

# “上火”人群中 Activin A、E-selectin 的差异表达研究

汪琴静<sup>1</sup> 徐 莉<sup>2</sup> 包 洁<sup>2</sup> 季巾君<sup>2</sup> 谢冠群<sup>2</sup> 范永升<sup>2</sup>

(1 浙江中医药大学附属江南医院中医内科,杭州,311200; 2 浙江中医药大学基础医学院,杭州,310053)

**摘要** 目的:通过对“上火”人群中细胞因子激活素 A(ActivinA)及 E 选择素(E-selectin)血清含量的测定以及外周血单个核细胞基因表达水平检测,探讨激活素 A 及 E 选择素在“上火”人群发病机制的影响和作用。方法:采集临床患者血液样本并提取血清及外周血单个核细胞。应用酶联免疫吸附试验(ELISA)测定血清中激活素 A 及 E 选择素的含量,应用 RT-PCR 法检测激活素 A 及 E 选择素的基因表达水平。结果:“上火”患者血清中 activinA、E-selectin 的水平以及外周血单个核细胞 activinA、E-selectin 基因表达水平高于正常平和质人群;观察组外周血中 activinA、E-selectin 的基因表达水平高于阴虚“上火”人群。结论:“上火”是一种局部的炎性反应,机体内环境在多种因素的作用下激活素 A 水平升高,影响炎性反应介质的作用或者本身作为一种炎性反应介质活化血管内皮细胞刺激 E 选择素的分泌与合成,诱导炎性反应,这是“上火”机制之一。

**关键词** 上火;激活素 A;E 选择素;炎性反应

## Research on the Differential Expression of Activin A and E-selectin in the Population of Excessive Internal Heat

Wang Qinjing<sup>1</sup>, Xu Li<sup>2</sup>, Bao Jie<sup>2</sup>, Ji Jinjun<sup>2</sup>, Xie Guanqun<sup>2</sup>, Fan Yongsheng<sup>2</sup>

(1 Affiliated Jiangnan Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311200, China;

2 College of Basic Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

**Abstract Objective:** To study of activin A and E selectin in the pathogenesis of “shanghuo” people and influence effect through the determination of serum content and the level of gene expression in peripheral blood mononuclear cells of activin A or E-selectin who suffered from excessive internal heat. **Methods:** Clinical lit crowd and gentleness in blood samples was collected and serum and peripheral blood mononuclear cells from blood samples was extracted. By enzyme-linked immune sorbent adsorption assay, the content of serum activin A and E-selectin were determined, and RT-PCR detection was sued to detect gene expression level of activin A and E-selectin. **Results:** The level of activin A and E-selectin in serum of patients with excessive internal heat was higher than that of normal and healthy people. The level of activin A and E-selectin gene expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with internal heat was higher than that of normal and healthy people. The gene expression level of activin A and E-selectin in peripheral blood was higher than that of yin deficiency and heat syndrome. **Conclusion:** Shanghuo is a local inflammation. Under stress, activin A levels are elevated, effecting inflammatory mediators or itself as a mediator of inflammation activated vascular endothelial cells stimulate E-selectin secretion and synthesis, induced inflammatory reaction and to cause the disorder of lipid metabolism in the body's physiological balance, causing Shanghuo.

**Key Words** Shanghuo; Activin A; E selectin; Inflammatory reaction

中图分类号:R285.6 文献标识码:A doi:10.3969/j.issn.1673-7202.2017.12.005

“上火”是指人体阴阳失衡,表现为目赤、口疮、口腔溃疡、牙龈肿痛、咽痛、口干、尿赤、便干等一系列热象的疾病<sup>[1]</sup>。课题组前期大规模流行病学调查发现,引起“上火”的因素主要有情志、饮食、药物等<sup>[2]</sup>。“上火”常见实热“上火”与阴虚“上火”2种证型<sup>[3]</sup>。课题组前期利用细胞因子芯片检测 6 例阴虚“上火”患者“上火”前后血清细胞因子的变化,结果发现下调的细胞因子有 10 种,上调的细胞因子有 23 种,其中发现细胞因子 Activin A 和 E-selectin 明显升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),提示细胞因子在“上火”的发病过程中发挥作用。本研究拟在上述基础上,进一步从细胞分子生物学角度探讨

