

国家精品课程
国家教学成果二等奖
国家级精品资源共享课
普通高等教育中医药类“十三五”规划教材

主编 / 方肇勤

副主编 / 张前 赵刚 杨丽萍 卢文丽 左爱仁 孙丽 冯晓桃

分子生物学技术 在中医药研究中的应用

(第三版)



上海科学技术出版社

非外借

普通高等教育中医药类“十三五”规划教材

分子生物学技术在 中医药研究中的应用

(第三版)

主 编 方肇勤

副主编 张 前 赵 刚 杨丽萍

卢文丽 左爱仁 孙 丽

冯晓桃

上海科学技术出版社

内 容 提 要

本书介绍了常用的分子生物学技术及其在中医药研发中的应用,主要包括 8 个部分:绪论、分子生物学常用基本技术、DNA 的研究方法、RNA 的研究方法、蛋白质的研究方法、基因功能与表达调控的研究方法、分子生物学实验常用的细胞生物学技术、分子生物学常用网络资源及利用。

本书可供中医药学科研究者以及高等院校师生参考使用。

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学技术在中医药研究中的应用 / 方肇勤主编. —3 版. —上海:上海科学技术出版社,2018.4
普通高等教育中医药类“十三五”规划教材
ISBN 978-7-5478-3926-3

I. ①分… II. ①方… III. ①分子生物学—应用—中国医药学—高等学校—教材 IV. ①R2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2018)第 035583 号

分子生物学技术在中医药研究中的应用(第三版)

主编 方肇勤

上海世纪出版(集团)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 www.sstp.cn)

常熟市兴达印刷有限公司印刷

开本 787×1092 1/16 印张 20.5

字数 440 千字

2002 年 9 月第 1 版 2018 年 4 月第 3 版 2018 年 4 月第 3 次印刷

ISBN 978-7-5478-3926-3/R·1573

定价: 68.00 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

编 委 会

主 编

方肇勤(上海中医药大学)

副主编

张 前(北京中医药大学)	赵 刚(湖北中医药大学)
杨丽萍(河南中医药大学)	卢文丽(上海中医药大学)
左爱仁(江西中医药大学)	孙 丽(辽宁中医药大学)
冯晓桃(广西中医药大学)	

编 委

方肇勤(上海中医药大学)	张 前(北京中医药大学)
赵 刚(湖北中医药大学)	杨丽萍(河南中医药大学)
潘志强(上海中医药大学)	卢文丽(上海中医药大学)
左爱仁(江西中医药大学)	孙 丽(辽宁中医药大学)
冯晓桃(广西中医药大学)	刘小美(上海中医药大学)
管冬元(上海中医药大学)	梁 超(上海中医药大学)
张园园(上海中医药大学)	贾冬威(上海中医药大学)
吴中华(上海中医药大学)	

编写说明

分子生物学实验技术的发展日新月异,中医药的研发中已愈来愈广泛地采用了分子生物学技术。然而,与国内外西医界相比,分子生物学技术在中医药研发中的应用还存在很大的差距,突出表现为知识普及不够、研发投入不足和技术使用不当,而该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。

早在 1996 年,我们就编写了《分子生物学常用技术与方法》讲义,为上海中医药大学中医基础专业本科生和中医专业博士、硕士研究生开课,受到了广大中医药学子的热烈欢迎。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名额,充分表明分子生物学技术在新一代中医学者中所引起的重视。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》,该书依据我们多年在国内外运用先进分子生物学技术的经验,从中医药研究实际出发,深入浅出地介绍了该领域常用技术及其在中医药研发中的运用,着重解决中医药研发为何用、如何用的问题,并在书中增加了实验技术的内容。该教材编写突出了 3 个方面:① 实用。书中所介绍的实验技术均为作者使用过的技术,并参考了一些国内公开发表的研究报告、有关公司试剂盒说明书,以及《分子克隆实验指南》等权威专著,言之有据,同时详细介绍实验的准备和实施,使读者可以方便地择用。② 先进。该书介绍了当时最新发展的一些实验技术。③ 突出中医特色。介绍了各分子生物学常用技术与方法在中医学中的应用。教材出版以来,成为中医界一些实验研究人员手边的工具书和教学参考书。同时该课程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。2008 年该教材作为普通高等教育“十一五”国家级规划教材出版,进一步丰富了实验内容。最近,上海中医药大学教学团队拍摄和编辑了系列实验技术视频,目前这些视频已在课堂普遍使用,并上传至“国家精品资源共享课”(网址: http://www.icourses.cn/coursestatic/course_2855.html),希望有助于读者了解和掌握这些技术。

