

# 郭铁峰毕业答辩论文



分类号:

密级:



甘肃中医学院

硕 士 研 究 生 学 位 论 文

论文题目（中文）痰湿体质型非创伤性股骨头坏死患者 SREBPs  
基因多态性研究

论文题目（外文）A experiments research for SREBPs gene  
polymorphism to Phlegm-dampness Constitu-  
tion in patients with non-traumatic necrosis of  
femoral head

研 究 生 姓 名 穆欢喜

学 科、专 业 中医骨伤科学

研 究 方 向 中医药防治骨伤科常见病的研究

导师姓名、职称 李盛华教授 主任医师

论 文 工 作

起 止 年 月 2012 年 2 月至 2014 年 3 月

论文提交日期 2014 年 3 月

论文答辩日期 2014 年 5 月

学位授予日期 2014 年 6 月

### 独创性声明

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。学位论文中凡引用他人已经发表或未发表的成果、数据、观点等，均已明确注明出处。除文中已经注明引用的内容外，不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的科研成果。对本研究做出贡献的个人和集体均已在论文中作了明确的说明并表示谢意。

论文作者签名：穆双善 签字日期：2014年6月4日

### 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解甘肃中医学院有关保留、使用学位论文的规定，本人同意学院保存或向国家有关部门或机构送交论文的纸质版和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权甘肃中医学院可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用任何复制手段保存、汇编学位论文。

(保密的学位论文在解密后适用本授权书)

学位论文作者签名：穆双善 签字日期：2014年6月4日

导师签名： 签字日期：2014年6月5日

# 目 录

|                               |    |
|-------------------------------|----|
| 摘要.....                       | 1  |
| ABSTRACT.....                 | 3  |
| 英文缩略词表.....                   | 4  |
| 一、前言.....                     | 5  |
| 二、立题依据.....                   | 6  |
| 1 中医体质研究.....                 | 6  |
| 1.1 中医体质学的概述.....             | 6  |
| 1.2 中医体质学的应用.....             | 7  |
| 2 NONFH 的中医研究.....            | 7  |
| 3 痰湿体质与 NONFH 的联系及意义.....     | 7  |
| 4 NONFH 痰湿体质与基因多态性的研究及意义..... | 8  |
| 三、材料与方法.....                  | 2  |
| 1 病例资料.....                   | 9  |
| 2 诊断及纳入标准.....                | 9  |
| 2.1 西医诊断标准.....               | 9  |
| 2.2 中医诊断标准.....               | 9  |
| 2.3 纳入标准.....                 | 9  |
| 2.4 排除标准.....                 | 9  |
| 2.5 病例剔除和脱落标准.....            | 9  |
| 3 中医体质分类及判定标准.....            | 10 |
| 4 研究方法.....                   | 10 |
| 4.1 调查方法.....                 | 10 |
| 4.2 血液标本采集.....               | 10 |
| 4.3 体质判定方法.....               | 10 |
| 5 资料处理与分组.....                | 10 |
| 5.1 建立病例数据库.....              | 10 |
| 5.2 病例分组.....                 | 11 |
| 6 实验方法.....                   | 11 |
| 7 分子生物学试剂与仪器.....             | 11 |
| 7.1 主要试剂.....                 | 11 |

