

液相芯片技术检测痰湿体质人群 TNF- α 、IL-6、CRP 及 MCP-1 的表达研究

郑璐玉¹ 杨玲玲¹ 李玲孺¹ 井慧如¹ 王 济¹ 王前飞² 王 琦¹

摘要 **目的** 应用液相芯片技术研究 20~50 岁痰湿体质及平和体质人群外周血血清炎症因子——肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、C-反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 及单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein 1, MCP-1) 的表达变化及其与肥胖的关系。**方法** 选择 2011 年 4—12 月北京普仁医院体检中心体检人群 101 名。以体重指数 (BMI) 为依据, 将研究对象分为痰湿体质肥胖组 (OBT, BMI ≥ 24 kg/m²) 30 例, 痰湿体质非肥胖组 (NOBT, BMI < 24 kg/m²) 25 例, 肥胖非痰湿体质组 (OBNT, BMI ≥ 24 kg/m²) 28 例以及平和体质组 (P, BMI < 24 kg/m²) 18 例。比较各组 BMI 及体脂肪率 (FAT%); 采用液相芯片法测定各组血清 TNF- α 、IL-6、CRP 及 MCP-1 水平。**结果** OBT 和 OBNT 组 BMI 显著高于 NOBT 及 P 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); OBT 和 OBNT 组体 FAT% 高于 P 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。OBT 组血清 TNF- α 高于 P 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); OBT、OBNT 组及 NOBT 体质组血清 CRP 及 MCP-1 含量均高于 P 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 痰湿体质评分与 TNF- α 、IL-6 及 MCP-1 呈正相关 ($P < 0.05$)。**结论** 20~50 岁痰湿体质人群存在炎症因子异常, 且痰湿体质人群和肥胖人群均存在慢性低度炎症状态。

关键词 痰湿体质; 炎症因子; 液相芯片

Expressions of TNF- α , IL-6, CRP, and MCP-1 in Phlegm-damp Constitution Population Detected by Multiplexed Luminex Assay ZHENG Lu-yu¹, YANG Ling-ling¹, LI Ling-ru¹, JING Hui-ru¹, WANG Ji¹, WANG Qian-fei², and WANG Qi¹ 1 Center for Traditional Chinese Medicine Constitution Research, School of Basic Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing (100029), China; 2 Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing (100101), China

ABSTRACT **Objective** To study the expression changes of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), C-reactive protein (CRP), monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1), and their correlation with obesity in 20–50 years old population of phlegm-damp constitution (PDC) and of normal constitution (NC) using Luminex technique. **Methods** Totally 101 population were recruited from Health Examination Center of Puren Hospital from April to December 2011. Based on body mass index (BMI), the subjects were assigned to four groups, i.e., the obesity of PDC group (Group OBT, BMI ≥ 24 kg/m², 30 cases), the non-obesity of PDC group (Group NOBT, BMI < 24 kg/m², 25 cases), the obesity of non-PDC group (Group OBNT, BMI ≥ 24 kg/m², 28 cases), the NC group (Group P, BMI < 24 kg/m², 18 cases). The BMI and body fat percent (FAT%) were compared among the 4 groups. Serum levels of TNF- α , IL-6, CRP, and MCP-1 were measured with Luminex technique. **Results** BMI was significantly higher in Group OBT and Group OBNT than in Group NOBT and Group P (all $P < 0.05$). The FAT% was significantly higher in Group OBT and Group OBNT than in Group P ($P < 0.01$). The serum TNF- α level in Group OBT was higher than in Group P ($P < 0.01$). The serum CRP and MCP-1 levels were significantly higher in Group OBT, NOBT, and OBNT than in Group P ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The score for PDC was positively

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81030064); 国家自然科学基金青年基金资助项目 (No. 81102526)

作者单位: 1. 北京中医药大学基础医学院中医体质研究中心 (北京 100029); 2. 中国科学院北京基因组研究所 (北京 100029)

通讯作者: 王 琦, Tel: 010-62486867, E-mail: wangqi710@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2013.07.0920

correlated with TNF- α , IL-6, and MCP-1 levels ($P < 0.05$). Conclusions Abnormal higher levels of inflammatory factors exist in 20–50 years old population of PDC. Chronic inflammation exists in population of PDC and obesity people.

