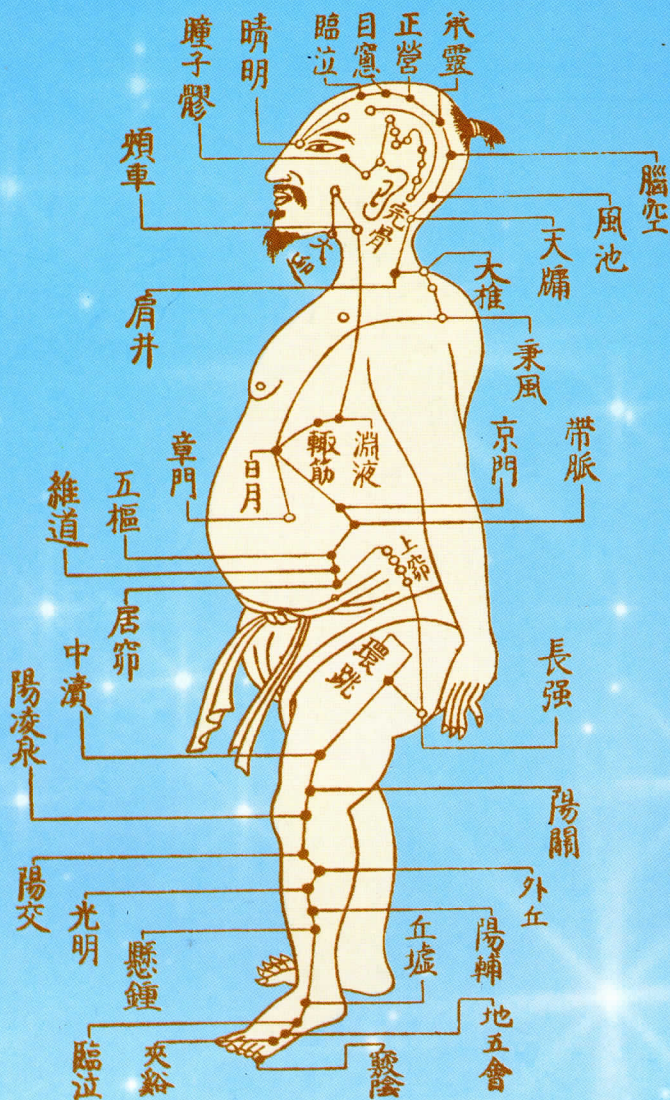


中国针灸®

CHINESE ACUPUNCTURE & MOXIBUSTION



2001 11

2001年11月第21卷第11期
November, 2001 Vol. 21, No. 11

- ★ 全国中医药优秀期刊
- ★ 中国医学专业核心期刊
- ★ 中文科技期刊论文统计源期刊

足少陽膽經之圖

ISSN 0255-2930



中国针灸学会 中国中医研究院针灸研究所 主办
 SPONSORS: China Association of Acupuncture and Moxibustion
 Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of TCM

目 次

临床研究

- 针灸配合米非司酮、米索前列醇终止早孕临床观察 杨波 张晓君 宋春红(643)
- 针刺曲池与药物即时降压的对比观察 张红星 张唐法 刘悦平(645)
- 穴位注射卡介菌多糖核酸治疗 266 例哮喘的临床研究 倪伟 于素霞 王宏长,等(647)
- 温阳利气法针灸治疗哮喘 30 例临床观察 万文蓉(649)
- 针刺及舌下放血治疗假性延髓麻痹的临床疗效观察 杨青兰 黄志伟 刘峰,等(651)
- 穴位埋线治疗癫痫 160 例疗效观察 林军 邓倩萍 张家维(653)
- 针刺加红外线治疗腰椎骨质增生疗效观察 舒洪文(655)
- 艾灸治疗颞下颌关节紊乱综合征咀嚼肌群功能紊乱 65 例疗效观察 邱晓虎 蒋妙仙(657)
- 舌针为主治疗小儿脑瘫 112 例疗效观察 管遵惠 郭翠萍 丁丽玲(659)

