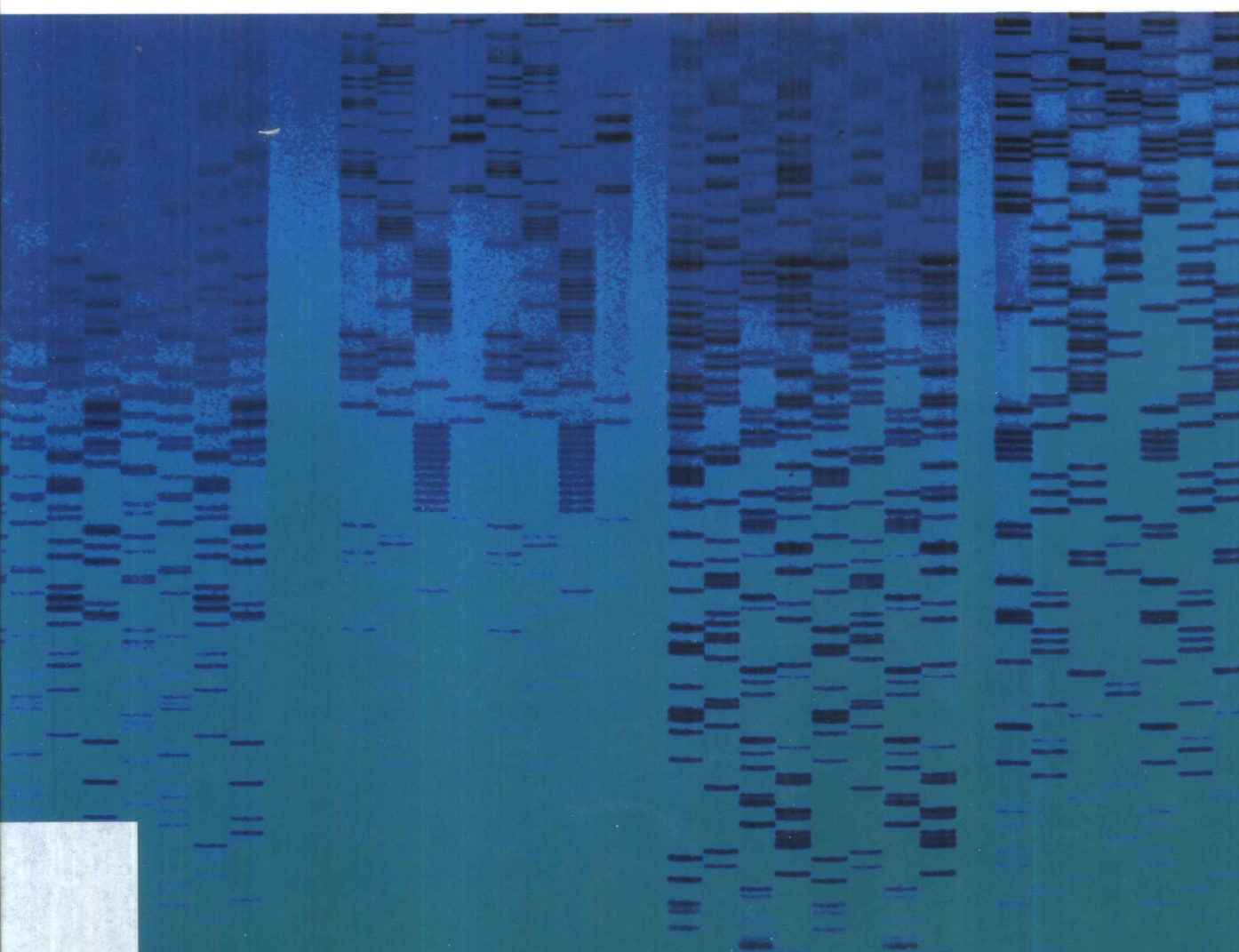


分子生物学技术 在中医药研究中的应用

主编 方肇勤

The lower half of the book cover features a complex, abstract pattern of horizontal and vertical lines in various shades of blue and white, creating a textured, almost digital or molecular appearance.

上海科学技术出版社

分子生物学技术在中医药研究中的应用

主 编	方肇勤	
编写人员	方肇勤	管冬元
	陈沙维	司富春
	徐维蓉	吴中华
	廖 蕊	

上海科学技术出版社

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.
上海:上海科学技术出版社,2002.9
上海研究生教育用书
ISBN 7-5323-6626-X

I.分... II.方... III.分子生物学-应用-中国
医药学 IV.R2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 055768 号

上海科学技术出版社出版发行

(上海瑞金二路 450 号 邮政编码 200020)

苏州市望电印刷厂印刷 新华书店上海发行所经销

2002 年 9 月第 1 版 2002 年 9 月第 1 次印刷

开本 787×1092 1/16 印张 12.75 字数 292 000

印数 1-3 000 定价:28.00 元

本书如有缺页、错装或坏损等严重质量问题,
请向本社出版科联系调换

内 容 提 要

本书作者根据多年来在国内外应用先进分子生物学技术的经验,结合分子生物学技术的最新进展,从中医药研究实际出发,深入浅出地介绍了分子生物学常用技术及其在中医药研究中的应用。将先进的分子生物学技术与传统的中医药学有机、紧密地结合起来,着重解决在中医药研究中如何用、怎样用该技术的问题。突出了实用性、先进性和中医特色三个方面。

