



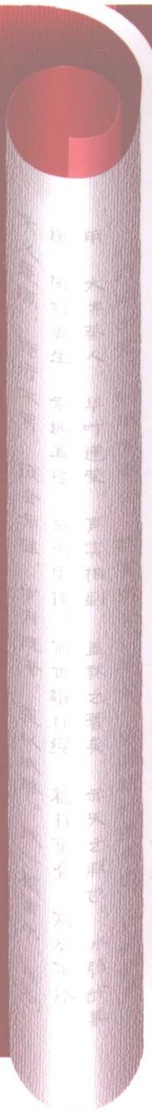
卫生部“十一五”规划教材
全国高等医药教材建设研究会规划教材

全国高等中医药院校研究生规划教材
供中医药、中西医结合各专业研究生使用



中医药研究 常用分子生物学技术

[主编] 方肇勤



人民卫生出版社



基础
系列



全国高等中医药院校研究生规划教材

供中医药、中西医结合各专业研究生使用

中医药研究常用分子 生物学技术

主 编 方肇勤

副主编 司富春 周 联

编 委 (以姓氏笔画为序)

才丽平 (辽宁中医药大学) 张 丹 (山东中医药大学)
王 威 (天津中医药大学) 张寿文 (江西中医学院)
方肇勤 (上海中医药大学) 周坤福 (南京中医药大学)
司富春 (河南中医学院) 周 联 (广州中医药大学)
华 茜 (北京中医药大学) 赵 刚 (湖北中医学院)
李丽帆 (广西中医学院) 管冬元 (上海中医药大学)

学术秘书 管冬元 (兼)

人 民 卫 生 出 版 社

图书在版编目 (CIP) 数据

中医药研究常用分子生物学技术/方肇勤主编. —北京:
人民卫生出版社, 2009. 1

ISBN 978-7-117-10934-5

I. 中… II. 方… III. 中国医药学: 分子生物学-
研究 IV. R229

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 184140 号

本书本印次封底贴有防伪标。请注意识别。

方肇勤 编 主

荆周 春富恒 编 主 编

(乳 代 画 学 为 技 术) 委 编

(学 大 医 国 中 京 山) 荆 周 (学 大 医 国 中 宁 丘) 平 丽 李

(荆 学 国 中 西 五) 文 秋 洪 (学 大 医 国 中 京 天) 荆 周

(学 大 医 国 中 京 南) 荆 周 (学 大 医 国 中 京 土) 方 肇 勤

(学 大 医 国 中 荆 九) 荆 周 (荆 学 国 中 南 西) 春 富 恒

中医药研究常用分子生物学技术

(荆 学 国 中 京 北) 荆 周

主 编: (学 大 医 国 中 京 土) 方 肇 勤 (荆 学 国 中 西 五) 荆 周

出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 010-67616688)

地 址: 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

邮 编: 100078

网 址: <http://www.pmph.com>

E - mail: pmph@pmph.com

购书热线: 010-67605754 010-65264830

印 刷: 北京市安泰印刷厂

经 销: 新华书店

开 本: 850×1168 1/16 印张: 21.5

字 数: 595 千字

版 次: 2009 年 1 月第 1 版 2009 年 1 月第 1 版第 1 次印刷

标准书号: ISBN 978-7-117-10934-5/R·10935

定 价: 42.00 元

版权所有, 侵权必究, 打击盗版举报电话: 010-87613394

(凡属印装质量问题请与本社销售部联系退换)

近些年来,随着中医药院校研究生教育规模的不断壮大,中医药研究生培养中硬件及软件水平相对不足与中医药高层次人才需求的矛盾日益突出,如何解决这一矛盾,成为当前中医药研究生培养教育中迫切需要解决的问题。

为了适应新时期中医药研究生教育和教学的需要,全国高等医药教材建设研究会、卫生部教材办公室自2006年开始,对全国各高等中医药院校的研究生院(处)、研究生导师、院士、名老中医、在校和毕业后的研究生,进行了大量、深入的调研和专家论证工作。在深入探讨“研究生规划教材在研究生培养过程中应该发挥的作用;研究生教材与五年制本科教材、七年制教材,以及专著之间的区别与联系;研究生教材与导师个性化培养的关系”的基础上,根据中医研究生教育的实际需要,策划组织了这套全国高等中医药院校研究生规划教材。

本套教材以“提高文化底蕴、加强基础知识;突出中医药经典原著研究;提高临床诊治技能;吸纳现代科技手段与方法”为宗旨,构建了基础、经典、临床、中药4个系列的40种书目。全套教材在内容的组织上,突破传统应试教育教材系统、全面的特点,紧紧围绕研究生的培养目标,着眼于学生进一步获取知识、挖掘知识和实践创新能力的培养;以问题为中心,围绕本学科的重点、难点、热点和疑点进行取材,深入展开某些方面的理论探讨和实践研究,在提高中医药研究生的动手能力、创新能力和思维能力上下功夫。4个系列中,基础系列主要以“够用”、“深度和广度”为基点,从中医研究生文化专业基础到科研能力各个方面可能遇到的实际问题展开。经典系列主要以条文内容为核心,进行勾勒理论、梳理观点、联系临床实际,阐发经典理论精髓,引导学生深入探索和挖掘。临床系列在中医优势病种的基础上,着重学科的重点、难点、热点内容,以问题为中心,深入探讨中医临床预防、诊治的理论与方法,启迪和培养研究生临床思辨能力。中药系列以当前学科领域研究的热点入手设立专题进行展开,深入探索和阐释本专业的理论与技术,启发学生的创新性思维。