为了适应近年来分子生物学技术发展和应用的特点和需求,我们对原教材进行了调整与充实。内容主要包括 8 个部分:

(1) 绪论。重点介绍分子生物学技术在中医药研发中应用的现状,深入浅出地介绍为何用和如何用,以及本书各章节的内容与关系。

(2) 分子生物学常用基本技术。介绍重组质粒、质粒转化大肠杆菌、阳性单菌落扩增与小量 DNA 制备、酶切重组质粒和电泳分离所插入的 DNA、从凝胶中回收 DNA、大量质粒 DNA 制备等。

(3) DNA 的研究方法。介绍哺乳类动物组织基因组 DNA 的提取、基因组文库的建立与目的基因筛选、Southern blot、PCR、DNA 双脱氧链终止法测序等。

(4) RNA 的研究方法。介绍哺乳类动物组织总 RNA 的提取、mRNA 的分离、Northern blot、RT - qPCR、多基因表达的检测、cDNA 库建立、基因全序列 cDNA 库筛选等。

(5) 蛋白质的研究方法。介绍哺乳类动物组织蛋白质的提取、Western blot、ELISA、免疫组织化学、蛋白质双向电泳、蛋白芯片等。

(6) 基因功能与表达调控的研究方法。介绍 RNAi、报告基因与基因调控元件的检测、体外定点诱变技术、CRISPR - Cas9 基因编辑技术、基因过表达、免疫共沉淀等。

(7) 分子生物学实验常用的细胞生物学技术。介绍哺乳类动物细胞的培养、细胞增殖检测、流式细胞术、体外细胞划痕实验、细胞迁移和侵袭实验、TUNEL 法检测细胞凋亡等。

(8) 分子生物学常用网络资源及利用。介绍美国国家生物技术信息中心 (NCBI)、GenBank 数据库查询与搜索、BLAST 分析、EST 的电子延伸、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、PCR 引物或序列寡核苷酸探针的在线设计、蛋白质分析。

此外,在书末附录中还介绍了分子生物学实验常用仪器设备、常用生物学数据、常用载体、分子克隆常用酶、常用储存液的配制、常用液体培养基、常用缓冲液、常用酸碱溶液的浓度与分子量、不同浓度酸碱液的 pH、核酸的纯化(用酚-氯仿抽提)、核酸浓缩、分光光度法测定 DNA 及 RNA 含量、Sephadex 的水化、放射性度量单位和数据、科学单位、离心速度和离心力换算、英汉对照等。

本版教材具体内容的调整包括:

鉴于一些分子生物学技术开始应用于中医药研究,为此新增了蛋白芯片(实验 24)、基因过表达(实验 29)、免疫共沉淀(实验 30);而一些细胞生物学技术业已成为分子生物学技术的常用实验方法,如细胞增殖检测(实验 32)、流式细胞术(实验 33)、体外细胞划痕实验(实验 34)、细胞迁移和侵袭实验(实验 35)、TUNEL 法检测细胞凋亡(实验 36),本教材一并予以介绍。

鉴于原位杂交、Footprint、凝胶阻滞分析等较少使用,而 cDNA Array 和 DD - PCR 已被基因芯片所取代,因而本教材不再介绍这些实验技术。在本教材“第四章 RNA 的研究方法”引言中介绍了非编码 RNA,其中涉及 small RNA,而有关实验及目的已编入相关章节中,因而不再专门介绍“small RNA 的提取与分析”。考虑到本教材的主要读者是中医学专

业的本科生和研究生,因此,不再列入一些与中药材相关的实验,如植物细胞悬浮培养技术、植物基因组 DNA 的提取、动植物药材的 ISSR 指纹图谱技术、中药 RAPD 指纹图谱技术、植物组织蛋白质的提取、植物细胞的基因转化。

