

· 综述 ·

实时荧光定量 PCR 技术及其在中医药研究中的应用

龚美蓉, 陈凤丽, 曹晨, 孙亦农, 王明艳*

(南京中医药大学, 南京 210023)

[摘要] 在中医现代化研究过程中, 越来越多地应用先进的现代科学技术, 聚合酶链式反应(PCR)技术作为一项重要的研究工具, 亦被不断地用于中医药的研究。荧光定量 PCR 是在 PCR 技术基础上发展起来的一种高度灵敏的核酸定量技术, 在 PCR 反应体系中计入荧光染料或荧光探针, 利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 反应进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析, 具有操作简便、快速高效, 高通量而且高敏感性等特点, 极大地克服了原有 PCR 技术的不足, 目前该技术已逐渐成为中医药研究中的重要手段。本文概述了实时荧光定量 PCR 技术分别在中医诊断、中医药理研究、中医证实质研究和针刺作用机制研究中的应用。通过文献研究表明: 应用实时荧光定量 PCR, 可以从分子基因水平探讨方剂或单味药及有效成分在组织、细胞及至分子层次上的作用机制, 了解药物作用部位及靶点。探讨中医证候的病理生理学基础, 并为阐明其生物学本质提供了新思路。使我国传统中医药体系的科学性在分子生物学的基因水平上得到了初步的验证。这些研究思路和方法为中医药的研究提供了借鉴, 实时荧光定量 PCR 有望更广泛的应用于中医药研究中。

[关键词] 实时荧光定量; 聚合酶链式反应; 文献研究

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)22-0238-04

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2014220238

Application of Real-time Fluorescence Quantitative PCR in Chinese Medicine Research

GONG Mei-rong, CHEN Feng-li, CAO Chen, SUN Yi-nong, WANG Ming-yan*

(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

[Abstract] In the process of modernization research of traditional Chinese medicine, more and more advanced technologies are applied. Polymerase chain reaction (PCR), as an important research tool, is also used in the study of traditional Chinese medicine (TCM). Real-time fluorescent quantitative PCR is a highly sensitive nucleic acid quantification technique that is developed on the basis of technology of PCR. In PCR reaction system, fluorescent dyes or fluorescent probes are added; then the PCR reaction is monitored in real time by using fluorescence signal accumulation; and finally the unknown template is analyzed quantitatively by using standard curve. With the characteristic of simple, fast, efficient, high-throughput and high sensitivity as well, real-time fluorescence quantitative PCR overcomes the deficiency of traditional one greatly and gradually becomes an important means of studying the Chinese medicine at present. The applications in the diagnosis of TCM, pharmacology research of TCM, essence research of TCM syndrome and the study of acupuncture mechanism are introduced in this review. Many studies have showed: Molecular mechanism of the prescription, single herb and effective components at tissue, cell and molecular levels could be explored and target site of drug could be found by using real-time fluorescent quantitative PCR; Additionally, it helped to reveal the pathophysiological basis of TCM

[收稿日期] 20131226(012)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81202742);江苏省2013年度普通高校研究生科研创新计划项目(CXZZ13_0619, CXZZ13_0629)

[第一作者] 龚美蓉, 博士, 助理研究员, 从事中医药分子生物学方面的研究, Tel:025-85811233, E-mail:njmgong@sina.com

[通讯作者] *王明艳, 博士, 教授, 博士生导师, 从事中医药细胞分子生物学方面研究, Tel:025-85811931, E-mail:dmwmy@163.com

symptoms and provide new ideas for elucidating the biological essence; What's more, the science of traditional Chinese medicine has been validated at the genetic level of molecular biology. Based on these studies, real-time fluorescent quantitative PCR would be widely used in the research of traditional Chinese medicine.