本套教材的主编大多为目前各学科内较有影响和威望的资深专家,他们从事研究生教育工作多年,具有丰富的教学经验,并对编写本学科研究生教材有很多独到的见解。教材编写中经过主编人会议、各科目编写会议、审定稿会议、主编及副主编统稿会议,参加编写的各位专家(包括港澳台、境外及其他学科专家)对教材的编写深入研讨,积极探索,确保了教材的科学性、先进性和适用性。

本套教材是自有中医药研究生教育制度以来,首次规划出版。这套教材为研究生基础教育搭建了平台,对开展和促进导师的个性化培养,提高中医药高素质人才的水准,无疑是非常必要的,对推动中医药更大的发展具有重大的现实意义和历史意义!

然而,毕竟是首次组织编写中医药研究生教材,其中不乏有不尽人意之处,或不妥或缺憾,冀海内外专家学者及广大读者朋友提出宝贵意见,以便不断完善和提高。

人民卫生出版社

2008年12月

王士元 主编
张其成 主编
胡晓平 主编
吴谷阿 主编
黄兴武 主编

中国耳鼻咽喉口腔科
中国针灸学
中国推拿学
中国小儿推拿学
中国气功学

教材目录

中医基础理论

中国医学史

中国医史学

中国医学史学

中国医学史学

中国医学史学

中国医学史学

中国医学史学

一、基础系列

中国古代哲学与中医学

自然辩证法

古代汉语

中国传统文化概论

中医古籍校读法

中医各家学说专论

医学科研思路方法与程序

中医药文献信息获取与利用

中医临床辨证思维方法

中医药研究常用分子生物学技术

中医基础理论专论

循证中医药临床研究方法

临床医学影像学

主编 孙广仁
主编 张宗明
主编 许敬生
主编 张其成
主编 段逸山
主编 鲁兆麟
主编 贾长恩
主编 蒋永光
主编 张伯礼
主编 方肇勤
主编 郭霞珍
主编 刘建平
主编 周伟生

二、经典系列

黄帝内经理论与实践

伤寒论理论与实践

金匱要略理论与实践

温病学理论与实践

难经理论与实践

针灸甲乙经理论与实践

神农本草经理论与实践

主编 王庆其
主编 郝万山 李赛美
主编 张家礼 陈国权
主编 杨进
主编 烟建华
主编 李鼎
主编 张树生

三、临床系列

中医外感病证临床研究

中医内伤杂病临床研究

中医急诊临床研究

中医外科临床研究

中医妇科临床研究

中医儿科临床研究

中医骨伤科临床研究

中医眼科临床研究

主编 吴银根 黄永生
主编 金实
主编 姜良铎
主编 唐汉钧
主编 肖承棕
主编 汪受传 俞景茂
主编 施杞 王和鸣
主编 段俊国

编写说明

分子生物学技术是当代中医药实验研究的领先技术。近些年来各高等中医药院校研究生教育中不断开展分子生物学技术的中医药实验研究,并获得丰硕成果。本教材根据卫生部教材办公室的统一要求,从中医药研究实际出发,常用分子生物学技术及其在中医药研究中的运用,以加强中医药研究生的科研思维、方法和能力的培养,着重解决能否用、为何用、怎样用的问题,更好地促进中医药的研究与发展。

本书适用于中医药专业的研究生以及非中医药学科从事分子生物学领域研究的研究生及其工作者。

本教材编写依据作者多年来在国内、外运用该技术的实验研究,以及研究生教学的经验,对分子生物学技术的运用删繁就简,择其精要,其内容有这样几个特点:①实用:为了便于读者择用,本书分7个部分:一是绪论。介绍分子生物学技术在中医药研发中应用的现状,深入浅出地介绍如何用和怎样用以及本书各章节的结构与不同技术间的关系。二是分子生物学常用基本技术。例如重组质粒、重组的鉴定、制备和回收、动物和植物细胞的培养等。三是DNA的研究方法。介绍动植物基因组DNA的提取、基因组文库的建立与筛选、Southern blot、PCR、DNA测序、动植物药材的指纹图谱等技术。四是RNA的研究方法。介绍RNA提取、mRNA分离、Northern blot、RT-PCR、荧光实时定量PCR、原位杂交、基因芯片、DD-PCR、cDNA库建立、基因全序列筛选等技术。五是蛋白质的研究方法。介绍动植物蛋白质的提取、Western blot、ELISA、免疫组织化学、单克隆抗体制备和蛋白质双向电泳等技术。六是基因功能与表达调控的研究方法。介绍RNAi、Small RNA的提取与分析、报道基因与基因调控元件的检测、点突变PCR、基因敲除、Footprint、凝胶阻滞分析、动植物细胞的基因转化等技术。七是分子生物学常用网络资源及利用。本书的实验研究注重实验细节和常见问题解惑与分析,详细介绍了实验原理、实验准备和实施细则以及注意事项等。②先进:当代最新发展的RNAi、基因芯片等技术以及丰富的网络资源。③可靠:所介绍的实验技术均为作者使用过的技术,并参考一些国内公开发表的研究报告、有关公司试剂盒说明以及包括《分子克隆实验指南》等权威专著,言之有据。④突出中医特色:实验研究联系中医药研究的案例和研究思路,以冀拓宽视野、启迪思路。

