• 专论与综述 •

植物中药功能基因研究

魏小勇¹, 方花², 李杰芬¹

(1. 广东中医药大学基础医学院, 广东 广州 510405; 2. 广州中医药大学护理学院, 广东 广州 510405)

摘要: 中药功能基因研究主要是探寻中药活性成分相关功能基因及表达规律, 确定药用成分合成的调控机制, 获得中药药用成分关键代谢途径和其中的关键调控因子, 为中药现代化奠定基础。从模式植物(水稻、拟南芥等)、主要技术策略(基因表达差异、基因表达序列标签、基因芯片技术和基因表达序列分析)和生物信息学方法(比较基因组学等)等3方面对国内外植物功能基因研究作了介绍。还介绍了黄酮类化合物与紫杉醇生物合成基因及植物 P₄₅₀ 基因研究现状。并对本研究室石斛碱相关功能基因研究情况作了介绍。

关键词: 功能基因; 中药; 生物活性成分

中图分类号: R282.12; R284 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2005)08-1251-04

Studies on functional genes of Chinese materia medica

WEI Xiao-yong¹, FANG Hua², LI Jie-fen¹

(1. School of Basic Medical Science, Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China;

2. Nursing College of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

Key words: functional gene; Chinese materia medica; bioactive components

功能基因是后基因组时代植物中药基因组研究的最活跃、最核心的研究领域之一。它强调发展和应用整体(基因组水平或系统水平)实验方法分析基因组序列信息、阐明基因功能。其基本策略从过去的单一基因或蛋白质上升到从系统角度研究所有基因或蛋白质^[1]。在植物中药功能基因研究中, 与基因组 DNA 和 EST 研究相比, 最为活跃的研究领域是与活性成分形成关系最密切的生物合成相关基因克隆研究。由于临床上对天然药物的实际需求不断增加, 以及基因克隆与表达技术的不断发展, 药用植物功能基因的克隆近年来呈现快速增长的趋势^[2]。

1 植物中药功能基因组研究方法

功能基因是一个崭新的研究领域, 其研究方法较多, 归纳起来可分为正向遗传学(forward genetics, 从一个突变体的表型开始, 研究其“基因是什么”)和反向遗传学(reverse genetics, 从一个突变基因的序列开始, 研究引起什么样的表型改变)。主要包括 T-DNA 插入、转座子技术、基因表达分析技术、表达序列标签技术和生物芯片技术等。

1.1 利用突变体进行基因功能分析技术

1.1.1 转座子标签技术: 转座子是染色体 DNA 上的一段可自我复制和位移的 DNA 序列, 其转位插入作用, 使被插入的目的基因发生突变失去活性, 转座子的剔除又可以使目的基因恢复活性。因此, 利用转座子的转位插入作用可对被插入的目的基因进行基因功能的研究, 这就是转座子标签技术。目前, 已成为

植物中药基因功能鉴定、分离的有效方法。Aarts 等利用该技术从拟南芥中发现了一个雄性不育基因, Hicrochika 等在水稻中利用 Tos17 同源恢复转座子探测基因。Takken 等利用玉米的 Ac/Dc 转座子标签技术分离了大量番茄基因, 包括 Cf-9 和 Cf-4 位点上的控制不同种叶霉病抗性的基因; 编码细胞色素 P₄₅₀ 家族的 Dwarf 基因; 控制叶绿体发育的 DCL 基因; 参与代谢和发育的 FEEBLY 基因^[1]。

1.1.2 T-DNA 插入: 随着农杆菌介导的转基因技术的不断完善, T-DNA 方法已成为快速构建插入突变库的主要方法。T-DNA 的插入通过阻断正常基因的表达可引起植物基因敲除突变。通过对 T-DNA 两侧基因序列作特异扩增等方法可分离到野生型的基因。这种方法可在预先不知基因的产物和表达的情况下分离基因。其主要优点是基因组 T-DNA 的插入稳定、不具有位点特异性, 可构建饱和的 T-DNA 插入突变库。其具体研究策略为将 NPTII、GUS 等标记基因克隆到 T-DNA 区段上, 利用农杆菌等载体介导的 T-DNA 转染植物组织, 从转基因后代中寻找突变体、增强子和启动子, 从而分离、鉴定若干基因。王雪景等利用 T-DNA 插入获得了玉米雄性不育突变体^[1]。

