

不同环境温度下 P2X5 受体表达与虚寒证、虚热证关系的研究

杨丽萍 于洪洁 黄睿 李新民 詹向红 侯俊林

摘要 **目的** 检测在不同温度环境下外周血中的 P2X5 受体的表达情况,探讨其与虚寒证、虚热证之间的关系。**方法** 通过量表及专家诊断筛选出正常组、虚寒证组及虚热证组各 20 例,抽取室温(25 ℃)及低温(-4 ~ 5 ℃)下受试人员肘静脉血样 5 mL,用实时荧光定量 PCR 对 P2X5 受体表达进行相对定量,分别比较 3 组受试人员室温和低温下 P2X5 受体的表达情况。**结果** 在室温状态下,虚寒证、虚热证组 P2X5 受体表达低于正常组($P < 0.05$);在低温状态下,与正常组比较,虚寒证组 P2X5 受体表达降低更明显($P < 0.01$),且低于虚热证组,差异有统计学意义($P < 0.05$),3 组组内 P2X5 受体在两种温度下的表达均无差异($P > 0.05$)。**结论** 不同的中医证候在不同的外界环境温度下 P2X5 受体的表达情况不同。外界环境温度对同一证候人群的 P2X5 受体表达的影响不显著。

关键词 实时荧光定量 PCR;P2X5 受体;虚寒证;虚热证

The Relationship Study between Expressions of P2X5 Receptor and Deficiency-cold Syndrome/Deficiency-heat Syndrome at Various Ambient Temperatures YANG Li-ping, YU Hong-jie, HUANG Rui, LI Xin-min, ZHAN Xiang-hong, and HOU Jun-lin *Basic Discipline of Integrated Chinese and Western Medicine, Henan College of TCM, Zhengzhou (450046), China*

ABSTRACT **Objective** To detect the expression of the peripheral blood P2X5 receptor at various ambient temperatures, and to explore its relationship with deficiency-cold syndrome and deficiency-heat syndrome. **Methods** Subjects were selected by questionnaire and expert diagnosis, and assigned to the normal control group, the deficiency-cold syndrome group, and the deficiency-heat syndrome group, 20 in each group. 5 mL venous blood was collected at room temperature (25 ℃) and cold temperature (-4 - 5 ℃) respectively. Then the expression of P2X5 receptor was relatively quantified by real-time fluorescence quantitative PCR, and compared at room temperature and cold temperature respectively. **Results** The expression of P2X5 receptor in deficiency-cold syndrome and deficiency-heat syndrome groups was lower than that in the normal control group at room temperature ($P < 0.05$). It decreased more at cold temperature in the deficiency-cold syndrome group than in the normal control group ($P < 0.01$) as well as in the deficiency-heat syndrome group ($P < 0.05$). The expression of P2X5 receptor showed no difference in all groups at two different temperatures ($P > 0.05$). **Conclusions** The expression of P2X5 receptor was different in different syndrome groups at various ambient temperatures. Ambient temperatures had insignificant effect on the expression of P2X5 receptor of the population with the same syndrome.

KEYWORDS real-time fluorescent quantitative PCR; P2X5 receptor; deficiency-cold syndrome; deficiency-heat syndrome

《素问·调经论》曰:“阳虚则外寒,阴虚则内热”。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81072734); 国家重点基础研究发展计划(No.2011CB505102)

作者单位:河南中医学院中西医结合基础学科(郑州 450046)

通讯作者:杨丽萍, Tel:0371-65934070, E-mail:bioyjp@126.com

DOI: 10.7661/CJIM.2015.05.0559

中医学认为,当机体表现出肢冷、畏寒、面色苍白、小便清长等证候特征时,是由于体内阳气亏损,以致机体失却温养,蒸腾、气化作用减退,为虚寒证候的表现。体内阴液亏少,滋润、濡养作用减退,表现为咽干、五心烦热、小便短赤、脉细数等则为虚热证候。从现代医学理论讲,虚寒证、虚热证特有的这些证候表现是否存在一定

