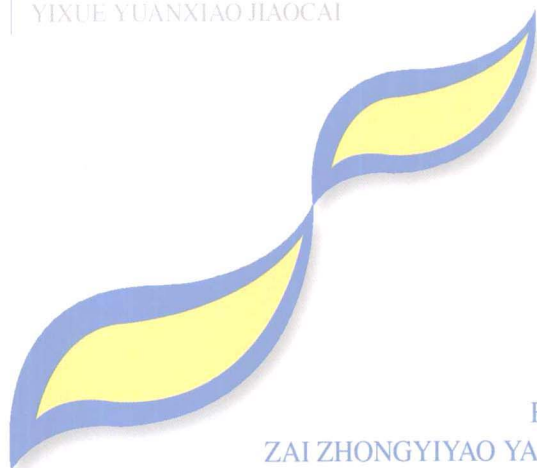




普通高等教育“十一五”国家级规划教材
全国高等医学院校教材

PUTONG GAODENG JIAOYU SHIYIWU
GUOJIAJI GUIHUA JIAOCAI
QUANGUO GAODENG
YIXUE YUANXIAO JIAOCAI



FENZI SHENGWUXUE JISHU
ZAI ZHONGYIYAO YANJIUZHONG DE YINGYONG

分子生物学技术 在中医药研究中的应用

(第二版)

主 编 • 方肇勤

副主编 • 赵 刚 华 茜 才丽平 周坤福

上海科学技术出版社



中国中医药出版社
CHINA JOURNAL OF CHINESE MEDICINE
100005 北京 东直门内大街98号

中国中医药出版社
CHINA JOURNAL OF CHINESE MEDICINE
100005 北京 东直门内大街98号



中国中医药出版社

CHINA JOURNAL OF CHINESE MEDICINE

分子生物学技术 在中医药研究中的应用

主编

王 健 教授

北京中医药大学 北京 100029

中国中医药出版社

普通高等教育“十一五”国家级规划教材

分子生物学技术 在中医药研究中的应用

(第二版)

主 编
副主编

方肇勤
赵 刚
华 茜
才丽平
周坤福

上海科学技术出版社

图书在版编目 (C I P) 数据

分子生物学技术在中医药研究中的应用 / 方肇勤主编.
2 版. — 上海: 上海科学技术出版社, 2008.9
普通高等教育“十一五”国家级规划教材
ISBN 978-7-5323-9280-3/R·2487

I. 分… II. 方… III. 分子生物学-应用-中国医药学-
高等学校-教材 IV. R2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 104606 号

上海世纪出版股份有限公司 出版、发行
上海科学技术出版社
(上海钦州南路 71 号 邮政编码 200235)
新华书店上海发行所经销
常熟市华顺印刷有限公司印刷
开本 787×1092 1/16 印张 21.5
字数: 495 千字
2008 年 9 月第 2 版 2008 年 9 月第 2 次印刷
定价: 40.00 元

本书如有缺页、错装或损坏等严重质量问题,
请向工厂联系调换

《生物学技术在中医药研究中的应用》(第二版)编委会名单



主 编

副主编

协 编

编 委

方肇勤(上海中医药大学)

赵 刚(湖北中医学院)

华 茜(北京中医药大学)

才丽平(辽宁中医药大学)

周坤福(南京中医药大学)

管冬元(上海中医药大学)

(以姓氏笔画为序)

王 威(天津中医药大学)

司富春(河南中医学院)

李丽帆(广西中医学院)

杨秀芬(广西中医学院)

张 丹(山东中医药大学)

张 红(陕西中医学院)

张 前(北京中医药大学)

张寿文(江西中医学院)

周 联(广州中医药大学)

梁 超(上海中医药大学)

董 燕(广州中医药大学)

编写说明

分子生物学实验技术的发展日新月异。目前,在中医药的研究中已愈来愈广泛地采用了分子生物学技术。然而相对而言,分子生物学技术在中医药研究中的应用还存在很大的不足,突出表现为知识普及不够、研究投入不足和技术使用不当。该技术在中医药研究中能否用、为何用、如何用的问题还没有得到根本的解决。