|                                 |    |
|---------------------------------|----|
| 7.2 主要实验仪器.....                 | 11 |
| 8 统计.....                       | 12 |
| 9 技术路线图.....                    | 13 |
| 四、分子生物学实验研究.....                | 14 |
| 1 血液基因组 DNA 提取.....             | 14 |
| 1.1 血液基因组 DNA 提取试剂盒组成.....      | 14 |
| 1.2 DNA 提取操作步骤.....             | 14 |
| 1.3 DNA 提取物检测.....              | 15 |
| 1.4 DNA 所得率及纯度测定.....           | 15 |
| 1.5 DNA 储存.....                 | 15 |
| 2 NONFH 目标基因 SNP 位点选择.....      | 15 |
| 3 SREBPS 基因位点相应序列引物设计及合成.....   | 16 |
| 3.1 引物设计与合成.....                | 16 |
| 3.2 引物的配置.....                  | 16 |
| 3.3 引物验证.....                   | 16 |
| 4 目的基因序列的 PCR 扩增.....           | 16 |
| 4.1 PCR 反应体系.....               | 16 |
| 4.2 PCR 反应条件.....               | 17 |
| 4.3 PCR 扩增产物验证.....             | 17 |
| 5 琼脂糖水平平板凝胶电泳实验.....            | 17 |
| 5.1 胶液的制备.....                  | 17 |
| 5.2 胶板的制备.....                  | 17 |
| 5.3 电泳缓冲液.....                  | 17 |
| 5.4 加样.....                     | 17 |
| 5.5 电泳.....                     | 18 |
| 5.6 观察和拍照.....                  | 18 |
| 6 PCR 扩增产物纯化.....               | 19 |
| 6.1 PCR 反应液纯化 DNA 片段的试剂盒组成..... | 19 |
| 6.2 操作步骤.....                   | 19 |
| 7 PCR 纯化产物测序分析.....             | 19 |
| 7.1 测序引物的设计.....                | 19 |
| 7.2 PCR 纯化产物测序.....             | 19 |

|                                                    |    |
|----------------------------------------------------|----|
| 五、结果.....                                          | 20 |
| 1 临床资料结果.....                                      | 20 |
| 1.1 性别与 NONFH 相关性分析.....                           | 20 |
| 1.2 NONFH 实验室检查分析结果.....                           | 20 |
| 2 分子生物学实验研究结果.....                                 | 21 |
| 2.1 基因组 DNA 提取结果.....                              | 21 |
| 2.2 SREBP-2、SREBP-1C 基因位点相应序列的 PCR 扩增结果.....       | 21 |
| 2.3 基因测序结果.....                                    | 22 |
| 2.3.1 SREBP-2 基因 SNP 位点测序结果.....                   | 22 |
| 2.3.2 SREBP-1C 基因 SNP 位点测序结果.....                  | 23 |
| 2.4 SREBPS 基因 SNP 位点实验结果统计分析.....                  | 24 |
| 2.4.1 SREBP-2 基因 RS2267439 SNP 位点实验结果.....         | 24 |
| 2.4.2 SREBP-1C 基因 RS2297508 SNP 位点实验结果.....        | 29 |
| 六、讨论.....                                          | 32 |
| 1 脂类代谢紊乱学说与 NONFH 发生机制.....                        | 32 |
| 2 中医体质与 NONFH 的联系及意义.....                          | 32 |
| 3 NONFH 及中医体质与 SREBPS 基因多态性的相关性.....               | 33 |
| 3.1 NONFH 及中医体质与 SREBP-2 基因多态性的相关性.....            | 33 |
| 3.1.1 NONFH 与 SNP 位点基因型的相关性.....                   | 34 |
| 3.1.2 NONFH 与 SNP 位点等位基因的相关性.....                  | 34 |
| 3.1.3 NONFH 平和质与痰湿质的 SNP 位点基因型的相关性.....            | 34 |
| 3.1.4 NONFH 平和质与痰湿质的 SNP 位点等位基因的相关性.....           | 34 |
| 3.1.5 NONFH 平和质及痰湿质与健康对照组基因型的相关性.....              | 34 |
| 3.1.6 NONFH 平和质及痰湿质与健康对照组等位基因的相关性.....             | 35 |
| 3.2 NONFH 与 SREBP-1C 基因 RS2297508 位点基因多态性的相关性..... | 35 |
| 3.2.1 NONFH 与 SNP 位点基因型的相关性.....                   | 35 |
| 3.2.2 NONFH 与 SNP 位点等位基因的相关性.....                  | 36 |
| 3.2.3 NONFH 平和质与痰湿质的 SNP 位点基因型的相关性.....            | 36 |
| 3.2.4 NONFH 平和质与痰湿质的 SNP 位点等位基因的相关性.....           | 36 |
| 3.2.5 NONFH 平和质及痰湿质与健康对照组基因型的相关性.....              | 36 |
| 3.2.6 NONFH 平和质及痰湿质与健康对照组等位基因的相关性.....             | 36 |

