

·综述·

药物筛选模型和技术 及其在中药活性成分研究中的应用

张志琪, 张延妮, 田振军
(陕西师范大学, 陕西 西安 710062)

[摘要] 现代生物技术的发展 and 药物作用靶标的揭示, 为中药活性成分的研究提供了新的技术和手段。本文就整体动物模型、受体模型和分子生物色谱、细胞模型和细胞膜色谱、基因芯片技术 4 种药物筛选模型和技术及其在中药活性成分研究中的应用进行了分析、综述, 为推动中药活性成分研究、加速中药现代化步伐提供参考。

[关键词] 生物模型; 药物筛选; 中药活性成分; 中药现代化

[中图分类号] R 285.5 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5302(2003)10-0907-04

中医药具有悠久的历史 and 显著的疗效, 中药药性理论包含四气五味、归经、升降浮沉、用药禁忌等, 中药学本身有其完整的理论体系。遗憾的是, 中药的基础性研究还很薄弱, 化学成分研究虽然取得了一定的成绩, 但研究的种类和深度与我国拥有的中药资源相比, 仅仅是沧海一粟, 绝大多数中药的化学成分尚未触及^[1]。因而, 缺乏可以量化的技术指标, 使中药在国际市场的开拓和竞争方面缺乏实力。经典的中药活性成分研究方法是通过提取中药中单一成分或抽提出某一馏分, 再进行药理实验确定其活性成分^[2], 这种方法步骤烦琐, 劳动强度高, 并且成功的概率低。近年来, 人们广泛应用生物模型及药物作用靶标进行药物筛选的研究工作, 这些方法和技术在中药活性成分研究中也得到了一定程度的应用。本文就整体动物模型、受体模型和分子生物色谱、细胞模型和细胞膜色谱、基因芯片技术 4 个方面及其在中药活性成分研究中的应用作一综述。

1 整体动物模型

神农尝百草应该是最早的整体动物药物筛选。应用实验动物, 则是现代医药学发现药物的主要途径, 尤其是整体动物的疾病模型, 在评价药物作用方面更为重要。在天然药物的研究中, 传统的动物模型仍然是重要的评价依据^[1]。利用动物模型研究中中药活性成分是采用特殊的实验动物模型, 将中药模拟中医临床给药, 然后从受药动物体内分析中药活性成分的一种方法。这种方法的实质是利用动物的生理机能将中药活性成分从中药内分离到动物组织内, 再运用分析

化学的方法, 从动物组织中分离活性成分。日本学者 Homma^[3]提出了血清药理学, 刘德麟等^[4]提出了生物筛选法用以研究中中药活性成分。朱梅刚等^[5]建立了抗人大肠癌肝转移动物模型, 快速筛选高效低毒抗肝转移药物。

近 10 年来发展起来的转基因动物技术, 在人类疾病模型建立中具有重要作用。目前转基因动物技术日趋成熟, 并已应用于医药学领域, 它既可作为“生物反应器”使用, 也可作为疾病动物模型用于疾病致病机理及药物筛选的研究^[6]。我国利用基因工程技术筛选药物虽然起步比较晚, 但是近几年已取得鼓舞人心的进展, 周勇等对转基因动物在药物筛选中的应用进行了综述^[7]。

建立新的整体动物病理筛选模型, 是新药开发中不可或缺的一个重要环节, 是药物筛选工作的长期重要任务。转基因技术和基因敲除技术的应用, 为建立动物疾病模型提供了有利的条件, 重视转基因技术和基因敲除技术在药物筛选和模型建立中的应用, 可以加快药物筛选的速度。目前, 虽然已经建立了大量的药物筛选模型, 但仍然有许多疾病还不能在动物身上复制出来, 加上生物体内大量内源性物质的干扰, 从受药动物体内分析中药活性成分将比直接分析中药成分更为艰巨, 从代谢产物出发推断活性成分的物质结构也存在较大的困难^[8]。

