

梦,烦躁紧张,注意力不集中等症,舌红苔薄黄脉弦亦为肝郁化热之征象。选方用药上以疏肝理气为主,用柴胡、枳壳、郁金、香附、川楝子以疏肝理气,配以疏肝清心之栀子、丹皮、黄芩、菊花、薄荷,化裁中加连翘以泻六经之火,佐以肉桂引火下行,砂仁、鸡内金、炙甘草以和脾胃,诸药合用,共奏疏肝解郁,清心安神之功。

参 考 文 献

[1] 于德华,吴绍敏,李春波,等.综合医院住院患者焦虑与抑郁

症状调查[J].临床精神医学杂志,2004,14(2):68-70.

[2] 吴文源,魏镜,陶明.综合医院焦虑抑郁诊断和治疗的专家共识[J].中华医学杂志,2012,92(31):2174-2176.

[3] 赵志付.心身疾病的病证结合临床研究——心身疾病的刚柔辨证[J].中国中西医结合杂志,2011,31(10):1304-1305.

[4] 李健,赵志付.赵志付教授重用酸枣仁治疗不寐经验初探[J].世界中西医结合杂志,2012,7(5):382-383.

(收稿日期:2013-07-19)

(本文编辑:蒲晓田)

· 综述 ·

基于全转录组测序技术的转录组学在中医药领域的应用前景分析

陈惠 辛丽丽 龚婕宁

【摘要】 转录组学以其在全基因组转录水平上整体性、系统性的研究特点在中医药研究中发挥了重要作用,近年来兴起的全转录组测序(RNA Sequencing, RNA-Seq)技术使转录组学研究进入了数字化、信息化的时代。本文总结归纳了 RNA-seq 技术在转录组学中的优势,其整体性、系统性、个体组织差异性、时间独立性等优势改善了以往单基因研究不能切合中医学整体观念的不足;着重探讨了基于 RNA-seq 技术的转录组学在中医学理论及方药研究等方面的应用现状及前景,对其在中医辨治理论实质研究、方药有效成分的筛选和作用机制研究及临床用药安全评定体系等方面的应用策略进行了分析,并提出了初步的实验方案。

【关键词】 中医药研究; 分子生物学; 转录组学; 全转录组测序技术

【中图分类号】 R34 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2013.10.014

Application prospect analysis in the field of traditional Chinese medicine based on the transcription of RNA-seq technology CHEN Hui, XIN Li-li, GONG Jie-ning. College of Basic Medicine, Nanjing University of Chinese Medicine. Nanjing 210046, China.

Corresponding author: GONG Jie-ning, E-mail: 13901580022@163.com

【Abstract】 For the feature of integrity and systematicness on the level of the whole genome, the transcriptomics play a significant role in research of Chinese medicine, the recently arisen RNA deep sequencing technology (RNA-seq) allows for the age of digital and information. In this paper, we summarize the advantages of RNA-seq in the transcriptomics, its integrity, systematicness, individual tissue differences, time independence and many other edges have solved the previous research problem that single gene research can't failed to correspond with the perspective of holism in traditional Chinese medicine (TCM). This paper discusses the transcriptome study based on the technology of RNA-seq in TCM theory and the formulas and medicine about their present situation in application and prospect. Analysis has been made on

基金项目:国家自然科学基金(81373603)

作者单位:210046 南京中医药大学基础医学院温病教研室[陈惠(硕士研究生)、辛丽丽(硕士研究生)、龚婕宁]

作者简介:陈惠(1989-),女,2012级在读硕士研究生。研究方向:中医临床基础。E-mail:1060138599@qq.com

通讯作者:龚婕宁(1957-),女,博士,博士生导师。研究方向:温病治则治法研究。E-mail:13901580022@163.com

the application strategy in the research of syndrome differentiation in TCM, the selection of active ingredients of formulas and medicine and the research of mechanism, clinical drug safety evaluation system, and a preliminary experimental scheme was proposed.