经络与腧穴

- 穴位刺激引起内脏的神经原性炎症反应 曹东元 朱汉璋 赵晏,等(662)
- 镇静调气法针刺不同腧穴治疗胸壁挫伤疗效观察 刘世平(665)

刺法与灸法

- 电针不同穴位、频率对胃粘膜保护作用的观察 于天源 张露芬 孙承琳,等(667)

机理探讨

- 针刺刺激增即时 SPECT 脑显像识别脑血管病存活脑组织的研究 郭松鹏 路建平 韩晓玲,等(673)
- 针刺治疗急性脑梗死对 TNF- α 、IL-6 及肌力的影响 张艳玲 李创鹏 马雅玲,等(677)
- 耳针和六味地黄丸加味预防和治去势雌鼠骨质疏松的实验研究 罗小光 刘国忠 贺志光,等(679)
- 天灸对衰老大鼠自由基水平的影响 李学武 刘琴 胡元会,等(682)

针家精要

- 张家维教授飞针疗法经验述要 许云祥(685)

器具研制

- DAJ 多功能艾灸仪治疗膝关节骨性关节炎临床观察 乐小燕(687)

教学园地

- 临床医学系《针灸学》理论教学体会 苏佩清(689)

思路与方法

- 三种差异表达基因克隆方法的比较 张雪朝 孙国杰(691)

文献与史料

- 简析《针灸甲乙经》中的禁(慎)针禁(慎)灸腧穴 李戎 罗永芬(695)

综述

- 针灸治疗颈椎病的研究进展 江庆淇 张必萌 吴焕淦,等(699)

临床报道

- 针刺治疗嗅神经功能障碍 22 例 施云军 江万松(646)
- 耳穴贴压治疗伸舌症 10 例 白华 韩丽 吴瑞琴(661)
- 中药敷脐治疗妇女更年期潮热汗出 张盛之(669)
- 透刺法为主治疗肩峰下滑囊炎 钱小燕(672)
- 温针结合五点支撑治疗腰椎间盘突出 26 例 吴赞杨(684)
- 胎盘组织液穴位注射加艾灸治疗慢性附件炎 20 例 胡晓靖(698)

单穴效方

- 针刺膝眼穴治疗痛经 60 例 胡朝伟 张华林(670)
- 局部点刺放血治疗口腔溃疡 徐建勇 高洪英(670)
- 针灸次髎穴治疗尿潴留 徐慧卿 张风敏(670)
- 郄上穴注射治疗乳汁淤积性乳腺炎 崔志欣 鲍淑琴 高睿心(671)
- 药敷百会穴治疗口腔溃疡 李海刚 张华芹(671)

文章编号:0255-2930(2001)11-0691-04

中图分类号:Q344+.13 文献标识码:C

思路与方法

编者按:

分子生物学理论和技术引入中医学研究领域 10 多年来,已经渗透到中医学理论体系和临床各学科中,对中医药学的现代化进程产生了积极的推动作用。21 世纪是生物医学发展的重要时期,随着人类基因组计划的完成,人类从基因水平上认识疾病、诊断疾病和治疗疾病的时代已经开始变成现实。从基因水平探讨中医、针灸基础理论的实质,是中医、针灸有希望取得突破的研究途径。为适应当前针灸工作者进行基因分离、筛选、鉴定科研工作的需要,本刊特选登此文。

三种差异表达基因克隆方法的比较

张雪朝 孙国杰

(湖北中医学院,武汉 430061)

[摘要] 为了能快速、有效、准确地克隆出有意义的基因,本文就常用的三种基因克隆方法,即差异显示 PCR、抑制性消减杂交、PAP-PCR,从其原理、应用、优越性、主要缺陷等几方面进行了简要概述。这些方法为中医、针刺治疗各种疾病过程中有关的基因差异表达,以及有关基因分子克隆提供有效的分子生物学工具。