本书内容主要包括中医药对基因组(DNA)、单基因转录(mRNA)、多基因转录(mRNA)、广泛基因差异转录(mRNA)、单基因表达产物(蛋白质)、多基因表达产物(蛋白质)作用的研究,以及中医药对基因转录调控的研究和分子生物学的一些基本技术,篇后有附录。

本书的读者对象为高等中医药院校研究生、本科生,以及各类中医药学科及相关学科的临床和科研工作者。

编写说明

分子生物学实验技术的发展日新月异,而中医药研究已有的积累和发展也正呼唤着分子生物学技术的介入。如何把两者紧密地结合起来,将前者更多、更有效地用于后者,是中医药研究领域、分子生物学研究领域和其他有志于中医药开发研究者迫切期盼解决的问题。

为此在 1996 年,笔者组织编写了《分子生物学常用技术与方法》一书,对中医基础专业本科生和各中医专业硕士、博士研究生开课。开课以来学生反响热烈,尤其是研究生,修课积极踊跃,人数一再超出课程指定的学生名额,充分表明该方法技术在新一代中医药学者中所得到的重视和热烈的反响。同样,国内中医药研究领域目前也已经普遍接受了分子生物学技术。但是如何把该技术与中医药研究紧密且有机地结合起来,以及如何应用的问题还没有得到真正地解决,从这方面来说,分子生物学技术还远没有在中医药学科中得到普及;同时,也由于中医药理论的深奥,一些非中医药领域学者应用该技术从事中医药研究十分困难,致使主观愿望与客观现实相脱节。

所以,笔者在以往科研和教学的基础上编写了这本《分子生物学技术在中医药研究中的应用》,据笔者多年在国内外应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、怎样用该技术的问题。希望能将先进的分子生物学技术与传统的中医药学有机、紧密地结合起来,因而该书的出版将有力地推动该技术在中医药研究领域的普及与运用,加速中医药研究的发展和现代化。

鉴于一些实验方法直接引自国外的试剂盒说明,为读者今后使用方便,其中部分所用试剂直接引用英语原文,不做翻译。需要的话,读者可以在附录的英汉对照中找到中译文。

分子生物学技术的发展十分迅速,迄今已积累起各种方法和技术,单就某一技术,也有不同的方法和改良,出版了大量的专著;另外,由于分子生物学技术已经向生命学科各个领域渗透,不同领域的专著中也包含了大量的有关技术和方法;同时,从分子生物学的基础研究到商品化的周期大大缩短,不少从事分子生物学技术服务、产品开发的企业像雨后春笋般地冒了出来,这些企业、公司的产品目录包含了大量的先进的分子生物学方法、技术和理论等等。面对如此庞大的信息,本书是远远难以概括的。因此,笔者只有凭十分有限的认识和体会,删繁就简,希望对初学者有所帮助。挂一漏万,以及叙述不妥之处在所难免,笔者殷切地期待同道的批评与指正!

编著者

2002 年 4 月于上海

目 录

第一章 绪论	1
第二章 中医药对基因组(DNA)作用的研究	14
实验 1 基因组 DNA 提取	16
实验 2 Southern blot	19
实验 3 PCR	24
实验 4 点突变 PCR	28
实验 5 DNA 双脱氧链终止法测序	32
第三章 中医药对单基因转录(mRNA)作用的研究	40
实验 6 组织总 RNA 提取	41
实验 7 mRNA 的分离	44
实验 8 Northern blot	47
实验 9 RT-PCR	53
实验 10 原位杂交	58
第四章 中医药对多基因转录(mRNA)作用的研究	62
实验 11 cDNA Array	62
第五章 中医药对广泛基因差异转录(mRNA)作用的研究	69
实验 12 DDPCR	70
实验 13 cDNA 库建立	76
实验 14 基因全序列 cDNA 库筛选	86
实验 15 RACE PCR	92
第六章 中医药对单基因表达产物(蛋白质)作用的研究	97
实验 16 Western blot	97
实验 17 ELISA	106
实验 18 免疫组织化学	109
实验 19 单克隆抗体制备技术	112
第七章 中医药对多基因表达产物(蛋白质)作用的研究	122
实验 20 双向等电聚焦凝胶电泳	122

第八章 中医药对基因转录调控的研究	129
实验 21 报道基因	130
实验 22 基因功能检测	134
实验 23 Footprint	138
实验 24 凝胶阻滞分析	145
第九章 分子生物学的一些基本技术	150
实验 25 重组质粒	150
实验 26 质粒转化大肠杆菌	153
实验 27 阳性单菌落扩增与小量质粒 DNA 制备	155
实验 28 大量质粒 DNA 制备	158
实验 29 酶切重组质粒及电泳分离所插入的 DNA	161
实验 30 从凝胶中回收 DNA	164
附录	166
一、分子生物学实验常用仪器设备	166
二、常用生物学数据	167
1. DNA 和 RNA 的符号	167
2. 氨基酸的符号	167
3. 遗传密码	167
4. 常用核酸的长度和分子量	168
5. DNA 摩尔换算	168
6. 转换系数和公式	168
7. 蛋白质摩尔换算	168
8. 蛋白质/DNA 的换算	168
9. 常用 DNA 分子量标准参照物	168
10. 常用蛋白质分子量标准参照物	169
三、常用载体	169
1. 质粒	169
2. λ 噬菌体	169
3. 黏粒载体	170
4. 单链丝状噬菌体	170
四、分子克隆常用酶	170
1. 限制性内切酶	170
2. DNA 聚合酶	176
3. 连接酶	176
4. 脱氧核糖核酸酶 I	176
五、常用贮存液的配制	176

