞凋亡、细胞信号传导。细胞凋亡是一种在基因调控下的细胞主动死亡过程,生物体经过几百万年的进化,才获得“凋亡”这个绝妙的体系,用以清除那些对机体无用或有害的细胞,有利于细胞数量的准确调控。凋亡方式从启动到结束是一个严密完整的程序,其信息通路(启动相、效应相、清除相)涉及促凋亡和抗凋亡分子之间相互制约、相互促进达成的相对平衡,组成一

个完整的细胞凋亡机制网络系统。

从涉及整体性的系统之间调节的神经内分泌免疫网络,到局部性系统内调节的免疫分子网络,都是得到公认的学说,当然在局部反应有数不清的小网络存在。其实机体就是由大小小众多网络所构成并作为对外反应与自我调节的基础。

正常的人体结构是人类基因的一个有序的表达,疾病则是基因表达的失衡。对绝大多数疾病的治疗,都将从调控基因的功能着手,即从修饰或改变基因的表达与基因产物的功能着手,故而大、小网络的调控都立足于基因表达的调控。无论哪一种网络都存在着网络状或相互对立而制约的基因并通过对中枢的信号传导由负反馈的机制来完成调控作用。在实现对机体功能状态的调节过程中,涉及整体—组织器官—细胞—分子多层面的分子网络的综合作用。

中医学把人体看成一个整体,把病或证看成是整体协调受到了干扰,证是一种多基因参与的有序的功能态,所以证本身就是一种基因调控网络的表现。对于“证”的基因调控网络研究需要采取以基因芯片为手段,研制该证的基因表达谱,如果能采用有效的中药加以干预,既可通过纠正基因网络失衡,以“差异分析”而找到基因表达的差异谱,同时又是“以药测证”,动态地观察到与该证相关基因群遵循的活动规律,由此阐明证的本质。

在“肾本质”的研究上,进一步的研究¹⁾利用 26 月龄老年大鼠模型和假阳性 < 1% 的 Affymetrix 公司的大鼠基因芯片,每张芯片点有 8 784 条基因,如此共投入 20 张。通过与青年大鼠的 NEI 网络的核心—下丘脑—垂体—肾上腺—胸腺轴(HPAT)轴基因表达谱比较,并分别比较 ER(淫羊藿总黄酮)及补肾(右归饮)、活血(桃红四物汤)复方对老年大鼠 HPAT 轴基因表达谱的影响,以阐明从调节 HPAT 轴途径延缓衰老,并从基因表达谱的差异显示中,探究衰老—生理性肾

虚证的分子网络调控模式。

老年大鼠和青年大鼠比较,可见老年大鼠在 HPAT 轴各层次上与生长、发育、衰老相关的基因均呈低表达(差异表达两倍以上),反映了老年大鼠 HPAT 轴上的基因表达谱是以衰退的表现为主。在比较 EF、补肾、活血对老年大鼠 HPAT 轴的作用,以 EF 的作用最为显著,在下丘脑可见多达 6 种神经递质及其受体 DaD1R、DaD2R、 α 1ER、GABA-AR、GluR、5-HT1R 以及这 6 种神经递质调节的生长激素(GH)显著上调。在垂体可见促性腺释放激素(GnRH)和促性腺激素等,以及和 GH 相关的泌乳素(PRL)、胰岛素样生长因子结合蛋白-5(IGFBP-5)的显著上调。在肾上腺也有性激素的显著上调。在淋巴细胞可见具有作为细胞增殖、细胞凋亡的上游因子 TGF β 显著上调,以致诱导一系列免疫效应及重要信号通路分子上调,在下调促凋亡基因的同时,上调抗凋亡基因,在下调抗增殖基因的同时,上调促增殖基因,从而重塑基因平衡,体现出 EF 之所以能延缓免疫衰老,在于其重建衰老免疫稳态的分子网络调控机制。

Basedovsky 提出的 NEI 网络里,神经内分泌能调控免疫(下行通路模式),免疫亦能调控神经内分泌(上行通路模式),如此形成双向调节网络。1988 年 Meites 提出衰老过程中 NEI 网络起重要作用^[2],尤其与下丘脑的去甲肾上腺素(NE)和多巴胺(DA)活性下降有关,因为给予增加下丘脑 NE 和 DA 活性的药物可延缓或逆转衰老时性激素与生长激素以及蛋白质合成代谢的下降。从 EF 可在下丘脑激活众多神经递质受体和神经肽,而未见作为启动上行通路最重要的一些细胞因子的出现,说明 EF 是通过 NEI 网络的下行通路这一模式而激活免疫系统,其中众多神经递质的启动可能是关键基因。