Activin A 和 E-selectin 对 2 种不同类型上火患者的影响。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选取浙江中医药大学第一附属医院招募的临床志愿者 48 例,随机分为实热组、阴虚组、对照组,每组 16 例,其中男 21 例,女 27 例,平均年龄为 38.83 岁。分别采集促凝管及抗凝管血液,促凝管提取血清,抗凝管提取单核细胞,3 组间年龄及性别比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 1。

1.2 诊断标准 实热“上火”和阴虚“上火”诊断标准需符合“上火”诊断标准外还应符合自身证候标准,具体如下:实热“上火”诊断标准:1 个主症 + 舌

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2014CB543001,2014CB543002);国家自然科学基金项目(81673857)

作者简介:汪琴静(1988.07—),女,硕士,中医师,研究方向:中医药防治风湿自身免疫病,E-mail:775161528@qq.com

通信作者:范永升(1955.11—),男,博士,教授,国家重点学科带头人,研究方向:中医药防治风湿自身免疫病,E-mail:fysjzcm@163.com

象或脉象(主症:眼眵或痰、发热或恶热、目赤、面红、牙龈肿痛、大便秘结;舌脉:舌红苔黄燥、脉数有力);阴虚“上火”诊断标准:1个主症+舌象或脉象(主症:手足心热、两颧潮红、午后潮热;舌脉:舌红苔少或无或剥、脉细数);2)平和质健康人群(作为正常对照组),符合《中医体质分类及判定》中平和质的判定标准;3)患者年龄在18~60岁之间;并且无心脑肝肾等重要脏器疾病者;4)自愿参加本试验并同意签署知情同意者。

表1 临床样本情况本

组别	性别(例)		年龄(岁)
	男	女	
实热组(n=16)	7	9	38.38±11.48
阴虚组(n=16)	5	11	40.88±11.56
对照组(n=16)	9	7	33.25±6.52

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$

1.3 纳入标准 1)符合入选标准的实热、阴虚“上火”人群,具体标准如下:采用专家咨询法,经过多轮专家咨询,确定“上火”的诊断标准:1个主症(头面部症状)或2个次症(至少1个头面部症状)。其中主症为:牙龈肿痛、咽喉肿痛、口臭、口腔溃疡、鼻疮疖、热疮、口苦、目赤干涩;次症为:口角糜烂、目眵增多、口渴、舌痛、鼻衄、鼻腔干燥、大便干结、心烦、小便黄、多食易饥、五心烦热、痔疮发作、潮热。

1.4 排除标准 1)不符合纳入标准者;2)合并各系统靶器官严重病变、肿瘤、精神障碍等疾病的患者;3)怀孕及哺乳期妇女;4)研究过程中认为有不宜入选情况者。

1.5 试剂与仪器 Activin A、E-Selectin 试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司,多功能酶标仪购自美国 Thermo Scientific 公司。Oligo(dT)、Rnase 抑制剂、mRNA、M-MLV 逆转录酶购于日本 TAKARA 公司,Trizol 试剂购于美国 Invitrogen 公司。Bio-rad T100 梯度 PCR 仪(Bio-Rad Laboratories, Inc)、微量核酸测量仪(3300Pro Amersham ultrospec)。

## 1.6 检测指标与方法

1.6.1 酶联免疫吸附法检测 activinA、E-selectin 的含量 促凝管取血后立即混匀,室温静置 45 min 后离心取血清。按说明书将不同浓度标准品及稀释好的样品加入酶标板后封板,加入生物素抗体、TMB 显色液、终止液等试剂,用酶标仪在 450 nm 测定 OD 值。绘制标准曲线。