六、常用液体培养基.....	178
七、常用缓冲液.....	178
八、核酸的纯化.....	178
九、核酸浓缩.....	179
十、分光光度法测定 DNA 及 RNA 含量	179
十一、Sephadex 的水化	179
十二、放射性度量单位和数据.....	180
十三、科学单位.....	180
1. 基本单位和数据	180
2. 百分浓度	180
3. 分子浓度	180
4. 当量浓度	181
十四、离心速度和离心力换算.....	181
十五、核苷酸序列资料库.....	181
十六、英汉对照.....	182
十七、名词和方法索引.....	189

第一章 绪 论

经过 40 余年中医药现代化实验研究的探索和发展,中医药现代实验研究从无到有,经历了临床印证性研究,初步的机制研究,以及全方位展开的深入的机制研究和探索,实现了与世界医学实验研究的接轨。采用先进的科学技术和方法来研究中医药已逐渐为中医药研究领域所普遍接受,分子生物学方法和技术便是其中之一。

但是,如何运用分子生物学方法技术来研究中医药,如何把两者紧密结合起来,这些技术对中医药学术发展有什么帮助,如何找到最佳的切入点等等,诸如此类的问题或困惑还萦绕在许多中医药学习和工作者的脑中。归结起来,如何用、怎样用的问题并没有得到普遍的解决。为此,我们先以中医药延缓衰老理论和研究发展为例,看看分子生物学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应用实例

早在《黄帝内经》中,中医学对人体衰老理论和防治就有过大量的论述,在理论上把衰老首先归结为五脏精气虚衰,日久导致肾气虚,天癸竭,生殖系统衰老而丧失生殖能力,其预防和延缓衰老原则主要从补五脏,特别是补肾入手,后世延缓衰老的理论和方法多由此引伸,以及多从补法立论。

但是补有不同的补法,各有家传不同,互有门户之异,就中药复方而言,仅补肾便有平补、温补、凉补、阴阳并补、填精等区别,还有滋阴泻火、温肾祛寒、数法兼用,等等。滋补之中用药也须讲究君臣佐使、轻重缓急。即使是同一治法,用药还会有很大的区别。发展到唐、宋,已经积累起大大小小数以千计万计的延缓衰老的单方和复方,面对如此众多的处方,临床应该如何选择,有没有最好的?金元后期,朱丹溪提出了“阳常有余,阴常不足”,治疗主张滋阴泻火,创有著名的大补阴丸;在明代李时珍《本草纲目》“黄柏”条下,也记载有长期服用单味黄柏以延缓衰老的论述。然而,明末的张介宾则极力反对,认为阳气是人身之大宝,不该采用寒性药物大肆克伐,而力主温补。由此而引发的寒温之争持续了数百年。

当现代临床实验研究方法引入中医临床观察以后,发现同样是老年人,激素水平、神经递质水平存在显著差别,这些递质、激素在部分人群当中可以长期维持在一个较高的水平,而部分人群随着衰老则明显下降。其中,近年大量实验研究所观察到的与寒证、热证有明显关系的儿茶酚胺类递质在不同老年人中波动就很大。笔者采用动物实验研究中药二仙汤及其寒温两个拆方的作用机制时发现,温肾药对老年和去势大鼠下丘脑-垂体-性腺(去势动物观察肾上腺)轴兴奋作用突出,而滋阴泻火药对这些轴的延缓衰老和保护作用突出,部分揭示出寒温治法的差别。联系到临床,对那些激素、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、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妥。这些中医药基础理论的研究丰富和发展了中医学延缓衰老的理论和方药,对临床上延缓衰老的辨证论治起到了积极的指导作用。

生物医学研究表明,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密切相关。在下丘脑水平,GnRH(促性腺激素释放激素)释放的一定数量和频率对于保持正常生殖能力是十分必要的。GnRH是由下丘脑位于弓状核和视前区的GnRH神经元所分泌。为了进一步了解二仙汤的作用机制,笔者采用了分子生物学实验技术观察了二仙汤对老年大鼠下丘脑、垂体中GnRH含量的变化。研究发现,24月龄老年大鼠下丘脑GnRH mRNA含量[Northern blot(RNA印迹,Northern印迹)]较5月龄青年大鼠下降,垂体GnRH(下丘脑合成的GnRH通过垂体门脉系统直接释放到垂体)含量也下降;而经过二仙汤的治疗,同龄老年大鼠下丘脑GnRH mRNA含量、垂体GnRH含量较老年对照大鼠增加,表明二仙汤治疗更年期综合征取效的部分机制与该处方延缓下丘脑GnRH神经元的衰老,并增进其功能有关。上海第二医科大学进而采用细胞生物学的研究方法,发现与若干常用经典温肾中药复方相比,二仙汤能使GnRH细胞系GT1-7(一种GnRH细胞系)的GnRH分泌峰提前,并维持时间最长。这些研究采用的细胞生物学和分子生物学技术加深了我们对中药复方作用机制的认识。如果不借助这些技术和方法,我们便难以高效、准确、深入地观察到中药复方作用的分子机制,也就无从开展更进一步的深入研究,并在此基础上发展和丰富中医药学。