本教材在编写过程中得到了全国各参编中医药院校以及人民卫生出版社领导的高度重视和支持,有关专家和领导积极参与,在此一并表示感谢。

分子生物学技术的发展十分迅速,迄今已积累了大量的不同技术和方法,出版了大量的专著、论文、产品目录,拥有了丰富的网络资源。面对如此庞大的信息,一部教材是难以囊括的。挂一漏万以及不妥之处在所难免,殷切期待同道的批评与指正,以便不断完善和提高。

方肇勤

2008年12月

92 植物基因组 DNA 的提取 第七章

100 中药 RAPD 指纹图谱 第八章

101 RNA 的研究方法 第四章

目 录

113 第一章 绪论 1

113 一、分子生物学技术在中医药研究中的实例 1

113 二、分子生物学技术在中医药研究中的现状 6

113 三、中医药研究经常使用的分子生物学技术及本书的安排 11

113 四、加强分子生物学技术在中医药研发中的应用,是新时期中医药继承与发展的
迫切需要 17

113 第二章 分子生物学常用基本技术 21

113 第一节 重组质粒 21

113 第二节 质粒转化大肠杆菌 23

113 第三节 阳性单菌落扩增与小量 DNA 制备 27

113 第四节 酶切重组质粒,电泳分离所插入的 DNA 30

113 第五节 从凝胶中回收 DNA 32

113 附:琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒及其方法 34

113 第六节 大量质粒 DNA 制备 35

113 第七节 哺乳类动物细胞的培养 37

113 附:细胞库简介 43

113 第八节 植物细胞悬浮培养 43

113 第九节 气相色谱-质谱联用 47

113 第十节 流式细胞仪分析 49

113 第三章 DNA 的研究方法 58

113 第一节 哺乳类动物基因组 DNA 的提取 58

113 第二节 植物基因组 DNA 的提取 62

113 第三节 基因组文库的建立与筛选 65

113 第四节 DNA 印迹杂交 76

113 第五节 聚合酶链式反应 80

113 附:多重 PCR 84

113 第六节 DNA 双脱氧链终止法测序 86

第七节	动、植物药材的 ISSR 指纹图谱	95
第八节	中药 RAPD 指纹图谱	100
第四章	RNA 的研究方法	104
第一节	总 RNA 提取	105
第二节	mRNA 的分离	107
第三节	RNA 印迹杂交	110
第四节	反转录聚合酶链式反应	115
第五节	荧光实时定量 PCR	118
第六节	原位杂交	123
第七节	基因芯片	127
第八节	cDNA 矩阵	137
第九节	差异展示 PCR	141
第十节	cDNA 库建立	145
第十一节	基因全序列 cDNA 库筛选	154
第十二节	迅速扩增 cDNA 末端的 PCR 技术	159
第五章	蛋白质的研究方法	164
第一节	哺乳类动物组织蛋白质的提取	164
第二节	植物组织蛋白质的提取	167
第三节	蛋白质印迹杂交	169
第四节	酶联免疫吸附试验	181
第五节	免疫组织化学	185
第六节	单克隆抗体制备技术	191
第七节	蛋白质双向电泳	199
第六章	基因功能与表达调控的研究方法	215
第一节	RNA 干扰	216
第二节	small RNA 的提取与分析	226
第三节	报道基因与基因调控元件的检测	231
第四节	点突变 PCR	236
第五节	基因敲除	241
第六节	DNA 酶 I 足迹法	246
第七节	凝胶阻滞分析	252
第八节	植物细胞的基因转化	259
第七章	分子生物学常用网络资源及利用	268
第一节	美国国家生物技术信息中心(NCBI)	268
第二节	GenBank 数据库查询与搜索	274
第三节	基础局部比对搜索工具(BLAST)	280
第四节	EST 的电子延伸	289
第五节	cDNA 序列的蛋白阅读框架分析(ORF)、染色体定位,及其在机体各组织中的	289

表达预测.....	294
第六节 PCR 引物或序列寡核苷酸探针的在线设计	300
第七节 蛋白质分析.....	302
附录	306
一、分子生物学实验常用仪器设备.....	306
二、常用生物学数据.....	307
三、常用载体.....	310
四、分子克隆常用酶.....	311
五、常用储存液的配制.....	315
六、常用液体培养基.....	316
七、常用缓冲液.....	317
八、常用酸碱溶液的浓度与分子量.....	317
九、不同浓度酸碱液的 pH 值.....	317
十、核酸的纯化(用酚/氯仿抽提)	318
十一、核酸浓缩.....	318
十二、分光光度法测定 DNA 及 RNA 含量	319
十三、Sephadex 的水化	319
十四、放射性度量单位和数据.....	319
十五、科学单位.....	319
十六、离心速度和离心力换算.....	320
十七、分子生物学名词术语英汉对照.....	320

第一章

绪论

中医药学杂志 (一)

