

评 述

分子生药学: 一门新兴的边缘学科

黄璐琦^{①*}, 肖培根^②, 郭兰萍^①, 高文远^③

① 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700;

② 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100094;

③ 天津大学药物科学与技术学院, 天津 300072

* 联系人, E-mail: huangluqi@263.net

收稿日期: 2009-09-22; 接受日期: 2009-10-27

国家重点基础研究发展计划(批准号: 2006CB504701)、国家中医药管理局行业专项(批准号: 200707014)、国家十一五科技支撑计划(批准号: 2006BAI09B03)资助项目

摘要 分子生药学为生药学与分子生物学有机融合形成的新兴边缘学科. 本文分析了分子生药学产生的背景、意义, 介绍了分子生药学的研究内容, 包括: 生药分子鉴定、药用动植物的系统进化、药用动植物种质资源的评估及保存、药用动植物濒危机制及保护、药用植物活性成分的生物合成及调控、药用动植物的道地性及分子机理. 认为分子生药学具有以下学科特色: (1) 研究领域广泛, 学科综合性很强; (2) 次生代谢产物积累的研究贯穿分子生药学; (3) 研究对象丰富多样, 模式植物构建困难较大. 简要介绍了分子生药学的常用技术方法, 主要包括: DNA 分析技术(分子杂交、分子标记技术、基因芯片、基因工程技术)、蛋白质分析技术、生物转化技术. 指出分子生药学学科的发展呈现以下趋势: (1) 学科理论体系进一步完善; (2) 应用实践进一步加强; (3) 生药资源永续利用的需求及技术发展导致特色领域成为热点, 主要表现为分子鉴定稳步发展, biocoding 成为分子鉴定的重要方向; 次生代谢产物相关的功能基因组研究异军突起; 基因组学、蛋白组学、代谢组学研究结果的整合和分析成为新热点; 核心种质构建形成新思路和新方法.

关键词分子生药学
生药学
边缘学科

分子生药学(Molecular Pharmacognosy)是在分子水平上研究生药的分类与鉴定、栽培与保护及有效成分生产的一门科学, 是生药学(Pharmacognosy)的一个极富前瞻性的分支^[1]. 1995 年, 黄璐琦等人^[2]在《展望分子生物技术生药学中的应用》一文中提出“分子生药学”这一概念. 2000 年 6 月, 北京医科大学出版社出版了《分子生药学》一书^[3], 该书于 2006 年发行了第二版^[4]. 同年, 《分子生药学》进入本科生教材系列^[5]. 迄今为止, 全国已有不少中医院校或医学院校开设分子生药学课程. 本文着重介绍了分子生药学产生的背景和意义、学科定位、10 余年来取得的

进展及其未来的发展方向.

1 分子生药学产生的背景

1.1 生药及生药学的概念

生药是指来源于植物、动物和矿物的新鲜品或经过简单的加工, 直接用于医疗保健或作为医药用原料的天然药材^[6]. 药用植物和动物是生药学的主体, 占生药总量的 99% 以上. “生药”一词兼有生货原药之意^[6], 最早出现于明代太医院中规定“凡天下解纳药材, 俱贮本院生药库”, “凡太医院所用药饵, 均由……各地解来生药制造”^[6]. 生药学(Pharmakognosie,

Pharmacognosy)是应用本草学、植物学、动物学、化学(包括植物化学、药物分析化学、生物化学等)、药理学、中医学、临床医学和分子生物学(Molecular Biology)等学科的理论 and 知识,运用现代科学技术来研究生药的基源、鉴定、有效成分、生产、采制、品质评价及资源可持续性开发利用等的一门学科^[7]。这一词首见于1880年日本学者大井玄洞的译著《生药学》^[7]。通观生药学的研究内容,我国古代生药的研究内容主要包含在本草学中^[3]。现阶段,生药学与中药资源学和中药鉴定学学科的内涵和外延存在一定的交叉。

1.2 生药学研究和发展的成就

几十年来,生药学研究与实践在资源调查与整理、常用中药材品种整理与质量研究、资源的扩大与保护、资源的开发利用等方面取得了巨大的成就。通过3次全国范围的中药资源普查,已基本摸清了我国中药资源种类、分布、生态环境、蕴藏量、历史、生产利用情况以及传统使用经验等基本情况;对220种常用中药材开展了以品种整理为重点的系统研究;对71种常用中药材进行质量标准规范化研究;对400余种中药材进行了较深入的化学成分研究,填补了一大批中草药化学成分空白;筛选出800余种生物活性成分。从亲缘相近的同种属植物中成功地在我国找到国产安息香(*Styrax macrothyrsus*, *S. subniveus*, *S. hypoglauca*)等进口药的国产资源。牛黄、麝香、虎骨、犀牛角、冬虫夏草等名贵中药人工制品或代用品研究均获成功。探索了药用部位的综合利用,如钩藤(*Oncaria rhynchophylla*)的药用部位由钩扩大到茎^[8]。中药人工繁殖及种植养殖迅速发展,国家从1999年开始推行中药材规范化种植,这些均大大缓解了野生资源的压力。这些年来,整理出版了一些具有代表性的大型著作,如《全国中草药汇编》、《中药大辞典》、《新华本草纲要》、《中国中药资源》、《中国中药区划》等著作^[9]。

