

· 中药现代化论坛 ·

蛋白质组学在中药现代化研究中的应用

王志平, 乔建军, 元英进*

(天津大学化工学院 制药工程系, 天津 300072)

摘要: 根据国内外文献, 结合课题组应用蛋白质组学对药物合成途径及代谢调控的研究, 介绍研究蛋白质组学的主要内容、技术手段, 以及在中药现代化研究中的巨大应用意义, 并分析了蛋白质组学的未来发展方向, 为中药现代化以及新型中药制剂的开发提供参考。蛋白质组学将成为中药现代化研究中必不可少的工具之一。

关键词: 蛋白质组学; 中药现代化; 基因组学; 二维凝胶电泳; 药物靶点

中图分类号: R 282

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2004)01-0001-04

Application of proteomics to modernization research of Chinese materia medica

WANG Zhiping, QIAO Jian-jun, YUAN Ying-jin

(Pharmaceutical Engineering Department, College of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: To summarize the application of proteomics to modernization research of Chinese materia medica (CMM) and offer the reference for modernization of CMM and new medicine preparation exploitation. Based on the references and our project group studies in proteomic of drug biosynthesis pathway and metabolism; the main content, technology strategies and important application of the proteomics were introduced significantly; and the further development of proteomics was analyzed. The proteomics will become one of absolutely necessary tackles in the modernization research of CMM.

Key words: proteomics; modernization of Chinese materia medica; genomics; two-dimension gel electrophoresis; drug target

随着人类社会回归自然的呼声越来越高, 世界上更多的人把关注的焦点放在了天然产物的研究上。受此热潮影响, 中药现代化的研究正以突飞猛进的速度, 借助现代科学技术手段向我们走来。1994年澳大利亚的Macquarie大学的Wilkins和Williams^[1]首先提出了蛋白质组(proteome)。蛋白质组学(proteomics)是指通过生化方法对蛋白质进行大规模研究的科学。蛋白质组学的研究领域包括以下3个方面: 蛋白质大规模鉴定和转录后修饰的微特征研究; 差异显示蛋白质组学, 即对肿瘤等疾病有广泛应用前景的蛋白质表达水平的比较; 应用质谱技术和酵母双杂体系对蛋白质间相互作用的研究。如果说基因组学(genomics)是一种对细胞的静态描述, 主要指其结构和功能; 而蛋白质组学才是真正的对基因的功能(或称结果)进行研究的一门科学, 是专门研究细胞内全部蛋白的动态表达, 其不但包括功能基因组学中所指的全部蛋白, 而且还

包含一部分非基因组编码的蛋白, 如病毒中的蛋白(其不是由基因组编码), 故通常亦称之为功能基因组学(functional genomics)。基于此, 蛋白质组学能较实际地反映机体生物代谢的一些基本问题, 深化生命科学认识。这将极大推进生物技术(基因工程、蛋白质工程、酶工程、细胞工程、发酵工程等)向更精确、更高效, 具有更高的可利用性和开发性的方向发展, 并将涉及涵盖到医学、药学、农业等相关领域, 使其内在的常规格局发生变革。

1 蛋白质组学的内容、技术手段及意义

1.1 蛋白质组学的内容: 与基因组的均一性相比, 蛋白质组则具有多样性。即在同一生物个体的所有体细胞中基因是一样的, 但在生命发育不同阶段的细胞中蛋白质种类及数量却是大相径庭, 不同组织中细胞表达的蛋白质也有很大差异; 其次, 基因组非常稳定, 而蛋白质组则是动态变化的。即同一细胞在不同时期、不同条件下, 其蛋白质组也是在不断地改

* 收稿日期: 2003-05-27

基金项目: 国家863计划资助项目(863-2001AA 214081); 国家自然科学基金资助项目(30200003)

作者简介: 王志平, 男, 天津大学生物化工专业博士研究生, 现从事天然活性产物的分离纯化。Tel: (022) 27401149

E-mail: wangzhiping2004@eyou.com

变之中。利用这一特点,可以多点切入蛋白质组的研究。功能蛋白质组学(functional proteomics)的研究即注重从局部入手,主要研究细胞内的蛋白质群体,群体范围可大可小,重点放在那些可能涉及到特定功能机制的蛋白质群体上。不断地把许许多多不同的蛋白质群体统计组合,从而描绘出接近于生命细胞的“全部蛋白质”的蛋白质组图谱^[2]。

