

消化道基因治疗:中医药治疗机制的探讨

Gene Therapy through Digestive Tract——The Elucidation of the Mechanism of Traditional Chinese Medicine

郑文岭

(广州军区广州总医院, 副主任医师 广州 510010)

马文丽

(第一军医大学基础部, 讲师, 博士后 广州 510515)

摘 要 中药作用的机制目前仍是一个谜。本文提出,中药动植物成分中的核酸经过煎煮热变性、胃酸变性、肠液复性、胆汁乳化、脂质体形成等体内外处理过程后,将有可能通过自然生理的过程,经过消化道将外源性基因导入人体细胞中,而达至基因治疗的功效。初步的实验结果也已证实了上述消化道转基因方式的存在。消化道转基因的巧妙过程,将为基因治疗提供一种更为简便易行、既符合生理特性又疗效确切的全新模式;并有可能由此最终揭示中医药治疗的机制,使这一中华民族的传统宝藏得到重新开发和弘扬。

中医药在维护中华民族数千年的繁衍过程中起着十分重要的作用。但迄今为止,对于中医药治疗效果的原理仍没有令人信服的理论模型。依据传统的中医药理论,虽有可能对各种疾病进行辩证施治,但中医的辩证医理毕竟源自千年以前,因而带有浓重的原始辩证或循环推理等朴素的唯物主义色彩,不仅不易为人们广为接受,而且无法与当代科学接轨,因而严重地阻碍了中医药理论和实践的发展。本文作者在研究生物细胞的信息过程中发现,通过体内外的处理过程,经消化道后中医药可将自身细胞中的小分子核酸物质转入人体细胞中。这给予我们提示:中医药经消化道服用的过程,是一种将中药的基因物质转入机体细胞的方式,实质

上是一种经过消化道的基因治疗过程。中医药治疗机理的揭示,将会大大促进中医理论的发展和实际应用的推广。这一机制同时还提示了饮食及其它与饮食有关的自然疗法的原理,这将为医药新模式的推出奠定基础;也将为中药及基因治疗新途径的开拓,展示诱人的前景。

一、中药的人体外过程分析

中药有各种成分,多数方剂中均以动、植物成分为主。不同中药方剂中的动植物经相应的不同方法体外干燥后,一般可以长期保存,使用时方剂中多种动植物成分先行混合,在煎锅中煎制一定时间

大受益于淤地坝的蓄水功能,这为实现较大区域上的侵蚀稳定奠定了基础。

包括坝系农业在内的区域生态环境重建研究工作,要努力阐明不同立地条件下,个体、种群、群落和生态系统四种水平上生物体生长所涉及的生态幅、生态位和系统稳定的域值特征,并由此确立黄土高原生态建设的可行途径。这方面的研究可望在地理生态位理论、干旱区生态场理论和黄土区生态系统稳定性理论上取得突破性进展,以把这一地区的生态环境建设纳入一个科学化、区域化和稳定

化的轨道。但目前要做到这一点还有不少困难,因为这一地区生态建设方面的许多基本问题仍没有研究清楚。

最后有必要进行的一项研究是关于治黄新思路方面的探讨工作,因为坝系农业研究本身并不等于治黄研究,前者更无法代替后者。但坝系农业思想的提出却为治黄新思路的建立提供了极有益的启示,如何从中重新审视黄河问题的性质、确立治黄工作的新思路,将是一项很必须的工作。

(责任编辑 冷远猷 蔡德诚)

后便形成具有治疗作用的中药汤剂。从生物学角度分析这一简单过程,就可以发现其中所包含的生物学意义。现代生物化学研究发现,大多数酶促反应均需一定的液相环境中才能进行。因此,动植物成分脱水干燥,能有效地停止动植物细胞中各种化学反应,从而使动植物细胞质中原有的各种分子不被降解,得到长期保存。特别是核酸类物质,在干燥状态下,有可能长期地保存。