建立重大疾病、疑难疾病以及中医病症的动物模型, 应通过多方面分析中医证候形成的原因, 力争使动物模型能够比较全面反映中医的证型实质。

2 受体模型和分子生物色谱

随着酶学和受体理论的形成和发展, 药物的作用靶点逐渐被揭示, 迄今为止, 已经发现的药物作用靶点有 400 余种, 1999 年沈倍奋对靶点的研究进展作出了综述^[9], 新的药物作用靶点还在不断发现。以受体靶点为目标, 寻找与之作用的药物, 是药物筛选的重要途径, 它克服了很多疾病没有合

[收稿日期] 2002-10-11

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(20175012); 教育部科技重点项目(01156)

[通讯作者] 张志琪 Tel: (029) 5308349 Fax: (029) 5300809

E-mail: zqzhang@snnu.edu.cn

适的动物模型以及有些药物喂给动物,未到达受体时,就在肠道或肝脏中被代谢而无法观察到其活性等缺点^[10]。受体筛选药物的方法,已取得了较大进展。

药物作用靶点可以分为受体、酶等类型,王序等在 20 世纪 80 年代以受体或酶活性检验为基础,对 150 种常用中药的 400 余种提取物,系统地进行了生物活性筛选,得到了 5000 余种生物活性测定结果^[11],为了解中医用药的机理提供了一些实验依据。

随着分子生物学技术在药理学领域的渗透,尤其是人类基因组计划的实施,新的受体及其亚型不断发现,国际上一些大制药公司竞相开展以纯化受体、克隆受体、重组受体为靶标的药物筛选工作,吕秋军等曾对受体药物筛选作过综述^[12]。重组受体是近年来发展起来的一项技术,与传统的制备方法相比,用重组受体技术制备的受体具有纯度高、制备量大、成本低、用它试验的结果与在人体试验的结果直接相关等优点。鲁春娥对使用重组受体技术制备受体进行药物筛选的研究进行了综述^[13]。依据目前已得到的人类基因组信息,越来越多的与疾病相关的特异受体亚型被识别和确认,成为作用更专一的药物作用靶。Knopfel 等在哺乳动物内建立了 8 种不同的亚型,用于筛选激动剂和拮抗剂^[14]。但纯化受体、克隆受体虽然实现了受体与配体特异性结合,却破坏了受体发挥生物活性的周围环境,而且受体类型单一。事实上,除少数疾病的发病原因与单一靶点有密切关系外,多数疾病都与多靶点有关系,因而以纯化受体、克隆受体、重组受体为靶标的药物筛选工作可以用于西药先导化合物的筛选发现,用于中药活性成分的筛选则失去了中药多成分多靶点作用的特征。

以受体、酶等作靶点,均属于分子水平的药物筛选。这种以受体或酶检验为基础的筛选方法应用于中药活性成分研究时,由于中药成分结构复杂,所以进行大规模快速筛选存在着一定的困难;筛选出活性成分后,还必须使用其它分离手段对活性成分进行分离纯化,并进行结构鉴定。而且,采用这种筛选方法很难体现中药有效成分组合药理作用的优越性。邹汉法等提出将生物体内活性物质如酶、受体、运输蛋白等固定于色谱填料中,利用色谱技术研究这些生物大分子有效物质之间的特性相互作用,分离纯化和测定具有活性的化合物和生化参数,即基于分子识别原理的分子生物色谱方法^[15]。他们应用分子生物色谱方法研究中药活性成分的筛选和质量控制,发现新的生理活性物质,了解中药作用的机理,并认识复方的作用。通过对几种中药在以人血清蛋白为配基的分子生物色谱的分离情况的比较,并经过药理实验验证,这一方法为中药的活性成分定量分析及快速筛选提供了新的可能性。酶、受体、DNA、膜蛋白、膜磷脂、血浆中的运输蛋白和其它具有重要生理功能的生物大分子均可作为分子生物色谱的配基,开展中药及其复方有效成分筛选的研究。他们这种以分子识别为基础的生物色谱应用于中药活

