

# 基因组学与生物芯片技术在中药研究与开发中的应用

杨 忠<sup>1</sup>, 张亚鸥<sup>1</sup>, 黄文秀<sup>2</sup>, 肖培根<sup>2,3\*</sup>, 杨梦苏<sup>1</sup>

(1. 香港城市大学基因组科技应用研究中心; 2. 香港理工大学应用生物学与化学技术系;  
3. 中国医学科学院、中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094)

关键词: 基因组学; 生物芯片; 研究与开发; 中药

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2002)06 - 0490 - 07

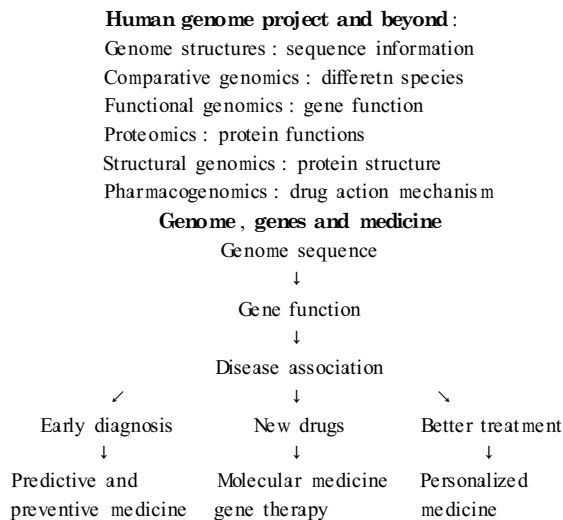
## 1 后基因组时代与生物芯片

在新世纪来临之际, 伴随人类基因组计划 (human genome project, HGP) 的初步完成, 人类对生命本质与疾病的研究进入了后基因组时代 (post genome era); 人类基因组计划测定了人类基因组约 30 亿个碱基对的排列, 绘制了人类数万个基因的物理与遗传图谱, 即主要基因的染色体定位和核酸序列检测, 一些遗传性疾病特别是单基因遗传疾病从基因水平得到揭示。但对基因组中单个基因的功能, 大部份迄今仍不知晓, 同时人类许多常见疾病的发生发展也是众多基因共同作用的结果; 因此后基因组时代的主要任务之一是阐明单个基因的功能与基因或基因产物间的相互作用——功能基因组学 (functional genomics), 其最基本的课题是阐明基因的表达情况: 一个基因在何时、何处及什么情况下表达<sup>[1]</sup>。

宏伟的人类基因组计划的完成为功能基因组学、结构基因组学及蛋白组学等的研究奠定了坚实基础, 上述领域的一个共同目标是所有人体功能蛋白的确定并阐明其在细胞中的作用与相互关系, 此类研究的深入必将对生物及医学产生深远影响 (表 1)。近年来以生物芯片为代表的高通量筛选技术的出现加速了此领域的进展; 广义的生物芯片 (biochip) 包括了基因芯片、芯片实验室及蛋白芯片系统。基因芯片, 又称 DNA 芯片, 作为一种高通量的基因表达检测及 DNA 测序技术, 是功能基因组研究中迄今最有力的工具。一种 DNA 芯片通常由密集排布于小型玻片上的 DNA 探针组成; 芯片上的

DNA 短链根据碱基互补只专一地与其相匹配的链结合, 在芯片杂交实验中由细胞内信使 RNA (mRNA) 逆转录而来的 cDNA 用荧光分子标记。当基因芯片上的 DNA 链与它的互补链结合时就会被“点亮”, 显示细胞中哪个基因处于激活或抑制状态。这使研究者能同时监控细胞基因组众多甚至每个基因的表达, 即使在某些基因功能还不知道的情况下, 从而可以比较不同生理状态或疾病条件下基因表达的改变<sup>[1,2]</sup>。

Table 1 Human genome project and its effect on medicine



在功能基因组学研究中, 伴随基因表达芯片及基因分型 (genotyping) 等技术产生的浩瀚数据, 计算机生物学或称生物信息学 (bioinformatics) 应运而生, 该学科的范畴不仅包括对实验数据的获取及处理, 同时通过建立各种数据库, 提供算法, 比较获得相同表达模式的基因群, 最终为生物医学提供快速有效的解读工具<sup>[3,4]</sup>。

## 2 药物基因组学——未来个体化医疗的基石

收稿日期: 2001-09-07.

作者简介: 杨 忠 (1968 - ), 男, 研究员;

肖培根 (1932 - ), 男, 中国工程院院士, 博士生导师.

