

文章编号: 1004-0374(2009)03-0408-04

## 基于受体的药物高通量筛选研究进展

冯璐璐, 赵霞霞, 李发荣\*

(陕西师范大学生命科学院, 西安710062)

**摘要:** 受体是药物筛选的重要靶标, 基于受体的药物高通量筛选是药物筛选的主要类型之一。本文根据受体作用原理, 按照检测对象的不同, 从直接与间接检测的角度, 将基于受体的药物高通量筛选进行了分类, 总结了基于受体的几种不同的药物筛选模型, 并简要介绍了高通量筛选技术在中药研究中的应用, 对药物筛选的发展进行了展望。

**关键词:** 受体模型; 高通量筛选; 中药研究

**中图分类号:** R965.1; R2      **文献标识码:** A

## Progress of high-throughput drug screening based on the receptor model

FENG Lu-lu, ZHAO Xia-xia, LI Fa-rong\*

(College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

**Abstract:** The receptor is attractive as an important target for drug screening. Receptor-based high-throughput screening is one of the main techniques in modern drug discovery. According to the mechanism of drug-receptor interaction and different object of detection, this paper reviews the classification of the high-throughput screening models based on the receptor, simply introduces the application of high-throughput screening technique in traditional Chinese medicine research, and discusses its future development.

**Key words:** receptor model; high-throughput screening; Chinese medicine research

药物筛选是新药研究开发的起点和重要环节, 筛选的靶点包括受体、酶、离子通道等, 其中受体参与机体的各种生理和病理过程是药物筛选的主要靶标之一。基于受体的药物筛选具有以下特点: 首先, 它是直接在结合部位进行的筛选, 除可以获得药物与受体的结合信息, 还可以了解药物的活性, 进行功能性筛选; 其次它以受体为作用靶点, 可以克服很多疾病没有合适的动物模型或是有些药喂给动物后, 还未到达受体就在肠道或肝脏中被代谢的缺点。因此, 以受体为靶标的药物筛选逐渐受到国内外研究机构的重视。

近年来, 随着受体技术的深入研究, 新的受体或亚型的发现以及许多高灵敏度检测技术在受体药物筛选中的应用<sup>[1-5]</sup>, 使基于受体的药物筛选实现了高效、快速的高通量筛选, 推动了药物筛选的

展。本文总结了基于受体的药物高通量筛选的不同模型并对高通量筛选在中药研究中的主要应用前景进行介绍。

### 1 基于受体的药物筛选模型

受体(receptor)是位于细胞膜表面或细胞内具有特异识别和结合细胞外某些化学信号物质(配基)的蛋白组分。配基可以是激素、神经递质、细胞因子、生长因子和某些药物等。当配基与受体结合, 可使受体激活且产生胞内信号, 引起信号转导, 启动细胞内相应的生理效应。因此, 根据受体作用原理, 按照检测对象的不同, 可以将基于受体的药物筛选分为通过检测受体-配体结合反映配体与受体相互作用

收稿日期: 2008-12-16; 修回日期: 2009-03-26

基金项目: 陕西省科技攻关项目(2006K16-G2(3))

\*通讯作者 E-mail: lifarong@snnu.edu.cn

用的直接筛选和通过受体活化后后续的细胞生物效应变化来反映配体对受体作用的间接筛选。

### 1.1 间接检测配体对受体作用的药物筛选模型

这种间接的筛选模型是通过受体介导的后续生物效应的变化, 了解被筛选化合物对受体的激动或拮抗作用。可通过检测受体介导的报告基因表达变化、特异的代谢物变化和第二信使变化来实现。

#### 1.1.1 基于受体介导的报告基因表达变化的药物筛选

报告基因(report gene)是指一组编码易被检测的蛋白质或酶的基因, 常见报告基因有荧光素酶基因、 $\beta$ -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰基转移酶等。将报告基因置于相应的应答元件的调控下, 构建重组报告基因载体, 应用转染技术导入细胞中, 通过检测报告基因表达的变化, 可以筛选受体的激动剂或拮抗剂。例如, 陈立敏等<sup>[6]</sup>利用分泌型碱性磷酸酶为报告基因, 建立了雌激素受体 $\beta$ 亚型激动剂细胞筛选模型。Wang等<sup>[7]</sup>构建了一种新的报告基因检测系统, 可用于Gs、Gq、G<sub>12</sub>、Gi等多种G蛋白偶联受体(GPCR)的筛选。引入报告基因, 不仅可以反映受体与配体结合反应, 还能充分反映受体的功能, 可以监测在转录和翻译水平上细胞的响应。

