

高内涵药物筛选方法的研究及应用

张莉, 杜冠华*

(中国医学科学院·中国协和医科大学 药物研究所, 北京 100050)

关键词: 高内涵药物筛选; 药物发现; 细胞水平检测

中图分类号: R965.1 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2005)06 - 0486 - 05

High content drug screening and its application

ZHANG Li, DU Guan-hua*

(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China)

Key words: high content screening; drug discovery; cell-based assay

高通量药物筛选 (high-throughput screening, HTS) 是 20 世纪 80 年代中期产生的为寻找先导物针对大量样品进行药理活性评价分析的一种技术手段, 在创新药物的研究和开发中发挥了重要作用。本室于 1998 年在国内率先将其用于创新药物的研究, 已发现一批具有潜在研究价值的化合物^[1,2]。近年来在药物发现领域又出现了一个新概念——高内涵药物筛选 (high-content screening, HCS)。本文就高内涵药物筛选目前的研究和应用情况作一讨论。

1 高通量药物筛选与高内涵药物筛选

高通量药物筛选是以药物发现的基本规律为基础, 应用药理学、生物化学、分子生物学及细胞生物学、计算机科学、药物化学、组合化学等多个学科知识的一种药物筛选体系。由于高通量筛选在创新先导物的发现过程中具有高效、快速、微量等特点, 虽然其出现只有 20 年时间, 却已经在全世界新药研究机构、大型医药公司创新药物发现过程中广泛应用。高通量药物筛选模型主要建立在分子和细胞水平, 特别是分子水平筛选模型使用最多, 筛选的靶点包

括受体、酶、离子通道等。高通量药物筛选的基本模式是以单一的筛选模型对大量样品的生物活性进行评价, 从中发现针对某一靶点具有活性的样品。随着人类基因组计划的完成, 潜在药物靶点不断被发现, 新的药物靶点不断出现, 不仅为创新药物的发现提供了机遇, 也对高通量筛选效率提出新的要求。在过去的近十年中, 通过提高仪器制造技术、生物检测手段、计算机数据分析软件的功能等, 使高通量筛选技术朝着日筛选规模越来越大, 速度越来越快的方向发展^[3]。目前已经形成了可日筛选 10 万样次的超高通量筛选技术 (ultra high-throughput screening, Ultra-HTS)。但是, 高通量药物筛选技术的单靶点单指标的筛选方法, 已经不能适应药物发现的需要, 而且也不利于对化合物活性的综合评价。在此情况下, 以多指标多靶点共同作用为主要特点的高内涵药物筛选技术应运而生。

高内涵药物筛选的概念早在 1997 年就有人提出, 认为高内涵药物筛选是解决药物发现过程中出现瓶颈问题的一条新途径, 许多药物研究人员认识到高通量药物筛选的发展不仅与筛选规模的扩大相关, 更重要的是与筛选结果质量的提高密不可分^[4-6]。高内涵药物筛选实际上就是相对于高通量药物筛选结果单一, 而其筛选结果多样化的一种筛选技术手段。高内涵药物筛选模型主要建立在细胞水平, 通过观察样品对固定或动态细胞的形态、生

收稿日期: 2004-08-18.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30171148); 国家中医药管理局中医药科技研究专项 (02-03ZP08).

* 通讯作者 Tel / Fax: 86 - 10 - 63165184,
E-mail: dugh@imm.ac.cn

长、分化、迁移、凋亡、代谢及信号转导等多个功能的作用,涉及的靶点包括细胞的膜受体、胞内成分、细胞器等,从多个角度分析样品的作用,最终确定样品的活性和可能的毒性。从筛选载体上看,高内涵药物筛选与高通量药物筛选并没有显著的区别,也在微孔板上进行,目前使用较多的是96孔微板。高内涵药物筛选的检测体积并未因检测指标增加而增高,操作步骤同样简单可行、自动化。

