

3 药理学与临床研究

近期对香茶菜属中二萜类和黄酮类化合物有许多药理研究报道,而以前者为多,如抗菌、抗炎、抗病毒作用^[21,22]、抗肿瘤作用^[23]、护肝作用^[24]、对平滑肌^[25,26]和心血管^[27]作用等。尤其值得一提的是卢长安等^[28]作了山地香茶菜提取物对艾滋病病毒 1 型(HIV-1)的实验研究,表明它对 HIV-1 有一定的抑制作用。对于溪黄草能否按照此思路进一步做一些药理研究,至今见诸报道的很少。廖雪芬等^[29]用线纹香茶菜、狭基线纹香茶菜、溪黄草的水提取物作了一些药理实验,结果表明三者均能抑制二甲苯致小鼠耳部炎症反应,降低 CCl₄引起小鼠肝损伤后血清谷丙转氨酶(SGPT)升高的作用,而狭基线纹香茶菜和溪黄草的提取物能对抗醋酸所致小鼠腹腔毛细血管通透性作用,说明三者都具有消炎利肝的作用。临床上,线纹香茶菜因清热利湿褪黄等功效,故广泛作为消炎利胆片、复方胆通片等中成药的主要原料。近期有报道用溪黄草治疗急性黄疸型肝炎 300 例^[30],用溪黄草与白花蛇舌草、虎杖、丹参等制成制剂治疗乙肝 68 例(有效率 84%)^[31],用溪黄草与其他药制成“炎瘤宁栓剂”等^[32]。

4 小结

综上所述,溪黄草来源为香茶菜属植物线纹香茶菜,今后应在分清与其他同属植物区别的基础上,结合现代分析技术,加强对其化学成分的研究,重点是二萜类和黄酮类。而药理学方面应参考同属其他品种的研究,着重在消炎、护肝及抗肿瘤方面,以其开发出更确切有效的医药产品。

参考文献

- 1 陈林姣,李植华,赖小平,等. 中药材,1996,19(4):169
- 2 肖树雄,杨启存,吕红. 中药材,1993,16(6):24
- 3 广西壮族自治区卫生厅. 广西中药材标准. 第二册. 南宁:广西科技出版社,1996:279
- 4 陈健南,赖小平,刘念. 中药材,1996,19(2):73
- 5 吴子超,周令仪,刘若雅. 中药材,1990,(11):23
- 6 周晓东. 广州中医学院学报,1990,(2):113
- 7 冯毓秀,宋万志,陈红. 中国药学杂志,1991,(3):147
- 8 赖小平,陈林姣,陈建南,等. 广州中医药大学学报,1996,13(3-4):83
- 9 陈林姣,屈良鸽,施苏华,等. 中国中药杂志,1998,23(6):328
- 10 曾元儿,赖小平,徐晖,等. 数理医药学杂志,1997,10(3):204
- 11 程培元,郭跃伟,许美娟. 药学报,1987(12):3
- 12 王兆全. 华西药学杂志,1988,(1):38
- 13 李广义,宋万志,季庆义. 中药通报,1984,9(5):29
- 14 吴兹武. 化学学报,1986,44(11):1139
- 15 金人玲. 中药通报,1987,(10):39
- 16 赵清治,张雁冰,薛华珍,等. 河南医科大学学报,1997,32(4):77
- 17 郭跃伟,程培元. 中草药,1991,22(8):371
- 18 郭跃伟. 中草药,1992,23(7):380
- 19 胡俊宏. 南京药学院学报,1986,17(2):143
- 20 阮德娇. 云南植物研究,1986,(8):109
- 21 张春芬. 济宁医学院学报,1992,15(1):11
- 22 陈慧芳. 国外药讯,1996,(7):32
- 23 葛日萍,陈维洁,王晨光. 细胞生物化学,1995,17(2):83
- 24 姚素华. 湖南中医学院学报,1988,(4):46
- 25 李素兰. 云南中医学院学报,1995,18(1):17
- 26 李惠兰. 中药通报,1988,(10):46
- 27 张春芬,李建美,王道生. 中药药理与临床,1996,(2):15
- 28 卢长安. 中国中医医学杂志,1998,4(4):25
- 29 廖雪芬,廖惠芳,叶木荣,等. 中药材,1996,19(7):363
- 30 秦雪峰. 陕西中医,1994,15(1):26
- 31 莫激勤. 陕西中医,1997,18(7):293
- 32 刘晨江. 河南医科大学学报,1991,(4):343

