

信号转导通路 with 异常黑胆质证 NEI 网络功能紊乱的关系

黄静静¹, 李春燕¹, 库热西·玉努斯¹, 阿衣古丽·玉努斯², 帕丽旦·麦麦提¹, 努尔比亚·吾布³, 刘文先⁴, 哈木拉提·吾甫尔⁴

1. 新疆医科大学基础医学院, 乌鲁木齐 830011
2. 新疆医科大学第二附属医院药剂科, 乌鲁木齐 830063
3. 乌鲁木齐市疾病预防控制中心, 乌鲁木齐 830002
4. 新疆医科大学维吾尔医学院, 乌鲁木齐 830011

摘要 为探讨信号转导通路 with 异常黑胆质证神经-内分泌-免疫 (NEI) 网络功能紊乱的关系, 采用基因芯片技术检测异常黑胆质证 with 非异常黑胆质 (异常血液质、异常黏液质、异常胆液质) 证白细胞结构基因表达水平, 筛选差异表达基因, 利用生物信息技术分析差异表达基因参与的相关信号转导通路。芯片结果提示, with 非异常黑胆质证相比, 异常黑胆质证白细胞中有 75 个结构基因表达上调, 生物信息学分析显示差异表达基因中富集到信号转导生物学过程的基因有 12 个, 这些基因主要涉及 MAPK、Toll 样受体和 Wnt 信号转导通路等。由此可见, MAPK、Toll 样受体、Wnt 信号转导通路在异常黑胆质证患者体内存在异常激活现象, 这可能与异常黑胆质证神经-内分泌-免疫网络功能紊乱密切相关。

关键词 异常黑胆质证; 信号转导通路; 神经-内分泌-免疫网络

中图分类号 Q75, R29

文献标识码 A

doi 10.3981/j.issn.1000-7857.2013.26.011

Relationship Between the Signal Transduction Pathway and the Disorder of Neuro-endocrine-immunity Network in Abnormal Savda Hilit

HUANG Jingjing¹, LI Chunyan¹, YUNUSI Kurexi¹, YUNUSI Ayiguli², MAIMATTI Palidan¹, WUBU Nuerbiya³, LIU Wenxian⁴, UFUER Hamulati⁴

1. Basic College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China
2. Pharmacy, the Second Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830063, China
3. Urumqi Center for Disease Control and Prevention, Urumqi 830002, China
4. Uyghur Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

Abstract In order to study the relationship between the signal transduction pathway and the disorder of the neuro-endocrine-immunity network in abnormal Savda Hilit, the blood samples of the abnormal Savda Hilit group and the non-abnormal Savda Hilit group (abnormal Kan Hilit, abnormal Belhem Hilit, abnormal Safra Hilit) were collected. After separating the white blood cell and extracting the RNA, the Affymetrix gene expression microarray technology was applied to detect the gene expression of the two groups. Then the differentially expressed genes were selected and a bioinformatic analysis was made by using the CapitalBio Molecule Annotation System (MAS) to find the genes related to the signal transduction pathway. The result of chip shows that 75 genes are up-regulated in the abnormal Savda Hilit group comparing with the non-abnormal Savda Hilit group. The bioinformatic analysis shows that 12 genes are

收稿日期: 2013-06-28; 修回日期: 2013-07-15

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81060310); 国家教育部长江学者和创新团队发展计划项目 (IRT0977); 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2009211B13)

作者简介: 黄静静, 讲师, 研究方向为维吾尔医药与分子生物学, 电子信箱: hjiang0516@163.com; 哈木拉提·吾甫尔 (通信作者), 教授, 研究方向为复杂性疾病的中维西医研究, 电子信箱: halmurat@263.net

concentrated in the signal transduction pathways of the biological process, involved in the MAPK, Toll-like receptor, the Wnt signal transduction pathway. These findings indicate that the abnormal activation of the MAPK, Toll-like receptor, the Wnt signal transduction pathway may be related to the disorder of the neuro-endocrine-immunity network in the abnormal Savda Hilit group.

