

· 综述 ·

中药活性成分的高通量筛选新技术

丁璇, 洪战英, 柴逸峰(第二军医大学药学院, 上海 200433)

[摘要] 以近年来国内外研究文献为基础, 总结概括了近5年来中药活性成分的高通量筛选新技术的进展情况。其中生物色谱技术、芯片技术和计算机辅助虚拟筛选等技术得到了广泛应用。这些新技术在中药活性成分筛选方面, 比起传统方法具有效率高、自动化、通量高的优点, 可以为中药活性成分的高通量筛选提供新思路。

[关键词] 生物色谱; 芯片; 虚拟筛选; 中药; 活性成分; 高通量

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2015)03-0193-05

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.03.001

New technologies for high throughput screening of effective traditional Chinese medicine components

DING Xuan, HONG Zhanying, CHAI Yifeng (School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[Abstract] The research progress on new technologies for high throughput screening of effective traditional Chinese medicine (TCM) components was summarized based on the recent documents at home and abroad, among which bio-chromatography, chip-technology and computer-aided virtual screen technology were widely used. Compared with traditional screening technology, those new ones had shown advantages in efficiency, automation and high-throughput, providing new ways to screen effective components of TCM with high throughput.

[Key words] bio-chromatography; chip; virtual screen; traditional Chinese medicine; effective components; high throughput

中药拥有几千年的传承历史, 人们在疾病预防、诊断和治疗中积累了大量的中药使用经验, 并形成了系统性的理论^[1]。现今在全球范围约有20%的人在使用天然药物和中药, 青蒿素的广泛使用就是一个成功的范例^[2]。在美国, 虽然中药已被批准作为一种营养添加剂来使用^[3], 不必进行等同于处方药的安全有效性评价, 但是, 为了让中药得到进一步的认可, 真正走向国门, 筛选出确切的中药活性成分就显得尤为重要。

现今, 中药药效研究和活性成分筛选的主要目标成分依然是中药里含量较高的一些标志物^[4]。这些标志物因为含量高、易提纯, 可以使用传统方法对其进行筛选。传统方法常使用一些经典的动物、细胞模型, 但其应用又往往因较低的重现性和通量而受到限制。此外, 一些具有潜在药效活性的微量成分因含量较低、难于提纯, 无法使用这样的方法进行

探究和筛选。为了克服这些难题, 实现中药活性成分的高通量筛选, 生物色谱技术、芯片技术和计算机辅助虚拟筛选技术等都在近几年受到了很大的关注。其中, 生物色谱技术结合了传统色谱分离理论和生物大分子的活性, 兼具色谱分析和生物分析的优点, 可以相对真实地模拟生物体内环境, 进行相关的中药活性药物筛选; 芯片技术则具有自动化、高通量的特点, 人工操作所造成的误差较小; 计算机辅助虚拟筛选技术可以有效减少筛选工作的任务量, 提高活性药物筛选的效率, 并且对在药物筛选前、中、后期的各个过程中所得到的结果均可以进行评价, 为中医药研究人员提供参考。笔者针对近年来中药活性成分高通量筛选的这几项新技术进行综述。

1 生物色谱技术

1.1 原理 生物色谱技术(biochromatography)出现于20世纪80年代中后期, 是一种将各种生物活性物质, 如活性大分子、细胞膜、人工合成膜或细胞等固定在固定相上的新型色谱技术^[5], 该技术可以用于筛选活性成分, 也可用于活性分子药动学参数的测定。

[作者简介] 丁璇, 硕士研究生. Tel: (021)81871261; E-mail: 155335961@qq.com

[通讯作者] 柴逸峰, 教授, 博士生导师. 研究方向: 复杂体系分析. Tel: (021)81871201; E-mail: yfchai@smmu.edu.cn

1.2 技术路线 如图 1 所示,生物色谱模型的建立,首先要分离或培养活性大分子或细胞等生物材料,然后再将得到的这些生物材料与色谱固定相采用共价键合或者疏水相互作用的方式进行结合固定,从而得到具有活性的生物色谱柱,再将其与自动