在中药煎制过程中(见封二图 1:中药体外过程分析),各种已被干燥处理过的动植物细胞将吸水、膨胀,并随着温度的上升和延续,植物细胞壁受热而破裂,动植物细胞膜的脂质由于受热而重新呈流动态(液态),导致细胞内容物的泄露。泄露出的蛋白质由于热变性作用可发生沉淀;泄露出的核酸成分虽亦可发生变性,但核酸变性的方式仅仅是立体结构的消除(双链解开,单链伸直),特别是小分子核酸物质,虽发生了变性,但在高温状态下仍呈可溶性状态,可通过煎制成的汤剂经口服进入体内。在可溶性成分中还含有某些具有生物活性的生物硷类。

中药煎制过程不仅导致上述生物活性物质自细胞质中释放,还由于持续加热,致使煎剂中存在的各种水解酶、特别是降解核酸的核酸酶活性大为降低。

二、中药的人体内过程分析

经煎制后的中药,其可溶性部分被服入人体内后,经历以下几个过程(见封二图 2)。

1. 胃酸变性阶段:可溶性中药成分中的核酸及生物硷经口服进入胃后,由于其中的刺激性物质刺激胃粘膜,导致胃酸的分泌。生物硷遇胃酸后其结构遭破坏;而胃酸作用于中药可溶性成分中的核酸时,由于氢离子的存在,导使核酸进一步发生变性。因此,经体外加热及体内胃酸的作用,中药中的核酸成分发生了较为完全的变性。

2. 通过十二指肠阶段:在胃酸中发生变性的核酸进入十二指肠后,十二指肠的碱性肠液迅即中和胃酸与中药的混合液,导致变性的小分子核酸迅速复性。但较大的核酸片段由于碱性液的突然混合,不易复性,依然呈变性状态(即相当于进行分子杂交之前的淬火过程),并在中和后呈中性的肠液中形成沉淀,因而与可溶性的、已被复性的小分子核酸分开。

3. 胆汁混合阶段:可溶性肠液与胆囊分泌的胆汁混合,核酸、脂质及胆盐相互作用形成脂质体(liposomes),球形脂质体的形成有几方面的作用:第一,形成疏水环境,保护被包绕的核酸成分,使其免受肠液中碱性物质的进一步破坏。第二,包绕核酸,

使其免受各种核酸酶的作用。第三,也是最重要的一点,即通过脂质体转基因(lipofection)过程或以胞吞的方式,使脂质体包裹的核酸物质被转至机体细胞中。

4. 转基因过程:包绕核酸物质的脂质体进入小肠后,特别是在空肠上部,由于脂质体与肠上皮细胞间的相互作用,可使由脂质体包裹的基因被导入肠上皮细胞。

脂质体包裹基因进入细胞的途径有两种:

第一,通过脂质体转基因的方式:在小肠中形成的脂质体,实际上与各种乳化剂(脂肪酸、胆固醇、卵磷脂、胆盐等)相互作用下形成的混合性微团(Mixed Micelle)是非常相似的。不同之处在于脂质体内包裹着有很强负电荷的核酸。脂质体由于直径小,并且表面张力较低,因而可以弥散至肠粘膜上皮细胞顶端的微绒毛之间,而与肠上皮细胞直接接触(见封二图 3),进而,通过脂质体转基因方式,即通过脂质体膜与肠上皮细胞膜的接触、融合,将内部包裹的基因导入肠道上皮细胞内。

第二,通过胞吞方式(Cytosis):虽然高等动物已不把这种原始机制作为消化吸收主要方式,但经常发生的食物过敏现象证明,胞吞现象在肠道上皮中是普遍存在的。胞吞现象的过程如下(见封二图 4),基因物质包裹于脂质体中,后者与肠上皮细胞或细胞的微绒毛接触后,脂质体可被细胞膜包裹,进而被卷入细胞中,形成胞质体(Cytosome)。