(2000-04-07 收稿)

中药材 DNA 分子标记研究的技术问题

I. 植物药基因组 DNA 的提取

北京中医药大学(100029) 郭宝林* 李家实 阎玉凝

摘要 随着 DNA 分子标记技术在中药中的广泛应用,快速有效地将材料中的 DNA 提取出来成为研究的关键步骤。综述了 90 年代以来文献报道的针对提取过程中出现的各种问题所采取的相应措施,主要涉及如何去除提取材料中的酚类和多糖类杂质。

关键词 DNA 分子标记 基因组 DNA 提取 多糖 酚类

DNA 分子标记应用于中药资源、鉴定、栽培等方面有着很好的发展前景,目前研究报道正日益增

* Address: Guo Baolin Beijing University of TCM, Beijing

郭宝林 医学博士,副研究员,现为北京中医药大学博士后。研究方向为药用植物(中药)的分类、资源和质量评价;分子生物学在中药中的应用是目前的主要研究内容。研究对象曾涉及淫羊藿、珍珠菜、牡丹、芍药、厚朴及金丝桃等,发表论文近 40 篇,现承担多项国家级和部级研究课题。

多。一般来说,该技术涉及的分子生物学原理比较简单,实验方法也不复杂,但熟练掌握,灵活运用,并有效地解决实验中出现的各种情况,仍有许多问题值得重视,作者曾就该研究的策略性问题作过论述^[1],现则着重介绍技术方面的一些关键问题。

1 材料的预处理

1.1 洁净:目的是去除任何可能的外源 DNA 污染,如细菌、真菌等。根、茎、果类材料要用刀认真刮取干净部分。花、叶、种子或小饮片等材料则在尽可能切去菌斑、菌块之后,用次氯酸、乙醇浸洗,或用紫外灯照射,有些植物有与细菌或真菌共生现象,菌丝深入到组织内部,则外来 DNA 不可能去除干净。而有些材料,如冬虫夏草,本身就为多种生物的复合体,研究时应予以注意。

1.2 粉碎:材料经液氮速冻后粉碎是通用方法。对于新鲜材料,液氮处理可抑制 DNase(DNA 酶)的活性,防止 DNA 的降解,但对于材料,液氮速冻只使材料变脆易磨,因而加玻璃砂或砂子共研则更经济,效果也很好^[2~4],而且如果没有液氮,对于新鲜材料也可用砂子共研,只要同时加入提取缓冲液(可抑制 DNase 的活性)即可^[5]。

基因组 DNA 的有效提取是进行任何 DNA 下游工作的前提和基础,有效提取指的是得到的基因组 DNA(或称总 DNA)有足够的量,尽可能的降解和不含有影响下一步酶反应的杂质,植物药中的小分子次生产物如萜类、黄酮、香豆素、有机酸、鞣质等含有酚羟基的化合物,氧化后易与 DNA 结合,引起 DNA 降解或抑制酶的活性,而植物中存在的多糖类由于与 DNA 同属大分子化合物,一般提取过程很难去除干净,也可能影响 DNA 的进一步酶处理或 PCR(聚合酶链式反应)扩增。

2 一般提取方法

2.1 CTAB 法^[6]:CTAB(Cetyltriethylammonium bromide)是一种去污剂,它可与核酸形成复合物,这些复合物在高盐溶液(>0.7 mol/L NaCl)中可溶并且稳定存在,但如果降低盐的浓度(<0.5 mol/L NaCl),CTAB 与核酸的复合物就会因溶解度降低而沉淀出来,大部分的蛋白及多糖仍溶于溶液中。