分子生物学技术已成为当代中医药研究与发展领域的领先技术,并得到广泛的应用。中医药专业的医、教、研工作者,尤其是研究生,对学习和运用分子生物学技术的热情十分高涨,其中研究生已成为中医药行业采用该技术的生力军和主要力量。然而,与国内外西医学界相比,分子生物学技术在中医药研发中的应用还存在着很大的差距,概括起来,主要表现在以下三个方面:

1. 知识普及不够 一些中医学者、研究生以及其他领域关注中医的学者和人士对分子生物学技术和(或)中医学了解不多,对该技术在中医药研发中是否能够用、为何用、如何用、对中医学术的继承和发展有什么帮助等知之甚少,存在许多困惑,以致在研发中对是否采用该技术犹豫不决,甚至形成学术阻力。
2. 研发投入不足 总体上,中医学、中医基础学科的实验研究投入少,研究经费不富裕,人力投入不够,研究效率低、积累薄、成果少;伴随的是一些实验室的仪器设备配置不合理、不配套、使用率低,以及研究经验少等,限制了当代中医学对新的生命现象和生命调控机制的探索与发现,阻碍了中医学术的发展。
3. 技术使用不当 由于以上原因,中医实验研究所采用的技术总体上还比较落后,研究深度和广度不够,大多停留在观察个别已知基因转录和蛋白表达多寡的层面上,未能深入探索基因的转录与翻译的调控,以及罕见和未知基因的功能;或一味追求一些技术新、价格昂贵的设备和方法,与原有实验积累不相衔接,检测数据不能有效地消化,造成浪费。

总之,分子生物学技术在中医药研发中能否用、为何用、如何用的问题还没有得到根本的解决。因此,加大普及该技术的力度,尤其是介绍中医药研究与发展中的运用是当务之急。下面以中医药防治恶性肿瘤机制方面开展的研究为例,介绍分子生物学技术在中医药研究中的应用。

一、分子生物学技术在中医药研究中的实例

在我国,原发性肝癌(以下简称肝癌)的发病率高、病死率高,是重大疾病之一。肝癌起病隐匿,恶性程度高,发展变化快,患者就诊时往往已进入中晚期,失去了手术条件,而化疗或酒精介入、物理和生物治疗等未获得确切的疗效。中医药在防治肝癌方面发挥着重要的作用,已成为我国肝癌防治的重要力量;肝癌患者大多主动寻求中医药或中西医结合治疗,对中医药防治有着广泛的需求。临床观察表明,中医药防治肝癌的突出表现为副作用小,并在改善症状和延长生存期方面具有独特的优势。那么,中医药防治肝癌的作用机制是什么,如何发展和提高其疗效?这是中医界乃至国际医学界十分关注的问题,为此某项目组对中医药防治肝癌及其作用机制开展了长期的研究。

中医药丰富的临床经验积累,是中医学宝贵的财富,为实验研究提供了丰富的素材。中医对肝癌发病机制是如何认识的,临床上是如何辨证分型的?哪些治法和中药使用得最为普遍?这些构成了实验研究设计的重要线索与依据。鉴此,该项目组首先对我国中医药防治原发性肝癌的现状进行了调研和跟踪分析,结果表明:中医临床肝癌辨证分型虽不规范,但是“毒”、“虚”、“瘀”三个病机的认识比较一致、集中。与此相应的,用药也表现出一定的规律。通过处方用药频率统计,对应“毒”的以半枝莲、白花蛇舌草等清热解毒药居多,对应“虚”的以黄芪、白术等益气健脾药居多,对应“瘀”的以丹参、赤芍、八月札等行气活血药的出现频率最高。据此,归纳出抑癌扶正行气活血方,以及三个不同亚治法的拆方,分别为清热解毒方、活血化瘀方、健脾益气方,代表了目前国内治疗原发性肝癌的中医治法的主流。后续的药效学和作用机制等实验研究主要围绕这些方面展开,并从中医药防治肝癌大鼠和小鼠两个方向切入。

(一) 中医药防治肝癌大鼠的研究

中药防治肝癌的代表性处方是否有效?有效的程度如何?不同拆方与全方的疗效异同如何?为此该项目组开展了以下研究:

1. 中医不同治法防治大鼠肝癌的药效学研究 采用二乙基亚硝胺(DEN)诱发大鼠肝癌,观察抑癌扶正行气活血(全方)及其清热解毒、活血化瘀、健脾益气等拆方对肝癌大鼠的治疗作用,发现与模型组和西药(喃氟啉)对照组相比,这些治法均能不同程度地延长 DEN 肝癌大鼠的生存期,不同治法对肝癌组织病理、生存期延长等方面表现不尽相同,综合评价,全方较好。

2. RT-PCR 为主要技术的中医不同治法对 ras 信号通路多基因表达差异的研究 20 世纪 90 年代,肝癌的一些异常表达的基因业已明确,如 ras 基因家族在肝癌细胞中高表达。不同中医治法对此是否具有调控作用?作为对疗效评价指标和作用机制探索的尝试,该项目组引入了分子生物学技术,采用 RNA 印迹杂交(Northern blot)和 RT-PCR 等检测大鼠肝癌细胞(含癌周肝组织)的若干癌基因和抑癌基因的表达,发现不同治法对 N-ras、p53 等已知癌基因或抑癌基因具有一定的调节作用,其中清热解毒法对 N-ras 下调作用最强。这些结果与临床报道近似,初步验证了中医常用处方及其配伍的疗效,揭示出其部分作用机制及其异同,为后续研究奠定了基础。

随着国内外研究的发展,肿瘤细胞内一些信号传导通路逐渐明确,如 ras 信号传导通路。既然中医不同治法对大鼠肝癌组织 ras 的表达具有一定的调控作用,那么对 ras 信号通路上各节点的基因表达是否也具有调节作用呢?