1.6.2 RT-PCR 实验检测 activinA、E-selectin 的基因表达量 引物设计:根据 Primer5.0 引物设计软件

设计,由上海生物工程有限公司合成,各引物序列见表 2。

表2 引物序列

cDNA	引物	引物序列
activinA	上游引物	5'-TGCTATAGTGGAGGATTACAAG-3'
	下游引物	5'-GCTGGACAATGACAACAAC-3'
E-selectin	上游引物	5'-GAAGGATGGACGCTCAATG-3'
	下游引物	5'-CTGGCATAGTAGGCAAGAAG-3'
GAPDH	上游引物	5'-CTGCCAACCTGTCACT-3'
	下游引物	5'-GTTGAGGGCAATGCCA-3'

提取外周血单个核细胞后,再提取 RNA 并进行逆转录成 cDNA。PCR 扩增的目的基因为 activinA、E-selectin,以 GAPDH 为内参。反应条件为:95 ℃ 3 min 预变性,然后按 95 ℃ 30 sec,55 ℃ 30 sec,72 ℃ 1 min,反应 45 个循环,最后 72 ℃ 10 min 延伸。

1.7 统计学方法 采用 SPSS 17.0 统计软件对数据进行统计学分析,实验数据用均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示。多组间比较采用方差分析法,方差齐性时组间两两比较采用 LSD-t 法,方差不齐时采 Kruskal-wallis H 检验。均采用双侧检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 血清 activinA、E-selectin 含量在上火人群中的表达 上火组 activinA 血清含量与对照组比较,阴虚组血清含量有一定程度降低,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ );实热组显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与阴虚组比较,实热组血清含量也显著上升,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。上火组 E-selectin 血清含量与对照组比较,阴虚组有一定程度升高,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ );实热组血清含量显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与阴虚组比较,实热组血清含量升高,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见表 3。

表3 各组血清 activinA、E-selectin 含量比较( $\bar{x} \pm s$ )

组别	activinA	E-selectin
阴虚组(n=16)	44.750±5.157 <sup>△</sup>	997.059±119.478
实热组(n=16)	71.985±26.062*	1111.603±102.223*
对照组(n=16)	50.654±9.624	891.010±157.954

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ;与实热组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$

2.2 外周血 activinA、E-selectin 基因水平在上火人群中的表达 上火组 activinA 的表达水平与对照组比较,实热组表达水平升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),阴虚组表达有一定程度降低,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );与阴虚组比较,实热组表达水平

显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表4。上火组 E-selectin 的表达水平与对照组比较,实热组表达水平显著升高( $P = 0.013$ );阴虚组表达水平升高不明显,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )与阴虚组比较,实热组显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表5。

