

建立药用植物化学生物学技术平台浅析*

□ 李晓华 (哈佛大学和麻省理工大学 BROAD 研究所 美国 MA02115)

陈 峰** (中国医学科学院协和北京医学院药用植物研究所 北京 100193)
(华中科技大学生命科学与技术学院 武汉 430074)

摘 要: 化学生物学是约 10 年前国际上兴起的新兴研究领域。本文介绍了化学生物学的概念和研究技术平台,并分析了在我国建立药用植物化学生物学技术平台的可行性,为化学生物学在我国的进一步发展提供了借鉴。

关键词: 化学生物学 技术平台 药用植物

化学生物学 (Chemical Biology) 是约 10 年前兴起的研究领域,哈佛大学的 Schreiber 教授是该领域的先驱者。什么是化学生物学?早在 10 年前第一期《化学生物学》杂志^[1]中 Schreiber 教授就提出化学生物学是使用小分子作为工具解决生物学的问题或通过干扰/调节正常过程了解蛋白质的功能,是一门运用小分子化合物作为探针,研究基因的功能、发现能够调控基因功能的活性化合物的科学。近年来,化学生物学在基因(蛋白)功能研究、药物作用新靶标的发现与确证,以及新药先导化合物的发现中发挥着巨大的作用。由于人类基因组计划为我们带来了至少几万个目标蛋白质,促使基因功能研究发展到基因组水平,但人类最终的目标是寻找特异性调节的基本物质,这需要更系统和整体的研究方法,而不是传统的研究方法,化学生物学可能是帮助我们寻找解开所有蛋白质之谜的钥匙。与此对应,化学生物学也推向基因组规模,产生了化学基因组学。化学基因组学

是一门由化学生物学分支的新的交叉学科,它结合了基因组学和化学的最新研究进展,研究在一个完整的生物系统中,化合物对基因、蛋白对化合物的干扰/调节作用。化学基因组学的目的是为基因组中的每一个生物大分子(主要是蛋白质)寻找一类特异性结合小分子化合物(天然产物或合成化合物),再用这些化合物为探针研究基因组的功能以及发现新的药物作用靶标、途径和网络^[2]。因此,化学基因组学在药物作用新靶标的发现与确证和新药先导化合物的发现中有较大的潜力。由于这一特点,化学基因组学受到各国政府、科研机构和大制药公司的高度重视。例如,最近美国国立健康研究院 (NIH) 推荐的路线图计划 (NIH Roadmap) 的 5 个研究方向中,专门设立了化学基因组研究方向。

谈到化学生物学,首先要介绍一下以 Schreiber 教授为首创办的哈佛化学与细胞生物学研究所(以下称 ICCB, Chemistry and Cellular Biology),该所的历史可以说就是化学生物学历史的缩影。1997 年在 Schreiber 教授的倡导下,哈佛大学整合化学系、分子

收稿日期: 2009-06-25

修回日期: 2009-08-28

* 国家“十五”科技攻关计划项目(编号:2004BA721A16): 中医药国际化与中美科技合作基础研究,负责人: 邹健强。

** 联系人: 陈峰, 研究员, 美国哈佛大学医学院高级访问学者, 主要研究方向: 中药学研究, Tel: 010-62896048, E-mail: fchen@implad.ac.cn。

[World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 493

与细胞生物学系以及哈佛大学医学院的优势力量,成立了 ICCB,开展化学生物学研究。该研究所的目标是实现 Schreiber 教授提出的“一个基因一个化合物(one gene one compound)”计划,即为每一个基因发现一个调控其功能的小分子化合物,用于功能基因组研究和药物开发。近年来,这一研究所发展了多项化学基因研究技术,如高效天然产物类似物库合成技术、细胞水平高通量化合物筛选技术和分子芯片技术等,使其成为化学生物学技术平台建设的楷模。ICCB 在过去的 8 年里发表了 130 多篇文章,其中在 Nature、Science 等杂志上发表论文 40 余篇^[3]。2004 年 6 月 ICCB 和以 Eric Lander 教授为首的 White Head 基因组项目合并,成立哈佛大学和麻省理工大学 BROAD 研究所化学生物部(BCB),继续致力于化学基因组学的研究,用 Eric Lander 教授的话来说是“建立基因组药物的工具箱(toolkit)”。