医学和生命学科的研究探索是没有止境的。近10年来所采用的分子生物学技术研究表明,GnRH基因有约3 000bp的启动子,在这些启动子上的一些区域在特定的细胞系中对于GnRH基因的高表达十分重要,被称之为增强子。GnRH细胞在胚胎初始由鼻小坑向下丘脑迁徙,并逐步分化成熟。研究发现来源于不同部位的GnRH细胞系,对GnRH的表达数量有着很大的区别,比如GT1-7(来源于发生在前脑的肿瘤,接近GnRH细胞迁徙的终点)可以高表达GnRH,而Gn10(一种GnRH细胞系,来源于GnRH细胞迁徙途中的肿瘤)则GnRH表达甚微。鉴此,研究人员推测2个细胞系中调节GnRH基因启动子的核蛋白构成会有所不同,由于这些核蛋白的构成不同,导致2个细胞系GnRH表达的多寡。笔者采用分子生物学Footprint(足迹法)技术发现,来源于GT1-7和Gn10两个细胞系的核蛋白在GnRH启动子,尤其是其增强子上结合的数量以及所结合的DNA序列确实有所不同,故推测,这些不同的结合蛋白可能是调节GnRH表达数量多寡的重要蛋白质,由此也提示2个细胞系中基因的表达有所差异。

笔者采用另一项新近发展起来的DDPCR(差异展示聚合酶链反应)技术进一步研究证实,GT1-7和Gn10两个细胞系中确实有许多基因表达不同,有的是仅仅在其中一个细胞系中表达,而另一细胞系中阙如;大多基因在2个细胞系中表达的数量明显不同。在这些差异表达的基因中,有1个基因产物称之为*Ark*,仅仅在Gn10中表达,之前的研究表明*Ark*是一个跨膜蛋白,但是采用报道基因技术研究发现,一旦使*Ark*基因在GT1-7细胞中表达增加,便会明显地抑制GnRH基因的表达。该现象不但新观察到*Ark*的新功能,同时也提示同一基因产物在细胞中可能存在的多功能。笔者进一步采用cDNA Array(cDNA阵列)研究发现,有许多基因在GT1-7和Gn10两个GnRH细胞系中表达差异。其中哪些基因,或哪些基因组合对GnRH表达多寡会发生作用,目前尚不清楚,研究正在进行之中。这些研究已经是GnRH研究的国际前沿工作。

那么我们自然要问,中药复方和其他中医药治法,比如二仙汤是否对以上这些调节GnRH表达的基因产物发生影响,影响了哪些,是哪些中药有效部位或有效成分所起的作

用,这些有效成分的量效关系如何,有没有最佳的组合,与已知西药的作用异同如何,等等。这样的研究必然将中医药延缓衰老的研究引向深入。

以上研究揭示出单一细胞内生物调控现象的混沌复杂,而位于组织和机体中的细胞还受到周边细胞、组织或其他系统的影响,因而变化就更复杂、更微妙,这也就在细胞、分子水平印证了中医学的整体观、恒动观,丰富了中医学的整体观、恒动观。澳大利亚的一项研究发现,刺激下丘脑某一特定核团可以促使 GnRH 的释放,但是随着研究的深入,发现不同实验动物,对相同的刺激反应表现却不同。这一结果令人联想到中医的体质学说和证的变化。延伸出去,这些变化,就有可能是体质或证在基因、细胞、组织层次的微观表现,而辨证论治有可能通过改变这些环节而发生作用。

所以,中医药延缓衰老的深入研究要求采用以上的这些分子生物学技术,推而广之,其他中医药领域的研究也要求采用以上这些分子生物学技术,在这些研究的基础上,结合临床有效中药复方的疗效优势,给予进一步干预研究,了解作用于哪些基因,调整了哪些蛋白质产物,与已知中西药的作用异同,等等。如此,可以极大地提高研究的效率、研究的深度、研究的可靠性、研究的可竞争性。这样的研究不仅将有利于进一步揭示中药复方的作用机制,丰富中医脏象学说、辨证论治理论、治则治法学说,以及中药新药的开发、中药产品的升级换代、加强中医药产业国际的竞争力,还将发现新的生命及其调控现象,拓展人类对生命学科的认识。因此,加大分子生物学方法技术在中医药研究中的应用,是新世纪发展中医学的重要途径。

二、分子生物学技术在中医药研究中的现状

近 10 年来分子生物学技术在中医药研究中已经起步,并呈现出迅速发展的态势,取得了一定的研究成果,这为中医药的深入研究,为中医药走向世界注入了新的生命力。

1. 分子生物学技术在中医基础理论研究中的应用 证本质的研究是分子生物学技术在中医基础理论研究中的热点。

在脏腑证的研究中,主要集中在肾虚证的研究。沈自尹等用 RT-PCR(逆转录酶聚合酶链反应)技术发现肾阳虚证与下丘脑室旁核 CRF(促肾上腺皮质激素释放激素)的 mRNA 转录受抑有关,从而将肾阳虚证定位在下丘脑。刘福春等通过³H-TdR(3 胸腺嘧啶脱氧核苷)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蛋白质代谢有关。方肇勤、司富春、廖柏松等的研究表明,老年肾精亏虚时,下丘脑 GnRH、EPO(内源性阿片肽)等基因转录与表达水平下降,提示老年肾精亏虚与下丘脑若干基因转录及表达水平下降有关。

以方测证是中医传统研究和发展证理论的方法。笔者曾分析总结临床肝癌治疗报道,归纳出抑癌扶正行气活血方,经该方治疗的 DEN(二乙基亚硝胺)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。进而将抑癌扶正行气活血治法拆为清热解毒、活血化瘀、健脾理气 3 个亚治法,分别对应肝癌癌毒阻滞、血瘀、脾气虚弱等 3 个最基本的证,采用 DDPCR 和大量的 Northern blot 实验对经这 3 个亚治法和总治法干预的 DEN 肝癌大鼠肝组织检测,发现不同治法对基因有不同的选择作用,提示不同证有其相应的基因转录水平的变化规律。