1.3 生药学面临的问题和局限

作为一门不断成长分化的学科,生药学有其自身在研究领域、技术方法等方面的局限。比如,作为品种整理、资源调查、保护、开发利用的基础,生药

鉴定是生药学的核心内容。生药材鉴定技术最初只是依据药材的外部形态特征、色泽、断面、质地、气味等进行药材真伪鉴别,其后逐步发展为对药材内部的细胞组织形态特征进行光学显微鉴别,对超微结构的扫描电子显微镜,以及对依据药材的理化性质开展的理化鉴别等,特别是各种光谱分析技术的应用,使生药学鉴定发展到一个新的高峰^[10]。但至今为止,生药鉴定仍存在很多无法解决的难题。例如,动物类药材由于药效成分不明确,特征不够鲜明而无法实现有效鉴别;又如,由于缺少有效的快速鉴别的技术,一些珍贵稀有的药材市场伪品严重。特别值得一提的是,多来源药材(一种中药来源于多种原植物)一直是影响中药材质量稳定性和均一性的关键问题之一。如黄芪原植物为豆科蒙古黄芪(*Astragalus Membranaceus* Fisch. Bge. Var. *Mongholicus* Bge. Hsiao)或膜荚黄芪(*A. membranaceus* Fisch. Bge);甘草原植物为豆科甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.),胀果甘草(*G. inflata* Bat.)或光果甘草(*G. glabra* L.)等^[11]。从生物学上来讲,每个物种都有其独特的遗传特性和表型特征,以及特定的对环境的适应方式,因此,将不同来源的药材视为一种中药显然是不合理的。为此,2005版《中华人民共和国药典》试图将多来源物种,按其来源不同拆分或合并,最终形成生物学上的物种与中药的种一一对应的关系。但由于很多多来源药材在进化中的分类地位存在争议,其系统关系不确定,基于遗传上的证据不足而无法确定其药材来源,导致无法对该多来源药材进行合并或拆分,这一计划并未很好实现,目前多来源问题仍是未来《中国药典》亟需解决的问题。例如,茅苍术(*Atractylodes lancea* Thunb. DC)和北苍术(*A. chinensis* DC. Koidz.)、多个来源的山银花,包括灰毡毛忍冬(*Lonicera macranthoides* Hand.-Mazz.)、红腺忍冬(*L. hypoglauca* Miq.)、华南忍冬(*L. confusa* DC.)等。可见,学科的发展对生药学提出了理论、方法及技术更新的要求。

1.4 分子水平的研究成为生药学发展的必然要求

20世纪末期,科学技术尤其是现代生物学及相关学科的飞速发展,极大地促进了生药学的发展,其他学科及相关知识的渗入使得生药学的研究内容不断扩大,技术方法不断更新,生药学科的内涵和外延

也不断延伸, 并产生了许多新的热点和难点问题. 例如, 如何认识生药的质量变异? 其物质基础是什么? 生药优质药材(特别是道地药材)是如何形成的, 其形成的分子遗传与环境机理是什么^[12]? 生药药效成分积累的生物学机理是什么? 受什么因素影响? 如何提高药效成分的含量? 生药的种质资源具有怎样的特性, 其与作物种质资源的研究有无不同等. 这一个时期, 人们开始意识到种质资源评价、珍稀濒危机制研究、次生代谢产物的调控等不少科学问题, 已不仅是在有机体、组织、器官甚至细胞水平就可以揭示和解决, 生药学的发展迫切要求在基因、蛋白质、酶等生物分子水平来阐释生药学的诸多生物学问题. 生药来源于生物, 但人们对其许多生物学的现象、规律及机理的研究和掌握却明显不足, 而这些现象和规律的分子机理研究更是鲜有报道. 可见, 生产实践的需求, 理所当然地将生药学的研究推进到分子水平.

1.5 分子生药学是生药学与分子生物学学科交叉的必然产物

自从 1953 年 Watson 和 Crick 对 DNA 结构的发现后, 分子生物学迅速成为 20 世纪里发展最快, 对人类影响最大的学科之一. 分子生物学的飞速发展, 极大地改变了人类对世界的认知, 提高了人类改造自身和其他生物的能力, 使与生物学有关的所有领域的分支学科, 都发展到了分子水平^[13]. 作为现代生命科学的“共同语言”, 分子生物学的研究与发展一方面不断深化和提升本学科的理论和技术, 使表现型和基因型的关系得到客观准确的阐释; 另一方面不断地与其他学科进行广泛而深入的横向联系和交叉融合, 以此开拓新的前沿领域和新的增长点, 使得一大批交叉科学、边缘学科和前沿学科应运而生, 例如分子遗传学、植物分子遗传学、分子系统学、分子生态学、蛋白组学、基因组学、代谢组学、微生物分子生态学、生物信息学等. 分子生物学在生物医学各个领域渗透应用并飞速发展, 由此产生了分子药理学、分子肿瘤学、分子病毒学、分子细胞生物学、分子生药学等相关学科. 其中, 作为分子生物学与生药学学科交叉的产物, 分子生药学的形成和发展受到分子遗传学、分子系统学、分子生态学、保护生物学、药用植物育

种学等诸多学科的启发, 主要在核酸、蛋白等分子水平研究生药学的相关问题. 分子生药学的产生, 是生药学向微观深入研究发展的必然趋势之一.

2 分子生药学与生药学的关系及其产生的意义

2.1 分子生药学与生药学的关系

分子生药学不仅继承了传统生药学的内容和使命, 更将赋予生药学新的任务和挑战. 谢宗万分析了分子生药学和传统生药学、现代生药学的关系问题, 认为“它们永远是一种互补关系, 而不是什么替代关系, 因为它们使用的手段有所不同, 解决的关键问题和取得的效果也不尽相同”, 并进一步指出“在今后, 要解决生药领域里的复杂疑难问题, 看来是缺一不可, 把这些手段统统加在一起联用或从中选择几种手段配合使用, 才是更全面和更有效的办法”^[10]. 本文就生药学与分子生药学进行了系统的比较分析, 足以看出分子生药学与生药学可以相互促进, 但决不可能相互替代(表 1).