蛋白质组学的内容主要有“蛋白质组技术体系”和“蛋白质组信息学”两方面的研究。蛋白质组技术体系包括:蛋白质组的样品制备和鉴定、蛋白质相互作用网络的研究技术等;蛋白质组信息学则涉及蛋白质组数据库的建立,相关软件的应用与开发和生物信息学。即在研究体系建立与不断完善的同时,针对一些重要的生物学问题进行功能蛋白质组研究。首先,要选择有很好研究积累的细胞与生物大分子(蛋白质/基因)的较完整研究系统,利用所建立的相应蛋白质组图谱方法,获取各种重要条件作用前后的同类蛋白质组图谱,并利用计算机图像技术系统分析比较,确定在数量及形式、修饰度或定位等发生变化的蛋白质群体^[3]。然后,对重要内外环境因素、基因突变等条件直接作用相关的蛋白质群体进行时相、初级和次级等变化的详细研究分析,从中发现重要的蛋白质群体及其活动规律和关键蛋白质,再深入进行它的组份及其性质的鉴定。由此创建各种细胞的蛋白质组数据库,并进而开展重要的蛋白质结构预测、三维结构和动态结构研究,在分子水平上深入探索其作用模式、功能机制、调节控制及其在蛋白质群体内或与相关生物大分子间的相互作用。

1.2 蛋白质组学的主要技术:蛋白质组学研究对象主要是细胞或有机体中所有的蛋白质。研究其结构与功能,对其进行定性、定量和作用展示的研究。首先对生物学体系中的复杂蛋白质混合物进行分离与鉴定。由于生物体系中各种不同种类的蛋白质含量差别较大,而且随体系所处的环境呈现动态变化,溶解性、酸碱性、相对分子质量等差异较大,因此需要采取相应的分离纯化方法和技术手段进行研究。蛋白质组学研究中常常涉及的相关技术包括样品的处理技术、双向电泳分离技术、蛋白质分析技术如相对分子质量^[4,5]的测定、序列的测定、N-末端、C-末端的测定、胶团以及相关的结构与功能研究、数据库检索分析等信息学技术。

1.3 研究蛋白质组学的意义:通常认为,蛋白质的表达可以通过基因产物——mRNA 水平反映出来,然而最新研究表明^[6],基因的表达水平与细胞中相应蛋

白质的含量并没有严格的一致性,所以对于基因组的研究并不能取代蛋白质组的研究。造成这一现象的主要原因有:(1)基因表达与相应的蛋白质表达存在时间上的差异;(2)基因表达的部位与相应蛋白质执行功能的部位有所不同;(3)mRNA 及蛋白质的稳定性有所不同;(4)mRNA 在转录后可生成不同的蛋白质;(5)蛋白质的修饰如磷酸化和糖基化对于蛋白质的活化及执行功能具有非常重要的影响。这一发现使得研究细胞中蛋白质的表达丰度对于研究疾病的分子机制及新药开发具有非常重要的意义。研究表明^[7],只有约 2% 的疾病与基因序列有关,98% 的疾病与蛋白质的表达有关,仅依靠基因水平的分析有时并不足以了解疾病发生的机制。蛋白质组学可以直接在分子水平阐述蛋白质修饰、蛋白质之间相互作用及蛋白质的作用机制等问题,这样有利于弄清疾病发生、发展以及药物治疗的分子机制,也便于开发更有效的中药制剂。所以,特定细胞的蛋白质组资料与基因组资料的相互补充和完善,也有助于疾病机制的研究及中药现代化的系统开发。

2 蛋白质组学在中药现代化中的应用

面临这样一个分子生物学快速发展的新时代,中药现代化研究应该借鉴其新观念和新技术,来发展和完善自身理论体系,加速中药现代化进程。

2.1 中药材或制剂有效部位或有效成分作用靶点的识别:中药进入体内发挥作用的基本环节是药物分子与细胞之间的直接或间接的相互作用。中药材中所含化学成分非常复杂,基于以往的分析技术,进行多组份同时分离筛选存在很多困难,采用有效部位加以描述,难以准确确定其中的有效成分。而中药复方的化学研究由于其复杂性和整体性,更加难以确定其中的有效成分。况且由于单味药材的化学研究尚未解决,多味药相互作用过程的化学成分研究更是有待进一步深入。这是从传统化学成分研究角度研究中药所遇到的难题。