1.2 DNA 序列直接分析法

1.2.1 基因表达系统分析技术(system analysis of genes express, SAGE): SAGE 是一种非常有效的快速分析基因技术, 它是转录子(cDNA)上特定区域 9~10 bp 的寡核苷酸

收稿日期: 2004-11-09

基金项目: 广东省中医药局资助项目(402003; 303005)

作者简介: 魏小勇, 男, 讲师, 主要从事组织学与胚胎学及中药生物工程研究。 Tel: (020)36585474 E-mail: wxyaby@163.com

序列作为标签来特异性代表该转录子,然后通过连接酶将多个标签(一般为20~60个)随机串联并克隆到载体上,建立SAGE文库,通过对双标签的序列分析,获得基因转录分布^[3]。其具体操作方法是:首先将mRNA反转录成cDNA;其次用锚定酶酶切,将所得cDNA分别与含锚定酶和标签酶酶切位点的接头A和接头B连接;然后用标签酶切产生的带有接头的cDNA片段连成双标签,进行PCR扩增;再用锚定酶酶切扩增产物,分离双标签并克隆;最后用SAGE软件分析,并与Genbank、ESTdatabase等数据库比较,获得转录物丰度的数据信息及新的表达基因。

1.2.2 表达序列标签测序技术(ESTs):ESTs是研究功能基因的最佳途径之一。EST标签技术即高通量的cDNA测序技术。药用植物中含有大量ESTs,其能提供准确的基因定位信息,当单个EST对应两个或更多外显子时,ESTs标签还能提供内含子的定位信息,结合软件分析技术,利用ESTs在具有较大基因组的物种中发现基因和研究基因功能。ESTs在基因定位,寻找同源基因等方面得到广泛应用^[4]。建立正常的cDNA文库,通过对数据库中来源不同植物和组织条件下ESTs比较,揭示不同药用植物在基因序列上的多态性。Bevan等研究表明,拟南芥基因组的56%基因均可有EST对应找出。利用EST和全序列与所有来自其他植物的EST资料进行比较,可帮助认识、了解植物中药的功能基因组。

1.2.3 利用同源序列分析基因功能:序列同源比较就是利用待检基因与相应的已知基因的同源性,来预测未知基因的功能,它是得到新基因后预测其基因功能的第一步。将待检的新基因序列到DNA和蛋白质序列数据库中进行同源检索后,得到一系列与新基因同源性较高的基因或片段,这些基因和片段的已知的功能信息为新基因功能提供了向导。易图永等^[5]比较观察已发现的20多个植物抗病基因所编码蛋白质的基因序列,结果发现这些抗病基因大多含有特殊核苷酸结合位点,富含亮氨酸的重复序列、亮氨酸拉链结构和跨膜结构等保守结构域,根据这些保守结构域结合PCR引物,扩增大量抗病基因同源序列(RGA),然后,利用这些RGA作探针,从基因文库中获取抗病功能基因。美国基因组研究协作组已集中了他们获得的拟南芥、水稻、松叶菊、大麦、鲜叶卷柏和盐藻等植物功能基因组研究进展,并提供了一个利用pipeonline数据分析的连接^[6]。

1.3 利用生物芯片进行基因功能研究:生物芯片是指通过微加工技术和微电子技术在固体表面上构建的微型生物化学分析系统,结合软件分析,可准确、快速分析大量生物信息。目前已经用于中药功能基因研究的生物芯片主要包括基因芯片和蛋白质芯片。

1.3.1 基因芯片:基因芯片是按特定的排列方式将大量基因探针/基因片段固定在硅片、玻片、塑料片上,与标记的样品进行杂交,通过检测每个探针分子的杂交信号而获取样品的序列信息。根据制备方法不同可分为:DNA芯片、微点阵和电子芯片。