性成分筛选在两个层次上进行^[8],首先以血液中存在的运输蛋白为靶体进行活性成分的粗筛选和质量控制,然后以特异性靶体筛选具有特定活性的物质。在技术发展上,建立了以分子生物色谱为核心,与 NMR、MS 等可提供结构信息的手段联用的一体化系统。由于中药药理作用的特殊性,“多成分、多靶点、多渠道”组效关系的存在已成共识^[16],单一高选择性靶体筛选难以解决中药复方活性成分的筛选,而这种粗筛选方法有可能较好地解决这一问题,既排除了绝大部分非活性物质,又保留了多种多样的活性成分。

虽然多数受体、酶以及离子通道的检测方法都已经建立,但作为药物筛选模型,特别是高通量药物筛选模型,在技术和方法上仍然有许多重要的内容要探索。因为能够与靶点作用的化合物的药理作用,要受到多种因素的影响,所以仅仅依靠分子水平模型的结果评价药物作用,也存在着显著的不足。

3 细胞模型和细胞膜色谱

在保持细胞、细胞膜及受体的原位、完整性和活性的条件下,进行中药活性成分筛选、分离,并反映出中药中何种或哪些成分与哪一种受体作用及其亲和力大小,是中药有效成分研究比较理想的方法。

谢明权等进行了细胞培养筛选抗球虫剂的研究^[17];王岱等用牛免疫缺陷病毒筛选抗艾滋病药物^[18];米志宝等用嗜肝 DNA 病毒模型筛选抗病毒中草药^[19];任金荣等用人体肺癌细胞筛选对肺癌化疗的敏感性药物^[20];刘卓拉等对一些中药作了癌细胞体外药敏试验的临床研究^[21];陈浩宏等建立了分散的人蜕膜细胞培养模型,用于抗生育药物的筛选研究^[22]。细胞水平的筛选模型可以应用到各种人类疾病的研究和治疗药物的筛选中,由于细胞的生长条件和来源较实验动物更经济方便,细胞水平的筛选模型可以进行大规模药物筛选,是高通量药物筛选的重要研究领域。

随着生命科学和生物工程技术的迅猛发展,生物膜技术不断成熟并进入药物筛选领域^[23]。若将活性组织细胞膜固定在特定载体表面,制备成细胞膜固定相,用液相色谱的方法研究药物或化合物与固定相上细胞膜及膜受体的相互作用则构成细胞膜色谱法^[24]。贺浪冲等将细胞膜固定在硅胶表面制成硅胶载体细胞膜,对该细胞膜制剂的酶活性和色谱特性进行了探索^[25],并对当归有效成分与模型药物的细胞膜色谱保留特性进行了比较,得出了化合物在细胞膜色谱中的保留特性和其药理作用显著相关的结论^[26]。

细胞水平筛选模型的最大优势是能够反映内外环境综合因素引起的整个细胞变化,更易于评价药物的作用和药用价值,其不足之处在于不能象分子水平筛选模型那样准确地反映药物作用的机制。

4 基因芯片技术

基因是遗传信息的载体,药物通过不同的作用靶点作用于组织细胞,直接或间接地影响细胞内基因的表达。随着分

子生物学的发展而建立起来的基因水平的药物筛选模型,可以从更深入的层次评价药物的作用,从而可以为许多疑难病症提供新的治疗途径和方法。基因工程技术与药物筛选相结合为人类发现了许多活性成分,是新药筛选方法上的革命^[27,28]。应用于报告基因的功能性新药筛选方法进行中药及其复方有效成分的筛选,可以明显提高筛选的流通量并在筛选的过程中得到有关细胞内功能性反应的信息,具有广阔的应用前景^[29]。

近年来出现的基因芯片技术,是基因水平筛选模型应用中的巨大进步和革新。基因芯片技术是分子生物学与微电子技术相结合的 DNA 分析检测技术,因其突出特点在于高度并行性、高通量、微型化和自动化,从而成为后基因组时代基因功能分析的最重要技术之一^[30]。用于药物筛选的基因芯片主要是 DNA Microarray 表达谱基因芯片,通过对用药前后两组样品进行表达谱基因芯片检测,就可以反映出该药物作用后相应组织或细胞中基因表达谱的变化,从而揭示药物作用的靶基因^[31]。利用基因芯片进行药物筛选,可以省略大量的动物试验,能够大大缩短药物筛选的时间和成本。陆祖宏^[32]、李静^[33]等就基因芯片技术在药物研究和开发中的应用作了介绍和综述。