中药制剂有效部位或有效成分进入人体,发挥作用,必然会引起从遗传信息到整体功能实现中的分子、细胞、器官、整体多个层面的结构与功能状态的改变,调节这些层面的结构与功能的本质是基因,而直接的作用者主要是蛋白质。因此,以蛋白质表达为指标^[8],以蛋白质调控改变和功能修饰为研究方向,进行中药复方有效部位或有效成分多组份、多环节、多靶点治疗调整作用的研究。具体来说,以蛋白质组学理论为指导,对中药制剂有效部位或有效成分作用靶点识别的大量结果,进行系统化分析和整

理,从而建立系统化的生命模式背景,以及中药制剂有效部位或有效成分作用靶点的识别体系,进而可以指导和预见中药材或制剂中化学成分的发和分离。与疾病相关的靶基因作为中药作用的最本质的治疗指标,可望对中药制剂有效部位或有效成分的识别研究取得突破性进展。

2.2 中药材或制剂的药理作用研究:中药药理学研究的主要任务是揭示中药治疗的作用机制和机体对药物处理过程的研究。该过程是一个涉及多成分、多靶点、多途径的作用过程。从中药角度看,由于成分复杂,单味药材就是一个化学分子库,复方是单味药材按照特定组织原则组织起来的多个化学分子库的组合。虽然不是所有化学成分都是有效成分,但在发挥作用过程中,各成分之间存在相互协同或抑制作用;另外,从机体角度看,机体本身是一个极其复杂的巨系统,每个系统中都包含着多因素的问题,疾病的发生大多也是多种病因通过多种途径导致整体功能紊乱的过程。研究这样两个多因素系统的相互作用,其复杂程度可想而知。从机体而言,机体生命活动规律的认识是研究深入的关键。

在蛋白质组时代可从分子水平揭示中药复方作用机制。中药治疗疾病不是单纯强调以药物去直接对抗致病因子,重点在于调整机体功能状态,发挥机体抗病能力。中药复方在对机体功能状态调节过程中,涉及到细胞、器官、整体多个层面,对多层面的系统关联性研究正是蛋白质组时代的主要任务。同时,依据多基因致病的关联特性,通过蛋白质表达谱和表达产物的差比性分析,可以揭示证候发生和发展的分子水平调控规律^[9],进而可能揭示中药复方的作用靶点、作用环节和作用过程。也就能发现复方中的有效成分及各成分间的协同关系,进一步实现复方的优化组合,实现由天然药物组方向化学成分组方的转化,从而可能会更清晰的阐述中药复方在分子水平的作用机制。

2.3 濒危中药材的细胞培养工程:运用生物技术来生产中药有效成分,即濒危药用中药材的大规模细胞培养工程,成为一种必然趋势。在后基因组时代,通过功能基因组和蛋白质组的研究,在了解遗传信息表达和调控规律基础上,用控制遗传信息的方式来促进中药材有效成分的细胞培养合成。如从黄连细胞培养物中生产黄连碱,人参根细胞中生产人参皂苷,长春花中生产吲哚碱,丹参中生产丹参酮,青蒿中生产青蒿素等^[10]。在 20 世纪 80 年代后期,药用植物有效成分基因调控方面的研究就已经开始,

红豆杉等药材进行过这方面的研究。20 世纪 90 年代以后,一些结构复杂的药用植物有效成分生物合成途径及其基因调控规律已逐渐被揭示出来,而且有些有效成分生物合成的人工调控已获得了初步成功,元英进教授领导的课题组长期研究各种诱导子对红豆杉细胞体系诱发凋亡^[11],考察凋亡过程中蛋白质的丰度及差异蛋白的显示,考察紫杉醇产量,使结果向提高紫杉醇产量的方向发展。随着功能基因组和蛋白质组的研究,遗传信息的表达调控规律和所表达蛋白质的生物功能将得到更多地阐明,生命科学认识将逐步深入,从而推动中药有效成分系统分析和利用生物技术合成的发展,这一领域展示出十分诱人的前景。