2 高内涵药物筛选技术和方法

高内涵药物筛选研究早期,认为高内涵药物筛选之所以能同时对两个以上指标检测,主要依赖仪器设备多通道检测技术的提高。最近逐渐认识到,高内涵药物筛选实际上是样品制备、自动化分析设备、数据处理软件、配套检测试剂、信息学等多方面技术整合的结果,特别是电子荧光显微镜和荧光试剂对高内涵药物筛选方法的建立起到重要作用。与传统的细胞成像系统相比,高内涵药物筛选使用的细胞成像系统要求完全自动化,能够适应固定细胞或细胞动态过程中多靶点成像分析。第一台高内涵药物筛选设备(ArrayScan and KineticScan™ HCS Reader)是由Cellomics公司生产,该设备拥有全区域发光的白色光源带、多道滤光片和一个CCD(charge coupled devices)照相机。与荧光显微镜相配套在高内涵药物筛选中的常用试剂为荧光蛋白,对固定细胞或活细胞的动态分析都显示出高度特异性和敏感性,也正是荧光蛋白生物传感器的应用才使荧光成像显微镜在高内涵药物筛选中广泛应用。目前高内涵药物筛选主要在影响细胞功能方面应用,例如细胞毒性、G蛋白偶联受体调节剂、转录因子的活化、活性物质释放等^[7-9]。

2.1 细胞毒高内涵药物筛选方法

细胞毒性检测一直是药物发现过程中的重要部分,细胞模型在高通量筛选中应用最广泛的是观察样品的细胞毒性,其中对肿瘤细胞株的毒性作用可用来筛选抗肿瘤药物。以前几乎所有针对细胞增殖的高通量检测方法都是基于酶活性或细胞蛋白量等单一指标的生化反应,如SRB(sulforhodamine B)法,MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)法,5-溴脱氧尿嘧啶(bromodeoxyuridine, BrdU)参入法,³H参入法等。最常用的方法是MTT法,原理是活细胞内线粒体脱氢酶能将氮唑化物(MTT)由黄色还原为蓝色的甲臞(formazan),后者溶于有机溶剂,甲臞产量与活细胞数成正比,最终通过检测活细胞内的线粒体酶活性来间接反映细胞的生长情况。

但细胞增殖的生物学反应非常复杂,包括几条通路的活化,如受体刺激后信号转导、蛋白激酶激活、受体底物磷酸化、DNA合成增加等都可促使细胞增殖。

传统的比色法不足以反映样品产生细胞毒时的作用机理,细胞毒产生的机理包括两个,一个是直接损害细胞DNA,如博来霉素;另一个是抑制微管聚合,如秋水仙碱。为了更深入地了解样品对细胞生长的影响机制,Vogt A等^[10]报道新建立了一种高内涵细胞增殖筛选模型,可以直接反映细胞数目、线粒体聚集、核形态学变化等多个方面的信息。该模型采用三重荧光标记法:Hoechst 3334(EX350/EM461)标记细胞核呈蓝色,MitoTracker(EX556/EM573)标记细胞浆中的线粒体呈红色,微管免疫印迹荧光反应二抗标记物AlexaFluor488(EX494/EM519)呈绿色,样品与标记好的细胞作用结束后,由ArrayScan II高内涵药物筛选记数仪(一种全自动荧光显微镜)直接对细胞进行成像分析,每孔可同时得到三个图像的筛选结果,蓝色荧光变化与细胞数目、核形态相关,红色荧光变化与线粒体聚集相关,通过结果可以直接分析样品的细胞毒性作用机理是损害了细胞核DNA还是抑制了微管聚集,结果显示用该模型得到的微管调节药物与其他报道一致^[11]。

另有研究报道采用ArrayScan高内涵药物筛选计数仪检测人正常表皮成纤维细胞(normal human dermal fibroblast, NHDF)在生长因子作用下的增殖状况,检测内容包括Ki-67, BrdU, Phospho-Rb,组蛋白H3(Phospho-histone H3)等4个指标^[12]。Ki-67抗原一般在细胞循环过程中的细胞核上高度表达,被认为是增殖的标志之一。组蛋白H3磷酸化是细胞周期M相特征化生物标记物。BrdU与胸腺嘧啶结构相似,在DNA合成过程中能与胸腺嘧啶一样参入其中,可反映细胞核增殖。pRb蛋白是一种抑制肿瘤生长的蛋白,在细胞循环过程和凋亡中起重要调节作用,pRb磷酸化也被认为是细胞增殖的一个标志。Gaspri F等采用相应单克隆抗体和荧光标记二抗,其中Fluorolink™ Cy2™(EX489/EM506nm)标记羊抗鼠二抗、Fluorolink™ Cy2™(EX489/EM506nm)标记羊抗兔二抗,Fluorolink™ Cy3™(EX554/EM566nm)标记羊抗兔二抗,DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole, EX359/EM461nm)标记组蛋白H3二抗。结果显示ArrayScan检测BrdU参入量和组蛋白H3磷酸化水平与单独对两者进行染色分析结果一致,说明每一种荧光染料都

不影响其他染料的作用。用 ELISA 和流式细胞仪检验表明 ArrayScan 检测系统获得的数据可靠,并具有高重复性。因此作者认为 ArrayScan 高内涵药物筛选能够在高通量多指标筛选中使用,成像分析可通过 4 个荧光通道实时进行不同标记物的生物活性测定,每一个都代表不同的作用途径。检测的 4 个指标即可代表整个细胞增殖过程,也可以代表细胞增殖过程中的特殊循环周期,如组蛋白 H3 代表 M 相,而 BrdU 代表 S 相,故运用该模型筛选可以发现细胞毒性药物作用的不同时期。

2.2 G 蛋白偶联受体高内涵药物筛选方法 已知 G 蛋白偶联受体 (G-protein-coupled receptors, GPCRs) 是最大的细胞表面受体家族,是小分子调节剂治疗干预的丰富靶点来源。研究表明用荧光生物传感器如荧光染色、蛋白标记等方法对 G 蛋白偶联受体活化或调节剂进行高内涵药物筛选,可平行得到 GPCR 自己或和它相连的第二个蛋白在细胞的位置、数目等多种信息数据,这些方法都被称为高内涵药物筛选^[13-15]。目前检测绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 生物传感器的最先进的系统是 Cellomics 公司生产的 ArrayScan。这个荧光成像平台完全可以充分利用 GFP 技术检测蛋白定位。ArrayScan 系统扫描板中的每一个孔可进行细胞群成像及单个细胞分析。两个荧光通道用来分析给药前后 hGR-GFP,高内涵药物筛选根据蛋白移位、蛋白浓度、特殊特性等变化检测 GPCR 活化状态。

在 GPCR 高内涵药物筛选中使用最多的标记物就是绿色荧光蛋白。绿色荧光蛋白是一个来自 JELLY 鱼 (Aequoria Victoria) 的天然蛋白,在起始氨基酸序列里有发色团。GFP 发色团是由一个处于 65 - 67 位置的丝氨酸酪氨酸甘氨酸三肽组成。GFP 有大量衍生物主要发色团激发峰的位置是向红色转换,从野生型 GFP 395 nm 到 488 - 490 nm,蛋白发色区域发生一个或更多氨基酸置换反应,但这些突变体依旧产生绿色光,最大波长接近 507 - 511 nm,而且激发光比野生型 GFP 更有效。使用较多的是 Ser65Thr 被称为加强型绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP)。研究人员又建立了加强型蓝色荧光蛋白 (enhanced blue fluorescent protein, EBFP)、加强型黄色荧光蛋白 (enhanced yellow fluorescent, EYFP)、加强型蓝绿色荧光蛋白 (enhanced cyan fluorescent protein, ECFP),能分别产生蓝色、黄绿色、蓝绿色等荧光信号。作为一个转录

报告信使, GFP 除了可以检测基因表达变化外,还可以用来检测蛋白定位、降解等。绿色荧光蛋白可与 GPCR 的 C 末端结合^[16]。高内涵药物筛选可根据标记的荧光蛋白提供细胞成分和过程中的动态变化,大量绿色荧光蛋白衍生物具有合适的特点用于高通量和高内涵药物筛选^[17]。

除了绿色荧光蛋白对 GPCR 标记检测方法外,最近又出现了一个新方法 pH 敏感花青苷 (Cyanine dyes) 染色法^[18]。原理是 CypHer-5 是一个对 pH 敏感性花青苷衍生物,强烈的荧光只有在酸性环境 (pKa 6.1) 中才被检测到。GPCR 细胞外的氨基末端表位决定簇可与标记 CypHer-5 的表位决定簇抗体结合,抗体-GPCR 复合物所在的细胞培养液 pH 7.4,染色发出微弱的荧光不能被观察到。只有当 GPCR 内化,配体激活 GPCR 后 pH 值降低,染色团才能发荧光。该方法在高内涵药物筛选中具有广泛应用前途。

2.3 其他高内涵药物筛选 高内涵药物筛选除在细胞毒、G 蛋白偶联受体等方面应用较多外,尚有报道在凋亡、雌激素受体等方面的研究。有研究表明多元极化荧光检测可以显著提高单孔筛选的信息量,如甾体激素受体调节剂选择性的筛选,利用不同荧光探针和 TAMRA 标记的追踪物可以识别选择性作用雌激素受体或孕酮受体的配体。在检测过程中即可评价选择性,不用进一步分别筛选来确定选择性^[19]。也有报道采用高内涵药物筛选方法研究双特异性磷酸酶 (DSPases) 抑制剂^[20]。另有研究用多指标高内涵药物筛选寻找促进肿瘤细胞凋亡的抗肿瘤药, HeLa 细胞和淋巴瘤细胞 U937 在细胞毒药物作用下,培养一定时间后,加入 DNA 结合染料 Hoechst 33342,荧光连接探针结合活化 caspases 和 氨基基-X-rosamine 来检测线粒体膜电位 (MMP),使用 ArrayScan 仪器获取每孔一定细胞数的荧光成像,应用现有此类药物结果显示, caspase-3 活化呈时间和浓度依赖性,线粒体膜电位降低,核分裂浓缩增加,因此这个方法可用来筛选新的凋亡诱导剂^[21]。

3 高内涵高通量筛选

高内涵药物筛选由于检测水平为细胞水平,测试仪器多采用荧光显微镜,因此筛选通量一直不是太高,数据处理繁琐。但也有研究者尝试提高高内涵药物筛选通量即建立高内涵高通量筛选方法,例如在单孔中进行多种非同源成分的多指标高通量 ELISA 法检测^[22]。细胞水平多核受体拮抗剂检测、

分离的细胞数,高内涵高通量筛选是高内涵药物筛选中可用于高通量筛选的方法和技术。Vogt A等^[10]认为,他们所建立的细胞毒高内涵药物筛选模型也完全可用于高通量筛选。但由于通量提高与检测设备的改进密切相关,目前高内涵高通量筛选尚处于研究阶段。

4 炎症因子抑制剂多指标筛选方法

本室在提高筛选结果信息量方面也做了大量工作,建立了针对 IL-1, IL-8 和 TNF- α 等炎症细胞因子的多指标多靶点筛选模型。目的是为发现新的具有抗炎作用的药物提供一种快速有效的方法。作者以人外周血白细胞为研究对象,与脂多糖、样品共同孵育一定时间后,同时检测 3 种炎症细胞因子分泌水平。结果显示人外周血白细胞在脂多糖刺激下可产生高水平的炎症细胞因子,抗炎药物 NDGA 和 Diclofenac 对 IL-1 和 TNF- α 有较强的抑制作用,而对 IL-8 无明显影响。

作者的实验结果显示人外周血白细胞经 LPS 长时间(4 h)诱导后即可合成和释放高浓度的炎症细胞因子,比未加刺激剂的对照组增高明显,3 种炎症细胞因子的释放水平已经可以用来筛选样品的抑制作用。通过 5 脂氧酶抑制剂 NDGA 和环氧酶抑制剂 Diclofenac 在该模型上的应用,提示该筛选模型不仅能筛选同时作用多种炎症细胞因子的药物,而且能表明对炎症细胞因子的选择性。

