

文章编号: 1004-0374(2009)04-0593-06

· 技术与应用 ·

# 秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 在药物筛选中的应用

杨再昌<sup>1\*</sup>, 杨小生<sup>2</sup>

(1 贵州大学化工学院, 贵阳 550003; 2 贵州省中国科学院天然产物化学重点实验室, 贵阳 550004)

**摘要:** 基于靶点的体外药物筛选操作相对简单, 成本较低, 但是由于药物在体内的作用并不仅仅取决于其与靶点的作用程度, 吸收、分布、代谢、排泄特征和毒性均会对早期先导物能否进入临床使用产生极大的影响, 因此, 药物的体内筛选受到重视。本文重点综述了秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)在抗衰老、抗感染药物筛选中的应用情况。秀丽隐杆线虫结构简单、易于培养和可实现高通量筛选, 在未来的药物筛选中必将发挥更重要的作用。

**关键词:** 秀丽隐杆线虫; 药物; 筛选

**中图分类号:** Q959.17; Q95-33; R965.1 **文献标识码:** A

## An application of *Caenorhabditis elegans* for drug screening

YANG Zai-chang<sup>1\*</sup>, YANG Xiao-sheng<sup>2</sup>

(1 Chemical Engineering College of Guizhou University, Guiyang 550003, China; 2 Key Laboratory of Chemistry for Natural Products of Guizhou Province and Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550004, China)

**Abstract:** It is relatively simple and cheap for drug discovery by target-based screen *in vitro*, but the actions of drugs *in vivo* do not depend fully on the interactions between drugs and targets. Major reasons preventing many early candidates reaching market are the inappropriate ADME (absorption, distribution, metabolism and excretion) properties and drug-induced toxicity. Now more attentions were paid to the methods of drug screening *in vivo*. In recent years, *C. elegans* has been widely used as a drug screening model in drug discovery. The developments of screening for drugs increasing lifespan and antagonizing microbes using *C. elegans*-based assays were mainly discussed in this paper. With the advantages of easily culture, simple tissue structure, and being amenable to high-throughput screening (HTS), *C. elegans* may turn out to be invaluable in the development of novel screening methods in the future.

**Key words:** *C. elegans*; drug; screening

秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)是一种常用模式生物, 因其结构简单、通体透明、生命周期短和易于培养, 被用于细胞凋亡的研究。Sydney Brenner等因研究秀丽隐杆线虫获2002年诺贝尔生理或医学奖; Andrew Z. Fire和Craig C. Mello以秀丽隐杆线虫为实验材料, 发现了RNA干扰机制, 获2006年诺贝尔生理或医学奖。近年来, 秀丽隐杆线虫又被用于药物筛选研究, 本文综述了这一方面的情况。

### 1 抗衰老药物的筛选

采用秀丽隐杆线虫研究老化现象和与老化有关的疾病已经有近30年的历史。秀丽隐杆线虫从L4期幼虫到成虫死亡只有2-3周的时间, 生命周期

收稿日期: 2009-03-16; 修回日期: 2009-04-02

基金项目: 贵州省科学技术基金资助项目([2007]2142号); 贵州省省长专项资金项目([2007]22号)

\*通讯作者: Tel: 0851-6848659; E-mail: yangzaichang@126.com

短,使其成为抗衰老药物筛选的理想动物<sup>[1]</sup>。

用于筛选的虫株一般为N2株(原始野生型)和N2的突变株,如 $daf-2$ 株,它是部分功能缺失的变异株,因 $daf-2$ 基因的变异导致DAF-2受体酪氨酸激酶的结构受影响,该虫株的寿命比原始野生型长。 $daf-16$ 株是部分功能缺失的变异株, $daf-16$ 是一个转录因子,它可促进许多长寿相关基因的表达, $daf-16$ 基因的突变导致许多靶点基因不能表达,因此, $daf-16$ 虫株的寿命比原始野生型短。N2的突变株有多种,在筛选时主要利用突变株进行机制探讨<sup>[2]</sup>。

