广西血竭的质量标准提供了定量的检测方法[12]。

3 药理作用

3.1 消炎、止痛: 广西血竭对二甲苯所致炎症及烫伤所致炎症有一定的拮抗作用,具有消肿、减少脓性分泌物、收敛、加速创口愈合等作用,并对金黄色葡萄球菌、白色葡萄球菌、白喉杆菌和 5种常见表皮真菌有不同程度的抑制作用。与进口印尼皇冠牌血竭比较,以上指标中普遍疗效较后者为高;在对血凝系统方面两者没有明显影响[13]。广西血竭外擦能明显抑制巴豆油引起的小鼠耳壳炎症、大鼠角叉菜胶性足肿胀,降低小鼠腹腔毛细血管通透性; ig减少小鼠扭体反应次数,对抗己烯雌酚引起的大鼠在体子宫收缩作用[14]。

3.2 活血化瘀、止血: 广西血竭和进口皇冠牌血竭在血液流变学和实验性动脉血栓方面均可显示活血化瘀作用,对正常家兔血液流变学无明显影响,对用葡聚糖造成的家兔"急性血瘀"模型可使其全血粘度和血浆浓度下降,红细胞电泳时间加快,对大鼠实验性血栓形成有抑制作用;且两者在等剂量条件下作用强度大致相当[15]。广西血竭能缩短小鼠凝血时间和家兔血浆复钙时间,对家兔凝血酶原时间无明显影响,说明广西血竭有促进凝血作用[16],其促凝作用与影响内源性凝血系统的凝血因子有关;广西血竭尚能缩短家兔的优球蛋白溶解时间(ELT),由于 ELT与纤维蛋白溶解酶活性单位成反比关系[17],可见广西血竭可增高溶解酶活性单位,有促进或增强纤溶活性作用。因此,广西血竭具有既能止血又能祛瘀的双重活性。

3.3 毒性试验: 在 90 d的长期毒性试验方面,广西血竭未引起动物病理状态的改变,对红细胞、白细胞的生长和肝、肾功能方面未见损害;在光学显微镜下病理检查,除可见心肌细胞间微小血管有一定的扩张之外,对脾、肝、肺、肾、肠和肾上腺无损害作用[13]。大鼠 ig 30 d未出现毒性反应[14]。

4 展望

广西血竭与棕榈科的进口皇冠牌血竭相比,在化学成分上有很大差异,但在药理作用上基本一致。其临床疗效报道目前还不是很多,文献报道[18]将云南血竭与进口的皇冠牌血竭,皆配制成七厘散,两组处方中其他原料用量不变,以止痛、消肿散瘀、止血、敛口生肌为指标,经 78例完整病例证明,国产血竭在七厘散中完全可以代替进口血竭。因此,进一步对龙血竭进行有效活性成分、药理作用及临床应用等研究,深入开发利用龙血竭,以替代进口血竭而满足国内血竭用药的需要,应具有广阔的应用前景。

参考文献:

[1] 张贵君. 常用中药鉴定大全 [M]. 哈尔滨: 黑龙江科学技术出版社, 1993.

[2] 谢宗万. 血竭基原的本草考证 [J]. 中药材, 1989, 12(7): 40-43.

[3] 李国权,甄汉深,刘炯哲. 剑叶龙血树的生药鉴别 [J]. 中草药, 1996, 27(4): 237-239.

[4] 卫生部药检所植化室. 进口印尼血竭的研究. 2. 血竭鉴别方法的研究及其应用 [J]. 药检工作通讯, 1978, 8(5): 217-220.

[5] 陈友地,李秀玲. 中药血竭的研究 [J]. 中草药, 1987, 18(4): 187-188.

[6] 金永清,郑博仁. 云南血竭的成分分析 [A]. 西南五省区第六次中药与天然药物学术研讨会论文集 [C]. 成都, 1991: 29-30.

[7] 王锦亮,李兴从,江东福,等. 云南血竭的化学成分及抗真菌活性 [J]. 云南植物研究, 1995, 17: 336-340.