该项目组采用 RT-PCR 为主要技术,发现不同中医治法对 ras 基因介导的信号传导通路上多个基因的转录也存在调控和差异,似乎有一定的选择性。该研究涉及的基因数量增加,由点及面印证了中药不同治法多途径、多靶点的特点。

3. 差异展示 PCR 为主的中医不同治法对肝癌大鼠多基因表达差异的研究 不同中医治法具有如此广泛的基因调整作用,那么中医不同治法防治肝癌是否还通过目前医学界尚不了解的一些途径、基因调控在发挥其治疗作用呢?如何寻找这些基因呢?1992 年 Science 发表 DD-PCR 技术,1993 年该技术得到完善,为不同组织广泛差异表达基因的检测提供了方法。

1997 年,在开展全方及其不同拆方对 DEN 肝癌大鼠的药效学研究的同时,该项目组引入该技术检测了大鼠正常肝组织与模型组肝癌组织中呈差异转录的 cDNA 片段,并采用 Northern blot 验证了这些 cDNA 片段在各组中转录的差异,最后将部分呈差异转录的阳性 cDNA 片段进行克隆与测序。该实验还同步采用免疫组化方法检测大鼠肝癌组织中甲胎蛋白(AFP)的表达。研究发现:

(1) 全方和拆方均能不同程度地改善肝癌大鼠的一般情况,提高大鼠的生存率,与早先观察到的结果一致。

(2) 全方和拆方均能不同程度地抑制肿瘤的生长和肝脏 AFP 的合成,其中以全方组与清热组

为优,而健脾组相对较弱。

(3) 通过两次重复的 DD-PCR,从正常肝组织与模型组肝癌组织中筛选出 32 个差异表达的 cDNA 片段;采用 Northern blot 鉴定出 9 个呈显著差异转录的 cDNA 片段,分别命名为:DD4、DD9、DD11、DD25、DD22、DD23、DD26、DD29、DD31。

(4) 通过基因克隆、测序,经互联网与 GenBank 比较发现,其中有 5 个为已知基因,4 个为新基因;但这 9 个基因在肝癌发生与发展中的作用未见报道。

(5) 全方及其拆方对以上基因的转录水平有不同程度的调节作用,其中 DD29 下调 57%~78%,DD11、DD25 也分别下调至 60%和 78%,使基因转录水平接近正常肝组织。

(6) 通过比较全方和拆方对上述 9 个基因片段转录水平的调节作用,结合大鼠的生存率和肝脏病理、AFP 检测,可以做出如下推测:①DD4、DD25、DD31 基因可能与瘀热搏结证有关,清热解毒治法下调的作用最为突出。②DD9 基因可能与脾气虚弱证有关,健脾益气治法下调的作用最为明显。③DD22、DD23 基因可能与瘀血阻滞有关,活血化瘀治法下调的作用最强。④DD11、DD29 以全方作用最为明显,可能与复合证所启动和表达的基因有关。⑤西药对照药喃氟啶对 DD23、DD26 基因改变作用最显著。

现已证明:肿瘤的发生和发展是多基因、多因素参与的复杂过程。癌细胞的发生和发展通过自分泌和旁分泌的许多细胞因子经由密如网布的不同信号传递系统发挥作用;某一基因的转录与否或多寡,往往受到多种不同浓度的蛋白的综合调控,调控机制十分复杂而微妙,癌基因与抑癌基因的表达也不例外。因此,仅仅观察现今已知的癌基因或抑癌基因已不能满足进一步深入认识肿瘤形成机制的要求。在中药复方及其拆方的研究中,不同中药还调整了哪些基因?是否存在一些基因可以用作评价疗效的指标、检测预后的工具基因?不同治法是直接调节这些基因,还是间接调节的?此外,肝癌是如何发生的?从反复的炎症,发展到组织增生,再发展到肝癌,中间有哪些基因、基因群、信号通路参与,存在什么关系?这些涉及早期治疗及评价疗效的指标选择、肝癌发生机制和预防方案制定,以及如何发挥中药防治肝癌的优势。

4. 基因芯片技术为主的中医不同治法对肝癌大鼠多基因表达差异的研究 2003 年,该项目组与美国科罗拉多大学医学院合作,利用当时最先进的基因芯片 Affymetrix Rat 230A GeneChip(每张芯片含有 15 710 个基因)检测 DEN 诱导大鼠肝癌的不同阶段,以及不同治法干预后大鼠肝(或含肝癌组织)基因表达的差异。研究发现:

(1) 大鼠肝癌表达大于正常肝脏(大于 2 倍,下同)的基因达 2796 个;正常肝脏表达大于肝癌的基因计 276 个。

(2) DEN 诱癌至 4 周表达大于正常的基因为 1927 个,表达大于正常组,以及前 8、16 周和肿瘤的基因计 827 个;4 周表达小于正常组(小于 1/2,下同)的基因计 363 个。诱癌至 8 周为 1674 个,表达大于正常组,以及前 4、16 周和肿瘤的基因计 335 个。诱癌至 16 周为 2311 个,表达大于正常,以及前 4、8 周和肿瘤的基因计 991 个。