#### 1.1.2 基于受体介导的特异代谢物变化的药物筛选

配体与受体特异性结合后可以引发一些细胞代谢的变化, 对代谢变化的检测也可作为受体功能性筛选的一种模型。当配体与GPCR结合激活质膜上的磷脂酶C(PLC)后, 可使磷脂酰肌醇水解产生二酰基甘油(DG), 随后与肌醇磷酸酯共同作用可使膜磷脂释放花生四烯酸(AA)。研究表明, 毒蕈碱样乙酰胆碱受体(M1受体)是衰老性疾病的非常重要的靶, 其受体激动剂即可促使细胞释放AA。基于上述原理, Bright等<sup>[8]</sup>将M1受体稳定转染入<sup>3</sup>H-AA标记的细胞中, 建立了一种用<sup>3</sup>H-AA标记的筛选毒蕈碱样乙酰胆碱受体激动剂的高通量筛选模型, 用于从天然化合物或人工合成的化合物中筛选M1受体激动剂。该方法需建立在对配体受体结合后引起的细胞反应的充分了解的基础之上, 且处理放射性物质的过程比较麻烦。

#### 1.1.3 基于第二信使水平变化的药物筛选模型

##### 1.1.3.1 基于钙流检测的受体药物筛选

配体门控离子通道受体是继G蛋白偶联受体和核激素受体家族之后的又一重要的受体靶标<sup>[9]</sup>。建立基于配体门控离子通道受体介导的钙流变化的药物筛选模型, 将细胞与Ca<sup>2+</sup>敏感的荧光探针(Fluo-4)共同孵育, 可

以有效地评价部分门控通道受体活性样品的药理学特征。如惠昕<sup>[10]</sup>建立烟碱样乙酰胆碱受体(nAChR)的筛选模型, 使用阳性化合物(ABT-594)来激动Fluo-4标记细胞, 通过加入被测化合物后钙流检测仪检测到的钙流变化, 观察被筛选化合物激动或拮抗钙流反应的能力, 筛选出对nAChR起拮抗作用的药物。

基于钙流检测的药物筛选也可用于以GqPCR为靶的药物筛选, 如尹琪等<sup>[11]</sup>用检测胞内钙离子浓度的高通量方法筛选以组胺受体3为靶点的药物。

##### 1.1.3.2 基于cAMP水平变化的受体药物筛选

cAMP是一种非常重要的第二信使, Williams<sup>[12]</sup>研究发现通过检测cAMP水平变化, 可以反应配体对受体的激动或拮抗作用。cAMP增加可激活PKA, PKA进入核内催化cAMP响应元件结合蛋白(CREB)的磷酸化, 磷酸化了的CREB将结合到含有cAMP响应元件(CRE)的启动子上, 使表达量增加。引入报告基因筛选法, 将cAMP响应元件(CRE)与报告基因偶联, 通过报告基因的表达量的变化, 可反应cAMP的变化与配体的功能。根据上述原理, 郑旭煦等<sup>[13]</sup>建立了黑色素皮质素受体激动剂筛选模型, 为治疗肥胖、糖尿病等能量代谢失衡性疾病提供有效的手段。

通过检测cAMP依赖的蛋白质的功能变化而建立的受体筛选模型, 也可反映作用于G蛋白偶联受体的配体的功能。囊性纤维化跨膜传导调节因子(CFTR)就是一种cAMP依赖的蛋白质。当配体与GPCR结合可使cAMP增加, cAMP增加激活PKA使得CFTR磷酸化而活化。CFTR是一种重要的氯离子通道, 它的活化可引起I的大量内流, 大量内流的I可使一种对卤化物敏感黄色荧光蛋白(YFP)发生淬灭, 通过检测荧光变化可反应cAMP与配体的功能。Yangthara等<sup>[14]</sup>利用此原理建立了基于细胞的V<sub>2</sub>R血管加压素受体拮抗剂的高通量筛选模型。此外, 环核苷酸门控离子通道(CNG), 一种非选择性的阳离子通道, 可直接被环核苷酸cAMP活化, 引起阳离子内流, 进而使膜电位发生变化。Titus等<sup>[15]</sup>在此原理基础上建立了一个CNG相关的定量筛选促甲状腺激素受体(TSHR)受体激动剂的高通量药物筛选模型。