上述两种方式的过程类似,但却存在本质的区别。脂质体转基因方式是将基因物质直接导入肠上皮细胞,而胞吞方式则可能将脂质体包裹的基因进一步导入机体的其它细胞。

三、中药基因物质细胞内过程分析

1. 用脂质体转基因方式将基因直接导入肠上皮细胞(见封二图 3)。以 mRNA 为例,核酸物质进入肠上皮细胞后,由于自然界核酸密码的通用性,动植物来源的 mRNA 在人体细胞中亦可被识别,并被运送至等待翻译的位置,随即与核糖体等物质发生结合,进而翻译(生产)出相应编码的特殊蛋白质。翻译出的蛋白质可在肠上皮细胞原位行使其特殊的生物学功能,或者被修饰(例如加接上可分泌出细胞的信号肽(Signal Peptide)后分泌出肠道细胞,再经血液循环被运至肠道之外的靶器官,行使其特殊的生物学功能。

2. 胞吞作用则是将包绕基因的脂质体吞入肠道上皮细胞(见封二图 4),形成胞质体,胞质体可与肠上皮细胞内的溶酶体发生融合,进而被降解、消化。胞质体亦可移行至粘膜上皮的侧面或底面,通过出胞作用(Exosis),将内容物转运出细胞。后者

与在细胞中合成装配的乳糜微粒一起,进入淋巴管、进而进入血液。细胞出胞的具体过程是这样的,细胞内囊泡或胞质体移至细胞膜,与细胞膜接触而融合,在融合处出现裂孔,囊泡或胞质体内容物从裂孔处排出,通过肠道粘膜下的中央乳糜管进入淋巴系统。

3. 进入淋巴系统脂质体的归宿:由于淋巴系统中有许多淋巴细胞,脂质体进入淋巴细胞管后,很快即可通过脂质体转基因方式,将包裹的基因导入淋巴细胞,然后通过基因表达或翻译有关的细胞内结构相结合,表达出具有生物活性的蛋白质,调节相应细胞的功能。事实上,进入淋巴管的脂质体亦可将其包裹的基因转入淋巴管内皮细胞中,经胸导管进入血液循环后,还可将基因转入血管内皮细胞;而进入血液循环的脂质体,在具有血窦的脏器中,还可与相应细胞发生接触(如肝细胞、脾细胞等),因此基因物质也可导入这些细胞中,通过在细胞内表达生物活性物质来调节细胞的功能,或将产物分泌入血,以调节整个机体的功能。

并非所有被脂质体包裹的基因都可以经历上述过程最终产生生物学效应。有些基因物质导入胞质后,被胞质中存在的核酸酶降解,还有些基因物质,虽包裹于脂质体中,或以胞吞的方式进入细胞,形成胞质体,但与胞质中的溶酶体融合而被溶酶体酶所降解。然而,从中药的体内外处理过程分析可知,煎制后的汤剂中含有大量的可溶性核酸物质,这些核酸物质的量在服入体内时,远远超过肠道细胞所能降解的能力,因而未被降解的核酸便以上述转基因及基因表达的方式,行使其基因治疗的功效。

四、消化道转基因过程的实验证实

为验证上述推论的正确性,我们构建了一个来自烟草镶嵌病毒(Tobacco Mosaic Virus, TMV)的基因工程载体(见封三图2)。该质粒含有TMV的复制起始点,故在烟草植物中可呈高拷贝增殖。在其中插入一外源基因—氯霉素乙酰基转移酶(CAT)基因,作为报告基因(Report Gene),后者表达的产物氯霉素乙酰基转移酶可将同位素 C^{14} 标记的氯霉素水解,通过薄层纸层析,可将水解产物分开,再经放射自显影,通过检测氯霉素乙酰基转移酶的活性,间接检测CAT基因是否被导入细胞。

将TMV—CAT质粒以Sfi I内切酶酶解后使其呈线性,利用体外转录系统,使TMV—CAT DNA转录出相应的mRNA。将含有转录产物的转录混合物涂擦烟草叶片后,继续培养,于第14天左右,收获被重组TMV感染的烟草,则烟草叶中含有大量的重组TMV—CAT DNA及其相应的转录产物。将收