KEYWORDS phlegm-damp constitution; inflammatory cytokine; Multiplexed luminex assay

痰湿体质是指由于津液运化失司,脾不散精,精微物质运行输布障碍与转化失调,痰湿凝聚、互蕴,迁延日久而逐渐形成的以黏滞重浊为主的偏颇体质状态,是肥胖症、高血脂、高血压病等代谢综合征相关疾病的易发体质^[1]。前期研究表明,痰湿体质是肥胖人群的主要体质类型。近年来,主要由肝脏合成的急性时相反应物——C 反应蛋白(C-reactive protein, CRP)作为急慢性炎症反应的敏感标志物,成为肥胖与有关心血管疾病及糖尿病研究的热点,而前炎症因子——IL-6 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)可能是肥胖和炎症的联系纽带^[2]。国内外众多研究发现肥胖人群外周血清中以上炎症因子水平升高^[3,4],但在痰湿体质人群中其水平是否升高,其升高又是否独立于肥胖目前尚无研究。液相芯片技术具有高通量、高灵敏度和高时效的特点,可同时检测数十种细胞因子。本实验采用 Luminex 液相芯片技术研究炎症因子——CRP、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、IL-6 和 TNF- α 在肥胖症痰湿体质、肥胖症非痰湿体质、痰湿体质非肥胖人群血清中的变化,探讨其与痰湿体质评分的关系。

资料与方法

1 超重/肥胖诊断标准及痰湿体质判定标准 根据中华人民共和国卫生部《中国成人超重和肥胖症预防控制指南》^[1]推荐的标准,体重指数(body mass index, BMI),BMI 18~24 为体重正常, BMI 24~28 为超重, BMI ≥ 28 为肥胖。体质判定标准参照《中医体质分类与判定》^[2]。

2 纳入及排除标准 纳入标准:年龄 20~50 岁;近 1 周内无急性感染、酗酒、吸烟及应用任何药物史;签署知情同意书。排除标准:各种兼夹体质;妇女经期;代谢性疾病;服药期间;患有其他疾病及孕妇。

3 一般资料 选择 2011 年 4—12 月北京普仁医院体检中心体检超重及肥胖人群 58 例,按照体质分为肥胖痰湿体质组(OBT 组,30 例:男 12 人,女 18 人),肥胖非痰湿体质组(OBNT 组,28 例:男 11 人,女 17 人);另选择非肥胖人群 43 例,按体质分为痰湿体质非肥胖组(NOBT 组 25 例:男 11 人,女 14 人),

平和体质非肥胖组(P 组,18 例:男 6 人,女 12 人)。其中,OBT 组平均年龄为(42.3 ± 9.7)岁,OBNT 组平均年龄为(43.0 ± 11.9)岁,NOBT 组平均年龄为(36.3 ± 14.1)岁,P 组平均年龄为(39.3 ± 8.8)岁,各组间年龄比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。此外,OBT 组痰湿体质得分为(23.3 ± 3.9)分,OBNT 组痰湿体质得分为(14.2 ± 4.9)分,NOBT 组痰湿体质得分为(23.5 ± 4.3)分,P 组痰湿体质得分为(12.6 ± 2.2)分,痰湿体质组和非痰湿体质组痰湿体质得分差异有统计学意义($P < 0.05$)。

4 观察指标及方法 所有受试者清晨空腹采静脉血 6 mL,3 000 r/min,15 min,2 h 内分离血清, -80 ℃ 冰箱待检。测量身高及腰围,在专业人士指导下受试者填写体质量表^[2]并计算体质评分(痰湿体质:是 ≥ 21 ;倾向是 18~20。痰湿体质分数 ≥ 21 分者结合四诊判断为痰湿体质,量表所有体质评分均 < 18 分者结合四诊判断为平和体质)。

4.1 BMI 及体脂脂肪率(FAT%)检测 使用日本 TANITA 公司生产的人体组成分析仪(TANITA-BC-420)进行测定。该仪器于测前校次水平位,受试者脱去外衣,摘掉身上携带的所有金属及电子设备,赤脚站立于 BC-420 仪上,输入年龄和身高,检测体重、BMI 及 FAT%。

