

· 学术探讨 ·

以药测证对肾虚证基因网络和信号转导的研究

沈自尹

摘要 总结了从细胞内的小的信号转导通路组成的网络到中等的下丘脑—垂体—肾上腺—胸腺 (HPAT) 轴网络和涵盖全身, 联络多个重要系统的大的神经内分泌免疫 (NEI) 网络, 提出人体受到外界干预而形成的“病”或“证”, 亦都是以众多的分子网络变化为基础。描绘了信号转导通路的方式、能力、研究信号转导通路变化的方法, 提出“以药测证”是按系统生物学方法研究证的干预手段。作者采用补肾复方以药测证发现肾阳虚证涵盖着 NEI 调节网络, 而且直接作用于 NEI 网络的调控中枢—下丘脑。采用从补肾复方中提取的有效组分——淫羊藿总黄酮 (EF), 发现它通过 NEI 网络的下行通路激活免疫系统, 能激活生长激素轴、性腺轴、淋巴细胞凋亡 3 个方面的网络机制发挥分子网络效应; 也观察到 EF 调控基因网络表现出多种多样的方式, 在淋巴细胞凋亡和增殖的网络机制中重塑对立的凋亡相关基因及增殖相关基因平衡; 能会聚与整合共刺激分子、转化生长因子及多个原癌基因, 成为启动促增殖、抗凋亡的上游因子网络; 使 NIK/IKK/I κ B/Rel/NF κ B 信号转导通路中对立的 I κ B α 与 NF κ B 同时升高, 既维持 NF κ B 适度升高, 又保证 NF κ B 呈强者态势发挥其分子调控网络中的枢纽作用, 并由此观察到肾虚证 HPAT 轴上有序的基因网络调控路线图谱。

关键词 网络; 信号转导; 肾虚证; 以药测证

Studies of Gene Networks and Signal Transduction of Kidney Deficiency Syndrome by Syndrome Differentiation through Drug Effects SHEN Zi-yin *Institute of Integrative Chinese and Western Medicine, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai (200040)*

Abstract Three kinds of networks were summarily described in this review including the small intracellular molecular networks, the middle-scale networks of hypothalamus-pituitary-adrenal-thymus (HPAT) axis and the large network, neuroendocrine-immune (NEI) network, covering the whole organism and linking multiple systems together. The hypothesis was expressed that the “disease” or “syndrome” formed in the human body by the intervention from outside world is based on the changes of multi-molecular network. In this paper, the pattern and ability of signal transduction channel and the methods of studying changes in it were also described, and raised, herefrom, “to determine syndrome by drug effects (DSDE)” is the intervention means for studying syndrome in the light of systemic biological methods. We found Kidney-yang deficiency syndrome covered the NEI network and the regulating center located in hypothalamus with Compound Bushen Recipe (CBR, Kidney-tonifying recipe). By intervention with EF, an effective component of CBR, it was found that EF can activate the immune system and the three networks, including growth axis, sex hormone axis and lymphocyte apoptosis network in HPAT axis through the downward pathway of NEI network to play its efficiency of molecular network. There are many regulation patterns of EF on networks. For example, in the network mechanism of lymphocyte apoptosis and proliferation, EF can reconstruct the balance of the opposite apoptosis related genes and proliferation related genes; EF can assemble and integrate co-stimulating molecules, transform growth factors (TGF), and several oncogenes to form an upstream factor network for initiating the proliferation and anti-apoptosis pro-

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 904090010)、上海市科委重点基础研究计划 (No. 04JC14090)

作者单位: 复旦大学附属华山医院中西医结合研究所 (上海 200040)

Tel: 021-62489999 6311, E-mail: ziyishen@21cn.com

万方数据

motion; EF can simultaneously up-regulate the two opposite genes expression of I κ B and NF κ B in NIK/IKK/I κ B/Rel/NF κ B signal transduction channel, which could not only control the rising of NF κ B in a moderate range, but also guarantee its predominant status to exert its hinge role in molecule regulating network, by which gene network regulation atlas in HPAT axis of Kidney-deficiency syndrome was observed.