#### 1.2 直接检测配体-受体结合的药物筛选模型

直接筛选可在结合部位直接反映药物与受体的相互作用, 但是无法确认药物对受体的激动/拮抗作用, 还需要进行进一步的功能验证。直接筛选模型包括基于放射性标记、细胞膜色谱、酶联免疫等

方法的受体筛选模型。

### 1.2.1 基于放射性同位素标记结合的受体药物筛选

放射配基结合筛选方法是受体筛选新药的常用方法。该方法的原理就是用放射性同位素 ( $^3\text{H}$ 、 $^{125}\text{I}$ ) 标记天然配基或特异性拮抗剂, 当被筛化合物与标记性配基及受体一起孵育时, 发生竞争性结合, 反应后去除游离的配基, 通过测定与受体结合的放射性配基量的变化反映被筛选药物的作用。MacAllan 等<sup>[16]</sup>建立稳定表达  $\text{ET}_\text{A}\text{R}$  的 COS7 细胞系,  $^{125}\text{I}$  标记的  $\text{ET}-1$  检测  $\text{ET}_\text{A}\text{R}$  拮抗剂。这种方法的局限性在于要获得纯化的受体, 而且需要处理放射性物质, 不够安全。

### 1.2.2 基于细胞膜色谱法的受体药物筛选

细胞膜色谱法 (cell membrane chromatography, CMC)<sup>[17]</sup>, 是一种研究受体与药物相互作用的新型亲和色谱技术。通过将细胞膜受体固定于硅胶载体表面, 以缓冲溶液为流动相, 药物为溶质或填加在流动相中, 用高效液相色谱研究受体和配体的特异结合, 被分析成分如果与特定的细胞膜受体有特异性结合, 则色谱保留时间延长, 可用于相应配基的筛选, 或受体激动剂、拮抗剂的筛选。该方法简便易行, 细胞膜色谱柱可以反复应用, 使受体研究和药物筛选效率得到提高, 可用于药物高通量筛选。李翠芹和贺浪冲<sup>[18]</sup>利用 CMC 技术建立白细胞膜色谱模型, 以紫杉醇为模型分子, 筛选白术中与白细胞膜及  $\text{TLR}_4$  受体作用, 并具有抑制炎症反应的活性成分, 但该方法中细胞膜的制备较繁琐, 而且如果细胞膜对硅胶载体包裹不全, 则色谱柱可能还有吸附性, 从而干扰被筛选物对受体的作用。

### 1.2.3 基于酶联免疫法的受体药物筛选

酶联免疫法 (ELISA) 是将抗原、抗体的免疫反应和酶的高效催化反应有机结合而发展起来的一种综合性技术。通过酶标记的单克隆抗体与相应的受检物质反应, 形成酶标记的免疫复合物。当酶遇到其相应底物时即反应产生有色或发光物质, 且产量与受检物质的量相关。根据上述原理, Cho 等<sup>[19]</sup>利用 ELISA 方法筛选新的过氧化物酶体增殖物激活受体 (peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs) 的配基。该方法灵敏度高、结果稳定, 但是在测定时需要溶解细胞, 还需要洗涤步骤, 以除去没有结合的标记物, 过程比较复杂。

## 2 基于受体的药物高通量筛选技术在中药研究中的应用

我国拥有非常丰富的药材资源, 为药物的筛选提供了一个巨大的资源库, 供筛选的这些天然化合

物与纯化学合成的化合物相比, 可在很大程度上减少毒副作用, 而且我国的中药研究已经有几千年的临床经验, 使筛选过程有很大的目的性, 提高了筛选的效率。高通量筛选技术的应用使基于受体的药物筛选在中药研究中发挥越来越重要的作用。

### 2.1 基于受体的药物高通量筛选在中药研究中的优势

中药研究中的重要课题就是中药药效物质基础研究, 目前中药药效物质不清, 中药质量难以控制是影响中药现代化实现的主要瓶颈。由于中药成分复杂, 利用传统的整体动物模型很难实现大量药物的同时筛选。然而基于受体的高通量筛选技术在重要有效成分筛选中有其特殊的优势, 可有效地解决这一问题。首先, 高通量筛选模型的建立, 可实现在微量条件下的活性成分观察, 省时省力; 其次, 以受体为作用靶标是一种基于活性的筛选方法, 可以观察药物与受体靶点的相互作用; 再次, 获得细胞、分子水平的药物作用机制, 不同于单纯的构效设计及验证。因此, 在几千年中药认识的传承积累和临床使用的经验指导下, 以高效液相、液-质联用、气-质联用等现代分离分析手段为依托, 进行基于受体的药物高通量筛选定会为中药活性成分信息的获取创造条件, 在实现安全有效、质量可控的中药现代化过程中发挥巨大作用。

