

## · 中药现代化论坛 ·

## 中药现代化研究的生物技术

赵广荣<sup>1</sup>, 向志军<sup>1</sup>, 元英进<sup>1</sup>, 郭治昕<sup>2\*</sup>

(1. 天津大学化工学院 制药工程系, 天津 300072; 2. 天津天士力集团研究院, 天津 300402)

**摘 要:** 中药在人类疾病的预防和治疗以及天然药物筛选中占有重要地位。随着科学技术的进步, 生物技术在中药现代研究中展示出良好的应用前景。可用扩增片段长度多态性、限制性片段长度多态性、随机扩增多态性和微卫星 DNA 等生物技术进行中药材的甄别和品种选育, 利用遗传转化、组织和细胞培养进行药材资源的保护和有效成分或部位的大规模发酵生产。蛋白质组、生物芯片等高通量技术可应用于中药作用的分子机制研究, 从蛋白质图谱和基因表达的变化中寻找中药作用的靶点和途径。把机制研究成果应用于新药研发和中药的二次开发, 将极大推动中药现代化的进程。

**关键词:** 中药; 分子生物技术; 高通量技术; 药物创新

**中图分类号:** R 284. 1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0253-2670(2004)05-0481-04

**Biotechnology in modernization of Chinese materia medica**ZHAO Guang-rong<sup>1</sup>, Xiang Zhi-jun<sup>1</sup>, YUAN Ying-jin<sup>1</sup>, GUO Zhixin<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Research Institute of Tianjin Tasy Group Co., Ltd., Tianjin 300402, China)

**Abstract:** Chinese materia medica (CMM) plays an important role both in the disease prevention and therapy system and also in natural drug screening. Biotechnology exhibits applicable prospects in modern research of CMM with progress of natural science and technologies. Amplification fragment length polymorphism (AFLP), restriction fragment length polymorphism (RFLP), random amplification polymorphism of DNA (RAPD), and microsatellite DNA have been used to discriminate and breed herbal varieties. Genetic transformation and techniques of tissue and cell culture are explored to protect herbal resources and to produce active components or parts on a commercial scale. High throughput technologies of proteome and biochip are expected to probe molecular targets and routes of CMM with the changes of proteome and gene expression. The results can be helpful to novel drug development and secondary exploitation, so as to promote the modernization process of CMM.

**Key words:** Chinese materia medica (CMM); molecular biotechnology; high throughput technology; novel drug development

中药在我国人民与疾病长期斗争的过程中, 为中华民族的繁衍昌盛做出了不可磨灭的贡献, 即使在高度文明的今天, 中药在各种疾病的预防和治疗中仍然具有举足轻重的地位。随着人类文明的进步, 人的居住和生存环境都发生了很大变化, 疾病谱也随之发生了变化, 诸如神经和微循环系统疾病、恶性肿瘤、艾滋病、老年性痴呆等各种现代疾病对人类健康的威胁越来越严重。人们已经认识到西药不良反应较强, 对有些疾病西药也无能为力, 这迫使人们从包括中药在内的其他天然产物中寻找有效药源。

科学家寻找新的动植物药源的动力和良好愿望, 以及人类回归自然潮流的兴起, 为我国中药现代化、国际化提供了良好的外围环境。中药现代化是一个系统工程, 至少包括药材原料生产、药物制剂生产、制造设备和工艺技术的现代化<sup>[1]</sup>以及中药文化和立法的现代化等。科学技术的进步时时刻刻影响着人们的观念和生活方式, 科学家预言 21 世纪是生命科学的世纪, 生物技术将在各行各业得到广泛应用, 而且生物技术已经在农业、环保、医药等领域首先取得了实质性成就。中药科技工作者已经认识到

\* 收稿日期: 2003-08-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371712); 天津市医药科技重点攻关项目(023183011)

生物技术将是推动中药现代化的强有力的重要技术之一<sup>[2,3]</sup>, 并且已经在中药现代化中得到了应用, 本文就生物技术在中药现代化研究中的应用及其前景进行综述和展望。

