

· 综述 ·

生物技术在中药鉴别及优良品种培育和在生产中的应用

杨青雅 劳 英

摘要 介绍生物技术在中药材鉴定,优良品种培育、生产等方面的应用。总结近 10 年来中药生物技术领域的相关文献并进行分析。结果表明,生物技术在当前中药材品质鉴定和中药新药研究中发挥了极其重要的作用。

关键词 生物技术;中药鉴别;优良品种培育

Application of Biotechnics in the Identification of Chinese Medicinal Herbs and the Production and Cultivation of Their Excellent Species YANG Qing-ya, and LAO Ying *Hospital Affiliated to Medical College, Ningbo University, Zhejiang (315020)*

Abstract In this paper, application of biotechnics in the identification of traditional Chinese medicinal herbs, and the production and cultivation of their excellent species was discussed, and the relevant references about usage of biotechnics in TCM researches published in recent decade were summarized and analysed. Lots of literature showed that biotechnics played important roles in the quality identification of Chinese medicinal herbs and the researches on new drugs of TCM.

Key words biotechnics; identification of traditional Chinese medicinal herbs; cultivation of the excellent speccies

中药是中华民族的瑰宝,是我国劳动人民长期与疾病作斗争的宝贵经验总结,随着生活水平的提高,人们对生命质量日趋关注,而化学合成药物产生的不良反应越来越明显,药源性疾病不断增加,回归自然已成为必然趋势,人们对天然药物有了极高的重视与需求。中药产品逐渐显出其巨大的潜在优势。但传统中药材却面临许多问题。人口的增加和工业化程度的提高,促使人类向自然界索取的资源越来越多,有时甚至是掠夺式的,使得作为野生资源的中药材储量日益减少,自然界生态平衡遭到了严重破坏,进一步加快了药用植物资源灭绝的速度。虽然植物人工种植品不断增加,但面临品质退化混杂的问题,使药材产量、质量都不能得到保障;中药材的造假问题也十分严重,这些都阻碍了中药的发展^[1]。生物技术的兴起为解决这一系列问题提供了有效途径。近几十年来,生物技术在许多领域取得了巨大的进展,在传统中药材研究开发中也取得了相当的成果。生物技术目前已渗透到中药的各个研究领域,在中药资源开发,优良中药品种的培育及生产,中药材鉴定中的应用愈来愈广泛。

DNA 分析技术应用于中药鉴定

来源于动、植物的中药均含有决定其生物学特性的遗传物质基因,由于基因中 DNA 多态性的特点,构成了物质表型的多样性。而分子生物学的发展使人们能从干燥药材中提取 DNA,以 DNA 多态性为基础,根据不同种属间药材 DNA 变异情况,揭示其亲缘关系,从而对生药和含原生药的中成药及其基原进行真伪优劣鉴定。由于 DNA 分析技术是针对生物的遗传物质进行鉴别,其结果不受环境因素、样品形态和材料来源的影响,因此,为中药鉴定提供了更加准确可靠的手段。

1 DNA 指纹图谱技术(DNA fingerprinting) 本技术是利用聚合酶链反应(polymerase chain reaction, PCR)从不同生物样品中人工合成 DNA 片段,而这种 DNA 片段的大小、数目因不同的生物而异的原理进行的。随机引物扩增多态性(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、限制性内切酶酶切片段长度多态性(ristrict fragment length polymorphisim, RFLP)是以 PCR 为基础发展的灵敏度高、操作简便快速的方法。RAPD 技术发展于 20 世纪 90 年代,在某些中药的基原鉴定、品种资源分析及其地理品系、栽培品系间的质量评价方面已有了许多研究报道。例如在人参

作者单位:宁波大学医学院附属医院(浙江 315020)

通讯作者:杨青雅, Tel:0574-88055537, E-mail:jjiaa@nbip.net

属^[2]、木蓝属^[3]、乌梢蛇及其混淆品^[4]、玉竹及其混淆品黄精^[5]、天花粉及其类似品^[6]、地榆属的 4 个品种及混淆品^[7]等多种药材的鉴定中取得了可靠的结果。日本九州大学 Nakai 等^[8]采用 RAPD 标记法对淫羊藿属 8 种植物进行了 DNA 分析,结果发现 RAPD 指纹图谱较易区别箭叶淫羊藿(*Epimedium sagittatum*)和其它 7 种淫羊藿。人们已进行了苍术类^[9]的 RFLP 分析,成功地进行了这些药材的鉴别。