筛选方法一般如下:准备含药(筛选样本)的NGM琼脂平板(直径60 mm),接种大肠埃希氏菌OP50株,待长出菌苔后,将秀丽隐杆线虫接种到平板中,每个平板接种雌雄同体的处于L4期的幼虫15条,在20℃培养箱中培养。开始每2 d更换一次平板,待线虫停止产卵后改为每周更换一次平板。每天观察记录虫株死亡情况。虫株的寿命为接种L4期幼虫之日至成虫死亡之日,以日(days)为计算单位。在测定寿命指标的同时,一般还需测定一些与衰老有关的生理指标,如虫体运动性、产卵能力、咽泵运动。因秀丽隐杆线虫以大肠埃希氏菌为食,筛选时应排除样本对细菌的干扰因素<sup>[2]</sup>。

Evason等<sup>[2]</sup>以具有不同结构、不同药效的19个经FDA批准的药物组成小样本库,筛选发现,抗癫痫药物乙琥胺(ethosuximide)能使秀丽隐杆线虫的寿命延长17%,并存在明显的量效关系。构效关系研究表明,与乙琥胺结构类似并具有抗癫痫作用的化合物三甲双酮(trimethadione)和3,3-二乙基-2-吡咯烷酮(3,3-diethyl-2-pyrrolidinone)也明显地延长秀丽隐杆线虫的寿命,但是与乙琥胺结构类似、对脊椎动物无抗癫痫作用的化合物丁二酰亚胺(succinimide)却没有延长秀丽隐杆线虫寿命的作用。提示上述化合物的抗癫痫机制与延长秀丽隐杆线虫寿命的机制可能是相同的,通过影响线虫的神经活动而导致生命延长。当然还不能完全排除抗癫痫与延长寿命存在不同机制的可能性,后续研究应该着重于乙琥胺的靶点定位。

Petrascheck等<sup>[3]</sup>用秀丽隐杆线虫筛选抗衰老药物,筛选了8.8万个化合物,发现115个化合物能延长秀丽隐杆线虫的寿命,有4个化合物是5-羟色胺受体抑制剂,它们能使秀丽隐杆线虫的寿命延长22%—30%,其中包括抗抑郁药米安色林(mianserin)。对5-羟色胺的合成、摄取发生变异的

虫株或章鱼胺(一种与嗅觉有关的神经递质)G蛋白偶联受体发生变异的虫株,米安色林不能延长这类线虫的寿命,因此,研究人员认为,米安色林能阻断线虫与觅食有关的神经递质的信号传递,产生饥饿感,导致线虫寿命延长。

Gerisch等<sup>[4]</sup>发现一种胆酸甾体化合物(dafachronic acid)与秀丽隐杆线虫的衰老调控有关。白藜芦醇(resveratrol)能延长酵母、果蝇、非洲齿鲤(*Nothobranchius furzeri*)、小鼠的寿命,也能延长秀丽隐杆线虫的寿命<sup>[5]</sup>。Srivastava等<sup>[6]</sup>最近报道利血平(reserpine)不但能延长秀丽隐杆线虫的寿命,而且能提高其生活质量<sup>[6]</sup>。具有抗氧自由基损伤的化合物,如维生素E、辅酶Q等以及蓝莓、银杏叶提取物,也能延长秀丽隐杆线虫的寿命<sup>[7]</sup>。

延长人类寿命一直广受关注,但是有关人类生命周期的探索才刚刚起步,基因调控、系统调控、环境和精神因素等都在不同水平上影响人类寿命。秀丽隐杆线虫生命周期短,与人类有60%—80%的基因相似度,成为抗衰老药物筛选的理想动物<sup>[8]</sup>。能延长线虫寿命的化合物(图1)在结构上差异较大,说明小分子对衰老的干预具有多靶点、多机制的特征。值得注意的是,干预神经活动的小分子能延长秀丽隐杆线虫寿命,提示神经活动可能与衰老现象有关,但是这些分子能否成为抗衰老药物还需要一个漫长的评价过程。白藜芦醇对Sir2蛋白进行调控而延长动物寿命,这种通过非神经干预机制发挥作用的分子似乎更具有抗衰老研究价值。Buck拟采用化学基因组学技术以发现更多的秀丽隐杆线虫衰老基因,可能为将来筛选抗衰老药物提供更多信息。