Keywords Abnormal Savda Hilit; signal transduction pathway; neuro-endocrine-immunity network

0 引言

维吾尔医学(维医)体液(Hilit)论认为组成人体的体液质分为黑胆质(Savda)、血液质(Kan)、黏液质(Belhem)和胆液质(Safra)4种。在生命活动中,各种体液质的数量和质量相互制约、相互补充、相互依赖,形成某一种体液质为主的体液型,即黑胆质型、血液质型、黏液质型、胆液质型体液。在不良环境和遗传因素的相互作用下4种体液会发生异常变化,失去原有的自然状态,导致体内平衡失调,形成相应的异常体液(abnormal Hilit),如异常黑胆质、异常血液质、异常黏液质和异常胆液质型体液。若异常血液质、异常黏液质和异常胆液质等非异常黑胆质(non-abnormal Savda Hilit)不及时纠正,最终均会发展成为异常黑胆质。为进一步阐明异常黑胆质证发生、发展的分子机制,本研究利用基因芯片技术筛选异常黑胆质证相关的差异表达基因,采用北京博奥生物分子注释系统(MAS系统)对差异表达基因进行功能基因注释、Pathway富集统计分析,并结合信号转导、各种细胞因子、免疫因子、反式作用因子等进行综合分析发现,与非异常黑胆质证相比,异常黑胆质证白细胞中75个结构基因表达上调,主要涉及丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)、Toll样受体(Toll-like receptor)、Wnt等信号转导通路。鉴于前期研究发现异常黑胆质证存在神经-内分泌-免疫网络功能紊乱^[1,2],本文重点讨论MAPK、Toll样受体、Wnt信号转导通路异常激活与神经-内分泌-免疫网络功能紊乱的关系。

1 材料和方法

1.1 材料

血液标本:由3名维医副主任医师根据维医体液辨证分型对新疆医科大学第一附属医院的就诊者进行体液质分型后收集,选取典型的3例异常黑胆质证和3例非异常黑胆质证样本进行研究。

主要试剂:血液总RNA快速提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司),人全基因表达谱芯片(Affymetrix公司),逆转录试剂盒及芯片杂交相关试剂(北京博奥生物有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 血液总RNA的提取

2mL抗凝血经3500转离心10min后取中间白细胞层,使用全血总RNA提取试剂盒提取总RNA,具体操作按说明书进行。

1.2.2 样本处理、芯片杂交、图像采集及筛选差异表达基因

样品RNA经质检后由北京博奥生物有限公司利用

Affymetrix公司的Human Genome U133 Plus 2.0,检测人物种的基因表达谱,以cy5/cy3的荧光信号比值(Ratio)≥2.0作为表达上调的基因,cy5/cy3的荧光信号比值(Ratio)≤0.5作为表达下调的基因。

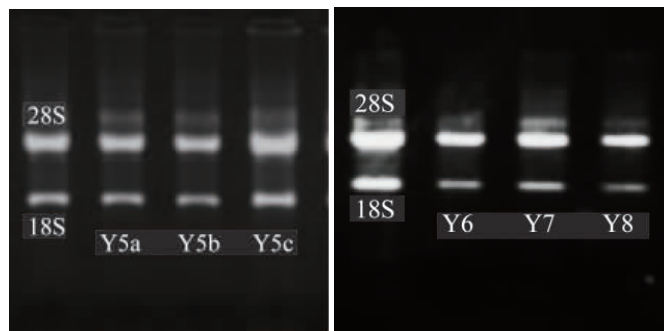
1.2.3 对差异表达基因进行生物信息学分析

借助常州楚天生物科技有限公司和北京博奥生物分子注释系统(MAS系统, www.capitalbio.com)对已筛选出的差异表达基因进行功能基因注释、生物学过程、分子功能、信号转导通路富集统计,获得差异表达基因参与的生物学过程和信号转导通路等。