Clark^[3]提出由 GH、PRL、IGFs 这 3 个主要的合成代谢激素或因子扮演了整合人体的生长、保养、修复及免疫功能。本实验可见 EF 使得老年大鼠原已衰退的 GH、PRL、IGFs 显著上调,这意味着 EF 可促进老年大鼠的合成代谢,表现出可延缓代谢上的衰老。EF 在老年大鼠上所激活的 GnRH 是 NEI 网络中一种强有力的信息传递因子,除了刺激 FSH、LH 的释放加强性腺分泌性激素,还以淋巴细胞为靶器官提高免疫功能,还有 GH 除促进生长、发育加强人体的合成代谢以外,还是免疫增强类神经激素,亦都能促进淋巴系统功能,可见 EF 在 HPAT 轴上交叉综合的调节,集中落实在提高免疫功能,成为延缓免疫衰老的主要效应机制。

每个人体的任何组织,如头发、血,其 DNA 都一

样,是同一个形态结构,基因表达谱则是测 RNA 转录水平与功能表达,mRNA 的表达又是受时、空间的限制。虽然全身各组织的 DNA 都一样,但不同组织只表达它相关的 RNA,不相关的 RNA 则保持沉默,这就是空间的限制,如某些组织具有昼夜节律变化,不同时间会有不同程度的表达,这就是时间的限制。“证”是反映着全身众多组织器官综合的状态,故而不宜仅采取人的血样为标本来建立某个证的基因表达谱,除非此证与血液系统密切相关,因为血样只反映与血液系统相关的基因表达,而必须以动物模型的多种能反映“证”并易于取材的组织为标本。我们在老年大鼠取 HPAT 轴的 4 个靶组织,就其结果每个组织在基因芯片上的反映,的确符合衰老期各自的基因表达特征。衰老(生理性肾虚证)是多器官、多组织的退行性改变,4 个靶组织样本未必能代表衰老和肾虚证的全面情况,但能阐明免疫衰老以及肾虚证的主要方面。

中医一向着重于证效关系来判别辨证的正确性,也就是“以药测证”。由 EF、右归饮、桃红四物汤 3 组药物在 HPAT 轴上基因表达谱的比较,活血药对 HPAT 轴无明显作用,右归饮虽有一定作用,但不如 EF 作用之全面系统并具有一定规律性。我们从有效的多个补肾复方中筛选出对 HPAT 轴最具效应的淫羊藿有效成分—EF,虽然它不能代表补肾的全方效应,但可针对病或证的某个方面(甚至是主要方面)作为药靶以发挥更为高效且专一的效应。

衰老时控制机体的整合功能明显减退,随着增龄性变化,NEI 网络出现进行性损伤,其中最早出现并明显受损当属下丘脑—垂体—生长激素轴和下丘脑—垂体—性腺轴,还有就是淋巴系统中掌管细胞凋亡和细胞增殖的基因。本实验不但证实了衰老时 HPAT 轴的这 3 个方面明显受损,而 EF 能广泛而有效地通过激活众多神经递质,按照 NEI 网络下行通路着重调节生长激素与性腺两个轴,最终重塑 T 淋巴细胞凋亡基因平衡,从而抑制了衰老时过度的 T 细胞凋亡。可见证是由若干个重要的分子网络所组成,衰老—生理性肾虚证具有特征性的分子调控网络谱。由此提出一个证的新概念:证是一种有机综合的功能态,由一个调控中心及其所属众多分子网络所构成,作为对外界反应与自我调节的基础”。

从衰老的基因表达谱微观所见,联系肾虚的理论,可从肾与命门学说发展上找到相对应的理解。肾与命门的关系早在《难经》:“命门者,精神之所舍,原气之所系也,男子以藏精,女子以系胞,其气与肾通”。至明代更尊肾与命门为真君真主,居于心之上,为人之生命之

门, 五脏六腑之本, 十二经脉之根, 故为先天之本。命门又为水火之府, 阴阳之宅, 此水火即真阴真阳(可理解为肾阴肾阳), 两者潜行于周身, 如此肾或命门代表了人身生命活动的源泉与动力。由 NEI 网络领衔的肾虚证恰好是反映了统率全身的最大的网络, 这样就不至于把肾或命门局限在某个脏器或某个腺体, 而且宏观与微观取得了统一。

参 考 文 献

1 沈自尹, 陈瑜, 黄建华, 等. EF 延缓 HPAT 轴衰老的基因表

达谱研究. 中国免疫学杂志 2004 ;(20):16—18.
 Sheng ZY, Chen Y, Huang JH, et al. The gene expression profile in hypothalamus-pituitary-adrenal-thymus (HPAT) axis from EF-treated old rats. Chin J Immunol 2004 ;(20):16—18.
 2 Meites R. Neuroendocrine biomarkers of aging in the rat. Exp Gerontol 1998 23:349—360.
 3 Clark RG. The somatogenic hormone and insulin-like growth factor-1: stimulators of lymphopoiesis and immune function. Endocr Rev 1997 ;18(2):245—248.