[关键词] 针灸原理;基因表达;克隆,分子;聚合酶链反应

Comparison among Three Differential Expression Gene Cloning Methods

Zhang Xuechao, Sun Guojie (Hubei College of TCM, Wuhan 430061)

[Abstract] The principle, application, advantages and disadvantages of the commonly-used three cloning gene methods, i. e., differential display reverse-transcriptase PCR (DD RT-PCR), suppression subtractive hybridization (SSH) and RNA arbitrarily primed PCR (RAP-PCR) are briefly introduced in order to clone significant genes rapidly, effectively and accurately. These methods provide effective molecular biologic tools for differential expression of gene and molecular cloning of gene in treatment of diseases with traditional Chinese medicine and acupuncture-moxibustion.

[Key words] Acup Mox Mechanism; Gene Expression; Cloning, Molecular; Polymerase Chain Reaction

高等生物大约有 100 000 个不同的基因,但在生物体内任一细胞中只有 15% 的基因得以表达。而这大约 15 000 个基因的表达是按时间和空间顺序有序地进行着,这种表达方式即为基因的差别表达 (differential expression)^[1]。生物体表现出各种各样的特性,主要是其基因表达的差异引起的。基因差异表达的变化有两种,即新出现的基因表达与表达量差异的基因表达。由于基因表达的变化是调控细胞生命活动过程的核心机制,通过比较同一类细胞在不同生理状态下或不同生长发育阶段的基因表达差异,可为分析生命活动过程提供重要信息。当前,人类基因组研究的重心正在由“结构”向“功能”转移,一个以基因组功能研究为主要内容的所谓“后基因组时代”(post-genomics),即功能基因组 (functional genomics) 时代即将到来,这就决定了寻找差异表达基因成为分子生物学的研究热点之一。

目前已有针灸科研工作者从分子生物学水平探讨针灸治疗各种疾病的可能机理。有实验^[2]报道

针刺翳风等穴位面神经组织中 NT-3 及 TrKCmRNA 表达增加;针刺后癫痫大鼠海马内 nNOSmRNA 和 iNOSmRNA 增加^[3];针刺可调节 CCK-8mRNA、THmRNA、SOMmRNA、c-fos \ c-jun mRNA、CGRPmRNA 的增减^[4]。为适应当前医学的发展,为满足针灸科研工作者分子生物学研究的需要,本文对差异显示 PCR、抑制性消减杂交及 RNA 任意引物 PCR 三种常用的差异基因筛选法,分别从其基本原理、过程、应用范围及优缺点等作一个简介。

1 差异显示 PCR (differential display reverse-transcriptase PCR, DD RT-PCR)

该方法自 1992 年由 Liang 和 Pardee 建立起来的^[1],后经多年改进,目前已被广泛的使用。它已较成功地用于胚胎发生^[5]、脑发育^[6]、生长因子激活与抑制、信号传导^[7]、癌症^[8]等有关的基因的鉴定与克隆。其主要原理是:利用 mRNAs 结尾处的多聚腺苷酸 [poly(A)] 结构,在其 3' 端设计如 5'-T₁₁CA 排列样的锚定引物,该引物可与 mRNAs 总

数的十二分之一[即 poly(A)前面 2 个碱基为 TG 的 mRNA]结合,从而使这部分基因得到逆转录;而一套(即 T₁₁MN, N 代表任意碱基, M 为除 T 外的其他三种碱基,共 12 条)引物可将全部 mRNA 得到扩增。在其 5-端再设计一些任意碱基序列的引物,就可使不同长度的基因得到扩增。