此外,“实验 15 RT-qPCR”替换了第二版的“RT-PCR”与“ABI 荧光实时定量 PCR”,“实验 16 多基因表达的检测”重点介绍基因芯片,在“实验 18 基因全序列 cDNA 库筛选”一并介绍了 RACE-PCR,“实验 21 ELISA”简介了抗体制备(因而不专门介绍“单克隆抗体制备”),“实验 27 体外定点诱变技术”仅介绍了相关原理。

本教材的使用对象包括各类中医药学科临床和研究工作者、研究生、本科生,以及非中医药学科从事中医药研究的工作者、研究生。

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,而且还在不断发展和分化,产生了大量的专著、论文、有关企业和公司的产品目录,以及丰富的网络资源,中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,本书是难以概括全面的。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

2017 年 12 月于上海

目 录

第一章 绪论

第一节	分子生物学技术在中医药防治肝癌作用机制探索中的应用	001
第二节	分子生物学技术在中医药研究中的应用现状	007
第三节	中医药研究中常用的分子生物学技术	013
第四节	分子生物学技术在中医药研发中的应用前景	020

第二章 分子生物学常用基本技术

实验 1	重组质粒	026
实验 2	质粒转化大肠杆菌	030
实验 3	阳性单菌落扩增与小量 DNA 制备	034
实验 4	酶切重组质粒和电泳分离所插入的 DNA	037
实验 5	从凝胶中回收 DNA	040
实验 6	大量质粒 DNA 制备	041

第三章 DNA 的研究方法

实验 7	哺乳类动物组织基因组 DNA 的提取	045
实验 8	基因组文库的建立与目的基因筛选	048
实验 9	Southern blot	058
实验 10	PCR	064
实验 11	DNA 双脱氧链终止法测序	070

第四章 RNA 的研究方法

实验 12	哺乳类动物组织总 RNA 的提取	079
实验 13	mRNA 的分离	081

实验 14	Northern blot	084
实验 15	RT - qPCR	090
实验 16	多基因表达的检测	096
实验 17	cDNA 库建立	112
实验 18	基因全序列 cDNA 库筛选	123

第五章 蛋白质的研究方法 132

实验 19	哺乳类动物组织蛋白质的提取	132
实验 20	Western blot	136
实验 21	ELISA	149
实验 22	免疫组织化学	154
实验 23	蛋白质双向电泳	160
实验 24	蛋白芯片	178

第六章 基因功能与表达调控的研究方法 182

实验 25	RNAi	183
实验 26	报告基因与基因调控元件的检测	189
实验 27	体外定点诱变技术	192
实验 28	CRISPR - Cas9 基因编辑技术	195
实验 29	基因过表达	204
实验 30	免疫共沉淀	211

第七章 分子生物学实验常用的细胞生物学技术 216

实验 31	哺乳类动物细胞的培养	216
实验 32	细胞增殖检测	224
实验 33	流式细胞术	226
实验 34	体外细胞划痕实验	234
实验 35	细胞迁移和侵袭实验	236
实验 36	TUNEL 法检测细胞凋亡	239

第八章 分子生物学常用网络资源及利用 243

第一节	美国国家生物技术信息中心(NCBI)	243
第二节	GenBank 数据库查询与搜索	248
第三节	BLAST	255

第四节	EST 的电子延伸	265
第五节	cDNA 序列的蛋白阅读框架分析、染色体定位及其在机体各组织中的表达预测	271
第六节	PCR 引物或序列寡核苷酸探针的在线设计	278
第七节	蛋白质分析	280

附 录	287
-----	-----

1	分子生物学实验常用仪器设备	287
2	常用生物学数据	288
3	常用载体	292
4	分子克隆常用酶	293
5	常用储存液的配制	297
6	常用液体培养基	299
7	常用缓冲液	300
8	常用酸碱溶液的浓度与分子量	300
9	不同浓度酸碱液的 pH	301
10	核酸的纯化(用酚-氯仿抽提)	301
11	核酸浓缩	302
12	分光光度法测定 DNA 及 RNA 含量	303
13	Sephadex 的水化	303
14	放射性度量单位和数据	303
15	科学单位	303
16	离心速度和离心力换算	304
17	常用分子生物学术语对照	304

第一章

绪 论

近些年来,分子生物学技术已成为中医药研究与发展的领先技术,中医药专业的医务人员、研究生,甚至本科生,对学习和运用该技术的热情空前高涨。然而,即便如此,依然存在一些问题。