瘀血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。

应用分子生物学技术研究表明:瘀血痰浊状态与病理性代谢产物刺激基因异常表达,引起细胞异常增殖有关,活血化瘀类中药能干预基因调控、抑制原癌基因表达。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“血管通”可抑制血管壁 PDGF(血小板衍化生长因子)基因及血管壁原癌基因 *c-myc* 的 mRNA 表达水平,进而抑制动脉平滑肌的细胞增生,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、细胞 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。

治则治法的研究。现代研究表明机体衰老的分子机制极为复杂,其中自由基产物对遗传物质 DNA 的损伤,以及机体对 DNA 损伤的修复能力与衰老有着密切的联系。钱汝红、丁镛发等应用³H-TdR 掺入细胞 DNA 方法,证明补肾与活血类中药有提高遗传物质 DNA 稳定性的作用,从而从分子水平上证明衰老与虚、瘀有关的中医理论。沈小珩、方肇勤等证明二仙汤及其拆方能通过调控、增强 SOD(超氧化物歧化酶)、CAT(过氧化氢酶)等酶的基因转录与表达水平,从而提高抗氧化的作用,减少自由基产物的积累,达到延缓衰老的目的。

在其他治则治法方面,也有了一些有益的探讨。日本的获田善一用遗传药理学研究方法,通过检测小鼠颌下腺 EGF(表皮生长因子)和 NGF(神经生长因子)mRNA 的量,研究八味地黄丸(肾气丸)的药理作用,揭示了证与方的部分对应关系。钱汝红等通过比较补肾、活血、益气、健脾及上述治则复方等 5 个不同治则治法的相关中药对抗衰老的机制研究,从分子水平探讨了不同治则治法的差异。钟历勇等比较了补肾、健脾、活血之类复方对肾虚证的作用,从基因转录水平阐明了补肾治法对肾虚证的确切疗效。

2. 分子生物学技术在中医临床上的应用 现代医学研究表明,许多疾病与基因结构、转录及表达异常有关,但目前对于基因缺陷的治疗在临床上还有许多有待解决的难题,而中医药治疗这些病已显示出疗效确切、毒副作用少等优势,尤其体现在血液病防治方面。吴志奎等用补肾生血药治疗珠蛋白生成障碍性贫血,结果发现该药对杂合子基因突变型患者效果明显,对纯合子型或异源双重杂合子基因突变型患者疗效不佳;并探讨其机制是中药治疗不能改变基因突变型,但能促进珠蛋白 mRNA 的表达。这为中药选型治疗从基因水平上提供了依据,对指导临床实践具有重要意义。中药砒霜提取物三氧化二砷对急性早幼粒细胞白血病的疗效肯定,已引起国际医学研究领域的广泛关注与肯定。王振义等用分子生物学技术发现砷剂对该病 *bcl-2* 基因 mRNA 的转录有下调作用,并通过深入研究找到了砷剂的作用“靶子”为锌指基因。这项研究结论与临床上所取得的疗效一致,印证了中医以毒攻毒的治法。

3. 分子生物学技术在针灸研究中的应用 针刺镇痛的机制研究已深入到分子基因水平,研究证明电针可引起脑内阿片肽基因及其他一些基因表达的变化。如范天生等用原位杂交技术,研究电针对大鼠脊髓背角内 SOM(生长抑素)mRNA 的变化,其结果提示 SOM 参与疼痛调节并在针刺镇痛中起一定作用。高秀等用原位杂交技术研究电针对脑、脊髓多巴胺受体 mRNA 的表达情况,揭示了针刺镇痛与多巴胺系统有着密切的联系。王成天等用斑点印迹杂交技术研究电针可刺激脑组织 *c-fos* mRNA 的表达增强,而电针刺激前后痛阈也发生较大变化,提示可能是电针将外界刺激与长时程细胞表型变化偶联起来参与疼痛调节,并认为电针镇痛并不同于伤害性刺激。

针灸治疗是中医临床的重要组成部分,也是得到国际公认的传统治疗方法,其机制研究

的深入发展,将有利于揭开其内涵。黄诚等用 RT-PCR 技术观察针刺对老年大鼠脑与垂体 IL-1 β (白细胞介素-1 β)及 IL-6(白细胞介素-6)mRNA 的转录水平有抑制作用,从而降低老年期神经细胞对炎症的反应性,有利于机体神经-内分泌-免疫网络的稳定,这可能是针刺抗衰老、防治老年性痴呆的作用机制之一。李耀功等用斑点印迹杂交技术研究针刺大鼠关元、中极、三阴交、子宫穴对大鼠垂体雌激素受体 mRNA 基因表达的情况,结果表明针刺可调整下丘脑-垂体-卵巢轴异常功能。

4. 分子生物学技术在方剂研究中的应用 为了探讨有效方剂的微观作用机制,已广泛地采用分子生物学技术。如张洪钧等用原位杂交技术研究复方益髓灵的提取物(YSL)对骨髓增生异常综合征作用的分子机制,发现白血病巨核细胞系 HI-Meg 被 YSL 诱导后, LIF(生长抑制因子)和 *c-myc* 基因有不同程度的转录增加;同时 YSL 能抑制该细胞增殖并促使其分化,揭示了 YSL 对该细胞系的增殖抑制效应、分化促进效应及基因转录上调效应。赵明瑞等用原位杂交技术证明草果知母汤能降低癫痫模型大鼠脑皮质生长素 mRNA 的表达。此外,樊永平等用原位杂交技术对保心丸抗实验性动脉粥样硬化的机制进行了探讨。杨永平等用斑点印迹杂交及 Northern blot 杂交技术研究了软肝片对贮脂细胞增殖及 I、III 型胶原 mRNA 转录的作用。日本的曦浜洋一郎研究了麦门冬汤对肺泡 II 型上皮细胞 β -肾上腺素受体 mRNA 表达的促进作用。