(收稿 2003-12-29 修回 2004-05-19)

强直性脊柱炎骨密度变化与中医辨证分型关系探讨

陶庆文 阎小萍 金笛儿 孔维萍 路平

我们于 2002 年 1 月—2003 年 12 月用双能 X 线吸收法测量了 107 例强直性脊柱炎(AS)患者的骨密度(BMD), 探讨其与中医辨证分型的关系, 同时与 681 名健康对照者进行比较。现将结果报告如下。

资料与方法

1 纳入及排除标准 西医诊断参照美国风湿病学会 1984 年修订的纽约标准; 中医证候诊断标准参照文献(马 骁, 阎小萍. 强直性脊柱炎的辨证施治. 中国临床医生 2002 30(5):54—55)。纳入标准: 符合上述诊断标准, 年龄 20~45 岁者; 排除标准: 女性已绝经或月经出现明显紊乱者; 曾使用激素患者; 妊娠或哺乳期妇女及精神病患者; 酒精依赖者; 内分泌疾病患者; 合并重度营养不良或伴有心、脑、肾、造血系统严重损害者。

2 一般资料 107 例强直性脊柱炎患者(以下简称疾病组)均为北京中日友好医院中医风湿病科门诊和住院患者, 男 83 例, 女 24 例, 年龄 20~45 岁, 平均(32.89±7.63)岁; 发病年龄 12~38 岁, 平均(23.27±9.87)岁; 病程 3.5~16.0 年, 平均(8.35±4.42)年; HLA-B27 阳性者 99 例(92.52%); 健康对照组 681 名为本院同期健康人 BMD 检查者, 男 508 名, 女 173 名, 年龄 20~45 岁, 平均(33.12±8.61)岁。两组年龄、性别构成比差异无显著性, 具有可比性。

3 观察项目和检测方法 采用 DPX-L 型骨密度仪(美国 LUNAR 公司生产)测定两组腰椎、股骨颈、股骨粗隆和 Ward 三角区 BMD。统计学方法采用 t 检验。

结 果

1 101 例 AS 患者中医辨证分型结果 107 AS 患者中医辨证分型分布为: 肾虚督寒证最多(60 例), 邪郁化热证(14 例), 湿热伤肾证(14 例), 邪痹肢节证(13 例)和邪及肝肺证(6 例)依次次之。

2 不同证型 AS 患者与对照组 BMD 比较 见表 1。与健康对照组比较, 肾虚督寒证、邪郁化热证组腰椎 BMD 显著降低(P<0.01, P<0.05), 肾虚督寒证、邪郁化热证、湿热伤肾证组股骨近端的所有部位(股骨颈、三角区、股骨粗隆)BMD 均显著降低(P<0.01), 邪及肝肺证组股骨颈、三角区 BMD 降低(P<0.05), 邪痹肢节证组 BMD 与健康对照组比较差异无显著性。

讨 论 强直性脊柱炎属于中医学“大”之疾, 其病因病机主要是肾督正气不足或因风寒湿三邪(尤其是寒湿偏重者)深侵肾督而出现骨质受损、关节变形。骨质受损与强直性脊柱炎所引起的 BMD 改变相符, 关节变形则与脊柱关节强直甚至脊柱竹节样变相一致。因此, 以骨量减少为标志的 BMD 下降是骨质受损的外在表现之一, 并可能是肾督亏虚的物质基础之一。强直性脊柱炎患者普遍存在肾督亏虚, 其中肾虚督寒证、邪郁化热证和湿热伤肾证的肾督亏虚程度更重, 同时感受外邪的程度亦重, 邪痹肢节证和邪及肝肺证感受邪气较轻。提示在临床治疗时, 肾虚督寒证、邪郁化热证和湿热伤肾证应补肾强督和祛除邪气(寒、热、湿热)并重, 而邪痹肢节证、邪及肝肺证则应侧重于补肾强督。

表 1 AS 患者中医不同证型与健康对照组 BMD 比较 (g/cm², $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	BMD			
		腰椎	股骨颈	三角区	股骨粗隆
肾虚督寒证	60	0.963±0.131**	0.816±0.116**	0.711±0.131**	0.653±0.204**
邪郁化热证	14	1.042±0.194*	0.789±0.112**	0.697±0.118**	0.640±0.142**
湿热伤肾证	14	1.121±0.144	0.913±0.068*	0.780±0.089**	0.758±0.122**
邪痹肢节证	13	1.266±0.177	0.982±0.175	0.919±0.205	0.858±0.173
邪及肝肺证	6	1.057±0.079	0.842±0.100*	0.728±0.143*	0.777±0.089
健康对照	681	1.120±0.101	0.954±0.133	0.901±0.193	0.837±0.092

注: 与健康对照组比较, *P<0.05, **P<0.01

(收稿 2004-01-01 修回 2004-07-10)