基因芯片技术主要应用于基因表达谱分析、新基因发

现、基因突变、多态性分析及监测基因组整体转录表达情况。Notoaki等^[7,8]利用cDNA芯片已对松叶菊、水稻等植物的基因表达谱进行了研究,获得了大量基因表达信息;对功能缺陷的突变体进行分析,获得了代谢和信号机制与抗性密切相关的决定因子。Schena等将45个拟南芥cDNA和3个对照cDNA,构建cDNA微阵列,在根和叶中检测到26个基因表达的差异。Philippe等^[9]利用拟南芥150个ESTs序列的cDNA芯片发现了一个受虫咬诱导的新基因。Haroni等^[10]分离1701个cDNA片段构建芯片,研究果实不同成熟期果色与成熟度的关系,发现401个基因在绿、白和红色果实中表达差异显著,其中之一是草莓乙酰基转移酶基因,在草莓成熟的特殊物质的合成中起重要作用。Lu等^[11]结合cDNA和抑制性扣除杂交技术分离并鉴定了一个与稻瘟病亲和与非亲和性反应有关的新基因。方志俊等^[12~14]用人白细胞cDNA文库构建了含2400个基因的DNA芯片,对阿霍烯处理的人早幼粒白血病细胞株HL-60细胞基因表达的改变进行了观察,显示阿霍烯的作用与其对胃肠道及白血病等抗癌作用有关。

1.3.2 蛋白质芯片:蛋白质芯片是将多肽或从cDNA表达文库中提取的蛋白质点样固定在固相介质表面上制备而成。将其与多种抗原样本杂交,使芯片上的抗体捕获相应的抗原,然后再与标记的多种抗体杂交,根据杂交信号的有无、多少进行定性、定量分析。从而研究蛋白质结构与功能的关系,并提供快速而有意义的带有充足家族分类检索结果的数据库检索系统。

2000年11月耶鲁大学的研究小组首次报道了利用蛋白质芯片克隆功能基因。他们表达和纯化了酵母的5800种蛋白质,并将这些蛋白质点样固定在载玻片上,制作了酵母蛋白质组微阵列芯片,筛选能与特定蛋白质和磷脂相互作用的蛋白质,发现了新的能与钙调蛋白和磷脂相互作用的蛋白质。这种蛋白质微阵列芯片可以用于筛选与蛋白质相互作用的药物,还可以用于检测蛋白质翻译后的修饰。他们的研究成果证实了制作和使用蛋白质组微阵列芯片进行功能分析检测的可行性,并向人们预示了蛋白质微阵列芯片在药物开发领域的广阔应用前景。

1.4 利用蛋白质组技术进行基因功能的研究

1.4.1 蛋白质组研究技术:蛋白质组是指1个基因组、1种生物或1种细胞/组织所表达的全套蛋白质。蛋白质组研究是将组织或细胞所有蛋白质进行分离并鉴定。用于蛋白质分离的技术主要有双向凝胶电泳和双向高效柱色谱。用于蛋白质鉴定的技术有Edman降解法测N端序列、质谱分析技术、氨基酸组成分析和肽质谱指纹图技术。其中质谱分析技术应用最广、发展最快。

1.4.2 药用植物蛋白质组研究:目前随着蛋白质组研究技术的不断发展,利用蛋白质双向电泳技术对基因敲除突变体或转基因重组体与野生型个体间双向电泳蛋白图谱差异进行对比分析,从而对目的基因功能进行研究。1998年Damer-Val分析玉米Opaque2基因等位基因系之间的双向电泳蛋