2 DNA 测序法 由于中药的加工和储存过程不利于 DNA 的保存,DNA 指纹图谱分析手段较为困难,而基于 PCR 的 DNA 直接测序技术(DNA sequencing)的发明使 DNA 分子鉴定技术取得了突破性进展。该方法以 PCR 扩增产物作为测序模板,大大提高了 DNA 序列分析的效率^[10]。目前用于 DNA 测序的基因主要有叶绿体基因组的 *rbcL*、*matK* 与核基因组的 *rRNA*、*ITS* 等,线粒体基因组的 *cyt-b*(动物类)。*rbcL* 一般用于科级以上分类群研究。*matK* 常用于种一级分类群亲缘关系研究。曾明等^[11]测定并分析了葛根属 3 种植物的内转录间隔区(*ITS*)序列及 5.8 S*rRNA* 基因序列,得出 *ITS* 序列特征是中药葛根鉴别的有效分子标记。王晶娟等^[12]对节肢类动物中常用的药材蜈蚣、全蝎、僵蚕、虻虫、蝉蜕进行了 PCR 扩增和 18S*rRNA* 基因测序基础上的对切酶鉴别的初步研究。日本富山医科药科大学 Fushimi 等^[13]亦报道了对人参属 3 种植物的 RAPD 研究。杨滨等^[14]对祁、杭白芷主要产区的种类及其周围的野生近缘种进行了随机扩增多态 DNA(RAPD)分析和 *ITS* 1 和 *ITS* 2 区的序列分析,为解决中药白芷的原植物问题提供了分子遗传学依据。

3 生物芯片技术(biological chip) 生物芯片主要包括基因芯片(gene chip)和肽芯片(peptide chip),是指将大量(通常每平方厘米点阵密度高于 400)探针分子(DNA、RNA、多肽等)固定于支持物(膜、玻璃片、硅片等)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,对样品分子进行定性、定量和结构分析,其原理是利用生物大分子具有的特异相互识别能力。具快速、准确、自动化的优点。李绍平等^[15]对川贝母、浙贝母、皖贝母和湖北贝母等 4 种主要贝母品种 5S-*rRNA* 的序列分析时发现,川贝母有一特异性的碱基序列 CTTTTGTCGCATCA,以此序列为探针制成芯片,将待测样品提取 DNA 并经扩增和荧光标记后与芯片上探针进行杂交,然后通过荧光检测即可准确鉴定出川贝母。

生物技术在药用植物及其活性成分生产中的应用

1 药用植物的大规模培养 利用植物细胞的全能性,诱导器官分化,繁殖大量无性系试管苗,使植物种苗实现工业化生产,具有繁殖量大,速度快和降低病毒的优点,对药材的质量、产量都非常有益。目前已有 100 多种药用植物经过离体培养获得试管植株^[16]。

2 组织培养、细胞培养生产药用活性成分 最初人们常利用植物愈伤组织培养提取活性物质,例如,人们曾先后以新疆紫草子叶、叶、根茎、根和种子为外植体诱导出愈伤组织^[17,18]。对藏红花球茎愈伤组织快速诱导进行了系统研究,选用合适的培养条件,在培养 14 天后,获得 60% 的愈伤组织诱导率^[19]。但该培养物生长缓慢,合成次生代谢产物能力低。将游离的细胞悬浮在液体培养基中进行培养,此法比愈伤组织快,适合大规模培养。我国科学家已建立了三七、人参、三尖杉、长春花、丹参等十几种药用植物的液体培养系统^[16]。

3 发酵工程与次生代谢产物生产中药活性成分 目前,国际和国内市场对具有重要药用价值的动植物药品都有着大量的需求。抗癌药紫杉醇、长春新碱、抗癌药青蒿素等均供不应求,近年各国广泛开展这些药物的细胞工程研究,期望建立稳定的细胞株和大规模细胞培养体系,以解决供需矛盾,这对自然资源匮乏的常用中药的保护和开发利用具有重要意义。

通过筛选高产细胞系,改进培养条件和技术以及设计适合植物细胞培养的发酵罐,人们已进行了包括人参、紫草、长春花、毛地黄、黄连、彩叶紫苏等在内的多种植物细胞大规模生产的试验。由紫草培养细胞提取的紫草宁以及人参和茜草细胞培养物代谢成分的生产陆续被报道^[20]。但植物细胞生长缓慢,有效成分含量较低,遗传稳定性较差和对剪切力较为敏感等,造成生产成本过高,因而在一定程度上限制了该技术的广泛应用。为了加速推进植物细胞培养技术商业化的进程,各国科学家一方面不断改进培养技术,如控制培养的气象环境,加入诱导剂或抑制剂,加入树脂吸附剂等,另一方面发展新的培养方法,如高密度培养,连续培养,固定化培养等,期望得到一种适合于植物细胞工业化生产的培养方法^[21]。因此,利用植物细胞大规模培养进行某些天然产物的商业化生产仍然有一定的发展前景。

