

药物和合成药物开辟了新的思路和途径。

参考文献

- 1 王本祥. 现代中药药理学. 天津:天津科学技术出版社,1997,1437
- 2 Gordon M G, *et al.* J Nat Prod, 1997, 60(1):52
- 3 Hecht S M, *et al.* J Nat Prod, 1992, 55(4):401
- 4 Scrip, 1995, (2036):23
- 5 Inpharma, 1997, (1099):22
- 6 Berry D E, *et al.* J Org Chem, 1992, 57:420
- 7 李凤琴, 等. 癌症, 1993, 12(3):200
- 8 Kashiwada Y, *et al.* J Pharm Sci, 1993, 82:487
- 9 Bastow K F, *et al.* Planta Med, 1993, 59:240
- 10 Tsai Y J, *et al.* J Biol Chem, 1992, 267:14436
- 11 Li-Chevalier T. Anticancer Drugs, 1995, 6(suppl 4):13
- 12 罗继红, 等. 国外医学-肿瘤学分册, 1997, 24(4):223
- 13 冯孝章. 中草药, 1996, 27(增刊):5
- 14 Smith C D, *et al.* Cancer Res, 1994, 54(14):3779
- 15 Chang C J, *et al.* J Nat Prod, 1992, 55(11):1529
- 16 Gamini S, *et al.* J Nat Prod, 1993, 56(10):1805
- 17 Prochaska H J, *et al.* J Cell Biochem, 1995, 22(suppl):

117

- 18 Burke T R, Stem Cell, 1994, 12:1
- 19 张庆林, 等. 国外医学-肿瘤学分册, 1997, 24(6):330
- 20 Yu S, *et al.* Planta Med, 1997, 63:258
- 21 邹恒琴, 等. 中草药, 1997, 28(7):437
- 22 Gross P E, *et al.*, Cancer Res, 1994, 54(6):1450
- 23 Cohen S M, *et al.* Science, 1990, 249:107
- 24 Willett W C. Science, 1994, 264:532
- 25 Tanaka T, *et al.* Cancer, 1995, 75:1433
- 26 谭晓华, 等. 国外医学-肿瘤学分册, 1998, 25(1):4
- 27 Chung F L, *et al.* Carcinogenesis, 1996, 17:1385
- 28 Benson A B, *et al.* Proc Am Assoc Clin Oncol, 1992, 11:145
- 29 Mizuno A. *et al.* Planta Med, 1994, 60:333
- 30 Tokuda H, *et al.* Planta Med, 1990, 56:653
- 31 Hidaka Y, *et al.* Biotherapy, 1992, 5:201
- 32 Numata M, *et al.* Planta Med, 1994, 60:356
- 33 Sharma S, *et al.* Cancer Res, 1994, 54:5848
- 34 Jang M, *et al.* Science, 1997, 275:218
- 35 Suh N, *et al.* Anticancer Res, 1995, 15:233

(1998-06-22 收稿)

RAPD 技术在药用植物学研究中的应用

中国协和医科大学 药物研究所(北京 100050) 舒艳群* 白守梅 陈毓亨
中国医学科学院

摘要 概述了 RAPD 技术在药用植物学中应用的理论意义及依据,并综述了该技术在药用植物中的应用情况、注意的问题及技术方法上的改进,展望了 RAPD 技术在药用植物分子生物学方面的应用前景。

关键词 RAPD 技术 药用植物 分子生物学

过去几年里,在分子生物学领域中, DNA 分子遗传标记(DNA Molecular Genetic Marker)技术迅猛发展,新方法、新技术不断涌现。继同工酶(isozyme)^[1,2]、RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)和 DNA 指纹(DNA fingerprinting)^[3,4]技术以后,90 年代又发展了 RAPD

(Random Amplified Polymorphic DNA,随机引物扩增多态 DNA)^[5,6]、CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence)^[7]、AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphic)技术等^[8,9]。其中 RAPD 技术由于操作简便、快速、省时、省力而迅速得到广大分子生物学家的重视,并在农、林、医学及动、植物和微生

* Address: Shu Yanqun, Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Chinese Xiehe Medical University, Beijing
舒艳群 1996 年毕业于厦门大学生物系,获学士学位。现在中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所攻读硕士研究生。

物学的各个领域得到广泛应用,在基因定位与分离、连锁图建立、品种鉴定、资源评价、物种亲缘关系和系统演化等各方面取得了很大进展。现对 RAPD 基本理论及其在药用植物方面的应用作简单的综述,并对应用前景作一展望。