## 1 应用生物技术生产中药材原料

我国的中药材包括植物、动物和矿物, 其中植物药材占绝大多数(87%), 约 383 科 233 属 11 020 种。虽然一些药材品种建立了生产基地, GAP 种植正在完善, 但大部分中药材仍然是依靠采集野生资源。由于过度开发使资源面临濒危和枯竭, 造成全国经常使用的 400 余种药材每年短缺 20%, 同时环境受到极大破坏, 药材品种市场混乱和质量下降。应用生物技术控制药材原料, 使中药材生产现代化。

1.1 组织培养技术保存中药生物资源、选育优良品种: 生物的细胞全能性赋予任何一种生物都能通过离体培养得到正常的生长发育, 现已经对数千种植物成功地进行了离体培养并建立了相应的培养系统, 其中药用植物达 200 多种<sup>[4]</sup>。组织培养结合超低温技术是生物种质资源保存的有效方法之一, 中药材完全可以采用该技术使其种质在试管内得到保存, 但需要研究相应的保存条件等具体技术细节, 不同品种的保存条件亦不尽相同。组织培养技术也是现代植物育种的有效手段, 如茎尖-16 号地黄新品种<sup>[5]</sup>。大多数中药材都是多年生、无性繁殖, 更适合于组织培养, 一方面, 不受生长季节的限制, 将加速育种进程; 另一方面能对新品种进行快速大量繁殖, 将良种的选育与大面积的推广种植一体化。

1.2 采用分子标记技术控制中药材的质量: 药材的质量是中药质量的直接决定因素, 高质量的药材才能经济有效地制造出合格的药品, 因此如何控制药材品质, 生产环境和种植技术就显得非常重要。已有成熟的分子遗传学方法和技术, 对药材品种进行分子标记研究, 实现生药的分子甄别。这些技术包括 AFLP (扩增片段长度多态性), RFLP (限制性片段长度多态性), RAPD (随机扩增多态性), 微卫星 DNA 等, 都是从遗传物质 DNA 变化的角度鉴定品种, 已在农作物品种的鉴定中使用相当成熟。其中 RAPD 简便、快速而应用最广, 且在中药材的鉴定中已有研究, 如鉴定木蓝属 8 种生药、铁线莲属 7 种生药及西红花等<sup>[6]</sup>。最重要的是, 从大量的结果中找到并建立连锁 DNA 标记或特征指纹图谱, 从遗传本质控制药材的来源。

DNA 水平的鉴定, 只能证实生药的真伪, 不能真正控制有效成分或部位的变化。因此还需要建立

有效成分或部位的基因表达差异的 cDNA 指纹图谱或蛋白质指纹图谱。检测这些分子标记的变化, 就能实现中药材质量的源头控制。

1.3 细胞和基因工程生产药材原料或药用有效成分、部位: 植物能生产 30 000 多种化合物, 是微生物来源的 4 倍。有些物质是很难用化学方法合成的, 有些很难用微生物生产或增加产量。植物细胞培养不受环境、生态和气候条件限制, 生长比整体植株快, 次生代谢物质的含量是自然植株的数倍甚至数千倍, 如人参皂苷在组织培养中含量占干重的 27%, 全株中只有 4.5%; 紫草素在细胞培养物中占 12%, 而全株只有 1.5%。药用植物三七、人参、三分三、雪莲、银杏、紫草、洋地黄、长春花、丹参、红豆杉等的培养已进行了系统研究, 并优化了培养条件。人参细胞培养物的化学成分和药理活性分析表明与种植人参无明显差异。

一些植物的细胞培养已达到商业化生产应用, 如在日本植物细胞培养反应器的规模已达 4 000~20 000 L, 美国 Phyto 公司已达到了 75 000 L 紫杉醇的生产规模。除大规模细胞培养之外, 毛状根和不定根组织培养也非常成功。培养的黄芪毛状根的效价与药用黄芪类似, 丹参毛状根的培养物含有 7 种丹参碱, 并且能分泌到培养基中。