\* 通讯作者 Tel: (010) 63011294, Fax: (010) 63038753,

E-mail: XiaoPG@public.bta.net.cn

药物基因组学 (Pharmacogenomics), 是随着功能基因组时代的来临而兴起的一门前沿科学, 它研究药物作用的分子基础及毒副反应的遗传机制, 力求阐明药物生物效应的个体差异, 从而达到人们所希望的在正确的病员群体, 合适的时间使用正确的适当剂量的药物 (the right drug for the right patient), 或称个性化医疗 (personalized medicine); 药物基因组学还研究药物作用后不同组织中基因表达模式的差异。其研究策略主要包括从不同个体中分离评估基因序列的变异, 建立遗传多态性 (genetic polymorphisms) 与药物反应间的明确联系; 该遗传多态性包含了能影响基因表达和功能的 DNA 序列中的重复、删除、插入及突变序列<sup>[5,6]</sup>。

临床上, 相同的药物对同一疾病群体可能部份有效, 而对另一部份病人却不起作用, 甚至对少数病人可能有毒副作用, 个体药物反应的差异可见一斑。中医诊疗的最显著特点是辩证论治, 因人而异及整体化治疗; 中医药辨证论治的特点, 提倡因人而宜的个体化治疗体系可以认为是个性化医疗的朴素反映; 中药治疗通过多种有效成分对人体多环节、多层次、多靶点的整合调节作用, 符合人体多样性的特点<sup>[7]</sup>。但这些尚有待建立于更科学的理论与实验基础上, 尤其是细胞及基因水平的研究。

除疾病发生发展的不同, 药物作用的个体差异有时是由于药物代谢的不同 (代谢多态性), 有时则是缘于药物靶标的多样性, 研究个体药物反应差异的分子机制将有可能对某些疾病进行基因分型, 进而指导治疗<sup>[6,8]</sup>。硫嘌呤甲基转移酶 (TPMT) 对次黄嘌呤核糖转移酶的代谢是药物代谢酶多样性研究较为清楚的一个, 后者在血液中主要经由 TPMT 甲基化降解, 在人群中低于 1% 的个体 TPMT 活性低下, 由此导致血液中硫肌核苷的堆积, 在儿童白血病及风湿病等使用硫嘌呤治疗时就需特别小心<sup>[6,9]</sup>。 $\beta_2$  肾上腺受体是药物靶标多样性的很好例子, 近年的研究已证实它具有 5 种基因表型, 其中第 16 位氨基酸的变异 (Arg > Gly) 常与肺脏疾病的发生有关, 对  $\beta_2$  肾上腺受体激动剂的作用, 16 位 Arg 的基因型常较 Gly16 变异体明显; 而第 27 位氨基酸的改变 (Gln > Glu) 不影响肺功能, 但 Glu27 基因型显示与肥胖的发生密切相关; 由于此两处等位子的变异发生频率极高, 因而在临床多种疾病治疗中使用  $\beta_2$  肾上腺受体激动剂时就需考虑不同的受体亚型<sup>[6,10]</sup>。

在药物基因组研究中最具应用前景的是正在建立中的单核苷酸多态性 (SNPs) 文库或称基因组多样

性计划, 这也是功能基因组研究的核心内容之一。SNPs 是人类基因组 DNA 序列中数量众多的变异区, 发生率超过 1/1000, 一个 SNP 就是同一群体中不同个体间 DNA 序列中存在一个碱基差异的位点。从理论模型讲, 如果将某一疾病人群与健康群体进行基因比较, 患病个体常存在着与此类疾病相关的一些基因表型 (genotype) 即 SNPs, 根据连锁不平衡原理, 即使与疾病的发生或药物反应无关, 这些 SNPs 的等位子也常常邻近致病突变区, 因而这些 SNPs 的定位就可用于帮助确定疾病相关基因, 发现新的治疗靶位, 或预测个体对某一疾病的易感性<sup>[11,12]</sup>。此外药物基因组学领域还包括了个体对药物及其代谢发生反应的 SNPs 的检测与测序, 此类研究已经开始影响一些新药临床应用时试验者的选择; 其研究将导致某些药物定点使用于特定人群中的个体, 使既往由于难以预测其毒副作用而被遗弃的药物重新得以应用<sup>[8,11,12]</sup>。

对作用、代谢及毒性等较为清楚的药物, 研究其生物效应的个体差异时相对容易, 因为其作用途径上的靶位基因常相对明确。但对一些新的化合物, 包括许多中草药, 由于其生物效应常缺乏相关基础研究, 此时就需要进行全基因组 (genome-wide) 的研究; 此方面较常采用的方法是比较基因组杂交 (comparative genomic hybridization), 即将荧光标记的待检与对照组织样本 DNA 与正常中期染色体杂交, 根据杂交后的荧光强度比反映细胞基因组特定区域的改变, 这一方法近年也已报道用 DNA 芯片完成, 但其缺点是只能检测染色体上较大区域的改变<sup>[13]</sup>。