基因芯片技术不仅可用于中药活性成分研究,而且可以在众多的配方中有针对性地选择合适的中药复方作为新药开发的目标,从基因水平上搞清中药的作用机制,托娅等^[34]研究了基因芯片筛选抗肿瘤血管生成中草药相关基因。加强基因芯片技术在中药活性成分研究中的应用,对于我国发展中药现代化、促进中药走向国际市场具有重大意义。蔡宝昌^[35]、杜喜平^[36]、张发宝^[37]等分别对基因芯片技术在中药现代化研究中的应用进行了探索。

基因芯片技术虽有诸多优点,但要成为实验室或临床可以普遍采用的技术目前尚有一些关键问题亟待解决。如何提高芯片的特异性,简化样本制备和标记操作程序,增加信号检测的灵敏度和高度集成化样本的制备,基因扩增,核酸标记及检测仪器的研制和开发等,已成为当今国内外研究的热点。

中医药有一套较完整的理论体系,较系统的诊治方法以及确切的治疗效果,中药又属于天然产物,因而有极强的生命力。只有应用新方法和新技术,加强中药活性成分研究,才能加速中药现代化步伐。

[参考文献]

- [1] 吴 镭. 药科学前沿与发展方向. 北京:中国医药科技出版社, 2000. 89, 118.
- [2] 姚新生. 天然药物化学. 第三版. 北京:人民卫生出版社, 1998. 18.
- [3] Homma M, Oka K, Yamada T, et al. A Strategy for Discovering Biologically Active Compounds with High Probability in Traditional Chinese Herb Remedies: An Application of Saiboku - to in Bronchial Asthma. Anal Biochem, 1992, 202(1): 179.
- [4] 刘德麟. 分子网络紊乱与调节·分子中医药学导论. 北京:清华大学出版社, 1999.
- [5] 朱梅刚, 邱红明, 杨学皆, 等. 应用人大肠癌肝转移裸鼠模型抗转移药物筛选研究. 中国癌症杂志, 1997, 7(3): 215.
- [6] 鲁春娥. 转基因动物与药物筛选. 国外医学·药学分册, 1997, 24(6): 330.
- [7] 周 勇, 张 斌, 陈国平. 受体克隆技术与转基因动物在药物筛选中的应用. 中国药理学杂志, 1999, 34(10): 654.
- [8] 邹汉法, 汪海林. 生物色谱技术分离、鉴定和筛选中药活性成分. 世界科学技术 - 中药现代化, 2000, 2(2): 9.
- [9] 沈倍奋. 寻找药物设计的新靶点. 中国免疫学杂志, 1999, 15(1): 44.
- [10] 陈泽乃. 受体技术与新药开发. 中国药理学杂志, 1994, 49(6): 362.
- [11] 王 序, 韩桂秋, 李荣芷, 等. 现代生物分析法对常用中药的筛选研究. 北京医科大学学报, 1986, 18(4): 31.
- [12] 吕秋军, 高 月. 受体药物筛选研究进展. 中国药理学杂志, 1999, 34(1): 6.
- [13] 鲁春娥. 重组受体与药物筛选. 国外医学·药学分册, 1998, 25(3): 136.
- [14] Knopfel T, Kuhn R, Allgeier H. Metabotropic Glutamate Receptors: Novel Targets for Drug Development. J Med Chem, 1995, 38(9): 1417.
- [15] 汪海林, 邹汉法, 孔 亮, 等. 分子生物色谱用于中药活性成分筛选及质量控制方法的研究. 色谱, 1999, 17(2): 123.
- [16] 顾 萍. 黑箱理论在中医学中的应用. 南京中医药大学学报(社会科学版), 2001, 2(2): 66.
- [17] 谢明权, 谢宏料, 吴惠贤, 等. 细胞培养筛选抗球虫剂程序的研究. 畜牧兽医学报, 1997, 28(3): 278.
- [18] 王 岱, 耿运琪, 徐为人, 等. 用牛免疫缺陷病毒筛选抗艾滋病药物的实验模型. 中国药理学与毒理学杂志, 1996, 10(1): 49.
- [19] 米志宝, 陈鸿珊, 张习坦, 等. 用肝 DNA 病毒模型筛选抗病毒中草药. 中国中药杂志, 1997, 22(1): 43.
- [20] 任金荣, 王增林, 艾 军, 等. 人体肺癌细胞对化疗药物敏感性的比色法体外测定. 河北医科大学学报, 1998, 19(6): 335.
- [21] 刘卓拉, 王崇刚, 高 斌, 等. 人癌细胞体外药敏试验的临床研究. 山西医科大学学报, 1998, 29(2): 130.
- [22] 陈浩宏, 顾芝萍, 游根娣, 等. 人蜕膜细胞培养作为抗早孕药物筛选模型的研究. 上海铁道大学学报, 1998, 19(11): 1.
- [23] 毛希琴, 孔 亮, 汪海林, 等. 生物膜色谱及其在药物活性成分分析中的应用. 分析化学, 2002, 30(2): 231.
- [24] He L C, Yang G D, Geng X D. Enzymatic and Chromatographic Characteristics of the Cell Membrane Immobilized on Silica Surface. Chinese Science Bulletin, 1999, 44(9): 826.
- [25] 贺浪冲, 杨广德, 耿信笃. 固定在硅胶表面细胞膜的酶活性及其色谱特性. 科学通报, 1999, 44(6): 632.
- [26] 赵惠茹, 杨广德, 贺浪冲, 等. 用细胞膜色谱法筛选当归中的有效成分. 中国药理学杂志, 2000, 35(1): 13.
- [27] 周 勇, 陈国平. 基因工程技术与药物筛选. 中国医院药学报