[**Key words**] real-time fluorescence quantitative; polymerase chain reaction; literature research

聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 作为一种重要的基因诊断方法,以其迅速、简便、灵敏等优点很快成为科研、临床的热点技术。但是传统 PCR 技术在应用中遇到诸如需要进行扩增反应后的电泳分离及染色处理,不能准确定量等问题,使其应用受到限制。1992 年 Higuchi 等首次提出了采用动态 PCR 方法和封闭式检测方式对目的核酸进行定量分析,为解决传统 PCR 的难题提出了新的思路^[1]。1996 年实时荧光定量 PCR 技术有美国 Applied Biosystems 公司推出,该技术融合了 PCR 高灵敏性、DNA 杂交的高特异性和光谱技的高精确定量等优点,在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号来实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板浓度进行定量分析^[2]。荧光定量 PCR 克服了常规 PCR 技术的诸多难题,如不需要 PCR 后处理或电泳检测,完全闭环操作减少污染,可以准确定量。因此实时荧光定量 PCR 技术在中医药研究中拥有更加广阔的应用空间,为中医药理论及其临床研究提供了更为客观的物质基础。现对实时荧光定量 PCR 技术在中医药研究中的应用综述如下。

1 实时荧光定量 PCR 技术的基本原理

实时荧光定量 PCR 技术是以荧光共振能量转移原理为基础,在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。 C_t 值是指样品管的荧光信号到达某一固定阈值的 PCR 反应循环数,是实时荧光 PCR 中一个很关键的因素, C 代表循环 (Cycle), t 代表阈值 (Threshold)。每个模板的 C_t 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系,利用标准品模板系列绘制出标准曲线,结合各样品的 C_t 值,就可以确定样品的起初模板量。实时荧光定量 PCR 技术所使用的荧光物质主要有两种:荧光探针和荧光染料。

Taq Man 荧光探针是应用最广的水解探针,其原理主要是:PCR 扩增时在加入一对引物的同时加入一个特异性的荧光探针,该探针为 20 多 bp 的寡核苷酸,5' 端标记一个特异性的报告荧光基团,3' 端或靠近 3' 端标记一个淬灭荧光基团。当探针完整的时候,报告基团所发射的荧光能量通过荧光共振能量传递被邻近的淬灭基团吸收,不能发出荧光信号。在 PCR 的退火期,探针与模板发生特异性杂交,当延伸期引物在 *Taq* 酶作用下沿 DNA 模板延伸到达探针处,*Taq* 酶的 5'→3' 外切核酸酶活性将探针酶切降解,使报告荧光基团和淬灭基团分离,从而荧光检测系统可接收到荧光信号^[3-4],每扩增一条 DNA 链,就有一个探针被切断并伴有一个荧光信号的释放。理论上被释放的荧光基团数目和 PCR 产物数量成正比关系。因此可根据 PCR 反应液中的荧光强度即可计算出初始模板的数量^[5]。但 *Taq Man* 也存在一定

的不足之处,如淬灭难以彻底,本底较高、定量时容易受酶活性的影响、探针成本较高,无法普及应用等。

SYBR Green I 是一种非饱和菁类荧光素,可以嵌合于 DNA 双链结构的小沟中,非特异地与 dsDNA 分子结合,是最广泛应用的非探针类化学检测物。在 PCR 反应体系中,SYBR Green I 荧光染料特异性地掺入 DNA 双链后,发射荧光信号。而游离的荧光染料不发出荧光,因此扩增开始时检测不到荧光信号。随着扩增的进行,荧光染料与逐渐增多的 dsDNA 结合,荧光强度逐渐增强,直到达到阈值,被荧光探测系统检测到^[6]。荧光染料法其优势在于检测方法简便,检测成本低。不足之处是由于荧光染料能与任何 dsDNA 结合,因此它也能与非特异性的 dsDNA (如引物二聚体) 结合,使试验产生假阳性结果,使定量结果不可靠。利用荧光染料可以指示双链 DNA 熔点的性质,通过熔点曲线分析可以识别扩增产物和引物二聚体,因而可以区分非特异性扩增。也可以通过设计特异性引物、优化 PCR 的反应条件,减少或去除非特异性产物。

2 中医药科研中引入实时荧光定量 PCR 技术应用

中医学历来认为疾病的发生、发展是人体正气与病邪共同作用的结果,人的体质因素是影响疾病发生、发展、变化的重要因素之一。体质因素决定了某些疾病的易感性,决定了某些疾病的证候类型。中医这种实践中得来的朴素的、笼统的认识是建立在没有形态的功能变化之上,中医基本理论 (包括中医语言) 与现代科学理论之间还未找到实质性的契合点。而人类基因组计划为医学提供了生物信息的基础,使得无论是西医还是中医都能在分子生物学层面上得以充分阐释和找到共同语言。在中医药研究中引入实时荧光定量 PCR 技术,可为中医药理论研究中提供了可共识的物质基础。从分子基因水平解释中医几千年来行之有效而又难以阐释的机制,应大有可为。