本模型的检测方法与目前国外高内涵筛选主要采用的细胞成像技术不完全一致,但由于本模型能够同时提供对 3 种炎症因子的作用,筛选结果信息含量丰富,筛选效率大大提高,而且采用人血白细胞作为研究对象,比用细胞株或动物的白细胞研究药物对炎症细胞因子的抑制作用更接近人的生理状态,筛选意义也更大,也是一种切实有效的寻找新的抗炎先导化合物的多指标多靶点筛选方法^[23]。

5 展望

从上面的高内涵药物筛选方法的研究及应用情况可以看出,高内涵药物筛选已经成为药物发现领域中的一个重要组成部分。高内涵药物筛选方法在药物发现过程中有许多优势。其中最显著的一个优点就是降低筛选成本。为降低筛选成本,进行了多方面的尝试,包括降低筛选体积、筛选样品混合、多靶点多指标平行检测等。但就筛选体积方面,目前高通量筛选规模已非常可观,许多筛选在 384 或 1536 孔板上进行,由于筛选体积变小,对相应处理反应液体的设备要求越高,筛选体积缩小的可能性

越来越小。检测混合样品虽然能有效地减少检测次数,但初筛后筛选结果的处理分析工作量增大,而且由于多个化合物存在一个孔里,相互影响溶解度,也可能会因为混合样品中某一个化合物的作用而掩盖其他化合物的活性,因此其使用也受到限制。多指标多靶点高内涵药物筛选则在一次筛选后获得样品对多个靶点的作用信息,筛选体积不必太低,检测指标的试剂互不影响,因此多指标同时评价的高内涵药物筛选不仅是先导物发现效率提高的一个新方法,而且也是未来药物筛选成本节省的方法之一。随着高内涵筛选的发展,越来越多的新技术应用其中,有报道用一个简单的流式细胞仪进行高内涵筛选,并从 2 000 个化合物中筛选出 15 个具有增强抗肿瘤活性的化合物^[24]。

由于高内涵药物筛选技术目前尚处于发展阶段,还有大量需要解决的技术难题,如常用的荧光蛋白灵敏度尚需提高,GFP 和它的衍生物是天然荧光蛋白,没有酶的信号放大作用,一个分子的 GFP 只能产生一个光子,相对酶来说敏感性有待提高。高内涵药物筛选通量亦有待提高,要求相应的通量筛选仪器。另外,许多荧光标示物对活细胞来说是器质性染色,染料浓度必须非常谨慎加入,确保细胞在孵育过程中保持活性,最大程度降低潜在的毒性反应,因此选择合适的荧光探针也是高内涵药物筛选成功的关键。但作者相信高内涵药物筛选技术将变得越来越成熟,在药物发现过程中显示更多的优势,最终使药物发现的方式和效率发生巨大的变化。

References

- [1] Du GH, Hu JJ, Xia LJ, *et al.* Development and status of drug discovery [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1998, 30(11): 166 - 169.
- [2] Zhang L, Shang NY, Du GH. Establishment and application of high throughput screening for discovery of new antidepressants [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2003, 38(4): 263 - 266.
- [3] Connick JH. A flexible technology platform to explore valuable drug targets [J]. *Biochem Soc Trans*, 2002, 30(4): 786 - 788.
- [4] Giuliano KA, DeBiasio RL, Dunlay RT, *et al.* High-content screening: a new approach to easing key bottlenecks in the drug discovery process [J]. *J Biomol Screen*, 1997, 2(3): 249 - 259.
- [5] Giuliano KA, Taylor DL. Fluorescent-protein biosensors: new tools for drug discovery [J]. *Trends Biotechnol*, 1998, 16(3): 135 - 140.
- [6] Dove A. Screening for content—the evolution of high throughput [J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(8): 859 -