4.2 炎症因子检测 IL-6、TNF- α 、CRP 和 MCP-1(FLUOROKINE MAP Multiplex Human Cytokine Panel and Obesity Panel,购自美国 R&D Systems 公司),采用 Luminex 液相芯片法(Luminex xMAP Technology,美国)Bio-plex 200 system 高通量分析平台(Bio-Rad 公司)检测受试者血清中游离蛋白量表达。

5 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件先进行描述性统计学分析,资料的正态性用单样本 K-S 检验,非正态分布的计量资料进行自然对数转换后进行正态性检验^[5]。对符合正态分布的计量资料两组间比较采用 t 检验及配对 χ^2 检验,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,相关变量的单因素相关分析采用 Pearson 相关分析或偏相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组腰围、BMI 及 FAT%比较(表 1) OBT 和

OBNT 腰围、FAT% 显著高于 P 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$, $P < 0.05$); OBT 和 OBNT 组 BMI 显著高于 NOBT 及 P 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 各组腰围、BMI 及 FAT% 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	腰围 (cm)	BMI (kg/m ²)	FAT% (%)
OBT	30	97.3 ± 9.3 ^{△△}	28.5 ± 2.2 ^{*△}	35.3 ± 7.1 [△]
OBNT	28	90.4 ± 8.1 ^{△△}	27.0 ± 1.7 ^{*△}	30.3 ± 6.5 [△]
NOBT	25	80.6 ± 8.6	21.1 ± 2.3	24.6 ± 4.6
P	18	78.2 ± 8.3	21.3 ± 2.4	22.6 ± 6.6

注: 与 NOBT 组比较, $*P < 0.05$; 与 P 组比较, $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。

2 各组血清 TNF- α 、IL-6、CRP 及 MCP-1 比较 (表 2) OBT 组血清 TNF- α 高于 P 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); OBT、OBNT 组及 NOBT 体质组血清 CRP 及 MCP-1 含量均高于 P 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

表 2 各组血清 TNF- α 、IL-6、CRP 及 MCP-1 比较 (pg/mL, $\bar{x} \pm s$)

组别	例数	TNF- α	IL-6	CRP	MCP-1
OBT	30	2.8 ± 1.1 ^{**}	2.5 ± 6.3	6 838.5 ± 3 096.9 ^{**}	65.9 ± 45.5 [*]
OBNT	28	2.5 ± 1.4	1.1 ± 1.5	6 752.8 ± 2 987.9 ^{**}	61.9 ± 38.9 [*]
NOBT	25	2.5 ± 1.1	1.1 ± 1.2	5 638.6 ± 2 807.4 ^{**}	61.3 ± 25.3 ^{**}
P	18	1.8 ± 1.3	0.7 ± 0.6	2 075.5 ± 1 277.3	27.8 ± 15.6

注: 与 P 组比较, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$

3 NOBT 组 TNF- α 、IL-6、CRP 及 MCP-1 与痰湿体质评分相关性分析 (表 3) NOBT 组血清 TNF- α 、IL-6、CRP 及 MCP-1 水平与痰湿体质评分呈正相关, 其中 TNF- α 、IL-6 和 MCP-1 有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 3 NOBT 组 TNF- α 、IL-6、CRP 及 MCP-1 水平与痰湿体质评分相关性

指标	r 值	P 值
TNF- α	0.23	$P < 0.05$
IL-6	0.40	$P < 0.05$
CRP	0.06	$P > 0.05$
MCP-1	0.58	$P < 0.05$

讨 论

液相芯片是一种非常灵活的多功能技术平台, 可进行蛋白、核酸等生物大分子检测及酶学分析、受体和配体识别分析等研究, 被喻为后基因组时代的芯片技术^[6,7]。与传统的 ELISA 法相比具有快速、经济、高效、灵活的特点, 对于以人群为目标临床大样本取样的研究, 更是具有节省样本量的优势。目前国外将液相芯片技术用于肥胖及代谢性疾病炎症因子的研究逐渐