转基因药用植物或器官和组织研究是近几年比较活跃的课题之一。中国医学科学院药用植物研究所用发根农杆菌和根癌农杆菌转化丹参, 诱导形成毛状根和冠瘿瘤, 进一步再分化形成转基因植株。与栽培的丹参相比, 发现毛状根再生的植株叶片皱缩、节间缩短、植株矮化、须根发达等; 而冠瘿组织再生的植株株形高大、根系发达、产量高, 丹参酮的含量高于对照, 这对丹参的有效成分生产具有重要意义。

中药材植物的基因工程遗传转化系统的建立为有效成分的生产开辟了新途径。已在甘草、丹参、黄芪、青蒿、红豆杉等多种植物药材中建立了农杆菌介导的遗传转化, 一些相关的关键基因已克隆。在红豆杉中的 20 余步紫杉醇生物合成过程中, 已有 8 个功能基因被克隆; 水蛭素 III、黄芪中糖苷转移酶基因等也被克隆。通过基因工程操作, 使这些基因过度表达, 就有望增加有效成分的含量。

## 2 高通量技术对中药作用的分子机制研究

中药是一个复杂体系, 化学组成复杂。因此, 虽然中药被国外看好, 但缺乏像西药那样明确的作用机制。中药的分子作用机制可能是一个多靶点、多途径、网络化的整体过程, 传统的单个功能的研究方法

难以完全解析其机制。采用现代科学技术的方法与手段,特别是应用高通量分析技术系统地阐明中药复方的作用机制是十分迫切和必要的,也是中药现代化的重要组成部分。如蛋白质组技术从细胞、分子水平研究中药控制细胞的路径、对信号转导途径的干预及效应的蛋白质图谱等,生物芯片,酵母双杂交系统,噬菌体展示技术都可用于研究中药如何调控机体内的基因和蛋白质的表达及其相互作用。中药作用的分子机制的阐明为中药被西方主流医学接受提供重要理论基础,为中药走向世界提供了技术平台支持。

2.1 蛋白质组技术研究中药作用机制的条件已经成熟:生命科学的研究已达到细胞和分子水平,药物作用机制的研究更是以其作用的靶点为目标。人类基因组计划的完成标志着人类已掌握自身的遗传信息,生命科学研究进入后基因组时代,大量的基因组信息的译码依赖于蛋白质组的研究,蛋白质的分离、鉴定和功能分析成为后基因组时代的一个重要目标。世界上许多大制药公司都投入巨资并与高校合作对目标蛋白质组进行研究,把蛋白质组技术作为药物开发的工具,暗示着蛋白质组技术将继续发展并最终成为许多科学研究实验室的核心技术<sup>[7]</sup>。

蛋白质数据库是进行蛋白质组研究的重要平台,目前已经建立了蛋白质数据库如2D-PAGE和蛋白质结构数据库如PDB, Swissprot, PIR, MIPS, TrEMBL等,这些数据库都可以通过Internet登录访问和获取。而且随着蛋白质组技术的日趋成熟与研究的深入进行,这些数据库的内容将更丰富。

2.2 蛋白质组技术:蛋白质组技术涉及多学科技术与知识的综合运用,如生物化学、分子生物学、生物信息学等,具体过程包括蛋白质样品的制备、二维凝胶电泳分离、染色、成像分析和蛋白质鉴定,其中蛋白质的分离和鉴定是核心和关键<sup>[8]</sup>。

2.2.1 蛋白质的高通量分离技术:二维凝胶电泳是分离上千个蛋白质的主要高通量方法,其原理是根据蛋白质的等电点的不同进行第一相等电聚焦电泳,然后根据相对分子质量大小进行第二相SDS-PAGE电泳分离。固定化pH梯度、银染以及样品制备技术的改进,提高了实验的重复性,不同实验室间的电泳数据结果可以相互交换和利用,检测底线水平大大提高(可检测到ng级),一些低丰度、疏水性蛋白质也能在二维凝胶上显现出来。现在的分辨率已达1 100个蛋白质斑点。二维凝胶电泳的样品可以来源于细胞或组织,甚至是亚细胞器,如线粒体