DD RT-PCR 包括 3 个基本步骤:①用一套锚定引物反转录样本 mRNA 为 cDNA;②用一套随机

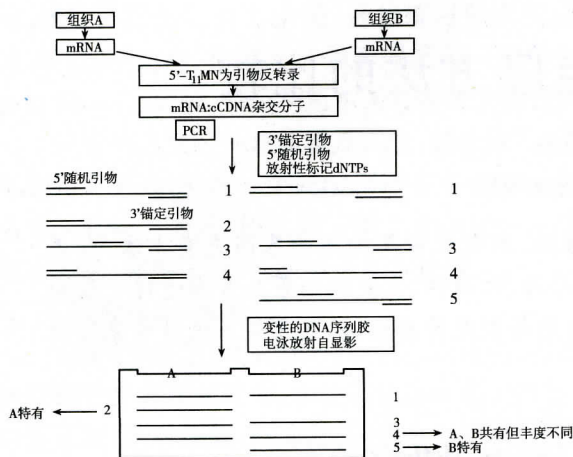


图 1 DD RT-PCR 过程

引物和锚定引物扩增 cDNA;③电泳分离产生 PCR 片段。由图 1 可知,条带 2、5 分别为不同组织 A、B 所特有。将差别表达条带进行回收、鉴定分析,即可获得差异表达的目的基因。

DD RT-PCR 具有简便、快捷、所需起始材料少;由于 PCR 技术的应用,使得低丰度 mRNA 的筛选成为可能;可同时对多个样本进行比较;可检测基因的上游调节和下游调节。但其缺点是假阳性条带太多,有时甚至高达 85%^[9],而且重复性差;获得的差异片段较短,因而在 Northern blot 检测时往往得不到杂交信号。

2 抑制性消减杂交 (suppression subtractive hybridization, SSH)

消减杂交最早由 Lamar 和 Palmer 于 1984 年报道^[10],后经多年的改进,它已发展为许多基因克隆方法的基础,SSH 就是其中之一^[11]。该方法运用杂交动力学原理,即丰度高的单链 cDNA 在退火时产生同源杂交速度快于丰度低的单链 cDNA,并同时利用链内退火优先于链间退火的特性,从而选择性地抑制了非目的片段的扩增。其基本过程(见图 2)为将 tester(样本) mRNA 和 driver(参照) mRNA 分