3.3 NONFH 与 SREBP-1C 基因 RS13306739 SNP 位点基因型的相关性.....36

七、结语.....38

参考文献.....39

综述.....41

甾醇调节因子结合蛋白基因多态性与股骨头缺血性坏死相关性研究进展.....41

八、致谢.....49

附录.....50

附录 1 伦理审查表.....50

附录 2 病例调查材料证明.....51

附录 3 兰州军区总医院实验场地证明.....52

附录 4 SREBPS 基因库查询 SNP 序列.....53

附录 5 非创伤性股骨头坏死中医体质类型及相关基因多态性研究病例调查表.....54

附录 6 实验、临床瞬间生活集锦.....82

附录 7 在校期间学习情况.....85

## 摘 要

**目的:** 应用临床流行病学方法调查 NONFH 中医体质类型分布特点、相关发病因素, 确定 NONFH 中医高发体质类型。NONFH 是遗传易感因素和环境危险因素共同作用的复杂性疾病, 建立在 NONFH 脂质代谢紊乱学说发病机理研究基础上, 选择脂质代谢相关基因即 SREBPs 基因多态性进行研究, 以阐明痰湿体质类型与 NONFH 相关基因多态性的相关性研究, 为 NONFH 易感人群筛查、早期诊断和早期干预提供重要科学依据, 为中医药辨体质防治股骨头坏死提供新的思路和理论依据。

**方法:** 应用临床流行病学方法, 参照《中医体质分类与判定》标准制订“非创伤性股骨头坏死中医体质类型及相关基因多态性研究”统一设计的研究调查表, 判定 NONFH 患者中医体质类型, 采集血液标本, 建立 NONFH 患者中医体质数据库, 在数据库中选取 NONFH 病例组共 69 人, 其中平和质 NONFH 32 人, 痰湿质 NONFH 37 人; 正常健康非血缘关系志愿者对照组 60 人。应用文献循证方法选择与 NONFH 的发生发展及脂质代谢有密切关系的 SREBPs 基因, 其中 SREBP-2 检测 SNP 位点为 rs2267439; SREBP-1c 检测 SNP 位点为 rs13306739, rs2297508。利用分子生物学研究采用聚合酶链式反应 (PCR)、基因测序等分子技术检测 SREBPs 基因 SNP 位点多态性。通过 SPSS18.0 统计学、BioEdit 等软件统计分析 SREBPs 基因相关 SNP 位点, 分析 NONFH 与健康对照组、NONFH 平和质与痰湿质、NONFH 平和质与健康对照组、痰湿质与健康对照组的基因型、等位基因分布规律。

**结果:** (1) SREBP-2 基因 rs2267439 SNP 位点基因型结果: ① 129 例样品中共检测出 CC, CT, TT 三种基因型、C 及 T 两种等位基因, 结果显示等位基因 C vs. T 在 NONFH、对照组分布有明显差异 ( $P < 0.05$ )。② 基因型 CC vs. CT+TT 在痰湿质 NONFH 与健康对照组之间分布有明显差异 ( $P < 0.05$ )。③ 等位基因 C vs. T 在痰湿质 NONFH 与健康对照组之间分布有明显差异 ( $P < 0.05$ )。 (2) SREBP-1c 基因 rs2297508 SNP 位点基因型、等位基因结果统计未见明显差异。 (3) SREBP-1c 基因 rs13306739 SNP 位点未发现基因多态性。

**结论:** (1) SREBP-2 基因 rs2267439 SNP 位点基因多态性结论: ① 等位基因 C vs. T 与 NONFH 易感性有关, 等位基因 T 的频率在 NONFH 组比健康对照组频率高, 因此等位基因 T 增加了 NONFH 的易感性。② 基因型 CC vs. CT+TT 与 NONFH 痰湿质的易感性有关, 且基因型 CC 的频率在痰湿质 NONFH 组比健康对照组频率明显低, 因此基因型 CC 对痰湿质 NONFH 的发生发展有保护作用。③ 痰湿质与 NONFH 的发生有明显相关性, 而等位基因 C 的频率在痰湿质 NONFH 组比健康对照组频率明显低, 因此等位基因 C 对痰湿质 NONFH 的