- 志,2000,20(6):359.
- [28] 周 勇,向 红. 基因工程技术在药物筛选中的应用简述. 中国医药工业杂志,2000,31(4):190.
- [29] 孙 哲,吕秋军. 基于检测报告基因的药物筛选方法研究进展. 中国药理学杂志,2000,35(8):507.
- [30] 祝 骥,姚汝华,马文丽. DNA 芯片技术及其在药物研究中的应用. 国外医学·药学分册,2000,27(4):193.
- [31] 徐伟文,李文全. 高通量药物靶位基因筛选的策略与方法. 中国药理学杂志,2002,37(4):241.
- [32] 陆祖宏,白农跃,孙 啸. 基因芯片技术在药物研究和开发中的应用. 中国医科大学学报,2001,32(2):81.
- [33] 李 静,吴妍汶. 基因芯片技术在药物研究中的应用. 天津药理学,2002,14(1):5.
- [34] 托 娅,苏秀兰,路桂荣,等. 基因芯片在抗肿瘤血管生成中草药相关基因筛选中的研究. 第二军医大学学报,2002,23(3):273.
- [35] 蔡宝昌,殷 武,王天山. 探索基因芯片技术在中药现代化研究中的应用. 世界科学技术,2000,2(6):12.
- [36] 杜喜平,田瑞华,刘士义,等. 探讨基因芯片在中药现代化研究中的应用. 药学进展,2001,25(6):330.
- [37] 张发宝,李欣梅,周逸平. 基因芯片技术在中医药研究中的应用. 安徽中医学院学报,2002,21(3):57.

Screening Models and Techniques for Medicine and Its Application in the Studies on the Active Components of Chinese Medicine

ZHANG Zhì-qí, ZHANG Yàn-ní, TIAN Zhē-jūn
(Shaanxi Normal University, Xi' an 710062, Shaanxi, China)

[Abstract] The development of modern biologic techniques have provided new techniques and approaches for the modern studies on active components of Chinese medicine. This article is a review of four kinds of screening models and corresponding techniques for medicine and their applications in the studies on the active components of Chinese medicine. The four aspects comprise the whole animal models, receptor models and molecular biochromatography, cell models and cell membrane chromatography, and gene chip techniques. It will provide references for promoting studies and accelerating modernization of Chinese medicine.

[Key words] biology model; medicine screening; active components of Chinese medicine; modernization of Chinese medicine
[责任编辑 方文贤]