的物质基础?是否和某些基因的正常表达相关?本课题前期利用基因芯片技术筛选出家系虚寒证与非家系虚寒证的差异表达的基因分别有 136 条和 138 条^[1],其中 P2X5 受体表达下调^[2]。P2X5 受体在其他证型是否有不同的表达?不同温度状态下,患者的主观感受各不相同,是否和 P2X5 受体的表达变化有关?本研究筛选正常组、虚寒证、虚热证组,设立两种不同的环境温度,运用实时荧光定量 PCR 技术对 3 组受试对象外周血中 P2X5 受体进行定量分析,探讨不同温度状态下 P2X5 受体表达与虚寒证、虚热证的关系。

资料与方法

1 诊断标准 以《中医诊断学》^[3]、《中医证候鉴别诊断学》^[4]中的虚寒证、虚热证诊断标准为参考,筛选虚寒、虚热证。虚寒证:(1)畏寒肢冷;(2)口淡不渴,或喜热饮;(3)面色㿔白;(4)舌淡胖苔润;(5)脉沉迟无力。具备 3 项为虚寒证。虚热证:(1)五心烦热;(2)口干咽燥;(3)潮热盗汗;(4)舌红少苔;(5)脉象细数。具备 3 项为虚热证。同一个研究对象需由 3 名专家进行诊断,根据专家的诊断结果,选取诊断结果一致性较好的对象纳入。

2 纳入标准 (1)符合虚寒证、虚热证患者的诊断标准;(2)年龄 18~25 岁;(3)签署知情同意书。

3 排除标准 (1)不愿意参加调查者;(2)有意识障碍者、精神病患者或聋哑人等不能正确描述自己的症状者;(3)近期感冒或急性病患者。

4 一般资料 根据《中医体质量表》^[5]对河南中医学院本科生进行初筛。依据评分标准筛选出符合平和质、阳虚质和阴虚质的人群。对上述 3 类人群进行专家诊断。筛选出正常对照组、虚寒证和虚热证组各 20 例,正常组男 11 例,女 9 例;虚寒证组男 10 例,女 10 例;虚热证组男 10 例,女 10 例;3 组基线资料比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。本试验通过河南中医学院第一附属医院伦理委员会批准。

5 试剂及仪器

5.1 试剂 动物全血高质纯化线粒体分离试剂盒(GMS10099.3,上海杰美基因科技有限公司);Trizol (Invitrogen);氯仿、异丙醇、无水乙醇及 DEPC H₂O 均为 BBI 公司产品;第一链 cDNA 合成试剂盒(AMV First Strand cDNA Synthesis Kit);定量 PCR 试剂[ABI SybrGreen PCR Master Mix (2X)]。

5.2 主要仪器 电热恒温培养箱(上海跃进医疗器械公司);微量移液器(德国 Eppendorf 公司);低温高速离心机(美国 Thermo Fisher Scientific 公

司);超低温冰箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司);超滤净水机(美国 Millipore 公司);涡旋震荡仪(北京市六一仪器厂);电子天平(北京市六一仪器厂);电泳仪(北京市六一仪器厂);凝胶成像分析系统(美国 UVP 公司);定量 PCR 仪(ABI Stepone Plus 型荧光定量 PCR 仪)。

6 温度的设定及样本采集 在确保受试人员饮食正常的情况下,让受试人员到室外温度 -4~5℃ 环境中慢步 30 min,用加有抗凝剂的静脉采血管抽取肘静脉血液 5 mL,充分混匀;后在 25℃ 室温环境下静坐 20 min,取肘静脉血液 5 mL,颠倒混匀。备用。