### 3 基因组学及生物芯片技术在中药研究与开发中的应用

#### 3.1 中医药的现状与问题

中医药是中华民族的瑰宝, 在数千年与疾病作抗争的过程中, 中医药为中华民族的繁衍昌盛做出了重大贡献。但勿容置疑, 在现代主流医学中中医药仅扮演着配角角色, 其原因包括长期以来对中药有效成份的化学研究较差, 药品质量控制不够标准, 疗效判断与西医标准不一致等。近年来随着人们对中医药研究及天然药物需求的增加, 中医药在世界范围日益受到重视并已开始影响到相关产业政策 (表 2), 如美国国家毒理学 (研究) 计划 (National toxicology project, NTP) 拟对 8 万余种人日常接触的食物、保健品及药品等进行毒理学研究与评价, 其中优先考虑的一项即为草药 (herbal medicines), 包括黄连素 (berberine)、银杏叶提取物 (ginkgo biloba extract)

与人参(Ginseng)等在内的一些传统中草药将被系统观察,而以 DNA 芯片为主的一些方法正是毒理机制研究中的主要手段;同时该项目还将特别关注草药与草药,草药与普通药品的相互作用及特定人群如孕妇、儿童和老人对药物的不同反应<sup>[14]</sup>。

**Table 2 Traditional Chinese medicine (herbal medicine)**

NIH Botanical drug definition:

1. A clinically-validated pharmaceutical of plant origin;
2. Typically a multi-component composition derived from an herbal medicine;
3. Market to healthcare professionals;
4. Labeled as drugs;
5. Reimbursable.

目前,传统药主要是中草药在国际市场销售额已超过 150 亿美元,并以每年平均 10 %左右的速度递增,但中国作为中医药大国在这一市场的份额远落后于日本与韩国,在加入 WTO 后,形势更不容乐观。近年国际上更出现了从传统药物如中草药中寻找新药的潮流,中药正成为研究开发新药的源泉;有统计表明,欧美大药厂一般要花费数亿至上亿美元,方可从合成的数千化学品中,筛选出一个药物,有些药物如抗肿瘤药,筛选命中率低至万分之一。中医药有数千年辉煌历史,深刻系统的理论和丰富宝贵的治疗经验,中药材资源及相关方剂数不胜数。因此,由中药开发新药有规律可循,命中率高、花费少和周期短<sup>[14,15]</sup>。

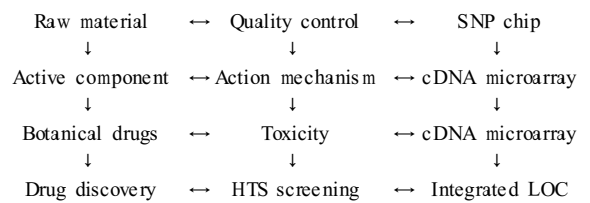
### 3.2 中医药现代化的重要对策——中药基因组学

针对传统中医药存在的弊端,中医药现代化已成为各界的共识,即从中医药理论的宝库中通过机理的研究,研制出有科学根据、疗效好、副作用小,在防病治病上具有特色的创新中药品;中国《中药现代化科技产业行动计划》已于 1997 年底通过。不少研究者认为其中的关键首先在于加强药理学和中药化学的基础研究,包括中药药效的物质基础、作用靶标、准确的临床疗效评价及质量控制等。结合当代基因组科技的进展,我们认为当前中医药的现代化研究应集中体现于中药化学组学特别是中药基因组学,将以生物芯片等为核心的技术引入现代中药研究(表 3)。

中药化学组学是从化学角度分析中药或复方的物质组成特别是有效成份,这方面近几年得到广泛认同的是建立中药指纹图谱。所谓中药(包括复方)指纹图谱是一个半定量的、具有专一性的成分特征谱,它能全面反映中药所含化学成分的种类与数量,

进而反映中药的质量;能较好地体现植物药制剂的均一性、稳定性,从而在整体上把握中药,也能使安全的中药制剂从形式上确定下来,防止有毒成分超标或未知成分出现,从而保证中药产品的质量稳定性和临床疗效的重现性。有专家认为,中药指纹图谱是中药现代化的关键,也是让世界接受和认同中药的关键。中药指纹图谱的建立通常采用高效液相色谱法或气相色谱法<sup>[8]</sup>,国家药品监督管理局也于 2000 年 8 月颁布了《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》。

**Table 3 Biochips and modernization of TCM (standardization, modernization, globalization...)**



近年来随着基因技术的推广应用,国内外多家研究机构已开始研究使用基因芯片对中药(材)进行鉴别,这一技术的前提是获取不同中药样本的特异性基因序列,即基因分型,现在常用的基因分型方法有直接测序荧光能量转移探测(fluorescence energy transfer detection),动力 PCR(kinetic PCR)及荧光偏振(fluorescence polarization)等<sup>[17,18]</sup>;研究者找出某种中药品种的特定基因或 DNA 序列后,将这些特定序列作为探针固定于玻片上制成基因芯片。当一个来自植物或动物的中药样本中含有可以与之互补的特定基因片段时,基因芯片即可以将其测试出来;如果在单片芯片上固定了足够多的来自不同中药样本的特有基因序列,则此种芯片就可以用于多种中药样本的鉴别。