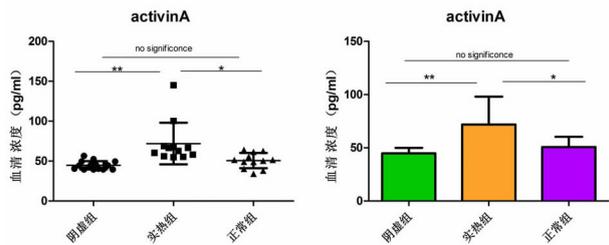


图1 各组血清 activinA 含量

注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ;与实热组比较, \*\*  $P < 0.05$

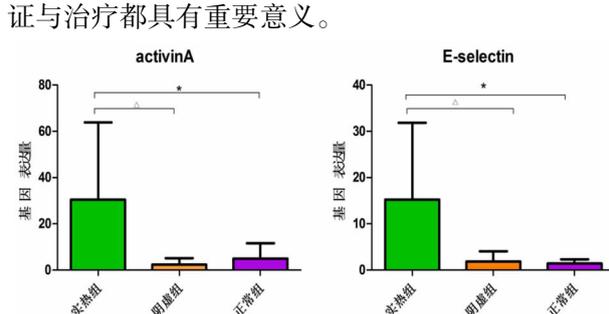


图3 各组 activinA、E-selectin 基因表达水平

注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ;与阴虚组比较, Δ  $P < 0.05$

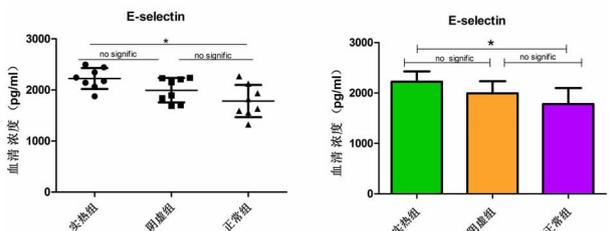


图2 各组 E-selectin 血清含量

注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$

表4 各组 activinA 基因表达水平( $\bar{x} \pm s$ )

组别	activinA $\Delta$ ct	GAPDH $\Delta$ ct	$2^{-\Delta\Delta ct}$
实热组( $n = 16$ )	$4.746 \pm 2.898$	$20.633 \pm 3.523$	$30.358 \pm 33.457^*$
阴虚组( $n = 16$ )	$8.731 \pm 3.273$	$17.328 \pm 2.417$	$2.303 \pm 2.826^\Delta$
对照组( $n = 16$ )	$8.136 \pm 3.471$	$17.369 \pm 1.508$	$5.008 \pm 6.659$

注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ;与实热组比较, Δ  $P < 0.05$

表5 各组 E-selectin 基因表达水平( $\bar{x} \pm s$ )

组别	E-selectin $\Delta$ ct	GAPDH $\Delta$ ct	$2^{-\Delta\Delta ct}$
实热组( $n = 16$ )	$10.861 \pm 1.736$	$20.633 \pm 3.523$	$15.186 \pm 16.634^*$
阴虚组( $n = 16$ )	$15.528 \pm 3.126$	$17.328 \pm 2.417$	$1.788 \pm 2.267^\Delta$
对照组( $n = 16$ )	$14.836 \pm 1.364$	$17.369 \pm 1.508$	$1.368 \pm 0.974$

注:与对照组比较, \*  $P < 0.05$ ;与实热组比较, Δ  $P < 0.05$

### 3 讨论

3.1 中医对“上火”的认识 中医对“上火”的认识历史悠久,明·陈嘉谟所撰《本草蒙荃》:“若研末鸡清调稠,可敷上火疮取效”其中“上火疮”的叙述是课题组目前发现最早的有关“上火”的文献记载。“上火”一般分为“实火”和“虚火”2大类<sup>[4-5]</sup>。实热“上火”多由于外邪内侵、过食辛辣等刺激,造成脏腑功能失调引起。阴虚“上火”多因内伤劳损所致,如久病精气耗损、劳伤过度,阴血虚损而生内热,内

热进而化虚火。《景岳全书·卷十五杂证谟·论火证》指出“凡察火证,必须察其虚实”,认为分清火证虚实之因是诊断的首要任务。《景岳全书·卷三传忠录·命门余义》:“实热之火其来暴,而必有感触之故;虚热之火其来徐,而必有积损之因,此虚火实火之大有不同也”。因此,分清虚实对“上火”的辨证与治疗都具有重要意义。

3.2 “上火”与炎症反应之间的关系 一般情况下“上火”是一种局部的炎症反应,人体受到环境、饮食、心理、感染等诸多因素刺激作用下,机体分泌炎症反应介质,使局部组织产生炎症反应而表现出“上火”的各种临床表现。如“上火”患者常有反复发作的口腔溃疡,溃疡的发生与炎症反应密切相关。有研究发现与正常人比较复发性口腔溃疡患者外周血中促炎介质明显升高<sup>[6]</sup>,抑炎介质水平则明显下降,调节性 T 细胞数量减少,机体自身免疫耐受能力降低。此外牙龈炎在“上火”人群中常有发生,作为牙周病的一种重要类型,也与炎症反应关系紧密。牙周病防治的关键在于控制菌斑,而在炎症反应急性期抗菌药物的应用不容忽视。可见“上火”患者的一些临床表现是由于抗炎与抑炎的平衡被破坏,过度免疫反应导致组织的破坏而引起的。