白图谱的差异,分离、克隆了1个新的转录激活因子基因。利用双向电泳凝胶技术鉴定拟南芥发育突变体,发现1个突变体中细胞分裂素过量表达。

2 植物中药功能基因克隆情况

截止2003年9月底,国内外已在32属42种药用植物中共注册功能基因序列255条^[15]。其中长春花(46)、甘草(28)、青蒿(28)及薄荷(17)是注册基因数最多的植物中药,红豆杉、紫草、藏红花等12种植物分别注册基因4~15条,天麻、银杏、雪莲、毛地黄、葛根等16属16种植物注册的基因数分别在4条以下,其他16属26种植物共注册基因233条。从国别而言,植物中药基因研究较多国家主要是日本、美国、德国和中国。我国注册的植物中药基因共有27种,主要是青蒿素合成相关基因,其次是紫杉醇合成相关基因和黄芪中多糖合成相关基因等。德国科学家克隆对象主要是包括长春花和萝藦木中的主要合成酶基因与吡啶生物碱合成有关的基因。日本科学家克隆基因的主要对象是黄连、杜仲、甘草、紫草、黄芩、人参以及莨菪烷生物碱生成植物天仙子等。美国科学家主要克隆红豆杉、薄荷与黄芪的有关功能基因,最有特色的工作为华盛顿州立大学 Croteau 实验室,他们在萜类化合物特别是紫杉醇生物合成相关基因克隆工作中卓有成效,走在世界的前沿。

2.1 黄酮类化合物合成相关基因及植物 P₄₅₀ 细胞色素氧化酶基因克隆:黄酮类化合物有多种药理活性,又与花色有密切关系,因此黄酮类化合物的生物合成途径研究开始较早,并取得了很大进展,对黄酮类化合物生物合成步骤、催化各步反应的酶及其基因都有研究,对包括拟南芥、金鱼草、松、桃、矮牵牛及葡萄在内的26种植物的黄酮类化合物合成基因的统计表明,至少已有103个黄酮类化合物合成相关基因被克隆,主要克隆的基因有:查耳酮合酶、催化黄酮母核羟基化的酶类及与糖苷转变有关的酶类等^[15]。

另一类研究得较多的基因是植物细胞色素 P₄₅₀ 基因,这是一类具有多种催化功能、含血红素蛋白的氧化酶系,植物 P₄₅₀ 在植物体内具有重要的功能,可以催化许多初级和次级代谢反应。由于在次生代谢及植物抗逆性(抗除草剂)中的重要作用及在生物除污方面的可能应用,这一类酶的研究特别受到关注。目前,600多个 P₄₅₀ 基因被克隆,其中100多个基因在细菌、酵母、杆状病毒等异源表达系统中成功表达并鉴定了功能^[16,17]。除模式植物拟南芥外,长春花中的 P₄₅₀ 酶类研究得较多。

2.2 紫杉醇生物合成基因的克隆:紫杉醇生物合成途径基因的克隆是植物中药功能基因克隆最典型的实例,代表了天然产物化学后基因组时代研究和应用的趋势^[15]。美国华盛顿州立大学 Croteau 实验室克隆表达了11个与抗癌药物紫杉醇生物合成相关的基因。他们应用同源引物 PCR 方法、红豆杉细胞培养结合差异显示及反向遗传的方法,从不同种的红豆杉中克隆了11个紫杉醇合成相关基因。包括紫杉醇母核形成基因、催化母核氧取代的3个羟基化酶基因和5个与侧链形成有关的酰基转移酶基因。这些基因均在大肠杆菌、

酵母或昆虫表达系统中得到表达并鉴定了表达产物的功能。在此基础上确定了从二萜类化合物共同前体合成紫杉醇至少有20个步骤,对有8个氧取代基团的紫杉醇生物合成途径进行了阐述,用不同的底物确定了重组酶的特异性及各取代基团在生物合成途径中的顺序^[18~23]。