获的烟草植物烤干,室温保存。

取干燥后的烟草,按常规中药煎制方式,煎煮一定时间,汤剂冷却至室温后,饲喂大白鼠,每日一次,连续七天。一周后大鼠被麻醉至死,取空肠段粘膜,以常规方法检测CAT的活性。

如封三图4所示,转入CAT基因的大鼠空肠粘膜中,具有明显的CAT活性(图中3、4),可见 C^{14} 被CAT解离,层析时表现出较高的迁移率。对应的未转入CAT基因的对照组大鼠肠粘膜中,基本没有CAT活性(图中1、2)。该结果证实,外源基因确实可经消化道天然生理过程,将其导入机体的细胞中。这一机制的揭示,将对中医药理论和实践的探讨,开拓一条全新的途径,同时也使中药治疗的各种特点得以科学地解释。

很早就已发现,中西医不同的治疗方式,产生的治疗效果各有自己的特点。西方当代医学多采用单一、纯化的化学分子,采用口服或注射的方式,使其进入体内,虽然血药浓度快速升高,但产生的治疗效果却是即时性的。由于小的化学分子易于从肾脏排泄,血药浓度只能维持一定的时间,因此其治疗效果又是一过性或纠正性的。而中药治疗的特点则是缓效、持续和调节性的。

中药治疗的各种特点可以从我们的分析中得到解释。由于中药作用本质是基因导入,从基因导入到产物生成需要一定的时间,故而,其效果产生比较缓慢。由于导入基因具有一定的半衰期,所以在核酸被降解之前,其产物的生物学功效将持续存在,因而其作用是持续性的。还由于基因被导入细胞中后,产物可以更直接地与细胞内各种成分相接触,从而可产生明确的调节性作用。

五、消化道基因治疗机制揭示与研究的意义

1. 有助于中药治疗机制的最终阐明

中药的治疗机制至今仍未被揭示。本文提出的中药作用新学说,有可能使传统的中医药治疗与全新的基因治疗有机地融为一体。虽然导入基因性质(mRNA或小分子DNA片段)的明确,还需要深入细致的工作,但我们的实验已经证实,外源基因确实可以通过自然、生理的消化过程,被导入肠道上皮细胞,进而有可能被导入体内的其它脏器细胞。中医药消化道转基因过程的揭示,使中药治疗的各种特点得到圆满的解释,也必将有助于中医药作用机制的最终阐明。

2. 提示一种全新基因治疗方式

迄今,进行基因治疗的操作方式包括病毒载体法、脂质体法及多种物理方法(电激、激光或基因枪等)。将外源基因通过非生理手段导入机体细胞,姑

且不评价各种方式对机体造成的损害(野生性病毒的产生等)及其治疗效果,仅对其制备过程分析即可发现,现行的基因治疗是一极其昂贵的过程,如果在制备方法上没有革命性的突破,基因治疗很难为人们广为接受。

我们在此提出的消化道基因治疗方式,由于其在极大的程度上利用了体内外自然、生理的处理机制,将外源基因十分简易、巧妙地导入机体细胞中,因此,为基因治疗的开展提示了一条简便、易行、符合自然与生理的巧妙过程。是基因治疗的一种全新模式。

3. 可导致多基因治疗的模式

中药的消化道基因治疗还具有另一些独特的优点。常规的基因治疗,由于基因制品制备的复杂和昂贵,一般只能采用单一基因的导入。相比之下经消化道的基因治疗过程可以方便地采用多基因导入的方式。