ICCB 的一项主要工作是运用多样化导向合成制备小分子库。到 2003 年 8 月,在这些合成库中约 20 万个样品将用于筛选。正如早先提出的,寻求每个蛋白质的小分子模块是化学基因组学的目标,已使有机合成界无比兴奋地运用有机合成的全部威力,致力于制备最大程度多样性的小分子集合体。ICCB 方法的一项标志是容纳了通常存在于天然产物中、被医药化学所回避的立体化学的复杂性。合成这样的分子库的挑战,已经引起了 ICCB 和哈佛化学系的合成天才群体的关注。此项工作非常有利于为将化学应用于生物学感兴趣的年轻科学家们创造一个极好的训练环境。

天然产物在靶识别和药物发现的丰富历史记录提供了 ICCB 方法的关键动机,不过 ICCB 合成库来源于已设计好的合成路线,重合成与探索结构-性能的关系,使其显得一目了然。发展一个合适的多样性导向的合成平台,设计与合成分子库,优化合成系统,是 ICCB 的主要努力方向。现在,终于有了一个功能强大的通用合成平台及清晰的设计系统。功能强大的通用多样性导向的合成平台是由 ICCB/ICG 的化学小组开发的,目前正用于制备数目不断增长的合成库。简单地说,该平台使用固相“分离-沉

淀”合成法来制备经编码的化合物分子库^[4],同时尽可能少地占用资源。图 1 说明了该“分离-混合”合成法的多样性生成能力。该方法也被描述为“一珠一储液”的化学基因组法,可用于制备数目从几千到十万的结构多样的分子库。

该 ICCB 技术平台开始于 500~600 μ m 的聚乙烯珠子,配有一终端含硅的碳链,如图 2 左上角所示。这些珠子平均每个能加载约 150nmol 个化合物,足够用于超过 100 次的生物分析。所有的合成库成分含有一羟基,将合成库的基质单元与珠子连接^[4](图 2 步骤 1)。一旦起始单元连结上,几个产生多样性的“分离-沉淀”合成操作就展开(图 2 步骤 2),并伴有相应的标识,生成的小分子连接在标识过的珠子上,如图 2 右上角所示。