7 实时荧光定量 PCR 检测不同温度下 P2X5 受体表达水平

7.1 白细胞及总 RNA 的提取和鉴定 根据试剂盒快速分离、提取白细胞。各组白细胞样本分别加入 1 mL Trizol 并按操作说明进行 RNA 的提取。取适量 RNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳检测,用紫外分光光度计检测样品在 260 nm 和 280 nm 的吸光值,确保 RNA 浓度在 1.8~2.0 之间。将提取的细胞 RNA 样品存放于 -80℃ 冰箱备用。

7.2 引物设计与合成 按 PCR 引物设计原则执行,根据 Genbank 基因序列检索数据库检索相应的基因序列,利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物,委托上海生工生物工程技术有限公司合成。见表 1。

表 1 引物序列和扩增片段长度

基因	引物序列	长度(bp)
P2X5	F-5'-GTGCTGTCATCACCAAAAGTCAA-3'	145
	R-5'-TTGGGGGTCACAATCAGGTT-3'	
GAPDH	F-5'-TGGGTGTGAACCATGAGAAGT-3'	126
	R-5'-TGAGTCTTCCACGATACCAA-3'	

7.3 实时荧光定量 PCR 检测 取冻存样本经常温解冻后,利用 BBI 第一链 cDNA 合成试剂盒(AMV First Strand cDNA Synthesis Kit)进行逆转录反应,反应条件为 42℃ 孵育 60 min,70℃ 加热 10 min。按照 ABI SybrGreen PCR Master Mix (2X)试剂盒要求配制反应混合液 20 μL,放入 ABI Stepone plus 型荧光定量 PCR 仪中进行反应。反应条件为:95℃ 2 min;95℃ 10 s,60℃ 40 s,40 个循环。反应结束后,利用实时荧光定量 PCR 分析软件读取相应的 Ct 值,根据公式计算 $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ 值。在组间比较时,分别选取室温和低温环境下一个正常组的 $\Delta\Delta Ct$ 为基数,分别计算 3 组 P2X5 受体的 $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ 值;在组内比较时,分别选取低温环境下的一个 $\Delta\Delta Ct$ 为基数,计算组内不同温度下的 $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ 值,

进行相对定量分析。

8 统计学方法 应用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学处理,定量资料符合正态性以 $\bar{x} \pm s$ 表示。3 组之间的比较采用单因素方差分析;组间两种温度间比较采用配对 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1 各组室温下 P2X5 受体表达水平比较(表 2) 在室温环境下,与正常组比较,虚寒证、虚热证组 P2X5 受体的表达量降低,且差异均有统计学意义($P < 0.05$);虚寒证的表达情况低于虚热证,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 2 各组室温下 P2X5 受体表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	P2X5 受体
正常	20	2.54 ± 0.54
虚寒证	20	1.47 ± 0.61*
虚热证	20	1.75 ± 0.35*

注:与正常组比较,* $P < 0.05$

2 各组低温下 P2X5 受体表达水平比较(表 3) 在低温状态下,正常组的表达情况高于其他两组,虚寒证组 P2X5 受体表达降低更明显,差异有统计学意义($P = 0.002$),且低于虚热证组,差异有统计学意义($P = 0.037$),正常组与虚热证比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

表 3 各组低温下 P2X5 受体表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	P2X5 受体
正常	20	1.66 ± 0.45
虚寒证	20	1.24 ± 0.12*
虚热证	20	1.45 ± 0.19 [△]

注:与正常组比较,* $P < 0.01$;与虚寒证组比较,[△] $P < 0.05$

3 各组两种温度下组内 P2X5 受体表达水平(表 4) P2X5 受体在正常组、虚寒证组低温的表达情况略高于室温,但 3 组组内的低温与室温值比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

表 4 各组两种温度下组内 P2X5 受体表达水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	室温环境	低温环境
正常	20	1.66 ± 0.63	1.70 ± 0.50
虚寒证	20	0.91 ± 0.45	1.01 ± 0.72
虚热证	20	0.79 ± 0.19	0.70 ± 0.23