为此,1996年我们编写了《分子生物学常用技术与方法》,对上海中医药大学中医基础专业本科生和各中医专业博士、硕士研究生开课。开课以来学生反响热烈,尤其是研究生,修课积极踊跃,人数一再超出课程所规定的学生限额,充分表明该方法和技术在新一代中医人中引起了重视。在此基础上,2002年我们编写并正式出版了《分子生物学技术在中医药研究中的应用》教材,根据我们多年来运用分子生物学技术的经验,从中医药研究实际出发,深入浅出地介绍该领域常用技术及其在中医药研究中的应用,着重解决中医药研究如何用、怎样用的问题,增加了实验技术的内容。该教材编写突出了三个方面的特点:一是实用。书中所介绍的实验技术均为作者使用过的技术,并参考一些国内外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,同时详细介绍了实验的准备和实施,使读者可以方便地选用。二是先进。该书介绍了当时最新发展的 cDNA Array、DD-PCR、报道基因等技术。三是突出中医特色。详细介绍各分子生物学常用技术与方法在中医学中应用,并附以实例,便于中医药研究的学习和使用。教材出版以来,成为中医药界一些实验研究人员手边常用的工具书和教学参考书。同时《分子生物学技术在中医药研究中的应用》作为实验中医学系列课程之一,还获得了国家精品课程的荣誉。

鉴于近年来分子生物学技术又有了长足的发展,而中医药研究工作对该技术的需求日益增加,我们对第一版《分子生物学技术在中医药研究中的应用》进行了修订、调整与充实。新增加了哺乳类动物细胞的培养、植物细胞悬浮培养技术、植物基因组 DNA 的提取、基因组文库的建立与筛选、动植物药材的 ISSR 指纹图谱技术、中药 RAPD 指纹图谱技术、ABI 荧光实时定量 PCR、基因芯片、哺乳类动物组织蛋白质的提取、植物组织蛋白质的提取、RNAi、Small RNA 的提取与分析、基因敲除技术、凝胶阻滞分析、植物细胞的基因转化、分子生物学常用网络资源及利用等内容。

分子生物学技术的发展十分迅速,迄今已积累了大量不同的方法和技术,单就某一技术,往往还分化出许多不同的方法和技术,而且还在不断的发展和分化,出版了大量的专著、论文、相关

企业和公司的产品目录,以及丰富的网络资源,其间包含了大量的先进分子生物学方法、技术和理论。面对如此庞大的信息,本书是难以概括的。因此,我们删繁就简,择其精要,希望对读者有所帮助。挂一漏万,以及叙述不妥的地方在所难免,我们殷切地期待同道的批评与指正。

方肇勤

2008年5月于上海

目 录

第一章	绪论	1
第一节	分子生物学技术在中医药研究中的实例	2
第二节	分子生物学技术在中医药研究中的现状	6
第三节	中医药研究中经常使用的分子生物学技术	12
第四节	分子生物学技术在中医药研究中的展望	18
第二章	分子生物学常用基本技术	23
实验 1	重组质粒	23
实验 2	质粒转化大肠杆菌	26
实验 3	阳性单菌落扩增与小量 DNA 制备	31
实验 4	酶切重组质粒,电泳分离所插入的 DNA	33
实验 5	从凝胶中回收 DNA	36
实验 6	大量质粒 DNA 制备	39
实验 7	哺乳类动物细胞的培养	41
实验 8	植物细胞悬浮培养技术	48
第三章	DNA 的研究方法	53
实验 9	哺乳类动物基因组 DNA 的提取	53
实验 10	植物基因组 DNA 的提取	58
实验 11	基因组文库的建立与筛选	61
实验 12	Southern blot	73
实验 13	PCR	78
实验 14	DNA 双脱氧链终止法测序	83
实验 15	动、植物药材的 ISSR 指纹图谱技术	92
实验 16	中药 RAPD 指纹图谱技术	96
第四章	RNA 的研究方法	99
实验 17	总 RNA 提取	100
实验 18	mRNA 的分离	103
实验 19	Northern blot	105

实验 20	RT-PCR	110
实验 21	ABI 荧光实时定量 PCR	113
实验 22	原位杂交	118
实验 23	基因芯片	122
实验 24	cDNA Array	132
实验 25	DD-PCR	136
实验 26	cDNA 库建立	141
实验 27	基因全序列 cDNA 库筛选	152
实验 28	RACE-PCR	157

第五章 蛋白质的研究方法 161

实验 29	哺乳类动物组织蛋白质的提取	162
实验 30	植物组织蛋白质的提取	165
实验 31	Western blot	167
实验 32	ELISA	178
实验 33	免疫组织化学	182
实验 34	单克隆抗体制备技术	188
实验 35	蛋白质双向电泳	196

第六章 基因功能与表达调控的研究方法 212

实验 36	RNAi	213
实验 37	Small RNA 的提取与分析	225
实验 38	报道基因与基因调控元件的检测	231
实验 39	点突变 PCR	236
实验 40	基因敲除技术	240
实验 41	Footprint	245
实验 42	凝胶阻滞分析	252
实验 43	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 266