细胞膜系统等,将使研究结果更具有意义。

2.2.2 蛋白质的鉴定技术:二维凝胶电泳结果经过图像处理,可以得到蛋白质的表达图谱,初步确定其等电点和相对分子质量,与已有的二维凝胶电泳数据库和其他蛋白质数据库进行比较分析,确定蛋白质的性质,如种类、物理化学性质和生物学特性。但这些结果都需要进一步验证,即需要鉴定。对于已知蛋白质,可用Western杂交,进行免疫沉淀反应鉴定。一般情况下发现的差异蛋白质都是未知蛋白质,需要采用生物质谱技术测定蛋白质的肽质量指纹图谱和肽的氨基酸序列。进而克隆该基因,研究其功能。

质谱技术已是蛋白质组研究中大规模鉴定蛋白质及其修饰的主要技术,基本原理是蛋白质酶解后成为多肽,离子化多肽后,根据其质荷比的不同分离并确定其相对分子质量,比对数据库中理论相对分子质量,从而鉴定蛋白质。生物质谱技术发展很快,已代替了传统的蛋白质分析方法,如Edman降解法、氨基酸分析方法等。基质辅助激光解析电离飞行时间质谱(MALDI-TOF)和四级飞行质谱(MALDI-TOF)、电喷雾电离串连质谱(ESI-MS/MS)等已用于蛋白质的鉴定中。生物质谱分析也可用于研究蛋白质的翻译后修饰,如磷酸化和糖基化等。蛋白质修饰后相对分子质量比未修饰的大,磷酸化后部分相对分子质量高80,质谱分析时产生特殊的 $PO_3^-$ 裂解物,磷酸酶水解时也能产生磷酸基团等特性。

蛋白质的鉴定技术正在快速的发展,不断出现了一些新技术<sup>[9]</sup>。毛细管凝胶电泳后的蛋白质粗提物,进行Fourier变换离子回旋共振质谱分析,能批量得到蛋白质精确的相对分子质量。纳喷液相色谱串连质谱(LC-MS/MS)技术能对蛋白质混合体系进行联机分离和鉴定,灵敏度高、速度快。由此衍生了一些其他鉴定技术,如一维分离质谱鉴定、免疫沉淀质谱鉴定、蛋白质提取物直接液相色谱质谱鉴定等。

目前我们实验室已经完善并建立了二维聚丙烯酰胺凝胶电泳研究蛋白质组的技术系统,并对红豆杉细胞培养生产紫杉醇相关的蛋白质图谱和灰黄链霉菌产生新型抗生素相关的蛋白质图谱进行了研究,发现了一些功能蛋白质。下一步试图以名贵中药为对象,采用动物或细胞病理模型,在蛋白质组水平研究中药作用的细胞和分子机制(图1)。

### 3 中药新药研制的创新

利用蛋白质组技术研究与开发药物已成为世界性的热点,中药作用的细胞信号分子传导路径、中药作用前后基因和蛋白质表达图谱的改变,有可能发

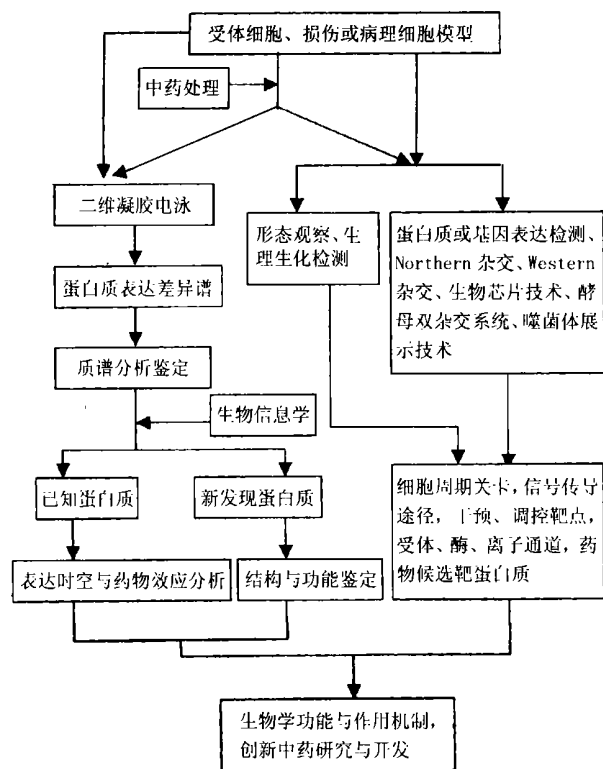


图1 分子生物技术研究中药作用机制与新药研发

Fig. 1 Study on mechanism of CMM and development of new drug in molecular biotechnology

