

表观遗传学在中医针灸研究中的应用探讨

卢圣锋^{1,2}, 徐斌^{1,2}, 于美玲², 朱冰梅^{1,2*}

(1. 南京中医药大学针药结合省部共建教育部重点实验室, 江苏 南京 210023; 2. 南京中医药大学第二临床医学院, 江苏 南京 210023)

摘要:表观遗传学主要研究在没有 DNA 序列改变情况下, 基因功能的可逆的、可遗传的改变, 其通过相互作用, 多途径、多层次影响和调节遗传基因的功能和特性。该特点与中医针灸作用整体性、综合性、双向性、功能性特点具有很大相似性。“理、法、方、穴、术”是实现针灸作用的基础, 围绕 DNA 甲基化、蛋白质共价修饰、染色质重塑、非编码 RNA 等表观遗传调控形式及相应调控蛋白酶对其展开研究, 将为深入阐释“理、法、方、穴、术”的物质基础, 探索相应的量化指标提供新的思路, 研究结果将对指导针灸临床和提高针灸临床疗效具有积极意义。

关键词:表观遗传学; 中医针灸; 研究思路

中图分类号: R246

文献标志码: A

文章编号: 1672-0482(2013)02-0105-04

Considerations about introducing epigenetics into Chinese acupuncture research

LU Sheng-feng^{1,2}, XU Bing^{1,2}, YU Mei-ling², ZHU Bing-mei^{1,2*}

(1. Key Laboratory of Integrated Acupuncture and Medicine Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China; 2. The Second Medical College, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023 China)

ABSTRACT: Epigenetics is the study of heritable changes in genes and gene expression that do not involve DNA nucleotide sequences. It emphasizes that the information of gene regulation can interact through the ways of multi-channel and multi-level, and it is reversible. The therapeutic effects of acupuncture is based on the suitable rules includes principles, methods, formulas, medicinals and manipulation, which also reflect the characteristics of entirety, comprehensive, bidirectional and functional regulation. But the mechanism is unclear, which need further research. Then, the introduction of epigenetics into acupuncture research will be valuable attempt, which including DNA methylation, covalent modification, chromatin remodeling, microRNA and so on. The studies will be helpful for explain the material basis of principles, methods, formulas, medicinals and manipulation, and also will provide new ideas for exploring objective indicators of them. The research results will be useful for guiding the acupuncture clinic and improving the clinical efficacy.

KEY WORDS: epigenetics; acupuncture; research idea

临床疗效是中医针灸的生命线, 疗效的产生离不开合适的“理、法、方、穴、术”。但国外一些研究表明, 不遵循中医针灸理论, 不选用特定经穴, 甚至不用进行相应的手法操作, 也能达到与针灸治疗相当的临床效应^[1-4]。这些结论对传统理论提出挑战, 严重影响了针灸学科的发展。因此, 围绕针灸临床中的“理、法、方、穴、术”进行相应研究, 提高临床疗效, 探索其有效物质基础, 是针灸科研工作者的责任和义务。表观遗传学(Epigenetics)是研究在基因的核苷酸序列不发生改变的情况下, 基因表达了可遗传

变化的一门遗传学分支学科。其强调在基因组中除了 DNA 和 RNA 序列以外, 还有许多调控基因的信息, 虽然它们本身不改变基因的序列, 但是可以通过基因修饰、蛋白质与蛋白质、DNA 和其它分子的相互作用, 多途径、多层次影响和调节遗传基因的功能和特性, 且同时存在可逆性。这与针灸作用整体性、综合性、双向性、功能性的特点具有一定的相似性, 因此, 笔者认为将表观遗传学的理念和技术引入中医针灸研究, 将具有积极意义。

收稿日期: 2012-10-23; 修稿日期: 2013-01-27

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(2012CB518501); 国家自然科学基金(81202743, 81273838)