发生发展有保护作用。(2) SREBP-1c 基因 rs2297508 SNP 位点基因型、等位基因在 NONFH 的发生无相关性。(3) SREBP-1c 基因 rs2297508 SNP 位点基因型、等位基因在 NONFH 的发生无相关性。

**关键词：**股骨头坏死；痰湿质；体质；甾醇调节因子结合蛋白；基因多态性

## ABSTRACT

**Objective :** To determine NONFH High risk physical type, we surveyed the TCM constitution type distribution, related risk factors of NONFH by clinical epidemiology. In order to clarify the relation of type of correlation between TCM constitution and NONFH, Choose the the gene SREBPs which is related to the lipid metabolism to study. So it may be provides an important scientific basis for susceptible to screening, early diagnosis and early intervention of NONFH and provide new ideas and theoretical basis to identified physical prevention with TCM necrosis for the femoral head.

**Methods:** Clinical application of epidemiological methods, refer to "TCM Constitution classification and judgment" standard setting "non-traumatic osteonecrosis TCM constitution types and related gene polymorphism" unified design research questionnaire. According to "Chinese constitution classification and determination" criteria to determine physical type NONFH patient medicine, Take blood samples, NONFH TCM constitution established a database of patients, Select NONFH case group of 69 people in the database, Where gentleness NONFH 32 people, phlegm NONFH 37 people; Normal healthy unrelated volunteers in the control group of 60 people. Applications literature and the development of evidence-based approach to select and lipid metabolism are closely related NONFH SREBPs genes, Which SREBP-2 SNP loci detected as rs2267439; SREBP-1c to detect SNP loci as rs13306739, rs2297508. Research on the use of molecular biology using polymerase chain reaction (PCR), gene sequencing and other molecular techniques to detect SREBPs gene SNP polymorphisms. Between by SPSS18.0 statistical, BioEdit statistical analysis software SREBPs gene-related SNP loci between NONFH with the healthy control group, between gentleness and phlegm NONFH, gentleness NONFH with the healthy control group, phlegm and the healthy control group between genotype and allele distribution.

**Results:** (1) SREBP-2 gene rs2267439 SNP genotype results: ① 129 samples were detected in the CC, CT, TT genotype, C and T two alleles showed that allele C vs. T in NONFH, there are significant differences in the distribution of the control group ( $P < 0.05$ ). ② CC vs. CT + TT genotype between phlegm NONFH distributed with the healthy control group were significantly different ( $P < 0.05$ ). ③ allele C vs. T between phlegm NONFH distributed with the healthy control group were significantly different ( $P < 0.05$ ). (2) SREBP-1c gene rs2297508 SNP genotype, allele showed no statistical difference in the results. (3) SREBP-1c gene rs13306739 SNP locus gene polymorphism was not found.

**Conclusion:** (1) SREBP-2 gene polymorphism rs2267439 SNP loci conclusions: ① allele C vs. T and NONFH susceptibility, the frequency of allele T in NONFH group frequencies higher than the healthy control group, so the T allele increased susceptibility NONFH. ② CC vs. CT + TT genotype and susceptibility NONFH phlegm and CC genotype frequencies in phlegm NONFH group was significantly lower than in healthy controls frequency, so the occurrence of CC genotype of phlegm NONFH development of a protective effect. ③ phlegm and NONFH significant correlation between the occurrence, and the frequency of allele C in phlegm NONFH group was significantly lower than in healthy controls frequency, and therefore the development of allele C of phlegm NONFH has a protective effect. (2) SREBP-1c gene rs2297508 SNP genotype, allele occurs in NONFH no correlation. (3) SREBP-1c gene rs2297508 SNP genotype, allele occurs in NONFH no

correlation.