现新基因和蛋白质,这不仅有利于从分子水平上研究其病理机制,而且有利于进行新药设计和作为生物标记的靶点,因为药物作用的主要靶点是蛋白质<sup>[10]</sup>。因此在中药新药的创新和二次开发中具有广阔的应用前景。

中药作用的分子图谱(包括基因图谱和蛋白质图谱)的建立可指导中药的二次开发。生物芯片技术包括蛋白质芯片、核酸芯片和蛋白质核酸芯片等,是分子水平药物筛选的有效工具。把疾病相关的基因或蛋白质如酶、受体、离子通道等高密度点布于载体上,制成检测芯片。人类基因组计划提供的基因和蛋白质数据库足以设计并制备此类芯片,用疾病相关的芯片在细胞或整体动物模型中去筛选中药的有效成分或部位,从而优化中药的配方和组成。特异基因或蛋白质的表达促进或抑制的变化,可能是中药作用的潜在分子靶点。

酵母双杂交系统和噬菌体展示技术是另外两种高通量研究基因和蛋白质表达及其相互作用的有效方法,与生物芯片一样,大量快速检测、发现并鉴定

功能基因及蛋白质,可以揭示中药复方的作用靶点和细胞周期的调控过程(图1),从而应用于中药新药的创新研究中。

#### 4 结语

生物技术在中药现代化中有广阔的应用前景,其中细胞培养工程技术已在中药材的保存与育种、有效成分的发酵、分子标记在药材的质量甄别中得到应用。在中药作用机制的研究上,已经采用生物化学、生理学和分子生物学技术,检测了中药作用的个别基因或蛋白质的变化,但缺乏高通量系统性研究。因此,极需大力加强这方面的研究。中药应该与生物技术密切结合,使生物技术成为中药研发的必备工具。可以预见,随着生物技术在中药现代化中广泛应用和深入研究,可望为现代中药研究提供良好的手段和方法。

#### References

- [1] Yuan Y J, Liu M Y, Dong A J. Key Technology for Production of Traditional Chinese Medicine (中药现代化生产关键技术) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002.
- [2] Hu Z B, Liu D. Status and role of biotechnology in TCM modernization in China [J]. World Sci Technol- Modern Tradit Chin Med (世界科学技术- 中药现代化), 1999, S1: 23-35.
- [3] Yu B Y, Yan Y Q. Analysis of relationship between methods of modern biology and modernization of traditional Chinese medicine [J]. World Sci Technol- Modern Tradit Chin Med (世界科学技术- 中药现代化), 2001, 3(4): 45-49.
- [4] Li H J, Li P. Sustainable development of herbal plant resources and industry of traditional Chinese medicine [J]. World Sci Technol- Modern Tradit Chin Med (世界科学技术- 中药现代化), 2001, 3(2): 55-57.
- [5] Chen H Z. Modernization of traditional Chinese medicine and herbal plant cultivation [J]. World Sci Technol- Modern Tradit Chin Med (世界科学技术- 中药现代化), 1999, S1: 28-29.
- [6] Zhou H. Application and perspective of modern biotechnology in discrimination of TCM [J]. Capital Med (首都医药), 2001, 8(3): 55-56.
- [7] Jain K L. Proteomics: delivering new routes to drug discovery- Part 1 [J]. Drug Discovery Today, 2001, 6: 772-832.
- [8] Ong S E, Pandey A. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics [J]. Biol Eng, 2001, 18: 195-205.
- [9] Cavalcanti J D. Genomic and proteomic databases, large-scale analysis and integration of data [J]. Trends Cardiovasc Med, 2001, 11: 76-81.
- [10] Page M J, Amess B, Rohlf C, et al. Proteomics: a major new technology for the drug discovery process [J]. Drug Discovery Today, 1999, 4: 55-62.