第一节	美国国家生物技术信息中心	266
第二节	GenBank 数据库查询与搜索	273
第三节	BLAST	279
第四节	EST 的电子延伸	288
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表达预测	293
第六节	PCR 引物或序列寡核苷酸探针的在线设计	299
第七节	蛋白质分析	301

附录	306
附一 分子生物学实验常用仪器设备	306
附二 常用生物学数据	307
附三 常用载体	311
附四 分子克隆常用酶	312
附五 常用储存液的配制	318
附六 常用液体培养基	319
附七 常用缓冲液	320
附八 常用酸碱溶液的浓度与分子量	320
附九 不同浓度酸碱液的 pH	321
附十 核酸的纯化(用酚-氯仿抽提)	322
附十一 核酸浓缩	322
附十二 分光光度法测定 DNA 及 RNA 含量	323
附十三 Sephadex 的水化	323
附十四 放射性度量单位和数据	324
附十五 科学单位	324
附十六 离心速度和离心力换算	326
附十七 分子生物学术语英汉对照	326

第一章

绪 论

在当代中医药研究与发展中,分子生物学技术得到了广泛应用,这与 20 世纪后期有了显著的不同。当时,分子生物学技术及其相关信息远没有像今天这样丰富和发达,中医界对此还很陌生,国内外大多西医及其基础学科也没有普遍地应用。现在不同了,分子生物学技术已成为中医药研究的领先技术,中医药专业的医务人员、研究生、本科生对学习该技术的热情空前高涨。然而,与国内外西医界相比,分子生物学技术在中医药研究中的应用还存在很大的差距,概括起来,主要表现为以下 3 个方面。

(1) 知识普及不够。一些中医药学者、研究生和本科生,以及一些其他领域关心中医药的学者和人士,对分子生物学技术和中医学之间的关系不是很了解,对该技术是否能够用来研究中医,为什么要采用该技术,以及如何运用该技术,包括对中医学术的继承和发展有什么帮助等等缺少了解,有许多困惑,以致于在研究工作中选择本技术时有疑虑心理,甚至造成了一定的学术发展阻力。

(2) 研究投入不足。中医学、中医基础学科在实验研究方面投入少,如研究经费不充裕,人力投入不够,导致研究效率低、积累薄、成果少、人才培养周期长,伴随的是一些实验室仪器设备配置不合理、使用率低、缺少研究经验等。其后果是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,限制了中医学术的增长及其竞争力。

(3) 技术使用不当。由于知识普及不够和研究投入不足,中医实验研究所采用的技术总体上还比较落后,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,未能普遍深入到基因的转录与翻译调控,或罕见探及未知基因功能的检测等方面,研究深度和广度不足;或与之相反,一味跟风,不恰当地择用一些新技术方法以及价格昂贵的设备,与原有实验积累不能衔接,所获检测数据不能消化,造成资源浪费。

总之,分子生物学技术在中医药研究中能否用、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,尤其是介绍如何在中医药研究与发展中应用是当务之急。

下面以人体衰老及其相关的中医药理论和防治为例,说明分子生物学技术在中医药研究中的应用。

分子生物学技术在中 医药研究中的实例

第一节

早在 2 000 多年前的《黄帝内经》一书中,中医学对人体的衰老和防治已经积累了一定的经验,在理论上把衰老归结为五脏精气虚导致任脉虚、天癸竭,而生殖能力的丧失是其标志。此后,中医学预防和延缓衰老主要从补肾入手。经历代探索和发展,形成了丰富的理论和方法,仅中药复方的补肾治法,就有平补、温补、凉补、阴阳并补、填精等不同,另还有滋阴泻火、温肾驱寒等;即便是同一治法,用药也会有不同的选择,必须注意君臣佐使、轻重缓急。历代积累起许多延缓衰老的单方和复方,面对如此众多的方剂,临床医师或研究者该如何选择,有没有最好的?