【Key words】 Traditional Chinese medicine research; Molecular biology; Transcriptomics; RNA-seq

近年来,功能基因组学技术已经广泛运用于动植物生理生化、肿瘤与干细胞、动植物分子育种及中医药研究等领域,并促进了相关领域的发展。功能基因组学研究包括转录组学、蛋白质组学、代谢组学研究,转录组学的研究是其中最为重要的一部分。在中医药研究中,随着分子生物学前沿技术的大量应用,人们已经从多层次、多角度对中医的辨治理论及方药的作用机制进行了深入探讨,取得了众多令人瞩目的研究成果。鉴于转录组学在功能基因组学中所处的重要地位,笔者认为,将转录组学的新方法——全转录组测序(RNA-Sequence, RNA-Seq)技术应用于中医药研究,可以促进该领域的快速发展^[1]。

近几年, RNA-seq 技术迅速发展, 2012 年美国推出了 TotalScript™ RNA-seq 试剂盒, 一个完整的转录组测序只需约 5 ng 的总 RNA 样品(含有 rRNA)且不需要片段化 RNA^[2], 甚至能完成单细胞水平的转录组分析^[3]。同年国内华大基因也推出微量转录组测序技术(TruSeq), 从而实现了高效、稳定的微量转录组测序。成熟的转录组分析技术, 尤其是新兴的 RNA-seq 技术, 以其整体性、系统性、个体组织差异性、时间独立性等优势, 可以更好的从基因水平阐明中医的辨治原理、方药的作用机制等问题。尤其是该方法改善了以往单基因研究不能切合中医学整体观念的不足, 因而是当前中医药研究应当重视的重要方法。

1 RNA-seq 技术在转录组学中的优势

转录组研究能够从整体水平研究基因功能以及基因结构, 揭示特定生物学过程以及疾病发生过程中的分子机理。转录组学提出之初采用的是基因芯片法, 它利用固定探针与样品(cDNA)进行分子杂交, 根据杂交图谱荧光信息的强弱测定基因的表达丰度。该技术在过去几年里以其操作简便、快速和低廉的特点成为转录组分析的主导技术。但基于芯片技术只限于已知基因序列, 无法检测新的 RNA, 也就无法应用到还未完成全基因组测序和基因注释的物种上; 而且杂交技术灵敏度有限, 不

能很好地分辨基因序列同源性较高的基因家族和难以检测低丰度的目标及重复序列, 更不能发现异常转录的基因。因此, 在许多情况下不能满足当前研究的需要。

随着测序技术的发展, RNA-seq 技术开始逐步取代芯片技术。该技术首先将细胞中的所有转录产物反转录为 cDNA 文库, 然后将 cDNA 文库中的 DNA 随机剪切为小片段, 在 cDNA 两端加上接头利用新一代高通量测序仪测序, 直到获得足够的序列, 所得序列通过比对或从头组装拼接, 形成全基因组范围的转录谱; 同时通过同已有的基因组序列比对得到基因转录后拼接和修饰的机制; 也能通过基因序列出现的次数来检测基因表达的丰度。

相比较芯片技术, RNA-seq 技术采用数字化信号, 灵敏度高, 能检测到低丰度表达的基因, 检测到单个碱基的差异和对 RNA 表达的定量化研究; 测序成本比基因芯片低; 不需要预先设计探针, 适用于所有物种(包括没有全基因组测序的); 而且测序结果得到的是完整的 RNA 序列^[4]。因此, 借此可以发现一些新基因和进一步完成单个碱基水平和全基因组范围的生物信息学分析和基因功能的研究。

2 RNA-seq 技术在中医研究领域中的应用

2.1 RNA-seq 技术用于中医辨治理论实质的研究

辨证论治是中医学的精髓, 是临床诊治疾病的重要方法。虽然近年发展迅速的数据挖掘技术促进了中医学辨证客观化的研究, 使得中医证候诊断标准具有了一定的规范性和客观性^[5], 但由于辨证主要依据病人的主观感觉和医生四诊所得的临床资料进行综合分析, 缺乏深层次的客观标准, 所以“证”的确立与临证医家的思辨能力和诊疗水平密切相关, 很难做到真正意义上的客观化和量化。运用现代研究技术手段对中医“证候”的本质进行研究, 已经经过了近 60 年的过程。在已有的报道中, 有关“证候”实质的转录组研究已有人作了初步的尝试。例如, 马晓娟等^[6]经基因芯片分析和 QRT-PCR 验证研究血瘀证患者差异基因表达谱, 筛选出差异基因共有 48 个。严石林等^[7]分析了不同疾病