[8] 王雪芬,卢文杰,陈家源. 剑叶龙血树化学成分的研究Ⅰ. 剑叶龙血素 A和 B的结构测定 [J]. 广西中医药, 1993, 16(1): 38-39.

[9] 卢文杰,王雪芬,陈家源,等. 剑叶龙血树氯仿部位化学成分的研究 [J]. 药学学报, 1998, 33(10): 755-758.

[10] 唐人九,文东旭,韦 宏,等. 广西血竭石油醚和醋酸乙酯部位中的化学成分 [J]. 中国中药杂志, 1995, 20(7): 421-423.

[11] 韦 宏,文东旭,刘晓松,等. 广西血竭石油醚和醋酸乙酯部位中的化学成分 (Ⅱ) [J]. 中国中药杂志, 1998, 23(10): 616-618.

[12] 黄 捷,高 辉,谢培德,等. 反相高效液相色谱法测定广西血竭中龙雪素 B的含量 [J]. 药物分析杂志, 1996, 16(4): 234-236.

[13] 林启云. 广西血竭的药理作用及毒性试验 [J]. 广西中医药, 1986, 9(6): 33-35.

[14] 曾雪瑜,何 飞,李友娣,等. 广西血竭的消炎止痛作用及毒性研究 [J]. 中国中药杂志, 1999, 24(3): 171-173.

[15] 黄树莲,陈学芬,陈晓军,等. 广西血竭的活血化瘀研究 [J]. 中药材, 1994, 17(9): 37-39.

[16] 农兴旭. 广西血竭的止血作用 [J]. 中国中药杂志, 1997, 22(4): 240-242.

[17] 高应斗,赵忠保,杨桂芬,等. 血竭抗血检及其作用机理的研究 [J]. 山西医药杂志, 1984, 13(2): 75-77.

[18] 云南省思茅地区医院. 国产血竭临床疗效观察报告 [J]. 热带植物研究, 1974, (6): 11-14.

生物芯片技术及在中药研究中的应用展望

金 伟,马昱澍,程海鹏,倪晓华,周宗祥,应 康,谢 毅,毛裕民

(复旦大学 遗传工程国家重点实验室,上海 200433)

摘 要: 生物芯片是近几年来发展起来的一种尖端技术,可用于中药药理的分析、新药的研制开发、中药鉴定、毒理观察等方面,有利于在分子生物学水平上阐明中医药治病的机制,促进中药的现代化,具有重要的科学意义和广泛的应用前景。

关键词: 生物芯片;中药;应用

⑳收稿日期: 2001-05-24

作者简介: 金 伟,男, 1994年毕业于长春中医学院中药系,获学士学位。1997年毕业于长春中医学院中药系,获硕士学位。2000年毕业于东北师范大学生命科学学院,获博士学位。现为复旦大学遗传所国家遗传工程重点实验室博士后,专业方向: 遗传学。

中图分类号: Q6-33 文献标识码: A 文章编号: 0253- 2670(2001)11- 1054- 03

Prospect in application of bio-chip technology in studies of TCM

JIN Wei, MA Yu-shu, CHENG Hai-peng, NI Xiao-hua, ZHOU Zong-xiang,
YING Kang, XIE Yi, MAO Yu-min
(State Key Laboratory of Genetic Engineering, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Key words bio-chip; traditional Chinese medicine (TCM); application

生物芯片的概念来自计算机,是近几年来发展起来的一种尖端技术,也是目前生物技术的热点和前沿。生物芯片技术是随着“人类基因组计划”(Human Genome Project, HGP)的进展而发展起来的,它是 90年代中期以来影响最深远的重大科技进展之一,它是融微电子学、生物学、物理学、化学、计算机科学为一体的高度交叉的新技术,具有重大的基础研究价值,又具有明显的产业化前景。生物芯片的应用具有十分巨大的潜力,在后基因组研究、新药研究[1]、生物物种改良、疑难疾病的病因研究和医学诊断等方面已经提供或正在提供有价值的信息。美国《科学》杂志把生物芯片评为 1998年世界十大科技突破之一。