3.3 激活素 A、E 选择素与“上火”的关系 细胞因子参与引导和调节固有免疫及适应性免疫应答、调节细胞生长分化、参与炎症反应发生和创伤愈合等,其表达异常可使机体免疫调节紊乱产生疾病,许多难治性疾病都与机体细胞因子功能紊乱有关<sup>[7-8]</sup>。前期“上火”的免疫调节通路变化研究中,利用基因芯片技术对造模后的大鼠血清细胞因子进行检测,发现 27 个细胞因子 2 倍上调,1 个细胞因子显著下调。而对 6 例“上火”患者血清进行芯片分析,下调的细胞因子有 10 种,发现上调的细胞因子有 23 种,其中激活素 A 和 E 选择素升高明显。可见“上火”的发生与细胞因子功能紊乱密切相关。激活素 A (Activin A) 又称免疫抑制因子 P,属于转化生长因

子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )超家族成员<sup>[9]</sup>。在骨髓、脾脏、肝脏、血管内皮细胞、单核细胞、巨噬细胞等多种组织中均有发现,具有多种生物学作用。如参与初期胚胎形成,诱导造血干细胞增殖和分化、抑制活化巨噬细胞活性等<sup>[10]</sup>。此外激活素 A 还对组织修复,炎症反应恢复和组织再生、分化有着重要的调节作用<sup>[11-12]</sup>。有研究<sup>[13]</sup>发现激活素 A 在体内外均能刺激小鼠腹腔巨噬细胞 IL-1 $\beta$  及 IL-6 分泌,还能增强小鼠腹腔巨噬细胞吞噬和吞饮功能。多项实验均显示炎症反应、机体急性期反应与激活素 A 有关<sup>[14-15]</sup>。可见在机体急性反应期或炎症反应早期,激活素 A 参与早期天然免疫应答的调节过程,通过影响炎症反应介质的作用而调节机体的免疫功能,进而影响机体的生理平衡。

E 选择素(E-selectin)属于选择素家族,是一类异亲型结合、Ca<sup>2+</sup> 依赖的 I 型单链跨膜糖蛋白细胞黏附分子<sup>[16]</sup>。有研究<sup>[17]</sup>发现选择素的主要作用是在炎症反应发生时介导白细胞与血管内皮细胞的识别及起始黏附,参与白细胞越过血管进入炎症组织。还有研究<sup>[18]</sup>证实,在感染及炎症反应发生的过程中,E 选择素通过与其相应的配体相结合后介导白细胞与血管壁接触,使白细胞在血管壁上缓慢滚动,即而启动一系列反应,最终导致白细胞在炎症反应区内集中。

激活素 A 和 E-选择素作为 2 种重要的细胞因子,在维持机体正常免疫功能和生理平衡举足轻重的作用。有研究<sup>[19]</sup>发现 TGF- $\beta$  能够影响细胞黏附分子的表达是显著延长心脏移植存活时间的作用机制之一。并且炎症反应组织释放的白细胞介素、肿瘤坏死因子及转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )等细胞因子可活化血管内皮细胞上的 E 选择素,促进其合成分泌而发挥作用。从 TGF- $\beta$  与细胞黏附分子在炎症反应中的相互作用,可见作为 TGF- $\beta$  超家族中的重要成员激活素可在一定条件下影响炎症反应介质的作用或者本身作为一种炎症反应介质活化血管内皮细胞刺激 E 选择素的分泌与合成,进而共同影响机体生理平衡,产生“上火”这类局部炎症反应。故本研究在前期基因芯片技术研究的基础上筛选出激活素 A 和 E 选择素作为研究对象,进一步探讨 2 者在“上火”疾病发生发展中的作用,以及 2 者的相互作用关系。本次研究的结果也说明激活素 A 和 E 选择素在诱导“上火”局部炎症反应中起到了一定作用。