**Keywords:** osteonecrosis; Phlegm; constitution; SREBPs; gene polymorphism

## 英文缩略词表

| 缩略词    | 英文名称                                                 | 中文名称          |
|--------|------------------------------------------------------|---------------|
| NONFH  | nontraumatic osteonecrosis of femoral head           | 非创伤性股骨头坏死     |
| PCR    | Polymerase chain reaction                            | 聚合酶链反应        |
| SREBPs | Sterol regulatory element binding proteins           | 甾醇调节因子结合蛋白    |
| GC     | Gentleness constitution                              | 平和质           |
| PDC    | Phlegm damp constitution                             | 痰湿质           |
| Buffer | Buffer                                               | 缓冲液           |
| DNA    | Deoxyribonucleic                                     | 脱氧核糖核酸        |
| dNTP   | Deoxynucleoside triphosphate                         | 单脱氧核苷三磷酸      |
| Gel    | Gelview                                              | 核酸染料          |
| SPSS   | Statistical package for social science               | 社会科学统计软件包     |
| TBE    | Trisboracic acid electrophoresis                     | 三氨基甲烷磷酸电泳     |
| GCs    | glucocorticoids                                      | 糖皮质激素         |
| SCAP   | SREBP cleavage-activating protein                    | SREBP 裂解激活蛋白  |
| ADD1   | Adipocyte determination and differentiation factor 1 | 脂肪细胞定向和分化因子 1 |
| SNP    | single nucleotide polymorphism                       | 单核苷酸多态性       |

## 一、前言

本课题来源于导师国家自然科学基金面向项目“非创伤性股骨头坏死中医体质类型及其相关基因多态性研究（批准号：81072821）”。研究分为 2 两大部分，一是临床病例调查研究；二是分子生物学研究。临床病例调查研究是围绕 NONFH 患者中医体质调查研究开展，参照《中医体质分类与判定》<sup>[1]</sup>标准制订“非创伤性股骨头坏死中医体质类型及相关基因多态性研究”统一设计的研究调查表，主要观察指标包括基本信息，既往病病史，个人病史，可能发病因素，病程，中医体质量表，临床常规实验室检查，影像学检查等（见附表）。按照《中医体质分类与判定》标准判定 NONFH 患者中医体质类型。并经调查者同意，采取血液标本，建立 NONFH 患者中医体质数据库，在数据库中选取痰湿体质、平和体质及采取血液标本的 NONFH 病例，单纯随机选取 NONFH 病例组共 69 人，其中平和质 NONFH 32 人，痰湿质 NONFH 37 人；正常健康非血缘关系志愿者对照组 60 人。分子生物学研究采用聚合酶链式反应（PCR）、基因测序等分子技术检测目的基因 SNP 位点多态性。查询文献<sup>[2]</sup>选择已证实与 NONFH 脂类代谢紊乱学说相关的 SREBPs 基因，进一步揭示痰湿体质类型 NONFH 目的基因 SNP 位点的基因多态性。

本研究在国内外率先提出了将 NONFH 基因多态性与中医体质类型相结合的方法。以 NONFH 患者为媒介，首先调查 NONFH 患者个人体质类型，建立 Excel 表数据库，并采集血液标本。以数据库中研究病历为模型，进一步分组研究目的基因 SNP 位点基因多态性，发现目的基因遗传易感 SNP 位点、表观遗传学、基因表达效率等的深入研究，建立在中医体质学基础上进一步阐述基因多态性与 NONFH 的发生发展的关系，揭示中医痰湿体质与 NONFH 患者 SREBPs 基因 SNP 位点多态性相关性，发现痰湿体质 NONFH 的发病规律，为临床痰湿体质 NONFH 调体治疗做好准备工作，为 NONFH 的诊治提供新的思路、和治疗靶点。