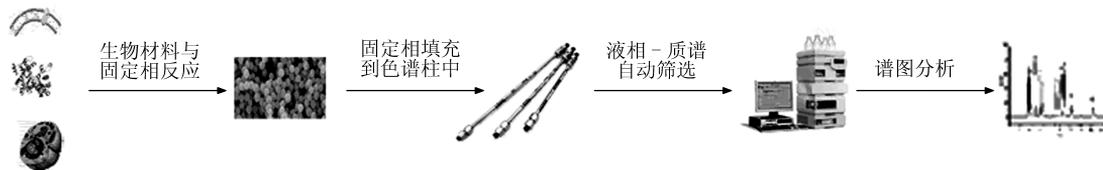


图 1 生物色谱技术路线图

1.3 应用 将靶标或蛋白固定于固定相上,利用靶标或蛋白与活性成分特异性结合的特点来分离或筛选化合物的色谱技术被称之为前沿亲合色谱。由于蛋白和靶标的确定性,以及蛋白固定技术的稳步发展,才使前沿亲合色谱成为一种比较成熟的、重现性较好的生物色谱技术。Luo 等^[6]使用兔体内血清纯化后的多克隆抗体来模拟 C 型肝炎病毒的蛋白酶,并将其固定于色谱柱固定相上与质谱联用,对叶下珠属草本类植物的提取物中酚酸类物质的保留特性进行了考察,发现了云实素等活性成分,从而建立起一种从天然产物中高通量地筛选高效低毒的治疗 C 型肝炎病毒的活性成分的新方法。Zhao 等^[7]使用前沿亲合色谱的方法,利用 G 蛋白偶联的蛋白色谱柱,对黄连总提取物进行了筛选,得到了盐酸小檗碱,盐酸巴马汀和药根碱等活性成分。

生物膜色谱是一种简单、可重复、高效的色谱模型,可以直接反映某些化学成分的药效参数,如活性和结合力等,可以极大地缩小天然产物中活性成分的筛选范围^[8]。Wang 等^[9]构建了 α_1A 肾上腺受体高表达的细胞膜色谱模型,从中药红毛七中筛选出了两种作用于 α_1A 肾上腺受体的活性成分木兰花碱和红毛新碱。Zhang 等^[10]使用成纤维细胞生长因子受体 4 高表达的 HEK293 细胞,构建了用于筛选抗癌活性成分的细胞膜色谱模型,并从甘蓝的多种成分中筛选出了一种芥子酸胆碱成分。Yue 等^[11]使用一种肾上腺素能受体高表达的细胞系,构建了用于筛选肾上腺素能受体抑制剂的细胞膜色谱模型,应用该模型从中药羌活提取物中成功筛选出活性成分欧前胡乙素。为进一步提高生物膜色谱的分离分析效率,Chen 等^[12]利用全二维色谱的方法,建立了一个新型的全二维细胞膜色谱模型。该模型同时使用一根 Hep/G₂ 细胞膜色谱柱和一根整体柱,利用十通阀的切换

进样器、高效液相色谱仪和质谱检测器连接,可以实现在线的高通量自动筛选。根据固定相的不同,生物色谱法分为前沿亲合色谱法、生物膜色谱法、细胞生物色谱法等;根据样品处理方法的不同,又可以分为离线生物色谱法和在线生物色谱法。

在两根柱子上实现了中药活性成分的有效分离,并考察了相关成分的保留情况,发现了小檗碱和四氢巴马汀等几种活性物质。多维液相色谱技术具有较高的峰容量,可以更有效地分离复杂成分并具有更高分辨率,将其应用于生物膜色谱技术之中,可以有效提高复杂体系分离分析结果的准确性和信息含量。

全细胞色谱是一种新兴的生物色谱技术。Yakufu 等^[13]使用毛细管电泳与全细胞结合的方法,将 CCR4 高表达的细胞固定在毛细管壁上,构建了一个全新的细胞毛细管电泳模型,可以用于筛选相关的活性药物。由于细胞的完整性,该色谱技术能更加真实地模拟体内大分子靶标的生物活性,对于药物筛选更加灵敏可信,但是在细胞固定方面还存在较大难度。

2 芯片技术

2.1 原理 生物芯片(bio-chip)将生物活性材料(寡聚核苷酸、DNA、多肽、抗原、抗体乃至细胞和模式动物等)以阵列形式固定于支持物的表面,可以在其上同时进行数千乃至上万次实验,从而达到高通量、快速筛选的目的^[14]。通常来说,生物芯片与拇指一般大,固定于其上的生物活性物质微小,以点阵的方式排列在硅基上,很像计算机的芯片,所以它被称为“生物芯片”。采用微电子学的并行处理和高密度集成技术,可利用软件同时并行分析成千上万种生物样品,具有高通量、微型化、自动化以及检测样品用量少等优点。