金元后期,朱丹溪提出“阳常有余,阴常不足”的理论,主张滋阴泻火,留有著名的大补阴丸传世;在明代李时珍《本草纲目》“黄柏”(大补阴丸药物之一)条目下,有长期服用单味黄柏可延缓衰老的记载。但是,明末的张景岳却极力反对,认为阳气是人身的大宝,不应该采用寒性药物大肆克伐阳气,力主温补。这样的寒温之争此后一直存在,有人秉承丹溪学说,有人推崇景岳学说,没有定论。

当现代临床实验研究方法引入到中医临床观察以后,有人发现,同样是老年人,他们的激素和神经递质水平存在着显著差别,这些递质、激素在部分人群中可以长期维持在一个较高的水平,而其他部分人群则随着衰老明显下降,其中与寒证、热证有关的去甲肾上腺素和肾上腺素在老年人尿液中的排出量就波动很大,那些高排出者,体格、精力和行动接近青年人;而低排出者,精力和行动的衰老现象明显^[1]。这容易令人联想到长期以来的寒温之争。

20 世纪 50 年代,张伯讷创制了中药复方二仙汤,该方由淫羊藿、仙茅、巴戟天、当归、黄柏、知母等 6 味中药组成,寒温并用,在治疗围绝经期综合征方面疗效卓著。该方经实验研究发现,二仙汤及其寒、温两个拆方具有延缓大鼠、小鼠、果蝇等实验动物衰老的作用。处方配伍的研究发现,温药拆方(淫羊藿、仙茅、巴戟天、当归)对老年以及去势大鼠下丘脑-垂体-性腺(去势动物观察肾上腺)轴兴奋作用突出;而寒药拆方(黄柏、知母)对该轴的延缓衰老和保护作用突出^[2~7],部分揭示出寒、温治法的差别。联系到临床研究结果,对于那些激素和神经递质水平高、热象明显的老年人,补肾以偏重于滋阴泻火为妥;而对于那些激素和神经递质水平低、寒象明显的老年人,补肾以偏重于温肾壮阳为好。这些研究结论丰富了有关中医基础理论,及中医延缓衰老的理论和方法,对临床上延缓衰老的辨证论治具有指导意义。

以上这些研究还引申出了一系列相关的学术探讨。

一、二仙汤及其拆方作用的靶组织

分别将下丘脑、垂体、性腺有关细胞体外培养,此可以避免体内复杂的系统、组织间的调节和反馈,有利于观察中药对某个组织细胞的直接作用。研究发现:

1. 二仙汤及其拆方具有直接促进下丘脑促性腺激素释放激素(GnRH)神经元分泌 GnRH 的作用 实验采用 GT1-7 细胞(一种采用转基因技术获得,来自小鼠前脑的 GnRH 肿瘤细胞,具有表达 GnRH 的能力),以及二仙汤及其寒、温两个拆方的药物血清,发现这些药物血清均能刺激 GT1-7 细胞株 GnRH 的释放,其中以二仙汤全方效果最显著^[8]。

2. 二仙汤及其拆方具有直接促进垂体前叶细胞分泌黄体生成素(LH)和卵泡刺激素(FSH)的作用 实验采用体外原代培养的大鼠垂体前叶细胞,直接加入二仙汤全方及其拆方,以及部分提取物。发现二仙汤全方及其拆方滋阴泻火方(知母、黄柏)和调理冲任方(当归)直接加药后,能促进大鼠垂体前叶细胞 LH 和 FSH 的分泌,温肾益精方(淫羊藿、仙茅、巴戟天)也有一定的促进趋势^[9]。

3. 二仙汤及其拆方具有直接促进卵巢颗粒细胞分泌雌二醇的作用 研究采用体外原代培养的大鼠卵巢颗粒细胞,中药直接给药,发现黄柏、仙茅刺激颗粒细胞分泌雌二醇的作用大于其他药物;全方去知母后雌二醇分泌作用强于全方,提示知母对卵巢颗粒细胞雌二醇的分泌有一定的抑制作用;淫羊藿与巴戟天合煎液比分煎液合并作用更大。采用体外原代培养大鼠卵巢黄体细胞,中药直接给药的方法,发现二仙汤全方对黄体细胞分泌孕酮的作用最好,其次是温肾药,而当归和滋阴药知母、黄柏的作用不明显^[10,11]。

4. 二仙汤及其全方具有直接促进睾丸间质细胞睾酮的分泌作用 采用体外原代培养大鼠睾丸间质细胞,以及中药直接给药的方法发现,二仙汤全方对睾丸间质细胞分泌睾酮具有促进作用。有趣的是,拆方的结果表明,滋阴药知母、黄柏有抑制趋势,而温肾药淫羊藿、仙茅、巴戟天和当归的作用不明显^[11]。

以上研究结果表明,二仙汤可以分别直接作用在下丘脑、垂体和性腺,具有促进下丘脑 GnRH 神经元分泌 GnRH、促进垂体前叶细胞分泌 LH 和 FSH、促进卵巢颗粒细胞分泌雌二醇和促进卵巢黄体细胞分泌孕酮、促进睾丸间质细胞分泌睾酮等作用,是多层次、多靶点的作用。由于下丘脑 GnRH 神经元数量少,若不是采用分子生物学转基因技术获得 GT1-7 细胞系,这样的研究便无从开展。