## 2 抗菌药物的筛选

由于细菌耐药性问题日趋突出,筛选发现新的抗菌先导物成为热点。以往的抗菌药物一般是通过体外抗菌实验发现的,体外筛选方法简单易行,但是也存在一些问题,如对于有抗菌活性的一些前药分子(prodrug),体外筛选难以发现;有些化合物可能抑制细菌毒力因子的表达;有些化合物可能有免疫增强作用;有些化合物体外抗菌活性好但毒性大或缺乏良好的药代动力学特征,体外筛选很难同时解决这些问题<sup>[9]</sup>。

Moy等<sup>[10]</sup>首次用粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)感染秀丽隐杆线虫,建立了体内抗菌药物筛选方法,与体外抗菌筛选方法相比存在下列优点:能发现具有抗菌活性的前药;发现降低细菌毒力或感染

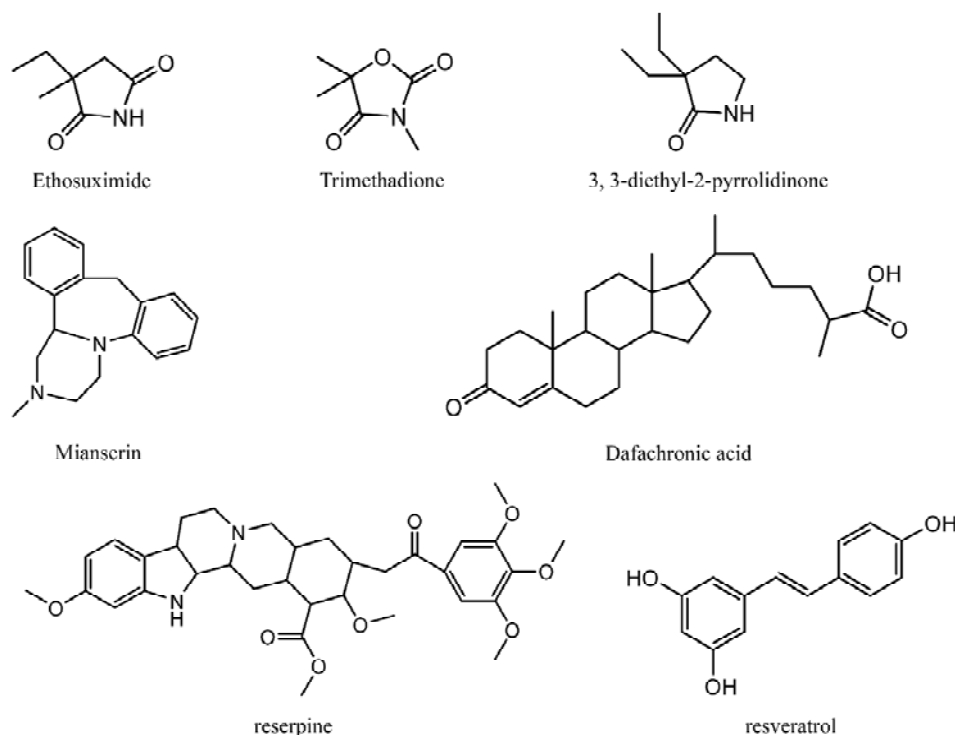


图1 影响*C. elegans*寿命和衰老的化合物

性的化合物;发现能抑制细菌体内繁殖的化合物;发现增强免疫活性的化合物。此外,还能同时评价被筛化合物的毒性,并排除药代动力学特征较差的化合物。

筛选在96孔板上进行,80或88孔为被筛选样本,16或8孔分别为阳性、阴性对照。将L4期或成年早期的线虫转移到粪肠球菌菌苔感染8h,用含卡那霉素(80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的缓冲液漂洗,约25条线虫连同50  $\mu\text{L}$ 缓冲液被转移到96孔板的孔内,然后将50  $\mu\text{L}$ 含制霉菌素(125 units/mL)的被筛样本溶液加入孔内,用透气膜覆盖96孔板后,置25 $^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度为80%—85%的培养箱中培养,培养6d后肉眼观察记分,被筛选样本孔的线虫成活数超过50%的视为有效,成活数超过阴性对照孔2或3倍的样本将进行复筛验证。