- 864.
- [7] Haskins JR, Rowse P, Rahbari R, *et al.* Thiazolidinedione toxicity to isolated hepatocytes revealed by coherent multiprobe fluorescence microscopy and correlated with multiparameter flow cytometry of peripheral leukocytes [J]. *Arch Toxicol*, 2001, **75**(7): 425 - 438.
- [8] Giuliano KA. High-content profiling of drug-drug interactions: cellular targets involved in the modulation of microtubule drug action by the antifungal ketoconazole [J]. *J Biomol Screen*, 2003, **8**(2): 125 - 135.
- [9] Conway BR, Minor LK, Xu JZ, *et al.* Quantitative analysis of agonist-dependent parathyroid hormone receptor trafficking in whole cells using a functional green fluorescent protein conjugate [J]. *J Cell Physiol*, 2001, **189**(3): 341 - 355.
- [10] Vogt A, Kalb EN, Lazo JS. A scalable high-content cytotoxicity assay insensitive to changes in mitochondrial metabolic activity [J]. *Oncol Res*, 2004, **14**(6): 305 - 314.
- [11] Minguéz JM, Giuliano KA, Balachandran R, *et al.* Synthesis and high content cell-based profiling of simplified analogues of the microtubule stabilizer (+)-discodermolide [J]. *Mol Cancer Ther*, 2002, **1**(14): 1305 - 1313.
- [12] Gasparri F, Mariani M, Sola F, *et al.* Quantification of the proliferation index of human dermal fibroblast cultures with the ArrayScan high-content screening reader [J]. *J Biomol Screen*, 2004, **9**(3): 232 - 243.
- [13] Conway BR, Demarest KT. The use of biosensors to study GPCR function: applications for high-content screening [J]. *Receptors Channels*, 2002, **8**(5 - 6): 331 - 341.
- [14] Gurwitz D, Haring R. Ligand-selective signaling and high-content screening for GPCR drugs [J]. *Drug Discov Today*, 2003, **8**(24): 1108 - 1109.
- [15] Conway BR, Minor LK, Xu JZ, *et al.* Quantification of G-protein coupled receptor internalization using G-protein coupled receptor-green fluorescent protein conjugates with the ArrayScan trade mark high-content screening system [J]. *J Biomol Screen*, 1999, **4**(2): 75 - 86.
- [16] Milligan G. High-content assays for ligand regulation of G-protein-coupled receptors [J]. *Drug Discov Today*, 2003, **8**(13): 579 - 585.
- [17] Kain SR. Green fluorescent protein (GFP): applications in cell-based assays for drug discovery [J]. *Drug Discov Today*, 1999, **4**(7): 304 - 312.
- [18] Adie EJ, Kalinka S, Smith L, *et al.* A pH-sensitive fluor, CypHer5, used to monitor agonist-induced G protein-coupled receptor internalization in live cells [J]. *Biotechniques*, 2002, **33**(5): 1152 - 1154, 1156 - 1157.
- [19] Blommel P, Hanson GT, Vogel KW. Multiplexing fluorescence polarization assays to increase information content per screen: applications for screening steroid hormone receptors [J]. *J Biomol Screen*, 2004, **9**(4): 294 - 302.
- [20] Vogt A, Cooley KA, Brisson M, *et al.* Cell-active dual specificity phosphatase inhibitors identified by high-content screening [J]. *Chem Biol*, 2003, **10**(8): 733 - 742.
- [21] Lovborg H, Nygren P, Larsson R. Multiparametric evaluation of apoptosis: effects of standard cytotoxic agents and the cyanoguanidine CHS 828 [J]. *Mol Cancer Ther*, 2004, **3**(5): 521 - 526.
- [22] Mendoza LG, McQuary P, Mongan A, *et al.* High-throughput microarray-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *Biotechniques*, 1999, **27**(4): 778 - 788.
- [23] Zhang L, Du GH. Study of high throughput screening for inhibitors of inflammatory cytokine [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2003, **19**(11): 1260 - 1263.
- [24] Gasparetto M, Gentry T, Sebt S, *et al.* Identification of compounds that enhance the anti-lymphoma activity of rituximab using flow cytometric high-content screening [J]. *J Immunol Methods*, 2004, **292**(1 - 2): 59 - 71.