讨 论

P2X5 受体是配体门控阳离子通道,尤其对 Ca^{2+} 的通透性较高^[6],可通过影响线粒体内游离 Ca^{2+} 浓度,

进而影响胞内 ATP 酶活性,导致三羧酸循环和有氧氧化发生改变,影响机体的产能^[7]。本研究结果显示,不论在室温或是低温环境下,虚寒证、虚热证组 P2X5 受体表达均低于正常组($P < 0.05$)。提示这两种虚证都存在产能不足。当处于低温状态时,虚寒证 P2X5 受体的表达低于虚热证组($P < 0.05$),虚寒证对寒冷的耐受程度低于虚热证,更易表现出明显的畏寒、四肢发冷等寒相。周志东等^[8]的研究也表明“热体”大鼠的肝线粒体游离钙、能量生成和消耗均高于“寒体”,与本研究结果相似。至于虚热证的表达为何低于正常组而高于虚寒证组,笔者推测表现为畏寒肢冷的虚寒证和五心烦热的虚热证在能量产生不足的同时可能还存在着能量利用率和储存的区别。从现代医学角度讲,能量对机体的影响除受产能多少影响外,能量的利用和储存比例也直接影响着机体对能量需求的表现^[9]。

病理情况或应激状态下,细胞释放大量的 ATP 及其降解产物,使 P2X 受体的表达失常,从而导致 P2X 受体的调节功能异常^[10]。同理,寒冷作为一种外界刺激,亦可引起机体的应激反应,通过神经递质,调节相关基因的表达,使机体产生一系列的变化适应环境^[11]。有研究显示,不同环境温度可通过 P2X 受体的激动剂和抑制剂对大鼠体温调节中枢产生影响进而引起体温的变化^[12];但本研究结果显示,3 组组内在低温室温下 P2X5 受体表达无明显差异($P > 0.05$)。考虑与以下几点相关:(1)基于医学伦理学对受试人员的保护,本次试验是利用冬天自然的寒冷温度($-4 \sim 5$ °C 左右)作为实验条件。受试人员正常着装,而 $-4 \sim 5$ °C 左右不是人体的最低耐受温度。(2)由于对自然环境无法控制,每天最低温度不同,受试人员受到的寒冷刺激程度不尽相同。因此,机体对外界冷刺激虽然产生了一些应激反应,但未能完全激活 P2X5 受体的功能。

本次试验初步证实,不同的中医证候 P2X5 受体的表达情况不同,同一证候人群的 P2X5 受体表达受外界温度的影响不显著。但有研究结果显示虚寒证、虚热证出现不同的症状可能与氧化还原酶活性相关基因的异常表达^[13]、内分泌水平、能量代谢、血液循环、组织器官等诸多因素有关^[14]。在后续研究中,将对 ATP 的合成速率、呼吸链上 5 种复合体的活性进行测定,以期进一步探索中医不同证型在不同温度下 P2X5 受体与能量代谢的关系。