(1) 知识与技术普及仍不够。一些中医药学者、研究生和本科生,对分子生物学技术仍不了解,对该技术是否能在中医药研究与发展中应用、为什么要采用该技术,以及如何运用该技术,例如对中医学术的继承和发展有什么帮助等,缺少了解,存在困惑,犹豫徘徊。

(2) 研发投入少,效益差。与国内外西医学科、中药学科相比,中医学及中医基础学科科学探索投入不够、经费不富裕、人力投入不足、研究效率低、知识发现和积累少。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,限制了中医药学术的增长及竞争力。

(3) 技术使用不当。基于以上原因,中医药实验研究与探索所采用的分子生物学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、罕见和未知基因功能的检测,研究深度和广度不足;或相反,一味跟风,不恰当地择用一些技术新、价格昂贵的设备和方法,与原有实验积累不衔接,检测数据不能消化,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,尤其是介绍如何将其运用在中医药研究与发展中仍是当务之急。

那么,为什么要要在中医药研究中采用分子生物学技术?

以下以中医药防治原发性肝癌作用机制探索为例,介绍分子生物学技术在中医药研究中的应用。

第一节 分子生物学技术在中医药防治肝癌作用机制探索中的应用

原发性肝癌(hepatocellular carcinoma,简称“肝癌”)是世界上第五大常见恶性肿瘤,居

肿瘤致死原因的第三位,全球每年有超过 50 万肝癌新发病例,其中约一半发生在我国^[1]。据对我国 2012 年 193 个恶性肿瘤登记处资料分析,估计恶性肿瘤发病高低依次为肺癌、胃癌、肝癌^[2]。我国 75% 以上的肝细胞癌(HCC)患者确诊时已为中晚期,肝内胆管癌(ICC)亦然^[3]。

目前外科治疗仍是肝癌治疗的主要手段^[4]。我国卫生部 2011 年所颁布的《原发性肝癌诊疗规范》,建议肝癌治疗主要包括:手术治疗(肝切除和肝移植术)、局部消融治疗、肝动脉介入治疗,以及系统治疗^[5]。国际上多采纳巴塞罗那临床肝癌分期标准,对 B 期(单发或多发的大肿瘤)推荐经导管肝动脉化疗栓塞(TACE),对 C 期(伴大血管/胆管癌栓)仅推荐靶向药物索拉非尼^[3]。

然而,据报道,肝癌切除后 5 年复发率超过 70%,早期肝癌也超过 40%^[3]。复旦大学肝癌研究所 1998~2009 年肝癌切除后患者 5 年生存率达 44.5%,近 10 年生存率提高已不明显^[6]。东方肝胆外科医院 1999~2003 年肝癌手术切除患者 1、3、5 年生存率分别为 85.9%、64.6%、53.2%,1、3、5 年无瘤生存率分别为 53.2%、34.9%、26.5%^[4]。结合有关文献,肝癌各种疗法的 5 年生存率分别为:肝移植 60%~80%,小肝癌切除 50%~60%,大肝癌切除 30%~40%,小肝癌消融疗法 30%~40%,经导管动脉内化疗栓塞 20%~30%,都已接近其高限^[6,7]。

在我国,中医药在肝癌防治方面一直发挥着十分重要的作用,大多数肝癌患者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,其优势体现在保护肝脏、副作用小、改善症状和延长带瘤生存期等方面。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一直十分关切的问题,为此我们把中医药防治肝癌及其作用机制作为研究方向。

中医药讲究辨证论治,针对肝癌患者常见脾气虚弱、气滞血瘀、痰热邪毒等证候,给予健脾益气、行气活血、清热解毒等治法方药;通过处方用药频率统计可见,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、白术等健脾益气药居多,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^[8-13]。据此我们归纳出抑癌扶正行气活血方,及其 3 个不同亚治法的拆方: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主流,并用于药效学和作用机制等实验研究。现主要从以下几个方向切入。

一、中医不同治法方药防治大鼠肝癌的药效学研究^[14-16]

中药防治肝癌的代表性处方对于肝癌大鼠是否有效,不同治法拆方与全方的疗效异同如何?作用机制是什么?为此我们开展了以下研究。

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,发现与模型组和对照西药(替加氟)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。

在 20 世纪 90 年代,肝癌的一些异常表达的基因业已明确,癌基因如 *ras* 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?我们引入了分子生物学技术,采用

Northern blot 和 RT-PCR(反转录 PCR)检测大鼠肝癌组织若干癌基因和抑癌基因的表达,发现不同治法方药对 *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* 癌基因下调作用最强。这些结果与临床报道近似,初步揭示了中医常用治法方药的部分作用机制,为后续的研究奠定了基础。

二、中医不同治法方药对大鼠肝癌 *ras* 信号通路基因表达调控的研究^[17-19]

随着国内外研究的发展,肿瘤细胞内一些异常信号传导通路被发现,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控作用?