2 结果与分析

2.1 血液总RNA的提取

RNA样品260nm与280nm吸光度比值(A_{260}/A_{280})≥1.80,总量>1μg,rRNA电泳结果显示28S和18S条带亮度接近2:1,符合表达谱芯片实验要求(图1)。



(a) 异常黑胆质证组 RNA (Y5a, Y5b, Y5c)
(b) 非异常黑胆质证组 RNA (Y6, Y7, Y8)
(a) Abnormal Savda Hilit group RNA (Y5a, Y5b, Y5c)
(b) Non-abnormal Savda Hilit group RNA (Y6, Y7, Y8)

图1 RNA电泳图

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of RNA

2.2 芯片扫描数据分析

采用R语言平台中的affy软件包对芯片实验数据进行预处理,并结合芯片数据分布(图2,图中横纵坐标分别代表两组数据的分布情况,非异常黑胆质证组基因表达量数值作为观察值,异常黑胆质证组基因表达量数值作为预期值),选择sam法分析差异表达基因,结果提示,与异常黑胆质证组相比,非异常黑胆质证组白细胞中75条基因表达下调(荧光信号比值≤2.0),即相对非异常黑胆质证组,异常黑胆质证组白细胞中75条基因表达上调。

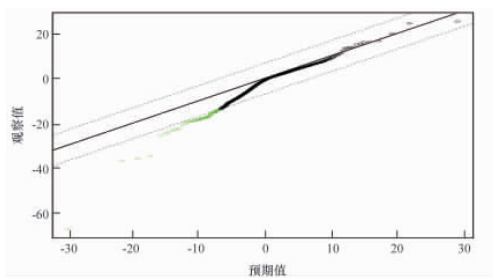


图2 两组差异基因分布

Fig. 2 Distribution of the differentially expressed genes
注:图中的每一个散点代表一个基因,绿色标记的是表达下调的基因,黑色标记的是表达无差异的基因。

Notes: Each point on the graph represents a single gene, green means down-regulated, black means no difference.

2.3 差异表达基因的生物信息学分析

采用GO数据库对差异表达基因进行生物学过程富集分析,结果显示,差异表达基因中与信号转导生物学过程相关的有12个基因(*CXCR4*; *CASP1*; *MAP2K4*; *TXN*; *PTPN11*; *EXT2*; *OR2A5*; *IGF1*; *RAC1*; *ARL8B*; *RAB8B*; *BRAF*)。说明异常黑胆质证与非异常黑胆质证相比,体内可能存在信号转导通路异常;为明确差异基因主要参与的信号转导通路,采用KEGG软件对差异表达基因进行相关信号通路分析,结果显示,差异表达基因主要涉及MAPK、Toll样受体、Wnt等信号转导通路,且与MAPK、Toll样受体、Wnt等信号转导通路相关的*RAC1*基因(图3)和部分差异基因通过实时荧光定量PCR验证^[34],结果与芯片结果相符,说明芯片数据可靠并具有可重复性。