二、二仙汤及其拆方药效的多样性

观察有关基因 mRNA 的转录水平有助于回答为何二仙汤及其拆方药效有多样性的问题。研究发现:

1. 二仙汤具有促进老年大鼠下丘脑 GnRH 基因转录与表达的作用 实验采用老年雌、雄 SD 大鼠,二仙汤水煎剂兑入自来水中自由饮用,剂量约为成人千克体重的 10 倍,自 18 月龄开始用药至 24 月龄。发现与 5 月龄雌、雄青年对照组相比,老年大鼠下丘脑 GnRH mRNA 转录与表达水平下降,GnRH 神经元的活动能力减退,加重了生殖系统的衰老;而二仙汤具有提高雌、雄老年大鼠下丘脑 GnRH mRNA 的转录水平,提高腺垂体 GnRH 的含量,提示二仙汤治疗更年期综合征取效的部分机制与该方延缓下丘脑衰老、提高其 GnRH 转录与表达水平有关^[12]。

2. 二仙汤及其拆方具有促进老年大鼠肝脏抗氧化酶活性及其基因表达水平的作用 研究采用 24 月龄雌、雄 SD 老年大鼠,二仙汤及其拆方水煎剂兑入自来水中自由饮用,剂量约为成人千克体重的 10 倍,自 18 月龄开始用药至 24 月龄。发现与 6 月龄雌、雄青年对照组相比,老年大鼠肝脏超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性及其 mRNA 表达水平减弱,过氧化脂质(LPO)含量增加;二仙汤及其拆方具有提高雌、雄老年大鼠肝脏 SOD 和 CAT 的活

性及其 mRNA 转录水平,降低 LPO 含量^[13]。

3. 二仙汤具有促进 18 月龄雌性大鼠下丘脑内源性阿片肽(EPO)基因转录与表达的作用
研究采用 18 月龄雌性 SD 老年前期大鼠,用二仙汤水煎剂灌胃 90 日(自 15 月龄开始用药至 18 月龄),剂量为成人千克体重的 10 倍。发现与 5 月龄雌性青年对照组相比,18 月龄大鼠下丘脑前阿黑皮原(POMC)基因 mRNA 转录水平下降,下丘脑和血浆 POMC 的表达产物 β 内啡肽含量减少;二仙汤具有提高雌性 18 月龄大鼠下丘脑 POMC mRNA 的转录水平,以及下丘脑、血浆 β 内啡肽的含量,提示二仙汤治疗更年期综合征取效的部分机制可能与该方延缓下丘脑衰老,提高其 POMC 转录与表达水平有关^[14]。

以上研究均采用了分子生物学技术 Northern blot,从而证明了衰老与一些目标基因表达减少有关,而二仙汤具有促进这些基因转录与翻译两个层面的作用,不仅仅是促进激素的释放。

三、二仙汤及其不同组分调整下丘脑 GnRH 基因表达机制

如果二仙汤或者其不同组分对下丘脑 GnRH 基因的表达调控的机制确切,对于那些下丘脑 GnRH 基因表达不活跃患者或围绝经期综合征患者的治疗是有帮助的,也有助于治疗方案的发展和优化,同时也会丰富人类有关生殖调控机制的认识。该研究的前提是下丘脑 GnRH 基因表达与调控机制得到明确。那么下丘脑 GnRH 基因是如何表达调控的呢?

以往的研究表明,生殖的发生和衰老与下丘脑-垂体-性腺轴的发育成熟和衰老有关。在下丘脑,位于弓状核和视前区的 GnRH 神经元表达 GnRH,并以脉冲方式通过垂体门脉循环到达垂体前叶,特异性地与垂体促性腺细胞的高亲和受体结合,调节 LH、FSH 的合成、分泌及其比值。GnRH 神经元在胚胎初始由鼻小坑经前脑向下丘脑迁徙,并逐步分化成熟。如果在胚胎发育时的迁移受到抑制,将会影响到成年后的生育能力。来源于转基因小鼠不同部位的 GnRH 肿瘤细胞系 GT1-7 和 Gn10,其 GnRH 表达量有着很大的区别,GT1-7 来源于前脑的肿瘤,已接近 GnRH 神经元迁徙的终点,可以高表达 GnRH;而 Gn10 来源于 GnRH 细胞迁徙途中的肿瘤,GnRH 表达甚微。因而这两个细胞系成为研究 GnRH 基因表达调控理想的细胞模型。