参 考 文 献

- [1] 杨丽萍,陈四清,丁俊维,等.家系虚寒证与非家系虚寒证基因表达谱比较研究[J].中华中医药杂志,2011,

- 26(7): 1478 - 1481.
- [2] 杨丽萍. 虚寒证的能量代谢基因功能模块异动研究 [D]. 成都: 成都中医药大学, 2007, 1 - 162.
- [3] 朱文峰. 中医诊断学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002.
- [4] 姚乃礼. 中医证候鉴别诊断学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 259 - 460.
- [5] 王琦, 朱燕波, 薛禾生, 等. 中医体质量表的初步编制 [J]. 中国临床康复, 2006, 10(3): 12 - 14.
- [6] Gerevich Z, Muller C, Liies P. Metabotropic P2Y1 receptors inhibit P2X3 receptor-channels in rat dorsal root ganglion neurons [J]. Eur J Pharmacol, 2005, 521(1-3): 34 - 38.
- [7] 贾弘提, 屈伸. 生物化学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 191.
- [8] 周志东, 王学敏, 缪明勇, 等. “寒体”、“热体”大鼠肝线粒体能量代谢的研究 [J]. 上海中医药大学学报, 2000, 14(2): 34 - 37.
- [9] 陆明, 高峰, 丁维俊, 等. 虚寒证肢冷的能量代谢紊乱之机
- 理探讨 [J]. 辽宁中医杂志, 2007, 34(8): 1065 - 1066.
- [10] Wada H, Otomo R, Shimoda N, et al. Acceleration of ATP-induced contraction in the obstructed bladder of the rat [J]. Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi, 2003, 94(3): 439 - 447.
- [11] 金锐, 张冰. 基于机体对寒冷刺激的适应性改变原理探讨阳虚证畏寒肢冷实质 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(5): 670 - 696.
- [12] Gurin VN, Gurin AV, Melenchuk EV. The effects of activation and blockade of central P2X receptors on body temperature [J]. Neurosci Behav Physiol, 2003, 33(9): 731 - 740.
- [13] 韩冰冰, 王世军. 比较虚寒证与虚热证模型大鼠肝全基因表达谱的差异 [J]. 北京中医药大学学报, 2011, 34(10): 673 - 675.
- [14] 黄俊山, 白介辰, 黄国良, 等. 从检测血中 FT₃、FT₄、T、E₂ 及皮质醇等指标探讨寒证热证的本质 [J]. 中国中西医结合杂志, 2002, 22(2): 113 - 115.

(收稿: 2013 - 07 - 17 修回: 2015 - 02 - 09)

2015 年全国急救医学学术交流会征文通知

2015 年全国急救医学学术交流会拟定于 2015 年 9 月在辽宁省大连市召开, 会议由中国中西医结合学会急救医学专业委员会主办, 大连医科大学附属第一医院承办。现将征文事宜通知如下:

征文内容 (1) 中西医结合及现代医学方面急救医学的基础、临床科研进展和新技术交流; (2) 脓毒症的国际、国内研究成果交流、回顾和展望; (3) 交流中西医结合急救医学治疗的新技术、新进展, 推广急救医学领域的临床治疗成果; (4) 老年多脏器功能不全的诊断与治疗进展; (5) 有关整合医学的研究。

征文范围 (1) 西医、中医、中西医结合的内科、外科、儿科、妇科、神经科、五官科、麻醉科、急诊科、ICU、血液净化、医学检验、医学影像、窥镜、创伤、中毒、烧伤、微创治疗、护理、心理、干细胞移植医学等专业的基础与临床研究论文; (2) 全身炎症反应综合征 (SIRS) 及脓毒症 (Sepsis)、多脏器功能不全综合征 (MODS)、危重病临床监测新技术、急救用药、急诊、ICU、干细胞移植医学质量控制标准、急救医疗行政管理和危重病急救医学领域的循证医学研究等方面的论文。

征文要求 (1) 全文在 3 000 字以内 (须附 400 字中英文摘要, 包括目的、方法、结果、结论)。要求标点符号准确, 著者顺序排列。请自留底稿。(2) 投稿采用 word 文档格式, 以电子邮件发出, 并于发出后 72 h 内确认是否收到。(3) 请注明“会议征文”字样。

截稿日期 2015 年 5 月 31 日 (以邮戳或发送电子邮件时间为准)。

联系方式 (1) 天津市经济技术开发区第三大街 65 号天津泰达医院, 邮编 300457, 联系人: 夏欣华, Tel: 13502001878, E-mail: 13502001878@163.com。(2) 天津市南开区复康路 24 号天津市第一中心医院中西医结合科, 邮编 300192, 联系人: 王东强, Tel: 18622051156, E-mail: wdqklm@sina.com。