## 二、立题依据

### 1 中医体质学研究

#### 1.1 中医体质学的概述

中医体质学<sup>[3]</sup>是以中医基础理论为指导,研究人体体质的概念、形成、特征、类型、差异规律,对疾病发生、发展、演变过程的影响,并以此指导对疾病进行诊断和防治的理论知识,是体质与健康、疾病关系的一门学科。中医体质学分类以整体观念为指导思想,以阴阳学说为思维方法,以藏象及精气血津液神理论基础划分。中医体质学渊源于《内经》,见《灵枢·寿夭刚柔》篇:“人之生也,有刚有柔,有弱有强,有短有长,有阴有阳”,还提出过阴阳含量划分法、五行归属划分法、形态与机能特征分类法、心理特征分类法等,后世医家结合各自的临床实践,丰富和发展了中医体质学说,如张介宾等采用藏象阴阳分类法,叶天士等以阴阳属性分类,章虚谷以阴阳虚实分类,现代医家以脏腑经络及精气血津液的结构与功能差异为基础,多从临床角度根据发病群体中的体质变化、表现特征进行分类。本课题以王琦在《中医体质学》<sup>[4]</sup>提出9种中医体质分类法研究为依据进行研究,即平和质、气虚质、阳虚质、阴虚质、痰湿质、湿热质、瘀血质、气郁质、特禀质。

#### 1.2 中医体质学的应用

人的体质是对个体身心特性的概括,是个体在遗传的基础上,在内外环境的影响下形成的个性特征,这些特征伴随着生命的全过程,具有先天遗传性、个体差异性、形神一体性、群类趋同性、相对稳定性、动态可变性、连续可测性、后天可调性等特点。疾病过程中所表现的差异取决于个体的体质,体质的差异性很大程度上决定着疾病的发生发展变化、转归预后、治疗措施。因此,体质与病因、发病、病机、辨证、治疗及养生预防有密切关系。中医体质学的应用表现在:①说明个体对疾病的易感性,体质反应了机体自身阴阳寒热虚实的盛衰偏倾机能状态,这种偏倾性决定了机体对外界刺激的反应性、亲和性、耐受性不同;②阐释发病机理,体质的强弱决定着疾病的发病与否及发病情况,邪正交争是疾病的发病原理;③解释病理变化,体质决定病机的从化;④指导辨证,体质是辨证的基础,体质决定疾病的证候类型;⑤指导治疗,辨证论治是中医治疗的特色,而证候的内在基础是体质,即“因人制宜”,区别体质特征而施治,根据体质特征注意针药宜忌,兼顾体质特征重视善后调理;⑥指导养生,养生调摄则根据各自不同的体质特征选择相应的措施和方法。

## 2 NONFH 的中医研究

中医认为 NONFH 属于“骨蚀、骨痹、痹证”的范畴，见《内经·刺节真邪》篇：“虚邪之入于身也深，寒与热相搏，寒胜其热，则骨疼肉枯，热胜其寒，则烂肉腐肌为脓，内伤骨为骨蚀”；《素问·长刺节论》：“病在骨，骨重不可举，骨髓酸痛，寒气至，名曰骨痹”；《素问·痿论》：“肾气热，则腰脊不举，骨枯而髓减，发为骨痿。”等，其病机是肝肾亏虚为本，血瘀痰阻为标。历代医家也认为 NONFH 病程发展和病理转归与“痰”有密切关系，病因病机阐述中有“因痰致痹”、“治痹必治痰”的说法。中医临床多从“瘀血”理论辨治股骨头坏死<sup>[5]</sup>，现代中医学研究<sup>[6, 7]</sup>中也发现，中医学“痰瘀互结”、“痰瘀同病”、“痰瘀相关”理论是 NONFH 发生的病理转归和核心，痰可致瘀、瘀可致痰，痰瘀同病致痹，“痰瘀”是股骨头坏死的基本病理特征，导致骨坏死形成是该病的主要病理过程。同时，现代众多医学研究者从中医类型对 NONFH 的发生机制进行探讨。

## 3 痰湿体质与 NONFH 的联系及意义

痰、湿是人体的病理产物和致病因素，是水液代谢障碍所形成的病理产物，由于痰、湿的存在，构成了体质的特殊状态，即气、血、精、津、液代谢偏颇的状态。王琦教授<sup>[4]</sup>提出的痰湿体质定义是由于体内水液内停而痰湿凝聚，以粘滞重浊为主要特征的体质状态。其形体特征表现：体形肥胖、腹部肥满松软；临床特征表现：面部皮肤油脂较多，胸闷，痰多，易倦，身体困重，汗出粘腻，口腻不渴，大便粘滞，小便浊，舌体胖大，舌苔白腻，脉濡或滑，对梅雨季节及湿环境适应能力差。