对6000个化合物和1136种天然提取物的筛选结果表明,有些化合物和提取物体外无抗菌活性,但具有体内抗细菌感染活性;有些化合物体内外均有抗菌活性,但体内抗菌浓度大大低于体外抗菌浓度;作阳性对照的抗生素的体内抗菌浓度(MIC)是体外MIC的5—20倍,其有效剂量与人体有效血药浓度接近。共发现16个化合物(图2)和9种提取物具有较强的体内抗菌活性。以四环素为阳性对

照,测定了16个化合物的体外最小抑菌浓度、体内治疗浓度以及与未治疗组对比的体内细菌清除率和线虫成活倍数(表1)。

Breger等<sup>[11]</sup>借鉴Ausubel的筛选方法,建立了白色念珠菌秀丽隐杆线虫感染模型,对1266个已知药理活性的化合物进行抗真菌药物筛选,发现15个化合物能延长被感染的秀丽隐杆线虫的寿命,并能抑制白色念珠菌在秀丽隐杆线虫体内形成假丝,其中咖啡酸苯乙酯(CAPE)、依诺沙星(enoxacin)和黄钟花醌(lapachol)活性较强(图3),咖啡酸苯乙酯、依诺沙星对白色念珠菌小鼠感染模型有治疗作用,但黄钟花醌对小鼠感染模型无效。值得注意的是,咖啡酸苯乙酯的体内抗真菌浓度明显低于体外抗真菌浓度,说明其抗真菌感染机制与杀菌作用无关。另外,用白色念珠菌秀丽隐杆线虫感染模型筛选发现的抗真菌药物在结构上与现有抗真菌药物缺乏明显的相似性,两者之间可能存在不同的作用机制,这些发现可能为研制新的复合型抗真菌药物奠定基础。

从微生物次生代谢产物中寻找新的抗菌药物已经越来越难,人工合成产物要么毒性大,要么难以克服细菌多药耐药性(MDR),从植物中发现新的抗菌药物重新受到重视。有些中草药或方剂无体外抗菌活性,但有体内抗细菌感染作用。我们按照