作者简介: 卢圣锋(1981—), 男, 江西高安人, 南京中医药大学讲师, 医学博士。* 通信作者: zhubm64@hotmail.com

1 表观遗传学及其主要研究内容

表观遗传学主要研究在没有 DNA 序列改变情况下,基因功能的可逆的、可遗传的改变,即其所表现出来的表观遗传是不基于 DNA 差异的核酸遗传,是对中心遗传法则的补充和完善。表观遗传具有调控组织和细胞中基因是如何“开”和“关”的作用。目前已知的表观遗传研究内容主要分为 DNA 甲基化、蛋白质共价修饰、染色质重塑、非编码 RNA 调控 4 个方面^[5-6]。DNA 甲基化,是指在 DNA 甲基转移酶(DNMT)的作用下将甲基添加在 DNA 分子中的碱基上,影响异染色质形成、转基因沉默和细胞分化等,从而调控基因的表达^[7-10]。蛋白质共价修饰最主要的是组蛋白共价修饰,包括乙酰化、去乙酰化、甲基化、磷酸化等共价修饰^[11],由此构成多种多样的组蛋白密码^[12-13]。其中,以乙酰化和去乙酰化为主,乙酰化通过乙酰化酶(HAT)给组蛋白加上乙酰基,影响基因活化以及 DNA 复制、调控转录、调节细胞周期,参与 DNA 损伤修复等;去乙酰化则通过去乙酰化酶(HDAC)产生相反作用,调控染色体易位、转录调控、基因沉默、细胞周期、细胞分化和增殖等。染色质重塑则是通过影响核小体结构,改变其基因启动区域的排列,增加了基础转录装置和启动子的可接近性,从而调控基因表达,影响机体功能和状态。非编码 RNA 分子,即 miRNA,其通过结合到目标信使 RNA 的互补序列进行转录后调节,进而产生转录抑制和基因沉默效应^[14-15]。

上述表观遗传现象广泛存在于大多数细胞中,并与机体功能和疾病状态密切相关,其中 DNA 甲基化、组蛋白去乙酰化和 miRNA 的表达与基因沉默密切相关^[16-17]。而这些表观遗传标记物的分布和 miRNA 的表达都容易被环境干扰^[18-20],且其分布和表达异常能导致多种疾病,如阿尔茨海默病^[21],自身免疫性疾病^[22]和心脏疾病^[23]。此外,对表观遗传标记物的检测还能预测机体状态,如当全基因组发生低甲基化和基因特异性的低甲基化被看作是癌症细胞的标记物^[24]。虽然这些表观遗传调控内容非常复杂,但其产生主要受几种特殊蛋白酶的调控,分别为 DNMT、HDAC、HAT,以及组蛋白甲基化转移酶(HMT)、甲基化的 CG 序列结合蛋白(MBD)、PcG 蛋白(PcG)、Drosha and Dicer (DICER) 和他们的家族。其中 DNMT、HDAC、HAT、HMT 对染色质起催化共价修饰作用,MBD 和 PcG 共同位于异染色质上,DICER 能促进 miRNA 前体

转化为成熟的 miRNA。因此,通过影响这些蛋白酶来调控表观遗传具有积极意义。

2 表观遗传学与中医针灸研究

在临床中,“理、法、方、穴、术”是实现效应的必要手段。“理”即中医理论,是临床诊断的依据和方法。虽然有研究者提出“经络辨证”是针灸治疗时诊断的主体^[25],但辨证论治与整体观仍然在针灸临床处于不可替代的位置。证是机体在疾病发展过程中某一阶段的病理概括,围绕辨证论治中的证进行研究具有重要意义。表观遗传中的 DNA 序列不变而功能可变的特性与同病异治,异病同治有着强烈的结合点。同一疾病的发生可能与不同的甲基化或乙酰化的调控相关,而不同疾病的发生发展可能受同一甲基化或乙酰化调控,故以此为切入点,采用高通量测序等相关技术对机体整体表观遗传水平及其蛋白调节酶进行筛选、评估,将为同病异治,异病同治生物学基础研究提供新的视角。同时,整体观强调人与自然、社会的整体性,即外界环境对机体具有不可分割的联系;疾病的发生、发展与环境因素密切相关,这也与表观遗传受环境影响具有一致性。此外,“用针之要,在于知调阴与阳”,阴阳是相对事物,存在相互转化关系,表观遗传也存在可逆性和相互转化性,如组蛋白在 HAT 作用下乙酰化,在 HDAC 作用下去乙酰化,即乙酰化和去乙酰化之间存在相互转化关系,这一特性与阴阳之间的关系存在一定的相似性,其平衡的维持是机体各项功能正常发挥的条件之一。因此,结合表观遗传学的具体内容,进行中医针灸辨证论治体系物质基础的界定,为针灸临床诊断提供科学的实验依据,这将是一项开创性的工作,值得深入研究。