GnRH 基因的启动子有约 3 000 bp(碱基对),其间有一些区域对于该基因的表达十分重要,称之为增强子。采用足迹法(Footprint)研究发现,来源于 GT1-7 和 Gn10 两个细胞系的核蛋白在 GnRH 启动子,尤其是增强子上结合的数量,以及所结合的 DNA 序列有所差异,推测这些不同的结合蛋白可能是调节 GnRH 表达数量多寡的重要核蛋白^[15,16]。将 GnRH 启动子增强子区域的-1787/-1783 突变后,出现了 GnRH 启动子活性被抑制的现象,而且该位点被 Oct-1 核蛋白所结合,那么 Oct-1 是否参与了 GnRH 基因表达的调控呢^[17]?

采用差异展示 PCR(DD-PCR)研究发现,GT1-7 和 Gn10 两个细胞系中存在许多基因表达不同,或单独在某一细胞系中表达,或在两个细胞系中表达量明显差异;采用 cDNA Array 研究进一步证实,确有许多基因在 GT1-7 和 Gn10 两个细胞系中差异表达。在这些差异表达的基因中,有一个基因产物被称为支持相关激酶(adhesion-related kinase, Ark),仅在 Gn10 中表达。之前的研究表明 Ark 是一个跨膜蛋白,采用哺乳类细胞表达载体重组和基因转染技术研究发现,一旦使 Ark 在 GT1-7 细胞中表达增加,便会明显抑制 GnRH 基因的表达。该现象不仅观察到 Ark 新的功能,同时也提示同一基因产物在细胞中可能存在多重功能^[18]。进而的研究发现,Ark 需借助细胞外信号调节激酶通路 Rac 的活化,抑制 GnRH 基因表达^[19]。同

步的研究还涉及到那些可能参与 GnRH 神经元迁移的因子,最近的研究发现,酪氨酸激酶受体 Ark(又名 Axl)与 Gas6(growth arrest-specific gene 6)结合后,须借助 PI3K-Ras 通路,再经 Rac 和 p38 MAPK 促进 GnRH 神经元迁移^[20 21]。

以上研究进展为二仙汤及其不同组分调整下丘脑 GnRH 基因表达机制的深入研究创造了条件。同时也可以看到,GnRH 基因表达调控机制还不是很清楚,仍然有大量的探索空间。一旦二仙汤作用机制研究到这样的层次,会发现许多新的问题,没有现成答案,因而自然会要求探索下丘脑 GnRH 基因表达调控的机制,探索新的生命现象,从而使中医基础研究跻身国际生命科学的前沿。

四、其他组织、基因的表达与下丘脑-垂体-性腺轴的关系

已有研究表明,在细胞中存在复杂的基因表达调控模式以及蛋白与蛋白的相互作用关系。就下丘脑 GnRH 的表达而言,EPO 对其有影响^[14],胰岛素样生长因子-1(IGF-1)也具有调节其表达的作用,对 GnRH 神经元的生长、成熟和分化可能也有作用;到了垂体层面,IGF-1 还能促进垂体内 LH 和 FSH 分泌;再往下,IGF-1 还参与到睾丸 Leydig 细胞增殖及分化的调节,并影响支持细胞的功能及调控睾丸激素的生物合成^[22]。有趣的是,在人卵巢的颗粒细胞和黄体细胞中竟然也有 GnRH 和 GnRH 受体(GnRHR)的表达,GnRH 以自分泌(旁分泌)方式直接调节性腺类固醇激素合成、卵泡形成、黄体退化^[23]。

在性激素方面,近年的研究发现,除了卵巢、子宫、乳房和睾丸、前列腺外,骨骼、血管、中枢神经、消化道、免疫、皮肤、肾脏和肺脏等系统均是性激素的靶组织。以往的研究证实,性激素配体与不同结构的性激素受体结合,结合后的受体再覆盖到目标基因启动子的特殊结构域,调节该基因的表达;最近的研究发现,受体与性激素结合后还可以通过激活不同的调节因子,间接地发挥基因表达的调节作用。如在子宫内膜,雌二醇受体可以通过调节 Fos 和 Jun 的活性,调节基因的表达;在骨细胞中,雌二醇受体可以通过与 NF-KB 蛋白相互作用,调节有关目标基因的功能;其他的研究还观察到性激素通过 G 蛋白复合受体的作用、与膜受体的互动,以及复杂的细胞内信号通路等间接发挥基因表达的调控作用^[24]。