3 结语

“中药基因组计划”是将分子生物学、生物信息学等现代生物技术与其他现代科学技术相结合研究开发中药,美国相继提出“人类基因组计划”(HGP)、“植物基因组计划”(PGP)、“微生物基因组计划”(MGP),都取得了突破性进展。我国提出和实施“中药基因组计划”是中药现代化研究与开发政策的重大战略措施,其中功能基因的研究是“中药基因组计划”中最重要的研究内容之一。通过功能基因组和蛋白质组的研究,建立和完善我国药用植物重要功能基因组的研究与重要功能基因发现的技术体系,体现我国中草药的深刻内涵,获得具有我国自主知识产权、功能明确和有应用前景的重要基因;在了解中药遗传信息表达和调控规律的基础上,对有效成分的关键基因进行调控,促进其表达,从而提高目前产物的含量;同时通过控制遗传信息来分析和合成中药有效成分,阐明中药或复方的作用机制,为中药现代化并走向国际市场奠定基础。并带动相关制药产业的发展,为人类健康事业发展作出贡献。

在植物中药功能基因研究中,与基因组测序和 ESTs 测序相比,药物活性成分生物合成相关基因的研究更受到重视,克隆基因的数量呈上升趋势,预示了天然产物后基因组时代的开启及一些天然产物生产方式的可能变革。人们对生物技术方法寄予的厚望可能通过基因工程与化学的有机结合而形成的新工艺得到实现。

在对铁皮石斛多年研究的基础上,本研究室着手对石斛药用相关基因进行研究。利用化学诱变剂 EMS (ethyl methane sulfonic acid) 定向诱发组培石斛原球茎突变,获得了稳定的石斛碱缺失的突变体,通过差异显示、反义 RNA 技术和转基因技术来克隆并鉴定石斛碱合成相关功能基因。现已完成部分工作:从铁皮石斛突变体及正常材料中分别提取总 mRNA,以选定的 3' 端锚定引物作逆转录合成第一链 cDNA、用 5' 端随机引物和 3' 端锚定引物组成引物对在底物标记情况下进行 PCR 扩增,已建立了差减 cDNA 文库,目前正在进行测序并着手进行生物信息学分析。

References:

- [1] Wang J X, Sun Y, Xu L. Research progress in functional plant genomics [J]. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2004, 20(1): 18-22.
- [2] Andy P, Brandle S, Kehr J, et al. Amino acid analysis in five pooled single plant cell samples using capillary electrophoresis coupled to laser induced fluorescence detection [J]. *Transgen Res*, 2000, 9: 245-260.
- [3] Xiong Y H, Xu Y. Technological advances of serial analysis of gene express [J]. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 2001, 18(3): 377-380.
- [4] Perteau M, Antonescu C, Salzberg S, et al. Economy and unveil: three abinitio eukaryotic genefinder [J]. *Plant Mole Biol*, 2002, 48: 39-48.
- [5] Yi T Y. Application of plant resistance gene analogs in

cloning and mapping resistance genes [J]. *Biotechnol Bull* (生物技术通报), 2002, 18(2): 16-20.

[6] Ayoubi P, Jin X, Leite S, et al. Pipeonline 2.0: automated EST processing and functional data sorting [J]. *Nuicck Acid Res*, 2002, 30: 4761-4769.

[7] Ski M, Narusaka M, Abe H, et al. Monitoring the expression pattern of 1300 arabidopsis genes under drought and cold stresses by using a full-length cDNA microarray [J]. *Plant Cell*, 2001, 13: 61-72.

[8] Ozturk Z, Talam V, Deyholos M, et al. Monitoring large-scale changes in transcript abundance in drought- and salt-stressed barley [J]. *Plant Mol Biol*, 2002; 48: 551-573.

[9] Philippe R, Hans W, Martine D, et al. Metabolomics and characteristics controlled by both genomics and environmental constraints [J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 707-719.

[10] Haroni A, Keizer L C P, Harrigan G, et al. Metabolic profiling: pathways in drug discovery [J]. *Plant Cell*, 2000, 12: 647-661.

[11] Lu G, Jantasuriyarat C, Zhou B, et al. An integrated approach to medicago functional genomics [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 11: 207-212.

[12] Wang J, Huang M H, Tsang L C, et al. Gene expression profiling in multidrug resistant KB cells using cDNA microarrays [J]. *Chin J Cancer Res*, 2002, 14: 11-17.

