

高通量筛选技术在中药研究的应用

★ 韩博 陈文 杨春梅 (新疆石河子大学药学院 石河子 832002)

关键词:高通量筛选技术;中药研究;药物筛选

中图分类号:R 284.1 文献标识码:A

高通量筛选(high throughput screening, HTS)技术是将多种技术方法有机结合而形成的新的技术体系,它以分子水平和细胞水平的实验方法为基础,以微板形式作为实验工具载体,以自动化操作系统执行实验过程,以灵敏快速的检测仪器采集实验数据,以计算机对实验获得的数据进行分析处理,在同一时间内对数以千、万计的样品进行检测,并以相应的数据库支持整个技术体系的正常运转^[1]。该技术正逐渐地发展成为新药发现的重要手段。中医药(TCM)是中华民族在长期的生产、生活中逐渐积累沉淀下来的宝贵的财富,近几十年来,由于我国药学工作者的努力,在中药的研究方面有了比较大的进步,但是由于中药治疗中讲求辨证施治,具有量效关系复杂、多靶点等特征,使得中药很难摆脱粗、大、黑的禁锢,至今还有许多中药没有经过系统的研究,也还没有比较系统的中药研究方法。HTS技术由于其快速、高效、分析样本量大等特点,在寻找新的活性的化合物方面有非常大的优势,必将会在今后的中药研究中发挥重要作用。

1 高通量筛选技术

HTS技术系统是大规模、自动化的加样和检测的系统。其基本特点是对大量样品的筛选,这种筛选方式符合发现创新药物的基本要求,因此,HTS也就成为发现新药、开发创新药物的主要方式之一^[2]。HTS主要由自动化操作系统、高灵敏度的检测系统、分子细胞水平的高特异性体外筛选模型、被筛样品管理库(即样品库)、数据采集传输处理系统等五个部分组成。

1.1 自动化操作系统^[3] 主要是指计算机控制的实验室自动化工作站,又称实验室机器人。该工作站可以代替人工进行自动加样、稀释、转移、洗脱、混合、温孵、检测等操作,使实验遵守程序化,减少人工误差,结果更准确可靠。在国外,高通量自动化筛选

系统主要由制药企业构建和使用。高通量自动化筛选系统建立以后,主要问题是如何保障不断需求的大量筛选资源的问题,而中药给HTS技术提供了巨大的资源库。

1.2 高灵敏度的检测系统 该系统是为了适应HTS而出现的检测仪器。放射性检测方法的建立,特别是SPA检测方法的应用,使进行的小样本量实验得到发展,促进了高通量药物筛选的实现。由于HTS在96孔或更多孔板如384孔,864孔,1536孔微板中进行实验,样品量小,因而要求仪器灵敏度高,而且能够对微板进行快速检测。现在用于HTS的检测仪器已可以进行可见光、紫外光、荧光比色,也可以进行同位素放射活性测定和生物发光、化学发光等多方面的测定,目前比较新的技术有:时间分辨荧光分析(TRF)^[4]、时间分辨荧光能量传递分析方法(TRET)^[5]等,这样高灵敏检测方法的出现,使精确检测几十微升甚至几微升的样品中的变化成为了可能。

1.3 高特异性体外筛选模型 指用于检测药物作用的实验方法。由于HTS要求反应总体积小,而且反应具有较高的特异性和敏感性,因此对于筛选模型也要求较高,常用的筛选模型都建立在分子平台和细胞水平平台上,观察的是药物与分子靶点的相互作用,能够直接认识药物的基本作用机制。目前这些模型主要集中在受体、酶、通道以及各种细胞反应方面,而基于酵母平台和动物平台的筛选方面也有了比较大的进展^[6~10]。基因水平的药物筛选模型,使得药物筛选模型的范围更加广泛^[11],特别是各种新的筛选模型。随着生命科学基础研究的新成就不断应运而生,如端粒酶抑制、细胞凋亡诱导、细胞周期抑制、新生血管抑制等各种活性指标用作微生物活性成分的筛选模型。随着病理生理机制的不断阐明,人们更加注重基于作用机制的筛选模型。

尤其是随着人类基因组计划的研究进展,建立基因芯片等针对某种基因为作用靶点的筛选模型和筛选方法也极受关注。此外,应用细胞模型(或分子水平的模型)进行化合物毒理学和药物代谢动力学研究和筛选,在 HTS 中也是十分重要的内容。而且对早期评价药物的体内过程中是非常重要的。

1.4 被筛样品管理库(即样品库) HTS 的重要特征之一是筛选样品的数量大。化合物来自已有的化合物库、天然产物、组合肽库及小分子有机化合物库^[12]。对大量样品进行筛选是发现新药的基础,国外进行药物筛选的机构都已储备了数以万计的化合物,建立了相当规模的样品库。样品库的建立,不仅需要大量化合物的储存,更重要的是建立合理的科学的管理系统。应用计算机进行样品库的管理,不仅可以使样品的应用程序化,而且可以对样品进行多方面的管理和分析,如查询样品、对样品进行编号、样品资料的查阅等。有些蛋白纯化的样品在结晶前还是不能够达到良好的高通量筛选的目的,Jancarik J 等^[13]用适当的缓冲溶液将样品溶解,再用水蒸气蒸馏得到少量的样品来进行筛选,得到比较好试验结果。