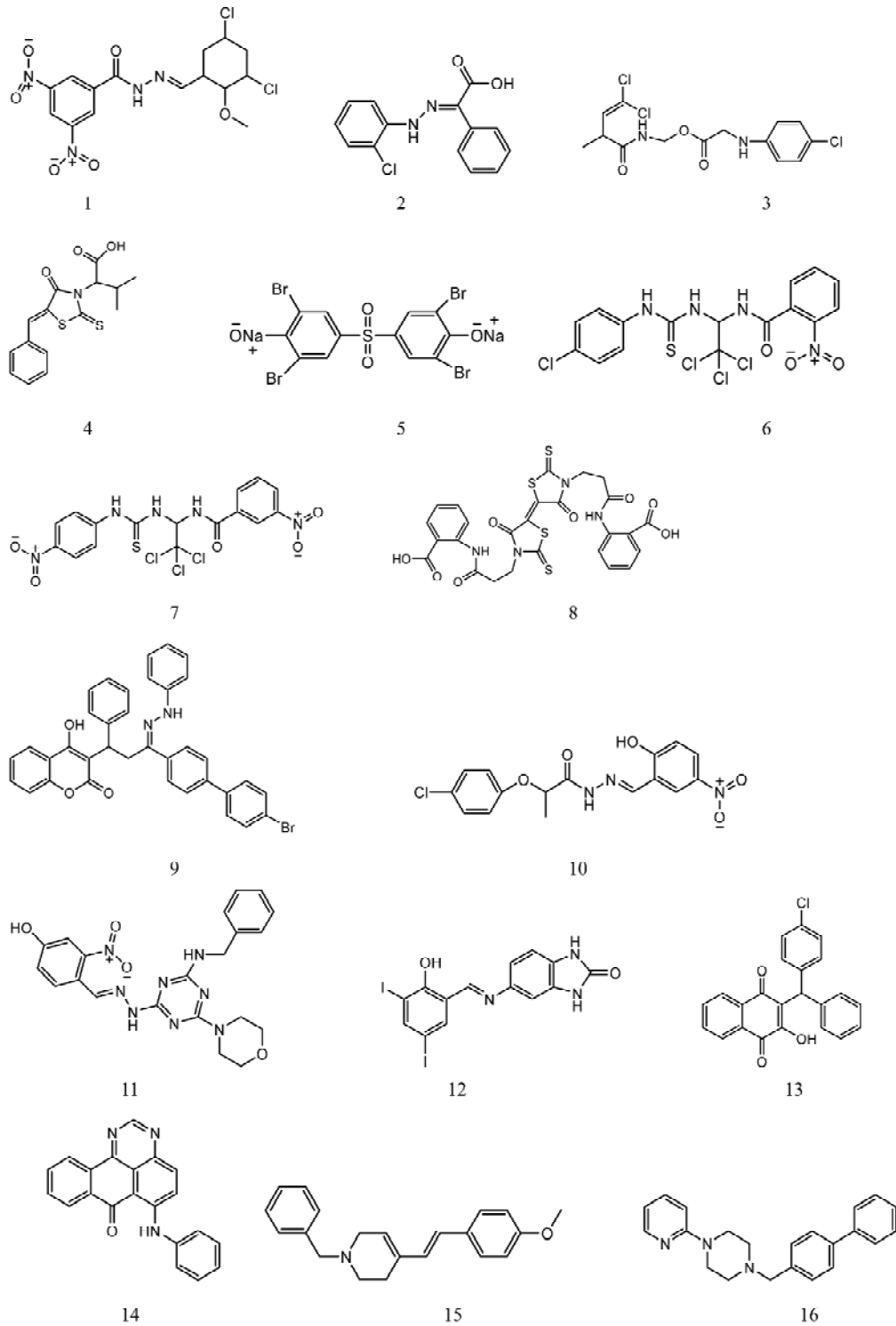


图2 延长被*E. faecalis*.感染线虫寿命的化合物结构<sup>[10]</sup>

Ausubel的方法,用秀丽隐杆线虫N2株感染粪肠球菌,发现了一些无体外抗菌作用的中药和方剂能提高线虫的成活率,认为这种筛选方法有益于发现具有新的抗菌机制的药物。当然,该方法也存在一些缺点,比如,较难控制线虫的感染程度,线虫