发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*)感染植物形成的毛状根,已成为继细胞培养后又一新的培养系统。由于毛状根生长迅速,遗传稳定性和生化特性不易改变以及易于进行遗传操作的特点,日益受到人们的重视。这一培养系统对传统药材来说更为重要,因

为约三分之一的传统药材是植物的根部。例如人们在长春花的毛状根中检测到了在长春花细胞培养中未能获得的长春碱和长春新碱^[22]。黄遵锡等^[23]建立了红豆杉毛状根培养体系,发现在短叶红豆杉(*Taxus brevifolia*)的毛状根中紫杉醇的含量是其愈伤组织中的近 8 倍。常振战等^[24]报道,对无刺曼陀罗(*Datura stramonium*)毛状根续代培养 5 年以上仍保持合成托品烷生物碱的稳定性。毛状根还可将部分次生代谢产物分泌释放到培养液中,有利于次生代谢产物的回收提取和工业化生产。刘涤等^[20]在丹参毛状根培养中发现有 7 种丹参酮存在于毛状根组织中,大约 40% 分泌到培养基中,同时发现丹参毛状根中含有水溶性酚酸类化合物,其中丹参酚酸 A 的含量超过原植物 217 倍。在黄芪毛状根培养的研究中发现粗皂甙、可溶性多糖的含量明显超过黄芪干燥根。此外,他们还成功地进行了黄芪毛状根的大规模培养实验,3L、5L 和 10L 体积的容器中经过 21 天的培养,其产量可以达到 10g 干重/L。建立毛状根培养系统的例子还有人参、石斛等。利用毛状根培养生产的次生代谢产物有生物碱类、苷类、黄酮类、甾类以及蛋白质等。

4 基因工程与生物转化 传统药材含有的有效成分绝大部分是次生代谢产物,合成途径非常复杂,往往有几个或十几个酶参与,因而找出形成特定产物的关键酶就成为利用基因工程技术生产传统药材有效成分的关键步骤之一。在研究清楚次生代谢途径的前提下,导入在正常植物中作为代谢途径的限速酶的基因或有关的具调节功能的基因,有可能提高植物的特定次生代谢物的产量。将天仙子胺 6- β -羟化酶基因转移到富含天仙子胺的莨菪毛状根中,与对照组比较,莨菪胺含量增加了 5 倍。将长春花种编码色氨酸脱羧酶的基因导入烟草后使之由色氨酸产生生物碱原色胺,在转基因植物中酶活增加了 260 倍,结果可使 1g 鲜重的植物材料产生 1mg 多的色胺^[25]。但由于大部分次生代谢途径还不十分清楚,成功的例子还不多见。另外,转基因植物作为一种整体表达系统,可望用于生产具有重要医疗价值的重组蛋白质,如各种抗体、血液因子、神经肽、生长激素等生物活性肽^[26];与常规微生物发酵生产系统相比,有不可比拟的优越性。第一,药物生产是在植物自身细胞内完成,更有利于人体吸收利用;第二,避免了微生物生产可能带来的有害副产品;第三,不需要大规模的发酵设备和较高的生产技术。