2.2 分子生药学产生的意义

生药学的主要任务为: 在个体和种群等较宏观水平开展生药真伪优劣的鉴别和质量评价, 为生药资源生产及可持续利用提供依据. 相关研究涉及细胞(cell)、组织(tissue)、器官(organ)、有机体(organism)、种群(population)等层次, 并在这些层次上形成了比较成熟和独立的理论和方法, 如生药组织学、生药形态学等. 分子生药学的主要任务为: 在分子水平研究生药的遗传背景、开展生药的分子鉴别, 揭示次生代谢产物积累的分子机理、探索次生代谢产物的分子调控及生物合成, 为生药的优质生产和保护提供依据. 分子生药学的产生, 一方面将生药的研究层次向微观推进到基因(genes)水平, 极大地丰富了以往对生药生命现象的认识; 另一方面, 由于不同基因或 DNA 片段的进化速度不同, 其在进化中的特殊地位不同, 所反映的遗传变异的尺度和水平也不同, 这一点强化了人们对生药细胞、组织、器官、有机体、种群等层次的重新认识和思考. 人们意识到生药作为一个生命体在不同研究水平所观察到的现象及规律的意义和局限, 并试图通过对这些层次的全面分析

表 1 生药学与分子生药学的区别及联系

	生药学	分子生药学
概念	生药学是研究生药的基源、鉴定、有效成分、生产、采制、品质评价及资源可持续性开发利用等的一门科学 ^[14] .	分子生药学是在分子水平上研究生药的分类与鉴定、栽培与保护及有效成分生产的一门科学, 是生药学的一个极富前瞻性和前景性的分支 ^[15] .
学科定位	面向应用, 主要在个体和种群等较宏观水平开展生药真伪优劣的鉴别和质量评价, 为生药资源生产及可持续利用提供依据.	面向机理和应用, 主要在分子水平研究生药的遗传背景、开展生药的分子鉴别、揭示次生代谢产物积累的分子机理、探索次生代谢产物的分子调控及生物合成, 为生药的优质生产和保护提供依据.
核心研究内容	识别鉴定生药基源 调查考证生药资源 制定生药的质量标准, 并对其进行品质评价 为中药材规范化生产服务 资源开发 ^[14,16]	药用动植物的系统进化 药用动植物种质资源评价及保存 药用动植物濒危机制及保护 药用植物活性成分的生物合成及调控 药用动植物的道地性及分子机理 生药分子鉴定 ^[17]
主要研究方法	基源鉴定、性状鉴定、显微鉴定、理化鉴定、化学成分分析等	DNA 分析技术(分子杂交、分子标记技术、基因芯片、基因工程技术)、蛋白质分析技术(酶技术)、生物转化技术, 以及生药学的常规分析方法(包括基源鉴定、显微鉴定、理化鉴定、化学成分分析)等.
密切相关学科	本草学、中药资源学、中药鉴定学、中药化学、分析化学等	生药学、分子生物学、分子遗传学、分子生态学、植物生理学、生物学、遗传学

和整合, 得到一个生药的全貌. 这样的努力提升了生药学研究的深度和广度, 使生药学更多地摆脱唯象学, 成为一门系统的现代科学. 可以说, 研究层次的改变导致了独特的视角, 由此产生了独特的科学问题和解决思路、方法和理论, 并最终导致了分子生药学学科的出现. 我国生药学界前辈谢宗万先生认为 2000 年《分子生药学》“第一次正式出版, 其意义十分重大, 且涉及到分子生药学这个分支学科创立的大问题”^[10].

3 分子生药学的研究内容、学科特色及技术方法

3.1 研究内容

(1) 生药分子鉴定. 生药分子鉴定是分子生药学科的首要任务. 作为可检测的遗传标记, DNA 标记具备准确性高、重现性好等特点, 相对于传统鉴定方法(包括基原鉴定、性状鉴定、显微鉴定和理化鉴定), 分子鉴定具有不受环境因素影响, 也不受药材加工炮制后外观性状改变影响的优势. 比在形态、组织和化学水平上的检测更能代表生药的变异类型. 生药的分子鉴定最常用的技术有基于 PCR 与电泳技术相结合的 RAPD, SSR, AR-PCR, MARMS, APAPD 和 PCR-RFLP 等技术^[18]; 基于 DNA 测序的 SNP 技术和 DNA 条形码技术. 近年来, 从国家科技期刊数据库中

检索到生药分子鉴定的文献有百余篇, 涉及到天花粉、人参、当归、大黄、柴胡等诸多生药^[19,20].

(2) 药用动植物的系统进化. 药用动植物系统关系的确定, 不但是其分类鉴别的基础, 也是拓展近缘种, 寻找替代品及开发新药源的基础. 与传统的表型特征相比较, 分子生物学方法受到环境的影响较少, 因而更能反映出生物体在演变进化过程中的本质, 其研究结果也更可靠. 因此, 利用 DNA 分子遗传标记、基因组序列分析、蛋白质分析及染色体计数等技术, 从居群、个体乃至基因水平上, 准确刻画药用动植物遗传背景差异和亲缘关系, 进而构建基于叶绿体基因组基因和核基因组基因序列分析的重要药用动植物系统发育树, 确定药用动植物系统关系及其在进化中的地位是分子生药学基础研究的重心. 目前常用于分子系统学研究的主要基因种类有: rbcL, matK, rps4, 18s rRNA, ITS 等, 其中前三者为叶绿体基因组基因, 后二者为核基因组基因. 相关研究已有不少报道, 如白芷^[21]、瓜蒌^[22]、党参^[23]、苍术^[24]、芍药^[25]、厚朴^[26]、蛇^[27]等.