2.4 濒危中药材相关替代及道地药材功能基因组研究:在后基因组时代,通过蛋白质组的研究,在越来越多了解有效成分作用靶点、调控规律的基础上,可以用监控细胞蛋白表达差异或体内代谢方向的方式研究濒危中药材的相关替代,促进中药材的充分合理利用。

对于中医药理论认为具有很好临床疗效和突出治疗作用的中药材如红豆杉(突出的抗癌作用)、虎骨(突出的祛风湿、定痛疗效)、麝香(突出的开窍、通络作用)等,而又属于濒危稀有动植物保护资源的,可以考虑采用相近种属替代,或者改变用药部位的方式,达到既保护资源,又能够充分利用的目的。传统的替代药材研究中,由于研究主体所含化学成分非常复杂,不仅所含化学成分种类不尽相同,即使化学成分类别相同,但所含各主成分之间的比例、微量元素含量及比例、主成分化合物存在方式的不同,其发挥治疗作用的效果就会大不相同。分析检测多组份的分离筛选有效成分存在很多困难,采用有效部位或指标性成分加以描述,难以确定其中的有效成分。多味药的复方相互作用过程的化学研究更是无法进一步深入明确其成分及机制,所以,难以筛选出合理的相关替代品。蛋白质组学的研究方向则认为有效部位或有效成分进入细胞或人体,发挥作用必然会引起整体功能的分子、细胞、器官、整体多个层面的结构与功能状态的改变,毫无疑问,直接的改变主要是蛋白质,蛋白质的调控发生了改变或功能发生了修饰。因此,以蛋白质的丰度或表达为指标,对作用靶点识别,建立作用靶点的识别体系并进行系统化分析归纳,找出相似作用方式的相关成分,对比考察替代品与传统上应用的濒危中药材的各蛋白质表达丰度、表达种类相似与否,即可筛选出最佳替

代。因此,利用蛋白质组学的技术手段进行濒危药用中药材或不同药用部位的相关替代研究是可行的。

另外,因为绿色开花植物的基因组之间具有相似性,利用植物研究中的基因组技术^[12],从众多临床中常用的中药材,选取一些具有代表性药材特征的范例,作为研究某一应用领域的模式植物,进行植物功能基因组研究,也可以为深入有关中药材的道地药材,科学种植等相关研究提供有利的科学依据。

2.5 有利于中药指纹图谱的更加合理化: 中药指纹图谱现已成为研究中药制剂乃至世界各国植物制剂的物质基础和作用机制的一种新模式和研究体系。指纹图谱除了包括通常所说的和化学成分相关的色谱、光谱指纹图谱外,还包括其他类多维多息中药生物指纹图谱,如基因组学指纹图谱和蛋白质组学指纹图谱等。中药指纹图谱能较完整地表征中药制剂复杂的物质基础(化学成分群)的大量信息,同时,也能够表征各种药理活性和药效作用(包括临床疗效);反过来,比较不同蛋白质组指纹图谱体现的不同药效结果,就可确定何种物质基础(化学成分群)是该中药制剂的最佳方式,此时这张指纹图谱不但包含了化学信息,也体现了和此相关的药效、临床疗效等生物医药信息,这就是多维多息指纹图谱的含义。

中药生物指纹图谱包括: 中药基因组学指纹图谱、中药蛋白组学指纹图谱和中药材DNA 指纹图谱。其中中药基因组学图谱和蛋白质组学指纹图谱系指用中药制剂作用于某特定细胞或动物后,引起的基因或蛋白的特定构象。复杂的变化情况,这两种指纹图谱似可称为生物活性指纹图谱。目前,中药基因组学和蛋白质组学有关指纹图谱的研究工作正在开展。由于宏观上中药作用靶点和作用机制的多样性及对基因作用的多样性,中药蛋白质组学指纹图谱,可在分子水平上丰富整个中药指纹图谱研究体系。无论是中成药二次开发,还是中药新药研究,一个关键问题需要解决,即逐步在分子水平上研究解决化学成分(物质基础)和药理作用、药效活性的相关性,而其中,通过蛋白质组学的研究得到的蛋白质组学指纹图谱又具有很高的说服力。从中药新药研究出发,可在开始研究阶段,即同时进行化学成分指纹图谱和蛋白质组指纹图谱的研究,一举达到建立同时体现化学和分子生物药效信息的蛋白质指纹图谱。这样,中药新药开发研究乃至整个中医药理论将会增添更多的方法和内容,实现中医药理论质的飞跃。