该方法是植物 DNA 提取的经典方法^[7~11],抽提缓冲液加入一定量的 β -巯基乙醇,可起到防止酚类氧化的作用,如果材料中酚类成分较多,可将其含量提高至 6%^[12]。技术关键是提取过程加入 10% CTAB 提取液和 1% CTAB 沉淀缓冲液的量一定要准确,否则 CTAB-DNA 复合物沉淀不易产生或

得到的 DNA 会有部分降解^[13,14]。

当材料中多糖少时,可不用 1% CTAB 沉淀缓冲液来沉淀 DNA,在经氯仿-异戊醇(24:1)抽提之后,用异丙醇或乙醇沉淀 DNA,使提取过程简化^[15,16]。

2.2 SDS 法^[7]:SDS(Sodium dodecyl sulfate)是阴离子去污剂。用含有高浓度 SDS 的抽提缓冲液在 55 ℃ 对植物细胞进行裂解后,用提高盐浓度(KAc 或 NH₄Ac)和降低温度(冰上保温)的办法沉淀除去蛋白和多糖,剩下的 DNA 再进一步纯化,该法提取出的 DNA 常含有较多的多糖,但如果材料本身多糖含量不高或其含量未超过一定限度而对进一步研究无影响时仍可使用。已有较多使用 SDS 法提取 DNA 成功的报道^[17~19]。

3 DNA 提取过程中杂质的去除

对于幼嫩的材料(鲜品或硅胶快速干燥品),一般方法都可得到很好的 DNA,但对于中药,研究材料常常无法选择。各种各样的来源、药用部位、采收季节、加工方法及贮藏条件都将会碰到,虽然中药的 DNA 提取方法已有一些报道^[13,17],但目前尚没有通用的方法。针对某一具体材料,常规的方法可能都不奏效,如何去除上述的两类主要杂质,下列处理办法可供参考。

3.1 去除多糖:如果材料中含有较多多糖,一般提取方法将很难去除。多糖常与 DNA 共沉淀而使沉淀物呈胶冻状。少量的多糖一般不影响 DNA 的限制性酶解或扩增,但当下一步研究无法进行时,则要考虑在提取 DNA 过程中去除多糖。

3.1.1 在 DNA 未溶出之前,先用一些缓冲液洗去多糖。如可用缓冲液:100 mmol/L Tris-HCl(pH=8.0)、5 mmol/L EDTA 和 0.35 mol/L Sorbitol 洗几次^[3,20]。

3.1.2 使 DNA 提取液中的多糖先沉淀。在提取液中加入 0.35 倍体积的无水乙醇,迅速混匀,多糖会先沉淀^[22]。

3.1.3 沉淀 DNA 时,使多糖保留在溶液中。

1)高盐法:如用乙醇沉淀时,在待沉淀溶液中加入 1/2 体积的 5 mol/L NaCl^[23],或加 NH₄Ac 使终浓度为 10 mmol/L^[24]。

2)PEG(聚乙二醇,WT 8 000)代替乙醇沉淀 DNA:如在 500 μ L DNA 液中加入 200 μ L 20% PEG 8000(含 1.2 mol/L NaCl,冰浴 20 min)^[18]或 0.5 mL DNA 液中加 0.125 mL 4 mol/L NaCl 和 0.625 mL 13% PEG 8000(冰浴 1 h)^[24]。

3.1.4 多糖和 DNA 的共沉淀物进行再分离。如用 TE(DNA 溶解缓冲液)反复清洗共沉淀物,将清洗液合并再用醇沉淀 DNA^[25];或将沉淀物溶解后,经琼脂糖电泳,切下 DNA 部分再将胶回收^[12],或者用多糖水解酶将多糖降解^[21,31]。还有在提取缓冲液中加一定量的氯苯(1/2 体积),氯苯可以与多糖的羟基作用而去除多糖^[27]。