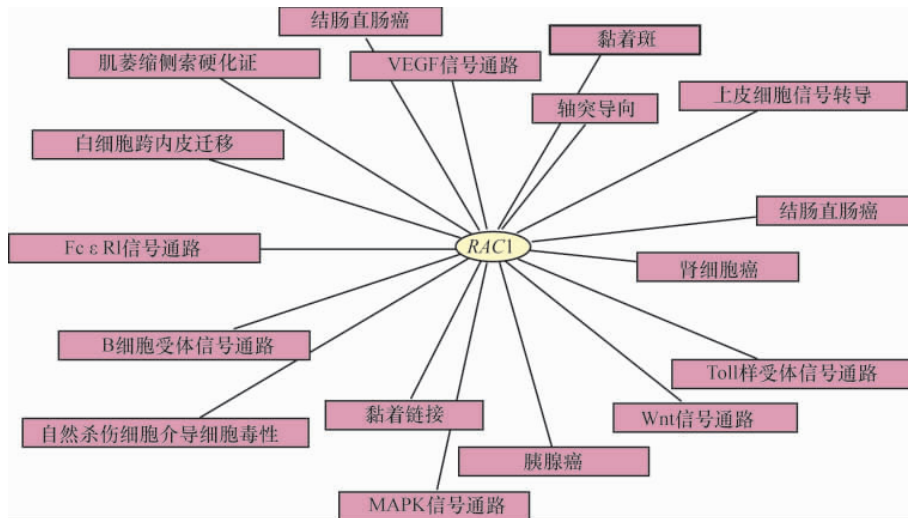


图3 RAC1基因参与的信号转导通路

Fig. 3 Signal transduction pathways related to RAC1

3 讨论

维吾尔医学已有2500多年的历史,是祖国医学的一个重要组成部分,它自成体系,并在维吾尔族人民长期与疾病斗争的过程中日益完善,最终形成了一套独特的理论体系。其中体液论是维医论的核心,是维吾尔医学最基本、最重要的理论之一。维吾尔医学中的体液是指人体中的各种内、外源性营养物质在肝脏中形成、并能被机体转化利用、为人的生命活动赋予力量的复杂液体的总称,可分为黑胆质、血液质、黏液质和胆液质型体液4种。在不良饮食习惯、环境、精神因素和各种微生物等的作用下,4种体液会发生变化,失去原有的自然状态,导致体内平衡失调,形成相应的4种异常体液。维吾尔医学认为体液的异常变化是疾病产生的根本,且不同体液分型人群对疾病的易感性存在差异。其中异常黑胆质是非异常黑胆质被“燃烧”、继而“沉淀”的最终病理产物,因此,异常黑胆质作为其他异常体液质的最终归宿可加重或诱发肿瘤、糖尿病、哮喘、高血压等疑难复杂性疾病^[50]。前期研究发现,异常黑胆质证存在神经-内分泌-免疫网络功能紊乱^[12],

本研究发现异常黑胆质证中MAPK、Toll样受体、Wnt信号转导通路异常激活,因此推测MAPK、Toll样受体、Wnt信号转导通路异常激活可能与异常黑胆质证神经-内分泌-免疫网络功能紊乱有关。

MAPK信号通路是机体对外界刺激反应中最保守的信号转导途径,主要包括细胞外调节激酶1/2(Extracellular Signal Regulated Kinase 1/2, ERK1/2), P38丝裂原活化蛋白激酶(P38 Mitogen-Activated-Protein Kinase, P38MAPK)和c-Jun氨基末端激酶(c-Jun Amino-Terminal Kinases, JNK)3个经典的亚家族途径,它们在细胞增殖、分化、凋亡、应激、炎症以及免疫反应等多种生理和病理过程中发挥着极其重要的作用。Toll样受体(Toll Like-Receptors, TLRs)是一类病原分子识别受体,分布广泛,在外周血白细胞中表达水平最高^[9],能促进细胞因子的合成与释放,引发炎症反应^[8],促进抗原提呈细胞的成熟,诱导机体获得性免疫反应,是机体介导天然免疫转向获得性免疫的桥梁^[9]。Wnt信号转导通路亦是一条古老保守的信号通路,目前主要包括经典Wnt/β-catenin、Wnt/Ca²⁺、Wnt/PCP

