

用基因芯片筛选针刺衰老大鼠涌泉穴的 318 个差异基因初报*

王米渠¹ 张卫¹ 李珉² 王刚² 吴斌¹ 罗永芬¹ 许锦文³

内容提要 目的:应用基因芯片研究针刺涌泉穴对 D-半乳糖所致衰老大鼠基因表达的影响。方法:将成年健康大鼠随机分为模型组与针刺组,两组每日皮下注射 10% D-半乳糖 0.5ml 造模,造模的同时针刺组予以针刺涌泉穴,7 周后处死,并摘取肝脏提取 mRNA,作逆转录为 cDNA 以备检测。随机选用 2305 条大鼠 cDNA 制备成表达谱芯片,用 Cy3 和 Cy5 两种荧光物质分别标记两组大鼠肝组织的 cDNA,制备成探针与表达谱芯片进行杂交,通过计算机扫描后进行数据分析,初步筛选出了差异表达基因 318 条,其中表达上调的有 137 条,表达下调的有 181 条,并对其中差异最为显著的 55 条作了初步分析。结果:针刺涌泉穴对衰老大鼠的基因表达的影响涉及免疫、生长发育、基础代谢和细胞骨架运动等多个方面,这从基因水平证明了针刺治疗是一整体调节作用。结论:应用基因芯片技术能够同时半定量的研究数千条基因的表达状态,可以从微观基因水平研究针刺的整体机理,并判定其分子疗效,进而提高中医的科研水平。

关键词 基因芯片 差异表达基因 针刺 涌泉穴 衰老

Preliminary Analysis of 318 Differentially Expressed Genes Screened out by cDNA Microarray of Aging Rat Model Treated by Acupunctured at Yongquan Point WANG Mi-qu, ZHANG Wei, LI Min, et al *Chengdu TCM University, Chengdu (610075)*

Objective: To study the effect of acupuncture Yongquan point on gene expression in aging rat model induced by D-galactose using cDNA microarrays. **Methods:** Rats were divided to the model group and the acupuncture group at random. Aging model were made by subcutaneous injection of D-galactose. The model rats in the acupuncture group were treated by acupunctured at Yongquan point every day for 5 times a week. The rats were sacrificed after seven weeks, the liver was taken out to extract mRNA for reverse transcription cDNA. 2305 cDNA were elected to made microarray for analysis. cDNA extracted from model rats were labeled with Cy3-dUTP while cDNA extracted from acupuncture group were labeled with Cy5-dUTP. These probes were hybridized with cDNA microarray, scanned and analyzed. There were 318 differentially expressed in rats of the acupuncture group, 137 were up-regulated and 181 were down-regulated. Preliminary analysis was made on 55 cDNA with most significant difference. **Results:** Acupuncture has vast effects on aging rats' gene expression, involving multiple scopes as immunity, growth and development, basal metabolism and cell skeleton motion. Acupuncture is proved, on gene level, to have a holistic regulation. **Conclusion:** The state of thousands gene expression could be studied simultaneously by cDNA microarray semiquantitatively, through which the holistic mechanism of acupuncture could be investigated on microcosmic gene level to evaluate its molecular effect, so as to raise the level of TCM research.

Key words cDNA microarray, differentially expressed gene, acupuncture, Yongquan point, aging

基因芯片(DNA Microarray)是当今生命科学最前沿的分子生物学技术,它可在一张芯片上同时研究上千条基因表达的改变,以微观整体的角度观察机体的变化,也是目前与中医整体观相符的研究针灸、中药等

复杂问题的最佳方法选择⁽¹⁾。许多人士亦看好基因芯片在中医研究上的前景,但尚未见报道。我们首先尝试应用基因芯片技术研究针刺对衰老模型大鼠的基因表达谱的影响,初步筛选出了针刺作用的差异表达基因谱,为进一步深入研究针刺的作用机理有着积极的意义,现初报如下。

* 国家自然科学基金项目(No. 0171126)

1. 成都中医药大学(成都 610075); 2. 四川大学生命科学学院;

3. 新加坡国立癌症中心

材料与方法

1 动物 雄性 5 周龄 SD 大鼠 8 只, 体重(160 ± 10)g, 由成都中医药大学实验动物中心提供。

2 试剂与仪器 D-半乳糖为上海试剂二厂产品(批号:980309); WQ-IOC 多电子穴位测定治疗仪为北京海淀电子医疗仪器厂生产; MGEC-20S 芯片为上海博星基因芯片有限公司产品。