治法研究。针灸临床常用的是补法、泻法,目前对补、泻法的研究一直滞后,目前还没有找到其相应的生物学基础,严重的阻碍了其在临床的应用和推广。目前,临床常用平补平泻代替之,这或许是影响针灸临床疗效的因素之一。有研究者采用文献信息学研究的方法,发现在众多方药中,补药主要针对组蛋白修饰来发挥功效^[26],那么针灸临床之补法是否也与组蛋白修饰相关? 如果有关,乙酰化、去乙酰化、或者甲基化,哪个与之最为密切? 同样,泻法又跟表观遗传机制中那一形式密切相关? 这些,都需要我们进行相应探索。

处方和选穴研究。处方与穴位选择密不可分,只有先明确穴性之后才能更好的进行针灸处方。近

年来,国外学者一直在质疑穴位的存在,目前对非经、非穴选取模糊不确定,不统一,且缺乏大样本、随机对照研究^[27],其原因是难以找到判定非经非穴的核心标准。调控表观遗传的 DNMT、HDAC、HAT、HMT、MBD、PcG、DICER 表达水平变化在一定程度反映机体的功能状态和干预措施的效应水平,或许能为此提供物质基础,选取最不能引起这些物质变化的部位作为非经非穴的选定标准也许能成为可能。在此基础上,进行穴位特异性研究。目前研究者已采用蛋白组学、基因组学、代谢组学探寻穴位特异性的生物学基础,研究结果也初步表明,经穴存在特异性,引入表观遗传学对其进行进一步研究,将更加完善穴位特异性的生物学证据。穴位配伍研究,即穴位组合后的协同增效作用和拮抗作用研究。其中的协同增效研究中,可以借鉴方剂配伍中的君、臣、佐、使模式进行,如研究表明,君药可以同时调整 DNMT、HDAC、HAT、HMT、MBD、PcG、DICER 的表达^[26],而臣药则只能影响其中的几个,佐药次之,使药影响最少。照此模式,针灸处方中穴位的选择也应如此,方能以最佳组合模式产生最好治疗效应。如在针灸治疗老年痴呆的治疗中,常采用百会穴、风府穴进行配伍,其依据是什么?中医认为,髓海不充是老年痴呆的根本病机,《灵枢·海论》论道“脑为髓之海,其输上在于其盖,下在风府”(此处盖即百会穴)^[28],故首选该两穴配伍进行补髓,但其现代科学基础是什么?有研究认为“脑髓”的现代科学基础之一是脑内神经干细胞增殖、分化^[29]。那么该配穴依据之一是否为百会穴能最大效能的影响 DNMT、HDAC、HAT 表达水平,从而影响 DNA 甲基化、组蛋白修饰,进而影响神经干细胞的增殖、分化;配以风府穴后,能更有效加强 DNMT、HDAC、HAT 表达水平,从而最大程度改善组蛋白修饰和甲基化效果,最终实现最佳补髓效应。当然,这只是我们的推测,具体科学依据需要进一步证实。

术的研究。主要包括针灸手法规范化、标准化,针灸手法效应、规律及生物学基础。针灸手法是影响针灸临床疗效的重要因素之一,同时也是目前影响临床大样本研究的主要因素之一。针灸刺激穴位后,其效应的产生是一个动态过程,刺激量与效应间密切联系,即存在产生最佳效应的最佳刺激量。我们的研究也就是寻找这种最佳刺激量的刺激方式和相应的物质基础。以影响 DNMT、HDAC、HAT、HMT、MBD、PcG、DICER 表达水平实现最大范围