(3) 药用动植物种质资源评价及保存. 种质资源(germplasm resources)也称遗传资源(genetic resources), 是指选育新品种的基础材料, 包括各种植物的栽培种、野生种的繁殖材料以及利用上述繁殖材料人工创造的各种植物的遗传材料^[28]. 药用植物种

质是影响中药质量和产量的重要因素,更是生药品种选育及资源可持续利用的物质基础.种质资源的收集、整理、保存及评价是药用动植物种质资源研究的主要内容.早些年,人们在品种选育的时候,就注意到红豆杉、人参、枸杞、地黄等很多中药种质资源在表型上的多样性.近年来,人们利用分子技术对石斛^[29]、厚朴^[30]、菊花^[31]、芍药^[32]、黄芩^[33]、白芷、苍术等种质资源的多样性、遗传结构、种质纯度、表型与遗传的相关性等进行了研究,为药用动植物种质资源的保护提供了丰富的遗传学资料.

(4) 药用动植物濒危机制及保护.遗传多样性对种群是否能适应环境变化、是否能长期存活都是非常重要的,如果没有遗传多样性,就没有能力应付变化的环境、进化的竞争.导致药用动植物濒危的内外因很多,其中,药用动植物种群遗传多样性低导致对环境的适合度降低是物种濒危的重要内在原因之一.因此,保护濒危物种的遗传多样性是濒危物种保护的基本目标.以DNA多态性分析为基础的分子标记和以基因组序列分析为基础的分子系统学,能直接测定DNA变异式样和确定保护的重点单元,并因种内群体的分衍和发展在本质上与物种的系统进化有相似的过程,可根据药用动植物的分子系统研究推测群体的发展状态和濒危程度,从而为生物多样性的测度与珍稀药用动植物资源保护对策的制定提供新的具有强操作性的手段.例如濒危药用植物荒漠肉苁蓉^[34]、杜仲、三七等.特别是目前用分子谱系地理学(molecular phylogeography)研究居群遗传变异方面取得的突破,为生药居群遗传变异研究提供了新的理论和研究方法^[35,36].

(5) 药用植物活性成分的生物合成及调控.生药有效成分绝大多数来源于次生代谢产物,次生代谢产物的有无和多少决定着生药的品质,因此,研究药用植物次生代谢产物的形成机理,开展次生代谢产物的调控和生物合成,或进行次生代谢产物的基因工程,以此提高生药有效成分的含量,是分子生药学研究的新热点.例如,利用微生物转化体系对延胡索中镇痛成分延胡索乙素进行转化,得到了2个活性明显高于延胡索乙素的转化产物;利用转基因何首乌毛状根培养体系和转基因西洋参冠瘿组织培养体系转化外源性化合物香豆素类,大部分转化产物为糖

基化产物.部分通过生物转化得到的新化合物,其活性超过了母体化合物.例如,利用小克银汉霉AS3.970转化雷公藤中雷公藤内酯,获得了4个新化合物且都具有对人肿瘤细胞株的细胞毒效应^[37].目前,已建立毛状根培养系统的药用植物有紫草^[38]、长春花^[39]、人参^[40]、丹参^[41]、青蒿^[42]、甘草^[43]等数十种;进行有效成分基因调控研究的药用植物有罂粟、青蒿^[44]、丹参^[45]、红豆杉^[46]、喜树^[47]等数十种;利用根癌农杆菌感染石刁柏产生冠瘿瘤使其产生大量的喹啉生物碱,感染鬼针草产生大量的多炔类,感染长春花产生大量的生物碱,感染毛地黄产生大量的强心甙;利用转基因技术提高抗病虫害、抗旱抗盐等抗逆能力,或提高有效成分含量的药用植物有丹参毛状根、天仙子毛状根^[48]等.

(6) 药用动植物的道地性及分子机理.道地药材是古人对产于特定产地的优质中药材的称谓,其形成是特定的基因型,在特定的生境下受到复杂的调控,导致某些代谢过程的关键酶基因的表达产生了时空差异的产物^[49,50].道地性研究一直是分子生药研究的特色领域.生药道地性及其分子机理的研究,就是要在分子水平揭示道地药材居群水平的遗传变异,明确道地药材基因型特征,以及环境对道地药材基因表达的影响,从而揭示遗传因素对道地药材形成的贡献率.近年来,有学者指出道地性的遗传本质在居群水平通常是个量变的过程,它与种内其它非道地药材的区别主要表现为居群内基因型频率的改变;在个体水平表现为微效多基因控制的数量遗传,或是微效多基因和主基因联合控制的数量性状.目前药用植物次生代谢生物合成酶基因的克隆^[51,52],相关转录控制因子的研究^[53],及细胞在接受外界刺激时的信号传导研究^[54]等方面取得的成果均为从遗传、环境及信号传导等多方面来研究优质药材的形成机理提供了基础^[55].目前,道地分子机理研究较多的生药有芍药、苍术^[24]、广藿香、厚朴、栀子等.

3.2 学科特色

分子生药学的学科特色既表现为这一学科研究和发展的困惑和困难,也是学科形成和发展的动力.学科特色主要体现在以下几个方面.

(1) 研究领域广泛,学科综合性很强.生药学本

身就是一门多学科综合的应用基础学科, 分子生物学又是建立在生药学及其他诸多现代科学基础之上的边缘学科和综合学科, 这一学科外延广泛且内涵丰富. 研究中涉及到生药学、分子生物学、分子遗传学、分子生态学、植物生理学、生物学、遗传学、中药化学、分析化学、生物化学等诸多学科的知识和技术, 学科综合性很强, 研究者个人知识背景及学科交叉的能力和素质对分子生药的研究及学科发展的影响很大^[56]. 可见, 复合型人才的培养, 学科队伍的建设是分子生药学期长和艰巨的任务.

