

基因芯片在肾虚证研究中的应用

邱龙龙 葛继荣

中图分类号: R259 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2012)08-0761-04

摘要: 随着现代科学技术的发展,中医“证”的科学性面临严峻的考验,“证”本质研究一直难以有突破性进展。目前基因芯片技术日趋成熟,将成为“证”本质研究的一个重要手段。本文主要从基因芯片技术的概况及其在中医肾虚证的应用等方面现状做一综述。

关键词: 肾虚证; 基因表达; 中药

The application of the gene chip in the research of nephraesthesia syndrome QIU Longlong, GE Jirong. College of Orthopedics and Traumatology, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China

Corresponding author: GE Jirong, Email: gjrrjgey@sohu.com

Abstract: Along with the development of modern scientific technology, the reasonability of sign in Chinese traditional medicine has faced on serious challenge. The research of sign has not acquired breakthrough progress. The recent gene chip technology gradually becomes mature and will become an important tool in the research of sign. This paper reviews the general condition of gene chip technology and the application of it on the research of nephraesthesia in Chinese traditional medicine.

Key words: Nephraesthesia; Gene expression; Chinese traditional medicine

基因芯片(Genechip 或 Microarray)又称为 DNA 芯片、DNA 微阵列(DNA microarray)等等,是综合运用生物、微电子、微加工和计算机等知识制造的高科技杰作,是进行 DNA 序列分析及基因表达分析的有力工具,具有高通量、高集成、微型化、平行化、多样化和自动化等特点^[1]。长期以来,证候的实质问题一直困扰着中医学界,虽然许多学者为此付出大量、辛勤的劳动,从生化、生理、超微结构等方面进行了深入的研究,也取得了一定的成果,但其实质尚无阐明。随着 2003 年人类基因组精确测序计划的顺利完成,人类进入后基因组时代,基因组学具有的整体性为证候实质研究提供了一个可能的突破口,而基因芯片则是研究基因组学整体性的重要技术。

1 基因芯片技术的概况

20 世纪 80 年代初,人们根据计算机半导体芯片制作技术将晶体管集成在芯片上,并提出将寡核苷酸分子也集成在芯片上的设想^[2]。Bains 等^[3]将

短的 DNA 片段固定在支持物上,通过杂交进行序列分析,做了有益的尝试。1991 年 Fodor 等^[4]首次提出了 DNA 芯片的概念,决定将硅技术与生物学技术融合在一起,借助半导体等技术进行芯片研制,解读生命在长期进化中累计下来的基因信息;1994 年美国 Affymetrix 生物公司的科研人员发明了 DNA 芯片原位合成技术^[5];1995 年 Schena 等^[6]发表了第 1 篇基因微矩阵的论文;1996 年美国 Affymetrix 生物公司制造出世界上第 1 块基因芯片,标志着基因芯片技术步入了广泛研究和应用的高速发展时期。尤其是在 2001 年人类基因组计划(human genome project, HGP)^[7,8]测序工作完成后,基因芯片现已成为后基因组时代基因功能分析的最重要的技术之一。

基因芯片技术是建立在基因探针和杂交测序技术上的一种高效快速的核酸序列分析手段^[9]。它就是在某种固相载体上一般为 1cm^2 - 2cm^2 左右的玻片或者胶片上,按照特定的排列方式大量而有序地排列已知的 cDNA 或寡核苷酸片段,将样品 DNA 通过 PCR 等技术进行扩增和体外转录。然后用不同荧光素标记样品,使之与芯片上已知的探针序列进

行杂交,之后将支持物上没有发生互杂交的片段洗去,通过计算机系统对荧光信号强弱的分析处理,推测出样品中大量相关基因的定量信息,从而对基因的序列及功能进行研究^[10]。它与其他分析基因表达谱的技术,如 RNA 印迹(Northern blot)、cDNA 文库序列测定、基因表达序列分析等的不同之处在于,基因芯片可以在一次试验中同时平行分析成千上万个基因^[11]。