不同中药样本的特异基因序列可理解为广义的中药指纹图谱。随着研究的深入,有希望在不远的将来首先用生物芯片技术对不同质量、产自不同地域甚至不同季节的中药样本进行鉴别。

除了应用于中药的鉴定与质量控制,作为药物基因组学在中医药领域的延伸,中药基因组学一方面研究中药作用及毒性的遗传分子机制,探讨中药作用的个体差异;此外对中药特有的复合成份或复方形式,它研究复方制剂的特定基因作用模式。因此中药基因组学的研究不仅有利于中药作用机理的阐明,同时也是对中药有效成份分析的辅佐,也将对中药新药的开发提供有力帮助。

尽管迄今将生物芯片用于中医药研究的报道极少<sup>[19]</sup>,人们对中医药的生物效应已注意探讨其分子及基因机制<sup>[20]</sup>,同时也开始认识不同基因型对中药治疗的影响<sup>[21]</sup>。中草药提取物由于其成份的复杂性以及多种成份间可能存在的协同作用,常难以分析其生物活性,基因芯片的出现为此提供了一条简易途径,基因芯片可建立方剂或药物的基因表达谱,并通过处方分析筛选优化靶标,观察不同中草药成份的作用与毒副反应。银杏叶提取物(*Ginkgo biloba* extract, Egb761)作为一种拮抗慢性老年性神经病变的口服补剂目前已广泛应用于临床,但其作用机理尚不完全清楚,最近 Watanabe 等<sup>[19]</sup>用高密度的寡聚核苷酸微阵列对服用 Egb761 小鼠皮层及海马组织的基因表达变化进行了观察,结果显示皮层内多种与脑功能相关的基因表达上调,包括微管相关  $\tau$  蛋白,钙离子通道及催乳素等,现已知过磷酸化的  $\tau$  蛋白是 Alzheimer 症脑内神经纤维缠结的主要成份;海马内则仅有甲状腺素转运蛋白(transthyretin)上调,它可能通过对  $\beta$  淀粉样蛋白的清除而发挥神经保护作用;该研究从基因水平提示

了银杏叶提取物可能的作用机制,也初步展示了基因芯片在中药研究中的应用前景。

除上述中药化学组与中药基因组学领域外,转基因药用植物的开发,应用生物技术建立药用动植物基因库以保护药材品种等,也是基因组科技应用于中药研究的重要领域。

### 3.3 中药基因组研究实例

肿瘤耐药性是临床肿瘤治疗中常见的问题,严重影响治疗效果,探讨其发生的遗传分子机制,对指导临床用药及新药开发具有重要意义<sup>[22]</sup>。本中心汪进等<sup>[23]</sup>分别用人白细胞 cDNA 文库制备的基因芯片和含一万个基因的高密度芯片,对抗癌药长春新碱(Vinblastine)诱导的多药耐药(MDR)细胞株 KB-VI 与药敏母细胞株 KB3-1 基因表达的差异进行了研究,显示耐药细胞株存在 CGA 及 CLU 等 10 余个基因表达的显著上调(图 1),Northern 杂交结果支持了芯片发现,研究还观察了药敏细胞株在耐药发生过程中基因表达的动态变化。此类研究的进一步深入将有可能用于对特定肿瘤患者进行药物敏感性分型及指导治疗。

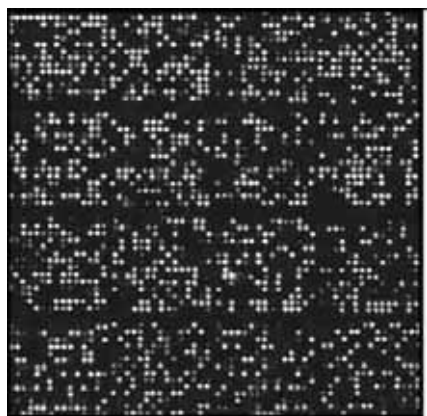


Figure 1 Gene expression profiling in multidrug resistant KB cells using cDNA microarrays

Two KB cell lines (KB3-1 and KB-VI) were purchased from the American type culture collection. KB-VI cell is a derivation of the MDR KB cell line obtained by selection of KB3-1 with vinblastin. KB3-1 and KB-VI cells were cultured in DMEM media supplemented with 10% heated-inactivated fetal calf serum. The cDNA microarray arrays consisted of a total of 12,720 members, of which 2640 randomly picked from a Leukocyte library (Research Genetics) and 10,080 known genes and EST clones from incyte cloneset. PCR products from these clones were prepared and spotted on glass slides. Fluorescently labeled cDNA with Cy3 or Cy5 (Amersham Pharmacia) was synthesized from 50 ~ 100  $\mu$ g of total RNA by oligo(dT)-primed polymerization using Super Script II reverse transcriptase (Life Technologies, Inc.) as described previously. For each hybridization the same reference RNA from KB3-1 and KB-VI were used. One labeled with the fluorescent dye Cy3 and the other with Cy5. After purification,

the two cDNA pools were mixed and applied to the array in a hybridization mixture containing  $3.5 \times \text{SSC}$ , 0.3% SDS and 10  $\mu$ g yeast tRNA. Hybridization took place under a glass coverslip in a humidified chamber at 65  $^{\circ}\text{C}$  for 14 ~ 16 h. The slides were washed, dried and scanned in ScanArray 4000.