3 造模及治疗方法 将大鼠随机分为模型组与针刺组。两组动物均于每日上午 9:00 皮下注射 10% D-半乳糖 0.5ml, 连续注射 7 周⁽²⁾。2 周后模型组动物出现精神萎靡, 畏寒怕冷, 毛色枯黄无光泽, 皮肤松弛, 行动迟缓等症状, 说明造模成功。针刺组在造模同时每周 1~周 5 上午 9:30 依据有关文献⁽³⁾, 并以比较解剖取穴法和模拟骨度取穴法为参考依据, 在后肢足心正中凹陷中选取涌泉穴。电针涌泉穴, 频率 10Hz, 强度 2mA, 每次 3min, 7 周后处死动物, 摘取肝脏以备检测(由于肝脏中 RNA 含量最为丰富, 且中医学认为衰老先从肝脏开始)。

4 芯片制备 芯片所用的 2 305 个靶基因 cDNA 克隆由博星基因芯片有限公司提供, 用通用引物进行 PCR 扩增, PCR 产物长度为 1000 ~ 3000bp (少数例外), PCR 反应及产物纯化用标准方法进行⁽⁴⁾, 通过琼脂糖电泳监控 PCR 质量。靶基因以 0.5g/L 溶解于 3 倍 SSC 溶液中, 用 Cartesian 公司的 Cartesian7500 点样仪及 Telechem 公司的硅烷化玻片进行点样, 点样后玻片进水合 2h, 室温干燥 0.5h, UV 交连(能量值设定 65mJ/cm), 再分别用 0.2% SDS、水及 0.2% 硼氢化钠溶液处理 10min, 凉干备用。

5 探针制备 用 Piotr Chomczynski 一步法抽提总 RNA⁽⁵⁾。用 Oligotex mRNA Midi 试剂盒(Quagen 公司)纯化 mRNA。用 Cy3-dUTP 标记衰老模型组动物肝组织 mRNA, 用 Cy5-dUTP 标记针刺组动物肝组织 mRNA。乙醇沉淀后溶解在 20μl 5 倍 SSC 加 0.2% SDS 杂交液中。

6 杂交及洗涤 将基因芯片和杂交探针分别在

95℃ 水浴中变性 5min, 将探针加在基因芯片上, 用盖玻片封片, 置于 60℃ 杂交 15~17h, 然后揭开盖玻片, 分别用 2 倍 SSC 加 0.2% SDS、0.1% SSC 加 0.2% SDS、0.1% SSC 洗涤 10min, 室温干燥。

7 检测与分析 用 General Scanning 公司的 ScanArray 3000 扫描芯片, 用 ImaGene 3.0 软件分析 Cy3 和 Cy5 两种荧光信号的强度和比值。

结 果

据总数为 n 的有效基因(select = 1, Cy3、Cy5 值两者皆大于 200, 或者其一大于 800)的比值自然对数值 $\ln Ri = \ln(Cy5/Cy3)$, 以 Ri 值在 0.1~10 之间的有效基因作为均一化依据, 算出这些基因比值自然对数平均值 $\ln(R')$ 得到均一化系数。将所有数据的 Cy3 标记强度乘以均一化系数, 得出调整后的 Cy3*, 算出所有基因的比值值 $(Cy5/Cy3^*)$ 比值。筛选出比值大于 2 和小于 0.5 的基因⁽⁶⁾得到 318 条与两种探针杂交时表现出较大差异的差异表达基因。现将差异最为显著的前 20 条基因列表如下, 见表 1。

表 1 表达差异最显著的前 20 条基因

表达上调的前 10 条基因		表达下调的前 10 条基因	
Genbank ID	比值	Genbank ID	比值
AW761867 胸腺基因	5.170	AU067242 脑组织 mncb 基因	0.070
NM 007482 精氨酸酶基因	4.713	X03672β 肌动蛋白基因	0.109
D87325 GSG1 基因	4.445	Z37107 环氧化物水解酶基因	0.124
U04827 脂肪酸结合蛋白基因	4.281	J05261 防护蛋白基因	0.147
U12403 Cas-19 基因	3.741	A1451539 淋巴结 NbMLN 基因	0.166
M16356 原蛋白 II 基因	3.726	NM-007817 细胞色素 P450 基因	0.170
D31943 SH2 结合蛋白基因	3.488	AF004934 Ste20 激酶基因	0.171
Y00225 核糖体蛋白 L3 基因	3.331	AA124525 胸腺 2NbMT 基因	0.178
U70494 组蛋白 H2A Z 基因	3.321	AW108540 铁依赖蛋白磷酸脂合成酶基因	0.196
V00722β1 珠蛋白基因	3.319	X03920 GSHPx 基因	0.200

根据筛选出的前 55 条基因的已知功能⁽⁶⁾, 我们将初步分类分析如下, 见表 2。

1 免疫相关基因 在差异表达前 55 条基因中主要与免疫相关的有 7 条, 其主要表现为上调(占 5 条), 如 Genbank ID 为 U38967 的 thymosin B4 gene 经针刺后其表达上调了 3.234 倍, 已知其主要功能是增加胸腺素的分泌。胸腺素是由胸腺分泌的一种蛋白质激

表 2 基因功能初步分类变化最显著的 5 条基因

免疫相关		生长发育相关		基础代谢相关		细胞骨架运动相关	
Genbank ID	比值	Genbank ID	比值	Genbank ID	比值	Genbank ID	比值
AW761867	5.170	U04827	4.281	D87325	4.445	X03672	0.109
V00722	3.319	C88540	3.250	NM-007482	4.713	AF181685	0.266
U38967	3.234	Y00225	3.331	M84145	0.270	M13446	0.281
M76987	3.092	X73829	3.032	NM-011172	0.236	U89915	0.283
A1451539	0.149	AF041376	0.291	X03920	0.196	AA691777	0.293

注: 此表只列出各类变化最显著的 5 条基因

素,它可刺激淋巴细胞的合成与成熟,增强机体的免疫功能⁽⁷⁾。V00722 与 M76987 分别是 β_1 -球蛋白基因和 α -球蛋白基因,调控着这两种球蛋白的生成,它们也分别上调了 3.319 和 3.092。表明针刺能从基因表达的角度上改善衰老机体的免疫功能。

2 生长发育相关基因 本实验中与生长发育相关基因表达改变最为显著的 5 条中 U04827 是脑脂酰胺合成蛋白基因,此基因的正常表达能促使神经细胞与神经胶质细胞正常发育分化⁽⁸⁾。Y00225 与 X73829 均是核糖体蛋白基因,核糖体是机体蛋白质合成的场所,这两条基因表达上调比值分别为 3.331、3.032,说明了针刺可以提高机体蛋白合成的功能,改善衰老造成的机体负氮平衡状况。C88540 是鼠胚胎基因,其具体功能尚不完全清楚。下调明显的 AF041376 基因是细胞死亡激活因子(cell death activator)基因,它的下调可使细胞死亡激活因子的产生下降,延长细胞寿命⁽⁹⁾。

3 基础代谢相关基因 在与基础代谢相关的 17 条基因中大部分是处于下调状态的,其中 12 条下调,5 条上调。在这些基因中除极个别基因单独分析有明确意义外,如 M84145(比值为 0.270)为延胡索乙酰乙酸水解酶基因(此酶升高可致酪氨酸血症,表现为进行性肝肾功能衰竭),大部分不能从单一基因分析,如同为细胞色素相关的基因 D31943 表现为上调(比值为 3.488),而 NM-007817 则表现为下调(比值为 0.166),其它与氨基酸代谢相关的基因如精氨酸酶基因(NM-007482 比值为 4.713)上调,脯氨酸脱氢酶基因(NM-011172 比值为 0.236)与天冬氨酸转氨酶基因(J02623 比值为 0.230)则表现为下调。这种结果一方面可能与降低组织代谢水平,继而减轻自由基对组织的损伤,达到保护组织与延缓衰老的作用。另一方面也需整体研究方可得出进一步的结论。

4 细胞骨架运动相关基因 此类基因和细胞的基本结构功能相关,如细胞支架蛋白基因(X03672 比值为 0.109)、膜蛋白基因(AF181685 比值为 0.266)及微管蛋白基因(M13446 比值为 0.281),它们是细胞基本结构完整与功能正常的基础。在我们初步分析的这些基因中属于此类的有 7 条,它们都表现为下调,这或许与降低各种蛋白的异常高表达,维持细胞膜的正常活动能力有关。其中内在规律,尚有待于进一步的研究。

讨 论

基因芯片技术是当今分子生物学领域最先进的技术,它可在一张芯片上同时把上千条基因作为一个整

体来研究,它高密度的显微排阵、大批量的基因筛选和巨大的功能信息处理能力,改变了以往把生命现象分解分析的思维方法,对极其复杂的生命现象及疾病研究提供了一种前所未有的方法,对生命科学具有划时代的意义⁽¹⁰⁾。利用基因芯片技术人们不但可以研究出很多基因的功能,同时利用它的整体研究的特色可以从基因层次对疾病精确分类⁽¹¹⁾。针灸是中医学的重要组成部分,分子生物学是当今生命科学发展的前沿,基因的功能则是生命表现的基础,对各种生命现象的解释有重大意义,因此针灸的研究也应当在这方面做出努力,向科学前沿靠近。中医学的最大特点之一是将人体作为一个有机整体来研究,大到藏象、经络,小到中药、穴位,都是一个复杂的有机系统,各种基因间也有其内在联系,所以靠简单的一两个基因数据的研究是不能窥视其内在规律的,而必须寻找一种可在整体上研究的方法来。基因芯片技术使我们能够从生物自然整体上研究出针刺对基因表达的影响,从基因组的角度研究针刺的作用机理,在微观整体上探讨针刺作用的物质基础。进一步深入研究或许可以发现针刺作用的功能基因组来,这对经络的本质研究也有重大意义。

本实验率先应用基因芯片技术研究了针刺涌泉穴对衰老模型大鼠基因表达的影响,初步筛选出了 318 条差异表达基因,我们对其中差异最为显著的 55 条作了初步分析,结果表明了针刺对基因表达的影响是极其复杂的,它涉及到了免疫、基础代谢、生长发育等多方面基因的表达。虽然由于经费等问题,此次实验还存在缺陷,需进一步完善深入研究,但它为针刺的基因组研究起到了一个良好的开端,使我们看到了应用基因芯片研究针刺作用机理及经络、腧穴实质的希望和前景。

参 考 文 献

1. 王米渠,蔡玉泉主编. 中医遗传学概论·基因与寒热辨证. 成都:四川科技出版社,2001:39.
2. 张洪泉,余文新. 中华抗衰老医药学. 北京:科学出版社,2000:567.
3. 邓春雷,殷克敬主编. 实验针灸学. 北京:人民卫生出版社,1998:148.
4. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitor. Science 1999;286(5439):531—537.
5. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162:156—159.
6. V Amekusick. 人类孟德尔遗传. 第 11 版. 北京:北京医科大

学中国协和医科大学联合出版社,1996:353.
7.Sasaki H, Fujii Y, Masaoka A, et al. Elevated plasma thy-
mosin alphas levels in lung cancer patients. Eur J Cardiothorac
Surg 1997;12(6):885—891.
8. Kurtz A, Zimmer A, Schnutgen F, et al. The expression pat-
tern of a novel gene encoding brain-fatty acid binding protein
correlates with neuronal and glial cell development. Develop-
ment 1994;120(9):2637—2649.
9. Inohara N, Koseki, T, Chen S, et al. CIDE, a novel family

of cell death activators with homology to the 45 kDa subunit of
the DNA fragmentation factor. EMBO J 1998;17(9):2526—
2533.
10. 罗非群. 基因芯片技术的出现及对生命科学发展的影响. 医
学与哲学 1999;(9):18.
11. Schena M, Shalon D, Heller R, et al. Parallel human genome
analysis: microarray-based expression monitoring of 1000
genes. PNAS USA 1996;93:10614—10619.
(收稿:2001-09-12 修回:2002-07-02)

祛瘀消斑胶囊对动脉粥样硬化患者血管内皮依赖性舒张功能的影响*

赵玉霞 刘运芳 杨 竞

1999 年 10 月~2001 年 10 月,我们应用高频超声技术观
察 31 例瘀瘀互阻型动脉粥样硬化患者服用祛瘀消斑胶囊治疗
前后肱动脉内皮依赖性血管舒张功能的变化,并与 16 名健康
人进行了比较,现报告如下。

临床资料

1 病例选择 全部患者均经周围血管超声检查发现双侧
颈动脉和股动脉中任一条动脉内膜—中层厚度(intimal-medial
thickness)>1.2mm,并经病史、查体、生化、心电图检查等确诊;
同时参照 1994 年国家中医药管理局颁布的《中医诊断标准》,
辨证属瘀瘀阻络型(症见形体肥胖、胸部闷痛或刺痛、舌质紫
暗、脉滑)。排除急性心脑血管疾病及严重肝肾疾病的患者。

2 一般资料 治疗组 31 例,男 18 例,女 13 例;年龄 26~
75 岁,平均(54.5±9.6)岁;病程 1.5~23 年,平均 16 年;冠心
病 16 例(包括陈旧性心肌梗死 9 例,心绞痛 7 例),高血压病 15
例。选我院查体健康人 16 名作对照,男 9 名,女 7 名;年龄 35
~75 岁,平均(55.6±9.8)岁。

治疗方法 治疗组口服祛瘀消斑胶囊(药物组成:生水蛭、
生山楂、大黄、海藻、莪术、泽泻,每粒胶囊含生药 0.3g,由山东
大学齐鲁医院制药厂提供),每次 4 粒,每日 3 次,观察时间为 8
个月(其间服用降脂药者未列入观察之内)。

检测方法:健康人在休息状态下一次测定及治疗组用药前
后两次测定肱动脉的血管舒张反应,采用美国 HP 公司
SONOS-5500 彩色多普勒超声诊断系统和 7.0MHz 线阵探头,
探查深度 4cm,同步记录心电图。每位受试者分别记录休息
时、反应性充血以及含服硝酸甘油后肱动脉的管腔内径变化。
方法如下:受试者在测试前休息 10min,取仰卧位,右上肢外展
15°,掌心向上,以二维超声扫描肱动脉纵切面,当动脉前后壁
内膜清晰显示时记录肱动脉图像。将血压计袖带置于肱动脉
远端,充气至 200mmHg,持续加压 5min 后放气,放气后 60~
90s 内记录肱动脉图像。休息 15min 待血管内径恢复至试验前
状态,舌下含服硝酸甘油 0.5mg,3~4min 时再次记录肱动脉内
径变化。整个测试过程中超声探头位置固定不变。所有图像

均存储于录像带中供嗣后分析。

测量指标:回放录像资料,在心电图 R 波顶点时相测量肱
动脉同一部位舒张末期内径,每位受试者均测量休息时(D₀)、
反应性充血时(D₁)及含服硝酸甘油后(D₂)的肱动脉内径,连续
测量 3 个心动周期,并取均值。以休息时的肱动脉内径为对照
值,计算血管内径的下列变化:反应性充血后血管内径的变化
为 ΔD%=(D₁-D₀)/D₀,含服硝酸甘油后血管内径的变化为
ΔD%=(D₂-D₀)/D₀。

统计学方法:采用 χ² 检验和配对 t 检验。

结 果 祛瘀消斑胶囊对肱动脉舒张功能的影响,见表 1。
对照状态下两组肱动脉内径差异无显著性,治疗组治疗前反
应性充血引起的内皮依赖性血管舒张功能明显减弱,与健康人比
较差异有显著性(P<0.01);含服硝酸甘油后肱动脉内径明显
增大,但与健康人比较差异无显著性。治疗组治疗后反应性充
血引起的肱动脉舒张功能明显改善(P<0.01),而含服硝酸甘
油后肱动脉内径的变化与治疗前比较差异无显著性。

表 1 祛瘀消斑胶囊对肱动脉舒张功能
的影响 (x±s)

组别	例数	对照状态肱动脉	充血反应状态	服硝酸甘油
		内径(mm)	(ΔD%)	
健康人	15	3.79±0.64	8.17±4.82	22.90±4.34
治疗	31	3.93±0.58	2.44±2.91*	20.50±7.21
		3.90±0.54	7.53±3.24 [△]	23.49±6.78

注:与健康人组比较,*P<0.01;与本组治疗前比较,[△]P<0.01

讨 论 本研究中我们利用高频超声技术测定了健康人
和动脉粥样硬化患者服用祛瘀消斑胶囊前后肱动脉内皮依赖
性及非依赖性血管舒张功能的变化。结果显示,与健康人相
比,动脉粥样硬化患者的非内皮依赖性血管舒张功能无明显改
变,但内皮依赖性血管舒张功能显著减弱。服用祛瘀消斑胶囊
8 个月后,非内皮依赖性血管舒张功能改善差异无显著性,但内
皮依赖性血管舒张功能显著改善,并接近健康人水平。祛瘀消
斑胶囊中主以水蛭活血化瘀,改善微循环和修复内皮功能,辅
以莪术、大黄破血逐瘀、荡涤血管之污浊;佐以山楂、海藻降脂
化痰,共奏活血化瘀通络之功,结果显示这些作用对于动脉粥
样硬化患者的内皮功能异常有明显的疗效。

* 山东省卫生厅“九五”攻关课题(No.9711)

山东大学齐鲁医院中医科(济南 250012)

(收稿:2001-06-11 修回:2002-07-15)