利用药用植物细胞进行生物转化也是获得药用有效成分的途径之一。目前已经知道植物细胞具有诸如酯化、氧化、还原、乙酰化、甲基化等多种生物转化能

力。植物细胞进行的生物转化实质上是一种酶的催化反应。由于某些植物酶能够催化化学合成和微生物很难进行的立体专一和区域专一性反应,因此进行自由悬浮细胞和固定细胞的生物转化研究成为植物生物技术的一个重要研究领域。有人利用洋地黄培养细胞特定的羟基化能力将洋地黄甙转化为临床上使用的强心甙甲基地高辛,使用 200L 发酵罐可以获得 600 ~ 700mg/L 的转化率,有望进行商业化生产。熊果甙是人类皮肤中黑色素合成的有效抑制剂;利用毛曼陀罗、长春花和蛇根木的培养细胞进行的生物转化取得了成功,其产量分别为 3 天 7.1g/L、4 天 9.2g/L、7 天 18g/L,已经达到化学合成的产量,也有希望成为商业化的产品^[20]。但由于多数生物转化反应的效率较低,能够达到工业化和商业化的例子还不多见,这方面仍有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 杨光明,蔡宝昌,王明艳,等. 分子生物学技术在中药鉴定中的应用. 世界科学技术-中药现代化 2001;3(4):29-34.
Yang GM, Cai BC, Wang MY, et al. Application of molecular biological technology in identification of traditional Chinese medicine. World Sci Technol-modernization Tradit Chin Med 2001;3(4):29-34.
- 2 马小军,汪小全,孙三省,等. 野生人参 RAPD 指纹的研究. 药学学报 1999; 34(4):312-316.
Ma XJ, Wang XQ, Sun SS, et al. A study on RAPD fingerprints of wild mountain ginseng (panax ginseng). Acta Pharm Sin 1999; 34(4):312-316.
- 3 张 荣,张步振,叶 浩. 用 RAPD 分析法鉴定木兰属生药中国中药杂志 1997; 22(2):72-73.
Zhang R, Zhang BZ, Ye H. A study on the identification of the Chinese herbs of Indigoferae L. by RAPD analysis. Chin J Chin Material Med 1997; 22(2):72-73.
- 4 王义权,周开亚,徐璐珊,等. 中药材乌梢蛇及其混淆品的 DNA 序列分析鉴别. 药学学报 1999; 34(1):67-71.
Wang YQ, Zhou KY, Xu LS, et al. Authentication of the Chinese crude "Wushaosh" (Zaocys dhumnades) and its substitutes by DNA sequence analysis. Acta Pharm Sin 1999;34(1):67-71.
- 5 刘塔斯,李 钟,刘春林. 玉竹及其混淆品黄精的 RAPD 分析. 中国药学杂志 2002; 37(10):734-736.
Liu TS, Li Z, Liu CL. Analysis of Polygonatum odoratum and its substitutes by RAPD. Chin Pharm J 2002; 37(10):734-736.
- 6 黄璐琦,王 敏,杨 滨,等. 用随机扩增多态 DNA(RAPD)技术鉴别中药材天花粉及其类似品. 药物分析杂志 1999; 19(4):233-238.
Huang LQ, Wang M, Yang B, et al. Authentication of the Chinese drug tian-hua-fen (Radix Trichosanthes) and its adulterants and substitutes using random amplified polymorphic