1.5 数据采集传输处理系统^[14] 该系统是 HTS 的最后一道程序,主要由计算机完成。由于在 HTS 中,每天可以产生大量数据,有时数千、数万甚至十余万或更多,这些数据可以由检测系统自动进行采集和记录,数据处理系统不仅能够对数据进行分析处理,而且可以根据要求,输出筛选报告。

1.6 化合物结构与生物活性相关性分析系统 不仅有利于该系统药物的设计,还可直接用于药物的发现,成为化合物药物活性的计算机筛选的一个方法,化合物结构与生物活性分析表明,具有相同作用原理且呈现出生物活性的化合物具有结构上的共同点,把具有这一共同点的化合物归为一簇,称为呈簇性分析(cluster assay),利用簇的特点筛选已有的化合物库或商用化合物库,可以发现具有更好活性的化合物,从而加快药物的发现过程^[15]。

2 HTS 与中药研究

从 HTS 对中药研究的内容来看,该方法可产生大量有关中药作用机理方面的信息,从微观角度、分子和细胞水平认识中药的基本作用。这些实验结果对于加深中药活性成分的认识、提高药物的鉴别、明确中药药理作用和了解复方的组方原理等方面将是十分重要的,对于传统中药理论的进步和发展必然是有益的。

2.1 中药活性成分的研究 中药资源是一个巨大的天然活性成分的宝库,近些年随着新的检测方法的建立,自动化工作站的应用,药物筛选的工作强

度、试验成本和样品需要量降低;随着药物作用机制的深入认识,酶和受体关系的进一步阐明;一系列试验方法,如:受体技术、基因芯片技术、蛋白质组学技术等,从中药资源中筛选先导化合物的条件更加成熟,也将会是一个大的趋势。HTS 可以借助新的样品制备方法和设备,提取不同的样品,包括单一化合物,提取组分或部位;同时积累各种中药样品,建立样品库,供不同的筛选模型使用,提高样品的利用率。

中药的作用特点表现为多效性、量效关系的复杂性、作用的相对不稳定性及某些中药的双向调节作用等。同时,中药作用方式上又具有多成分、多环节、多靶点的特性。这些复杂的特点和作用方式,使得从整体到细胞水平,甚至是蛋白质水平都很难全面的研究。通过高密度芯片上则可以点上或原位合成几百、几千,乃至上万个基因(或基因片段)作为探针。中药作用前后 mRNA 的表达及表达水平都会有所改变,分别获得作用前后不同的 mRNA,用荧光染料标记作为靶序列,与芯片上的探针杂交,然后通过分析杂交结果,可以得到 mRNA 的表达情况,哪些基因在中药作用后表达了,哪些表达停止了,以及哪些表达升高,哪些表达下降,对于我们在分子水平了解中药的作用靶点、方式及代谢途径有极大的益处^[16]。

2.2 用于药材的鉴别及炮制前后的成分和药效变化 中药材种类繁多,地域差异大,各地名称和用药习惯不同,同名异物或同物异名现象普遍存在,由于形状相似,鉴别特征不明显而不易辨认,特别是对同科属的种类及中药复方制剂中组成药物的鉴别显得力不从心。目前大多数中药材的鉴定还是通过形状鉴定、显微鉴定、理化鉴定,或者应用薄层扫描、高效液相的方法做单位药材的指纹图谱。HTS 方法的日益成熟,它的高效,高通量等特点可对中药材快速进行鉴别。

为符合中药的辨证论治的特点,增加疗效,减小毒副作用,传统中药学根据药物的性味等性质分类,作为药物应用的依据。根据传统的药物分类方法,按照不同的类别进行大规模的比较筛选,研究不同类别的药物作用的共性和特点,对于深入认识中药学的理论基础将会产生积极的促进作用。通过对不同类别的中药作用机制的研究,可以发现各个类别药物的差异所在,由此验证中药分类方法,深入认识各种中药的作用特点和药效,使中药的应用更准确、更合理,将会使中药的信息资料更加丰富和科学,有利于中药炮制标准的制定。

2.3 中药药理作用的研究 中药现代化研究的关键问题之一是研究如何将分子细胞水平的筛选模型

与中药理论和药物作用结合起来,以做到指导用药为原则,应用 HTS 方法,可以对中药作用原理进行深入研究。这个研究可以分为两个方面:一方面是通过不同的药物筛选模型研究中药不同成分的药理作用,阐明中药在治疗过程中发挥作用的机制;另一方面是根据分子细胞水平的筛选模型获得的结果,得到研究中药学的实验基础,丰富中药学的知识和内容,提高中药的治疗效果,发展中药学理论体系。对实验模型的研究,可以采取不同水平的模型相结合的方法,探索各种水平的筛选模型之间的相互关系,逐步建立适合于中药作用特点的筛选模型。由于 HTS 可以对同一样品进行多模型的检测,经过一定的多模型的检测,可以得到同一样品在不同模型上的活性结果,应用综合分析技术,对多种生物活性进行分析更符合中药多靶点作用的特点,由此可以深入认识中药的作用机理,丰富中药药理学内容^[17]。