现代医学研究<sup>[8, 9]</sup>发现致病因素“痰”可引起神经内分泌异常、植物神经功能紊乱、体液代谢及物质代谢障碍，从而导致代谢产物堆积、内环境紊乱，表现为痰证的一系列临床症状；研究“痰”与血脂相关性时发现痰证患者血液黏滞性、浓稠性、凝固性及聚集性均有不同程度的增高，进而致血液流变学的异常改变。因此，从脂代谢、微循环、胰岛素抵抗、免疫功能、黏附分子等不同方面反映了痰的客观存在，提示痰与体内代谢物质、循环状态及机体功能等相关。现代医学研究从致病因素“湿”与机体能量代谢、水液代谢、脂肪代谢及免疫功能等研究发现其具有相关性。王东坡等<sup>[10, 11]</sup>通过对痰湿体质的基因表达特性进行探索痰湿质的分子机制，证实痰湿型体质者多存在脂质代谢紊乱、血液黏滞性增加、自由基损伤等病理生理现象。王琦<sup>[8]</sup>研究痰湿体质的分子生物学特征，发现痰湿体质相关基因功能为酶活性、固醇运载体活性等功能，参与糖异生途径、脂肪酸生物合成途径、胆固醇代谢过程、脂肪酸氧化作用、棕色脂肪细胞分化、细胞葡

葡萄糖调节平衡作用、体温调节作用等生物学过程，痰湿质者在分子水平上具有代谢紊乱的总体特征。

高脂血症与高凝状态并存的现象是中医学“痰瘀互结”、“痰瘀同病”、“痰瘀相关”理论在 NONFH 病机中的生动体现，血管内凝血和脂质代谢紊乱及其相关因素是 NONFH “痰瘀”共同为该病的病理基础。痰湿体质与 NONFH 的发生发展二者在代谢紊乱机制中具有相关性。

#### 4 NONFH 痰湿体质与基因多态性的研究及意义

现代医学对非创伤性股骨头坏死的发病机制目前存在争议，主要包括血管内凝血学说，脂质代谢紊乱学说，骨细胞受损学说，骨质疏松学说，骨内高压学说等，其发病是多种不同疾病共同的终末期病理过程，通过影响骨组织的血供而导致骨坏死。其中脂质代谢异常导致高脂血症，伴有脂类动员到软骨以及小动脉栓塞。最终过多的软骨下脂类沉积导致血管血流停滞、局部呈现高凝状态、内皮损伤和静脉凝血。甾醇调节因子结合蛋白（SREBP）通过激活与胆固醇生物合成通路相关基因的表达，在维护脂质内环境稳定中起作用。Kim 等<sup>[12]</sup>首次报道韩国人群中 SREBP-2 基因多态性与骨坏死易感基因有关，rs2267439 位点的最小等位基因 C 对骨坏死有明显的保护作用，IVS11+414G>A（rs1052717）和 IVS12-1667G>A（rs2267443）多态性与骨坏死明显相关。有关股骨头坏死中医体质与 SREBP 的基因多态性的研究经查阅文献尚未见报道。

从分子水平研究非创伤性股骨头坏死脂质代谢相关的基因多态性与中医痰湿体质之间的相关性，有助于揭示中医体质的现代物质基础，为临床辨体疗法提供实验依据。但这种关联性是否与 NONFH 患者体内血脂代谢紊乱相关，是否各证型间基因多态性的变化存在规律性，是我们当前的研究目标。本研究从祖国医学治未病思想出发，从中医体质学角度研究地区性 NONFH 人群的遗传易感因素，为预防及治疗 NONFH 的发生提供理论指导，对中医体质的遗传学研究提供思路，实现 NONFH 的中医个体化诊疗。