### 2.2 应用举例

基于受体的药物筛选模型在中药研究中发挥越来越重要的作用。许多的研究机构及科研人员在这一领域进行不断的研究和创新, 如王秀坤和李家实<sup>[20]</sup>就以脑神经系统抑制性递质受体  $\gamma$  氨基丁酸受体为对象进行中药活性成分研究。汪宁等<sup>[21]</sup>提出将细胞膜色谱法应用于中药活性成分筛选中。目前, 应用基于受体的高通量药物筛选在心血管疾病、神经-精神疾病 (主要是老年性痴呆、衰老等)、糖尿病等许多疾病的中药开发中也取得进展, 如高虹等<sup>[22]</sup>建立毒蕈胆碱 M1 受体激动剂的高通量筛选模型, 对多种抗衰老中药水提物进行了筛选, 找到 3 种对 M1 受体有活性的中药; 唐建华等<sup>[23]</sup>建立低密度脂蛋白受体 / 报告基因系统用于中药降脂药物的筛选; 万娟和许治良<sup>[24]</sup>建立了一种高通量筛选胰高血糖素受体拮抗剂的细胞模型, 为治疗糖尿病药物的筛选提供帮助。

## 3 展望

高通量筛选技术以其快速、灵敏、高特异性等特点, 受到国内外药物研究机构的重视, 成为了

新药发现过程中的主要技术与手段。随着新靶标的不断发现,生物检测技术和分析技术的不断发展,使得高通量筛选技术不断的优化,出现了超高通量筛选(ultra high throughput screening, uHTS)技术,更大程度上提高了日筛选量,加速了发现活性化合物的速度<sup>[25]</sup>,但是无论HTS或是uHTS,都是对单个靶点筛选量的提高,无法全面反映被筛选样品的生物活性特征,也不利于对化合物活性的综合评价。在这种情况下,高内涵筛选技术(high content screening, HCS)应运而生<sup>[26]</sup>。HCS不仅能阐明被筛样品与药物作用靶点的相互关系,而且可同时了解细胞的其他生物学改变,进而研究其对相关代谢途径的影响,并通过观察细胞形态来预测化合物的毒性。HCS实现了对多个靶点的同时筛选,拓展了检测范围,是药物筛选的新的发展方向。

虽然基于受体为靶的高通量筛选还存在一定的局限性,但是,相信随着HTS/HCS技术的发展,新的筛选模型的建立和新的检测技术的出现,体外分子、细胞水平和体内整体水平的药物作用机制综合评价模式的建立,必将为多成分、多靶点的中药的有效成分的筛选提供新的技术支持,推动中药现代化的发展。