2.1 实时荧光定量 PCR 技术在中医诊断中的应用 中医传统的诊断思维方式和方法虽然体现了中医宏观性和整体性的特点,但其获得的信息往往存在着较大的模糊性,同时带有很强的主观性和不确定性。运用证素进行组合辨证,将有助于摒弃纷繁复杂的表象的干扰,直接把握疾病本质,提高中医辨证论治的可操作性、准确性,对临床诊治具有很大指导意义。研究发现发现,动脉粥样硬化 (AS) 的发生、发展与基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 及 TIMP-1 基因表达水平有着重要的关系。谈晓东等^[7] 将 AS 患者分为痰浊证素组 30 例,非痰浊证素组 48 例,通过实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 技术进行 MMP-9 和 TIMP-1 mRNA 表达水平的定量检测。研究显示 AS 痰浊证素组的 MMP-9 基因与 TIMP-1 基因表达水平明显大于非痰浊证素组,提示可将 MMP-9 与 TIMP-1

基因水平检测作为 AS 病情发展的一种监测指标和 AS 中医辨证分型的客观指标。

何永鑫等^[8]通过 *Taq Man* 实时荧光定量 PCR 方法对 50 例正常人和 80 名糖尿病肾病不同分期患者进行了醛糖还原酶 (AR) 基因表达量测定,结果显示 AR 基因的表达量的变化趋势在不同中医分型中的阴虚、阳虚和阴阳两虚与西医诊断的 DN Ⅲ期、Ⅳ期和 V 期基本一致。这说明中医诊断的阴虚、阳虚到阴阳两虚都能够反映糖尿病肾病病情逐步发展恶化的程度,与西医体系中的 DN Ⅲ期、Ⅳ期和 V 期具有同样的作用。使我国传统中医药体系的科学性在分子生物学的基因水平上得到初步验证。

2.2 实时荧光定量 PCR 技术在中药药理研究中的应用

中药作为天然药物的应用价值日益受到世界的瞩目,优势凸显,其治病的物质基础是通过其所含的生物活性分子而发挥作用。但很多药物作用机制不明,疗效评价不可靠。因此,可以借鉴实时荧光定量 PCR 技术的方法,从分子水平探讨方剂或单味药及有效成分在组织、细胞及至分子层次上的作用机制,了解药物作用部位及靶点。

张红等^[9]用凉血化瘀法对实验性自身免疫性甲状腺炎模型大鼠进行治疗,采用实时荧光定量逆转录-聚合酶链式反应法研究大鼠外周血单核细胞肿瘤坏死因子 α 和白细胞介素-10 mRNA 的表达情况。结果发现凉血化瘀中药可一定程度地降低 TNF- α mRNA 及增加 IL-10 mRNA 表达,说明凉血化瘀法对 Th1/Th2 平衡紊乱有一定程度的免疫调节作用。姜华等^[10]用荧光定量 PCR 方法测定益气活血复方含药血清对脂多糖诱导的人脐静脉内皮细胞 Toll 样受体 4 (TLR4), NF- κ B 及 TNF- α , 细胞间黏附分子 (ICAM-1) mRNA 表达的影响。研究发现益气活血方可阻断 TLR4/NF- κ B 信号通路的高表达,同时抑制 TNF- α 及 ICAM-1 的表达,这可能是其发挥抗动脉粥样硬化作用的机制之一。

采用实时荧光定量 PCR 研究发现中药单体丹酚酸 B 可以使离体培养内皮祖细胞 (EPCs) 细胞因子 (VEGF, bFGF mRNA) 的表达量增加,提示丹酚酸 B 对 EPCs 具有保护作用,增强其细胞功能的部分机制与其增强分泌细胞因子 VEGF 和 bFGF^[11]。余克强等^[12]选取 10 例类风湿关节炎患者,分离患者的单核细胞,采用细胞因子刺激分化为树突状细胞。用中药单体青藤碱进行干预,应用实时荧光定量 PCR 和 Western-blot 检测 TLR2 和 TLR4 的表达。结果显示青藤碱干预后,可使树突状细胞 TLR2 和 TLR4 的 mRNA 和担保表达降低,提示青藤碱可能通过抑制树突状细胞 TLR 介导的炎症信号转导,而产生治疗类风湿关节炎的作用。