5. 分子生物学技术在中药研究中的应用

(1) 应用分子生物学技术进行中药药材鉴别与质量评价:传统的药材鉴定方法主要从药材的形态学特征、来源、理化特性等方面进行鉴定,这种方法对于鉴定特殊部位入药的药材以及贵重动物药材难度很大。近年来,我国运用 PCR 及由 PCR 衍生出的 RAPD(随机扩增多态性 DNA)等分子生物学技术,具有方便、准确、迅速、简捷等特点。如徐国钧等应用 RFLP(限制性内切酶片段长度多态性,又称 DNA 指纹图)技术鉴定海马类药材,能准确地予以鉴别,结果可靠。王培训、肖小河等应用 RAPD 技术对西洋参、附子的栽培品种类型及麦冬类药材的居群分类地位进行评判与划分,获得较满意的结果。

(2) 应用分子生物学技术进行中药材药效评价与筛选:中药材的有效成分复杂,具有相同或类似作用的品种很多,这为药效比较与临床用药带来诸多不便,通过分子生物学技术对其筛选与评价,已广泛用于中药材的药理研究中。李文、张耀新等应用斑点印迹杂交技术对 100 多种中草药抑制乙肝病毒 DNA 的药理研究,以寻找有效的抗乙肝药物。姜传仓等应用斑点印迹杂交与 Northern blot 杂交技术研究并证实中药丹参、大黄可提高高脂血症大鼠 LDL(低密度脂蛋白)受体 mRNA 的水平,从而具有降低血清胆固醇的药理作用。

(3) 应用分子生物学技术改良中药品质,提高药品质量:中药的生物工程研究是一个具有广阔前景的研究领域,借助遗传工程技术,可以对药理作用显著而天然药材中含量很少的有效成分进行扩增,并去除药物中的有害物质,从而在遗传性状上提高有效成分含量,改良药材品质,这对中药走向国际市场具有重要的开发价值。如胡之璧等应用植物细胞培养技术进行洋地黄培养细胞的生物转化研究,筛选出高产细胞并获得相当好的遗传稳定性;另外已培养出的三尖杉培养细胞中抗癌活性成分三尖杉酯碱含量占生物碱总量的 70%以上,高于原植物的 20%~40%。

分子生物学技术在中医药研究中的运用方兴未艾,以上仅举数例,类似的综述和专著已

有问世,可以参考。所开展的研究一再发现并证明了中药复方和一些其他中医疗法对人体的作用是通过有关基因的保护和调整作用实现的,由此极大地丰富了脏象学说、证治原理、针灸原理的研究,进一步阐明了中药配伍、组方的原理,丰富了中医基础理论,指导着临床的辨证论治,推动了中药材的规范及药用资源的保护与利用,坚定了中医药研究人员广泛采用分子生物学技术研究中医药学的信念。

三、分子生物学技术在中医药研究中存在的问题

从以上可见,分子生物学技术在中医药领域的渗透是多方面的。但是,与西医、国外医学研究相比,分子生物学技术在中医药研究中的应用还存在许多问题,概括起来,主要表现为以下3个方面。

1. 普及不够 中医研究领域在一个较长的时期内对分子生物学方法技术是否能够用于研究和发展中医药存在疑虑。究其原因,主要还是缺少对这门方法技术的了解,以致给该方法技术在中医药领域的应用带来阻力,也给采用这些技术方法的研究项目申请,以及研究工作的开展带来较大的困难。

20世纪60年代开创性的中医基础实验研究提出之后,中医研究领域已经逐步接受了通常意义上的实验研究(包括人与实验动物),生化、组胚、生理、病理、免疫等实验技术也得到认可。但是,对发展较晚的细胞生物学、分子生物学的接受能力显得不足,应用这些技术研究中医药,尤其是研究中医基础理论的阻力很大,甚至还出现以中医的生命在临床为由,贬低实验室研究,尤其是尖端的分子生物学技术在中医药研究中的重要性。类似对新技术、方法的排斥不仅仅是中医药研究领域独有的现象,国内外某些西医领域也如此,起步迟缓,其主要原因是缺少对这门方法技术的了解。缺少普及的另一种表现是盲目追风,不论以往研究的基础、积累如何,动辄选用分子生物学方法技术。比如最近基因芯片技术在中医药研究领域中风行,许多申报项目不论自身的技术条件、研究积累、今后研究方向,纷纷采用或计划采用基因芯片技术,而立论依据、工作假说、研究条件、研究基础,等等方面,均不支持这样的选择,在一定程度上说明这些申请者对基因芯片技术缺少了解,有不少盲目性。

2. 投入太少 尤其是中医基础实验研究的投入严重不足,导致研究经费短缺、人才匮乏、经验积累迟缓、分子生物学仪器设备配置滞后、试剂材料质量差等现象。

3. 积累太少 由于以上的原因,中医实验研究的积累还十分薄弱,所采用的分子生物学技术还主要停留在观察已知基因 mRNA、蛋白质表达多寡的层次上,还未能深入到基因的转录与翻译的分子调控水平,无论深度和广度均显不足。与西医的研究相比,中医研究在整体上,还存在着上游研究多,下游研究少,即临床多、普通实验研究多,而分子生物学,尤其在细胞、分子调控方面研究少;检测常见已知成分多,研究罕见、未知成分及其调控少。这与当代国际上医学研究蓬勃开展的细胞、分子调控研究形成鲜明的反差。