的表观遗传变化作为针灸手法的评价标准,或许能界定最佳刺激方式。

3 小结

中医针灸作为一种古老的、有效治疗疾病的方法,疗效已被广泛接受,目前已经在 160 多个国家中进行使用,然而,其作用机理一直未得到完全阐释。虽然近年来国家加大了经费投入,连续资助针灸相关“973 计划”项目,使得针灸作用基础与规律的研究取得了长足发展,但要更全面阐明针灸作用的机制,实现最佳“理、法、方、穴、术”组合,还需要不断引进新的技术和方法。表观遗传学的兴起和发展,无疑为中医针灸的研究提供了一片新的视野和天地。

表观遗传学研究内容中的 DNA 甲基化、组蛋白共价修饰、染色质重塑、miRNA 的表达主要受 DNMT、HDAC、HAT、HMT、MBD、PcG、DICER 的影响,因此,抓住这些物质变化与表观遗传成正相关,以这些物质的表达程度为基准,围绕“理、法、方、穴、术”研究中的关键问题进行相应探索,对最终形成某一具体病证的临床实践指南或者相应的临床应用规范,具有积极的意义。在这个研究背景下,我们可以深入研究针灸临床差异问题,该问题是针灸临床效应可重复性差的主要原因之一,也是影响国外某些学者的针灸认同程度的主要因素之一。通过大样本的临床研究,筛选、明确针灸效应差异的表观遗传机制,探索开展实验室检测的技术方法,开发出检测适应针灸治疗的相应产品,最终实现针灸临床的个体化治疗。

当然,引入表观遗传学进入针灸研究领域并不能解决针灸研究中的所有问题,针灸疗法的特殊性决定了其研究的复杂性,在其众多需要解决的问题中^[30],表观遗传只能在某一层面丰富针灸研究内涵。因此,除了上述研究外,从表观遗传角度进行针灸治疗各类疾病的作用机制研究,或者结合表观遗传程度变化于临床效应评价体系之中,必定能为中医针灸学科的发展提供更充实、更可靠的实验证据。

参考文献:

- [1] Melchart D, Streng A, Hoppe A, et al. Acupuncture in patients with tension-type headache: randomised controlled trial[J]. BMJ, 2005, 331(7513):376-382.
- [2] Elden H, Fagevik-Olsen M, Ostgaard HC, et al. Acupuncture as an adjunct to standard treatment for pelvic girdle pain in pregnant women: randomised double-blinded controlled trial comparing acupuncture with non-penetrating sham acupuncture[J]. BJOG, 2008, 115(13): 1655-1668.

