

## 编 译

## 走在药物发现前沿的高内涵药物筛选

陈 伟, 王莉莉\*

(军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

**摘要:** 高内涵药物筛选已经成为药物发现领域的一个重要部分, 在生物医药领域里的重要性日益突显, 其广泛应用必然会为药物发现带来新的希望与突破。高内涵药物筛选方法具有许多独特的优势, 它使得药物筛选更趋生物化。本文介绍了高内涵药物筛选的发展过程, 及其当前和潜在的应用领域, 探讨了高内涵药物筛选与其他研发技术手段之间的关系, 并就其在新药发现中的作用和前景进行了阐述。

**关键词:** 高内涵药物筛选; 高通量药物筛选; 药物发现; 靶标评价

**中图分类号:** R914.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0971(2007)03-0204-04

高内涵药物筛选 (high-content screening, HCS) 在药物研发后期的应用已有近 10 年的历史。科技的发展又推进 HCS 应用到药物研发早期, 包括高通量药物筛选 (high-throughput screening, HTS) 和先导化合物优化。近来, 图像分析和计算机技术的进步以及系统细胞生物学的技术革新, 又将 HCS 的应用拓展到药物靶标确证和包括 RNA 干扰 (RNAi) 筛选在内的基础生物学研究领域。当前, HCS 已应用于靶标确证的早期研究, 可以在更趋生物性环境下进行靶标特性的研究。

## 1 HCS 的发展

HCS 是一个能够进行荧光显微成像和定量图像分析的自动化平台。在 20 世纪 90 年代中期问世之初, 研究者们利用 HCS 对固定在微孔板里的染色细胞进行分析。对于细胞内的一些生物学变化, HCS 可以在单细胞水平上进行分析, 如蛋白磷酸化、转位、丰度的改变, 核内染色质构象改变的动态监测。图像分析软件对所有这些分析都可进行实时或样本采集后的定量分析。Cellomics 创造出 HCS 一词, 是在细胞进行定量分析过程中, 用来区分荧光显微技术和其他技术, 如凋亡的逐级分析法

(TUNEL 法)、酶学分析法及运用报告基因分析间接检测胞内信号转导的其他技术方法。

在早期临床前研究中, HCS 可使一些高难度和关键性分析能够自动化, 如化合物毒性特征指标, 药物处理后细胞内微核的检测。但由于费用昂贵, 目前 HCS 主要局限应用于筛选后期的化合物特性分析, 尚不能高通量。然而, HCS 十分适合进行精细和高劳动强度的细胞分析工作。它优于其他基于细胞的分析方法之处在于可以对每个实验细胞进行筛选, 包括细胞的大小, 形态和胞体或胞核的染色强度, 确定其是否符合分析条件并排除细胞碎屑人工荧光的干扰。HCS 的另外一个巨大优势是具有广阔的应用领域, 如应用于基因表达、蛋白定位、G 蛋白偶联受体激活和一般的信号转导分析。

与其他技术比较而言, HCS 具有多项技术优势, 如选择细胞群体和监测细胞变化的能力, 同时, 它也具有超出选择分析的应用模式。HCS 是个多参数技术, 可以组合运用多种不同的荧光标记, 在一个分析中进行 2 个或多个应答的检测。例如对 3 个转录因子的分析可用于检测对刺激发生反应的不同信号途径。但是, 常用染料的荧光发射和激发波谱的局限, 以及细胞中固有蛋白水平限制了在单个实验中只能同时应用 3~4 个通道。虽然存在这些局限, 但 HCS 可以很容易在单次分析中合并初次和二次检测结果。此外, 在应用 4 种荧光标记物的基础上可进行分布和动力学的定量测定, 确定胞内成分的重新定位和粒度大小; 并可以整合多个检测指标

收稿日期: 2006-10-26

作者简介: 陈 伟, 男, 在读博士研究生, 研究方向: 新药筛选与分子药理学, E-mail: weichen45@126.com

\* 通讯作者: 王莉莉, 女, 研究员, 研究方向: 新药筛选与分子药理学, Tel: 010-66874603, E-mail: wangll63@yahoo.com.cn

来分析,如整合有关凋亡的检测标准(如染色质结构、核仁结构和线粒体膜的完整性),对凋亡阶段和类型进行评价。

## 2 HCS 在 HTS 和先导物发现研究中的应用

HCS 显微平台和新的成像分析技术的提高促进了 HCS 在 HTS 和先导物筛选中的应用。Evotec 的 Opera™ 和 Amersham 的 InCell3000™ HCS 平台,能够以支持筛选的速率收集数据,这为 HCS 在 HTS

中的应用奠定了基础。HTS 分析要求高效稳定(即良好的信噪比),操作简捷。

通过特定细胞系和细胞系内标志物鉴定试剂的建立与确定,HCS 可以作为大型化合物库筛选的一种方法。例如,稳定表达融合绿色荧光蛋白(GFP)或加强型绿色荧光蛋白(EGFP)的细胞系,在药物靶标受到作用时,发生改变的蛋白功能及其定位可由 HCS 检测出。这些相关的 HTS 技术总结在表 1 中。

表 1 高通量筛选技术比较

技术名称	靶标特异?	途径特异?	对非靶向反应的整合性?	局限性
HCS	是,仅当所检测化合物是靶标底物时才会有特异性激活	是,对信号途径激活发生反应的转录因子和其他蛋白可做测试终点	是,毒副作用可以直接鉴别出,可涉及其他路径或靶标	数据信息量太大;特异性试剂难以获得或无法满足筛选需要
基于细胞的报告基因分析	否,报告基因对影响该信号途径中任何一步的化合物都会发生反应	是	是	启动子经常被多条信号途径激活(即使单个转录因子);假激活(如源于染色质结构)
结合分析(包括荧光偏振和近似亲和层析的体外分析技术)	是,靶标直接筛选	否	否	整体毒性,透膜性能和其他生物学行为不能直接评价

HTS 后化合物的优化,通常指的是先导物的研究,同时需要 HCS 分析工作增加,特别是对检测细胞生物学相关事件的分析,如蛋白从胞膜到胞质的转位、分化的原代神经细胞轴突生长等,这些为传统化合物筛选带来了新的内涵。HCS 的优势在于它能够以相当于体外分析的速率快捷地进行工作,确定先导物的特性,获得一系列化合物的构效关系数据。HTS 获得的化合物有效性和毒性等的生物信息可以和其他分析中得到的靶标结合能力和亲脂性能等数据进行便捷整合,进而得到比较完整的结果。

## 3 靶标确证中的 HCS: 生物学, RNAi 和化学基因组

### 3.1 疾病发生机制的阐明对靶标的确证的推动

靶标确证是确定哪个靶标可以用小分子抑制剂或生物药物调节的过程。其具有两方面的含义,即在最相关、可行的模型上对某一生物学过程的特征性描述和在较为容易操作的实验系统上进行的研究。这种矛盾存在于各种疾病中,可以总结为:人类

疾病总是一个不同类型细胞间复杂相互作用的结果,即某些功能失调细胞与受其影响的其他细胞或有直接影响疾病过程的细胞之间的相互作用。这类具有复杂基础的疾病包括间充质纤维细胞在肿瘤细胞增殖中的作用,激活的巨噬细胞在风湿性关节炎中的作用,神经胶质细胞在神经退行性疾病中的作用。而靶标确证的难点在于将这些复杂的相互作用在实验系统中模拟出来。并将这些研究应用到筛选模型中,进而鉴定出针对该特定靶标的调节剂。筛选工作不但要严格符合统计学要求,更应该尽可能地模拟靶标的生物学特性。以往很多情况下很难做到两者兼顾,现在 HCS 所具有的靶标定量的细胞生物学分析(如激酶底物的磷酸化)功能有效地改善了过去的许多其他筛选策略的缺憾。

HCS 在靶标确证中的其他优势还包括:(1)能够发展围绕细胞学终点的分析方法。这是 HCS 总的目标,如前所述,许多疾病是在疾病细胞和周围环境间异常相互作用的结果,反之亦然。HCS 能够分析细胞结构的改变,因而能够研究细胞与细胞间接

触所调节的生物学事件,这在其他分析模式中是不可能的。(2)HCS的单细胞分析,能够像流式细胞仪获得数据一样,通过对数据进行分析,鉴定亚细胞群的变化,直接追踪而无需预先分析,因此有可能会得到一些有用的额外信息。

### 3.2 RNAi 在靶标确证研究中的作用

靶标确证有多种方法,其中 RNAi 是应用最多的方法之一。它选择性在 mRNA 水平减少基因表达,可在单次分析中快速筛选多个基因。这些候选基因来源于转录研究或基因家族筛选,包括已知药物靶标家族的大约7 000个基因。

起初, RNAi 集中于单基因上,需进行大量确证试验以保证所观察到的效应是由靶基因 mRNA 或蛋白的减少所致。由于靶标外其他基因所产生的一些非特异性效应的存在,因此谨慎确证所得结果十分必要。近年来,学者们就 RNAi 特异性问题进行了大量研究,通过序列设计已可能将引起靶向外效应 siRNA 序列减低到最小化。尽管 RNAi 是高度可变的,但是同时检测多基因的筛选可在一定程度上避免这些问题。但值得注意的是 RNAi 不一定会真实地模拟小分子抑制剂,如在多功能复合体蛋白的效应。因为在这种情况下,部分抑制该蛋白可以减弱其功能,但如果完全去除该蛋白则将会影响该蛋白复合体的全部功能。尽管 RNAi 在靶标确证研究中存在一定的不足,但仍然是靶标确证的一个重要方法。

### 3.3 HCS 和 RNAi

HCS 和 RNAi 文库筛选均是应用广泛和有效的靶标识别确证方法,两种方法结合运用 HCS 可以对 siRNA 处理或表达 RNAi 构建体的细胞进行有效的分析。在这种情况下 HCS 为传统的筛选增添了新的内容。但 HCS 和 RNAi 的有效整合也面临着一些挑战。对于许多细胞而言, RNAi 敲除效应远较化合物处理结果更为复杂。此外,严密的统计分析(即高的 Z 评分)在 RNAi 库筛选中也较难实现,其原因如下:(1)HCS 文库较 HTS 化合物库小(分别是 1 000 ~ 5 000 个 RNAi 和远大于 50 万个化合物);(2)很多情况下所检测基因都已经显示出具有潜在有效性;(3)许多 RNAi 仅表现出部分敲除效应(表达量降低大约 40% ~ 70%)。这些问题在多参数筛选中被扩大化,因为这些因素使得单个参数(或分析)命中率提高。因此,尽管初始命中率可能较高但仍需大量筛选的确认。虽然运用 HCS 的 RNAi 筛

选存在各种挑战,这种新颖的筛选方法已经获得了大量有意义的结果。

### 3.4 HCS 与化学基因组学

化学基因组学是一个已经采用 HTS 进行生物学研究的新兴基础科学领域。其目的不是为了确定治疗干预措施,而是要运用化学工具来研究诸如细胞周期和分化的过程。其分析方法相当复杂(经常是基于细胞的),因此,筛选的化合物不是很多(1 万 ~ 5 万个化合物)。这些基于 HCS 的化学基因组筛选可以在肿瘤细胞内鉴别发现 FOXO 转录因子功能和有丝分裂的化学抑制剂。

## 4 HCS 在临床的应用

在诸如生物标记研究之类的临床治疗学发展中 HCS 也可发挥一定的作用吗?生物标志物的测定是临床上评价一种疗法的有效性和毒性的方法。在实验室诊断分析(通常为酶联免疫吸附分析)中对其进行测定。而基于图像的生物标志物的检测具有直接反映新疗法效果的优势。许多这样的生物标志物涉及到组织,尤其是肿瘤组织,以便肿瘤本身成像。目前,肿瘤代谢、缺氧和其他表型特征成像或器官功能也被列入考虑范围。除了在诊断中运用 HCS,它还可以用来做代谢分析,尤其是活体组织样本上。临床前 HCS 分析可以评定在细胞或诸如 3D 类培养系统的复杂细胞模型上治疗的有效性,也可以作为生物标志物。尽管有效生物标志物的好处很多,但在实际工作中却存在一定困难,因为这涉及到医疗和病人在内的很多问题。尤其在临床应用中需要明确的指导方案,包括诸如样本的收集和处理等。总之, HCS 在临床上的应用会为疾病的治疗带来新的希望,同时也会带来相关的问题,这些问题的解决只有待实验科学家和临床医生都熟练掌握生物标志物从临床前到临床实践的应用过程后才可能实现。

## 5 推动 HCS 拓展的关键因素

HCS 的发展有赖于可检测靶标数量的增加和对图像数据信息处理能力的提升。推动 HCS 发展的几个重要因素如下。

### 5.1 特异性蛋白和细胞成分的标记抗体及其他试剂

HCS 的运用与特异蛋白或细胞结构的识别能力直接相关。在 RNAi 和小分子筛选中有效运用了一些简单染料,如 DNA 染色的 4',6-二氨基-2-苯基

吡啶(DAPI)。蛋白特异性标记试剂的开发为HCS应用于日益更新和复杂的生物体系中的靶标确证起到了巨大的推进作用。最近,一些用于蛋白杂交、免疫组化和流式细胞仪的试剂及日益增多的抗体都被成功开发特化用于细胞学研究。

目前,简单抗体和细胞蛋白的直接标记方法有了长足的提高,这对于在三通道和四通道试验中多重抗体的使用极为重要。量子光点发射光谱范围窄,在标记细胞表面蛋白方面逐渐引起了人们的兴趣。然而因其粒子远较其他染料大,现实中很难应用。针对G蛋白偶联受体(GPCR)开发的含有GFP的融合蛋白,转位输出蛋白或以细胞周期依赖方式而转位和降解的细胞周期蛋白,还有诸如 Halo Tags™ (Promega) 和 Smap Tags (Pierce) 等相关策略都是HCS的强而有效的技术手段。采用这些技术开发的产品在HTS中都表现良好。将这些方法应用到靶标评价中可能会为寻找到新靶标特异性抗体提供一个更好的选择。此外,超过四通道的成像能力将大大增加HCS的复杂性和分析能力。

### 5.2 更快更灵活的成像分析模式

图像分析应用能力的不断提高,使得针对小分子治疗药物的筛选和精确的生物学研究成为可能。已经用于基因功能研究、化合物筛选和药物特性评价中的复合细胞事件筛选需要强大的运算模式。这些手段十分新颖,也拓展了运用图像数据筛选特异性反应的能力。然而,细胞学筛选中的一些问题,如双核细胞的出现,HCS的检测限度,真正HTS水平的细胞分析筛选,都依赖于图像数据处理能力的有效提高。

基于大量细胞学特征,研究者进一步拓展图像分析和一般细胞生物学筛选策略的应用,得到了大量的数据。图像分析应用使得这些筛选包括细胞图像,一个公开资源的图像分析平台,定制图像分析软件和 Cellomics 的 Morphology Explorer 成为可能。筛选所产生的大量数据可通过一种常用的处理方法,即与转录资料数据相类似的处理方法进行探索。细胞学数据如肌动蛋白-纤维密度和核大小都是高度

复杂的。如果没有研究所用生物系统的检测有效性知识为基础,想要标准化或比较这些细胞学特征是十分困难的。

### 5.3 针对数据管理问题的多种解决方案

HCS是一个数据信息密集的技术。一个由4~6人组成的研究小组,通过检测每孔(20倍镜下96孔板,每孔可采80个点)细胞的多个点,一年内可生成4太拉字节(Tb)数据。HTS每周能够生成0.25 Tb数据,而活细胞的高分辨率研究每天能够生成0.5 Tb数据。研究者必须能够回顾数据,并能够在不同地点应用不同的分析软件、运算方法,修改并重新分析图像,或是调用图像核实确认数据分析。这就需求超出固定配置的应用软件,这对HCS的数据管理是一个新的挑战。

除研究者自己需求外,保存并管理好大量的历史数据资料是必要的。对于药物研究来说,从药物筛选的早期开始就需要保留那些需要递呈给FDA的化合物数据。这意味着可能需要按照FDA服从标准协议第11部分第21节,把临床前HCS数据也保留备用。多数学术研究也一样,需要对原始数据进行类似的管理和证明。对于那些高度复杂的数据集合如转录资料数据来说已经制定了可依据的标准;然而,相对于HCS庞大的数据管理问题来说,这也只能算是冰山一角而已。

## 6 结语

HCS过去主要应用于高度特异的化合物特性研究,目前已经广泛应用于临床前药物研究的各个阶段,其能够成功完成从前不能进行的定量细胞生物学研究。虽然HCS仍存在一些技术限制,如速度、灵敏度和信息挖掘等问题。但HCS前景广阔,可以用来解决药物发现过程中的一些重大问题,包括靶标特异性作用及化合物毒性的区分、新抑制剂筛选及使基因研究超越一般的应答反应。可预见HCS将会成为药物与基因分类的新技术手段,比如细胞学谱,这是对药物研究具有直接意义的系统生物学的实体展现。