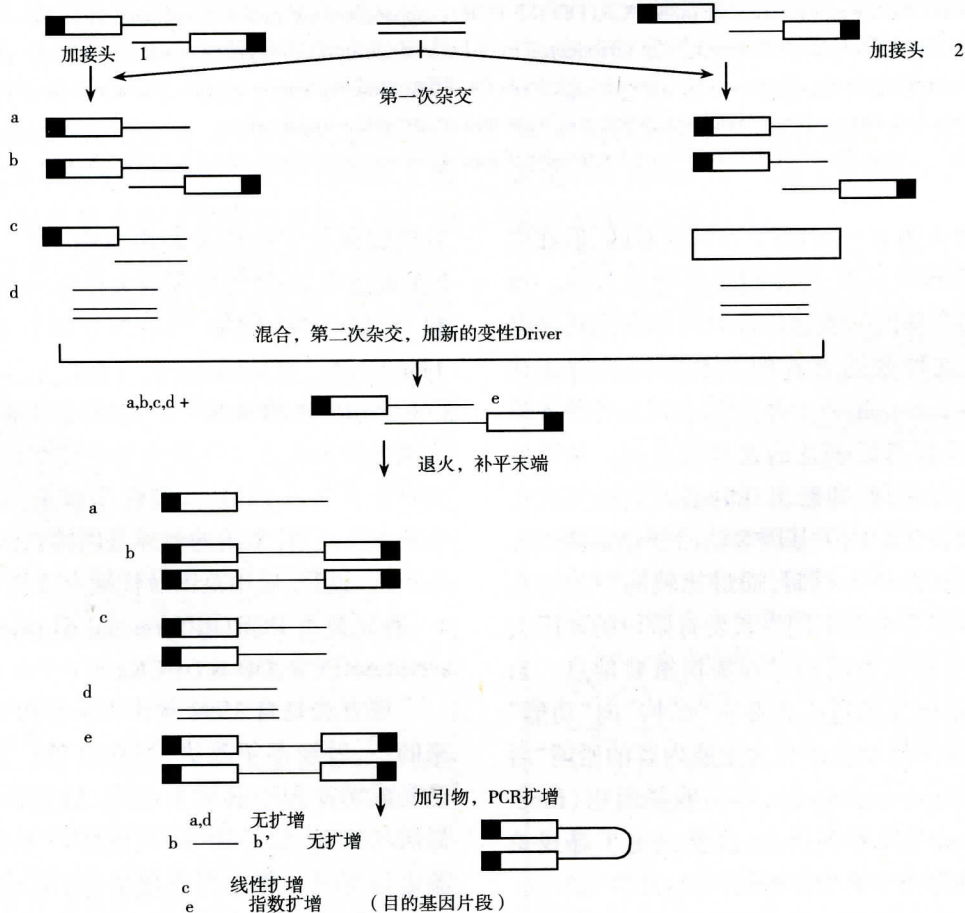


图 2 SSH 过程图解

别逆转录为 cDNA,用 4 碱基识别酶(RsaI)酶切两种 cDNA 产生平端片段;tester cDNA 分别接上 adapter(接头)1 及 adapter 2 并与过量的经 RsaI 酶消化的 driver 样本杂交。引物设计在 adapter 上,这样仅使具有差异表达的片段成为 PCR 的模板,同时接头上含有启动子序列及限制性内切酶识别位点,为以后连接克隆载体和测序提供方便。经过重复消减杂交以便减少非特异性片段的扩增,使得差异表达的目的基因片段得到大量富集。

该方法具有高度的灵敏性、假阳性率低、分离的差异条带多。然而其仅能比较成对 RNA 群体间差异表达的基因,起始材料要求较多、对小片段缺失的样本无法检出,由于稀有 mRNA 不适合杂交动力学而使这部分基因漏掉,通过使用 driver 序列和 tester 序列彻底杂交的扣除方法可以避免非差异表达的序列,但副作用是使那些不按“全或无”模式表达的基因之间的明显差异变化变得模糊,并还存在 adapter 与 cDNA 片段的连接效率问题等。但 SSH 仍不失是目前较有效的克隆目的基因的方法之一^[12,13]。

3 RNA 任意引物 PCR (RNA arbitrarily primed PCR, RAP-PCR)

RAP-PCR 方法与 DD RT-PCR 同时报道^[14],其基本原理也较为一致。但其具体使用方法与 DD RT-PCR 不同。首先,用任意引物在 RNA 模板和其配对最好的位点进行反转录合成第一链 cDNA 或者在反转录的第一步即加入 5'-随机引物与 3'-锚定引物,如果 RNA 具有 6~8 个碱基与该 5'-引物的 3'-端相匹配,则该随机引物同样能引导 cDNA 第一链的合成。这样,通过两种引物的反转录即可以研究所有 RNA,包括开放阅读框(open reading frame, ORF)。第二链是在任意引物所找到的最佳配对位点起始合成。在扩增序列引物和模板配对比较差的一端,可以由极好配对的另一端得到补偿。以上的结果是收集了在 3 和 5 端侧翼有和任意引物相同的序列(互补的序列)的基因片段。这些片段可作为模板进行高严谨性的 PCR 扩增,最终得到与基因组 DNA 指纹(DNA fingerprinting)相似的指纹。因此该方法也称为 RNA 指纹技术(RNA fingerprinting technique)。凝胶电泳可以显示全部 PCR 产物,再从中回收差异表达的基因片段,进行克隆、测序及功能分析。其基本步骤如图 3。图中条带 A、C 为组织 1 或 2 特有的, B 为不同组织表达量差异的条带。