一枚珠子就像一个单独的反应器,在整个合成

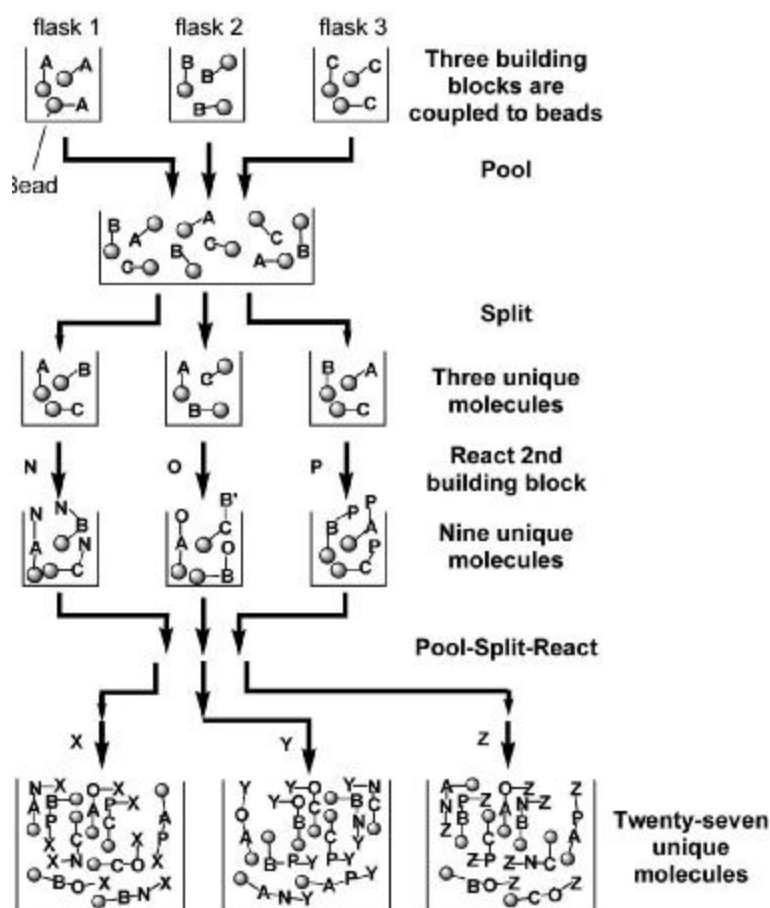


图 1 “分离-混合”合成法

在第一个循环,珠子连接了三种结构单元(A、B、C)。然后,这些珠子混合在一起,是“沉淀”步骤。然后进行另一回合的反应(N、O、P),接着再展开下一回合的沉淀-分离反应(X、Y、Z)。

过程,每一步反应后,一个小的“标签”分子就会被加载到合成珠子上,用于记录该枚珠子所适用的反应条件。这些标签将珠子的反应历史编码,再经解码来揭示珠子上的分子的结构^[5]。每一个合成-标签步骤都经过严格的品质控制过程来保证所有的合成是如期进行的,并且都已加载了恰当的标签^[6]。

分子库的合成结束后,珠子将逐一排列到 384 孔板上,然后在每个孔内加入 THF/HF/吡啶溶液,将小分子从珠子上切断。切下的小分子溶解后再重新分配到几个子孔板上,作为同一分子库的复制品(图 2 步骤 5)。在这阶段,添加了品质控制步骤,以保证格式化成功实施。严格的品质控制步骤保证了只有最高级品质的分子用于筛选。目前的标准是:1)经 LC/MS 检测的>75%的纯度;2)>90%的样品经过标签解码和小分子 LC/MS 鉴定。

一旦分子库合成与品质控制的操作完成,分子库平板就可在 ICCB 的筛选中心进行筛选。这些分子能被转移/再格式化到别的平板上(96-,384-,或多或1536 个槽),用于筛选。ICCB 在组合化学上的发展使

得短时间合成大量化合物成为可能。人类基因组计划的完成使得新的靶蛋白的数量几何级数地增加。该所高通量筛选技术(HTS, High Throughput Screening)的发展使得处理大量的分子成为可能。高通量药物筛选平台是由化合物库、靶体选择、靶体和化合物反应的测试方法的建立、靶体作用物的高通量筛选和数据的处理系统这几大部分组成。其目的是通过对种类繁多的合成物及天然化合物作针对各种药物靶体的筛选,从中寻找最佳的分子探针。HTS 技术的发展减少筛选单位的数量并且自动化重复工作,同时简化筛选过程、降低筛选成本。HTS 可以根据待测样品的合成路线分为液相和固相筛选,也可以根据筛选目标物分为纯蛋白受体亲和性筛选、酶活性筛选、细胞活性筛选等。中国国家新药筛选中心和中国科学院北京基因组研究所都有类似的平台。

ICCB/ICG 的另一个新技术是能将分子库成分通过与连接珠子的起始单元相同的羟基连接到固体支撑物(玻璃板)上^[7]。这些小分子芯片(10000 个化合物/板)能被用于纯蛋白质分析的筛选。小分子芯片在反

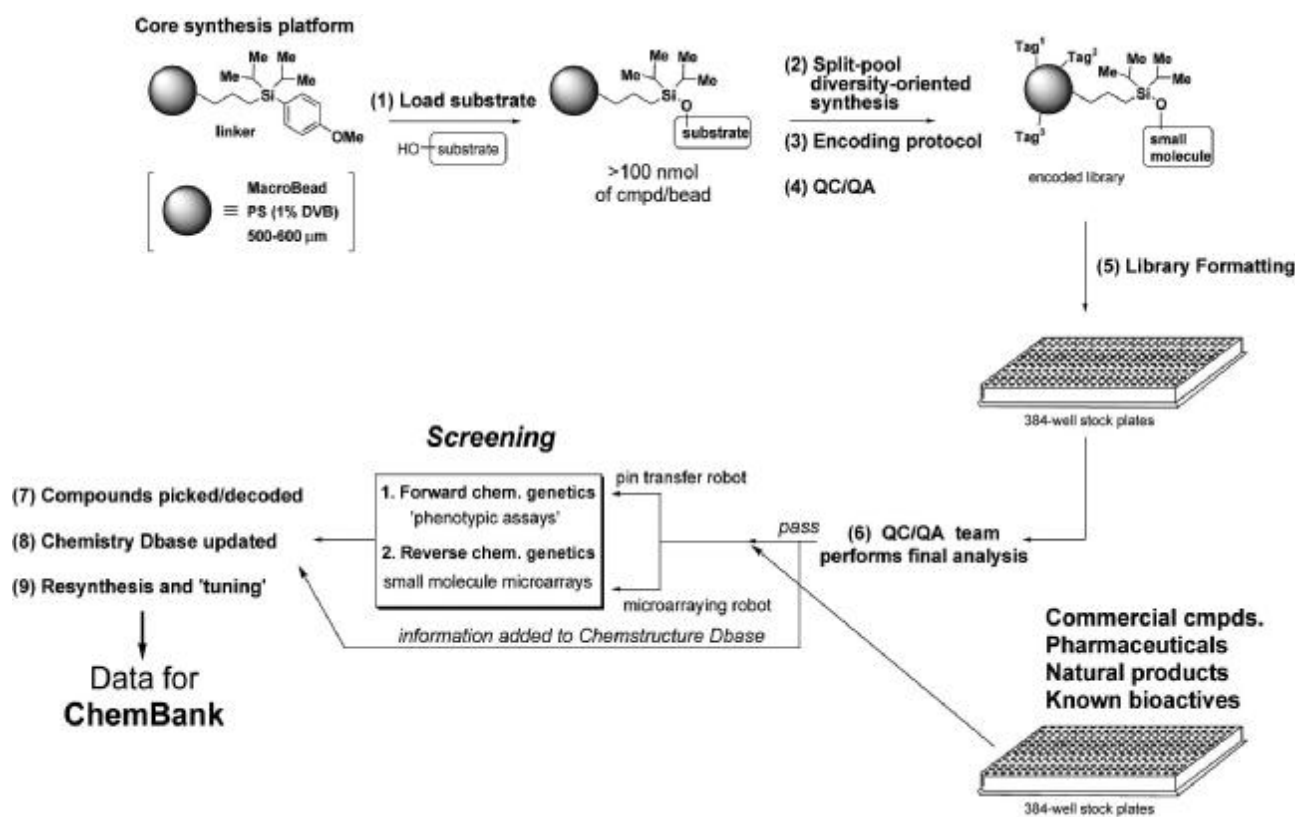


图 2 展示整个过程

ICCB/ICG 技术平台图解——制备结构多样性的“一珠一储液”小分子库,使用编码的“分离-沉淀”合成技术。

向化学基因组筛选中是非常有用的。例如, **DHODH** 还原酶, 用一荧光分子标识, 就能用于小分子芯片, 来确认它所能键合的小分子。这些小分子经功能分析, 可能被测定为 **DHODH** 的抑制剂。小分子芯片在确认蛋白质的小分子伙伴中将非常有用, 因为目前暂无其它方法。目前科学家们正尝试将中药有效部位做成小分子玻璃芯片, 已有一些很有希望的初步结果。

分子库经筛选、有显示结果的孔被确定后, 孔内化合物的分子结构必须先被确定。目前, 化合物结构的确定是随机的——只有经筛选挑出的有显示结果的孔才被标签解码。化合物结构的决定是由“标签”(Still 教授发展了一种新的方法采用色谱活性化合物作标签分子, 这些分子可以通过气相色谱进行分析^[8]) 和小分子本身的 **LC/MS** 确定。被筛选的化合物的纯度也在解码阶段得到。近期, 多数分子将在筛选前解码, 因为分子确认的完整信息是扩大化学库的需要。目前所有的数据保存在加密的化学库中, 最终会公布于众。

多样化导向的合成库例子: **ICCB** 从一开始就同时开发针对多样化导向合成与合成库的统一平台。以下介绍的是 **ICCB/ICG** 在早期和近期的两个合成库例子。

其一, 加兰他敏(雪花胺或雪花莲碱)合成库^[9]: 早期的合成库常模拟天然产物。如源于一种植物生物碱, 提供有生物活性的小分子(图 3a)。**Secramine** 得名于它调制细胞分泌路径的功能, 而这性质并没有在原生的天然产物加兰他敏上发现。制备合成库的关键反应摹仿了加兰他敏的生物合成中的氧化环化反应(图 3c)。这一特殊的化学途径生成了约 2500 个小分子。图 3d 显示了部分不同的取代基团, 该合成库立体化学的复杂性和结构基元的多样性, 在当时是前所未有的。一个关键的缺陷是在加兰他敏合成库中无法产生立体化学的多样性。也就是说, 每一个复合立体化学的小分子都有相对一致的立体化学特征。为解决立体化学多样性问题, 在以后的合成库中, 探索了能提供控制这一分子重要性质的策略。

其二, **Stavenger** 合成库: 不对称合

成是开发立体化学多样性非常有效的途径^[10]。图 4 说明了运用该方法构建合成库的一个例子。其中, 铜催化不对称反向逆求杂 **D-A** 反应是关键步骤, 最终的合成库有约 4400 个含二氢吡喃杂环酰胺的结构。其中的催化剂可以是任一种对映体, 合成库的立体化学多样性包含了分子及其对映体。该对映体的多样性在商品化的化合物收集中是得不到的, 至少很难得。目前为止, 已在该合成库中找到两种重要蛋白质的配体, 核分裂激素 **Eg5** 和酵母表达因子 **Hap3**^[7]。

综上所述, 化学基因组学是运用小分子化合物作为探针研究基因组的功能, 即研究基因的生物学功能和调控基因功能的活性化合物。由化学生物学衍生的化学基因组学也被人称为“大海捞针”, 是从各种化合物库中寻找这些小分子。用于基因组研究的化合物库有几个不同的来源: 天然产物(Nature product)化合物库和合成化合物(Synthesized compound)库, 最近几年还有人用 **RNAi**(RNA 干扰)库^[11], 这些都是单一成分的小分子。化学生物学在生物体系研究和新药开发上的功能已是公认的, 但应用于多种组分的中药研究还是空白。可喜的是, 一些有识之士已开始关注化学生物学对中药现代化的促

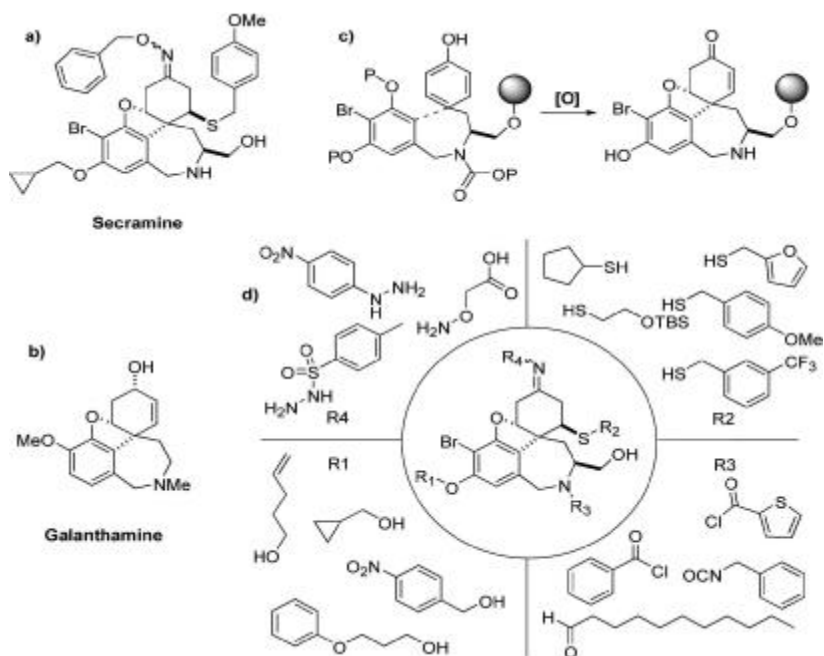


图3 加兰他敏合成库

a) Secramine, 在合成库中找到的小分子, 可用于调制分泌途径, b) 加兰他敏, 激发该合成库兴趣的植物碱, c) 在加兰他敏生物合成中发现的关键氧化环化反应, 被用于合成库构造, d) 部分在加兰他敏合成库中的多样性单元。

进作用。2004年12月28至30日在北京香山饭店召开了以“化学生物学驱动的功能基因组和创新药物研究”为主题的香山科学会议第245次学术讨论会。中国科学院陈竺院士特别指出：“我国在化学生物学研究方面应该发展一些独特的方法和技术，在研究内涵、研究技术、研究工具等方法上有所突破”。

中药现代化很大程度上是化学生物学的问题，中药和天然产物是化学生物学的重要研究工具，化学生物学反过来应服务于中药现代化，加速中药走向国际化的进程。在我国建立药用植物化学生物学技术平台是中药研究与国际领先领域接轨的一大机会，也是中药现代化在国际化进程中的一个里程碑，只有这样我国在新一轮国际科技竞争中才能立于不败之地。因此，我们必须抓住这一国际前沿领域的发展机遇，组织专业的研究队伍，及时发展化学生物学方法和技术，并应用于中药研究、药物新靶标的发现以及新型中药的研究与开发等，提高我国中药研究的整体水平和综合实力，促进我国中药现代化的跨越式的发展。把握这千载难逢的机遇，化学生物学的新分支——中药基因组学的兴起也许指日可待。我们建议建立我国第一个药用植物化学生物学技术平台，该平台的宗旨是为我国药用植物研发建立一个高效和通用的化学生物学的新方法。

我们拟应用先进高效分离技术建立药理功能库，将中草药按药理分类成不同功能库，以适应不同药理模型的筛选需要，并发展高通量药用植物有效部位提

取平台。运用正压固相提取技术，通过控制流动相的流速，把来自天然产物的浓缩复杂混合物分成平行的96组层析组分，并重复分离以显著地减低天然产物的复杂性而获得高质量的分离组分。该系统与全自动的存贮和检索系统、树脂空气阻隔系统以及组分收集的

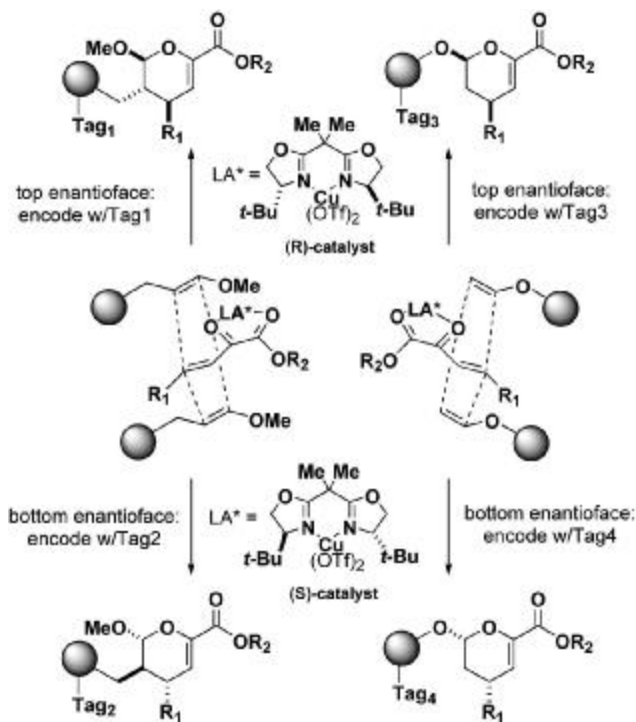


图4 Stavenger 合成库

关键的环加成反应步骤的铜催化剂，是对映体，其中任何一个对映体都可以制备出完整的合成库。

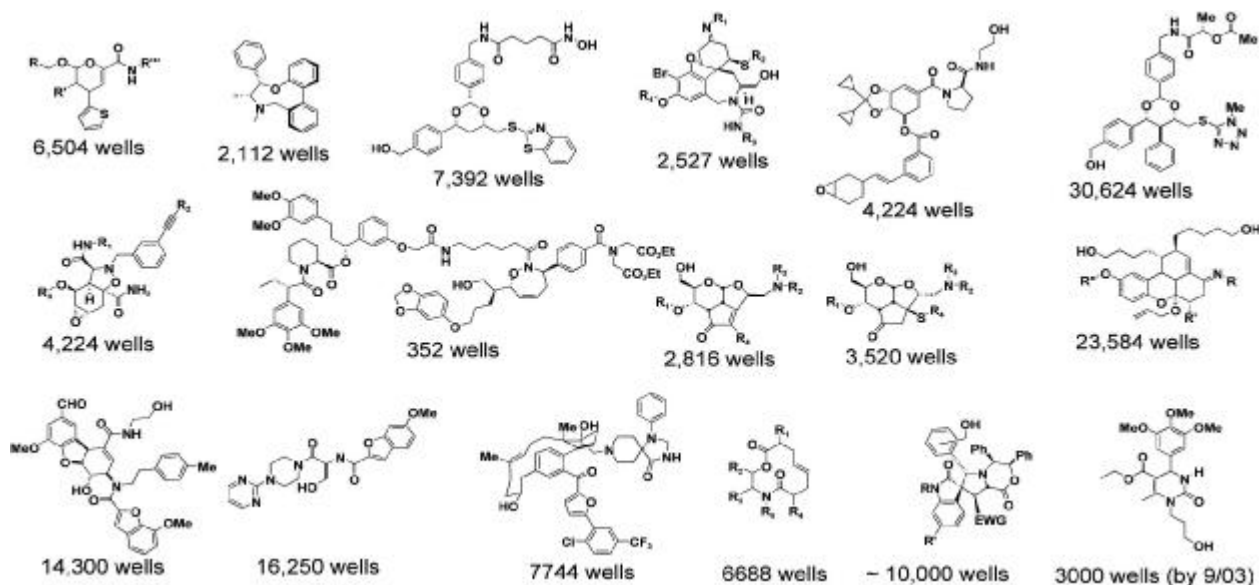


图5 展示了更多的 ICCB 合成库例子

深孔多孔板, 标签读出器以及数据管理系统相结合, 组成配套平台, 为中药的混合组分高通量筛选和中药的现代化研究提供了坚实的物质基础。

从药用植物中提取有效成分是研究药物开发的有力手段之一。这些有效成分来源于植物的代谢物, 含有最大限度的化合物结构差异性, 并已在生物体内经过代谢过程, 要比纯粹来源于化学合成的化合物具有更大的生物利用度。以此天然产物为模型, 合成类似物可以作为药物发现过程的捷径。比如从 60 年代起, 抗癌新药的发现主要从原植物的代谢产物中寻找。实际上, 好几种正在使用的抗癌化疗试剂不是从高等植物中分离得到的化合物, 就是其结构类似物; 比如从长春花中分离到长春花类生物碱, 从盾叶鬼臼中分离得到的表鬼臼毒素类衍生物, 从短叶红豆杉和欧洲红豆杉中分离到的紫杉二萜类成分, 从喜树中分离到的喜树碱类衍生物。

从药用植物中发现先导化合物, 建立以高效天然产物类似物库合成技术为核心, 结合高效筛选技术和计算机辅助药物设计技术的小分子研发统一技术平台——“中药活性部位模板”技术。利用高效天然产物类似物库合成技术和“中药模板”设计思想, 对已有的活性部位进行优化改造, 以主结构为“模板”合成系列天然产物类似物库。经过筛选后, 寻找具有类似活性甚至专属性更强、毒性更小的药物前体。

在筛选方面, 我们建议可以和国家新药筛选中心甚至与新近成立的 **BROAD** 研究所化学生物平台

中的“疾病生物筛选平台”合作进行药物筛选, 一方面无需建立昂贵的高通量筛选技术平台, 另一方面又可以使用这些研究所先进的生物鉴定技术。为了寻找到中药作用机理, 研究新型中药, 达到“一个中药, 多个基因”的目标, 采取全球策略是绝对必要的。这样可以实现中美合作研究, 资源和知识产权共享的良好局面。

参考文献

- 1 Stuart L. Schreiber Gerald R. Crabtree. Introductory Issue. *Chem. & Bio*, 1994, xx-xxi.
- 2 Schreiber, S.L. *Chem. & Eng. News*, 2003, 81:51-61.
- 3 Derek S. Tan, Michael A. Foley, Matthew D. Shair, et al. *Am. Chem. Soc.*, 1998, 120 (33):8565-8566.
- 4 John A. Tallarico, Kris M. Depew, Henry E. Pelish, et al. *J Comb Chem*, 2001, 3:312-318.
- 5 MHJ Ohlmeyer, RN Swanson, LW Dillard, et al. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1993, 90:10922-10926.