3 未来蛋白质组学的发展方向

目前的蛋白质组学尚存在其明显的不足,具体

表现在对整体蛋白质的辨别能力及鉴定能力有待进一步提高,对疏水性强、相对分子质量较小和较大、酸碱性较强的蛋白质,以及分离后胶上蛋白质的回收等均需有较大的改进与提高,简化操作,开发价廉易使用的仪器设备,采用自动化快速分析等手段仍是蛋白质组学未来研究的方向。但随着蛋白质双向聚丙烯酰胺凝胶电泳分离技术的发展,各种质谱技术的完善及新型仪器的应用,以及网络化、系统化生物信息学的迅速普及与应用,蛋白质组学在自身相关技术如样品制备、灵敏度、准确度、重复性及高通量、自动化方面取得了丰富的经验和较大的进展,新技术、新方法、新的仪器设备应用于蛋白质组学研究,都将使蛋白质组学与中药现代化的联系更加紧密。同时应该集中蛋白质及细胞、基因等方面的优势研究力量,充分利用各种已有的研究基础与积累,开展蛋白质组学与中药现代化的研究,试着建立蛋白质组学与中医药相关联的转换模式概念,为揭示诸如疾病状态下的代谢调控等生命活动的规律上取得突破,为探讨中药治疗重大疾病的机制、诊断和防治以及新型中药制剂开发提供理论基础。

References

- [1] Wilkins M R, Sanchez J C, Gooley A A, *et al.* Progress with proteome project: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it? [J]. *B iotechnol Genet Eng Rev*, 1995, 13: 19.
- [2] Lorthals G L, Wasinger V C, Hochstrasser D F. The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research [J]. *Electrophoresis*, 2000, 21: 1104.
- [3] Skolnick J, Fetrow J S. From genes to protein structure and function: novel applications of computational approaches in genomic era [J]. *Tibtech*, 2000, 18: 34.
- [4] Link A J, Eng J, Schieltz D M, *et al.* Direct analysis of protein complexes using mass spectrometry [J]. *Nat Biotechnol*, 1999, 17: 676-682.
- [5] Hoving S, Munchbach M, Schmid H. A method for chemical generation of N-terminal peptide tags for rapid protein identification [J]. *J Anal Chem*, 2000, 72: 1006.
- [6] Aka T, Takasawa T, Nakanura T. Identification and characterization of proteins from two-dimensional polyacrylamide gels by a combination of isotopic labelling and nanoelectrospray fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry [J]. *J Anal Chem*, 2000, 72: 1179.
- [7] Andson L, Serhamer J. A comparison of select mRNA and protein abundances in human liver [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18: 533.
- [8] Zhou J, Li C H. The study of thalamencephalon proteinomic in febrile big rats effected by Guizhi Tang [J]. *J Chin Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2003, 9(1): 31-34.
- [9] Lu Y Q, Gao Y. The development of pharmacology research in Chinese medicine herb compounds modernization [J]. *Nat Med Clin Pharm Res Chin Med Herb* (中药新药与临床研究), 2002, 13(1): 59-61.
- [10] Zhong J J. Production of ginseng and its bioactive components in plant cell culture: current technological and applied aspects [J]. *B iotechnol*, 1999, 68: 89-99.
- [11] Yuan Y J, Hu G W, Wang C G. Effect of rare earth compounds on the growth, taxol biosynthesis and release of *Taxus cuspidate* cell culture [J]. *J Chin Rare Earth Society* (中国稀土学报), 1998, 16(1): 56-60.
- [12] Zhou X F, Xiao N Z. The strategy of plant genomes study [J]. *J Chin Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2002, 22(6): 13-17.