Average signal intensity and local background measurements were obtained for each spot on the array by using QuantArray and Scanalyze softwares. Local background was subtracted from the value of each spot on the array. The two channels were normalized with respect to the median values for the remaining set of the array. The Cy5/Cy3 fluorescence ratios and  $\log_{10}$  transformed ratios were calculated from the normalized values.

**Up-regulated genes in KB-VI:** Clusterin (complement lysis inhibitor) glycoprotein hormones, alpha polypeptide nuclear body protein Sp140 serum/glucocorticoid regulated kinase. Homo sapiens peptidylprolyl isomerase B inhibitor of DNA binding 1, dominant negative helix-loop-helix protein. Fukutin inducible poly(A)-binding protein enolase 3, (beta, muscle). Phosphatase and tensin homolog.

**Down regulated genes:** Dual specificity phosphatase 11 bladder cancer related protein (10 ku) alkaline phosphatase, placental (Regan isozyme), glycyl-tRNA synthetase, dihydrofolate reductase, ribosomal protein L15, dual specificity phosphatase 11, KIAA0450 gene product, bladder cancer related protein (10 ku), alkaline phosphatase, placental (Regan isozyme), glycyl-tRNA synthetase, dihydrofolate reductase, ESTs interferon, alpha 2, ribosomal protein L15

阿藿烯(*ajœne*)是大蒜粗提取物中的一种主要成份,其抗癌作用尤其对胃肠道肿瘤及白血病等的治疗已得到体内外实验的证实;但其作用机制及途径等迄今尚不清楚<sup>[24,25]</sup>。本中心方志俊等<sup>[26]</sup>用入白细胞 cDNA 文库构建了含 2400 个基因的 DNA 芯片,然后对经阿藿烯处理的人早幼粒白血病细胞株 HL60 细胞基因表达的改变进行了观察;实验显示 HL60 细胞经处理 24 h 后有 28 个基因的表达发生改

变(包括 7 个 ESTs),其中分泌颗粒 1 (secretory granule1), $\beta_2$  微球蛋白及 16S 核糖体 RNA 等多个与细胞周期及凋亡相关的基因表达显著上调,流式细胞仪检测也显示细胞凋亡的增加,提示阿藿烯的作用可能与此相关<sup>[27]</sup>;研究还对不同时相的基因表达谱进行了初步聚类分析,更清楚显示了单个基因的动态变化及可能途径(图 2)。