我们主要采用 RT-PCR 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作用,似乎有一定的选择性。该研究还使我们所关心的基因数量增加,由点及面,印证了中药不同治法多途径、多靶点的特点。

三、中医不同治法方药对大鼠肝癌多基因表达调控的 DD-PCR 研究^[20-23]

既然不同中医治法具有广泛的基因调控作用,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、基因调控而发挥其治疗作用?如何寻找这些基因?1992 年 *Science* 发表了 DD-PCR(差异展示 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 年我们引入该技术,在开展全方及其不同拆方对 DEN 肝癌大鼠的药效学研究的的同时,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) 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。

(2) 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。

四、中医不同治法方药对大鼠肝癌多基因表达调控的基因芯片研究^[24-26]

现代研究证明,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,可以通过自分泌和旁分泌的许多细胞因子经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质的综合调控,调控机制十分复杂,癌基因与抑癌基因的表达也不例外,仅仅观察若干已知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。例如,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、检测预后的工具基因?不同治法中药是直接调节这些基因,还是间接调节?

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订,以及中药优势的发挥。

2003年,我们在国家自然科学基金的资助下,与美国科罗拉多大学医学院合作,采用了当时最先进的 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,以及不同治法治疗后大鼠肝(或含肝癌组织)基因表达的差异。研究获得以下发现。

(1) 大鼠肝癌表达大于正常肝脏(大于 2 倍,下同)的基因达 2 796 个;正常肝脏表达大于肝癌的基因计 276 个。

(2) DEN 诱癌至 4 周表达大于正常组的基因为 1 927 个,其中表达同时大于前 8、16 周和肿瘤的基因计 827 个;4 周表达小于正常组(小于 2 倍,下同)的基因计 363 个。诱癌至 8 周表达大于正常组的基因为 1 674 个,其中表达同时大于前 4、16 周和肿瘤的基因计 335 个。诱癌至 16 周表达大于正常组的基因为 2 311 个,其中表达同时大于前 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 1.5 倍及以上,下同)者 582 个,表达小于其余中、西药对照组的基因计 342 个;清热解毒法下调基因 291 个,表达小于其余中、西药对照组的基因计 140 个;行气活血法下调基因 377 个,表达小于其余中、西药对照组的基因计 186 个;健脾益气法下调基因 892 个,表达小于其余中、西药对照组的基因计 689 个;西药对照组下调基因 639 个,表达小于其余各中药对照组的基因计 476 个。

以上结果提示:

1) DEN 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(有待进一步筛选),以往学术界仅仅关注若干基因的研究,确有可能忽略了一些重要的基因。因此,在今后的研究中,应扩大研究的范围。

2) 在肝癌逐渐形成的不同阶段可望寻找到不同的有效治疗方法。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,哪些是不可逆而必须依赖药物调整的?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,推测调控是多层次、多基因的,其中有些是正向的。不同的拆方和组方,可能会产生不同的调节效应。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,有助于中药复方、单味中药、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案。

4) 哪些基因的调控与辨证论治有关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,很多情况下,并非单纯针对疾病或病灶局部。这样的分子途径有哪些?在不同治法所选择性调控的基因中间,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与发展可能有着紧密的关系,构成复杂和多层次的网络。

同期国内外肝癌基础研究仍十分薄弱。我们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 以及肝癌组织表达值读数低

(50 以下)的基因,共得到 509 个基因,其中 325 个基因是 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 等检索,在 20 年内的国外文献中,以上 184 个基因有 16 个在国外的文献报道较少或无报道,有 100 个与肿瘤有关,其中仅有 36 个基因在以往的研究中涉及肝癌,4 个基因与肝脏有关,64 个与肿瘤相关的基因与肝脏无关。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,以往国内外研究薄弱,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关联?