Key words network; signal transduction; Kidney-deficiency syndrome; to determine syndrome by drug effects

分子生物学的研究证实,细胞内存在着受体介导的多种细胞信号传导通路,这些通路之间存在着复杂的相互作用,形成了一个细胞信号转导通路组成的网络系统。生物有机体是由无数个大大小小、由众多小节点(蛋白质、RNA、DNA、小分子)组成各种各样,如规则的、随机的、复杂的网络所构成。因此,人体受到外界干预而形成的“病”或“证”,亦都是以众多的分子网络变化为基础^[1]。

1 网络与信号转导通路

网络有大有小,大的如 Basedovsky 提出的神经内分泌免疫(NEI)网络,它不但涵盖了全身,而且联络了多个重要的系统,中等的如下丘脑-垂体-肾上腺-胸腺(HPAT)轴,它是 NEI 网络中最重要分支网络;小的如细胞凋亡机制网络,它存在于各种系统、各种细胞里面。网络又是由许多信号转导通路所组成^[2],细胞内一些主要的,如与细胞代谢、增殖有关的信号转导通路已经基本阐明;与细胞凋亡相关的信号转导通路也有了大体的了解;与细胞运动、黏附、转运有关的信号转导通路正逐渐形成研究的新热点,这方面的研究正方兴未艾。

2 信号转导通路的方式和能力

一种信号往往可同时激活几种细胞内不同的网络,或信号转导通路,细胞具有分检信号、合并同类信号,即具有信号会聚能力,并且对不同的信号区别轻重缓急,做出最有利于细胞生存和发挥功能的效应,即具有信号整合能力,这种会聚和整合反映了调控的整体性。同时哪一个信号转导通路被激活与不断放大而呈强者态势,就会在网络的牵动变化中占主导地位。例如损伤常可同时启动细胞保护和细胞凋亡的信号转导通路,细胞的最终命运取决于两种相反信号的强度和力量对比。

3 如何研究信号转导通路的变化

自然界中对立因素的存在就是为了平衡,机体具有自身调节以达到平衡的能力,网络中常有对立的节点,信号转导通路中也有对立的分子,故而网络或信号转导通路常依赖对立因素之间的协调而达到平衡。网络又是动态的,通过正、负反馈的自动调节以维持机体万方数据

的内稳态 homeostasis,所以网络的变化是根据机体所处的状态。对于一个处于正常的机体状态是无法观察到网络和信号转导通路的存在,只有在两种不同的机体状态的比较中,以及采用一种能改变机体状态的刺激(包括以药测证)进行干预,才能观察到网络或信号转导通路的变化。

4 以药测证观察分子网络调控规律

1977 年 Basedovsky 首次提出体内存在 NEI 网络的假说,现已证实神经内分泌与免疫系统之间存在双向信息传递机制,并拥有一套共同的化学信息分子与受体,使这三个系统之间得以相互交通和调节,呈现多维立体网状的联系。我们在肾阳虚证的研究中^[3],采取以药测证用补肾方在模拟肾阳虚证的皮质酮大鼠模型上,观察了以下丘脑为调控中心的 NEI 网络中 HPAT 轴的变化,证明肾阳虚证是涵盖着 NEI 调节网络,而且直接作用于 NEI 网络的调控中枢一下丘脑。

随后,我们进一步在模拟肾虚证的自然衰老大鼠模型上^[4],采用补肾药—淫羊藿总黄酮(EF)进行以药测证,摘取下丘脑、垂体、肾上腺、脾淋巴细胞,并用 Affymetrix 公司的大鼠基因芯片,研究老年大鼠 HPAT 轴的基因表达谱,结果显示:(1)EF 上调多种神经递质受体的表达,通过 NEI 网络的下行通路激活免疫系统;(2)还通过生长激素轴、性腺轴、淋巴细胞凋亡三个方面的网络机制发挥分子网络效应;(3)EF 在淋巴细胞凋亡和增殖的网络机制中重塑对立的凋亡相关基因及增殖相关基因的良好互动并重塑基因平衡。我们从有效的多个补肾复方中筛选出对 HPAT 轴最具效应的淫羊藿有效成分——EF,虽然它不能代表补肾的全方效应,但可针对病或证的某个方面(甚至是主要方面)作为药靶以发挥更为高效且专一的效应。

