

DNA 芯片技术与中医脾虚证研究

修宗昌¹ 罗云坚¹ 宋 阳²

主题词 脾虚/遗传学 寡核苷酸排列序列分析

脾胃学说是中医学理论体系的精髓,脾虚证研究亦历 40 余年之久而弥新。但透过这些有益的尝试,人们不禁感悟到,要结束目前研究中的徘徊局面,不仅需要新的思维方式与认识方法,更呼唤崭新的技术手段。

1 DNA 芯片的问世

DNA 芯片又称 DNA 微阵列、基因芯片,是上世纪 90 年代中期以来影响最深远的重大科技进展之一,是融微电子学、生物学、物理学、化学、计算机科学为一体的新技术。它的诞生为“后基因组计划”时代基因功能的研究及现代医学科学与医学诊断学的发展提供了强有力的工具。

所谓 DNA 芯片,是将 DNA 分子高密度地固定在固相介质上的传感器,详言之则指将几百乃至几万个寡核苷酸或 DNA 密集排列在玻璃片、硅片或尼龙膜等固相支持物上作为探针,把要研究的样品(称为靶 DNA)标记后与其进行杂交,用合适的检测系统进行检测,然后根据杂交信号强弱及探针位置和序列,便可确定靶 DNA 的表达情况以及突变与多态性的存在^[1]。根据探针的种类,将 DNA 芯片主要分为 cDNA 芯片和寡核苷酸芯片两类,后者又有原位合成芯片与合成点样芯片之别^[2]。目前较为成熟且较普遍应用的人类表达谱基因芯片系列包括人类基因表达谱芯片、免疫相关基因芯片、细胞信号传导芯片、肿瘤相关基因芯片以及代谢功能基因芯片等。

DNA 芯片的最大优点是大规模、并行化、微制造。它能对大量样本做快速、敏感、平行的测序(定性分析)与基因表达研究(定量分析)。DNA 芯片出现之前,研究众多基因在特定研究体系中表达变化的手段是原位杂交技术和 NORTHERN 技术,一次实验过程只能检测有限的基因。若想在有限的实验次数中检测众多基因在特定实验体系中的变化规律,这两种技术是不可能完成的。而 DNA 芯片则不然,它利用了生物芯片技术中的集约化和平行处理原理,一次可检测几百乃至

上百万个杂交信号,检测信息量大,众多基因探针的标记、杂交等过程一次性完成,样品消耗少,检测过程及结果分析自动化程度高,分析速度快。

由于 DNA 芯片充分利用了生物科学、信息科学的成就,并以全面、系统、综合的观点来研究生命的本质,因此 DNA 芯片技术尽管诞生较晚,却已展现出广阔的应用前景。当今时代,科学已从“分析时代”转变为“系统时代”,人们思维方式也从“分析式思维”向“整体式思维”转变,更确切地讲,向分析和综合相统一的思维方式转变,这一发展趋向恰好与中医学注重“整体”的理念相契合。可以预见,该项技术的问世必将使在“基因”平台上揭示中医证候尤其是脾虚证的深刻内涵迎来曙光,更为克服目前中医“证”的实质研究中存在的瓶颈现象铺就坚实的理论基石。

2 DNA 芯片在脾虚证研究中的应用

2.1 可行性:中医学认为,证即证候,是对疾病过程中所处一定阶段的病因、病位、病性以及病势所作的病理概括,是对致病因素与机体反应性两方面情况的综合,也是对疾病当前本质的认识。细胞是构成生命的基本单位,作为生命科学热点之一的细胞信号转导理论认为,细胞间通讯的激素等以及外界环境因子作用于细胞表面(或胞内受体)后,跨膜形成胞内第二信使和其后的蛋白信息分子级联传递,诱导基因表达,从而调节着细胞的生理反应,维持着细胞的正常代谢。一旦各种不同的致病因素作用于细胞表面,或细胞信号通路的某一环节会发生异常,都会导致整个信息通路的异常变化而发生疾病。由于蛋白质是基因转录后指导而合成的,所以人类疾病的发生机制似乎都可以在基因层面上得以诠释。基因的功能是通过表达体现出来的,故基因表达的异常改变几乎贯穿于所有疾病过程中。由此推演,中医之“证”也应与基因表达的异常变化具有内在联系。某一个基因、一组基因的表达改变可能会导致一个或几个证候的出现,而一个证候的变化常涉及到多个基因表达的改变。从人类基因组学角度而言,中医学“脾虚证”是由于机体内某些相关的基因发生异常表达而致。有报道,胃粘膜癌前病变中脾气虚证有 p53 基因较强表达^[3];脾虚证与人类白细胞抗原(HLA)基因型及表达异常密切相关^[4]等。提示脾虚证病理改变理应具有相关的基因组学基础。

基金项目:广东省中医管理局重点课题(200003)

1 广州中医药大学第二附属医院消化内科,广东省广州市大德路 111 号(510105)