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),这样的调节是正向的,还是负向的?

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,可以被治疗调整,并实现治疗作用?

由此引导出以下研究。

五、基于大鼠芯片结果的完整表达基因序列的筛选^[27-30]

如前文所述,在 DEN 诱导大鼠肝癌的过程中,以及经健脾、活血、清热和全方等治法干预后肝癌(含肝脏组织)表达改变显著的基因,大多是 EST 片段,此外还有我们采用 DD-PCR 获得的基因片段。欲检测这些基因的功能,首先要获得其完整表达序列。为此,我们综合采用了多种分子生物学技术,开展了系列研究。

(1) 建立了 DEN 诱导大鼠肝癌组织和正常大鼠肝脏组织的高质量(排除大量小片段的)cDNA 库。

(2) 采用 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 的基因完整表达序列。

(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、Touchdown-PCR 等技术,筛选出数十个基因的完整表达序列。其中共计 29 个基因实现了 GenBank 登录,其基因号分别为: DQ480743、DQ480744、DQ480745、DQ480746、DQ480747、DQ480748、DQ480749、DQ480750、DQ480751、DQ480752、DQ480753、DQ912022、AM258958、AM258959、AM258960、AM258961、AM258962、AM258963、AB259152、AB259153、AB259154、EF076766、EF076767、EF076768、EF076769、EF076770、EF076771、EF076772,以及 50299539。并依据 GenBank 有关信息,对这些基因的染色体定位及蛋白质阅读框架进行了初步分析,发现其中大多数基因与人类已知基因序列近似,部分基因近年来开始有了功能检测的报道,且多与细胞的生长增殖有关。

六、探索差异表达基因在肝癌恶性增殖中的作用——以金属硫蛋白为例^[31-39]

针对以上的差异表达基因在肝癌细胞恶性增殖中可能扮演的角色,我们开展了长期的

探索。如前文所述,2003年,在国家自然科学基金的资助下,我们发现采用 DEN 诱导大鼠肝癌至肝脏恶性增殖及肝癌形成阶段有大量差异表达的基因,而金属硫蛋白 2(MT2)为其代表。该基因在诱癌 16 周及癌变阶段(诱癌 20 周)表达显著增加,提示 MT2 与肝癌恶性增殖密切相关。与肝癌模型组比较,中药不同治法复方给药后,其均呈不同程度的下调。研究还发现,伴随 MT2 上调,大鼠肝癌(含肝组织)中表达增加的还有结构蛋白、转录、DNA 结合等信号通路的基因群。提示 MT2 可能直接或间接促进了这些通路基因的表达。

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一种组织中普遍存在的低分子量、富含半胱氨酸的金属结合蛋白,在其基团中存在 2 个天然锌离子(Zn^{2+}),在整个进化过程中高度保守。MT 分为 MT1~MT4 四类,如 MT2。人类 MT 基因位于染色体 16q13,含有 MT1E、MT1F、MT1G、MT1H、MT1X、MT2A 等 10 个亚型的编码区,有 18 个亚型的多种异构体;不同类型的细胞表达不同的 MT 亚型。MT 在细胞的细胞质和细胞核中均有分布。

我们综合采用 RNAi 等技术研究发现:

(1) MT 对于肝癌细胞恶性增殖是必需的。采用 RNAi 令 MT 表达后沉默,会引发细胞增殖变缓。提示 SMMC7721 肝癌细胞的恶性增殖依赖该基因。

(2) MT 促进肝癌细胞增殖活跃。在 SMMC7721 细胞培养中,较之增殖不活跃的细胞,增殖活跃细胞的金属硫蛋白 2A(MT2A,是 SMMC7721 肝癌细胞中高表达的 MT 成员)表达增加,亦提示 MT2A 对于肝癌细胞恶性增殖是重要的。

(3) MT 具有促进肝癌细胞抵御不同应激因子的作用。研究发现,多种不同应激因子作用于体外培养的肝癌细胞,会引发肝癌细胞的应激反应,使 MT2A 表达显著增加。表明 MT2A 在肝癌细胞抵御不同应激方面均发挥着重要的作用。例如,转染质粒扩增后,细胞处于转染后应激状态,MT2A 表达增加;脂质体转染应激,可令 MT2A 轻度上调;氯化钙应激,可令 MT2A 表达显著上调。