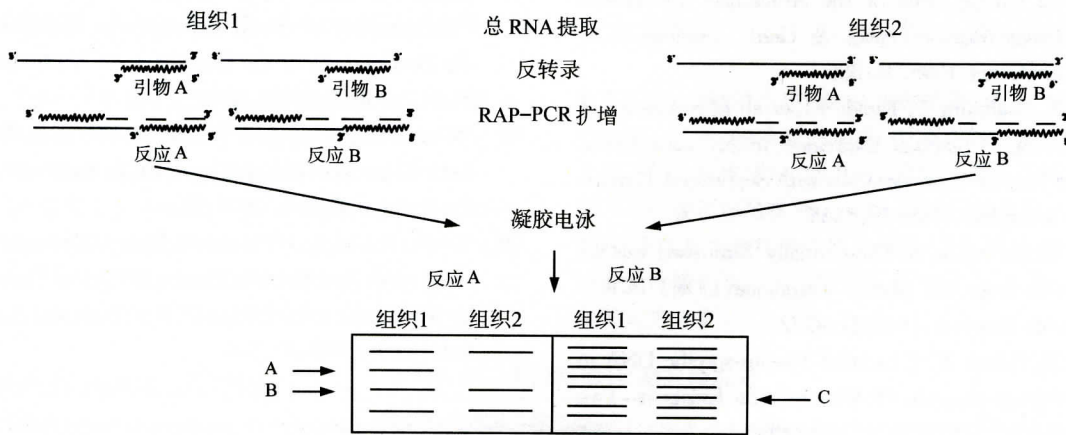


图 3 RAP-PCR 基本过程

该技术经过多年的应用和改进,利用此方法有人已成功的寻找到一种新的神经膜蛋白基因^[15]、并在某些疾病相关基因^[16]、信号传导相关的调节基因等方面得到广泛的应用^[17~19]。有实验表明,RAP-PCR 在一定的反应条件下,重复性相当好,可达 90%。RNA 的浓度、DNA 的污染等均对结果无明显影响;组间条带的亮度差异在 20% 以上即可定为基因的差异表达^[20]。与 DD RT-PCR、SSH 比较,该方法有其独特的优点:首先,RAP-PCR 可以同时比较 2 个以上的 RNA 样本,并且来自各式各样的调控种类的基因能直接克隆。因此,对于任何被观察

到的差异片段,能分析许多因素的影响。其次,以 PCR 为基础的 RNA 指纹分析方法另一个优点是在几天内产生结果,而不像 DD RT-PCR 及 SSH 那样需要许多步骤,花几周时间。再次,由于长序列随机引物的应用大大降低了假阳性条带的出现。另外,RAP-PCR 灵敏高、起需起始材料少。尽管 RAP-PCR 具有诸多的优点,但该方法需要较高的变性温度和较低的离子强度;并且随机引物并非选择性扩增的专一目标,有可能正好在某一类基因的保守区或分散的基因重复序列区,这样有可能只扩增这一类基因。象其他方法一样,RAP-PCR 电泳产物的回