上述方法还可组合使用,以达到最佳效果^[3,28]。然而这些方法均会在一定程度上减低 DNA 的提取量;如果材料较少或要求较高,则可考虑用柱层析方法,使用对 DNA 具有特异性吸附的树脂来纯化 DNA,可选用 Wizard Purification Kit(作者经验),PRC-5 柱^[19],Sephacryl S-1000 或 S-500^[18],Qiagen Genomic tip 500/G^[26],或者 CsCl 梯度离心纯化 DNA。

3.2 去除酚类:含有酚类杂质的 DNA 其沉淀物多呈黄色至褐色,难以溶解或溶液色深。由于酚类化合物在植物材料中存在十分普遍,因而抽提缓冲液中要加入一定量的 β -巯基乙醇(防止酚氧化),PVP(聚乙烯吡咯烷酮,可与酚类结合)也十分常用,但有时仍无法全部去除。可以考虑下述方法。

3.2.1 对酚类的预提取(清洗):对未粉碎的干材料可水浸过夜,主要去除水溶性鞣质等^[18],对粉碎后的材料用丙酮浸提,去除脂溶性酚类化合物(作者经验),或用可去除酚类的缓冲液清洗(0.25 mol/L NaCl,0.2 mol/L Tris-HCl,50 mmol/L EDTA,2%~4% PVP)(作者经验)。

3.2.2 抽提液中再加一些防止酚类氧化的试剂:多是一些抗氧化剂,如抗坏血酸(参考终浓度 30~60 mmol/L)^[17]、半胱氨酸(10~60 mmol/L)^[19]、亚硫酸钠(10 mmol/L)^[29]、二硫苏糖醇(0.1%)^[21]及二乙基二硫氨基甲酸(4 mmol/L 或 0.5%)^[30]。

3.2.3 抽提液中再加入易与酚类结合的试剂:这类试剂与酚类有较强的亲和力,可防止酚类与 DNA 的结合,PVP 属于这一类,还有 PEG(聚乙二醇)(参考终浓度 10%)^[5]。

在 SDS 法中调整抽提液为低 pH 值(pH = 5.5),使酚类呈未解离状态,也可防止其氧化^[17,19]。

酚类杂质也可用上述提到的柱层析纯化,对于既含多糖又有多量酚类的材料,去除两类杂质的方法常组合使用。

4 花(孢)粉、种子或浸制标本的 DNA 提取

4.1 花(孢)粉:有效破除花(孢)粉壁是花(孢)粉 DNA 提取的关键,Simel 比较了前人报道的多种方

法,如 MMNO(4-methylmorpholin-N-oxide)处理,渗透破裂,快速冷冻,微波降解,酸碱处理并加纤维素、半纤维素酶消化,以及微珠机械粉碎等方法,试验了 8 种裸子植物和被子植物花粉,以用最后一种方法最好,提取介质为十二烷基磺酸锂(lithium dodecyl sulfate)优于 SDS 和 CTAB^[31]。

4.2 种子:种子中常贮藏较多的蛋白和淀粉,一般不影响 DNA 的有效提取,CTAB 法和 SDS 法均可,得到的 DNA 一般有些降解,与种子的贮存时间呈正相关,但情况好于腊叶标本材料^[14,32]。

4.3 浸制标本:有时会需要从浸制标本中提取 DNA。不论浸液是卡诺固定液、FAA 或不同浓度的醇均对材料中的蛋白起作用,使得染色体中与 DNA 结合的蛋白质不易解离,提取介质中一定要加入蛋白酶,Proteinase E 或 Proteinase K 均可^[33]。

5 DNA 质量的检测

提取得到 DNA 要进行数量和质量的检测。

5.1 外观:好的 DNA 沉淀为白色,干后透明。如果干后仍呈白色,常因蛋白较多;若呈黄至棕色,则是有多酚类杂质;呈胶冻状则含有多糖。

5.2 紫外分光光度法^[19]