综上所述,“上火”患者血清中激活素 A 和 E 选择素的水平均较正常人群有所升高,同时外周血单核细胞中激活素 A 和 E 选择素的基因表达水平也

较正常人群有所升高。说明机体内环境在多种因素的作用下激活素 A 水平升高,影响炎症反应介质的作用或者本身作为一种炎症反应介质活化血管内皮细胞刺激 E 选择素的分泌与合成,诱导炎症反应影响机体生理平衡,从而引发“上火”。

#### 参考文献

- [1]何森泉,鲍玺,温成平. 火热证候的临床特征[J]. 中华中医药杂志,2013,28(3):791-792.
- [2]包洁,汪琴静,李思敏,等.“上火”诱导因素的病例对照研究[J]. 中华中医药杂志,2015,30(4):1013-1016.
- [3]谢志军,王伟杰. 上火病因病机初探[J]. 浙江中医药大学学报,2013,37(3):226-228.
- [4]钱苏海,钱俊华. 中医“上火”的内涵、表述及其应用初探[J]. 浙江中医药大学学报,2015,39(6):430-432.
- [5]吴金飞.“上火”的舌象与症状特征研究[D]. 北京:北京中医药大学,2008.
- [6]王栋. 细胞因子与复发性口腔溃疡关系的研究[J]. 滨州医学院学报,2011,34(1):23-24.
- [7]申维玺,孙燕. 细胞因子网络紊乱是疾病的基本发病学机理[J]. 医学研究通讯,2000,29(7):8-12.
- [8]申维玺,孙燕. 论中医证的化学本质是蛋白质和肽及证本质的分子标准[J]. 中国中西医结合杂志,1999,10(11):696-698.
- [9]Zhang HJ, Tai GX, Zhou J, et al. Regulation of activin receptor-interacting protein 2 expression in mouse hepatoma Hepal-6 cells and its relationship with collagen type IV[J]. World J Gastroenterol,2007,13(41):5501-5505.
- [10]Werner S, Alzheimer C. Roles of activin A in tissue repair, fibrosis, and inflammatory disease[J]. Cytokine Growth Factor Rev,2006,17(3):157-171.
- [11]李东霞,张江蓉,潘志红. 老年冠心病患者血清激活素 A、C 反应蛋白、白介素-6 水平及其意义[J]. 中华实用诊断与治疗杂志,2009,25(5):454-455.
- [12]霍德胜. 激活素 A 促炎作用研究[D]. 长春:吉林大学,2009.
- [13]Keelan JA, Zhou Rou, Evans LW, et al. Regulation of activin A, inhibin A, and follistatin production in human amnion and chorionic decidua explants by inflammatory mediators[J]. J Soc Gynecol Investing,2000,7(5):291-296.
- [14]李海燕. 激活素 A 对小鼠巨噬细胞白细胞介素 6 表达调控的研究[D]. 长春:吉林大学,2006.
- [15]Bevilacqua MP, Stengelin S, Gimbrone MA, et al. Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: An inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins[J]. Science,1989(243):1160.
- [16]郑立新,周晓红,石应康,等. 选择素研究进展[J]. 生物医学工程杂志,2000,17(1):101-106.
- [17]胡晓慧,阮长耿. E-选择素及其在炎症中的作用研究进展[J]. 中国血液流变学杂志,2001,11(4):272-274.
- [18]杨胜茹. E-选择素研究进展[J]. 医学综述,2008,14(9):1411-1413.
- [19]赵金平,李平,张韵凤,等. 转化生长因子  $\beta$ 1 对心脏移植排斥反应中细胞黏附分子表达的影响[J]. 华中科技大学学报:医学版,2008,37(2):211-214.