肾阳虚证的转录组特征,通过对差异表达基因进行 Pathway 分析,找出 332 条共同差异表达基因,其中有注释的基因为 181 条,探讨了肾阳虚证“同证异治”的生物学基础。这些差异表达的基因为中医证候本质的研究开启了一扇大门。

在各种先进诊疗设备趋于完善的今天,辨病施治可以提高医生的诊疗速度与准确度,辅助医生处方用药。转录组技术尤其是芯片技术以其快速、高效、灵敏、经济等优点已经在疾病诊断上发挥了巨大作用。在西医学领域,转录组学已大量运用于疾病的诊断。中南大学黄进等^[8]将分支 DNA 液相芯片技术应用于胃癌相关基因表达的检测,以用于评定化疗疗效。约翰霍普金斯大学医学院朱教授对蛋白芯片技术的应用做了回顾,并举例说明蛋白芯片技术可以在基础和临床中广泛应用,并发挥巨大作用^[9]。可见,芯片技术已经广泛应用于疾病诊断中。

辨证论治与辨病施治是当今临床医生诊治疾病基本方法,其中辨证论治突显中医特色、辨病施治突显西医特色,中医临床大多强调辨证与辨病相结合。转录组学利用芯片技术在揭示“证”与“病”的实质方面已经取得了可喜的成就,但转录组学对中医证候研究和疾病诊断上本身尚存在许多不足,如不能适应基因表达的多态性、信息含量不够全面、敏感性和准确度不够高等;加之芯片技术本身也存在一些局限性,一种芯片只能检测有限的基因和诊断一种或几种疾病,对于复杂证候则束手无策。因此,引入 RNA-seq 技术就十分必要。该技术能够很好地解决这些问题,通过 RNA-seq 技术可以获得不同病变组织、不同时间段的基因表达谱,分析表达谱从而找到一系列差异表达的基因,进而结合数据库进行基因的功能比对和构建疾病影响的代谢调控网络^[10]。也可进一步挖掘不同个体病例的表达谱,结合人类基因组计划,构建一个病例与整体或组织器官特异表达谱相对应的诊断数据库,通过病人表达谱数据与数据库中已建立的证型特异基因表达谱进行生物信息学比较分析,初步对病人做出诊断^[11]。所以,证候实质的研究还有很多工作需要完善,首先是标准证型模型的建立,然后是相关证型数据库的建立,可以设想,倘若中医证型数据库与疾病数据库均足够庞大,仅通过一次 RNA-seq 测序,就应当能做到对病人进行疾病和证候的诊断,并为精确治疗提供指导,从而大大提高

临床疗效。

2.2 RNA-seq 技术用于方药有效成分的筛选和作用机制研究

中医临床治疗疾病,以中药复方为主要手段。实践证明,大多数疾病的疗效,是通过大量中药有效成分来发挥作用的,因此不能通过传统的单靶标药物筛选来研究中药有效成分,而应从多靶点的研究策略出发。长期以来,由于中药复方成分过于复杂,为其机制研究带来很大难度。芯片技术的应用,为解决这一难题提供了新的手段,迄今已取得了一定成果。如刘喜德等^[12]研究发现,温化蠲痹汤干预胶原诱导性关节炎大鼠后,大鼠滑膜基因有 222 条差异表达,这些差异表达基因主要涉及细胞凋亡、血管生成、信号转导等。王东生等^[13]构建了大黄廑虫丸治疗动脉栓塞患者前后的基因表达谱,筛选出了血小板中 243 个差异基因。可见,芯片技术在方剂的研究上已经突显优势,鉴于 RNA-seq 技术在各方面更优于芯片技术,因此,RNA-seq 技术应用于方剂研究可加快研究进度与准确度。利用 RNA-seq 技术建立不同方剂处理前后的表达谱数据库,通过比对现有的研究成果(如 NCBI 数据库),构建药物影响的代谢网络通路,进而解析方剂的作用机制,也许是该领域研究取得突破的关键环节。