2 基因芯片应用于肾虚证的研究

如何才能将基因芯片技术运用于中医药的研究领域,特别是中医“证”的研究,对于中医证候客观化及现代化有着重大意义。沈自尹院士认为:“遵循中医学研究本身的内在规律,充分利用功能基因组学的研究成果,建立中医证的基因表达谱,将是 21 世纪中医药学的主要发展趋势”。基因表达谱可为辨证论治这一精华再度辉煌而提供现代基因组学依据^[12]。而基因芯片恰恰是研究基因表达图谱的重要手段。

2.1 基因芯片技术在肾阳虚证研究中的应用

阳虚质是指阳气不足,以虚寒表现为主要特征的体质状态^[13]。中医认为肾为先天之本,肾阳虚即命门火衰,可生虚寒。倪红梅等^[14]利用基因芯片技术等方法筛选、分析青少年肾阳虚体质者外周血白细胞的差异表达基因,共筛选出 127 条差异表达基因,其中 63 条呈上调表达,64 条呈下调表达。认为与青少年肾阳虚体质相关的基因表达涉及到细胞周期蛋白类、发育相关、细胞生长、原癌基因和抑癌基因、代谢、离子通道和运输蛋白、细胞骨架和运动、DNA 结合、转录和转录因子、细胞受体、细胞信号和传递蛋白、蛋白翻译合成等多方面。其中 CCNH 基因与 PSMB7 基因的表达差异最大,提示这两条基因可能与青少年肾阳虚体质密切相关。陈晓玲等^[15]针对一个典型肾阳虚家系 15 个成员,采用人类 Oligo 芯片杂交技术对其外周血单个核细胞的差异基因表达谱进行分析研究。芯片的杂交结果显示,共有 53 个基因反复出现在差异基因表达谱之中。这些基因主要为:物质代谢、信号转导、能量代谢和免疫调节等,初步反映出肾阳虚证患者恶寒喜暖、肢冷倦卧、面色淡白等宏观证候在微观基因表达的分子生物学基础。这些基因可能在肾阳虚寒证的发生发展中起着关键性作用。在肾阳虚病证的发生与免疫因素也有相关的报道。杨丽萍等^[16]应用基因芯片技术筛选出与肾阳虚骨关节炎免疫相关的基因

13 条,肾阳虚骨关节炎患者与正常人相比表达下调 4 条,上调 5 条。报道肾阳虚证骨关节炎的发生涉及免疫相关基因表达的异常。李炜弘等^[17]筛选肾阳虚证患者 3 名,正常对照者 3 名,采用基因表达谱芯片进行研究,聚类分析得到 6 条有特征性地差异表达基因,主要涉及细胞周期和凋亡,肿瘤发生以及免疫。提示老龄肾阳虚证的发生涉及一系列免疫紊乱的复杂的过程,可能与个体的衰老存在密切关联。

2.2 基因芯片技术在肾阴虚证研究中的应用

《中藏经》论述了肾阴虚的证候表现:“肾生病,则口热舌干,咽肿,上气,腰脊急痛,嗜卧,足下热而痛;病久不已,则腿痛,小便闭^[18]。”可知,肾阴虚证即是指由于机体肾中阴液亏损,失于滋养,虚热内生所表现的证候。魏敏等^[19]应用基因芯片技术,研究肾阴虚证的基因表达谱。其结果表明:肾阴虚证组和正常对照组间存在差异表达基因共 79 条。其中,表达水平上调的有 6 条,表达水平下调的有 73 条。这些差异表达的基因主要涉及到免疫功能、新陈代谢、蛋白质生物合成、氧化应激、遗传信息过程、离子通道、蛋白质氨基酸去磷酸化、细胞凋亡、细胞信号传导等相关基因。谢丽华等^[20]随机选择绝经后骨质疏松症受试者,分为肾阴虚证组、肾阳虚证组、非肾虚证组和正常组。运用人全基因组表达谱芯片检测 4 组的基因表达谱发现,肾阴虚证组与正常组、肾阳虚证组、非肾虚证组的差异表达基因分别为 197 条、354 条、54 条,其中肾阴虚证组与其他 3 组共同的差异表达基因有 9 条:PROK2(前动力蛋白 2 基因)、ASB1(锚蛋白重复序列和细胞因子信号抑制物的蛋白质家族 1)、MUC12(黏蛋白 12)、GSTM5(谷胱甘肽转移酶 5)、CLCF1(心肌营养蛋白样细胞因子 1)、GPR27(G 蛋白偶联受体 27)、C3orf353(号染色体开放阅读框)和未知基因 chr3:113822408-113822347、chr18:34851804-34851745。这些差异表达的基因主要涉及到生物学过程的调节、细胞代谢途径、生物合成过程、信号转导通路、细胞凋亡、磷代谢过程、JAK-STAT 级联反应的调节、免疫系统发育及炎症反应等。