等信号通路,激活后可调节靶基因的表达,对细胞的增殖、分化、迁移、极性和凋亡起调节作用。

维吾尔医学理论认为,异常体液是机体在不良因素(如不良饮食、炎症、缺氧、精神因素等)作用下由正常体液转化而来,这些刺激因素不仅能启动机体的应激系统,产生全身非特异性反应,主要表现为下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis,HPAA)、交感-肾上腺髓质系统的强烈兴奋,而且亦可引起MAPK、Toll样受体信号转导通路异常。MAPK属于丝氨酸(Ser)/苏氨酸(Thr)蛋白激酶,它的激活能增强激活蛋白-1(Activator Protein-1,AP-1)家族的转录活性,进而影响*c-fos*、*c-jun*下游促肾上腺皮质激素释放激素(Corticotropin Releasing Hormone,CRH)基因的表达^[10],促进腺垂体的促肾上腺皮质激素(Adrenocorticotrophic Hormone,ACTH)分泌,ACTH刺激肾上腺皮质分泌皮质醇(corticosteroid,COR)或皮质酮,进一步引起下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPAA)兴奋。同时,MAPK信号通路不仅在固有免疫中起着重要的作用,在获得性免疫中也起着不可替代的作用,例如ERK可调控T细胞的活化、促进活化的T细胞分化,p38和JNK可调控Th细胞亚型的分化、控制淋巴细胞的凋亡^[11,12],Toll样受体信号转导通路可通过进一步活化NF- κ B转录相关基因,刺激大量Th2相关细胞因子释放,增强抗体介导的免疫应答^[13]。近期研究发现,通过Toll样受体介导的Wnt信号转导通路在T细胞发育、分化中起重要作用^[14,15]。此外,MAPK、TLRs、Wnt亦可直接或间接促进许多因子包括NF- κ B、IL-1、IL-6及TNF等的表达^[13,16,17],上述免疫介质及细胞因子等能很快活化神经反应,不仅放大局部免疫反应以清除局部损害,且启动全身神经内分泌反应及区域神经反应以最终促进机体恢复正常状态^[18],但这些炎症因子又可通过正反馈调节进一步激活MAPK、Toll样受体信号转导通路^[19-21],形成恶性循环,造成机体严重或长时间的神经内分泌反应,使机体发生过度炎症、免疫反应等,最终导致机体神经-内分泌-免疫网络功能发生紊乱。

4 结论

MAPK、Toll样受体、Wnt信号转导通路异常激活可能与异常黑胆质证体内神经-内分泌-免疫网络功能紊乱相关,该结果为进一步研究异常黑胆质证神经-内分泌-免疫网络功能紊乱的分子机制及阐述维医体液论的科学内涵提供了实验依据。

参考文献 (References)