几千年的中医药学有其独特的优势,但受到有效成分及作用机制不明确等因素影响而不能被西医体系所普遍接受。因此,在中药研究方面,筛选治疗疾病的有效药物并探讨其作用机制历来是其重要内容。以肿瘤防治为例,从中药中提取分离得到的抗肿瘤成分,包括三尖杉碱、紫杉醇、羟基喜树碱和长春碱类等,已经成为疗效明确的抗肿瘤药物^[14]。目前,肿瘤防治的相关研究已从单纯的细胞靶向杀灭逐步向肿瘤微环境方向转移,抑制肿瘤转移是肿瘤防治的关键环节,中医药在防治肿瘤发生发展中发挥了较大作用。贺用和^[15]总结了中药和西药在肿瘤转移的应用情况,并指出中药治疗相较西药的手术、放化疗等不良反应少,且能减轻病人的痛苦而更易被患者所接受。孙大志^[16]通过比较小鼠注射了 MNK-45 胃癌细胞间质液和生理盐水等对照的实验,证实了中医胃癌痰证理论和细胞间质相关,从而说明化痰是抑制 MNK-45 胃癌转移的重要方法。关于肿瘤转移的研究,近几年进展迅速,继种子与土壤学说之后,肿瘤干细胞与肿瘤转移、上皮间质转换与肿瘤转移、肿瘤休眠与肿瘤远期转

移逐步被提出,中医药在抑制肿瘤转移方面作用凸显,现已发现多种抗肿瘤转移中草药,如白花蛇舌草、半枝莲、人参、仙鹤草等。另外,很多学者对其机制也作了初步研究,王秀峰等^[17-18]对近几年中药及其成分干预肿瘤转移的研究报道进行归纳总结,其中当归中提取的果胶多糖能够增强机体 B 细胞和巨噬细胞的免疫功能,抑制肿瘤细胞的转移;去甲斑蝥素通过下调桥粒核心糖蛋白、N-钙黏蛋白、A、B 连环蛋白的表达降低黏附;吴茱萸碱能够通过抑制 ERK 的磷酸化来减少 VEGF 的表达,抑制肿瘤转移等。鉴于中药的有效成分及抗癌机制研究仍处在较初级阶段,加快筛选有效抗癌中药,并明确其有效成分及作用机制是需要努力的方向。在具体研究中,首先应当从一些有明确抗癌疗效的临床方药入手来研究中药抗癌机理和有效成分的筛选。而且, RNA-seq 技术可以同其它一些分子生物学手段结合起来,通过构建肿瘤对中药应答的转录谱,找出差异表达的基因,从而架构信号调控网络。选择其中一些基因作为药物筛选的 maker 基因,并结合荧光定量 PCR (QRT-PCR) 检测 maker 基因的表达量,以之作为检验药物有效性的标准。近来,随着多能干细胞诱导 (IPS) 细胞体外诱导分化技术 (该成果已在 2012 年获诺贝尔医学奖) 的成熟,为药物筛选提供了充足的细胞材料^[19]。选取病人的病变组织细胞,体外诱导成无限扩繁的 IPS 细胞系,以不同药物组合处理这些细胞并获得细胞的表达谱数据^[20],并以 marker 基因的表达情况为检测标准筛选药物的有效成分,然后在结构生物学、药物化学、网络药理学的协同应用下,以及采用现代药物开发技术等,进一步对这些有效成分进行改造和组合,可以开发出更高效、更健康的抗肿瘤药物。

2.3 RNA-seq 技术用于临床用药安全评定体系的建立

纯天然的中草药并非安全无毒的绿色药物。在肯定中药疗效的同时,必须做好安全性评价体系,这是中医药走向现代化必备的基础。由于中药毒性的产生和其药效的作用模式是相通的,因此其安全性检测也必须强调系统化、动态化和整体化^[21]。传统中药安全性评价主要采用一般化学药物的研究思路,即着眼于有效成分 (或毒性成分) 进行研究,存在着不可忽视的片面性,同时也没有一个固定的标准化评定体系,使中药的有效性和安全性受到一些质疑。针对这一现状,有专家指出在原