多基因治疗与单基因治疗相比,有着明显的优势。单基因治疗一般适用于纠正单基因缺失等较为局限的疾病,而多基因治疗将适应于广泛的各种疾病。以中药的消化道基因治疗过程为例(见封三图3),假设在植物细胞中生产某种生物硷的一个代谢通路需要三个酶,在中药体内外处理过程中,三个酶的基因(mRNA),将分别经热变性、酸变性、碱复性、脂质体包裹、转基因,最后被导入肠道上皮细胞内。三种基因同时被转入同一细胞的可能性是很大的(三种基因被包裹于同一脂质体中,或包入不同脂质体但转入同一细胞中)。当此三种基因被同时转入同一细胞内时,则三种基因的表达产物(酶)可在肠道上皮细胞中重新构建起原来的代谢通路,重新在人体细胞中合成出生物硷,进而持续性地、可被调控地将生物硷导入血液循环,产生治疗功效。这种多基因治疗的潜力是巨大的。将其它动植物中的代谢通路,暂时转导至人体细胞中,在某种意义上讲,将使人体细胞的功能得以极大的拓广和延伸。

4. 饮食机制的进一步拓宽

饮食最重要的目的是为机体提供营养,但由于各种食物的烹饪过程与中药的煎制有着极为类似的处理方式,食物中基因物质导入人体细胞的过程必然也是存在的。事实上,中医药理论一直就把食物看作是药物的一部分,很早就提出了所谓“食药同源”的概念。从以上分析中,人们不仅可以验证中医理论中以动物脏器“补”人体脏器的真实性(即动物脏器中的功能相近的基因为人体所用),而且为从基因水平,对饮食机制进行深入研究,提供了全新的思路。

5. 进化及生态学意义

大自然千姿百态、各有千秋,由于基因组容量的限制,人体细胞不可能含有所有生物的全套基因,因此,随着人类进化中获得更高级的遗传特性,原始的、用途不太多的基因,将根据节约和用进废退的原则,逐渐从人体基因组中丢失。反之,由于自然界进化中形成的生物链,人们经常进食的食物中的基因物质,可以通过消化道转基因过程,将人体所需的基因导入人体细胞,进而产生相应的蛋白质,行使特殊的功能。这种长期的供给关系的结果,会造成人类细胞中相应基因的荒置(idle)而逐渐被关闭、丢失。自然界进化时形成的生物链,不仅为相应的生物提供了营养物质,而且还提供了功能补偿性基因。

当前生态环境的恶化,已对许多生物的生存造成了严重的威胁。由于基因的进化是一极其漫长的过程,所以如果某种生物突然灭绝,则依靠这种生物提供补偿基因的另外的生物也必然受到威胁,进而将启动某种恶性循环,最终将危及整个人类的生存。

6. 中药新产品的开发

通过对中药作用机制的分析,可以清楚地发现,如果将有药用价值的基因转至其它植物(如某些蔬菜)中,使其在植物中复制增殖,则该植物将具有中药类同的功能,这将会有利于一些名贵中草药的开发。通过基因工程的手段,还将开发出更为直接高效、价廉物美的中药新产品。

六、结 语

在维系中华民族数千年的繁衍过程中,中医药有着不可磨灭的功绩。中医药有确切的疗效,但却不能被现有的理论直接解释,提示其中存在着更为深奥的机制。通过对中药体内外过程的仔细分析,令人惊异地发现,中药的体外煎制、胃酸作用、肠液中和、胆汁乳化,其实即是一巧妙的裂解细胞、变性核酸、纯化小分子核酸和形成包裹核酸脂质体的过程。脂质体进一步可通过脂质体转基因方式,将基因导入人体细胞中,从而实现这一浑然天成、妙不可言的消化道基因治疗过程(见封三图1)。

基因治疗是目前国际上生物治疗发展的前沿,虽然已采用了各种复杂的基因治疗方式,但经消化道基因治疗从未有人提出过研究过。我们这里提出的新模式,不仅将为基因治疗提示更为经济、简便、符合自然和生理的全新途径,而且极有可能完全揭示中药作用的机制,使中华民族这一传统的瑰宝,在21世纪生物学时代即将到来之际重现生机,在当代科学的最前沿,释放出更加绚丽夺目的光彩。

(责任编辑 蔡德诚)