对某些化合物较敏感,浓度稍高即导致线虫死亡,但作为一种体内抗菌普筛方法,比用小鼠感染模型经济简便得多。

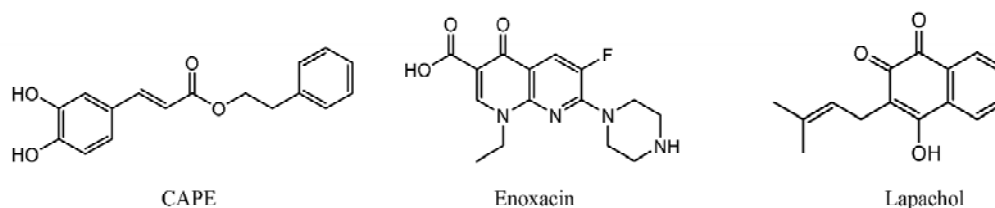
### 3 其他药物的筛选

Devgen公司<sup>[12]</sup>采用秀丽隐杆线虫筛选得到新的

表1 秀丽隐杆线虫感染粪肠球菌(*E. faecalis*)后能提高其生存率的化合物<sup>[10]</sup>

| 化合物编号   | 提高线虫存活倍数<br>(与未给药组*比) | 给药浓度<br>$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ | 线虫体内细菌数百分率<br>(与未给药组†比) | 最小抑菌浓度<br>(MIC) $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ |
|---------|-----------------------|--|-------------------------|--|
| 1       | 3.0                   | 25                                       | 22                      | >125   |
| 2       | 2.6                   | 12.5                                     | 13                      | >125   |
| 3       | 1.6                   | 6.3                                      | 2                       | >30  |
| 4       | 2.7                   | 50                                       | 7                       | >125   |
| 5       | 2.3                   | 12.5                                     | 1                       | >125   |
| 6       | 2.2                   | 100                                      | 8                       | >125   |
| 7       | 3.0                   | 25                                       | 1                       | 31.3   |
| 8       | 3.1                   | 25                                       | 3                       | >125   |
| 9       | 3.3                   | 25                                       | 6                       | 31.3   |
| 10      | 2.6                   | 25                                       | 5                       | 3.9  |
| 11      | 2.6                   | 25                                       | 8                       | 15.6   |
| 12      | 3.0                   | 50                                       | 1                       | 15.6   |
| 13      | 2.7                   | 63                                       | 9                       | 7.8  |
| 14      | 2.1                   | 6.3                                      | 11                      | 2.0  |
| 15      | 1.9                   | 100                                      | 61                      | >125   |
| 16      | 1.8                   | 25                                       | 101                     | >125   |
| Tet(对照) | 4.0                   | 1.6                                      | 5                       | 0.24   |

Tet, 四环素。\*注意, 未给药组中24%的线虫在感染后能生存4 d。†未给药组的线虫平均每个虫体内细菌数为 $3.3\times 10^4$ 。

图3 延长被*C. albicans*感染线虫寿命的化合物结构

胰岛素增敏剂(insulin-sensitizers)和抗心律失常药。一般情况下, 野生秀丽隐杆线虫处于不利环境时, 如过分拥挤、食物不足, 常常进入冬眠状态, 称为dauers期幼虫, 而秀丽隐杆线虫的*daf-2*基因突变株, 即使在有利环境中, 其发育也只能停留在dauers幼虫期间, 但当其胰岛素信号传递途径被刺激后, 则其表型可发生改变, 发育成成虫。因为与秀丽隐杆线虫胰岛素信号传递有关的基因和人类的类胰岛素生长因子受体基因属直系同源基因, 故能使*daf-2*基因突变株转变成成虫的化合物有可能对人类胰岛素信号传递存在调节作用, 由于成虫与dauers期幼虫十分容易区别, 故Devgen公司用*daf-2*基因突变株建立了抗2型糖尿病的药物筛选模型, 接着该公司构建了能产生定量荧光信号的*daf-2*基因工程虫株, 建立了高通量筛选方法。

心律失常与电压门控快钾通道蛋白(Kv4)有关, 采用传统的离体筛选方法, 很难测定化合物对该蛋白质的调节功能, Devgen公司构建了人源化的虫株, 以秀丽隐杆线虫咽泵运动频率为指标, 建立了Kv4调节剂的高通量筛选方法<sup>[13]</sup>。

Baumeister等<sup>[14]</sup>用秀丽隐杆线虫建立了镇静、镇痛和抗炎药物的筛选方法, 并申请了专利。该方法的缺点是秀丽隐杆线虫对热刺激的逃避程度不能进行定量, 有待进一步完善。

#### 4 结束语

基于靶点的高通量筛选方法通常遇到的问题是, 筛选得到的化合物是否具有好的药物动力学特征, 以及化合物进入体内后是否因脱靶效应(off-target effects)而呈现不良反应。要解决这些问题只有依赖体内筛选, 但是在技术上很难用小鼠、兔、

犬等动物实施高通量筛选, 而且成本太高。用秀丽隐杆线虫做体内筛选有下列优越性: (1) 以 *E. coli* 为食, 易于培养; (2) 世代交替短, 繁殖快, 可在短期内获得大量虫体; (3) 个体小, 可以用 96 孔板进行培养, 单孔可培养百余条成虫, 可实现高通量筛选; (4) 通体透明, 采用体内荧光标记技术可以研究活体内轴突发育、脂肪代谢等动态过程; (5) 药物可通过消化系统、表皮等途径进入体内, 与人类给药途径类似。