2.2 技术路线 如图 2 所示,生物芯片的筛选步骤主要包括靶标验证部分、筛选部分及后期优化部分。即先通过前期实验确证或者文献报道搜寻的方式得到具体作用靶标,然后再将相应的靶标蛋白、受体、DNA 等大分子甚至是特定细胞或生物个体接种于

芯片之上,使用备选库中的药物与芯片作用反应,通过检测荧光变化或者其他各种生化指标来判断药

物结合力和作用的强弱,最终进行结构优化或者修饰,并进行进一步确证。

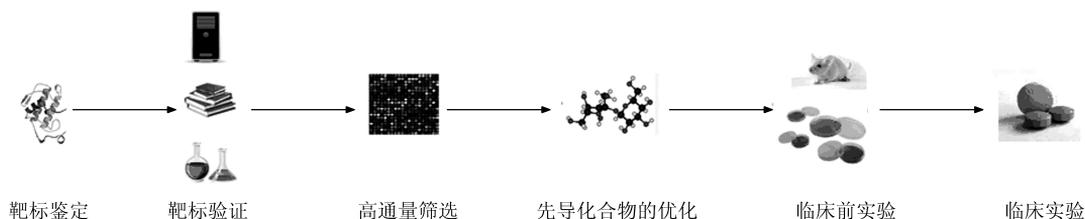


图2 生物芯片技术路线图

2.3 应用 在过去几年里,分子水平的活性测定(受体结合和酶活抑制等)为天然产物的活性成分筛选打开了一条全新的思路^[15],因而生物芯片在分子水平层面得到了很大程度的发展。随着高通量分析技术的完善,利用基因组学和蛋白组学,可以对中药有效成分进行更加准确的筛选。

在基因研究层面,生物芯片将大量特定序列的核酸片段有序地固定在载体上与标记核酸分子进行杂交,通过检测杂交信号的强弱来判断样品中靶分子的组成及数量。Ren等^[16]利用基因芯片,观察了丹参总提物、丹参亲水性成分与亲脂性成分对HUVEC细胞系基因表达水平的影响,并发现亲脂性成分对其基因表达水平的影响要大于另外两组,共有511个基因发生显著变化,其中236种基因表达水平上调,并证明丹参亲脂性成分对血管异常增生引起的疾病具有一定的治疗作用。Liu等^[17]使用基因芯片和基因组学的方法,发现中药四物汤方剂具有潜在的植物激素样活性,并提出了利用天然产物中植物激素治疗癌症的可行性。

在蛋白研究层面,生物芯片的制备是通过把预先制备好的蛋白靶标固定于经化学修饰的玻片或硅片等载体上,使蛋白质与载体表面结合,同时仍保留蛋白质的理化性质和生物活性。Song等^[18]利用商业化的CM10蛋白芯片,针对慢性乙肝患者,对中医理论中“证”的情况进行了研究,并发现了4种潜在的生物标志物。Li等^[19]通过动物模型试验确定了急性痛风性关节炎表达的几种差异蛋白,然后使用这些蛋白构建了蛋白芯片,发现TRAIL和Neuropilin-2蛋白在其病程中发挥着重要作用,TRAIL诱导的细胞因子及其结构类似物可以作为一种肿瘤治疗的新型活性成分。

随着微流控技术的发展,特定细胞乃至模式生物个体层面的芯片技术也逐渐得到了发展。Carr等^[20]利用线虫为模式生物模型,将其置于微

流控芯片上,使用多种药物液滴与其进行相互作用,通过观测给药前、给药时和给药后的各项指标,测定咪唑类药物的药效情况,从而达到高通量筛选的目的。Sandoz等^[21]搭建了一个装有由神经干细胞分化所得的组织样品的三维微流控芯片,通过检测其电生理活动情况,可以检测潜在活性药物的有效性和毒性。

生物芯片具有自动化、高通量的优点,有效避免了大量重复性实验工作,人工干预造成的误差较小,因而其所得结果也较为稳定、可靠,这对于中药有效成分的体外筛选具有十分重要的意义。