1 基本理论

RAPD 是 1990 年由 Williams 等^[5,6] 两个研究小组分别在不同的实验室同时发展起来的,其核心技术是多聚酶链反应(PCR),应用人工合成的 10 个左右的寡核苷酸(G+C 约占 60%~70%)作为引物,随机扩增基因组 DNA,产生多态性 DNA 谱带,(DNA fingerprinter),产物经琼脂糖电泳或聚丙烯酰胺电泳、EB 染色,即可在紫外灯下检测出 DNA 谱带。任何生物种都具有特定顺序和结构的遗传物质——DNA,不受外界因素和生物体发育阶段及器官组织差异的影响。由于在生物进化过程中所选择的不同,基因组 DNA 不同区域表现出高度的保守或高度的变异,有不同的遗传多样性。RAPD 技术就是通过分析遗传物质 DNA 经过 PCR 扩增后的多态性来诊断生物体内在基因排布与外在性状表现的规律。其灵敏度高,不受环境、发育、数量性状遗传等的影响,客观地揭示供试材料之间 DNA 的差异,因而成为一种理想的有效的分子生物学的技术。该方法无需使用同位素,DNA 用量少,无需事先知道 DNA 的顺序,用 10 个任意碱基引物就可以进行 PCR 扩增;没有 DNA 克隆、Southern 转移、分子杂交等复杂程序;省工、省力、工作进度快;且 PCR 引物没有种属限制,一套 RAPD 引物可以应用于任何一种生物的研究,具有广泛和通用性的特点。而且,RAPD 产物经克隆和序列分析后,可作为 RFLP 和原位杂交的探针。

2 在药用植物学研究中的应用

药用植物在我国据估计大约有 10 000 多种,其中包括中药药约 600 种,它们是我国人民防病、治病的重要手段,同时是寻找和开发

新药的宝库。随着“人类回归自然”呼声日高和国内外新药开发和研制竞争的日益激烈,传统中药和天然产物的开发和利用受到人们越来越多的重视。在生物多样性已经受到认识和保护的今天,我们应该在保护生物多样性的基础上探求现有资源和成分的分布规律,以发现新疗效、低成本、更安全的新药。显然,传统的生物学和化学方法已不适应今天的要求,所以,我们应该在传统的生物学和药学基础上,应用新技术和新方法,开展植物物种、遗传和生态 3 个层次的生物多样性和天然产物多样性相结合的研究,使药用植物的研究提高到一个新的水平。

2.1 生物多样性:随着植物药研究的不断深入,可持续开发利用药用植物资源的问题越来越受到重视。应用 RAPD 技术进行药用植物生物多样性研究,可以在遗传多样性水平上了解天然产物多样性与物种、生态及地理分布的关系,挖掘潜在的药物资源,为开发新药寻找途径。

RAPD 方法可以检测物种的遗传多样性,探讨物种的亲缘关系和进化趋势。因此它是药用植物资源保护和种质资源保存的依据,特别是对濒危物种的研究更具有实际意义。陈永久等^[10]用 RAPD 方法分析了冬虫夏草 *Cordyceps sinensis* (Berk.) Sacc. 的遗传分化,通过遗传距离说明遗传差异度与地理距离呈正相关。从分子水平上提供了冬虫夏草的分类、起源及进化方面的宝贵资料,可作为制定冬虫夏草资源保护和合理利用等措施的理论依据。

2.2 种属特异性:RAPD 分析 DNA 在生物个体之间的差异,研究物种的遗传变异性,为物种分类提供依据。Paran 等^[11]用 RAPD 标记研究了药用植物列当属 (*Orobancha* L.) 的种间和种内变异性,从遗传距离得到了种间变异与依靠形态特征的分类的一致性;并找出了每个种特定的 RAPD 标记,而种内变异性则相对少得多。Scott 等^[12]对马缨丹 *Lantana camara* L. 这一按花颜色分类的种进行