2.3 芯片技术在肾阴阳两虚证中的应用

目前关于肾阴阳两虚证基因组学的报道相对较少。高黜等^[21]应用基因芯片技术对 1 个糖尿病家系中的 3 例肾阴阳两虚-血瘀证-糖尿病患者与同一家系中的 2 例正常人进行检测。发现差异基因 446 条,其中上调基因 8 条,下调基因 438 条。其中包括与代谢相关 34 条,细胞凋亡相关 6 条,细胞周期相

关 3 条,与糖尿病相关 2 条。与创同中医理论肾的功能相关基因 20 条,与血瘀相关基因 2 条。说明虚证与基因下调有密切联系,发现肾阴阳两虚与广泛的功能基因相关。其中,与中医肾阴阳两虚证表现相关的基因涉及到现代医学机体代谢减慢、免疫功能下降、肿瘤的发生、生殖与衰老等各方面。

3 基因芯片在补肾中药中的应用

沈自尹等^[22]在肾虚证采用自然衰老大鼠模型,肾阳虚证采用皮质酮大鼠模型,用淫羊藿总黄酮(epimedium flavonoids, EF)以药测证,运用 Affymetrix 公司的大鼠全基因组芯片,各两次重复基因表达谱研究。发现老年大鼠和皮质酮大鼠与青年大鼠比较,在下丘脑-垂体-肾上腺-淋巴细胞(HPAT)轴上首先是众多的神经递质显著下调,接下来是生长激素类和性激素类都显著下调,其表达下调的模式呈高度一致,但是通过淫羊藿总黄酮能逆转上述基因的表达。得出结论,两组大鼠均具有肾虚的内涵,但肾阳的主要物质基础是甲状腺激素促进能量代谢的氧化磷酸化过程。韩清民等^[23]采用基因芯片技术检测补肾中药作用后的肾虚型大鼠骨关节炎关节软骨的基因表达。发现补肾方治疗肾虚型骨关节炎有显著差异表达的基因有 52 个,其中上调的有 25 个,下调的有 27 个。由此认为,补肾中药能上调软骨细胞抗凋亡和增殖基因,抑制蛋白酶基因,抑制炎症因子,增强机体免疫功能,重建衰老免疫稳态,重塑基因表达良性平衡,延缓软骨退行性变。杨裕华等^[24]通过小鼠造模,利用鼠脑芯片检测正常对照组和肾阳虚模型组鼠脑基因,以二者荧光信号相对强度比值 ≥ 2 和 ≤ 0.5 筛选差异显著基因,并进一步用 qRT-PCR 对部分差异表达基因进行验证。报道金匱肾气丸、右归丸可使肾阳虚小鼠模型显著下调的激素、黑色素浓集素显著上调,并促进细胞增殖,从而在基因水平上探讨了金匱肾气丸和右归丸的药物作用机理。阚卫兵等^[25]采用 Hulth 方法建立膝关节骨性关节炎模型,给予补肾活血方干预,常规抽提和纯化 RNA,采用 Affymetrix Rat 230 2.0 Array 芯片检测滑膜组织的基因表达变化。芯片结果显示模型组滑膜组织 MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-9、MMP-12 表达明显高于正常组滑膜组织,补肾活血方对其有明显下调作用。得出结论为:MMPs 在膝 OA 滑膜组织表达升高,导致关节软骨降解,促进骨性关节炎的形成,而补肾活血方可以下调 MMPs 的表达,促进软骨的修复,是补肾活血法中药治疗骨性关节炎的