(2) 次生代谢产物积累的研究贯穿分子生药学. 药用动植物与普通动植物相比, 最大的区别是前者具有药用价值. 由此造成了生药特殊的质量特性, 既除了性状、气味、口感等外部特征外, 次生代谢产物的积累及其种类和配比关系是其质量标准的核心. 纵观分子生药学的研究内容, 不论是药用植物活性成分的生物合成及调控, 还是分子鉴定(真伪优劣)、药用动植物的道地性(涉及到药材的优质性), 或是药用动植物种质资源评价(包括品质评价)、药用动植物濒危机制及保护(优质药材更易濒危), 相关研究都与次生代谢产物的积累有直接或间接的关系. 所以说次生代谢产物的积累贯穿分子生药学研究. 分子水平观察和调控次生代谢产物的形成和积累是分子生药学重要内容, 这一点与普通动植物, 包括作物和林木等显著不同^[55].

(3) 研究对象丰富多样, 模式植物构建困难较大. 分子生药学的研究对象为上万种药用动植物, 其中常用药用动植物有数百种, 与农作物、林木等研究对象相比(后者的常用种数目通常为几十种), 分子生药学的研究对象丰富多样. 同时, 作为贯穿分子生药学研究的主线, 次生代谢产物形成机理复杂多样, 其中公认的最核心的生物合成途径就有 5 条^[57], 各个途径彼此相差很大, 且各途径内外部形成的复杂的代谢网络, 造成以次生代谢产物的形成和积累为核心的分子生药学研究很难寻找到一个通用的理想的模式植物.

3.3 技术方法

分子生药学的常用技术方法主要包括: DNA 分析技术(分子杂交、分子标记技术、基因芯片、基因

工程技术)、蛋白质分析技术(酶技术)、生物转化技术^[58], 以及生药学的常规分析方法(包括基源鉴定、显微鉴定、理化鉴定、化学成分分析)等^[14,59]. 部分技术介绍如下:

(1) DNA 分析技术. DNA 分析技术主要包括分子杂交、分子标记技术、基因芯片、基因工程技术等.

① 分子杂交. 分子杂交(molecular hybridization)是确定单链核酸碱基序列的技术, 主要用于核酸片段碱基序列的检测、鉴定及目标基因的定位等研究. 主要包括固相杂交和液相杂交, 其中固相膜核酸分子杂交技术又可分为: 菌落原位杂交(Colony in situ hybridization); 斑点杂交(Dot blotting); Southern 印迹杂交(Southern blotting); Northern 印迹杂交(Northern blotting); 组织原位杂交(Tissue in situ hybridization).

② 分子标记. 是指以 DNA 多态性为基础的遗传标记技术. 通过直接分析 DNA 的多态性, 快速准确地测定 DNA 的差异性, 可用于生药的鉴定、新药源的寻找开发等.

DNA 分子标记技术分以下几类:

(i) 以分子杂交为基础的分子标记技术. RFLP (restriction fragment length polymorphism)限制性内切酶片段长度多态性标记; VNTRs(variable number of tandem repeats)可变数量串联重复; DGGE-RFLP (denaturing gradient gel electrophoresis-RFLP)变性梯度凝胶电泳-RFLP.

(ii) 以 PCR 为基础的分子标记技术. RAPD (randomly amplified polymorphic DNA)随机扩增多态性 DNA; AP-PCR(arbitrary primer-PCR)随机引物 PCR; DAF(DNA amplification fingerprinting)DNA 扩增产物指纹分析; SSCP(single strand conformation polymorphism-RFLP)单链构象多态性; SCAR(sequence characterized amplified region)特征性片段扩增区域; CAPS(cleaved amplified polymorphism sequences)酶切扩增多态性序列, 又称 PCR-RFLP; AFLP (amplified fragment length polymorphism)扩增片段长度多态性; AS-PCR(allele-specific PCR)等位基因特异 PCR; SPAR(single primer amplification reaction)单引物扩增的反应; SSR(simple sequence repeat)简单重复序列, 又称微卫星 DNA(Microsatellite DNA)或 STR (short tandem repeat)短串联重复; ISSR(inter simple sequence

repeat)inter-简单重复序列.

(iii) 以 PCR 和 RFLP 相结合的分子标记技术. AFLP(amplified fragment length polymorphism)扩增片段长度多态性.

(iv) 以逆转录 PCR 为基础的分子标记技术. RT-PCR(revert transcription PCR)逆转录 PCR; DD (differential display) 差异显示; RDA(representative difference analysis)特征性差异分析; 荧光定量 PCR (fluorescence quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR).

(v) 以测序为基础的分子标记技术(Sequencing). SNP(single nucleotide polymorphisms)单核苷酸多态性; DNAbarcoding 生物条形码.

(vi) 基因芯片技术(DNA Chips). cDNA microarray cDNA 芯片; Oligo microarray 寡核苷酸芯片.

③ 基因芯片. 基因芯片技术系指将大量(通常每平方厘米点阵密度高于 400)探针分子固定于支持物上后与标记的样品分子进行杂交, 通过检测每个探针分子的杂交信号强度进而获取样品分子的数量和序列信息的新型杂交和测序技术. 这一技术由于可以一次性对样品大量序列进行高效、快速检测和分析, 从而解决了传统核酸印迹杂交技术操作繁杂、自动化程度低、操作序列数量少、检测效率低等不足. 可应用于基因表达谱测定、多态性分析、基因组文库作图及杂交测序等. 在分子生药学中, 目前主要应用于监测环境因素对地道药材基因表达的影响、主要有效成份调控基因的分析等研究^[60].

④ DNA 重组技术. 也称基因克隆或分子克隆, 是基因工程操作的基础. 它包括了一系列的实验技术, 最终目的是把一个生物体中的遗传信息(DNA)转入另一个生物体. 随着同源 DNA 重组技术的产生, 基因工程将变得更为简易、快速和准确. 该技术具有以下优点: 无需使用限制性内切酶和连接酶; 不改变 DNA 重组试验步骤; 操作简单. 目前, 市售克隆载体很多. 这一技术主要用于生药遗传改造及次生代谢产物的生物合成载体的构建等.