迄今为止, 还没有通过秀丽隐杆线虫筛选上市的药物。毕竟秀丽隐杆线虫与人类在生理、病理等方面差异太大, 因此, 只能作为一种初筛手段来看待, 应正确认识秀丽隐杆线虫在药物筛选中的优势与不足, 明确筛选目的和范围。

除药物筛选外, 秀丽隐杆线虫还在以下药学领域中得到广泛应用: 药物新靶点的发现和证实、药物作用机制研究 (MOA, mechanism of action)、人类疾病模型的复制及药物干预、化学基因组学和毒理学<sup>[15-18]</sup>。可以预料, 化学基因组学与秀丽隐杆线虫相结合, 将为揭示小分子对生命现象的干预规律奠定基础, 使秀丽隐杆线虫在药物筛选中发挥更大作用。

### [参 考 文 献]

- [1] Olsen A, Vantipalli MC, Lithgow GJ. Using *Caenorhabditis elegans* as a model for aging and age-related diseases. *Ann NY Acad Sci*, 2006, (5): 120-8
- [2] Evason K, Huang C, Yamben I, et al. Anticonvulsant medications extend worm life-span. *Science*, 2005, 307 (12): 258-62
- [3] Petrascheck M, Ye XL, Buck LB. An antidepressant that extends lifespan in adult *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 2007, 450 (11): 553-6
- [4] Gerisch B, Rottiers V, Li D, et al. A bile acid-like steroid modulates *Caenorhabditis elegans* lifespan through nuclear receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104 (12): 5014-9
- [5] Viswanathan M, Kim SK, Berdichevsky A, et al. A role for SIR-2.1 regulation of ER stress response genes in determining *C. elegans* lifespan. *Dev Cell*, 2005, 9 (5): 605-15
- [6] Srivastava D, Arya U, SoundaraRajan T, et al. Reserpine can confer stress tolerance and lifespan extension in the nematode *C. elegans*. *Biogerontology*, 2008, 9 (5): 309-16
- [7] Collins JJ, Evason K, Kornfeld K. Pharmacology of delayed aging and extended lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Exp Gerontol*, 2006, 41 (10): 1032-9
- [8] Kaletta T, Hengartner MO. Finding function in novel targets: *C. elegans* as a model organism. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5 (5): 387-98
- [9] Bhavsar AP, Brown ED. The worm turns for antimicrobial discovery. *Nat Biotechnol*, 2006, 24 (9): 1098-100
- [10] Moy TI, Ball AR, Ausubel FM, et al. Identification of novel antimicrobials using a live-animal infection model. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103 (27): 10414-9
- [11] Breger J, Fuchs BB, Aperis G, et al. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay. *PLoS Pathogens*, 2007, 3 (2): 168-78
- [12] Verwaerde P, Anthonissen C, Deprez B, et al. Lipid uptake assays [EB/OL]. WO/2001/088533
- [13] Jan KT, Els DN, Maria PGK. Methods for identifying and developing compounds that interact with voltage-gated potassium channels of the kv4 family [EB/OL]. WO/2003/097682
- [14] Ralf B, Nicole W. Method for investigating the suitability of a material as a medicament [EB/OL]. WO/2000/073491
- [15] Ashrafi K, Chang FY, Watts JL, et al. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes. *Nature*, 2003, 421 (6920): 268-72
- [16] Jones AK, Buckingham SD, Sattelle DB. Chemistry-to-gene screens in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Rev Drug Discov*, 2005, 4 (4): 321-30
- [17] Lackner MR, Kindt RM, Carroll PM, et al. Chemical genetics identifies Rab geranylgeranyl transferase as an apoptotic target of farnesyl transferase inhibitors. *Cancer Cell*, 2005, 7 (4): 325-36
- [18] Braungart E, Gerlach M, Riederer P, et al. *Caenorhabditis elegans* MPP model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings. *Neurodegener Dis*, 2004, 1 (4): 175-83