机制之一。

4 芯片技术的问题及展望

虽然基因芯片技术能够为中医证候研究提供了良好的技术平台,但是作为一种新的技术手段,该技术仍存在许多问题。其最主要的问题是成本过高,其次是芯片的标准化问题,即如何将不同实验室、不同操作人员做出的结果进行标准化的问题,有学者认为,这些误差可以通过蛋白质分析技术如酶谱、双向电泳等方法进行验证^[26]。还有一个亟待解决的问题是当我们运用基因芯片筛选出大量的差异基因之后,对于这些已经找到的差异基因部分学者变得无从下手,不知道如何进一步研究这些差异基因。

然而基因芯片技术的出现是生命科学领域中的一次革命,世界各国正在致力于该技术研究,随着科学的深入研究和发 展,该技术会不断的完善和成熟,将对临床疾病的诊断、疾病的发生机制和新药的开发等方面提供一个重要的研究和应用平台,特别是在中医证候本质的研究方面^[27]。如果通过基因芯片技术,证本质的问题能够得到解决的话,那么中医药的发展必将出现一个质的飞跃,为祖国中医药事业的现代化、客观化提供一个重要的研究手段。

【参 考 文 献】

- [1] 陈岩,潘龙. 基因芯片技术研究进展. 齐齐哈尔医学院学报, 2011, 32(17):2828.
- [2] MARSHALL A, HODGSON J. DNA chips: An array of possibilities. Nat Biotechnol, 1998, 16(1):27-31.
- [3] CHANG JC, HILSENBECK SG, FUQUA SA. Genomic approaches in the management and treatment of breast cancer. Br J Cancer, 2005, 92(4):618-624.
- [4] Fodor SP, Read JL, Pirrung MC, et al. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. Science, 1991, 251(4995):767-773.
- [5] Pease AC, Solas D, Sullivan EJ, et al. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(11):5022-5026.
- [6] Schena M, Shalon D, Davis R, et al. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science, 1995, 270(5235):467-470.
- [7] Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. International human genome sequencing consortium initial sequencing and analysis of the human genome. Nature, 2001, 409(6822):860-921.
- [8] Venter JC, Adams MD, Myers EW, et al. The sequence of the human genome. Science, 2001, 291(5507):1304-1351.
- [9] 王洪水,侯相山. 基因芯片技术研究进展. 安徽农业科学, 2007, 35(8):2241-2243.

(下转第 746 页)

体间移位等改变,有研究证明新的椎体骨折与椎体成形术有关,这不仅表现在伤椎上,同时表现在身体任何骨器官,尤其是增加了邻近椎体骨折的风险^[5-6]。补肾壮骨汤可以明显增加骨密度减少了脊柱各个椎体压缩骨折的发生,理所当然也就减少了骨水泥成形术后相邻椎体压缩骨折的发生。

老年性骨质疏松性骨折,以骨量减少、骨皮质和骨小梁变薄、变小,骨脆性增加为特征,极易发生压缩骨折。中医认为本病的病因主要是多虚、多瘀所致。治疗方面:①补虚,主要是脾虚、肾虚,应健脾益肾。湿热内生,配合清热化湿,有助于调理脾肾。健脾有助于气血供应。肾主骨,补肾有助于壮骨。②溶血化瘀,有助于改善微循环。用药分三部分:①健脾药:苍术、苡仁有去湿作用,忍冬藤、黄柏有清热化湿作用,怀牛膝、木瓜能补脾肾、祛风湿、通络止痛。②活血通络药:当归尾、三七、全蝎、蜈蚣、土元有活血通络作用。③补肾壮骨药:自然铜、骨碎补、补骨脂起到补肾壮骨作用。患者服用后,症状有明显改善,且优于常规补钙疗法。因此,本药对老年性骨质

疏松患者非常有利,值得临床进一步推广应用。

【 参 考 文 献 】

[1] Barr JD, Barr MS, Lemley TJ, et al. Percutaneous vertebroplasty for pain relief and spinal stabilization. Spine,2000,25(8):923-928.