2.4 中药的复方研究 中药复方给中药工作者的研究带来了不少的困难,其关键是解决以下两个问题^[18]。首先是复方样品的制备和活性分析,中药中的活性成分是中药材或是中药提取物中的很少的一部分,在进行 HTS 之前需要进行分离,分别测定,经过分离后,就可以进行 HTS,根据复方研究的要求和特点,会使复方研究的效率大大提高。其次是中药复方的药理分析,如何将分子平台、细胞平台、动物平台的药理试验结果和中药复方的治疗作用结合起来,是一个至今还没有很好解决的问题。中药复方重视辨证论治和整体的调节作用,是从整体分析药物的作用,而 HTS 只是反映分子、细胞等微观的功能变化,这需要更多的药学工作者辛勤努力,才能达到两者的统一。

2.5 其他方面的研究 HTS 技术作为一种科学研究的手段,可以适用的范围决不仅限于以上几个方面,例如:该方法可以有效地评价中药的疗效、代谢方式、毒副作用和作为筛选中药新药的技术平台。中药现代化的发展,重要的是开拓思路建立新的研究方式,药物筛选技术可采取直接应用、创造性应用和借用有关的技术和思维方式,开创中药现代化研究的新局面。

3 结语

中药筛选的研究中利用 HTS 技术作为一个发现新药得平台,具有比较大的优势。首先,我国传统药物为筛选研究提供了一个巨大的资源库,可从中药中提取分离筛选新的化合物,这个优势为药物的高通量筛选打下了坚实基础;其次,是对化合物生物

活性的筛选目的较明确,无目的合成的化合物较少,大大的提高了效率;再次,供筛选的化合物是天然产物,很大的程度上减少了毒副作用。HTS 技术,是目前药物筛选领域研究的重要课题,近年来,对它的研究应用虽然已取得了长足的发展,但仍然存在许多难题,如体外模型的筛选结果与整体药理作用的关系;对 HTS 模型的评价标准以及新的药物作用靶点的研究和发现等。随着医药学的进步,HTS 技术在创新药物的研发中一定会开拓出更广阔的空间。

参考文献

- [1] 秦路平. 生物活性成分的高通量筛选[M]. 上海:第二军医大学出版社,2001.3
- [2] 杜冠华. 创新药物研究与高通量筛选[J]. 中国新药杂志,2001,10(8):561
- [3] 杜冠华,胡娟娟,夏丽娟等. 药物筛选的发展与现状[J]. 药学报,1998,33(11):876
- [4] Millar DP. Time-resolved fluorescence spectroscopy[J]. Curr Opin Struct Biol,1996,6(5):637
- [5] Pope AJ, Haupts U, Moore KJ. Homogeneous fluorescence readouts for miniaturized high-throughput screening theory and practice[J]. Drug Discov Today,1999,4:350
- [6] 姚佳,杨建波,杨洁. 高通量药物筛选模型[J]. 药学进展,2004,28(15):5
- [7] Fernandes PB. Technological advance in high-throughput screening[J]. Curr Opin Chem Biol,1998,2(5):597
- [8] Nance M A, Mathias-Hagen V, Brenningstall G, et al. Analysis of a very large trinucleotide repeat in a patient with Juvenile Huntington's disease[J]. Neurology,1999,52(2):392
- [9] Vidal M, Endoh H. Prospects for screening using the reverse two-hybrid system[J]. Trends in Biotechnology,1999,17(9):374
- [10] 司书教,黄明玉,张月琴. 微生物药物筛选研究进展[J]. 基础医学与临床,2001,21(4):294
- [11] Williams C. cAMP detection methods in HTS: selecting the best from the rest[J]. Nat Rev Drug Discov,2004,3(2):125
- [12] 吕秋军,高月. 受体药物筛选研究进展[J]. 中国药学杂志,1999,34(1):6
- [13] Jancarik J, Pufan R, Hong C, Kim SH, Kim R. Optimum solubility (OS) screening: an efficient method to optimize buffer conditions for homogeneity and crystallization of proteins[J]. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr,2004,9(8):344
- [14] 胡娟娟,刘艾林,杜冠华,等. 高通量药物筛选活性数据的计算机处理[J]. 中国药学杂志,2000,3(3):145
- [15] Stanton DT, Morris TW, Roychoudhury S. Application of nearest neighbor and cluster analyses in pharmaceutical lead discovery[J]. Chem Inf comput Sci,1999,39:21
- [16] 郭书文,孟庆刚,王国华,卢建秋,刘珍清,盛瑞生,崔巍. 基因芯片技术在中医药研究中的应用探讨[J]. 中国中医药信息杂志,2004,11(11):946
- [17] 杜冠华. 药物筛选技术的中药现代化研究[J]. 世界科学技术,2000,2(4):47
- [18] 杜冠华. 高通量药物筛选[M]. 北京:化学工业出版社,2002.224

(收稿日期:2005-05-16)