了研究,RAPD 数据表明,遗传关系的远近与地理距离的远近有密切关系,而与花的颜色关系不大,从而说明用花颜色作为分类依据并不可靠。

RAPD 用于药用植物系统学研究,从方法上有独到的优势,它能够通过不同引物直接给出整个基因组的多态性信息,避免了生长环境和发育时期不同的影响;并从 DNA 水平上对分类群比较分析,确定药用植物种、品种间的亲缘关系,绘制系统发育树状图。汪小全等^[13]通过对升麻属(*Cimicifuga* L.)5 个种、类叶升麻 *Actaea asiatica* Hara 及松潘乌头 *Aconitum sungpanense* Hand.-Mazz. 的 RAPD 结果分析,认为 RAPD 方法可以用于种间乃至近缘属间的系统学研究,但有一定的局限性。惠东威等^[14]利用 8 种 RAPD 引物对大豆属的 21 份材料进行了基因组指纹图谱构建,重建了大豆属中各个种的亲缘关系。Yu 和 Lin^[15]对烟草属(*Nicotiana* L.)进行了种间和种内的亲缘关系鉴定并绘制了系统树。论证了 *N. sylvestris* 在分类学中的位置,即它可能是 sect. *Alatae* 下面的一个种。

在菌类中,药用真菌种的鉴定常常是个难点。虽然可以通过大工作量的筛选得到优良品种或品系,但在寻找新品种、新品系方面还缺乏有效的手段。孔繁荣等^[16]应用 RAPD 技术对 3 群淋球菌进行了菌种鉴定和分型,找出了它们的特异的 DNA 条带,可作为 3 群淋球菌分型的基因学基础。Anzai 等人^[17~19]分别研究了 RAPD 应用于真菌、放线菌、细菌的菌株的筛选工作,结果表明 RAPD 是进行微生物菌株筛选工作的一个简单有效的手段。

2.3 遗传育种:遗传连锁图谱可以指导育种,防止品种间杂化和自交,选育优良性状的品种。目前,应用 RAPD 技术已经建立了番茄和马尾松的^[20]分子标记连锁图谱等。对茶 *Camellia sinensis* L. 植物相对自由的品种间杂交和自然种间的杂交现象,Wachira^[21]等利用 RAPD 技术检验了栽培茶和野生茶之

间的亲缘关系。RAPD 分析表明,野生茶基因组 DNA 的片段渐渗到栽培茶基因组 DNA 中,这与假定的从相似的野生茶种的种质渐渗到栽培茶种质相一致。这些研究为 RAPD 技术应用在药用植物遗传育种方面提供了可行性依据。

2.4 生药鉴定和药材道地性:主要是同属不同种、同名不同种的药材和药材真伪(药材混淆替代品)的鉴定。传统的生药鉴定一般依靠外形和粉末特征等,RAPD 技术应用于生药鉴定可直接分析药材 DNA 的多态性,找出药材特有的 DNA 片段(标记)进行药材检测。这方面已经有许多应用:张荣等^[22,23]对木蓝属(*Indigofera* Linn.)8 种生药、铁线莲属(*Clematis* L.)7 种中药进行鉴定,并证明 RAPD 对于应用在干燥的植物类生药的鉴定上有实际应用价值。

如今,药材道地性研究已经成为中医药科研的重要课题,道地药材有一个地域性现象,其产生除了与栽培方法、生态环境、加工方法有关外,还与物种的居群的遗传特异性有关,这可能是造成道地药材与非道地药材的品质差异的原因。由于道地与非道地药材在形态和生药上基本一致,因此,利用 RAPD 技术可以在 DNA 水平上鉴定两者的差异,使道地药材的研究提高到分子水平。

3 实际应用中需注意的问题

3.1 模板的浓度和纯度:RAPD 的最佳扩增条件在不同的研究中有很大出入,对其重复性问题及其系统学价值引起了很大争论,尤其是模板 DNA 的浓度和纯度问题。Devos 等人^[24]研究了 DNA 模板浓度在 2.5~2 500 $\mu\text{g/L}$ 内对 RAPD 产物的影响,结果仅在 200~400 $\mu\text{g/L}$ 间获得了一致的扩增产物;汪小全等^[13]在研究银杉 *Cathaya argyrophylla* 的遗传多样性时,对 RAPD 产物的影响因素进行了大量的探索,得到逐级纯化的 DNA 模板的 RAPD 结果一致,认为模板制备过程中的许多纯化步骤是不必要的,尤其是 RNA 的存在与否对扩增产物没有影响;模板浓度