有研究的基础上,是否可以借助转录组学技术做进一步的深入研究,如通过相关 RNA-seq 数据的分析,检测药物是否引起了一些参与重要代谢途径的蛋白的表达变化,根据表达量的变化来初步判定这些药物是否具有潜在毒性,或把表达谱数据与有毒化合物的毒理效应数据库比对,观察此类中药是否含有这些毒性化学物质并反应其毒性的强弱程度^[9]。因此,可以把 RNA-seq 表达谱作为临床用药安全评定的标准之一。

3 RNA-seq 技术在中医药领域应用策略分析

如上所述, RNA-seq 技术数字化、系统化的特点在中医药研究中可以大展身手,但要使其发挥出更大的作用,尚应当重视以下关键环节。

3.1 应加强疾病及病证动物模型的研究

RNA-seq 技术应用于中医药研究离不开很好的病证动物模型。目前,一些疾病及中医证候动物模型的建立及调控尚存在一定难度,并且如何将目的基因差异表达的程度和疾病时期、药物剂量等联系起来还不十分清楚,因此 RNA-seq 技术可先与病证动物模型研究相结合并把研究数据作为人类疾病诊断和治疗的参考。目前已经利用在组织结构上、生理代谢上和人体有很大相似性的小鼠、大鼠、小型猪建立了多种疾病模型^[22],同时这些模式生物都已完成了全基因组测序、基因注释,并在很多疾病上有了较好的分子生物学研究基础,但仍然缺乏公认、成熟的病证结合模型。因此,加强对疾病和证候模型的研究,逐步建立和完善病证转录组数据库,可为中医临床精确诊断、对症下药、同病异治奠定基础。

3.2 应加强对 mRNA 修饰和蛋白质修饰的研究

目前,转录组学分析还只是停留在转录水平上。基因组中只有少部分基因表达成 mRNA,大部分基因只是起调控作用, mRNA 只是基因调节生命活动的中间体,更多的生命活动体现在转录后的 mRNA 修饰和翻译后的蛋白质修饰上。现有大量研究表明非编码的 RNA (ncRNA) 起了重要调控作用,其中研究最热的是 microRNA (miRNA)。miRNA 是 22 个左右核苷酸序列的小 RNA,能够靶向调控目标基因^[23]。郑思道等^[24]的一篇综述很好地概括了 miRNA 在中医药研究中的进展, miRNA 参与了中药有效成分对肿瘤的调控。现有报道人类总共含有一千多个 miRNA^[25], miRNA 表达的特异性和时序

性与中医证候的动态时空特征极其相似,如王阶等^[26]提出将 miRNA 引入冠心病中医证候的研究,借助 miRNA 芯片及生物信息学技术,建立和证候相关的 miRNA 调控网络,为从转录水平研究中医药提供了新的视角。随着 RNA-seq 技术的发展还会发现更多参与疾病调控的 microRNA,并阐述其调控的分子机制。另外,蛋白质才是生命活动真正的体现者,有很多蛋白功能都是在翻译后调控的,如甲基化、糖基化和磷酸化/去磷酸化等修饰作用,其 RNA 转录量并没有任何改变。因此,充分利用 RNA-seq 技术,加强对 mRNA 修饰和蛋白质修饰的研究,促进基因组学加深对功能基因和调控基因功能和结构的认识,进一步丰富各种蛋白质、次生代谢物的数据库,可以帮助人们在蛋白组学、代谢组学水平上更深层次地研究中医药学。