1)测量 260 nm 处的紫外吸收值,用于定量,每个 OD 值相当于 DNA 浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2) A_{260}/A_{280} 比值若为 1.80 左右,则 DNA 比较干净; >1.80 ,则含有 RNA; <1.80 ,则含有蛋白质,需要去除。前者用 RNase 将 RNA 降解,后者可用酚/氯仿再抽提。

如果含有其它小分子杂质(药材中常有),它们在相应波长可能有吸收,则单从 OD 值的变化情况无法很好地判断 DNA 的纯度。

5.3 琼脂糖凝胶法

1)琼脂糖电泳后胶孔处有 EB(溴化乙锭)吸收,表明有多糖。

2)未降解的 DNA,电泳时用标准量的 λDNA 进行定量。

3)干药材的 DNA 大多降解,电泳呈弥散状(不同的材料降解的程度不同),可点于凝胶上,与标准量的 DNA(分子量较小)通过紫外投射大致定量。

5.4 DNA 中是否有影响 PCR 或酶切的杂质,则要根据实验的需要进行相应反应的试验才可确定。

总之,植物药 DNA 的提取对于具体的材料还是一个需要不断摸索的过程,今后的研究中将会积累更多的经验。

参考文献

- 1 郭宝林. 世界科学技术——中药现代化, 2000, 2: 39
- 2 王培训, 黄 丰, 周 联, 等. 中药新药与临床药理, 1999, 10: 18
- 3 Scott K D, Playford J. BioTech, 1996, 20: 974
- 4 Guillemant P, Marechal L. Plant Mol Biol Rep, 1992, 10: 60
- 5 Ouenzar B, Hartmann C, Rode A, et al. Plant Mol Biol Rep, 1998, 16: 263
- 6 Doyle J J, Doyle J L. Phytochem Bull, 1987, 19: 11
- 7 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天, 等编. 植物基因与分子操作. 北京: 北京大学出版社, 1995: 19
- 8 曹 晖, 毕培曦, 邵鹏柱, 等. 中药材, 1996, 19: 608
- 9 黄璐琦, 王 敏, 周长征, 等. 药学报, 1998, 33: 778
- 10 Cheng K T, Su C H, Chang H C, et al. Planta Med, 1998, 64: 45
- 11 Perry M D, Darey M R, Power J B, et al. Plant Mol Biol Rep, 1998, 16: 49
- 12 Aldrich J, Cullis A. Plant Mol Biol Rep, 1993, 11: 128
- 13 Cao H, But P P, Shaw P. J Chem Pharm Sci, 1998, 7: 130
- 14 Roger S O, Bendich A J. Plant Mol Biol, 1985, 5: 69
- 15 Chen D H, Ronald P C. Plant Mol Biol Rep, 1999, 16: 53
- 16 Singh M, Bandana, Ahuja P S. Plant Mol Biol Rep, 1999, 17: 171
- 17 邹喻苹, 汪小全, 雷一丁, 等. 植物学报, 1994, 36(7): 528
- 18 Li Q B, Cai Q, Guy C L. Plant Mol Biol Rep, 1994, 12: 215
- 19 卢圣栋主编. 现代分子生物学实验技术. 北京: 高等教育出版社, 1993: 59
- 20 Tel-Zur N, Abbo S, Myslabodski D, et al. Plant Mol Biol Rep, 1999, 17: 249
- 21 Woodhead M, Davies H V, Brennan R M, et al. Mol Biotech, 1998, 9: 243
- 22 Michaels S D, John M C, Amasino R M. BioTech, 1994, 17: 274
- 23 Porebski S, Bailey L G, Baom B R. Plant Mol Biol Rep, 1997, 15: 8
- 24 Schiernbeck K A. BioTech, 1994, 16: 392
- 25 Rozman D, Komel R. BioTech, 1994, 16: 382
- 26 Csaikl H M, Bastian H, Brettschneider R, et al. Plant Mol Biol Rep, 1998, 16: 69
- 27 Simel E J, Saidak L R, Tuskan G A. BioTech, 1997, 22: 390
- 28 Zhu H, Qu F, Zhu L H. Nucl Acids Res, 1993, 21: 5279
- 29 Raina K, Chandlee M. BioTech, 1996, 21: 1030
- 30 Peterson D G, Boehm K S, Stack S M. Plant Mol Biol Rep, 1997, 15: 148
- 31 Rether B, Delmas G, Laovedu A. Plant Mol Biol Rep, 1993, 11: 333
- 32 Benico C, figueiras A M, Zaragoza C, et al. Plant Mol Biol Rep, 1993, 11: 181
- 33 Flouruooy L E, Adams R P, Pandey R N. BioTech, 1996, 20: 657