3 计算机辅助虚拟筛选技术

3.1 原理 计算机辅助虚拟筛选技术(virtual screen technology)的理论基础是Emil Fischer(1894年)提出的“锁钥原理”^[22],即活性药物只与体内某特定靶点进行相互作用,如同钥匙和锁一般,其相互作用准确、精密,且十分依赖分子构型和空间位阻效应。在20世纪60年代,Hansch和Fujita等^[23]研究发现了经典的定量构效关系,极大地促进了近代计算机辅助虚拟筛选技术的发展。

3.2 技术路线 如图3所示,筛选目标确定后,需要在相应数据库中检索大量分子结构信息,并使用软件对其进行处理,模拟其与已知靶标的结合情况,然后给出得分函数和评价结果,最终筛选出一种乃至几种潜在的有效成分,进行进一步的体内药效作用实验。

3.3 应用 计算机辅助虚拟筛选技术的实现是通过计算机软件来实现的,它利用计算机强大的计算能力,在已经构建好的待筛选化合物的三维模型数据库中搜寻与靶标位点具有潜在相互作用的分子化合物,从而达到初步筛选的目的^[24]。如今有许多数据库提供靶标蛋白或小分子的相关结构信息,如CamMedNP、INC、ACD、TCMD、CNPD、CHMIS-C等^[25-28]。但是仅仅具有数据还远远不够,研究者还

需要能够将这些数据变为可视化、可操作性的筛选模型的软件。常见的筛选软件有 Sybyl、Insight II、Dock、Gold、Glide、AutoDock、eHiTS、IPA 等^[29-31],

其中多数需要在 Linux 操作系统下的大型服务器端运行,但也有部分软件可以在预装有 Windows 系统的个人电脑端运行。

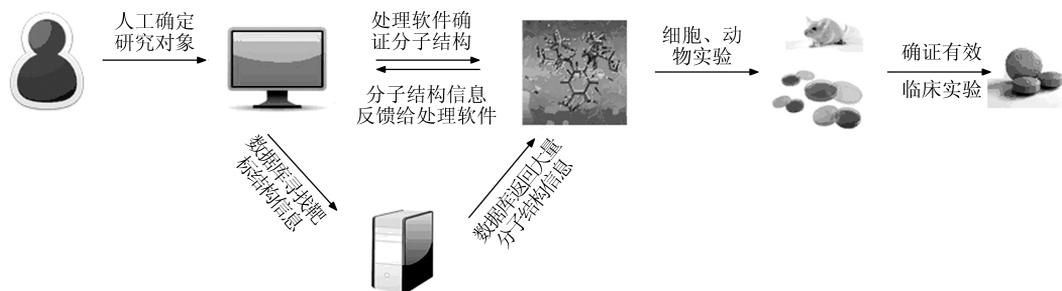


图 3 计算机辅助虚拟筛选技术路线图

近年来, Karthick 等^[32]利用计算机辅助虚拟筛选技术,使用 TCMD 数据库筛选出一种具有潜在的神经氨酸酶抑制剂活性的先导化合物新葡萄糖芸苔素,并可以有效治疗奥司他韦抗病毒引起的感冒。Tian 等^[33]使用药效基团和虚拟筛选联用的方法,筛选出了多个结构全新的 Rho 激酶 1 抑制剂。Berger 等^[34]使用 DOCK 软件,以脂肪酸结合蛋白(FABPs)为靶标,对 100 多万种化合物进行了虚拟筛选,初步得到了 48 种化合物,并最终确定了 4 种活性化合物,其中 α -truxillic 酸作为一种中药活性成分,具有抗炎和抗伤害的药理作用。Wang 等^[35]使用 IPA 软件,对中药复方 PHY906 作用于荷瘤小鼠的药理机制进行了探究,发现其激活了荷瘤小鼠的促凋亡和抗炎通路,并进一步证实了其于化疗药物联用时的减毒增效作用。计算机辅助虚拟筛选技术作为中药活性成分筛选的一种新兴技术,具有效率高、成本低、速度快、容量大的特性,在中药活性成分初步筛选过程中,可以对复杂体系中的多种成分实现一定的聚焦效果,缩小筛选范围。

4 总结与展望

中药作为一个巨大的人类遗产宝库,其药效已经得到了广泛的认可和验证。但是如何高效快速地筛选、分离出中药中的活性成分,实现中药的现代化,这还需要现代技术的辅佐。

生物色谱技术、芯片技术和计算机辅助虚拟筛选技术作为新兴的技术手段,相对于传统的活性成分筛选技术具有快速、高通量的分析特点,成本低、效率高。但同时也要清楚地认识到这些新技术的应用都有其各自的局限性,如生物色谱技术存在着非特异性结合的问题,芯片技术的实现需要明确的病理作用靶点、蛋白、细胞或模式生物个体,计算机辅助虚拟筛选技术会产生大量假阴性和假阳性结果等