- [3] Goldman RH, Stason WB, Park SK, et al. Acupuncture for treatment of persistent arm pain due to repetitive use: a randomized controlled clinical trial[J]. *Clin J Pain*, 2008, 24(3): 211-218.
- [4] Schnyer R, Lao L, Hammerschlag R, et al. Society for acupuncture research: 2007 conference report: "the status and future of acupuncture research: 10 years post-NIH consensus conference"[J]. *J Altern Complement Med*, 2008, 14(7): 859-860.
- [5] Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome[J]. *Cell*, 2007, 128(4): 669-681.
- [6] Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, et al. A mammalian microRNA expression Atlas based on small RNA library sequencing [J]. *Cell*, 2007, 129(7): 1401-1414.
- [7] Bender J. DNA methylation and epigenetics[J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, 55: 41-68.
- [8] Paszkowski J, Whitham SA. Gene silencing and DNA methylation processes[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4(2): 123-129.
- [9] Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis[J]. *Cell*, 2006, 126(6): 1189-1201.
- [10] 郑小国, 陈亮, 楼巧君, 等. 表观遗传学研究方法进展[J]. *生物技术通报*, 2011(9): 63-71.
Zheng XG, Chen L, Lou QJ, et al. Research method progress of epigenetics[J]. *Biotech bulletin*, 2011, (9): 63-71.
- [11] Li X, Wang X, He K, et al. High-resolution mapping of epigenetic modifications of the rice genome uncovers interplay between DNA methylation, histone methylation, and gene expression[J]. *Plant Cell*, 2008, 20(2): 259-276.
- [12] 董玉玮, 侯进慧, 朱必才, 等. 表观遗传学的相关概念和研究进展[J]. *生物学杂志*, 2005, 22(1): 1-3.
Dong YW, Hou JH, Zhu BC, et al. Concepts related to epigenetics and their advances[J]. *J Biology*, 2005, 22(1): 1-3.
- [13] 王霞, 秦秀丽. 表观遗传学的产生、机制及生物学意义[J]. *吉林农业科技学院学报*, 2008, 17(4): 37-39.
Wang X, Qin XL. On the producing, mechanism and biology meaning of epigenetics[J]. *J Jilin Agricultu Sci Tech College*, 2008, 17(4): 37-39.
- [14] Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions[J]. *Cell*, 2009, 136(2): 215-233.
- [15] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [16] Fuks F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes[J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2005, 15(5): 490-495.
- [17] Kim DH, Saetrom P, Snøve O Jr, et al. MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(42): 16230-16235.
- [18] Baccarelli A, Bollati V. Epigenetics and environmental chemicals[J]. *Curr Opin Pediatr*, 2009, 21(2): 243-251.
- [19] Hudder A, Novak RF. miRNAs: effectors of environmental influences on gene expression and disease[J]. *Toxicol Sci*, 2008, 103(2): 228-240.
- [20] Bollati V, Baccarelli A. Environmental epigenetics[J]. *Heredity*, 2010, 105(1): 105-112.
- [21] Wang SC, Oelze B, Schumacher A. Age-specific epigenetic drift in late-onset Alzheimer's disease[J]. *PLoS One*, 2008, 3(7): 2698.
- [22] De Santis M, Selmi C. The therapeutic potential of epigenetics in autoimmune diseases[J]. *Clin Rev Aller Immunol*, 2012, 42(1): 92-101.
- [23] Yang B, Lin H, Xiao J, et al. The muscle-specific microRNA miR-1 regulates cardiac arrhythmogenic potential by targeting GJA1 and KCNJ2[J]. *Nat Med*, 2007, 13(4): 486-491.
- [24] Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human Cancer[J]. *Nat Rev Genet*, 2006, 7(1): 21-33.
- [25] 梁繁荣, 曾芳, 唐勇. 关于构建针灸临床辨证体系的思考[J]. *中国针灸*, 2008, 28(8): 551-553.
Liang FR, Zeng F, Tang Y. Thinking about building a clinical syndrome differentiation system of acupuncture and moxibustion[J]. *Chin Acupunc Moxibus*, 2008, 28(8): 551-553.
- [26] Hsieh HY, Chiu PH, Wang SC. Epigenetics in traditional Chinese pharmacy: a bioinformatic study at pharmacopoeia scale [J]. *Evid Based Comple Alternat Med*, 2011, 2011: 816714.
- [27] 田小平, 李瑛, 马婷婷, 等. 经穴与非经穴效应比较研究的现状与思考[J]. *中国针灸*, 2008, 28(12): 907-909.
Tian XP, Li Y, Ma TT, et al. Present situation and thinking of comparative studies on effects of acupoints and non-acupoints[J]. *Chin Acupunc Moxibus*, 2008, 28(12): 907-909.
- [28] 张志聪. 黄帝内经灵枢集注[M]. 北京: 学苑出版社, 2006: 278.
Zhang ZC. *Lingshu Annotations of the Yellow Emperor's Classic of Medicine*[M]. Beijing: Academy Press, 2006: 278.
- [29] 李小宏, 卢圣锋, 乔秀兰, 等. 针刺对快速老化小鼠海马神经干细胞增殖、分化的影响[J]. *中华物理医学与康复杂志*, 2010, 32(9): 662-665.
Li XH, Lu SF, Qiao XL, et al. The influence of acupuncture on neural stem cell proliferation and differentiation in the hippocampus of the senescence-accelerated mouse prone 8[J]. *Chin J Phys Med Rehabil*, 2010, 32(9): 662-665.
- [30] Carlo MG. 针灸科研需解决的问题[J]. *南京中医药大学学报*, 2011, 27(4): 301-303.
Giovannardi CM. Problems to be Addressed on Acupuncture Research[J]. *J Nanjing Univ Chin Med*, 2011, 27(4): 301-303.

(编辑: 范欣生)