增多, 但是国内尚不多见。本实验应用 Luminex 液相芯片平台检测痰湿体质人群外周血血清炎症因子含量。

炎症的病理生理作用是局限和消除损伤因子、清除异物和组织修复, 但长期反复的炎症可导致一系列的疾病^[8,9]。炎症反应时, 机体分泌大量炎症因子如 TNF- α 、IL-6 和 CRP 来实现对自身的保护。CRP 是由肝脏产生、分泌的重要防御分子, 是亚临床炎症反应的敏感性标志物, 其表达受某些炎症因子调控, 如 IL-6 和 TNF- α 作为极强的促炎因子, 可刺激肝脏合成 CRP^[9,10]。MCP-1 是介导巨噬细胞激活和趋化的重要介质, 可诱导巨噬细胞由外周血液循环进入脂肪组织并使其激活。巨噬细胞一旦被激活, 可分泌多种炎症因子, 如 IL-6、TNF- α 等, 这些炎症因子均可抑制脂肪细胞的胰岛素信号传导, 还可进一步刺激巨噬细胞分泌大量炎症因子, 最终引起脂肪细胞广泛降解^[10,11]。

近年来研究表明, 肥胖及超重人群外周血血清中炎症因子含量显著升高, 处于慢性低度炎症状态, 同时也是代谢综合征的高发人群。中医学认为痰饮是人体水液代谢障碍所产生的病理变化和病理性产物^[12]。董静等^[13,14]研究表明, 代谢性疾病产生的“共同土壤”是痰湿体质, 其共同的代谢机制是“津液不归正化, 痰湿内蕴”, 虽然表现为不同疾病, 但都有共同的体质基础, 病邪从化产生相同的证候。然而痰湿与肥胖并非等同的概念, 中医学除擅长观察外形之外, 更注重综合证候、舌脉等表现进行内在变化的推测。痰湿是水谷代谢障碍所形成的病理产物, 无论是过食肥甘厚味, 还是脏腑功能失调, 都会导致代谢障碍, 水谷精微不归正化, 聚而成痰成湿。除了肥胖的外在表现外, 痰湿还有多种表征, 中医体质学对古今文献中描述痰湿的表征进行了总结, 频率出现三次以上的有肢体不爽、身重、脘腹胀满、胸闷、口中黏腻、大便不实等十余种, 中医为痰湿内蕴的表征提出了丰富的借鉴, 也即肥胖这一外在表现并不是痰湿内蕴的唯一或者必要条件^[15]。

本研究发现 OBT 组及 OBNT 组 TNF- α 、IL-6、CRP 及 MCP-1 含量均高于 P 组, 其中 OBT 组 TNF- α 和 CRP 及 OBNT 组 CRP 含量与 P 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), OBT 组和 OBNT 组 MCP-1 含量与 P 组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 与国内外文献报道结果一致。同时, 以上炎症因子 OBT 组表达量均高于 OBNT 组, 组间虽无统计学意义 ($P > 0.05$), 但提示痰湿体质可能会加速肥胖症患者的炎症进程, 从而促使肥胖症患者罹患代谢性疾病的可能性增加。

在炎症因子与肥胖指数相关性方面,国内外文献[16-18]报道一致,本研究也与这些结果相一致。肥胖症痰湿体质患者聚集了肥胖、高胰岛素血症、血脂异常等代谢综合征的风险因素,罹患代谢异常疾病的风险增高,但 MCP-1 和 CRP 水平升高代表的痰湿体质存在潜在代谢紊乱状态是否独立于肥胖尚无具体研究。本试验首次发现,NOBT 组 BMI 及 FAT% 与 P 组间差异虽无统计学意义,但是 NOBT 组的 FAT% 仍旧高于 P 组,符合痰湿体质人群外形特征,即腹部肥胖松软,身体沉重不轻、不爽快等特点。而 NOBT 组 TNF- α 、IL-6、CRP 及 MCP-1 表达量均高于 P 组,且 CRP 和 MCP-1 含量与 P 组比较差异有统计学意义($P < 0.01$),同时其表达趋势与肥胖组相同,且组间比较差异无统计学意义。说明 CRP 和 MCP-1 的升高不仅与肥胖相关,与痰湿体质本身亦密切相关。因此笔者推断,痰湿体质非肥胖人群体内也处于慢性低度炎症状态,与肥胖与否并无密切联系。痰湿体质本身已独立于肥胖之外出现了代谢紊乱倾向。