2 长春中医学院附属医院检验科

收稿日期:2004-01-13

2.2 必然性:中医学属非简单线性系统论,是一个开放的复杂巨系统。中医所言脏腑并非现代解剖学的具体概念,而是深蕴着现代医学中的多个器官、组织与系统,有着极强的包容性。中医之“脾”主运化,为气血生化之源,是一个以消化系统为主体的旁纳多个系统的综合脏器与生理学概念。大量研究清晰表明,脾虚状态下机体消化吸收、能量代谢以及免疫系统、血液系统和神经系统等均发生异常改变,且这些变化涉及各系统内部的每一子系统,以免疫系统改变而然,便宽泛地表现出非特异性免疫、体液免疫、细胞免疫及细胞因子等方面异常。面对如此繁杂的病理机制,企盼以个别特异性强的专一指标来尽括其貌是不现实的,更是不可能的,这早已成为不争之实。毋庸置疑,脾虚证的发生与相关基因组学异常变化有着广泛的内在联系。以往脾虚证研究多采用传统的核酸印迹杂交法探讨单一基因表达,而今其缺憾已暴露无遗,如是研究最终也难以真正揭示脾虚证的本质。因为中医“证”具有系统性、结构性与时限性等特点,脾虚证的发生、发展则涵着由轻到重、由简单到复杂、由消化系统障碍到全身功能异常的渐进过程,所以开展多系统、多基因表达的动态、同步检测,将成为今后脾虚证基因层面研究的必然与趋向。现已发现人类约有 3 万多个基因,若采用原始的分子生物学方法逐一检测,其耗时、费力之大以及对经费需求之多可想而知,再要做到“同步”更是难上加难。而 DNA 芯片具有的大样本、同期而平行检测的性能特点,恰好与中医脾虚证基因水平研究对基因检测技术的要求相契合,故可以利用该项技术,结合脾虚证候特征,对脾虚状态下的基因表达谱改变进行全面而动态研究。

3 思路与方法

可以说,DNA 芯片的诞生为脾虚证研究实现质的跨越提供了良好的契机与可能。那么,如何合理运用该项技术以及其所提供的大量数据信息来阐释脾虚证的科学内涵,将是所要面临的具体问题。我们认为,使 DNA 芯片的鲜明特点与脾虚证的证候特征有机结合,充分发挥芯片的超常检测功能当是关键。一般原则,先用大芯片如人类基因表达谱芯片初筛,然后根据检测结果及研究目的,改用功能明确的小芯片如免疫相关基因芯片、细胞信号传导芯片等作进一步重点观测。这样有的放矢,可节省费用,充分利用信息资源,避免浪费。具体设计时,下列问题切莫忽视。首先,注意受试病种、证候的纳入,作多组别的比照。病是证的载体,证是病的阶段性标识,具有相对独立性的同时,也明显受到“病”的影响与制约,不同疾病以及疾病的不同阶段

赋予“证”以不同的特征。既应重视“异病(慢性胃炎、慢性肠炎、慢性肾炎等)”中的脾虚证研究,又要着眼于脏腑兼证(肝郁脾虚、脾肾阳虚等)中脾虚证的探讨,既要强调脾脏系统内部虚实证(脾气虚、脾胃湿热等)之间以及诸虚证(脾气虚、脾阳虚等)之间的比较,也应顾及脾虚证与其系统外部相关证候(肾气虚、肺气虚等)的对照,通过多组间比较发现其病理改变的共同点。由于证的微观变化复杂,指标繁多,此时应用 DNA 芯片进行指标筛选,恰能发挥其“高通量”特性,执简驭繁;其次,鉴于证具有鲜明的立体结构特征,实验标本宜多理化,做到局部与整体、组织器官与血清血浆之间的统筹划一,以增强研究力度。除此,观察过程应动态化,做到分阶段、分时期观察,既可契合“证”的时相性,又体现出 DNA 芯片的“平行性”。如是,共性与个性兼容,异中求同,动静结合,并通过对检测结果加以聚类分析,寻找与消化吸收、免疫及能量代谢等相关的表达异常的基因,再根据逆向发散思维抽提出其基因层面变化的结构位点,进而总结出脾虚证发生机制的核心要素。

4 问题与展望

伴随科学的整体化、技术的综合化以及科学技术一体化的现代科学技术发展的大趋势,现代科学技术特别是生命科学的理论和方法,已经并继续向中医学渗透。鉴于 DNA 芯片所具有的无法比拟的优点,目前已被初步应用到中医药研究之中,尤其是中药有效成分的筛选、中药材鉴定,以及中药新药的开发等方面,但较少见到运用这种前沿技术探讨中医证候实质的报道。因而我们顺应时势,正在从事这方面的探索工作。诚然,DNA 芯片技术还存在诸多弊端,如虽然已经知道了基因芯片上的每一点基因,但遗憾的是,在基因组学的研究从结构基因组学过渡到功能基因组学的今天,有些基因功能尚茫然不知;mRNA 抽提技术欠稳定;芯片数据易受较多随机因素干扰,假阳性率较高;样本需求量偏大等。尽管如此,我们仍相信,DNA 芯片作为具有划时代意义的崭新生物技术手段,会伴随科学技术的不断发展而逐渐完善,它能促使人们在回首以往科研工作时产生深深的思考,给中医脾虚证乃至其他证候客观化、规范化研究带来全新的理念。

参考文献

- 1 赵剑华,王秀琴,刘芝华,等.功能基因组学的研究内容与方法.生物化学与生物物理进展,2000,27(1):6-7.
- 2 徐炳森,邵健忠.几种新型生物芯片的研究进展.生物化学与生物物理进展,2000,27(3):252-253.
- 3 刘晓颖,陈小野,张海燕,等.脾气虚证与胃粘膜 p53 基因表达关系的实验研究.中国中医基础医学杂志,1999,5(3):15-17.
- 4 马伟.脾虚证与 HLA 基因型及表达的相关性.中国中医基础医学杂志,1998,4(S):79.