四、加强用分子生物学研究中医药是新时期中医药发展的迫切需要

1. 振兴中医的重要机遇 分子生物学、细胞生物学以其实验条件便于控制,实验稳定、重复性好,实验周期短,仪器、试剂(包括各类试剂盒)发展快,手段丰富,国际研究普遍(新方法、新技术层出不穷),研究积累快,参考文献丰富,可以观察人体不同组织的细

胞、分子(这又强于动物实验)等优点,给该方法技术研究应用创造了绝佳的条件;同时,通过应用这些实验技术已揭示和开拓出生命科学广泛的未知领域。也由于分子生物学的新兴,发展速度快,给中医药创造了与西医同等的发展和应用的的机会,再次使中西医有可能站到同一起跑线上。抓住这个千载难逢的机会,充分利用、驾御它,必将给中医药学注入强大的生命力。

2. 保持中医药优势的需要 几千年来,中医在运用天然药物方面积累了丰富的经验,其中一些天然动植物药物的粗制品,比如水蛭素、蛇毒抗栓酶类粗制品已经作为我国传统医药的外贸产业。但当国外采用了分子生物学技术和生物工程后,生产出的水蛭素、类凝血酶素不但成本降低了,还提高了质量的稳定性,返销我国并行銷国际市场,对我国传统医药产业形成了巨大竞争压力。有识之士已开始呼吁不能坐视祖国医学优秀遗产的优势失去,主张抓紧采用分子生物学技术研究天然中药的有效成分,开发新药。通过几十年的研究,中药所面临的问题已经暴露得十分清楚,比如中药材的质量稳定性、占用大量耕地、其有效成分和若干有效成分最佳组合的探索、有效成分得率需要提高,以及服用安全性、方便等均有赖于大量的中药学基础研究,而已有的研究表明,分子生物学是十分重要、有效的研究手段。中药的研究有赖于中医基础的研究,而不加强分子生物学技术对中医基础的研究,没有强大的基础研究的积累和支撑,药物的研究、开发将成为无本之木。回顾中医药学发展史,这样的惨痛教训实在太多了。

3. 继承和发展中医基础理论的需要 中医药效用的发挥、脏腑病机的变化、不同治法(具体落实到中药复方及其有效成分,针灸、推拿等治疗方法)的作用环节和最终作用的发挥,均必须落实到人体基因转录与表达的调控环节上。已有的研究大量表明,中医药的取效,往往是通过基因的转录与表达调控实现的,甚至一些基因缺失或突变所引起的疾病,中医药通过对其其他有关基因的转录调控进行补偿,可以达到治疗的目的。因此深入研究对于阐明中医药的作用机制、阐明生命的调控原理,均具有重要的科学意义。作为对中医学优秀遗产的继承和发展,这部分的研究具有广阔的天地,是中医基础理论研究的着重点。另一方面,还应该看到,证的临床研究局限性与困难日益明显。主要表现在限于种种困难,证治的动态演变观察研究难以深入细微;临床证治的干扰因素多且复杂,严重影响到证治疗效的观察、评估;由于受到实验室检查费用昂贵、病人顾虑、不予配合等因素的限制,临床病例证治的实验室检查、复查均有困难,观察难以完整,很多情况下只能是广种薄收,效率低下;由于创伤性检查目前我国临床上难以展开,因此细胞水平、分子水平,尤其是细胞、分子的调控研究无法进行,致使研究深入不下去。而采用分子生物学、细胞生物学技术能在很大程度上弥补其不足。

4. 新时期中医药研究人才培养的需要 只有通过大量的研究实践,加强研究的国际交流,才能造就一大批适应新时期发展需要的中医药基础理论研究的专门人才,才能保证中医药事业的长盛不衰。

五、中医药研究中经常使用的分子生物学技术及本书的内容结构安排

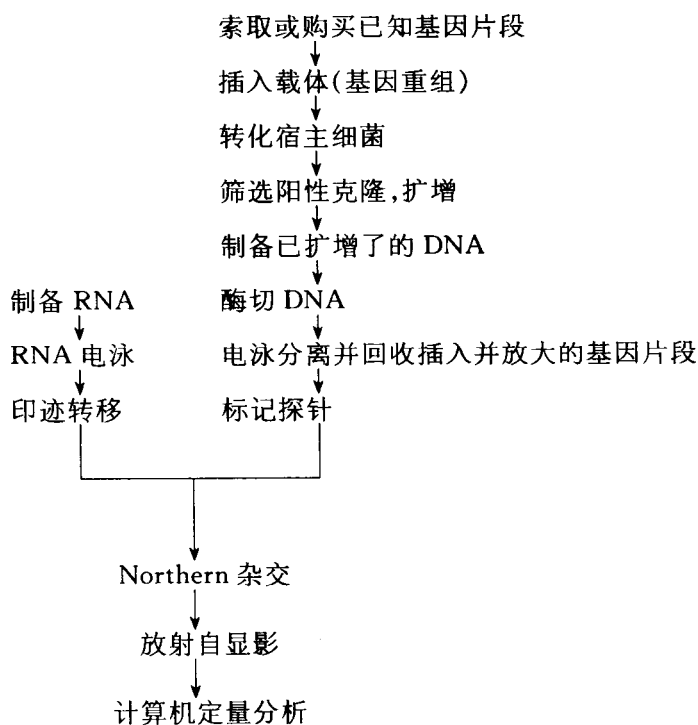
综合目前中医药研究中常用的分子生物学技术,以及将有可能普遍涉及到的技术,中医药研究中经常使用的分子生物学技术主要包括以下内容。

1. 中医药对基因组(DNA)作用的研究 人类基因组计划的基因测序工作已接近尾

声。一些实验动物、植物,包括中药植物的测序工作正在展开,或计划展开。鉴于中医药研究中这方面开展的不多,所以本书着重介绍一些常用的与 DNA 研究有关的方法。即“第二章 中医药对基因组(DNA)作用的研究”中的基因组 DNA 提取(获取研究用 DNA)、Southern blot(观察 DNA 的变化,方法大体接近下面介绍的 Northern blot)、PCR 技术(一种便捷地研究和放大 DNA 的方法)、点突变 PCR(研究 DNA 的功能及其意义)、DNA 测序等。

2. 中医药对某个已知基因转录(mRNA)水平调整作用的研究 这是目前中医药研究使用最为普遍的技术。其方法是在明确某一中医药方法防治某一病证有效或证的变化等的前提下,取病人或实验动物的目的组织,或经培养的细胞系,提取总 RNA,做 Northern blot 或 RT-PCR。

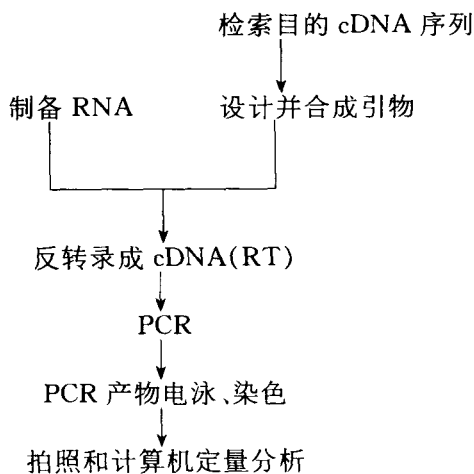
(1) Northern blot 技术:其实验流程主要如下。



以上实验流程涉及到多项分子生物学常用技术和方法,包括:重组质粒、转化宿主细菌、筛选阳性克隆、扩增细菌、从细菌中制备已扩增了的 DNA、利用限制性内切酶切开重组插入的 DNA 片段和载体、电泳分离插入 DNA 片段和载体、回收插入并放大的 DNA 片段、标记探针,以及制备组织或细胞的 RNA、RNA 电泳、把 RNA 转移到硝酸纤维素膜上(印迹转移)、固定、Northern 杂交、放射自显影,等等。

因此,在“第三章 中医药对单基因转录(mRNA)作用的研究”中介绍了组织总 RNA 提取、Northern blot;“第九章 分子生物学的一些基本技术”中介绍了重组质粒、质粒转化大肠杆菌、阳性单菌落扩增与小量质粒 DNA 制备、大量质粒 DNA 制备、酶切重组质粒及电泳分离所插入的 DNA、从凝胶中回收 DNA。把这些内容安排在第九章是因为这些技术不仅在 Northern blot 杂交中要用到,其他许多分子生物学实验也要用到。

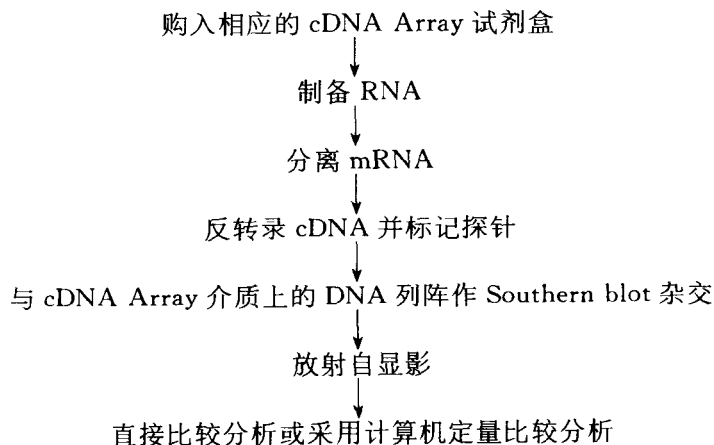
(2) RT-PCR 技术:实验流程如下。



该技术的特点是速度快,一般没有同位素的污染,是目前了解中医药对某个已知单基因转录水平调整作用使用最频繁的技术。因此,在第三章介绍了 RT-PCR 技术。

3. 中医药对多个已知基因转录(mRNA)水平调整作用的研究 cDNA Array 和 Micro Array(基因芯片)这些在 20 世纪 90 年代迅速发展起来的技术效率最高。这些实验所提供的信息量大,一个实验可以观察多至10 000个以上的基因变化,给研究复杂的中医药调控机制和变化提供了强有力的武器。鉴于基因芯片研究目前还需要专门的仪器设备,在一般实验室内无法开展,所以在第四章中详细介绍了 cDNA Array 技术。

该方法是在明确某一中医药方法防治某一病证有效或明确证的变化等前提下,取病人或实验动物的目的组织、培养细胞,提取总 RNA,用于标记探针,进行类似于 Southern blot 的杂交。其大体的实验流程如下。



鉴于该实验标记探针采用 mRNA 要较总 RNA 的灵敏度高,因此,在第三章中还介绍了从总 RNA 中分离 mRNA。

4. 中医药对广泛未知基因差异转录(mRNA)作用的研究 该实验主要采用 DDPCR 技术。大体的实验流程如下。