以上研究大量采用了细胞分子生物学技术,勾画出了与衰老相关的下丘脑、垂体、性腺不同层次基因表达调控,以及其激素的复杂作用机制。联系到中医基础理论,这些研究结果在细胞、分子水平印证了中医学的整体观、恒动观,丰富了中医基础理论有关肾精、天癸等理论。

现在,我们还需要探讨的是,二仙汤及其不同组分对下丘脑、垂体、性腺的调节作用是否是通过这些途径实现的,有没有新的未知的调节通路?引申开来,其他中药复方和中医治法的作用机制如何?是哪些有效成分及配伍所起的作用,量效关系如何,有没有最佳的组合?鉴于中药作用主要是通过其有效成分发挥,那么如何鉴定道地中药品种与提高有效成分的产量?与已知西药作用机制的异同,有没有协同作用?有没有可能联合使用以提高疗效,减少西药用量及其副作用?等等。从生理、病理的角度出发,我们还将探讨,中医藏象、气血、经络的本质,证候的本质是什么?不同体质及其与疾病、证候的关系是什么?辨证论治取效的机制是什么?等等。这些学术探讨在以往的中医药实验研究中业已部分涉及,今后的研究还将展现出绚丽的前景。

分子生物学技术在中医

第二节 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、中药新药等研究,广泛采用了分子生物学技术。

一、分子生物学技术在中医基础理论研究中的应用

1. 证本质的研究^[12~14,25~37] 藏象—病机(证候)—治则治法—中药复方治疗等密切联系,是中医基础理论的特点。因此,把脏腑相关证候造模与中药复方干预结合起来研究证候本质,成为中医基础理论研究的主要手段和方法。以肾虚证、血瘀证和同病异证为例。

(1) 肾虚证:在脏腑证候本质的研究中,肾虚证是其代表。沈自尹早先在中医临床上观察到,一些西医诊断为不同的疾病,会出现类似的肾虚证,而中医采用补肾的“异病同治”,可以取得良好的治疗效果,推测肾虚证有其共同的物质基础。那么是什么物质呢,亦即肾虚证的本质是什么呢?后续的研究发现,肾虚证与肾上腺皮质功能减退有关。此后他们采用 RT-PCR 技术发现,大鼠肾阳虚证与下丘脑室旁核促肾上腺皮质激素释放激素(CRF)的 mRNA 转录受抑有关,与健脾、活血复方比较,补肾药能够选择性地提高 CRE 表达与下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPAT)的功能。梁恒等采用蛋白双向电泳技术发现氢化可的松肾阳虚小鼠,经补阳中药治疗后,小鼠肾脏蛋白双向电泳出现大量的差异蛋白点。陈闽军等利用气相色谱质谱联用测定氢化可的松肾阳虚大鼠尿液代谢产物,发现其代谢网络明显偏离正常范围,而当喂饲以温阳补肾的中药肉苁蓉后有所改善。刘福春等通过³H-TdR 掺入细胞 DNA 的方法,发现“肾阳虚”动物骨髓细胞 DNA 合成率下降,推测中医肾主骨藏精生髓理论与促进核酸代谢有关。王米渠等观察到恐伤肾母鼠所产子鼠先天肾气亏虚,胸腺 DNA、RNA 含量及 RNA/DNA 值均有所降低。

衰老的主要特征是肾虚。如前所述,我们早先的研究发现,老年和老年前期下丘脑 GnRH、POMC,老年大鼠肝 SOD、CAT 等 mRNA 表达水平减弱,补肾坚阴的二仙汤治疗后具有一定的改善作用。吴志奎等观察到老年肾虚大鼠肝细胞 DNA 的甲基化水平下降,补肾生血中药可以提高;姚明忠等发现固真方具有促进老年大鼠肝细胞 *c-fos*、*c-jun* 的表达水平;徐桂香等发现抗衰老方能减少老年大鼠、小鼠肝 DNA 的损伤,维持其正常的结构。以上研究充分证明,肾虚证有着广泛的物质基础,其突出表现在神经-内分泌功能的减弱。

其他藏象也进行了类似的研究,例如王昕等观察到伤湿致脾阳虚证大鼠肠上皮细胞 DNA、琥珀酸脱氢酶(SDH)、总蛋白(STP)含量降低;罗和古等采用超导傅立叶变化核磁共振波谱仪检测慢性束缚雄性 SD 应激大鼠血浆代谢谱,发现醋酸、乳酸、酪氨酸、低密度脂蛋白等改变较为明显。