[2] BouzaC, LopezT, Magro A, et al. Efficacy and safety of balloon kyphoplasty in the treatment of vertebral compression fractures: a systematic review. Eur Spine J,2006, 15(7):1050-1067.

[3] 顾冬云,戴尅戎,张鹏. 椎体成形术的生物力学研究. 中华骨科杂志,2006,26(6): 421-423.

[4] 刘伟,贾连顺. 经皮椎体成形术和后凸成形术的充填材料及生物力学研究进展. 中国矫形外科杂志,2006,14(9):703-706.

[5] Chiang CK, Wang YH, Yang CY, et al. Prophylactic vertebroplasty may reduce the risk of adjacent intact vertebra from fatigue injury: an ex vivo biomechanical study. Spine, 2009, 34(4):356-364.

[6] 陆声,徐永清,张美超,等. 骨质疏松椎体增加后对相邻椎体生物力学影响的有限元研究. 中华创伤骨科杂志, 2006,8(9):864-867.

(收稿日期:2012-03-27)

(上接第 763 页)

[10] 俞晓军,胡志前. 基因芯片技术在休克中的应用. 创伤外科杂志,2011. 13(5):465.

[11] Roberts S S, Mori M, Pattee P, et al. GABAergic system gene expression predicts clinical outcome in patients with neuroblastoma. J Clin Oncol,2004,22(20):4127-4134.

[12] 沈自尹. 基因科学与 21 世纪中医药的走向. 上海中医药杂志,2000,34(10):7-9.

[13] 姚实林. 阳虚质临床辨治浅析. 新中医,2007,39(11):92.

[14] 倪红梅,何裕民,方盛泉. 青少年肾阳虚体质差异表达基因的筛选研究. 浙江中医杂志,2007,34(9):1220-1222.

[15] 陈晓玲,高志芬,丁维俊,等. 肾阳虚证患者血液生化、免疫指标与基因表达谱结果的对比研究. 四川中医,2007,25(5):11-13.

[16] 杨丽萍,王明臣,王米渠,等. 基因芯片技术研究针灸对肾阳虚证骨关节炎患者免疫相关基因表达的影响. 辽宁中医杂志,2006,33(3):257.

[17] 李炜弘,雍小嘉,范怀昌,等. 老龄肾阳虚证的差异表达基因谱分析. 时珍国医国药,2009,20(5):1210.

[18] 于立志,于春泉. 肾阴虚证的中医研究进展. 天津中医药大学学报,2011,30(2):125.

[19] 魏敏,赵晓山,孙晓敏,等. 肾阴虚证患者的基因差异表达. 广

东医学,2010,31(23):3017-3019.

[20] 谢丽华,赵毅鹏,陈可,等. 绝经后骨质疏松肾阴虚证相关基因的信息学分析. 中国组织工程研究与临床康复,2011,15(15).2833-283.

[21] 高黝,高泓,王米渠. 1 个糖尿病家系肾阴阳两虚血瘀证糖尿病的差异表达基因分析. 现代中西医结合杂志,2005,14(1):1.

[22] 沈自尹,黄建华,陈伟华. 以药测证对肾虚和肾阳虚大鼠基因表达谱的比较研究. 中国中西医结合杂志,2007,27(2):135.

[23] 韩清民,刘洪江,梁祖建,等. 补肾方对肾虚型大鼠膝关节炎软骨病变基因表达谱的影响. 中国组织工程研究与临床康复,2008,12(46):9036.

[24] 杨裕华,李震,李文. 补肾中药对肾阳虚小鼠模型影响的脑基因图谱研究. 辽宁中医杂志,2009,36(12):2174.

[25] 阚卫兵,袁琴,宋鹏飞. 自拟补肾活血方对家兔膝关节骨性关节炎模型滑膜组织 MMPs 的影响. 广西中医药,2011,34(2):57.

[26] 薛晓红,刘胜. 基因芯片及其在中医药研究中的应用思考. 中国医药学报,2003,8(9):556-557.

[27] 徐清华,余裕炉. 基因芯片技术的研究进展. 中国优生与遗传杂志,2007. 15(1):14.