在一个相当大的范围内不影响扩增结果。当然,实验过程中也避免不了人为原因(操作问题)对扩增结果产生影响。

3.2 RAPD 的重复性:由于 RAPD 技术灵敏性高,因而,其重复性问题最为引人注目。汪小全等^[13]在研究了银杉的干、鲜叶片 DNA 的 RAPD 扩增结果后认为,从干样品中提取的 DNA 模板可获得与鲜样品同等的扩增结果,从同一个体的干叶和鲜叶中 DNA 模板可获得完全一致的扩增产物;干、鲜样品的 RAPD 结果可一起分析;野外采集鲜样品困难时,建议直接用硅胶干燥,这就为 RAPD 技术应用于生药鉴定提供了可能。Shaw 等发现,不同产地、不同时间采集的同一植物基因组 DNA 的指纹图不变,从而证明 RAPD 方法在中药鉴定上的稳定性和重现性^[25,26]。

3.3 引物的选择:Wolff 等^[27]研究了适用于菊属(*Chrysanthemum*)的 RAPD 最佳条件,包括不同厂家的酶、热循环次数、退火温度及引物;指出每一引物都有其最佳退火温度,引物的最佳退火温度与引物中 G+C 含量没有联系,找到最佳的引物与种的组合则是最关键的问题。

3.4 产物分析:在 RAPD 产物中会出现许多弱带(亮度不够的带),其中不能重复的可以不计;能够重复的在实验条件稳定的情况下可计算在内。另外,为避免污染问题,实验中应设空白对照反应。

4 技术方法的改进

4.1 DNA 提取方法:Francois^[28]在提取缓冲液中加入蛋白酶 K,省略了反复离心过程,使 DNA 提取更加快速,每个样品可以做约 6 000 个 PCR 反应,为 PCR-RAPD 的工业化提供了很好的方法。Micheli 等^[29]认为影响 RAPD 可重复性的主要原因之一是模板 DNA 的质量,尤其是在传统的 DNA 提取方法中使用乙醇使许多杂质和 DNA 混在一起沉淀出来。他们介绍了一种简单的方法,即靠一个玻璃棒转动来收集 DNA,从而去除了多余的沉淀物。

4.2 提高多态性:小麦是具低水平的 RAPD 重复性和多态性的作物,Robert^[30]在研究该物种时对 RAPD 方法进行了改造,利用限制性内切酶(Frequently Cutting Restriction Enzymes)预先对模板 DNA 进行消化,然后选用与内切酶搭配适合的引物,得到了理想的结果。

4.3 RAHM^[31]和 RAPMO^[32]:RAHM(Random Amplified Hybridization Microsatellites,随机扩增杂交微卫星)是 1995 年由 Cifarelli 等在 RAPD 基础上改进的一种方法,利用植物基因组中存在并散布着大量的微卫星重复序列的特性,将 RAPD 产物转移到尼龙膜上用洋地黄毒苷标记的带有短重复序列的寡聚核苷酸探针进行杂交,经放射自显影后检测其多态性。这一技术可以检测真核生物基因组 DNA 中存在的微卫星 DNA。

RAPMO(Random Amplified Microsatellite Polymorphisms,随机扩增微卫星匀线性)是 1995 年由 Richardson 等^[32]对 RAPD 的另一个改进,与 RAHM 有异曲同工之处,但所用的引物不是随机的,而是微卫星 PCR 引物。电泳后产物转入尼龙膜,³²P 微卫星探针进行标记,放射自显影检测多态性指纹图谱。这一技术可检测植物的微卫星 DNA 多态性,应用在物种的分类、进化等许多方面。

4.4 RAPD-RFLP 联合:Nakai 等^[33]利用 RAPD-RFLP 联合的方法对中药淫羊藿属(*Epimedium* L.)7 种植物进行了遗传连锁图谱的构建。Yamazaki 等^[34]用这两种方法对甘草属(*Glycyrrhiza* Linn.)建立了系统树。

5 展望

RAPD 技术的出现虽然仅仅几年的时间,但在其应用过程中显示了广泛的前景。但此技术在药用植物方面的研究还不十分深入,相信随着分子生物学技术的不断发展和药用植物分子遗传特征研究的不断深入,RAPD 技术将在药用植物研究领域中得到