(2) 血瘀证:血瘀证的理论和活血化瘀治法是中医病因病机学说和治则治法学说的一个重要内容。陈可冀等应用斑点印迹杂交、原位杂交和³H-TdR 掺入细胞 DNA 等技术,证明活血化瘀类中药可抑制血管壁血小板衍化生长因子(PDGF)及血管壁原癌基因 *c-myc* mRNA 表达水平,进而抑制动脉平滑肌细胞的增生,阻止动脉粥样硬化;唐利龙等用 Northern blot 杂交技术发现川芎嗪能明显抑制原代培养血管平滑肌细胞 I、Ⅲ 胶原基因的转录,进而抑制血小板的粘附、聚集和激活,最终起到活血化瘀的作用;雷燕等以原位杂交方法观察到大鼠实验性急性心肌缺血可诱导心肌中内皮素转换酶(ECE)和一氧化氮合酶(NOS) mRNA 表达异常,益气活血药能对其进行调节;谢文光等用脂多糖(LPS)复制热毒血瘀证大鼠模型,发现经赤芍治疗后有 6 个蛋白下调。此外,马增春等采用⁶⁰Co 射线全身照射制造血虚证小鼠,发现四物汤可使血虚证小鼠血清中 12 个下调和 4 个上调的蛋白质有所恢复。

(3) 同病异证:我们长期的动物实验发现,荷瘤小鼠会自发形成证候和证候的演变与兼夹,与人类十分相似。在所有证候中,有 4 个证候比较集中,即疾病早期的邪毒壅盛证和气虚证,中期的阳气虚证和中晚期的气阴虚证。我们采用小鼠计量化四诊和辨证方法,以及先进的 RNA Nano LabChip、Affymetrix Gene Chip Mouse Exon 1.0 ST Array(含有百万个探针,可以检测 16 661 个核心基因及其大量的外显子)等技术,观察了早期邪毒壅盛、气虚,中期阳气虚和中晚期气阴虚等 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特征。初步的研究发现:①荷瘤小鼠不同证候的 8 个组织基因表达存在显著差异,与正常对照小鼠相比,4 个不同证候荷瘤小鼠其下丘脑有 1 286 个基因表达存在差异,垂体有 510 个,肾上腺 445 个,甲状腺 848 个,性腺 852 个,脾脏 1 023 个,胸腺 1 298 个;与邪毒壅盛小鼠肿瘤相比,3 个其他证候肿瘤有 3 713 个基因表达存在差异。②荷瘤小鼠不同证候 8 个组织的基因外显子剪接存在显著差异,与正常对照小鼠相比,4 个不同证候荷瘤小鼠其下丘脑有 7 109 个外显子剪接存在差异,垂体有 12 006 个,肾上腺 9 861 个,甲状腺 15 109 个,性腺 2 355 个,胸腺 5 393 个,脾脏 5 539 个。与邪毒壅盛证候相比,其余 3 个不同证候小鼠肿瘤有 8 863 个外显子剪接存在差异。③发现不同组织 RNA 18 s 和 28 s 表达量存在差异,在不同证候中会出现有规律的变化。④发现不同组织 GAPDH 表达量存在差异。以上数据表明,神经-内分泌-免疫网络组织基因转录与剪接的差异是荷瘤小鼠不同证候内在重要的物质基础。该研究目前正积极进行之中。

2. 治则治法的研究^[38~44] 治则与治法是中医治疗学的特色。钱汝红等采用大鼠外周血淋巴细胞 DNA 损伤修复能力的方法,同步比较了补肾、活血、益气、健脾及上述治则复方等 5 个不同治则治法的作用,从分子水平探讨了其差异。

我们在分析总结中医临床治疗肝癌报道的基础上,制定抑癌扶正行气活血法,发现经该法治疗的二乙基亚硝胺(DEN)诱导肝癌大鼠,在延长肝癌大鼠生存率的同时,肝(含肝癌)组织若干癌基因转录水平得以降低。进而我们将抑癌扶正行气活血治法拆为清热解毒、活血化瘀、健脾益气三个亚治法,分别对应肝癌瘀毒阻滞、血瘀、脾气虚弱等 3 个最基本的证,采用了 DD-PCR 和大量的 Northern blot 对经这 3 个亚治法和总治法干预的肝癌大鼠肝组织检测,发现不同治法对基因表达有不同的选择作用,提示不同证候有其相应的基因转录水平的变化规律,并发现了一些新的基因片段。后续的实验,采用 RACE-PCR 技术,筛选到编号为 DD31 基因片段完整的表达序列,实现了 GenBank 的登录。2003 年,我们进一步采用 Affymetrix Rat