1 生物芯片的产生及其意义

生物芯片的实质是在面积不大的基片表面上有序地点阵排列了一系列固定于一定位置的可寻址的识别分子。结合或反应在相同条件下进行。反应结果用同位素法、化学荧光法、化学发光法或酶标法显示,然后用精密的扫描仪或 CCD摄像技术记录。通过计算机软件分析,综合成可读的生物总信息[2]。

生物芯片主要包括基因芯片、蛋白质芯片等。迄今为止,绝大多数生物芯片都属于基因芯片[3-6]。基因芯片是将许多特定的 DNA寡聚核苷酸或 DNA片段(称为探针)固定在芯片的每个预先设置的区域内,通过碱基互补配对原则进行杂交,检测对应片段是否存在、存在量多少,以用于基因的功能研究和基因组研究、疾病的临床诊断和检测等众多方面。基因芯片主要包括原位合成的基因芯片和直接点样的微矩阵基因芯片。其中点样于玻璃介质上的微矩阵基因芯片是目前应用最广的基因芯片,它将成千上万的基因集中到 1 cm^2 大小的薄片载体上,通过这些探针来与待测样品的 mRNA进行分子杂交,能够准确、快速地定量分析细胞中大量靶基因的表达情况[7]。生物芯片可以从疾病及药物两个角度对生物体的多个参量同时进行研究以发掘筛选靶标即疾病相关分子并同时获取大量其他相关信息[8-10]。可以说,在这种情况下,任何一元化的分析方法均不及生物芯片这种集成化的分析手段更具有优势。到目前为止,已有许多报道显示在各种肿瘤和癌组织中基因表达谱的异常变化,这些肿瘤和癌组织包括急性白血病[11]、黑色素瘤[12]、肺鳞状细胞癌[13]、卵巢癌[14]、乳腺癌[15,16]、肾细胞癌[17]、前列腺癌[18]、腺横纹肌肉瘤[19]、Ewing, s肉瘤[20]等。

人类基因组计划是当今生命科学领域内的头号工程,它的目的是测定人类基因组 DNA 30亿个碱基的序列,发现人类所有的基因并阐明其在染色体上的位置,破译人类全部遗传信息[21,22]。未来的后人类基因组计划研究将把人类医药学带入崭新的时代,将由主要是依赖经验转向以特异的分子病理学和分子药理学为依据,而基因芯片将在后基因组研究中起到越来越大的作用。基因芯片将人类和模式生物的难以想象的生物学信息量进行集成化处理,使人类可以在分子水平上探索健康和疾病的奥秘,攻克从癌症到老年痴呆症等不治之症,探索药物作用于人体的分子机制[23]。

2 生物芯片与中药研究

2.1 促进中药药理学的发展: 大量研究发现,许多疾病与基因结构、基因调控和表达异常有关,而用中药治疗这些疾病能取得显著疗效且毒副作用小。因此,从基因水平上研究中药治病的机制就显得非常有意义。已有研究报道表明,许多中药的作用靶点为基因,尤其是一些抗癌中药,能明确影响肿瘤细胞中 P53\Bcl-2基因的表达。在进行研究过程中,往往采用免疫组织化学法、流式细胞仪检测法等,需要将每个样品分别进行测试,操作繁琐,有的结果还受试剂质量等的影响。如将生物芯片技术用于中药药理等方面的研究,则可将中药作用的所有靶基因全部显示出来,药物处理后基因表达的改变对药物作用机制的研究有一定的提示作用,可加快中药分子药理学的研究进展。目前,我们已经完成了高三尖杉酯碱对 HL-60细胞、黑色素瘤 B16细胞;以及斑蝥素对 HL-60细胞的基因芯片实验,现在正在分析给药后的各个时间点表达明显上调或下调的基因,可望绘制出每种抗癌药物给药后药物靶基因随时间改变而系统变化的路径图。这些研究有助于阐明抗肿瘤中药有效成分的治癌机制。