综上所述,本次试验首次发现痰湿体质人群无论肥胖与否,已处于慢性低度炎症状态,与肥胖及超重人群一样是罹患代谢紊乱疾病的高风险人群。《中医体质分类与判定》标准在体检及亚临床筛查中具有极其重要的意义,在不通过实验室检测的情况下,痰湿体质评分结合中医临床四诊合参即可有效判断出体重正常但已处于慢性低度炎症亚临床代谢紊乱状态的痰湿体质人群。

参 考 文 献

- [1] 王琦主编.中国人九种体质的发现[M]. 北京: 科学出版社, 2011:162.
- [2] 王琦,叶加农,朱燕波,等. 中医痰湿体质的判定标准研究[J]. 中华中医药杂志, 2006, 21(2): 73-75.
- [3] 罗勇,李小平,吕湛,等. 超重及肥胖者血清 TNF- α 、IL-6、CRP 水平变化及意义的研究[J]. 四川医学, 2008, 29(6): 658-659.
- [4] 王朝迅,裴海成,金红梅,等. 超重和肥胖者血清 TNF- α 、IL-6 及 CRP 与肥胖的关系[J]. 天津医药, 2007, 35(5): 332-334.
- [5] 刘艳明,农光民,吴娇华. 单纯性肥胖外周血单核/巨噬细胞趋化因子与胰岛素抵抗的相关性研究[J]. 中国实用儿科杂志, 2009, 24(3):197-198.
- [6] World Health Organization. Obesity: preventing and managing the global epidemic [R]. Geneva: WHO, 2000:894.
- [7] 邓元江,梁伟雄,陈云波,等. 慢性充血性心力衰竭患者血清细胞因子 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 及 IL-10 的液相芯片检测[J]. 广东医学, 2006, 27(9): 335-33.
- [8] 陈玮,李明,吴英松,等. 用液相芯片技术定量测定人血清 CEA、AFP 和 HBsAg[J]. 中山大学学报(医学科学版), 2007, 28(1): 105-109.
- [9] Pradhan AD, Manson JE, Rifai N, et al. C-reactive protein, interleukin-6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus [J]. JAMA, 2001, 286(3):327-334.
- [10] 张洁,王方,许海燕,等. 炎症因子与胰岛素抵抗[J]. 世界华人消化杂志, 2006, 14(32): 3121-3125.
- [11] Fujiki K, Kano F, Shiota K, et al. Expression of the peroxisome proliferator activated receptor gamma gene is repressed by DNA methylation in visceral adipose tissue of mouse models of diabetes[J]. BMC Biol, 2009, 38(7): 10.
- [12] 张红敏,谢春光,陈世伟. 动脉粥样硬化、2 型糖尿病等疾病发病学说中低度炎症的中医病理探讨[J]. 中医杂志, 2005, 46(2): 83-84.
- [13] 董静,王琦,吴宏东,等. 代谢综合征体质因素的病例-对照研究[J]. 中国康复理论与实践, 2007, 13(5): 464-465.
- [14] 王东坡,王琦. 痰湿体质研究现状分析与展望[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(1): 5-8.
- [15] 李玲儒. 痰湿体质与肥胖亚型的相关性及其易发代谢综合征的氧化应激机制研究[D]. 北京:北京中医药大学, 2012:24.
- [16] Tarantino G, Savastano S, Colao A. Hepatic steatosis, low-grade chronic inflammation and hormone/growth factor/adipokine imbalance[J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(38): 4773-4783.
- [17] Monteiro R, Azevedo I. Chronic inflammation in obesity and the metabolic syndrome [J]. Mediators Inflamm, 2010, 7:2-3.
- [18] Hassanali Z, Ametaj BN, Field CJ, et al. Dietary supplementation of n-3 PUFA reduces weight gain and improves postprandial lipaemia and the associated inflammatory response in the obese JCR: LA-cp rat [J]. Diabetes Obesity Metabolism, 2010, 12(2): 139-147.

(收稿:2012-10-25 修回:2013-03-17)