[13] Dirsch V M, Vollmar A M. Ajoene, a natural product with non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-like properties [J]. *Biochem Pharmacol*, 2001, 61(5): 587-589.

[14] Fong C C, Wang M S, Huang M, et al. Gene expression profiling of human promyelocytic leukemia HL-60 cell treated by ajoene [J]. *Chin J Cancer Res*, 2002, 14: 5-10.

[15] Zhu P, Wang W, Cheng K D. Progress in the functional gene research of medicinal plants [J]. *China Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2004, 24(2): 3-8.

[16] Tu J, Zhu P, Cheng K D. Heterologous expression systems of plant cytochrome P450 [J]. *China Biotechnol* (中国生物工程杂志), 2003, 23(7): 32-37.

[17] Schoendorf A, Rithner C D, Williams R M, et al. Molecular cloning of a cytochrome P450 taxane 10 beta-hydroxylase cDNA from *Taxus* and functional expression in yeast [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(4): 1501-1506.

[18] Jennewin S, Rithner C D, Williams R M, et al. Taxoid metabolism: Taxoid 14beta-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2003, 413(2): 262-270.

[19] Walker k, Scheondorf A, Croteau R. Molecular cloning of a tasa-4 (20), 11 (12)-dien-5alphaol-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli* [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2000, 374(2): 371-380.

[20] Walker K, Croteau R. Molecular cloning of a 10-deacetyl-baccatin III-10-O-acetyl transferase cDNA from *Taxus* and functional expression in *Escherichia coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(2): 583-587.

[21] Walker K, Croteau R. Taxol biosynthesis: molecular cloning of a benzoyl-CoA; taxane 2alpha-O-benzoyltransferase cDNA from *taxus* and functional expression in *Escherichia coli* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(25): 13591-13596.

[22] Jennewin S, Rithner C D, Williams R M, et al. Taxol biosynthesis; taxane 13 alpha-hydroxylase is a cytochrome P450-dependent monooxygenase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(24): 13595-13600.

[23] Walker K, Long R, Croteau R. The final acylation step in taxol biosynthesis: cloning of the taxoid C12-side-chain N-benzoyl transferase from *Taxus* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(14): 9166-9171.

中药复方经皮给药制剂研究概述

李 静¹, 王冬梅^{1*}, 徐月红², 唐 志¹

(1. 中山大学药学院天然药物与中药研究所, 广东 广州 510080;

2. 中山大学药学院药剂学实验室, 广东 广州 510080)

摘 要: 随着近年来经皮给药制剂的迅猛发展, 有着悠久历史的中药复方经皮给药制剂也受到越来越多的关注。主要从体外经皮渗透研究、在体经皮吸收研究、经皮吸收促进剂研究等 3 个方面对近年来中药复方经皮给药制剂的研究进行概述, 并就存在的问题进行了初步探讨和展望。指出中药复方经皮给药制剂在突出自己特色的基础上, 与现代科技相结合, 必定会为中药复方经皮给药制剂的发展带来曙光。

关键词: 中药复方; 经皮给药制剂; 体内外经皮渗透; 经皮吸收促进剂

中图分类号: R283.69

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)08-1254-04

Survey on transdermal drug delivery preparation of Chinese materia medica compound prescription

LI Jing¹, WANG Dong-mei¹, XU Yue-hong², TANG Zhi¹

(1. Institute of Natural Product and Traditional Chinese Medicine, School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen

University, Guangzhou 510080, China; 2. Laboratory of Pharmaceutics, School of Pharmaceutical

Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Key words: Chinese materia medica compound prescription; transdermal drug delivery preparation; skin permeation *in vitro* and *in vivo*; penetration enhancer

收稿日期: 2005-01-11

基金项目: 国家中医药管理局中医药留学回国人员科技活动择优资助项目(2003LHR20)

作者简介: 李 静(1980-), 男, 湖南宁远县人, 在读硕士, 药物分析专业, 主要从事中药分析和药剂学研究。

* 通讯作者 王冬梅 Tel: (020)87333159 E-mail: lsswdm@zsu.edu.cn