2.2 促进中药新药的研制: 利用基因芯片技术比较经阳性药物处理前后组织细胞基因表达变化情况,同样能提供许多十分有价值的信息。经药物处理后表达明显改变的基因往往与发病过程中药物作用途径密切相关,很可能是药物作用的靶点或继发事件,可作为进一步药物筛选的靶标或对已有的靶标进行验证。

单体药物作用的靶基因不多,单味中药作用的靶基因稍多,而中药复方则作用于多个直接靶基因和间接靶基因。无论单体药物、单味中药,还是中药复方最终作用于靶细胞的表面,通过一系列的信号传递过程,最终影响到基因的表达,进而启动或关闭某种或某些效应分子(蛋白质),达到治疗的目的。而中药复方的开发面临的一个首要难题就是怎样采用现代高科技手段阐明中药复方治病的复杂机制将传统的中医药理论标准与世界医学标准接轨。生物芯片的出现有助于从分子生物学水平上阐明中药复方的治病机制为实现这一

接轨铺平道路,同时,根据不同基因型为特定中药或复方选择合适的病人将是中医药辨证施治理论上的一次质的飞跃。

利用生物芯片可比较单味中药或中药复方给药后正常组织(细胞)及病变组织(细胞)中大量(可达数千)相关基因的变化,从而发现一组疾病相关基因作为药物筛选靶标。目前,国际上仅有少数实验采用基因芯片技术在时间序列上分析了给药后药物靶基因系列表达的变化。例如国外有学者将抗癌药物拓扑异构酶鬼臼亚乙苷(etoposide)作用于人成骨瘤细胞系 U2-OS后,可诱发该细胞发生凋亡;于不同时刻提取胞内 mRNA,用 Affymetrix公司的寡核苷酸芯片检测 6519种 mRNA表达量的变化,并用 Northern印迹证实;其中 WAF1/p21及 PCNA基因是已知受 P53调节的基因,而谷胱甘肽过氧化物酶及 S100A2钙结合蛋白是首次发现的效应基因[24]。这个实验所采用的方法也完全适用于中药的研究与开发。目前,许多基因开发公司已把战略眼光放在了用生物芯片技术开发中药新药的这条路上。

关于药物筛选方面的工作目前刚刚起步,报道的文献很少,只是在多数文献中提到有这方面应用,具有很大的潜在应用价值,目前美国很多制药公司已开始前期工作,即正在建立表达谱数据库,从而为药物筛选提供各种靶基因及分析手段。

2.3 促进中药鉴定学的发展: 如何运用分子生物学技术准确有效地鉴定药材,这是近年来人们正在努力的方向。已有一些研究者利用 RAPD等技术,有效地进行了蛇类等动物药材的鉴定。但生物芯片的研究应用将会更准确、快捷。我们可以在一块芯片上同时点上成千上万个探针,可进行大规模的药材鉴定,使分析的时间大大减少,极大地提高鉴定效率,而且中药复方组成的准确鉴定也有望实现。

2.4 促进中药毒理学的研究: 用生物芯片研究某种中药作用于细胞后基因表达的变化,如发现一些重要的功能基因表达有明显改变,则提示此中药在研究剂量下可能有一定毒性。观察药物处理后细胞基因表达谱的改变可使研究者对中药的毒性及代谢特点等有一大估计,有利于下一步工作的进行。

采用生物芯片技术和药物化学技术,有助于从遗传分子水平和药物分子水平上阐明十八反、十九畏的机制早日解决中医药领域里的一大难题。

3 结论

由于生物芯片具有准确、快速、高效、高通量分析生物信息的特点,因而可用于中药药理的分析、中药新药的研制开发、中药鉴定、毒理观察等方面,有利于在分子生物学水平上阐明中医药治病因此,具有重要的科学意义和广泛的应用前景。

参考文献:

[1] 贺 林. 解码生命—人类基因组计划和后基因组计划 [M]. 北京: 科学出版社, 2000.

[2] 马立人,蒋中华. 基因芯片 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2000.

[3] Schena M, Shalon D, Davis R W, *et al*. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray [J]. Science, 1995, (270): 467-470.