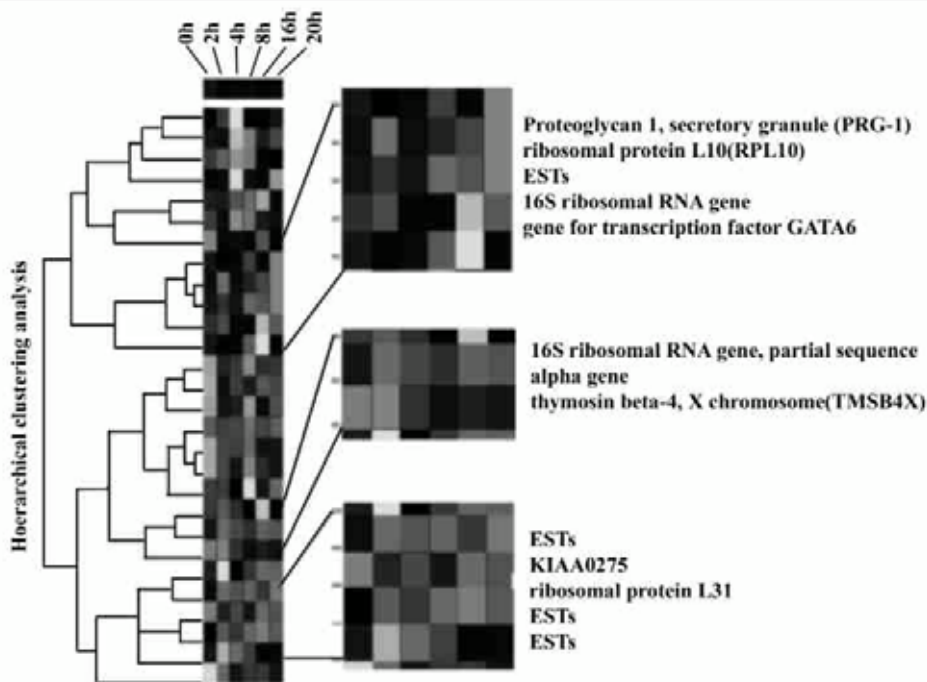


Figure 2 Gene expression profiling of human promyelocytic leukemia HL-60 cell treated with Ajoene Provided by National Laboratories of National and Biomimetic Drug, Beijing University. The final concentration in the experiment was  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ . 2400 genes were amplified with the polymerase chain reaction (PCR) from human leukocyte library (Clontech) and arrayed on the poly-L-lysine coated glass slides using SPBIO (Hitachi). Cultured HL-60 cells were harvested and dissolved with TRIZOL reagent (Gibcol BRL). Total RNA was isolated according to the manufacturer's protocol. Same amount (50  $\mu\text{g}$ ) of total RNA from control or treated group were reverse transcribed to cDNA using SuperScript II reverse transcriptase. Fluorescent dyes Cy3 and Cy5 labeled dUTP (Amersham Pharmacia) were incorporated into the cDNA respectively. The two cDNA pools were mixed and applied to the array in a hybridization mixture containing  $3.5 \times$  sodium chloride-sodium citrate (SSC), 0.3% sodium dodecyl sulfate (SDS) and 10  $\mu\text{g}$  yeast tRNA. Hybridization took place under a glass coverslip in a humidified chamber in a 65  $^{\circ}\text{C}$  Hybridization Chamber for 14 ~ 16 h. The slides were then washed, dried and microarray images from two-color fluorescence hybridization were scanned by using ScanArray 4000. The scan images were analyzed using software ScanAlyze (Standford University)

中药贝母(*Fritillaria*)有许多种类,一些外观非常类似,但医疗属性与市场价值相差甚远,其中以川贝质量为最佳。根据草本植物中高度保守的 26S DNA 基因 D1 至 D12 区在不同种属具有多态性,可作为鉴别依据的特点<sup>[28]</sup>,本中心蔡佩欣等首先提取来自多种贝母根茎的基因组 DNA,对 26S DNA 基因 D2 与 D3 区的多态性片段进行直接测序,将针对不同种属多态性片段的特异性寡核苷酸探针点制于经多

聚赖氨酸处理包被的芯片。然后设计特定引物,用来自不同种属贝母的 PCR 产物与固定的寡核苷酸探针进行杂交,由于在 PCR 反应过程中使用了荧光素标记的 ddNTPs,不同贝母种属即可在芯片不同位置检测到荧光信号。从而提供了一种快速高效的集基因分型和中药鉴别于一体的方法(图 3);显示 DNA 芯片技术可为植物种属的验证与质量控制提供一种快速、高通量的检测工具。



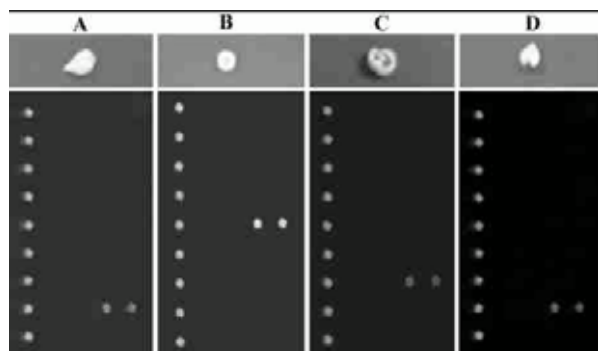


Figure 3 Image shows the hybridization results of 4 species of *Fritillaria*

A. *F. przewalskii* ( Jianbei ); B. *F. ussuriensis*; C. *F. unibracteata* ( Songbei ); D. *Fritillaria cirrhosa*. Genomic DNA was extracted and the resulting pellet was dissolved in Tris-EDTA buffer. The primers used for amplification of 26S rRNA gene for various species of *Fritillaria* were Nnc26S2 forward primer (5'-GAG TCG GGT TGT TTG GGA-3') and 950rev reverse primer (5'-GCT ATC CTG AGG GAA ACT TC). A 50  $\mu$ L PCR reaction mixture consisted of 10  $\mu$ L 10x PCR reaction buffer, 1  $\mu$ L each of 10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> stock dNTPs, 5  $\mu$ L forward and reverse primers and 5 unit of AmpliTaq polymerase (PE Applied Biosystems). 50 ng genomic DNA was used as a template for the PCR reaction. The PCR condition was follows: an initial 5 min at 94  $^{\circ}$ C followed by denaturing at 94  $^{\circ}$ C for 1 min, annealing at 55  $^{\circ}$ C for 1 min, elongation at 72  $^{\circ}$ C for 2 min with 30 cycles and final extension for 5 min at 72  $^{\circ}$ C. DNAs were then purified by QIAquick PCR purification kit (QIAGEN).