## 三、材料与方

### 1 病例资料:

本课题临床调查病例均来自甘肃省中医院门诊、住院部就诊 NONFH 患者及健康非血缘关系志愿者,应用临床流行病学方法,参照《中医体质分类与判定》标准制订“非创伤性股骨头坏死中医体质类型及相关基因多态性研究”调查表。予 2011 年 1 月—2013 年 7 月在甘肃省中医院门诊、住院部对 NONFH 患者及健康非血缘关系志愿者进行问卷调查,将调查病例所得数据资料建立 NONFH 患者体质数据库。从数据库中选取 NONFH 病例组共 69 人,其中平和质 NONFH 32 人,痰湿质 NONFH 37 人;正常健康非血缘关系志愿者对照组 60 人。

②研究方法经医院伦理委员会讨论并获得批准。受试者签订知情同意书。

### 2 诊断及纳入标准

#### 2.1 西医诊断标准:

参考 2006 年中华医学会骨科学分会关节外科学组提出的股骨头坏死诊断与治疗专家建议<sup>[13]</sup>。

#### 2.2 中医诊断标准:

参照 2002 年卫生部实施的《中药新药临床研究指导原则》修订版<sup>[14]</sup>。

#### 2.3 纳入标准

- ①符合中西医诊断标准的股骨头坏死患者(包括接受手术或中医药对症治疗者)。
- ②年龄 18~60 岁。
- ③愿意接受本次科研调查研究者。

#### 2.4 排除标准

- ①诊断为创伤性股骨头坏死患者的患者;
- ②妊娠或哺乳期妇女,过敏体质者或不能接受本治疗方法者;
- ③类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、髓臼发育不良、股骨头骨髓滑脱症、骨性关节炎等症患者;
- ④合并有严重的内脏病变者或其他严重代谢异常疾病及骨肿瘤患者;
- ⑤精神病患者、智力障碍者;
- ⑥正在参加其他临床试验的患者。

#### 2.5 剔除和脱落标准(有下述任何一项者即可排除):

- ①患者依从性差,未能按照要求填写者。
- ②采集项目不完整,缺项多于 20%者。
- ③体质分型判定为兼夹体质者。

### 3 中医体质分类及判定标准

按照中华中医药学会 2009 年 4 月 9 日颁布的《中医体质分类与判定》标准<sup>[1]</sup>, 中医体质 9 种类型有分别是: 平和质、气虚质、阳虚质、阴虚质、痰湿质、湿热质、血瘀质、气郁质、特禀质。

## 4 研究方法

### 4.1 调查方法

调查员为课题组成员, 对调查者进行中医体质理论知识、调查方法培训, 调查对象是符合纳入标准及经解释课题研究意义后自愿签署病例研究知情同意书并配合调查研究的患者, 调查员采用规范化语言及问答方式对调查对象进行询问、查体、非数字化辅助检查结果的判定以及诊断、分期。

### 4.2 血液标本采集

因 NONFH 分布不集中, 故指定专职调查者进行病例的收集, 并经调查者同意, 采取空腹外周血 2ml 置入 EDTA 抗凝剂的无菌管中混匀, 并保存在 -80℃ 冰箱。

### 4.3 体质判定方法

调查填写规范填写《中医体质分类与判定表》, 计算原始分和转化分, 按标准判定体质类型; 原始分=各个条目分相加, 转化分数=[(原始分-条目数)/(条目数×4)]×100, 正常体质为平和质, 其余体质为偏颇体质, 判定标准见表 1。

表 1 平和质与偏颇体质判定标准

| 体质类型 | 条件            | 判定结果 |
|------|---------------|------|
| 平和质  | 转化分≥60 分      | 是    |
|      | 其他体质转化分均<30 分 |      |
|      | 转化分≥60 分      | 基本是  |
|      | 其他体质转化分均<40 分 |      |
| 偏颇体质 | 不满足上述条件者      | 否    |
|      | 转化分≥40 分      | 是    |
|      | 转化分 30-39 分   | 倾向是  |
|      | 转化分<30 分      | 否    |

调查结束后复核、整理原始资料, 将不合格的调查表予以剔除, 并及时把调查表所得数据输入建立的 Excel 数据库。

## 5 资料处理与分组

### 5.1 建立病例数据库:

将调查病例所得数据资料进行汇总, 并予以复核、整理, 在 Excel 表中建立数据库。