(2000-06-19 收稿)

药用卷柏的研究概况

北京市中医研究所(100010) 何 薇* 曾祖平 王永红

摘 要 综述了药用卷柏在化学成分、药理作用方面的研究概况, 提示丰富的卷柏资源有进行深入研究的意义。

关键词 药用卷柏 化学成分 药理作用

卷柏为蕨类植物门卷柏科卷柏属植物, 约有 700 种, 广泛分布于全世界。我国约有 50 种, 产于全国各地^[1]。常作为药用的有 6 种, 被《中华人民共和国药典》一九九五年版中收录的两种为卷柏科植物卷柏 *Selaginella tamariscina* (Beauv.) Spring; 垫状卷柏 *S. pulvinata* (Hook. et Grev.) Maxim., 具有活血通经之功效, 用于经闭痛经, 症瘕痞块, 跌扑损伤; 炒炭后可化瘀止血, 用于吐血、崩漏、便血、脱肛。我国南方部分地区广泛使用的石上柏, 《广西中药材标准》中收录石上柏的来源为卷柏科植物深绿卷柏 *S. doederleinii* Hieron. (别名: 大叶菜); 江南卷柏 *S. moellendorfii* Hieron. (别名: 地柏枝), 具有清热解毒、抗癌、止血之功效, 用于癌症、肺炎、急性扁桃体炎、眼结膜炎和乳腺炎。《贵州民间药物》中将深绿卷柏称为多德卷柏 *S. doederleinii* Hieron., 具有祛风、散寒、消肿、止咳之功效, 用于风湿病, 风寒咳嗽。山东省有些地区使用中华卷柏 *S. sinensis* (Desv.) Spring, 用于治疗慢性气管炎。福建等地使用的为袁

州卷柏 *S. involvens* (Sw) Spring。

为进一步深入研究卷柏的药用价值, 现将对卷柏的化学成分、药理作用的研究情况做简要综述。

1 化学成分

1.1 黄酮类: 现已发现卷柏中含有芹菜素 (apigenin)、穗花杉双黄酮 (amentoflavone)、扁柏双黄酮 (hinokiflavone) 和异柳杉素 (isocryptomerin)^[2] 及阿曼托黄素 (amentoflavone)^[3]。林瑞超^[4] 等从深绿卷柏中分离得到阿曼托黄素、7, 7'-二-O-甲基阿曼托黄素、7, 4', 7'', 4''-四-O-甲基阿曼托黄素和三叶胶树黄酮。陈平^[5] 等从深绿卷柏中分离出芹菜素。

1.2 生物碱类: 林瑞超^[6] 等从深绿卷柏中分离得到 3 种新的生物碱苷 (alkaloid glycoside): hordenine-O- α -1-rhamnopyranoside, *n*-methyltyramine-O- α -1-rhamnopyranoside, hordenine-O-[(6''-O-trans-cinnamoyl)-4'-O- β -D-glucopyranosyl- α -1-rhamnopyranoside]。

1.3 酚类: 林瑞超^[4] 等从深绿卷柏中分离得到 5 种

* Address: He Wei, Beijing Institute of TCM, Beijing