5 多种多样的信号转导模式

在 EF 调控老年大鼠淋巴细胞基因表达谱中细胞凋亡相关信号分子表达的研究中^[5],观察到有 3 种在细胞凋亡与细胞增殖中起诱导作用的上游因子和信号转导模式值得注意。

1970 年 Brestcher 和 Cohn 首先提出并证实“共刺激信号”及“共刺激分子”,共刺激分子及其调节网络在

特异性免疫应答过程中起着极其重要的作用,尤其是 T 细胞激活诱导凋亡^[6]。T 细胞分子 CD28 是最早被证实也是迄今公认的最基本的共刺激分子,而后新的共刺激分子不断被发现,活化后的 CD28 信号可诱导其它多种共刺激分子的表达形成调节网络。本研究观察到 EF 激活 CD28,其信号诱导细胞毒性 T 细胞 (CTLA-4)、T 细胞特异性受体 (TCR) 以及 CD3。这些共刺激分子形成调节网络,共同激发 T 细胞生长因子 IL-2 形成促增殖、抗凋亡信号转导的重要途径。

转化生长因子 TGF β 本身既具有诱导某些细胞的促凋亡反应,又能增强某些细胞的抗凋亡作用,这种显而易见的矛盾性质是被机体按其需求所利用。本研究观察到当老年大鼠由于 EF 的干预而呈现逆转促凋亡而有抗凋亡的趋势,TGF β 的显著上调就作为调节细胞凋亡过程的上游因子,而成为促增殖、抗凋亡的另一个信号转导的重要途径。

原癌基因和抑癌基因大多数参与细胞增殖和凋亡的调控,原癌基因既是促进细胞增殖,又是抗细胞凋亡,故而有利于癌肿的生长,抑癌基因的作用正好相反。但原癌基因和抑癌基因的作用不是独立的,而是两种功能相反的基因形成相互制约的状态。力量的对比发生变化就会倾向于凋亡或增殖。在衰老过程中,原癌基因多呈低表达,抑癌基因呈高表达。本研究观察到 EF 使得原癌基因 c-Fos、c-myc、a-Raf、cyclinD1、c-Jun 等上调,同时亦伴有抑癌基因 Rb 下调,显而易见这里是原癌基因处于强者态势起着主导作用,并由抑癌基因的良性互动,从而加强了促增殖、抗凋亡的信号转导。由此揭示了启动淋巴细胞凋亡过程中就有多种多样的信号转导模式。

6 对于核因子 NF κ B 信号转导通路的研究

在 EF 调控老年大鼠淋巴细胞基因表达谱中还看到 NF κ B (Nuclear factor kappa B) 显著上调。NF κ B 是一组重要的快反应多向性核转录调节因子,集抗凋亡、促增殖、调节免疫效应于一身,为多种信号转导途径的联结点,在分子调控网络中处于枢纽地位。

NF κ B 被激活时,首先启动 NIK (NF κ B inducible kinase),使得 IKK (I κ B kinase) 被诱导激活,进而导致 I κ B (inhibitor of NF κ B) 发生磷酸化和降解,由于 NF κ B 通常与其对立的因子 I κ B 结合为复合物限制了 NF κ B 向核内移动,I κ B 的降解使得 NF κ B 与 I κ B 解离,游离的 NF κ B 迅速从细胞质移位到细胞核,结合到靶基因的同源 DNA 结合位点,从而启动靶基因转录发挥其生物学功能。这样 NIK/IKK/I κ B/Rel/NF κ B 成为 NF κ B 的主要信号转导通路^[7]。

万方数据

为观察 EF 对 NF κ B 的作用强度,采用包含 96 个 NF κ B 相关基因表达的专用基因芯片,分别检测老年大鼠对照组、EF 组、PDTC (NF κ B 阻断剂组)、PDTC 加 EF 组和年轻大鼠组的 NF κ B 相关信号差异表达。结果显示年轻大鼠 NIK/IKK/I κ B/Rel/NF κ B 信号转导通路及相关成员与老年对照组比较有较多地上调,达 39/96 个基因。EF 用药组与老年对照组比较,NIK/IKK/I κ B/Rel/NF κ B 信号转导通路及相关成员则普遍上调,达 73/96 个基因,证实了 EF 对于 NF κ B 家族成员具有很强的调控能力。在一般情况下,I κ B α 降解才导致 NF κ B 活化,但本组 I κ B α 却与 NF κ B 家族成员同时升高,原因可能是由于 NF κ B 持续激活后对 I κ B α 反馈式的上调作用,从而抑制 NF κ B 过度活化,使得 NF κ B 活性维持在较为适度的范围。这是信号整合能力以发挥其最佳效应。

对另一组 PDTC 阻断后,NIK/IKK/I κ B/Rel/NF κ B 通路及相关成员仅有 9/96 个基因上调,说明 PDTC 对 NF κ B 活性抑制作用成立。而经用 EF 再行 PDTC 阻断后,又可见到相当多 NIK/IKK/I κ B/Rel/NF κ B 通路及相关成员,仍有 47/96 个基因上调。证明 EF 对该信号转导途径的激活,具有很高的强度。分析 EF 仍能发挥作用的另一原因,PDTC 虽是一种有效的 NF κ B 抑制剂,但其阻断作用并不完全,鉴于 EF 具有多靶点的作用,很有可能通过激活网络中其它信号转导途径,促使 NIK/IKK/I κ B/Rel/NF κ B 通路仍能处于活化状态,从而发挥免疫调控作用。

7 结语

自然界中存在的大量复杂系统都可以通过网络加以研究与描述^[8],人体是一个复杂巨系统,自然也不例外。今天的生命科学正面临着一个新的转型期,既需要系统生物学的整体思想与方法^[9],也离不开还原分析方法,故而迫切需以生物分子所组成的网络的结构和功能来认识与阐明人体这一复杂巨系统生命活动的规律。网络是高度复杂非线性动力学系统,钱学森说过要看动力学就要造成干扰,才能看到变化,并从宏、微观中进行整合。

中医是用自然的系统概念考察人体的变化,一向着重于证效关系来判别辨证的正确性,也就是“以药测证”,这就提供了一个研究证的干预手段。我们以临床疗效为基础,从有效的多个补肾复方中筛选出最具效应的单味药——淫羊藿,又从淫羊藿不同成分中找到对 HPAT 轴的有效成分——EF^[10],虽然它未必代表补肾的全方效应,但可针对病或证的某个方面(甚至是主要方面)作为药靶以发挥更为高效且专一的效应,而

且可以用这高效的 EF 以药测证,在两种不同的机体状态(老年对照组与 EF 用药组)的比较中,深入细致地了解肾虚证微观内涵—基因网络与信号转导通路的动态变化,如 EF 会聚与整合共刺激分子、转化生长因子及多个原癌基因成为启动促增殖、抗凋亡的上游因子网络。还有 EF 在下调促凋亡基因的同时上调抗凋亡;在下调抗增殖基因的同时上调促增殖基因,使得这些对立的基因整合到向有利于增殖与凋亡平衡的一个方向进行。又如 EF 使 NIK/IKK/I κ B/Rel/NF κ B 信号转导通路中对立的 I κ B α 与 NF κ B 同时升高,既可维持 NF κ B 适度升高,又保证 NF κ B 呈强者态势发挥其分子调控网络中的枢纽作用。从而呈现肾虚证所具有特征性的有序的基因网络调控路线图谱(见图 1),并由此来认识与“证”相关的生命活动的一些规律。

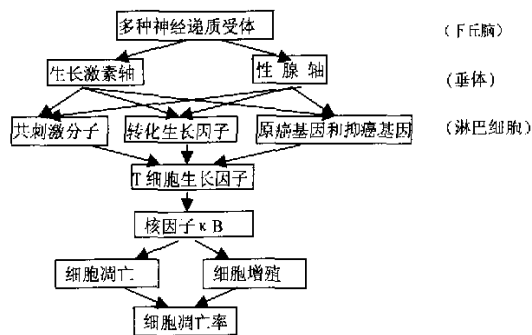


图 1 下丘脑—垂体—淋巴细胞基因网络调控路线图

这样,以药测证对肾虚证基因网络和信号转导通路的研究内容为前提出“证”的新概念“证是一种有机综合的功能态,由一个调控中心及其所属众多分子网络所构成,作为对外界反应与自我调节的基础”^[1],逐步积累中医药学与现代生命科学相交融的资料。

参 考 文 献

- 1 沈自尹.衰老—生理性肾虚证的 HPAT 轴分子网络调控研究.中国中西医结合杂志 2004;24(9):841—843.
Shen ZY. Study on the regulation of HPAT axis molecular network in patients with aging-physiologic Shen deficiency syndrome. Chin J Tradit Chin West Med 2004; 24(9): 841—843.
- 2 卢建,余应年,徐仁宝主编.受体、信号转导系统与疾病.

济南:山东科学技术出版社,2001:13—19.

Lu J, Yu YN, Xu RB, editors. Receptor and signal transduction and disease. Jinan: Shangdong Science and Technology Press, 2001:13—19.

- 3 沈自尹.有关证与神经内分泌免疫网络的研究.中医药学刊 2003;21(1):10—14.

Shen ZY. Studies on syndrome and neuroendocrine-immune network. Chin Arch Chin Med 2003;21(1):10—14.

- 4 沈自尹,陈瑜,黄建华,等. EF 延缓 HPAT 轴衰老的基因表达谱研究.中国免疫学杂志 2004;20(1):59—62.

Shen ZY, Chen Y, Huang JH, et al. The gene expression profile in hypothalamus - pituitary - adrenal - thymus (HPAT) axis from EF-treated old rats. Chin J Immunol 2004;20(1):59—62.

- 5 沈自尹,黄建华. EF 调控老年大鼠淋巴细胞基因表达谱中凋亡相关基因信号分子表达的研究.中国免疫学杂志 2005;21(3):175—178.

Shen ZY, Huang JH. Regulation of apoptosis-related molecules in gene expression profile in old rats by Epimedium flavonoids. Chin J Immunol 2005;21(3):175—178.

- 6 张学光.共刺激分子及其调节网络在特异性免疫应答中的作用及机制.中国免疫学杂志 2004;20(1):26.

Zhang XG. Function and mechanism of co-stimulator and its regulation network in acquired immune response. Chin J Immunol 2004;20(1):26.

- 7 Cohen L, Henzel WJ, Baeuerle PA. IKAP is a scaffold protein of the I κ B kinase complex. Nature 1998; 395(6699):292—296.

- 8 Albert R, Barabasi AL. Statistical mechanics of complex networks. Rev Mod Phys 2002; 74:47—97.

- 9 沈自尹.系统生物学和中医“证”的研究.中国中西医结合杂志 2005;25(3):255—258.

Shen ZY. Study on systematic biology and syndrome of traditional Chinese medicine. Chin J Tradit Chin West Med 2005; 25(3):255—258.

- 10 沈自尹.淫羊藿总黄酮对应一个药靶的探索过程.中药新药与临床药理 2003;14(5):293—295.

Shen ZY. Series of studies on corresponding action target of Epimedium flavonoids. Tradit Chin Drug Res & Clin Pharmacol 2003;14(5):293—295.

(收稿:2005-06-23 修回:2005-09-21)