A mixture contains 31.25 ng of PCR products, 100 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris, pH 9.5, 4 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> TAMRA-labeled ddATP and ddCTP, 2 units of DNA polymerase and 1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> primer mix containing primers F5-6 (5'-TTC GGA TGG ATT TGA GTA AG-3'), F6 (5'-TGC AAA TCG ATC GTC G-3'), F7 (5'-CCG GTC AAA GGC CT-3'), F8 (5'-TGA AAG GGA AGC ACT GG-3'), F1-2-9-10 (5'-TTT GAA AAG AGA GTC AAA GAG TG-3') and FRIT (5'-GAA ACA CGG ACC AAG G-3') in 10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Tris solution, pH 9.5. Cycling conditions consisted of 30 s denaturation at 96  $^{\circ}$ C, followed by 30 s annealing at 50  $^{\circ}$ C and 1 min extension at 60  $^{\circ}$ C. All steps were repeated 30 times. The fluorescence-labeled mixtures were then used for hybridization.

Six oligonucleotide probes with different length (14 - 23 nt) were designed to be complementary to their particular amplicons. The probes are F5-6-CP (5'-CTT ACT CAA ATC CAT CCG AA-3'), F6-CP (5'-CGA CGA TCG ATT TGC A-3'), F7-CP (5'-AGG CCT TTG ACC GG-3'), F8-CP (5'-CCA GTG CTT CCC TTT CA-3') and FRIT-CP (5'-CCT TGG TCC GTG TTT C-3'). 2  $\mu$ L of each of 200 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> capture probes was mixed with a proprietary spotting solution and then printed on the polylysine glass slide by an array printer (SPBIO).

5  $\mu$ L of each PCR mixture was mixed with 0.5  $\mu$ L of 12x hybridization buffer (16x SSC and 0.2 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup> Salmon sperm DNA) and 0.5  $\mu$ L of 0.8% SDS. Hybridizations of DNA chips were performed by incubating these solutions for 4 hours at 50  $^{\circ}$ C. The slides were then washed

#### 4 展望

伴随后基因组时代的来临,人类对许多生命现象包括疾病的认识将更多地是在基因水平演绎,生物芯片为该时代提供了一种高效有力的工具;药物基因组学,其潜在的应用范围涵盖从治疗靶基因的发掘到临床药物作用与毒性的预测,甚至包括通过减少试验病例加快药物开发效率<sup>[5]</sup>。所有这一切,同样适用于传统的中医药,也为正力求现代化的中医药提供了一个契机。

中医药正逐步为世界所认识接受是不可否认的事实与潮流,但我们也耳闻目睹中医药走出国门的艰辛,国外公司凭借当今生物技术与资金的优势研发或取走基于中医药理论的药物已屡有报道,又如美国FDA近年对许多药物的2,3期临床试验已增加了血液中SNPs的检测与评估,与现代生物科技的脱节将使中医药宝库有可能面临被瓜分的境地,而这应该是众多国人所不愿见到的。

中医药强调综合疗效,治标治本,标为症状,本为病因,在对一些病因较为明确的疾病的治疗中,通过生物芯片对药物成份谱(如君药,臣药)与基因表达谱进行综合研究,将有助于了解特定中药成份的确切治疗靶位和一些天然药物的开发;而随着越来越多中药或复方作用机制的阐明,也能促进一些疾病发生与发展过程的研究。

#### REFERENCES:

- [1] Lockhart DJ, Winzler EA. Genomics, gene expression and DNA arrays [J]. *Nature*, 2000, **405**(6788): 827 - 836.
- [2] Harrington CA, Rosenow C, Retief J. Monitoring gene expression using DNA microarrays [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2000, **3**(3): 285 - 291.
- [3] Scherf U, Ross DT, Waltham M, et al. A gene expression database for the molecular pharmacology of cancer [J]. *Nat Genet*, 2000, **24**(3): 236 - 244.
- [4] Zweiger G. Knowledge discovery in gene-expression-microarray data: mining the information output of the genome [J]. *Trends Biotechnol*, 1999, **17**(11): 429 - 436.
- [5] Evans WE, Relling MV. Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics [J]. *Science*, 1999, **286**(5439): 487 - 491.
- [6] McLeod HL, Evans WE. Pharmacogenomics: unlocking the human genome for better drug therapy [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001, **41**: 101 - 121.
- [7] Zhu YP. *Chinese Materia Medica - Chemistry, Pharmacology and Applications* [M]. Harwood: Academic Publishers, 1998. 1 - 32.
- [8] McCarthy JJ, Hilfiker R. The use of single-nucleotide polymorphism maps in pharmacogenomics [J]. *Nat*