等,因此这些技术的筛选结果需要进一步实验验证。但随着分析技术的不断发展和进步,这些局限性可以通过多种方式逐步解决。例如可以通过制定标准操作步骤和相应的质控规范,降低生物色谱重现性差、非特异性吸附所带来的影响;另外使用全二维色谱模型可以有效提高生物色谱的筛选和分离能力。而在进一步优化生物芯片结构,实现其微型化和集成化的同时,还要进一步将该模型信息化,充分挖掘其内涵信息,提高活性筛选效率;同时发展与质谱联用的生物芯片技术。虚拟筛选则需要利用多种筛选算法和数据库,对靶标和活性成分的相互作用进行确证,降低实验结果的假阳性率和假阴性率;另外,构建一个完整的中药化学成分数据库也是迫在眉睫的任务。随着这些新技术的发展和應用,它们将成为中药活性成分高通量筛选所必不可少的工具。

【参考文献】

- [1] Wong KC, Wu L. History of Chinese medicine. Being a chronicle of medical happenings in China from ancient times to the present period[J]. Nature, 1933, 4(5): 527-529.
- [2] Bent S. Herbal medicine in the United States: review of efficacy, safety, and regulation[J]. J Gen Intern Med, 2008, 23(6): 854-859.
- [3] Yeh GY, Eisenberg DM, Kaptchuk TJ. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes[J]. Diabetes Care, 2003, 26(4): 1277-1294.
- [4] Hopkins AL. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery[J]. Nat Chem Biol, 2008, 4(11): 682-690.
- [5] Chen C, Yang FQ, Zuo H, et al. Applications of biochromatography in the screening of bioactive natural products[J]. J Chroma Sci, 2013, 51(8): 780-790.
- [6] Luo H, Chen L, Li Z, et al. Frontal immunoaffinity chromatography with mass spectrometric detection: a method for finding active compounds from traditional Chinese herbs[J]. Anal Chem, 2003, 75(16): 3994-3998.
- [7] Zhao X, Li Q, Bian L, et al. Using immobilized G-protein