更加广泛的应用,并成为药用研究现代化的重要内容。

参考文献

- 1 Graur D. *Evolution*, 1985, 39:190
- 2 Soltis E D, *et al.* In *Isozymes in Plant Biology*, 1990:320
- 3 Bostein D, *et al.* *Am J Hum Gen*, 1980, 32:314
- 4 Jeffrey A. *et al.* *Nature*, 1985, 314:67
- 5 Williams T G K, *et al.* *Nuc Acid Res*, 1990, 18:6531
- 6 Welsh J, *et al.* *Nuc Acid Res*, 1990, 18:7213
- 7 Akopyanz N, *et al.* *Nuc Acid Res*, 1992, 20:6221
- 8 Vos P, *et al.* *Nuc Acid Res*, 1995, 23:6221
- 9 Hill M, *et al.* *Theor Appl Genet*, 1996, 93:1203
- 10 陈永久,等. *遗传学报*, 1997, 24(5):410
- 11 Ilan P, *et al.* *Heredity*, 1997, 78:68
- 12 Scott L J, *et al.* *Electrophoresis*, 1997, 18(9):1560
- 13 汪小全,等. *植物学报*, 1996, 38(12):954
- 14 惠东威,等. *遗传学报*, 1996, 23(16):460
- 15 Yue Y I, *et al.* *J Plant Res*, 1997, 110:187
- 16 孔繁荣,等. *中华微生物学和免疫学杂志*, 1995, 15(1):67

- 17 Yojiro A, *et al.* *J Antibiotics*, 1994, 47(2):183
- 18 Fumhiro F, *et al.* *J Antibiotics*, 1994, 47(2):173
- 19 Hitomi T, *et al.* *J Antibiotics*, 1994, 47(2):194
- 20 尹佟明,等. *植物学报*, 1997, 39(7):607
- 21 Francis N, *et al.* *Heredity*, 1997, 78:603
- 22 张 荣,等. *中国中药杂志*, 1996, 22(2):72
- 23 张 荣,等. *中草药*, 1996, 27(11):686
- 24 Devos K M, *et al.* *Theor Appl Genet*, 1992, 84:567
- 25 Shaw P C. *Planta Med*, 1995, 61:466
- 26 Cao H. *Acta Pharm Sinica*, 1996, 31(7):543
- 27 Wolff K, *et al.* *Theor Appl Genet*, 1993, 86:1033
- 28 Francois G. *Nuc Acid Res*, 1994, 22(9):1772
- 29 Maria R M, *et al.* *Nuc Acid Res*, 1994, 22(10):1921
- 30 Robert M D K. *Cenet Anal; Biomol Engin*, 1995, 12:63
- 31 Cifarelli R A, *et al.* *Nuc Acid Res*, 1995, 23(18):3802
- 32 Richardson T, *et al.* *Nuc Acid Res*, 1995, 23(18):3798
- 33 Nakai R, *et al.* *Biol Pharm Bull*, 1996, 19(1):67
- 34 Yamazaki M, *et al.* *Biol Pharm Bull*, 1994, 17(11):1529

(1998-09-13 收稿)

芦荟的化学成分及其研究

珠海市中医院(519015)

万金志*

珠海市卫生学校

乔悦昕

摘要 对近年来开展的有关芦荟的药用成分组成的专题研究作一综述。

关键词 芦荟 化学成分 蒽醌类 萘醌类

芦荟为百合科芦荟属植物,其种类繁多,已知的植物约有 360 种,大部分生长在地中海、中东和中美洲。现在我国广东、广西、云南、海南、福建、四川、贵州等地都有种植。常作为药用报道的芦荟品种有库拉索芦荟 *Aloe vera* L.、好望角芦荟 *A. ferox* Mill.、斑纹芦荟 *A. vera* L. var *chinensis* 及翠叶芦荟 *A. barbadensis* Miller^[1]。芦荟是一种药用价值很高的植物,应用范围涉及内、外、妇、儿、皮肤、五官等各科^[2]。国外从 60 年代开始对芦荟进行了较深入、广泛的研究,在不少方面取得了成绩,其成果广泛应用于医药、保健和日常生活,已形成一大产业。芦荟在我国的应用基本

保留在原有病症的传统用法上^[3,4],至于药学基础研究 90 年代初还基本属于空白。由于芦荟产品的研究开发及应用有着良好的社会效益,因此引起了许多医药专家的极大关注。针对该问题,作者于 1990 年开始对芦荟有关课题进行了研究,先后对芦荟药用成分的组成、生物活性物的提取、药理作用的实验研究、临床应用、产品开发等方面进行了多年的研究和探讨,多次到福建、海南、广东、云南、等地考察芦荟品种及资源,并建立了芦荟科研种植基地,于 1995 年获得我国首份芦荟发明专利。现将部分有关芦荟现代研究资料作一综述,旨在促进我国芦荟的研究、开发和

* Address: Wan Jinzhi, Zhuhai Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhuhai