

# 细胞模型发展现状及应用于中药研究的探讨\*

□王春梅\*\* 乔延江\*\* (北京中医药大学中药学院生物制药系 北京 100102)

**摘 要:**细胞模型最早被用来筛选抗微生物药物,随着高通量药物筛选的需要,细胞模型迅速发展成熟起来。该文综述细胞模型在药物高通量筛选和高通量毒性筛选中的应用,介绍利用 Caco-2 细胞模型进行药物体外代谢研究。并对细胞模型用于中药研究的前景进行分析,简单探讨了细胞模型用于中药筛选、活性成分确定、药理研究和药物代谢分析的可能方面。

**关键词:**细胞模型 高通量筛选 中药

充分利用现代生物技术和方法是我国中药现代化的基本内容。高通量药物筛选 (High Throughput Screening, HTS) 技术是现代药学研究的重要工具之一,它的发展很大程度上是因为一个古老方法的复兴: 早先细胞水平的筛选,主要用于抗微生物药物筛选。随着分析技术和微型化技术的提高,细胞模型筛选在药物研究中的应用迅速扩展。药物筛选技术经过几十年的发展,在许多药物研究机构已经建立了比较完善的体系,但将现代药物

筛选技术应用到中药现代化研究中,需要进行艰苦的尝试和探讨<sup>[1]</sup>。本文就细胞模型在现代药学研究中的应用作简要综述,对应用于中药研究的趋势进行探讨。

## 一、细胞模型用于高通量药物筛选

细胞模型是指细胞水平的药物筛选模型。HTS 技术是 20 世纪末发展起来的药物开发新技术,其核心部分由体外分子或细胞水平的筛选模型、计算机控制的操作系统和灵敏的生物反应检测系统组成。多种多样的重组靶点的

出现奠定了 HTS 的基础。分离的蛋白质等生物分子不能代表复杂的生物系统,而细胞模型为药物研究提供了一个完整的生物系统,因此,细胞模型的研究为体外研究提供了重要的数据补充。

### 1. 细胞模型适用的前提

许多因素影响到 HTS 过程中分析模式的选择和应用,因为细胞水平的筛选和生化或其他分离的靶点筛选的特点不同,所以需要决定是否该药物适用细胞模型筛选以及哪一步用细胞模型。主要需要考虑: 靶标的价值、得到的难易程

收稿日期: 2004-02-01

\* 国家重点基础研究发展规划项目 (G1999054400) 方剂关键科学问题的基础研究,课题负责人: 王永炎。

\*\* 联系人: 王春梅, 博士, 副教授, 主要从事中药生物技术方面的研究, Tel: 010-64711199 转 6045, Mobile: 010-86428951, E-mail: wchunmei@126.com。乔延江, 本刊编委, 教授, 博士生导师, 北京中医药大学中药学院院长, E-mail: yjqiao@263.net。

[ World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica ] 29

度以及状态和复杂性。如果功能蛋白或活性酶靶标难以分离或药物的特性不是很清楚,细胞模型便是最快速、有效而且便宜的筛选方式。另外,细胞模型适用于生化分析不能完成的复杂靶标的研究,这些靶标可能涉及受体或细胞因子间的复杂的相互作用,比如调节信号传导通路中的本身的影响因子没研究清楚的靶标。

## 2. 可用的细胞模型<sup>[2]</sup>

细胞的可获得性、细胞的行为以及细胞背景信号的获得及放大决定了是选用原代细胞、细胞系还是基因工程细胞系。人源的原代细胞系被证明是与生理条件最相似的模型系统。但是,原代细胞的数量不能满足高通量筛选的需要。

转染的人源细胞系是现在最常用的细胞筛选模型。内源的靶标在这些细胞系中表达,比如核肽受体在SK-N-MC中表达,因此筛选可以在这些细胞系的自然状态下进行<sup>[3]</sup>。

分子和细胞生物学技术在克隆和表达人的蛋白方面的发展促使高表达靶标的细胞系供给细胞筛选研究<sup>[4]</sup>。表达可以是瞬时的或稳定的并且有些可以有几套表达系统。可以用质粒转染或反转录病毒感染获得。

由于缺少人源材料、原代细胞增殖能力差而用于细胞存在许多问题,因此HTS多用永生细胞系。然而,因为永生细胞的较强的增殖能力使它表现异常的遗传和功能特点。所以,国外的许多研究开始把精力集中于通过特定的克

服衰老信号和缩短端粒的分子策略创造新的细胞系。这些策略包括表达病毒性原癌基因和端粒酶的催化亚基来产生永生细胞系。然而,原癌基因引起的长久的细胞增殖可能产生不可预知的结果,特别是在细胞分化方面,因此,为了提供更合适的药物研究细胞模型,发展可条件控制的细胞永生方法成为研究的可能方向。

## 3. 应用中的问题

不考虑分析方法,细胞模型的关键挑战来自于细胞毒性、细胞生长和细胞的粘连性。细胞模型的HTS中,化合物的细胞毒性可能掩盖靶标的活性产生假阴性,或者在抑制剂筛选时产生假阳性。化合物的细胞毒性取决于细胞的背景、化合物剂量和作用时间长短。因为大多数的筛选库溶解于DMSO中,对DMSO的耐受性限制了筛选的化合物的最大浓度。对多数细胞系来说,1%的DMSO明显干扰了筛选分析<sup>[5]</sup>。对于需要长时间孵育(24~48h)的筛选,细胞间生长状态的不同可能产生信号漂移。

## 4. 以细胞功能为基础的分析方法

细胞对不同刺激的反应表现出复杂的功能变化,如基因转录、离子流、转运、增殖、细胞毒性、分泌、蛋白表达和酶活性等。以细胞功能为基础的检测分析,着眼于细胞整体的某些功能。方法涉及放射性、报告基因、ELISA、比色、荧光等多种<sup>[6]</sup>。根据细胞的功能变化分为几类:(1)细胞激活(2)细胞

凋亡(3)抗肿瘤活性(4) $G_2$ 检查点( $G_2$  checkpoint)(5)信号转导通路;(6)使用灵敏的感受器(sensor)测量活细胞的代谢功能。

## 二、细胞模型用于高通量细胞毒性筛选

药物在开发过程中失败的原因包括不良的药物性质,如溶解性、稳定性和通透性<sup>[8]</sup>。很大一部分药物由于毒性的原因而失败(22%),表明了药物发现过程中毒性检测的重要性。失败得越早,付出代价越少的策略已广为制药界接受,主要的方式就是把ADME-Tox(Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion)评价用于药物筛选的早期。细胞毒性的确定被认为是减少药物开发失败而进行先导化合物优化过程的一部分<sup>[7]</sup>。用于高通量细胞毒性筛选的方法主要有以下5种<sup>[8]</sup>。

### 1. 荧光染色法

活细胞的浆膜结构对染料具有排斥作用,加入具有细胞毒性的药物会使浆膜受到破坏,从而使染料易进入到细胞溶质中。高通量细胞毒性检测需要在微孔板上进行,并且接种和分析在同一块板上进行,所以荧光微板检测法逐渐发展起来。利用表达增强型绿色荧光蛋白(EGFP)也可高通量检测细胞死亡。

### 2. 化学发光检测法

化学发光是指生色物质在酶作用下,化学能以光子的形式释放出来。化学发光根据发光的形式和种类分为辉光型发光及闪光

型发光,前者的发光时间较长而且稳定;后者是以发光蛋白、三磷酸腺苷(ATP)、荧光素酶为底物的发光反应,其发光时间较短。化学发光由于应用了时间分辨及偶合回路技术,其检测灵敏度可以达到 0.1 pg 数量级。

### 3. 生物发光检测法

ATP 生物发光检测法是由萤火虫荧光素酶提供的一个非常简单、高效、高灵敏度的检测法。与 MTT 法比较,ATP 生物发光法具有一定的优越性。其主要的优点是它的灵敏性和可重复性。

### 4. 荧光检测法

新型的激发荧光检测的特点是用连续的激发光谱和测定光谱取代固定光谱,从而使建立的模型更具备灵活性,通过对 96 孔板和 384 孔板进行信号采集和处理,使之更适用于 HTS。

### 5. 细胞毒性终点的选择

与毒理学相关的细胞毒性终点不超过 20 个,包括细胞吸附或迁移、凋亡、分裂、分化、坏死等。在目前的条件下要设计 HTS 方法以能全面反映上述所有细胞毒性终点还有一定困难。

## 三、细胞模型用于药物代谢分析

细胞模型应用于药代动力学的研究和筛选,在 HTS 中也是十分重要的内容。是早期评价药物的体内过程非常重要的步骤,在药物开发的前期使用,可减少大量的动物实验。

单层 Caco-2 细胞可用来高通量筛选高渗透性和吸收性化合

物<sup>[9]</sup>。Caco-2 细胞是一种人结肠直肠癌细胞来源的分化良好的消化道上皮细胞,有消化道上皮细胞屏障的多种形态和功能特征。研究表明,Caco-2 细胞模型具有较好的体外实验重现性,可以用来研究药物吸收机制。其不仅可用于药物制剂开发前研究,即各种药物赋形剂、吸收促进剂及药物分子结构、pH 值和其他生理生化因素对药物吸收的影响,还可以在一定的控制条件下对药物进行 HTS,以获得药物结构与吸收利用之间的相互关系的大量信息。Caco-2 细胞模型还可用于药物在小肠上皮代谢稳定性的评估,在药物辅料的安全性及有关酶和载体的表达等方面也都有研究应用的价值。目前用于代谢研究和 Pg 级药物与药物相互作用研究的其他肠类细胞系还有 MDCK, TC-7, HT29-MTX, 2/4/A1 等。

## 四、细胞模型可用于中药筛选

我国早在 20 世纪后期就开始开展 HTS 的探讨,到 1998 年在国家科技部支持下,开始了 HTS 的实质性研究和应用。

中科院上海药物所、国家新药筛选中心已建立了几种药物筛选的细胞模型:利用小鼠白血病细胞和多种来源清楚、病理分型明确且对药物敏感的人恶性肿瘤细胞株筛选抗肿瘤药物;采用 T 和 B 淋巴细胞的增殖反应试验来筛选免疫调节药物;睾丸间质细胞培养用来检测睾丸合成雄激素的水平,筛选治疗性功能障碍的

药物;卵巢颗粒细胞培养用来筛选抑制排卵的避孕药。上海药物所筛选出了天然产物中提取的 ZZ-1 和中药验方“解毒丸”,两者都具有明显的细胞水平对抗 SARS 病毒、保护细胞的作用。

中科院基因组信息学中心华东中心已建立与 MC4R 受体相关的细胞筛选模型和与 5HT7 受体相关的细胞筛选模型,可开始 HTS。

中药是各种成分的混合制剂,其有效成分定量不明确、个体反应差异较大、在市场推广中受到限制。传统的整体动物试验和离体器官试验虽然能够筛选其有效组分,但是如果大规模筛选,工作量十分巨大,随着我国分子和细胞水平的药物筛选模型研究的成熟,用 HTS 技术对中医药进行大规模筛选研究已成为可能。

发展以细胞模型为基础的 HTS 方法更适用于中药的研究。因为中药多以混合物的形式出现,混合物在与受体(竞争)结合时,不同组分间可能存在相互竞争或相互协同作用,出现假阳性或假阴性的机率较大;又如,除主组分以外的其他化合物可能会对生物实验体系的介质系统的条件(如酸碱度、各种离子的张力等)产生一定影响,从而影响生物实验体系的反应性,可能导致实验结果出现较大的波动。此外,药物作用的靶点不仅局限于受体,受体后过程中的信使物质、酶及参与基因转录的众多分子也是药物作用的靶点,只在受体上考查化合物的作用,不利于新作用类型



药物的发现,亦不符合中医药理论。并且,中药多为多成分共同作用,如第一节提到的细胞模型的特点,所以细胞模型的 HTS 方法更适于中药研究。

中药的 HTS 可用于以下方面:一是对大量文献记载的中药及复方生物活性和药理作用的再验证;二是寻找潜在的新天然药物;三是对中药单一化合物成分的活性筛选,可根据获得的结果直接评价化合物的生物活性和药理作用。另外,对于含有多种成分的提取物或部位,则可根据活性结果进行跟踪、分离、提取,最终发现活性化合物或确定活性组分。

#### 五、细胞模型可用于中药分子药理学研究

我国以前多用动物模型进行中药的药理研究,随着分子生物学的发展,对中药分子药理学的研究多了起来。由于中药的作用表现与西药相比有如下特点:作用的多效性、复杂性、相对不稳定性、某些成分的双向调节作用等,同时,中药的药理作用还具有多组分、多途径、多靶点的特点。所以,目前在开展适用于中药的动物模型的同时,已经有人开始研究适用于中药分子药理学研究的细胞模型。有报道把星状细胞培养应用于抗肝纤维化中药作用机制研究。该实验的许多结论与既往的体内研究结论吻合,证明了利用活化的星状细胞(为肝纤维化形成过程中的共同特征与中心环节)作为观察重点的研究体系,

进行抗肝纤维化药物机制探讨的可行性与可靠性。

中药复方是中药学的精华组成部分,从 20 世纪中叶开始,已有人用现代医学的技术和方法研究中药复方的临床疗效、药理作用、配伍组成、活性物质等相关内容,并取得了重要成果。如何将分子、细胞水平的药理活性结果与中药复方的治疗作用相结合,至今仍是有待探讨的问题。

#### 六、细胞模型可用于中药毒理学研究和药物代谢分析

近年来,中药毒理学的研究逐渐引起人们的关注。中药复方在组方的过程中已经考虑到药物的毒性,采取相应的降低毒性的措施(配伍)。中药或复方的细胞毒实验简单快速可以作为初步的筛选和评价方法。西药毒理学的细胞水平研究已经很成熟,中药研究可以借鉴第二节中提到的一些检测方法。

在中药代谢分析方面,应用于西药研究中很成熟的 Caco-2 细胞模型同样可用于中药药物分子透过小肠粘膜的吸收、代谢、转运的研究。因为中药多为多成分共同作用,利用 Caco-2 细胞模型,可对多种药物相互作用和吸收程度进行事先预测和估计。除此之外,Caco-2 细胞模型还可用于药物在小肠上皮代谢稳定性的评估,在药物辅料的安全性及有关酶和载体的表达等方面也都有研究应用的价值。

总之,随着 HTS 技术在我国

的发展成熟,大量细胞模型的建立及研究方法的完善,构建适合中药筛选的细胞模型,把细胞模型应用于中药研究可能成为中药现代化研究中的一个很有发展潜力的切入点。

#### 参考文献

- 1 杜冠华.高通量药物筛选.北京:化学工业出版社,2002,213~215.
- 2 Horrocks C, Halse R, Suzuki R, et al. Human cell systems for drug discovery. Curr Opin Drug Discov Devel, 2003, 6(4): 570~575.
- 3 Johnston PA. Cellular platforms for HTS: three case studies. Drug Discov Today, 2002, 7(6): 353~363.
- 4 Bailey SN, Wu RZ, Sabatini DM. Applications of transfected cell microarrays in high-throughput drug discovery. Drug Discov Today, 2002, 7(18 Suppl): S113~S118.
- 5 Moore K, Rees S. Cell-based versus isolated target screening: how lucky do you feel? J Biomol Screening, 2001, 6(2): 69~74.
- 6 Sundberg S A. High throughput and ultra high throughput screening: solution and cell based approaches. Curr Opin Biotechnol, 2000, 11(1): 47~53.
- 7 Yu H, Adedoyin A. ADME-Tox in drug discovery: integration of experimental and computational technologies. Drug Discov Today, 2003, 8(18): 852~861.
- 8 Slater K. Cytotoxicity tests for high throughput drug discovery. Curr Opin biotechnol, 2001, 12(1): 70~74.
- 9 Wang Z, Hop CE, Leung KH, et al. Determination of in vitro permeability of drug candidates through a Caco 2 cell monolayer by liquid chromatography/tandem mass spectrometry J Mass Spectrom, 2000, 35(1): 71~76.

(责任编辑:肖鲁沂)

SYN, MAP-2, NF200 and Ref-1 in the zones of focus and peripheral reaction by immunohistochemical method as well as the dynamic change of NSE with serum neuron specificity by means of ELISA, and study the characteristics of the above-mentioned changes and their relations with pathological processes. **Result** The observation from neuroethology indicates that the recovery of the motor functions of the experimental rats assumes in a curve of platform trend after 5 weeks of MCAO. Their pathomorphology shows that pykno-scar tissues are formed in focus zones after 4 weeks of MCAO and abnormal colloid degeneration also formed in focus zones and their ambience after 5 weeks. The immunohistochemical and biochemical tests suggest that it is the very time for model rats to have their plerosis in tissues and get functionally recovered within 4 weeks after MCAO. **Conclusion** Ischemia stroke sequela model of rats can be established in 5 weeks after MCAO.

**Key Words:** ischemia stroke sequela model, rat, model assessment, experimental study

### **A Study on Pharmacokinetics of Slow Releasing Drugs of Traditional Chinese Medicine**

*Yang Ming and Yang Rongping ( Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075 )*

Starting from the role of the study on the pharmacokinetics of slow releasing drugs of traditional Chinese medicine (TCM) in the modernization of TCM and taking the study on the pharmacokinetics of the slow releasing capsule for liver as an example, this article analyzes and assesses the method for the pharmacokinetics of slow releasing drugs of TCM and summarizes its merits and defects. In the article the authors analyze and epitomize the difficulties and tendency of the study on the pharmacokinetics of slow releasing drugs of TCM on the basis of large quantities of literatures and materials and in accordance with the authors' experience in their study on the pharmacokinetics of the slow releasing capsule for liver. The study on the pharmacokinetics of slow releasing drugs of TCM is still in the exploratory period, but its theory and technical system are bound to be further normalized and grow ripe with the development of science and technology and then push ahead the modernization and internationalization of TCM.

**Key Words:** slow releasing drugs of TCM, pharmacokinetics, slow releasing capsule for liver

### **Application of Macroporous Adsorption Resins to Study and Production of TCM New Drugs**

*Tu Pengfei, Jia Cunqin and Zhang Hongquan ( School of Materia Medica, Peking University, Beijing 100083 )*

Owing to lagging behind in basic research problems have frequently aroused in the application of resins to the study and production of TCM new drugs although macroporous adsorption resins have been widely used in the separation and purification of active constituents and effective parts of natural medicinal materials and TCM in China and as the result the effective application of them has to be gravely influenced. On the basis of their study and experiments the authors of this article summarize the varieties of macroporous adsorption resins as well as their functions and pre-processing and the method of their regeneration and probe some technical problems which should be given more attention in the study and production of TCM new drugs via the application of macroporous adsorption resins so as to provide a reference for the study and production of TCM new drugs. They also suggest that medicinal resins should be developed and produced in the country.

**Key Words:** macroporous adsorption resin, pre-processing, regeneration, Study of TCM new drug

### **Status Quo of Development of Cell Model System and Exploration of Its Application to Studies of Traditional Chinese Medicine**

*Wang Chunmei and Qiao Yanjiang ( Department of Pharmaceutics, School of Chinese Materia Medica,*

*[ World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica ] 85*

*Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100102 )*

This article summarizes the application of cell model system to the high – throughput screening assays and toxicity of drugs and presents the study on the *in vitro* metabolism of drugs by Caco – 2 cell model system. It also analyzes the prospects of studies on Chinese medicine by cell model system and generally discusses the possibilities in the application of cell model system to the screening, the identification of active components, the study of pharmacology and the analysis of metabolism of Chinese medicinal materials.

**Key Words:** cell model, high – throughput screening, Chinese medicine

**Study and Establishment of Fingerprint of Saposhnikovia Divaricata (Turcz) Schischk  
Cultivated in Accordance with Standard Operation Procedures (SOP)**

*Wang xijun, Cao Ling and Sun Hui*

*( Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040 )*

The establishment of a complete fingerprint for Chinese medicinal materials constitutes a step of utmost importance in the deep study and control of the effective constituents of Chinese medicinal materials. The authors of this article have studied and established a possibly complete fingerprint of saposhnikovia divaricata (Turcz) schischk by the method of HPLC and by means of Kromasil C18 column (4.6mm \* 200mm, 5μm) and methanol – water solvent programming, by which 254nm of wavelength and 1.0ml · min of current velocity are detected. Under such conditions as described above all the constituents of saposhnikovia divaricata (Turcz) schischk have been effectively separated and the established fingerprint can afford to reflect all the characteristics of the plant's medicinal constituents and successfully identify its cultivated and wild varieties. Therefore it can be used as the basis for the quality control and classification assessment of this medicinal plant.

**Key Words:** Saposhnikovia divaricata (Turcz) Schischk, fingerprint, HPLC, quality evaluation, primo – glucosyl – cimifugin

**Exploration of Quality Control and Safety of Prepared Ultra – fine Slices of  
Traditional Chinese Medicinal Plants**

*Wang Wentao ( Drug Control Office of Hunan Province, Changsha 410001 )*

The prepared ultra – fine slices of traditional Chinese medicinal plants turned out by high and new technologies is a kind of new slices which accord with the principles of diagnosis and treatment based on an overall analysis of diseases and patients' condition and also with the features of traditional prescription in TCM. In this article the characteristics of the prepared ultra – fine slices and the present situation of their research and development are described, the problems existing in the progress of their industrialization and the problems in their production, quality control and safety, which are necessary to be studied, as well as suggestions herefrom are put forward.

**Key Words:** prepared slices of traditional Chinese medicinal plants, ultra – fine powder, quality control, safety

**Application of Modernized High and New Technologies to Analysis of Internal Chinese Medicine**

*Zhao Yuqing ( Liaoning College of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032 )*

*Yu Jingmou and Cui Jiongmo ( School of Pharmacy of Yanbian University, Yanji 133000 )*