(4) MT 对中药有效成分也具有抵御作用。我们观察了预知子种子乙醇提取物、正丁醇萃取物,以及其诱导内质网应激的主要成分木通皂苷 E 等对体外肝癌细胞 MT 的表达作用,发现 MT 一致出现上调^[31-33];而非像整体实验那样,中药复方令大鼠肝癌组织 MT 表达下调。

(5) 肝癌细胞具有复杂的抵御应激网络,相互补偿。当 MT 敲除后,另一些抵御应激的途径会激活,如胆固醇生物合成通路,以及 G1 到 S 期、G 蛋白信号、炎症反应、糖原代谢、脂肪酸降解通路等。表明肝癌细胞内存在复杂的抵御应激因子的网络,一些分子或通路被抑制,如 MT,另一些分子或通路便会活跃,进行补偿。提示这也是肿瘤难治的机制之一。

(6) MT 还可能通过上调多基因来抵御应激因子。

1) 表达谱芯片检测表明,在质粒过表达等应激条件下,MT 过表达可能会促进核糖体蛋白、DNA 复制、mRNA 加工结合、细胞周期等通路基因的表达,诸如 RPS10、RPS20、RPS23、RPL19、RPL31、CDC2;促进包括 HSP、ATF 在内的一些抵御应激基因的表达;以及促进包括 eIF2、RPL 在内的一些参与基因翻译基因的表达。而当 MT 表达后沉默,这些通路基因的表达便会下调。

2) 在 G418 诱导的细胞应激时,MT 促进细胞周期、G1 至 S 期细胞周期反应、核糖体蛋白、RNA 转录、核受体等通路基因的表达。而当 MT 表达后沉默,这些通路基因的表达量会

发生下调。

以上现象表明, *MT* 还可能通过上调多基因来抵御应激。

(7) *MT* 确有上调核糖体蛋白等基因表达的作用。在多次的重复实验中, 当 *MT* 表达沉默后, 一些基因, 如若干核糖体蛋白(*RPL4*、*RPL11*、*RPL12*、*RPL19*、*RPS23* 等)会出现较为恒定地下调, 表明 *MT* 确有直接或间接促进这些基因表达的作用。那么, *MT* 是不是通过促进这些基因的表达, 来实现对肝癌细胞的促恶性增殖作用?

(8) *MT* 可能通过上调核糖体蛋白等基因发挥促进肝癌细胞恶性增殖的作用。我们采用 RNAi 方法, 检测 *RPL4*、*RPL11*、*RPL12*、*RPL19*、*RPS23* 等 5 个基因对细胞恶性增殖的作用。发现当分别令这些基因表达沉默后, 细胞增殖确被抑制; 而且这些基因的表达沉默, 同时可能对其他一些基因的表达产生影响, 该研究还在继续进行中。

(9) 通过上述研究, 所获得的结论与思考如下。

1) 在肝癌细胞处于应激状态时, 比如各种治疗、变性、修复等, *MT* 表达增加, 并向细胞核内迁移, 直接改变了细胞核内离子的浓度与平衡, 发挥其对基因表达的调控作用。

2) *MT* 可能还通过与多基因的相互作用, 发挥其对基因表达的调节作用。

3) *MT* 直接或间接地促进了包括核糖体蛋白在内的多基因、多通路相关基因的表达, 进而促进了肝癌细胞的恶性增殖。

4) 整体动物实验中, 中药常用治法方药可以不同程度地减轻和部分缓解由 DEN 所造成的肝毒性和损伤作用, 从而使得大多肝细胞的应激得到一定程度的缓解, *MT* 表达下调; 而并非直接下调肝癌细胞的 *MT* 表达。这一实验结果还提示, 在临床肝癌的防治过程中, 应重视肝脏的保护和炎症的控制, 以杜绝其由慢性炎症向异常增生、肝癌转变和发展, 且可提高患者的生存质量; 这对改善和纠正肝癌组织周边微环境、提高肝癌疗效也是十分重要的; 同时表明, 中药在肝癌综合治疗中具有十分重要的作用。

第二节 分子生物学技术在中医药研究中的应用现状

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逐渐频繁, 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, 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^[35-50] 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, 将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。沈自尹院士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