收、克隆、测序是一项繁琐的工作。

4 参考文献

- 1 Liang P, Arthur BP. Differential Display of Eukaryotic Messenger RNA by Means of the Polymerase Chain Reaction. *Science*, 1992; 257: 967
- 2 牙祖蒙, 王建华, 李忠禹, 等. 面神经损伤后穴位电针刺激对神经组织中神经营养因子-3 及其受体表达的影响. *中国中医基础医学杂志*, 2000; 6: 59
- 3 Yang R, Huang ZN, Cheng JS. Anticonvulsion Effect of Acupuncture Might be Related to the Decrease of Neuronal and Inducible Nitric Oxide Synthases. *Acupunct Electrother Res*, 1999; 24(3~4): 161
- 4 Wang YQ, Cao XD, Wu GC. Role of Dopamine Receptors and the Changes of the Tyrosine Hydroxylase mRNA in Acupuncture Analgesia in Rats. *Acupunct Electrother Res*, 1999; 24: 81
- 5 Zimmermann JW, Schultz R. Analysis of Gene Expression in the Preimplantation Mouse Embryo: Use of mRNA Differential Display. *Proc Natl Acad Sci*, 1994; 91: 5456
- 6 Joseph R, Dou D, Tsang W. Molecular Cloning of a Novel mRNA (neonatin) that is Highly Expressed in Neonatal Mammalian Brain. *Biochem Biophys Res Comm*, 1994; 201: 1227
- 7 Harrier LA, Wright F, Hooker JE. Isolation of the 3-phosphoglycerate Kinase Gene of the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus Mosseae* (Nicol. & Gerd.) Gerdemann & Trappe. *Curr Genet*, 1998; 34: 386
- 8 Nagasaki K, Sugimura T, Terada M, et al. Identification of Genes Showing Differential Expression in Antisense K-ras-transduced Pancreatic Cancer Cells with Suppressed Tumorigenicity. *Cancer Res*, 1999; 59: 5565
- 9 Bauer D. Identification of Differentially Expressed mRNA Species by an Improved Display Technique (DDRT-PCR). *Nucleic Acids Research*, 1993; 21: 4272
- 10 Lamar EE, Palmer E. Y-encoded, Species-specific DNA in Mice; Evidence that the Y Chromosome Exists in Two Polymorphic Forms in Inbred Strains. *Cell*, 1984; 37: 1771
- 11 Diatchenko L, Lau YFC, Campell AP, et al. Suppression Subtractive Hybridization: a Method for Generating Differentially Regulated or Tissue-specific cDNA Probes and Libraries. *Proc Natl Acad Sci*, 1996; 93: 6025
- 12 Zuber J, Tchernitsa OI, Hinzmann B, et al. A Genome-wide Survey of RAS Transformation Targets. *Nat Genet*; 2000; 24: 144
- 13 Hufton SE, Moerkerk PT, Brandwijk R, et al. A Profile of Differentially Expressed Genes in Primary Colorectal Cancer Using Suppression Subtractive Hybridization. *FEBS Lett*, 1999; 463: 77
- 14 Welsh J, Chada K, Dalal SS, et al. Arbitrarily Primed PCR Fingerprinting of RNA. *Nucl Acids Res*, 1994; 22: 4965
- 15 Schweitzer B, Taylor V, Welcher AA, et al. Neural Membrane Protein 35 (NMP35): a Novel Member of a Gene Family Which is Highly Expressed in the Adult Nervous System. *Mol Cell Neurosci*, 1998; 11: 260
- 16 Lafontaine DA, Mercure S, Perreault JP, et al. Identification of a Crohn's Disease Specific Transcript with Potential as a Diagnostic Marker. *Gut*, 1998; 42: 878
- 17 Heaton MP, Laegreid WW, Beattie CW, et al. Identification and Genetic Mapping of Bovine Chemokine Genes Expressed in Epithelial Cells. *Mamm Genome*, 1999; 10: 128
- 18 Leung GS, Zhang M, Xie WJ, et al. Identification by RNA Fingerprinting of Genes Differentially Expressed During the Development of the Basidiomycete *Lentinula Edodes*. *Mol Gen Genet*, 2000; 262: 977
- 19 Wilson ME, Sonstegard TS, Smith TP, et al. Differential Gene Expression during Elongation in the Preimplantation Pig Embryo. *Genesis*, 2000; 26: 9
- 20 Tortola S, Capella G, Marcuello E, et al. Analysis of Differential Gene Expression in Human Colorectal Tumor Tissues by RNA Arbitrarily Primed-PCR: a Technical Assessment. *Lab Invest*, 1998; 78: 309

(收稿日期: 2000-09-17, 刘炜宏发稿)