- [1] 张莉, 哈木拉提·吾甫尔, 玛依努尔·艾力, 等. 恶性肿瘤的维医分型及其神经内分泌免疫网络紊乱研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2008, 14(2): 119-121.
Zhang Li, Upur Halmurat, Aili Mayinuer, et al. Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine, 2008, 14(2): 119-121.
- [2] 热娜古丽·艾则孜, 穆塔里甫·吾布利哈斯木, 帕力旦·吾布尔, 等. 2型糖尿病维吾尔医分型及其神经-内分泌-免疫网络紊乱研究 [J]. 科技导报, 2009, 27(22): 32-37.
Aizezi Renaguli, Oblkasim Mutallip, Wubuer Palidan, et al. Science and Technology Review, 2009, 27(22): 32-37.
- [3] 黄静静, 阿衣古丽·玉努斯, 努尔比亚·吾布, 等. 异常黑胆质证神经-内分泌-免疫紊乱与趋化因子的关系 [J]. 新疆医科大学学报, 2013, 36(5): 567-569.
Huang Jingjing, Yunusi Ayiguli, Wubu Nuerbiya, et al. Journal of Xinjiang Medical University, 2013, 36(5): 567-569.
- [4] 黄国虹, 黄静静, 阿衣古丽·玉努斯, 等. Wnt信号转导通路与异常黑胆质证神经-内分泌-免疫网络紊乱的关系 [J]. 新疆医科大学学报, 2013, 36(5): 570-573.
Huang Guohong, Huang Jingjing, Yunusi Ayiguli, et al. Journal of Xinjiang Medical University, 2013, 36(5): 570-573.
- [5] 哈木拉提·吾甫尔, 阿不都热依木·玉苏甫, 怒尔买买提·艾买提. 维吾尔医学异常黑胆质新论 [M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 2009.
Upur Halmurat, Yusufu Abudueyimu, Aimaity Nuermaiti. New conception on the theory of abnormal Savda in traditional Uighur medicine [M]. Urumqi: Xinjiang People's Publishing House, 2009.
- [6] 雅森·米吉提. 维吾尔医学体液辩证分型及其相关疾病 [J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(6): 612-613.
Mijiti Yasen. Journal of Xinjiang Medical University, 2010, 33(6): 612-613.
- [7] Sandor F, Buc M. Toll-like receptors. II. Distribution and pathways involved in TLR signalling [J]. Folia Biologica (Praha), 2005, 51(6): 188-197.
- [8] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity [J]. Cell, 2006, 124(4): 783-801.
- [9] MacLeod H, Wetzler L M. T cell activation by TLRs: A role for TLRs in the adaptive immune response [J]. Science's STKE, 2007, 2007(402): pe48.
- [10] Ullrich M, Bundschu K, Benz P M, et al. Identification of SPRED2 (Sprouty-related Protein with EVH1 Domain 2) as a negative regulator of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis [J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(11): 9477-9488.
- [11] Dong C, Davis R J, Flavell R. MAP kinases in the immune response [J]. Annual Review of Immunology, 2002, 20(1): 55-72.
- [12] Cook R, Wu C C, Kang Y J, et al. The role of the p38 pathway in adaptive immunity [J]. Cellular & Molecular Immunology, 2007, 4(4): 253-259.
- [13] Bachar O, Adner M, Uddman R, et al. Toll-like receptor stimulation induces airway hyper-responsiveness to bradykinin, an effect mediated by JNK and NF- κ B signaling pathways [J]. European Journal of Immunology, 2004, 34(4): 1196-1207.
- [14] Pereira C P, Bachli E B, Schoedon G. The wnt pathway: A macrophage effector molecule that triggers inflammation [J]. Current Atherosclerosis Reports, 2009, 11(3): 236-242.
- [15] Xue H H, Zhao D M. Regulation of mature T cell responses by the Wnt signaling pathway [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2012, 1247(1): 16-33.
- [16] Harris J E, Fernandez-Vilaseca M, Elkington P T G, et al. IFN- γ synergizes with IL-1 beta to up-regulate MMP-9 secretion in a cellular model of central nervous system tuberculosis [J]. The FASEB Journal, 2007, 21(2): 356-365.
- [17] 杨春勇, 梁庆模. Wnt与MAPK信号通路在肿瘤发生中的串话 [J]. 医学分子生物学杂志, 2010, 7(4): 441-447.
Yang Chunyong, Liang Qingmo. Journal of Molecular Biology, 2010, 7(4): 441-447.
- [18] 杜权. 大鼠创伤后巨噬细胞TLR2/4的表达及神经内分泌激素的调节 [D]. 重庆: 第三军医大学, 2008.
Du Quan. Expression of Toll-like receptor 2/4 on rat macrophages and its regulation by neuroendocrine hormones following trauma [D]. Chongqing: Third Military Medical University, 2008.
- [19] Weston C R, Davis R J. The JNK signal transduction pathway [J]. Current Opinion in Cell Biology, 2007, 19(2): 142-149.
- [20] Mita Y, Dobashi K, Endou K, et al. Toll-like receptor 4 surface expression on human monocytes and B cells is modulated by IL-2 and IL-4 [J]. Immunology Letters, 2002, 81(1): 71-75.
- [21] Bosisio D, Polentanuti N, Sironi M, et al. Stimulation of toll-like receptor 4 expression in human mononuclear phagocytes by interferon- γ : A molecular basis for priming and synergism with bacterial lipopolysaccharide [J]. Blood, 2002, 99(9): 3427-3431.

(责任编辑 吴晓丽)