2.3 实时荧光定量 PCR 技术在证实质研究中的应用 辨证论治是中医学的核心内容,证实质的研究室诸多学者讨论的重点,随着实时荧光定量 PCR 技术的不断完善,可以从基因表达定量水平来探讨证的实质。中医理论认为,脾(胃)运化水液失常,易湿浊内生,湿聚易化热,这也是脾胃湿热证的基本病机。可见,脾胃湿热证与“脾主运化水液”、水液

代谢密切相关。研究发现在多种器官组织的细胞膜上存在着一种整合蛋白质,即水通道蛋白它能特异性地介导水转运。人体胃体主要是水通道蛋白 (AQP4) 表达,且只表达胃底腺主细胞和壁细胞的膜上,功能是参与胃液的分泌和(或)维持壁的细胞正常容积。周正等^[13]招募慢性浅表性胃炎患者 25 例,其中脾胃湿热证 15 例,脾气虚证 10 例,另 10 例健康志愿者为对照。采用荧光定量 PCR 法检测 AQP4 在各组胃黏膜组织中的 mRNA 表达量。结果提示在脾胃湿热证患者中,胃腺细胞表达 AQP4 增加,可能会引起胃液分泌增加,而脾气虚证组 AQP4 低下,可能与其能量代谢低下有关。这说明 AQP 的异常表达可能是脾胃湿热证的分子生物学机制之一。脾胃湿热证和脾虚证一实一虚,与水液代谢失衡都相关,AQP 表达也不同,这也提示 AQP 可用来研究“脾主运化水液”的机制。

韩冰冰等^[14]采用基因芯片技术和荧光定量 PCR 验证芯片结果的方法,研究虚寒证与虚热证大鼠肝全基因表达谱的差异。研究发现虚寒模型组与虚热模型组比较有 114 条基因差异表达,主要涉及氧化还原酶相关基因。脂代谢相关氧化还原酶基因显著下调,细胞色素 P450 家族基因显著下调,提示虚寒证模型大鼠脂代谢与生物转化能力的降低。虚寒证与虚热证虽然同为虚证,但有“寒证”和“热证”不同的表现,氧化还原酶活性相关基因的异常表达可能是虚寒证与虚热证出现不同症状的物质基础。这些研究为探讨症候的病理生理学基础、阐明其生物学本质提供了新思路。

2.4 实时荧光定量 PCR 技术在针刺作用机制研究中的应用 实时荧光定量 PCR 技术对靶基因的数量进行检测,尤其对低丰度 mRNA 水平进行定量,运用实时荧光定量 PCR 技术有望有助于阐明针刺作用的机制。沈梅红等^[15]应用实时定量荧光 PCR 方法研究电针对缺血再灌注大鼠大脑皮层 Bax/Bcl-2 mRNA 基因表达的调节作用。结果表明,电针可以降低大脑皮层中 Bax mRNA 含量,提示电针可通过调控内源性凋亡途径,抑制 Bax 的促凋亡作用,降低缺血再灌注区的细胞凋亡,促进细胞的存活。周景辉等^[16]研究转化生长因子 β 在维持关节软骨正常和关节修复中的意义。设立正常组、模型组、电针组和药物组,采用荧光定量 PCR 法,检测转化生长因子 β_1 及其受体 I, II 的含量。结果实验电针组和药物组的转化生长因子 β_1 受体 I mRNA、转化生长因子 β_1 受体 II mRNA 的表达量均较模型组显著降低,认为与转化生长因子 β_1 结合的受体含量下降,使转化生长因子 β_1 破坏软骨的作用减弱。