- 6 Derek S. Tan, Michael A. Foley, Brent R. Stockwell, et al. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121:9073-9087.
- 7 Koehler, A.N., Shamji, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, 125:8420-8421.
- 8 H. Peter Nestler, Paul A. Bartlett, W. Clark Still. *Journal of Organic Chemistry*, 1994, 59:4723-2724.
- 9 H. E. Pelish, N. J. Westwood, Y. Feng, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, 2001, 123:6740-6741.
- 10 Rob A. Stavenger, Stuart L. Schreiber *Angew. Chem Int Ed Engl* 2001, 40:3417-3421.
- 11 T.M., Mayer. T.U., Coughlin, et al. *Cell Biol*, 2000, 150:975-988.

The establishment of a chemical biology technology platform for medical plants

Li Xiaohua

(BROAD Harvard University and Massachusetts Institute, MA02115, USA)

Chen Feng

(Institute of Medical Plant Development, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China; College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract: Chemical biology is a new research field with a history of only 10 years. This paper introduces the concept of chemical biology and the research technology platform, and then analyzes the feasibility of establishing a chemical biology technology platform for medical plants. This may provide some information for the future development of chemical biology in China.

Keywords: chemical biology; technology platform; medicinal plants

(责任编辑: 崔建华, 责任译审: 张立巍)