(收稿日期:2012-02-14)

基因芯片在肾虚证研究中的应用

作者: 邱龙龙, 葛继荣, QIU Longlong, GE Jirong
作者单位: 福建省福建中医药大学骨伤学院, 福州, 350108
刊名: 中国骨质疏松杂志 **ISTIC**
英文刊名: CHINESE JOURNAL OF OSTEOPOROSIS
年, 卷(期): 2012, 18(8)

参考文献(27条)

1. 陈岩;潘龙 [基因芯片技术研究进展](#)[外文期刊] 2011(17)
2. MARSHALL A;HODGSON J [DNA chips:An array of possibilities](#)[外文期刊] 1998(01)
3. CHANG JC;HILSENBECK SG;FUQUA SA [Genomic approaches in the management and treatment of breast cancer](#)[外文期刊] 2005(04)
4. Fodor SP;Read JL;Pirrung MC [Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis](#)[外文期刊] 1991(4995)
5. Pease AC;Solas D;Sullivan EJ [Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis](#) [外文期刊] 1994(11)
6. Schena M;Shalon D;Davis R [Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray](#)[外文期刊] 1995(5235)
7. Lander ES;Linton LM;Birren B [International human genome sequencing consortium initial sequencing and analysis of the humangenome](#)[外文期刊] 2001(6822)
8. Venter JC;Adams MD;Myers EW [The sequence of the human genome](#)[外文期刊] 2001(5507)
9. 王洪水;侯相山 [基因芯片技术研究进展](#)[外文期刊] 2007(08)
10. 俞晓军;胡志前 [基因芯片技术在休克中的应用](#) 2011(05)
11. Roberts S S;Mori M;Pattee P [GABA ergic system gene expression predicts clinical outcome in patients with neuroblastoma](#)[外文期刊] 2004(20)
12. 沈自尹 [基因科学与21世纪中医药的走向](#)[期刊论文]-[上海中医药杂志](#) 2000(10)
13. 姚实林 [阳虚质临床辨治浅析](#)[外文期刊] 2007(11)
14. 倪红梅;何裕民;方盛泉 [青少年肾阳虚体质差异表达基因的筛选研究](#) 2007(09)
15. 陈晓玲;高志芬;丁维俊 [肾阳虚证患者血液生化、免疫指标与基因表达谱结果的对比研究](#)[期刊论文]-[四川中医](#) 2007(05)
16. 杨丽萍;王明臣;王米渠 [基因芯片技术研究针灸对肾阳虚证骨关节炎患者免疫相关基因表达的影响](#) 2006(03)
17. 李炜弘;雍小嘉;范怀昌 [老龄肾阳虚证的差异表达基因谱分析](#) 2009(05)
18. 于立志;于春泉 [肾阴虚证的中医研究进展](#) 2011(02)
19. 魏敏;赵晓山;孙晓敏 [肾阴虚证患者的基因差异表达](#) 2010(23)
20. 谢丽华;赵毅鹏;陈可 [绝经后骨质疏松肾阴虚证相关基因的信息学分析](#) 2011(15)
21. 高黝;高泓;王米渠 [1个糖尿病家系肾阴阳两虚血瘀证糖尿病的差异表达基因分析](#) 2005(01)
22. 沈自尹;黄建华;陈伟华 [以药测证对肾虚和肾阳虚大鼠基因表达谱的比较研究](#) 2007(02)
23. 韩清民;刘洪江;梁祖建 [补肾方对肾虚型大鼠膝关节炎软骨病变基因表达谱的影响](#) 2008(46)
24. 杨裕华;李震;李文 [补肾中药对肾阳虚小鼠模型影响的脑基因图谱研究](#) 2009(12)
25. 阚卫兵;袁琴;宋鹏飞 [自拟补肾活血方对家兔膝关节骨性关节炎模型滑膜组织MMPs的影响](#) 2011(02)

26. [薛晓红;刘胜](#) [基因芯片及其在中医药研究中的应用思考](#) 2003(09)

27. [徐清华;余裕炉](#) [基因芯片技术的研究进展](#) 2007(01)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zggzsszz201208022.aspx