李文媛等^[17]将荧光定量 PCR 法应用于电针联合脂肪源性干细胞 (ADSC) 移植研究领域,设计了正常组、模型组、电针组、ADSC 组、电针加 ADSC 组,用实时荧光定量 PCR 检测海马区 IGF-1, IGF-1R mRNA 表达。结果表明电针加 ADSC 联合治疗协同促进脑缺血大鼠神经功能恢复,其机制可能与电针上调海马区 IGF-1 和 IGF-1R 的表达、改善干细胞生存内环境、促进移植的 ADSC 迁移和存活有关。这些研究思路和方法为针刺领域的研究提供了借鉴。

3 结语与展望

实时荧光定量 PCR 技术具有的特异性强,有效解决了传统 PCR 污染问题,自动化程度高,成为迄今为止定量最为准、重现性最好的定量方法。毫无疑问实时荧光定量 PCR 技术将成为未来分子生物学实验室必备的研究工具,有望广泛应用于中医药研究中的诸多领域。

[参考文献]

[1] Heid C A, Stevens J, Livak K J, et al. Real time quantitative PCR [J]. *Genome Res*,1996,6(3):986.

[2] Higuchi R, Fockler C, Walsh P S, et al. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences [J]. *Biotechnology*,1992,10(9):413.

[3] Tyagi S, Kramer F R. Molecular beacons probes that fluoresce upon hybridization [J]. *Nat Biotechnol*,1996,14:303.

[4] Holland P M, Abramson R D, Watson R, et al. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the exonuclease activity of thermos aquaticus DNA polymerase [J]. *Proc Natl Acad Sci USE*,1991,88:7276.

[5] Livak K J, Flood S J, Marmaro J, et al. Oligo nucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization [J]. *PCR Methods APPI*,1995,4(6):357.

[6] Yin J L, Shackel N A, Zekry A, et al. Real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for measurement of cytokine and growth factor mRNA expression with fluorescent probes or SYBR Green I [J]. *Immunol Cell Biol*,2001,79(3):213.

[7] 谈晓东,苏伟,高枫,等. 动脉粥样硬化患者基质金属蛋白酶-9 及其抑制物-1 基因表达与痰浊证素的相关性研究 [J]. *中国中医急症*,2012,21(6):868.

[8] 何永鑫,李雪,范雪梅,等. 糖尿病肾病患者 AR 基因表达量测定 [J]. *高等学校化学学报*,2010,31(3):293.

[9] 张红,徐晓光,顾军. 凉血化瘀法对实验性自身免疫性甲状腺炎大鼠外周血单核细胞肿瘤坏死因子 A 和白细胞介素-10 的影响 [J]. *中西医结合学报*,2008,6(2):190.

[10] 姜华,张艳,王辰. 益气活血复方含药血清对人脐静脉内皮细胞 TLR4/NF- κ B 信号通路及 TNF- α ICAM-1 mRNA 表达的影响 [J]. *辽宁中医药大学学报*,2010,12(4):45.

[11] 薛亮,范英昌,李庆雯,等. 丹酚酸 B 对离体培养内皮祖细胞 VEGF、bFGF mRNA 表达及抗氧化酶活性的影响 [J]. *中国老年学杂志*,2011,31(9):236.

[12] 余克强,罗仁. 青藤碱对类风湿关节炎患者外周血树突状细胞 TLR2 和 TLR4 表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*,2009,24(3):316.

[13] 韩冰冰,王世军. 比较虚寒证与虚热证模型大鼠肝全基因表达谱的差异 [J]. *北京中医药大学学报*,2011,34(10):673.

[14] 周正,劳绍贤,黄志新,等. 脾胃湿热证与水通道蛋白 4 基因表达的关系 [J]. *中国中西医结合消化杂志*,2004,2(2):71.

[15] 沈梅红,刘晓华,李缨,等. 电针调节脑缺血再灌注大鼠大脑皮层 Bcl-2 和 Bax mRNA 的表达 [J]. *辽宁中医杂志*,2012,39(1):155.

[16] 周景辉,吴耀持,张峻峰,等. 电针干预膝骨关节炎大鼠转化生长因子 β 含量的变化 [J]. *中国组织工程研究与临床康复*,2009,13(24):4690.

[17] 李文媛,王莹,李智刚,等. 电针联合脂肪源性干细胞移植对脑缺血/再灌注大鼠 IGF-1 及其受体表达的影响 [J]. *针灸临床杂志*,2013,29(1):69.

[责任编辑 邹晓翠]