[4] Schena M, Shalon D, Heller R, *et al*. Parallel human genome analysis: Microarray-based expression monigtoring of 1000 genes [J]. PNAS, 1996, (93): 10614-10619.

[5] DeRisi J L, Iyer V R, Brown P O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale [J]. Science, 1997, (278): 680-686.

[6] Lockhart D J, Dong H, Byrne M C, *et al*. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays [J]. Nature Biotech, 1996, (14): 1675-1680.

[7] 李 瑶,陈菊祥,裘敏燕. 基因芯片的制备研究 [J]. 第二军医大学学报, 2000, 132(9): 812-814.

[8] Kaiser S, Hwang J J, Gregor M. High-density microarray genechip analysis reveals different gene expression profiles in hepatoma cell lines and in hepatocellular carcinoma tissue [J]. Gastroenterology, 2000, 118(4): 905.

[9] Kaiser S, Hwang J J, Gregor M. Microarray genechip analysis of altered gene expression profiles in hepatitis C-Induced hepatocellular carcinoma [J]. J Hepatol, 2000, 32 164.

[10] Kaiser S, Anderson W F, Hwang J J. High-density microarray genechip analysis of altered gene expression profiles in hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 1999, 30(4): 391.

[11] Golub T R, Slonim D K, Tamayo P, *et al*. Molecular classification of cancer: Class discovery and class prediction by gene expression monitoring [J]. Science, 1999, (286): 531-537.

[12] Derisi J, Penland L, Brown P O, *et al*. Use of a cDNA microarray to analyze gene expression patterns in human cancer [J]. Nat Genet, 1996, (14): 457-460.

[13] Wang T, Hopkins D, Schmidt C, *et al*. Identification of genes differentially over-expressed in lung squamous cell carcinoma using combination of cDNA subtraction and microarray analysis [J]. Oncogene, 2000, (19): 1519-1528.

[14] Wang K, Gan L, Jeffery E, *et al*. Monitoring gene expression profile changes in ovarian carcinomas using cDNA microarray [J]. Gene, 1999, (229): 101-108.

[15] Osin P, Shipley J, Lu Y J, *et al*. Experimental pathology and brest cancer genetics: new technologies [J]. Recent Results Cancer Res, 1998, (152): 35-48.

[16] Sgroi D C, Teng S, Robinson G, *et al*. In vivo gene expression profile analysis of human breast cancer progression [J]. Cancer Res, 1999, (59): 5656-5661.

[17] Moch H, Schraml P, Bubendorf L, *et al*. High throughput tissue microarray analysis to evaluate genes uncovered by cDNA microarray screening in renal cell carcinoma [J]. Am J Pathol, 1999, (154): 981-986.

[18] Bubendorf L, Kolmer M, Kononen J, *et al*. Hormone therapy failure in human prostate cancer: analysis by complementary DNA and tissure [J]. J Natl Cancer Inst, 1999, (91): 1758-1764.

[19] Khan J, Bittner M L, Saal L H, *et al*. cDNA microarrays detest activation of a myogenic transcription program by the PAX3-FKHR fusion oncogene [J]. PNAS, 1999, (96): 13264-13269.

[20] Welford S M, Gregg J, Chen E, *et al*. Detection of differentially expressed genes in primary tumor tissues using representational difference analysis coupled to microarray hybridization [J]. Nucleic Acids Res, 1998, (26): 3059-3065.

[21] Collins F S, New goals for the U. S Human Genome Project: 1998-2003 [J]. Science, 1998, (282): 682-689.

[22] Waterson R. The Human Genome Project: reaching the finish line [J]. Science, 1998, (282): 53-54.

[23] 杨胜利. 生物芯片未来发展趋势及对策 [J]. 第二军医大学学报, 2000, 132(9): 1.

[24] Wang Y, Rea T, Bian J, *et al*. Identification of the genes responsive to etoposide-induced apoptosis: application of DNA chip technology [J]. FEBS Lett, 1999, 445(2): 269-274.