### [参 考 文 献]

- [1] Edwards BS, Bologa C, Young SM, et al. Integration of virtual screening with high-throughput flow cytometry to identify novel small molecule formylpeptide receptor antagonists. *Mol Pharmacol*, 2005, 68(5): 1301-10
- [2] Heise CE, Sullivan SK, Crowe PD. Scintillation proximity assay as a high-throughput method to identify slowly dissociating nonpeptide ligand binding to the GnRH receptor. *J Biomol Screen*, 2007, 12(2): 235-9
- [3] Albizu L, Teppaz G, Seyer R, et al. Toward efficient drug screening by homogeneous assays based on the development of new fluorescent vasopressin and oxytocin receptor ligands. *J Med Chem*, 2007, 50(20): 4976-85
- [4] Hu LA, Zhou T, Hamman BD, et al. A homogeneous G protein-coupled receptor ligand binding assay based on time-resolved fluorescence resonance energy transfer. *Assay Drug Dev Technol*, 2008, 6(4): 543-50
- [5] Joesch C, Guevarra E, Parel SP, et al. Use of FLIPR membrane potential dyes for validation of high-throughput screening with the FLIPR and microARCS technologies: identification of ion channel modulators acting on the GABA (A) receptor. *J Biomol Screen*, 2008, 13(3): 218-28
- [6] 陈立敏, 吕秋军, Satoshi Inoue, 等. 基于报告基因的雌激素受体 $\beta$ 亚型激动剂细胞筛选模型的建立. *药学报*, 2006, 41(8): 721-6
- [7] Wang CJ, Hsu SH, Hung WT, et al. Establishment of a chimeric reporting system for the universal detection and high-throughput screening of G protein-coupled receptors. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24(7): 2298-304
- [8] Bright SW, Higginbotham DJ, Falcone JF, et al. Development of a whole cell high throughput screen for muscarinic receptor agonists. *J Biomol Screen*, 1997, 2(2): 79-84
- [9] Dunlop J, Bowlby M, Peri R, et al. Ion channel screening. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2008, 11(7): 514-22
- [10] 惠昕. 以孕激素受体为靶点的药物筛选模型的建立与应用[D]. 中国科学院研究生院(上海生命科学研究院), 2006, 60-7
- [11] 尹琪, 张以琳, 蒋亚琴, 等. 以组胺受体3为靶点的高通量药物筛选细胞模型的建立[EB/OL]. 中国科技论文在线, [http://www.paper.edu.cn/paper.php?serial\\_number=200601-235.html](http://www.paper.edu.cn/paper.php?serial_number=200601-235.html), 2006-01-19
- [12] Williams C. cAMP detection methods in HTS: selecting the best from the rest. *Nat Rev Drug Discov*, 2004, 3(2): 125-35
- [13] 郑旭煦, 欧阳克清, 高虹, 等. 黑色素皮质素受体激动剂的高通量筛选模型研究. *生物化学与生物物理进展*, 2004, 3(1): 36-40
- [14] Yangthara B, Mills A, Chatsudthipong V, et al. Small-molecule vasopressin-2 receptor antagonist identified by a G-Protein coupled receptor "pathway" screen. *Mol Pharmacol*, 2007, 72(1): 86-94
- [15] Titus S, Neumann S, Zheng W, et al. Quantitative high-throughput screening using a live-cell cAMP assay identifies small-molecule agonists of the TSH receptor. *J Biomol Screen*, 2008, 13(2): 120-7
- [16] MacAllan D, Sohal J, Walker C, et al. Development of a novel TNF $\alpha$  ligand-receptor binding assay for screening natchemlibraries. *J Recept Sig Trans Res*, 1997, 17(1-3): 521-9
- [17] 陈婷, 周玖瑶, 徐贝佳. 细胞膜色谱法及其在药理学研究中的应用进展. *中华中医药学刊*, 2007, 25(5): 983-5
- [18] 李翠芹, 贺浪冲. 白细胞膜色谱模型建立与白术中TLR4受体拮抗活性成分筛选研究. *中国科学C辑: 生命科学*, 2005, 35(6): 545-50
- [19] Cho MC, Yoon HE, Kang JW, et al. A simple method to screen ligands of peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$ . *Eur J Pharm Sci*, 2006, 29(5): 355-60
- [20] 王秀坤, 李家实. 中药生物效应鉴定法探索-脑神经系统抑制性递质受体 $\gamma$ -氨基丁酸受体中药活性成分研究. *世界科学技术——中药现代化*, 2002, 4(4): 48-51
- [21] 汪宁, 段金彪, 朱荃, 等. 细胞膜生物色谱法在中药研究中的应用. *世界科学技术——中医药现代化*, 2008, 10(5): 82-5
- [22] 高虹, 欧阳克清, 郑旭煦, 等. 毒蕈胆碱M1受体激动剂的高通量筛选模型. *中国药理学通报*, 2003, 19(7): 776-9
- [23] 唐建华, 高小平, 张义正. 低密度脂蛋白受体/报告基因系统建立及中药降脂药物的筛选. *天然产物研究与开发*, 2005, 17(3): 316-9
- [24] 万娟, 许治良. 中草药中胰高血糖素受体拮抗剂的高通量细胞筛选. *华东师范大学学报*, 2007, 4: 112-8
- [25] Wunder F, Kalthof B, Müller T, et al. Functional cell-based assays in microliter volumes for ultra-high throughput screening. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2008, 11(7): 495-504
- [26] Harz H, Daum R, Seebacher C, et al. Following live cells—a novel high content high throughput screening platform. *Med Laser Appl*, 2007, 22(2): 77-85