参 考 文 献

- [1] Qi Y X, Liu Y B, Rong W H. RNA-Seq and its applications: a new technology for transcriptomics [J]. Yi Chuan, 2011, 33 (11):1191-1202.
- [2] Kuersten S. A transposable approach to RNA-seq from total RNA [J]. Nature Method, 2012, 9(6).
- [3] Mcgettigan P A. Transcriptomics in the RNA-seq era[J]. Curr Opin Chem Biol, 2013, 17(1):4-11.
- [4] Marguerat S, Bahler J. RNA-seq: from technology to biology [J]. Cell Mol Life Sci, 2010, 67(4):569-579.
- [5] Chen J X, Zhao H H, Wang W. Investigative strategy for research on biological basis of traditional Chinese medicine syndrome: feature selection-based data mining methods[J]. Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao, 2010, 8(8):747-749.
- [6] 马晓娟,殷惠军,陈可冀. 血瘀证患者差异基因表达谱研究[J]. 中西医结合学报, 2008, (4):355-360.
- [7] 严石林,沈宏春,王浩中,等. 3 种疾病肾虚证“同证异治”的信号通路调控研究[J]. 云南中医学院学报, 2012, (1):5-9.
- [8] 黄进,胡华斌,谢阳春,等. TUBB3, TS, ERCCI mRNA 表达对晚期胃癌化疗疗效和预后的影响[J]. 中南大学学报(医学版), 2013, 38(6):582-589.
- [9] Chen S L, Jiang J G. Application of gene differential expression technology in the mechanism studies of nature product-derived drugs[J]. Expert Opin Biol Ther, 2012, 12(7):823-839.
- [10] Wang E T, Sandberg R, Luo S, et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes [J]. Nature, 2008, 456 (7221):470-476.
- [11] Choi M, Scholl U I, Ji W, et al. Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009, 106(45):19096-19101.
- [12] 刘喜德,洪旭涛,王云卿,等. 温化蠲痹方对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜基因表达谱的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012(10):1398-1402.
- [13] 王东生,陈方平,贺石林,等. 大黄廬虫丸抗动脉血栓形成的基因表达谱研究[J]. 中药材, 2009(9):1410-1413.
- [14] 仇凤梅,曹巧巧,张如松. 中药抗肿瘤有效成分的药效基因研究概况[J]. 现代肿瘤医学, 2008, (4):666-671.
- [15] He Y H. General survey of traditional Chinese medicine and Western medicine researches on tumor metastasis [J]. Chin J Integr Med, 2006, 12(1):75-80.
- [16] Sun D Z, Jiao J P, Ju D W, et al. Tumor interstitial fluid and gastric cancer metastasis: an experimental study to verify the hypothesis of “tumor-phlegm microenvironment” [J]. Chin J Integr Med, 2012, 18(5):350-358.
- [17] Chen Y J, Shieh C J, Tsai T H, et al. Inhibitory effect of norcantharidin, a derivative compound from blister beetles, on tumor invasion and metastasis in CT26 colorectal adenocarcinoma cells [J]. Anticancer Drugs, 2005, 16(3):293-299.
- [18] 王秀峰,苏式兵. 中药及其成分干预肿瘤转移实验研究进展[J]. 中国中药杂志, 2008, (22):2583-2587.
- [19] Spinelli V, Guillot P V, De Coppi P. Induced pluripotent stem (iPS) cells from human fetal stem cells (hFSCs) [J]. Organogenesis, 2013, 9(2):101-110.
- [20] Cloonan N, Forrest A R, Kolle G, et al. Stem cell transcriptome profiling via massive-scale mRNA sequencing [J]. Nat Methods, 2008, 5(7):613-619.
- [21] 范刚,周林,赖先荣,等. 基于代谢组学技术的中药质量控制研究思路探讨[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2010, (6):870-875.
- [22] 殷惠军,黄烨. 病证结合动物模型的研究进展[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(1):8-10.
- [23] Calin G A, Croce C M. MicroRNA signatures in human cancers [J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(11):857-866.
- [24] 郑思道,吴红金,刘宇娜. microRNA 在现代中医药研究中的作用和意义[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2012, 10(7):857-860.
- [25] Liu C G, Calin G A, Meloon B, et al. An oligonucleotide microchip for genome-wide microRNA profiling in human and mouse tissues [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101 (26):9740-9744.
- [26] 王阶,虞桂. microRNA 与冠心病中医证候研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2012(11):1562-1565.

(收稿日期:2013-08-04)

(本文编辑:蒲晓田)