(3) 经中药全方治疗后,基因表达小于肿瘤(下调 1/3 及以上,下同)者 582 个,表达小于其余中、西药对照组基因计 342 个;清热解毒法下调 291 个,表达小于其余中、西药对照组的基因计 140 个;行气活血法下调 377 个,表达小于其余中、西药对照组的基因计 186 个;健脾益气法下调 892 个,表达小于其余中、西药对照组的基因计 689 个;西药对照组下调 639 个,表达小于其余各中药对照组的基因计 476 个。

(4) 由此可以推论:①DEN 诱导肝癌发生和形成过程中基因表达的改变是大量的,推测其中部分基因是举足轻重的、重要的(有待进一步筛选),以往学术界仅仅关注若干基因的研究,有可能忽略了一些重要的基因。因此,在今后的研究中,扩大研究的范围是必须的。②在肝癌逐渐形成的不同阶段可望寻找到不同有效的治疗方法。在肝癌诱导的不同阶段,那些改变明显的基因中必

然有一些是肿瘤的直接诱导基因。如果肝脏的损伤停止,有哪些基因可望自然恢复,哪些是不可逆的,必须依赖药物的调整的?而且,肝癌诱发的不同阶段,似应该采用不同的治疗方案给予干预,以获得最佳疗效,并期望制止肝癌的发生。这将是一项十分重要的基础工作。对于肝癌的预防具有重要的现实意义。③不同中医治法、西药对基因的调控有一定选择性,甚至可能是目标基因群,调控推测是多层次、多基因的;其中有些是积极的;不同的拆方和组方,可能会产生出不同的调节效应。这提示中药不同治法的筛选和优化有很大的空间,检测和筛选其靶基因和基因群,有助于应用于中药复方、中药、中药有效成分的筛选,为提高中医药治疗肝癌的疗效提供更多的方法,研究空间很大。④发展疗效更为显著的中医治法具有广阔的前景。以往的研究一再发现,不同中医治法治疗肝癌具有一定的疗效,但总体上作用弱、疗效不稳定,基因下调的幅度大多不大,这可能是有效成分剂量不足造成的;而且,大多肝癌高表达基因,不同中西医治法尚无调节作用。因而筛选、分离、改造、修饰中药有效成分,包括有效成分的配伍与组合,可望提高疗效。⑤寻找与辨证论治有关的基因调整是今后研究的重点之一。中医学讲究“同病异治”、“异病同治”的辨证论治,因此中医疗法在很多情况下不是单纯针对疾病或病灶局部的。这样的分子途径有哪些?在不同治法所选择性调节的基因中间,有哪些是针对“虚”、“毒”、“瘀”的?这些代表不同证候病机的基因、基因群与肝癌的形成和发展可能有着紧密的关系,构成复杂和多层次的网络。

(5) 国内外肝癌的基础研究十分薄弱:该项目组将肝癌组织与正常肝组织所测的芯片读数数值比较,求出比值,按比值由高到低排序,剔除比值小于5倍的,以及肝癌组织表达值读数低(在50以下)的基因,共得到509个基因,其中325个基因是表达序列标签(EST,未知基因)片段,占64%;有184个为已知基因,占36%。采用PubMed和国内生物医学数据库,将基因名称加Liver cancer、cancer或Liver进行检索,在20年内的国外文献中,以上184个基因中,有16个基因在国内外文献报道较少或无报道;有100个基因与肿瘤有关,其中以往仅有36个基因研究与肝癌有关,4个基因与肝脏有关,64个基因与肿瘤、肝脏均无关。这一结果提示:

1) 以上大多已知基因,其生理功能和病理意义不是从肝癌的研究中获得的,在肝癌中的生理和病理意义不明确。

2) 大量表达显著改变的EST片段可能具有重要的病理意义,以往国内外研究投入不多,值得研究。

3) 这些基因表达的改变,在肝癌发生与发展中的作用是什么?之间是否存在复杂的联系或关系?

4) 不同中医治法对这些基因、EST片段似乎具有选择性调节作用(有待重复验证和探索),这样的调节是积极的,还是消极的?

5) 在这种十分复杂的基因表达紊乱中,是不是存在一些主要的基因、基因群,存在主要的可以被治疗调整,并实现治疗作用的基因、基因群?

5. 基于大鼠芯片检测结果的理论研究 对于大多研究人员来说,所了解的基因往往是有限的,对芯片中大量的基因是陌生的,需要逐一认识,尤其是表达量大、组间差异显著的基因往往成为研究关注的重点;许多已知基因的发现、功能研究不是在某目标组织中展开的,因此其在某特殊目标组织中的作用是不明确的,需要借鉴、分析、研究;基因间还存在着相互关系,调控与被调控、基因的相互作用等等。而计算机数据处理和挖掘技术难以回答以上问题,因此,该项目组开展了大量的文献检索和理论研究。

6. 基于大鼠芯片结果的EST完整表达基因序列的筛选 在DEN诱导大鼠肝癌后,以及健脾、活血、清热和全方等治法干预后,肝脏表达改变显著的基因大多是EST片段。欲检测这些基因的功能,首先要获得其完整表达序列。为此,该项目组综合采用多种分子生物学技术开展了研究:

①建立了DEN诱导大鼠肝癌组织,以及正常大鼠肝脏组织的高质量(指排除大量的小片段的)

cDNA库。②采用迅速扩增 cDNA 末端的 PCR 技术(RACE-PCR)技术,筛选到大鼠肝癌和肝组织高表达 DD31 基因的完整表达序列。③采用了经典的 cDNA 杂交筛选技术,筛选到编号为 G9 基因完整表达序列。④利用计算机网络生物信息资源,采用 EST 片段的电子延伸技术,延伸了大量的 EST 片段,并综合采用 RT-PCR、RACE-PCR、Touch down-PCR 等技术,筛选出 27 个基因的完整表达序列。

以上共计 29 个基因实现了 GenBank 的登录,并根据 GenBank 的有关信息,对基因的染色体定位、蛋白阅读框架进行了初步分析,发现其中大多基因与人类已知基因序列近似,部分基因这些年开始有了功能检测的报道,且多与细胞的生长增殖有关。

7. 基于大鼠芯片结果的基因功能检测 以上 29 个基因以及其他一些肝癌高表达基因在肝癌细胞增殖中的作用如何? 该项目组把这些基因与人类基因比较,取其中序列类似者,采用人肝癌细胞株(希望这样的研究更贴近人类肝癌实际)、RNA 干扰(RNAi)技术,观察这些基因表达沉默后,肝癌细胞增殖的改变。RNAi 技术涉及利用互联网有关生物医学数据库 RNAi 位点和序列设计、哺乳类细胞表达载体的基因重组和利用、目的基因细胞转染技术等。初步的研究发现,部分基因表达沉默后,细胞的增殖得到抑制,提示这些基因有助于细胞的增殖;而另一些基因表达沉默后,细胞的增殖得到增强,提示这些基因有助于抑制细胞的增殖;其余大多基因没有显著的作用。

(二) 中医药防治荷瘤小鼠的研究

1. 中药复方对 H22 荷瘤小鼠药效学的早期研究 鉴于 DEN 肝癌大鼠实验周期长,为提高研究效率,以及鉴于国内外肿瘤防治的研究多采用荷瘤小鼠,该项目组同步开展了荷瘤小鼠的药效学研究。采用腋下接种 H22 腹水瘤 C57 小鼠的研究发现:中药复方或对照西药(5FU)均具有一定的抑瘤作用,但没有显著延长荷瘤小鼠带瘤生存期;用药后,荷瘤小鼠死亡有集中的趋势。提示所采用的中、西医治疗方案,对于部分荷瘤小鼠有益,有望延长其带瘤生存期,而部分无益,甚至有害。由此引发了一系列学术问题:①荷瘤小鼠有没有证候,其不同预后是否与证候有关,能不能辨证?②荷瘤小鼠能不能开展个体化的辨证论治,辨证论治对于疾病的疗效如何,对于证候的疗效如何,是否有助于提高疗效?③荷瘤小鼠不同证候的内在物质基础是什么?

2. 荷瘤小鼠证候自发形成及其演变规律的发现 通过长期研究,该项目组创建了小鼠四诊与辨证的系列方法和标准,以及小鼠常见证候计量化辨证方法。采用以上方法,发现:①接种肿瘤细胞后,荷瘤小鼠早期出瘤后肿瘤增长速度差异大,部分小鼠肿瘤增长迅速,部分缓慢。其中增长迅速者,邪毒壅盛(辨证为邪毒壅盛证),预后差($P < 0.01$),据此可判断预后。而气虚、阳虚、阴虚等其他证候或体质与荷瘤小鼠的预后关系不大。②早期邪毒壅盛小鼠死亡时,肿瘤仅 2~3g,而存活至中晚期荷瘤小鼠,肿瘤多在 20~30g 之间;提示邪毒壅盛证荷瘤小鼠死亡早,难以全部归咎于肿瘤体积及其压迫,必然还存在其他因素。③随着疾病的发展,气虚、阳虚、阴虚等虚证发生率和程度逐渐增加,其中气虚发生率和程度最严重,其次是阳虚,阴虚发生率偏低。随着病情的发展,荷瘤小鼠无证可辨和单证的数量下降,复合证组合的小鼠比例显著增加。在所有荷瘤小鼠中,肿瘤发生的早期,以邪毒壅盛证和气虚证小鼠比较集中,中期以阳虚和气虚兼证(简称阳气虚证)较多,中晚期以气虚、阳虚、阴虚兼证(简称气阴阳虚证)小鼠居多。

3. 荷瘤小鼠不同证候内在物质基础的揭示 以往的研究表明,虚证与神经-内分泌-免疫网络有关。因此,该项目组采用先进的 Affymetrix GeneChip Mouse Exon 1.0 ST Array 等技术,检测了早期的邪毒壅盛证、气虚证,中期的阳气虚证和中晚期的气阴阳虚证等最为集中的 4 个证候的 H22 荷瘤小鼠下丘脑、垂体、肾上腺、甲状腺、睾丸、胸腺、脾脏、肿瘤等 8 个组织基因表达与剪接的差异。将每个证候 16 个小鼠以上不同组织的 RNA 样本合并,以正常小鼠为对照。共检测 39 张芯片,初步的结果表明:

(1) 荷瘤小鼠肿瘤发生的早期,下丘脑、垂体、肾上腺 RNA 转录模式发生显著改变,突出表现为 RNA 的 18s 和 28s 含量及其比值出现改变:下丘脑 28sRNA 迅速抬升并持续,气虚强于邪毒壅盛证;垂体却相反,28s 陡降,邪毒壅盛证尤甚;肾上腺 RNA 电泳图谱特征类似于垂体。

(2) 荷瘤小鼠不同证候不同组织的基因表达存在显著差异。与正常对照小鼠相比,在芯片的 16 661 个核心基因中,4 个不同证候荷瘤小鼠下丘脑有 1286 个基因表达存在差异(上调 2 倍或下调 1/2 倍及以上,下同)、垂体有 510 个、肾上腺有 445 个、性腺有 852 个、脾脏有 1023 个、胸腺有 1298 个;与邪毒壅盛证相比,其余 3 个证候荷瘤小鼠肿瘤计有 3713 个基因表达存在差异。

(3) 荷瘤小鼠不同证候不同组织的基因外显子剪接存在显著的差异。与正常对照小鼠相比,4 个不同证候荷瘤小鼠下丘脑有 7109 个外显子探针组剪接存在差异;垂体有 12 006 个;肾上腺有 9861 个;性腺有 2355 个;胸腺有 5393 个;脾脏有 5539 个;与邪毒壅盛证相比,其余 3 个证候荷瘤小鼠肿瘤有 8863 个外显子剪接出现差异。

(4) 初步的研究发现,不同证候荷瘤小鼠,神经-内分泌-免疫组织中基因表达存在显著的差异,例如:①与正常小鼠相比,邪毒壅盛证和气虚证垂体表达上调的基因有 5 个,其中邪毒壅盛证 *Alas2*、*Sgk*、*Cbln3* 表达高,十分突出,可能与该证候形成有关;邪毒壅盛证和气虚证垂体有 13 个基因表达几乎关闭!其中 *Abpg*、*Pip* 以及 *Car6*、*Klk1b22*、*Klk1b3*、*Klk1b9*、*Muc10*、*Ren1*、*Hspala*、*Wfdc12* 等在正常对照小鼠垂体表达量大,可能是垂体具有重要生理功能的基因,其关闭可能与肿瘤早期荷瘤小鼠处于应激状态有关,并导致其预后差。②正常小鼠肾上腺高表达的基因主要参与代谢和基因表达的调控,部分参与化学合成、加工修饰,以及运输和信号转导。肿瘤发生后,气虚证荷瘤小鼠这些基因大多表达量大多低于正常小鼠和同期的邪毒壅盛证小鼠,反映出气虚证候的物质基础。③正常小鼠睾丸高表达的基因多与激素合成、精子生成与功能有关。荷瘤小鼠肿瘤发生的早期,这些基因普遍出现下调,而且在总体上,邪毒壅盛证下调幅度大于同期的气虚证,提示邪毒壅盛证的睾丸功能抑制更显著。④在肿瘤中,邪毒壅盛证独特性高表达的基因 32 个,其中包括 *Tcte3*、*Phf7*、*Ldhc* 等参与睾丸发育、精子或卵子发生的基因 22 个,*Adipoq*、*Nrcam*、*Tnfrsf6* 等与肿瘤有关的基因 4 个以及 *Atp8b3*、*Pnpla3*、*Retn* 等其他功能的基因 6 个;低表达的基因仅 2 个。而同期气虚证肿瘤独特性高表达的基因仅 9 个,其中包括 *H2-Eb2*、*H2-K1*、*H2-Ea* 和 *Sla* 等 4 个 T 细胞和 B 细胞抗原受体有关的基因和 *P2ry1*、*Cobral*、*Sprr1a* 等 5 个其他功能类的基因;独特性下调的基因有 19 个,包括 *MMP8/9/10* 等 3 个 MMPs 家族基因,*S100a8*、*S100a9* 等 2 个 *S100* 家族基因,*Lcn2*、*Clec4d*、*Clec4e* 等 5 个细胞因子和黏附分子类基因,以及 *Slc6a9*、*4930402E16Rik*、*Ddit4* 等其他功能类的基因 9 个。提示荷瘤小鼠早期邪毒壅盛证和气虚证肿瘤组织中存在与证候相关的基因表达改变。

初步研究表明,不同证候荷瘤小鼠在下丘脑、垂体、肾上腺、甲状腺、睾丸、胸腺、脾脏、肿瘤等层面确有其复杂的物质基础,证候是客观存在的。

从上述实例可以看出,中医药的研究若不采用分子生物学技术,则难以观察到如此丰富的生命调控现象和证候复杂的物质基础。而采用了先进的分子生物学技术,可以使我们从早期的药效学验证研究,逐渐过渡到探索中药复方药效学机制,探索新的生命现象及其调控机制。

二、分子生物学技术在中医药研究中的现状

自 20 世纪 50 年代以来,中医学开展了大量的临床与实验研究,广泛验证了中医各学科的理论与方法。在此基础上,到了 80 年代后期,随着国际生物医学的发展和学术交流的频繁,中医学开始了中医基础理论、中医药疗效作用机制探索,以及中药标准化、中药新药等研发,其间广泛采用了分子生物学技术。