- coupled receptors to screen bioactive traditional Chinese medicine compounds with multiple targets[J].J Pharm Biomed Anal, 2012, 70: 549-552.
- [8] Wang B, Deng J, Gao Y, et al. The screening toolbox of bioactive substances from natural products: a review[J].Fitoterapia, 2011, 82(8): 1141-1151.
- [9] Wang L, Ren J, Sun M, et al. A combined cell membrane chromatography and online HPLC/MS method for screening compounds from *Radix Caulophylli* acting on the human α_{1A} -adrenoceptor[J].J Pharm Biomed Anal, 2010, 51(5): 1032-1036.
- [10] Zhang T, Han S, Huang J, et al. Combined fibroblast growth factor receptor 4 cell membrane chromatography online with high performance liquid chromatography/mass spectrometry to screen active compounds in *Brassica alba*[J].J Chromatogr B, 2013, 912: 85-92.
- [11] Yue Y, Xue H, Wang X. High-expression β_1 adrenergic receptor/cell membrane chromatography method based on a target receptor to screen active ingredients from traditional Chinese medicines[J].J Sep Sci, 2014, 37(3): 244-249.
- [12] Chen X, Cao Y, Lv D, et al. Comprehensive two-dimensional HepG2/cell membrane chromatography/monolithic column/time of flight mass spectrometry system for screening anti-tumor components from herbal medicines[J].J Chromatogr A, 2012, 1242: 67-74.
- [13] Yakufu P, Qi H, Li M, et al. CCR4 expressing cells cultured adherently on a capillary wall and formaldehyde fixed as the stationary phase for ligand screening by ACE[J].Electrophoresis, 2013, 34(4): 531-540.
- [14] Woo CSJ, Lau JSH, El-Nezami H, et al. Herbal medicine: toxicity and recent trends in assessing their potential toxic effects[J].Adv Bot Res, 2012, 62: 365-384.
- [15] Ye F, Wang H, Jiang S, et al. Quality evaluation of commercial extracts of *scutellaria baicalensis*[J].Nutr Cancer, 2004, 49(2): 217-222.
- [16] Ren G, Fan X, Liang Q, et al. Screening and evaluation of traditional Chinese medicine by microarray expression analysis[J].J Ethnopharmacol, 2013, 147(3): 564-569.
- [17] Liu M, Fan J, Wang S, et al. Transcriptional profiling of Chinese medicinal formula Si-Wu-Tang on breast cancer cells reveals phytoestrogenic activity[J].BMC Complement Altern Med, 2013, 13: 11-29.
- [18] Song YN, Zhang H, Guan Y, et al. Classification of traditional Chinese medicine syndromes in patients with chronic hepatitis B by SELDI-Based proteinchip analysis[J].Evid Based Complement Alternat Med, 2012, 2012: 626320.
- [19] Yao L, Dong W, Lu F, et al. An improved acute gouty arthritis rat model and therapeutic effect of *Rhizoma dioscoreae nipponicae* on acute gouty arthritis based on the protein-chip methods[J].Am J Chin Med, 2012, 40(1): 121-134.
- [20] Carr JA, Parashar A, Gibson R, et al. A microfluidic platform for high-sensitivity, real-time drug screening on *C. elegans* and parasitic nematodes[J].Lab Chip, 2011, 11(14): 2385-2396.
- [21] Sandoz A, Charvet I, Stoppini L, et al. Development of a microfluidic biochip for chronic monitoring of 3D neural tissues derived from human embryonic stem cells[J].Procedia Eng, 2013, 59: 46-50.
- [22] Behr J. The Lock-and-Key principle, the state of the art—100 years on[M].Chichester: Wiley, 1995: 1-336.
- [23] Hansch C. Quantitative approach to biochemical structure-activity relationships[J].Accounts Chem Res, 1969, 2(8): 232-239.
- [24] Ge H, Wang Y, Li C, et al. Molecular dynamics-based virtual screening: accelerating the drug discovery process by high-performance computing[J].J Chem Inf Model, 2013, 53(10): 2757-2764.
- [25] Lyne PD. Structure-based virtual screening: an overview[J].Drug Discov Today, 2002, 7(20): 1047-1055.
- [26] Irwin JJ, Shoichet BK. ZINC—a free database of commercially available compounds for virtual screening[J].J Chem Inf Model, 2005, 45(1): 177-182.
- [27] Chan AH, Wereszczynski J, Amer BR, et al. Discovery of *Staphylococcus aureus* sortase A inhibitors using virtual screening and the relaxed complex scheme[J].Chem Biol Drug Des, 2013, 82(4): 418-428.
- [28] Barlow DJ, Buriani A, Ehrman T, et al. *In-silico* studies in Chinese herbal medicines' research: evaluation of *in-silico* methodologies and phytochemical data sources, and a review of research to date[J].J Ethnopharmacol, 2012, 140(3): 526-534.
- [29] Pitt WR, Calmiano MD, Kroeplien B, et al. Structure-based virtual screening for novel ligands[J].Methods Mol Biol, 2013, 1008: 501-519.
- [30] Ellingson SR, Dakshanamurthy S, Brown M, et al. Accelerating virtual high-throughput ligand docking: current technology and case study on a petascale supercomputer[J].Concurr Comp Pract E, 2013, 26: 1268-1277.
- [31] Lavecchia A, Di Giovanni C. Virtual screening strategies in drug discovery: a critical review[J].Curr Med Chem, 2013, 20(23): 2839-2860.
- [32] Karthick V, Ramanathan K. Virtual screening for oseltamivir-resistant A (H5N1) influenza neuraminidase from traditional Chinese medicine database: a combined molecular docking with molecular dynamics approach[J].Springer Plus, 2013, 2(1): 115-124.
- [33] Tian S, Sun H, Li Y, et al. Development and evaluation of an integrated virtual screening strategy by combining molecular docking and pharmacophore searching based on multiple protein structures[J].J Chem Inf Model, 2013, 53(10): 2743-2756.
- [34] Berger WT, Ralph BP, Kaczocha M, et al. Targeting fatty acid binding protein (FABP) anandamide transporters—a novel strategy for development of anti-inflammatory and anti-nociceptive drugs[J].PLoS One, 2012, 7(12): e50968.
- [35] Wang E, Bussom S, Chen J, et al. Interaction of a traditional Chinese medicine (PHY906) and CPT-11 on the inflammatory process in the tumor microenvironment[J].BMC Med Genomics, 2011, 4(1): 38-50.