- DNA (RAPD). *Chin J Pharm Analysis* 1999; 19(4):233—238.
- 7 沙明,张东方,孟宪生,等. DNA 指纹谱与 HPLC 指纹谱对中药地榆质量评价研究. *中国药学杂志* 2002; 37(11): 815—818.
Sha M, Zhang DF, Meng XS, et al. Quality evaluation of Chinese materia medica *Sanguisorbae* by DNA fingerprinting and HPLC fingerprinting. *Chin Pharm J* 2002; 37(11): 815—818.
 - 8 Nakai R, Shoyama Y, Shirashi S. Genetic characterization of *Epimedium* species using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP) diagnosis. *Biol Pharm Bull* 1996; 19(1):67—69.
 - 9 Mizukami H, Shimizu R, Kohda H, et al. Restriction fragment length polymorphisms of rDNA and variation of essential oil composition in *Atractylodes* plants. *Biol Pharm Bull* 1996; 19(6):577—580.
 - 10 詹秀琴,王明艳. 分子生物学技术在中药鉴定中的应用及探讨. *生物学通报* 2001; 36(11):3—4.
Zhan XQ, Wang MY. Application and study of molecular biological technology in identification of traditional Chinese medicine. *Bull Biol* 2001; 36(11):3—4.
 - 11 曾明,马雅军,郑水庆,等. 中药葛根及其近缘种的 rDNA-ITS 序列分析. *中国药学杂志* 2003; 38(3):173—175.
Zeng M, Ma YJ, Zheng SQ, et al. Studies on ribosomal DNA sequence analyses of *Radix puerariae* and its sibling species. *Chin Pharm J* 2003; 38(3): 173—175.
 - 12 王晶娟,张贵君,白根本. 蜈蚣等 5 种动物类中药 18S rRNA 基因酶切鉴定的初步研究. *中国药学杂志* 2002; 37(8):582—584.
Wang JJ, Zhang GJ, Bai GB. Study on endonuclease cutting of 18S rRNA gene in five animal drugs including *Scolopendra*. *Chin Pharm J* 2002; 37(8):582—584.
 - 13 Fushimi H, Komatsu K, Isobe M, et al. Application of PCR-RFLP and MASA analyses on 18S ribosomal RNA gene sequence for the identification of three ginseng drugs. *Biol Pharm Bull* 1997; 20(7):765—767.
 - 14 杨滨,王敏,曹春雨,等. 中药白芷的分子遗传及其原植物分析. *中国药学杂志* 2004; 39(9):654—657.
Yang B, Wang M, Cao CY, et al. Molecular genetic study on the crude herb *Baizhi* and its source. *Chin Pharm J* 2004; 39(9): 654—657.
 - 15 李绍平. 生物芯片技术在中药鉴定研究中的应用与展望. *世界科学技术—中药现代化* 2000; 2(3):158—160.
Li SP. Application and expectation of biological chip technology used in identification of Chinese medicine. *World sci technol—modernization of tradit Chin med* 2000; 2(3):158—160.
 - 16 许铁峰,张汉明,张磊,等. 生物技术在中药材品质改良、保护和鉴定等方面的应用. *中国药学杂志* 2003; 38(3): 166—170.
Xu TF, Zhang HM, Zhang L, et al. Application of biotechnology to improvement of character, preservation and identification of traditional Chinese medicine. *Chin pharm J* 2003; 38(3): 166—170.
 - 17 计巧灵,王卫国. 新疆紫草无性繁殖及其再生植株的遗传稳定性初探. *植物生理学通讯* 2001; 37(6):499—501.
Ji QL, Wang WG. Asexual propagation of *Arnebia euchroma* johnston and exploration of hereditary stability in regenerated plantlets. *Plant Physiol Commun* 2001; 37(6):499—502.
 - 18 葛锋,王晓东,王玉春. 新疆紫草愈伤组织高效诱导及快速增殖研究. *中国药学杂志* 2004; 39(10):735—737.
Ge F, Wang XD, Wang YC. Studies on highly efficient induction of callus from *Arnebia euchroma* and rapid proliferation of callus. *Chin Pharm J* 2004; 39(10): 735—737.
 - 19 陈书安,王晓东,欧阳杰,等. 藏红花球茎愈伤组织快速诱导的研究. *中国药学杂志* 2003; 38(4):254—256.
Chen SA, Wang XD, Ouyang J, et al. Investigation on rapid induction of *Crocus sativus* callus taking corm as explant. *Chin Pharm J* 2003; 38(4): 254—256.
 - 20 刘涤,胡之璧. 植物生物技术在传统药材生产中的应用前景. *生物工程进展* 1997; 17(1):37—41.
Liu D, Hu ZB. Perspectives of plant biotechnology application in the production of traditional drug. *J Chin Biotechnol* 1997; 17(1): 37—41.
 - 21 崔堂兵,郭勇,林炜铁. 提高植物细胞培养法生产次级代谢物产量的方法. *植物生理学通讯* 2001; 37(5):479—482.
Cui TB, Guo Y, Lin WT. The ways to enhance the production of secondary metabolites by plant cell culture. *Plant Physiol Commun* 2001; 37(5):479—482.
 - 22 Parr AJ, Peerless ACJ, Hamill JD, et al. Alkaloid production by transformed root cultures of *catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep* 1998; 17(3):309—312.
 - 23 黄遵锡,慕跃林,周玉敏,等. 发根农杆菌对短叶红豆杉的转化及毛状根中紫杉醇的产生. *云南植物研究* 1997; 19(3):292—296.
Huang ZX, Mu YL, Zhou YM, et al. Transformation of *taxus brevifolia* by agrobacterium and taxol production in hairy roots culture. *Acta Botanica Yunnanica* 1997; 19(3):292—296.
 - 24 常振战,果德安,郑俊华. Ri 质粒植物用于生产天然活性成分的研究进展. *中草药* 1998; 29(10):705—707.
Chang ZZ, Guo DA, Zhen JH. Application of Ri-plasmid transformation system in plant tissue culture for production of natural active constituents. *Chin Tradit Materia Med* 1998; 29(10):705—707.
 - 25 许智宏. 植物生理学和生物工程. *植物生理学通讯* 1994; 30(3):228—230.
Xu ZH. The plant physiology and biotechnology. *Plant Physiol Commun* 1994; 30(3):228—230.
 - 26 朱玉贤. 植物基因工程的现状与展望. *北京大学学报(自然科学版)* 1996; 32(2):261—264.
Zhu YX. Current status and major developing trends of plant genetic engineering. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis* 1996; 32(2):261—264.

(收稿:2004-09-20 修回:2005-02-30)