- Biotechnol*, 2000, **18**(5):505-508.
- [9] McLeod HL, Krynetski EY, Relling MV, *et al.* Genetic polymorphism of thiopurine methyltransferase and its clinical relevance for childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. *Leukemia*, 2000, **14**(4):567-572.
- [10] Hoit BD, Suresh DP, Craft L, *et al.* Beta 2-adrenergic receptor polymorphisms at amino acid 16 differentially influence agonist-stimulated blood pressure and peripheral blood flow in normal individuals [J]. *Am Heart J*, 2000, **139**(3):537-542.
- [11] Kwok PY, Gu Z. Single nucleotide polymorphism libraries: why and how are we building them? [J] *Mol Med Today*, 1999, **5**(12):538-543.
- [12] Riley JH, Allan CJ, Lai E, *et al.* The use of single nucleotide polymorphisms in the isolation of common disease genes [J]. *Pharmacogenomics*, 2000, **1**(1):39-47.
- [13] Pollack JR, Perou CM, Alizadeh AA, *et al.* Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays [J]. *Nat Genet*, 1999, **23**(1):41-46.
- [14] Gong X, Sucher NJ. Stroke therapy in traditional Chinese medicine (TCM): prospects for drug discovery and development [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1999, **20**(5):191-196.
- [15] Qin GW, Xu RS. Recent advances on bioactive natural products from Chinese medicinal plants [J]. *Med Res Rev*, 1998, **18**(6):375-382.
- [16] Li SL, Lin G, Chan SW, *et al.* Determination of the major isosteroidal alkaloids in bulbs of *Fritillaria* by high-performance liquid chromatography coupled with evaporative light scattering detection [J]. *J Chromatogr A*, 2001, **909**(2):207-214.
- [17] Shi MM. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies [J]. *Clin Chem*, 2001, **47**(2):164-172.
- [18] Cai ZH, Li P, Dong TTX, *et al.* Molecular diversity of 5S-rRNA spacer domain in *Fritillaria* species revealed by PCR analysis [J]. *Planta Med*, 1999, **65**(4):360-364.
- [19] Watanabe CM, Wolfram S, Ader P, *et al.* The *in vivo* neuromodulatory effects of the herbal medicine Ginkgo biloba [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(12):6577-6580.
- [20] Li XK, Motwani M, Tong W, *et al.* Huanglian, A Chinese herbal extract, inhibits cell growth by suppressing the expression of cyclin B1 and inhibiting CDC2 kinase activity in human cancer cells [J]. *Mol Pharmacol*, 2000, **58**(6):1287-1293.
- [21] Ren M, Ju S, Zhang Z. Curative effect of TCM WM therapy on Wilson disease with different clinical phenotypes and polymorphisms of ATP7B gene [J]. *Chin J Integrated Tradit Chin West Med* (中国中西医结合杂志), 1998, **18**(11):652-654.
- [22] Levenson VV, Davidovich IA, Roninson IB. Pleiotropic resistance to DNA-interactive drugs is associated with increased expression of genes involved in DNA replication, repair, and stress response [J]. *Cancer Res*, 2000, **60**(18):5027-5030.
- [23] Wang J, Huang MH, Tsang LCH, *et al.* Gene expression profiling in multidrug resistant KB cells using cDNA microarrays [J]. *Chin J Cancer Res*, 2002, **14**:11-17.
- [24] Dirsch VM, Vollmar AM. Ajoene, a natural product with non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID)-like properties? [J] *Biochem Pharmacol*, 2001, **61**(5):587-589.
- [25] Scharffenberg K, Wagner R, Wagner KG. The cytotoxic effect of ajoene, a natural product from garlic, investigated with different cell lines [J]. *Cancer Lett*, 1990, **53**(2-3):103-108.
- [26] Fong CC, Wang MS, 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.
- [27] Dirsch VM, Gerbes AL, Vollmar AM. Ajoene, a compound of garlic, induces apoptosis in human promyeloleukemic cells, accompanied by generation of reactive oxygen species and activation of nuclear factor kappa B [J]. *Mol Pharmacol*, 1998, **53**(3):402-407.
- [28] Kuzoff RK, Sweere JA, Soltis DE, *et al.* The phylogenetic potential of entire 26S rDNA sequences in plants [J]. *Mol Biol Evol*, 1998, **15**(3):251-263.

## APPLICATION OF GENOMICS AND BIOCHIP TECHNOLOGY IN RESEARCH AND DEVELOPMENT OF CHINESE MATERIA MEDICA

YANG Zhuang<sup>1</sup>, ZHANG Ya-ou<sup>1</sup>, WONG Maan-sao<sup>2</sup>, XIAO Pei-gen<sup>2,3</sup>, MICHAEL M. Yang<sup>1</sup>

(1. City University of Hong Kong, Hong Kong, China; 2. Department of Applied Biology and Chemical Technology, the Hong Kong Polytechnic University, Hong Kong, China; 3. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medicinal Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China)

**KEY WORDS:** genomics; biochip; research and development; Chinese materia medica