(2) 蛋白质分析. 这一技术主要用于生药蛋白质水平变异的分析, 包括蛋白质分离纯化的前处理、蛋白质的鉴定、蛋白质的盐析与透析及蛋白质的电泳技术(electrophoresis)、染色方法. 其中, 电泳技术包括:

醋酸纤维素薄膜电泳(Cellulose Acetate Membrane Electrophoresis); 琼脂和琼脂糖凝胶电泳(agarose gel electrophoresis); 聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE); SDS-PAGE; 印迹转移电泳(Electrophoretic Blottransfer); 聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦(isoelectric focusing, IEF); 双向聚丙烯酰胺凝胶电泳(two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis); 免疫电泳 (immunoelectrophoresis).

(3) 生物转化技术. 这一技术主要用于生药次生代谢产物积累的生物合成和生产研究, 包括: (微生物、悬浮培养细胞或转基因器官)转化体系的构建和筛选; 冠瘿瘤及毛状根获得及培养; 添加底物诱导^[61], 生物转化产物的提取分离和鉴定等^[62].

4 分子生药学的展望

4.1 生药资源永续利用的需求及技术发展导致特色领域成为热点

生药资源永续利用的需求与分子技术的优势相结合, 最终决定着分子生药学的方向和热点. 未来一段时间, 分子生药学在药用动植物的系统进化、药用动植物濒危机制及保护、药用动植物道地性等原有的研究领域持续稳定发展, 并将在以下领域形成热点.

(1) 分子鉴定稳步发展, biocoding 成为分子鉴定的重要方向. 根据国家科技期刊数据库中检索结果, 近年来, 生药分子鉴定的文献处于快速增长阶段. 随着分子生药学相关仪器及分子试剂成本的不断降低, 分子生药学知识和技术将不断普及. 作为分子生药学的核心和基础内容, 分子鉴定将持续成为分子生药学的热点领域. 与此同时, 人们对分子鉴别的速度及方便程度提出新的要求和目标. 因 DNA 条形码技术在物种鉴定方面拥有巨大的潜力, 有望实现生药的快速和标准化鉴别, 因而会在一段时间内成为分子生药鉴定的新热点.

(2) 次生代谢产物相关的功能基因组研究异军突起. 基因组学(genomics)研究主要包括以全基因组测序为目标的结构性基因组学(structural genomics)和以基因功能鉴定为目标的功能基因组学(functional genomics), 又被称为后基因组(postgenome)研究或后基

基因组学(postgenomics). 随着越来越多的全基因序列的获得, 人们在将基因组静态的碱基序列弄清楚之后, 逐步转入对基因组动态的生物学功能学研究. 次生代谢及其调控的分子机理是分子生药学的特色领域, 促进和调控次生代谢产物合成是分子生药研究的重要目标之一. 近年来, 次生代谢途径的基础研究越来越受到重视, 次生代谢产物的关键酶基因的研究取得积极进展. 随着生药基因工程、组织培养、生物转化技术水平的整体提高, 次生代谢产物相关的功能基因组研究异军突起, 并将成为分子生药学研究中最富挑战和前景的方向之一^[63].

(3) 基因组学、蛋白组学、代谢组学研究结果的整合和分析成为新热点. 基因组学(genomics)、蛋白质组学(proteomics)、代谢组学(metabonomics/metabolomics)虽然均是在分子水平开展生药相关研究, 但三者各有其优势和独特性, 基因组学主要研究功能基因等基因层面的内容, 蛋白质组学主要研究差异蛋白等蛋白质层面的内容, 代谢组学主要研究次生代谢物, 三者的分工不同. 次生代谢产物是典型的多基因性状, 其积累很大程度上受到环境, 尤其是环境胁迫的影响, 主要在基因表达和蛋白水平发生变异. 随着代谢组学、蛋白组学在分子生药研究中的不断拓展, 将基因组、蛋白质组和代谢组三个不同层次的研究结果进行整合分析, 从而获得超越三个组学各自领域的知识和信息将成为一种新的趋势^[64].

(4) 核心种质构建形成新思路和新方法. 核心种质(core collection)是种质资源的一个核心子集, 以最少数量的遗传资源最大限度地保存整个资源群体的遗传多样性, 同时代表了整个群体的地理分布. 核心种质是生药种质资源群体研究和利用的切入点, 可提高整个种质库的管理和利用水平. 生药资源核心种质的构建模式主要参考农作物, 后者通常是在已有种质资源库或已有大量种质资源的基础上, 按照科学的取样方法与技术, 从中选出约10%样品, 在一定程度上, 代表了某一种及其近缘野生种的形态特征、地理分布、基因与基因型的最大范围的遗传多样性. 与农作物种质资源研究形成明显区别的是, 多数生药资源本身不具备种质资源库, 而且不少野生、甚至珍稀濒危物种很难收集到大量种质. 这一方面是由于生药资源研究基础较薄弱, 另一方面, 也与生药资源种类繁多, 而且多数种质数量有限, 种质资源库

构建难度很大有关. 显而易见, 生药核心种质的构建模式无法也不该照搬农作物核心种质模式. 在未来一段时间, 如何发挥分子生药技术和方法在遗传多样性检测方面的优势, 充分利用有限的材料, 在分析药用动植物基因型上的差异, 以及不同基因型对环境反应上的差异, 特别是遗传结构的基础上, 配合混合线性模型等统计分析, 无偏预测生药性状的基因型值, 用预测出的基因型值计算遗传材料间的遗传距离, 准确评价不同材料间在遗传上的相似性, 通过设计合理的抽样策略, 构建生药核心种质库, 并建立生药学核心种质构建的特有模式势在必行.

4.2 理论体系进一步完善

分子生药学从概念的提出到第一本《分子生药学》著作的出版历经6年时间, 又经过了8年时间进入全国高等院校创新教材系列. 在这短短十几年的时间里, 越来越多的人参与到这一领域的研究中来, 学科取得了突飞猛进的发展. 随着研究的不断深入, 许多分子层面的研究成果给人以新的启迪, 人们对生药的认识不断深入. 例如, 生药多样性及种内变异的研究, 使人们开始重新思考生药的标准化问题及解决策略; 对次生代谢产物形成微效多基因及其与环境的互作, 以及基因网络化和程序表达的认识, 引发了人们对生药基因调控、品种选育的思考^[12]. 又如, 次生代谢产物的生物合成本身是个极复杂的系统工程, 它有相对独立的一套理论、方法和技术, 研究的深化要求人们对其在分子生药学学科中的地位进行思考. 相应的思考会导致分子生药学理论体系的不断完善.

4.3 应用实践进一步加强

生药学是一门来源于实践的应用学科. 虽然, 有关分子层面机理的研究增加了分子生药学学科的理论成分, 但分子生药学依然继承了生药学面向应用的这一属性, 解决生药在生产实践和保护利用中的具体问题依然是学科发展的航标. 分子生药学研究成果在实践中的应用是学科存在的意义所在, 也是衡量学科健康发展的重要标志. 目前, 利用分子生药学技术对栝楼属的系统分类的结果同时被*Flora of China*(第19卷)及2000年《中国药典》采纳是分子生药研究结果应用的典范^[65]. 相信在不远的未来, 这一领域的应用实践会进一步得到加强.

参考文献

- 1 黄璐琦, 肖培根, 主编. 分子生药学. 北京: 中国中医药出版社, 2008. 1—189
- 2 黄璐琦. 展望分子生物技术在生药学中的应用. 中国中药杂志, 1995, 20: 634
- 3 黄璐琦, 主编. 分子生药学. 第 1 版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000. 1—375
- 4 黄璐琦, 主编. 分子生药学. 北京: 北京医科大学出版社, 2006. 1—678
- 5 黄璐琦, 主编. 分子生药学. 北京: 北京医科大学出版社, 2006. 1—2
- 6 徐国钧, 主编. 生药学. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1987. 1
- 7 蔡少青, 主编. 生药学. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007. 4
- 8 黄璐琦, 主编. 分子生药学. 第 1 版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000. 9
- 9 黄璐琦, 主编. 分子生药学. 第 1 版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000. 8
- 10 谢宗万. 《分子生药学》评介. 中国中药杂志, 2001, 26: 216
- 11 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 2005 版. 第一册. 北京: 化学工业出版社, 2005. 212, 59
- 12 黄璐琦, 郭兰萍, 胡娟, 等. 中药道地性的分子机理及遗传背景. 中国中药杂志, 2008, 33: 2303—2308
- 13 黄璐琦. 展望分子生物技术在生药学中的应用. 中国中药杂志, 1995, 20: 634
- 14 蔡少青, 主编. 生药学. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007. 2
- 15 黄璐琦, 肖培根, 主编. 分子生药学. 北京: 中国中医药出版社, 2008. 2
- 16 徐国钧, 主编. 生药学. 第 2 版. 北京. 人民卫生出版社, 1987, 3
- 17 黄璐琦, 肖培根, 主编. 分子生药学. 北京. 中国中医药出版社, 2008, 2—3
- 18 徐红, 王峥涛, 胡之璧. 中药 DNA 分子鉴定技术的发展与应用. 世界科学技术——中医药现代化, 2003, 5(2): 24—30
- 19 陈美兰. 采用 RAPD 和 PCR-RFLP 方法从分子水平鉴定人参. 国外医学. 中医中药分册. 2002, 24: 305
- 20 武莹, 刘春生, 刘玉法, 等. 5 种习用柴胡的 ITS 序列鉴别. 中国中药杂志, 2005, 30: 732—734
- 21 杨滨, 王敏, 曹春雨, 等. 中药白芷的分子遗传及其原植物分析. 中国中药杂志, 39: 654—657
- 22 黄璐琦, 王敏, 杨滨. 栝楼农家品种苗期的分子标识鉴别. 中国中药杂志, 1999. 34: 66
- 23 邱英雄, 傅承新, 吴斐捷. 明党参与川明参群体遗传结构及分子鉴定的 ISSR 分析. 中国中药杂志, 2003, 28: 598—603
- 24 郭兰萍, 黄璐琦, 蒋有绪. 苍术遗传结构的 RAPD 分析. 中国药学杂志, 2006, 41: 178—181
- 25 周红涛, 胡世林, 郭宝林, 等. 芍药野生与栽培群体的遗传变异研究. 药学报, 2002, 37: 383—388
- 26 郭宝林, 斯金平. 厚朴 DNA 分子标记的研究——正品的 RAPD 研究. 药学报, 2001, 36: 386—389
- 27 唐晓晶, 冯成强, 黄璐琦, 等. 高特异性 PCR 方法鉴别乌梢蛇及其混淆品. 中国药学杂志, 2007, 42: 333—336
- 28 黄璐琦, 主编. 分子生药学. 第 1 版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000. 217
- 29 白音, 包英华, 王文全, 等. 不同居群美花石斛种质资源的 RAPD 分析. 中草药, 2007, 38: 748—751
- 30 斯金平, 童再康, 曾燕如, 等. 厚朴种质资源评价与利用研究. 中药材, 2002, 25: 79—81
- 31 李辛雷, 陈发棣. 菊花种质资源与遗传改良研究进展. 植物学通报, 2004, 21: 392—401
- 32 周红涛, 胡世林, 郭宝林, 等. 芍药野生与栽培群体的遗传变异研究. 药学报, 2002, 37: 383—388
- 33 李欣, 黄璐琦, 邵爱娟, 等. 黄芩种质资源的研究概况. 世界科学技术—中医药现代化, 2003, 5: 54—58
- 34 崔光红, 陈敏, 黄璐琦, 等. 药用肉苁蓉的遗传多样性 RAPD 分析. 中国中药杂志, 2004, 29: 727—730
- 35 Gao L M, Möller M, Zhang X M, et al. High variation and strong phylogeographic pattern among cpDNA haplotypes in *Taxus wallichiana*(Taxaceae) in China and North Vietnam. *Mol Ecol*, 2007, 16: 4684[DOI]
- 36 Yuan Q J, Zhang Z Y, Peng H, et al. Chloroplast phylogeography of *Dipentodon*(Dipentodontaceae) in southwest China and northern Vietnam. *Mol Ecol*, 2008, 17: 1054[DOI]
- 37 余伯阳. 中药与天然药物生物技术研究进展与展望. 中国药科大学学报, 2002, 33: 359—363
- 38 Koichiro S, Hiroshi S, Hitoshi S, et al. Shikonin production and secretion by hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Reports*, 1991, 10: 282—285
- 39 Rajiv B, John A M, Jacqueline V S. Transient Studies of Light-adapted Cultures of Hairy Root of *Catharanthus roseus*: Growth and Indole Alkaloid Accumulation. *Biotechnol and Bioeng*, 1998, 60: 670[DOI]
- 40 孙彬贤, 杨光孝, 汪沁琳, 等. 人参毛状根合成人参皂苷培养条件的优化. 中成药, 2003, 25: 746—748
- 41 崔光红, 黄璐琦, 邱德有, 等. 丹参功能基因组学研究 II -丹参毛状根不同时期基因表达谱分析. 中国中药杂志, 2007, 32:

1267—1272

- 42 刘春朝, 王玉春, 欧阳藩. 青蒿毛状根合成青蒿素的培养条件研究. 植物学报, 1998, 40: 54—58
- 43 杜旻, 刘峻, 丁家宜, 等. 甘草毛状根体内外抗氧化能力的测定. 植物资源与环境学报, 2000, 9: 1—4
- 44 王红, 叶和春, 刘本叶, 等. 青蒿素生物合成分子调控研究进展. 生物工程学报, 2003, 19: 651—654
- 45 晏琼, 胡宗定, 吴建勇. 生物与非生物诱导子协同作用对丹参毛状根培养生产丹参酮的影响. 中国中药杂志, 2006, 31: 188—191
- 46 杜亚填, 陈建华, 许建宇, 等. 植物生长调节剂对南方红豆杉愈伤组织培养和紫杉醇合成的影响. 天然产物研究与开发. 2006, 18: 569—576
- 47 Zu Y G, Tang Z H, Yu J H, et al. Different responses of camptothecin and 10-hydroxycamptothecin to heat shock in camptotheca acuminata Seedlings. Acta Botanica Sinica, 2003, 45: 494—499
- 48 Zhang L, Ding R X, Chai Y R, et al. Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 10: 6786—6791 [\[DOI\]](#)
- 49 黄璐琦. 分子生药学. 北京: 北京医科大学出版社, 2006. 369—388
- 50 黄璐琦, 郭兰萍, 华国栋. 道地药材属性及研究对策. 中国中医药信息杂志, 2007, 14: 44—46
- 51 Hikaru S, Kiyoshi O, Satoru S, et al. Licorice β -amyrin 11-oxidase, a cytochrome P450 with a key role in the biosynthesis of the triterpene sweetener glycyrrhizin. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 14204—14209 [\[DOI\]](#)
- 52 戴住波, 钱子刚, 胡运乾, 等. 金铁锁鲨烯合酶 cDNA 的克隆和功能鉴定. 药学学报, 2008, 43: 1245—1250
- 53 Keinanen M, Oldham N J. ORCA3, a Jasmonate-responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. Science, 2000, 289: 295—297 [\[DOI\]](#)
- 54 Xu M J, Dong J F, Zhu M Y. Nitric oxide mediates the fungal elicitor-induced hypericin production of hypericum perforatum cell suspension cultures through a jasmonic-acid-dependent signal pathway. Plant Physiology, 2005, 139: 991—998 [\[DOI\]](#)
- 55 黄璐琦, 戴住波, 吕冬梅, 等. 探讨道地药材研究的模式生物及模型. 中国中药杂志, 2009, 34: 1063
- 56 黄璐琦, 主编. 分子生药学. 第 1 版. 北京: 北京医科大学出版社, 2000. 16—17
- 57 黄璐琦, 郭兰萍, 主编. 中药资源生态学. 上海: 上海科学技术出版社, 2009. 44—45
- 58 黄璐琦, 肖培根, 主编. 分子生药学. 北京: 中国中医药出版社, 2008. 36—103
- 59 蔡少青, 主编. 生药学. 第 5 版. 北京: 人民卫生出版社, 2007. 49—65
- 60 黄璐琦, 肖培根, 主编. 分子生药学. 北京: 中国中医药出版社, 2008. 68—71
- 61 严春艳, 马伟丽, 梁建, 等. 转基因何首乌毛状根对 8 种活性成分的生物转化研究. 中国生物工程杂志. 2008, 28: 78—81
- 62 张传会, 陈有为, 郑毅, 等. 黄山药的黑曲霉转化产物化学成分研究. 天然产物研究与开发, 2008, 20: 585—588
- 63 邱德有, 黄璐琦. 代谢组学研究——功能基因组学研究的重要组成部分. 分子植物育种, 2004, 2: 165—177
- 64 王四旺, 王剑波. 综观中药研究新观点, 试论药物开发新思路. 医学研究杂志, 2008, 37: 95—99
- 65 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 北京: 化学工业出版社, 2000. 84