

基于转基因秀丽隐杆线虫模型的抗阿尔茨海默病中药成分筛选思路

黄燕辉, 赵路光, 孔令朔, 王 奇(广州中医药大学临床药理研究所, 广东 广州 510405)

摘要: 转基因秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)是近 20 年发展起来的优良衰老模型, 被应用于包括阿尔茨海默病在内的神经退行性病变的药物筛选与基因组学研究。秀丽隐杆线虫模型具有操作简单、筛选周期短、能提供多个靶点等特点, 本文讨论了利用其进行抗阿尔茨海默病中药成分筛选的可行性与优势, 以期药学工作者提供新思路。

关键词: 秀丽隐杆线虫; 阿尔茨海默病; 中药筛选; 思路与方法

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2017)05-0000-00

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2017.05.000

Based on transgenic *Caenorhabditis elegans* model put forward the methods of chinese medicines screening for anti-Alzheimer's disease

HUANG Yanhui, ZHAO Luguang, KONG Lingshuo, WANG Qi (Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405 Guangdong, China)

Abstract: Transgenic *Caenorhabditis elegans* is an excellent aging model for nearly two decades, applied to neurodegenerative disease drug screening and genomics research especially Alzheimer's disease. The transgenic *Caenorhabditis* takes advantage of feasibility and short circles and apply to many targets in common, this article evaluate the and advantages of Chinese medicines for anti-Alzheimer's disease drug screening using transgenic *Caenorhabditis elegans* model, provide new ideas for pharmacy workers.

Keywords: *Caenorhabditis elegans*; Chinese medicines screening; Thoughts and Methods

，改成、

痴呆是一种渐进的，以皮质功能(包括语言、判断、记忆、思维、学习、理解能力)退化为结局的综合征^[1]，其特征智力水平与日常生活能力的逐渐丧失和恶化。痴呆的致残率已超过癌症与心血管疾病，成为导致老年人残疾或依赖于他人照顾的最主要原因之一^[2]。2015 年，全球痴呆患者数量超过 4600 万，其中约 50 %~75 %由阿尔茨海默病(Alzheimer's Disease, AD)引起^[3]，且随着人口老龄化趋势，痴呆与 AD 患者数量几乎每 20 年就翻一番^[4]。然而，相比 AD 给公众健康带来的严重危害，其研究和治疗却远远不足。目前尚无药物可以明确阻断 AD 的病理进程，研制抗阿尔茨海默病药物已成为药学领域的重点研究方向之一。本文讨论模式生物模型

秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)在抗阿尔茨海默病中药成分筛选中的优势，并提出新的思路，旨在为药学工作者提供参考。

1 抗阿尔茨海默病药物靶点的研究现状

首例 AD 患者的病理研究结果于 1906 年被报道^[5]，报告描述了患者大脑皮质内出现特殊斑块物质沉积、神经元细胞堆积成厚纤维，多年以后，过度磷酸化的 tau 蛋白被证实^[6]是脑内神经元退化的重要组成部分，脑皮质内斑块沉积物的主要成分则是 β -淀粉样蛋白(amyloid- β , A β)。胆碱能功能损伤、炎症反应诱导、氧化应激和兴奋性氨基酸毒性也被证实参与了 AD 病理过程，并形成了不同的独立学说来

参考文献[5]放在句末

收稿日期: 2016-05-19

作者简介: 黄燕辉, 女, 硕士研究生, 研究方向: 脑病的临床与实验研究。Email: 1185030370@qq.com。通信作者: 王奇, 男, 教授, 研究方向: 脑病的临床与实验研究。Email: wqitem@qq.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81473740, 81673627)。

解释 AD 的病理机制。目前仅有的 2 类被批准用于 AD 治疗的药物就是基于胆碱能学说和兴奋性氨基酸学说,但其仅能起到改善部分症状的作用,且远期疗效不佳。而淀粉样蛋白假说(amyloid hypothesis)经过数十年的研究与补充,在解释了淀粉样蛋白生成的上游机制和其毒性片段的生理病理作用后,成为了过去 25 年对 AD 病理最为全面的解释,也是最为研究者所接受的 AD 发病机制学说^[6,7],因此,目前很多 AD 临床试验的目的都在于改变疾病进程(而不仅仅是改善症状),将靶点集中于 A β 、tau 蛋白和脑能量代谢过度^[8]。尽管近年来“淀粉样蛋白假说”由于几种以 A β 为靶点的药物在 III 期临床实验中的失败而遭受质疑^[7],但更多学者认为,相比淀粉样蛋白假说的“误导”,临床试验的失败更可能是由于药物动力学、剂量、结局指标的原因^[9]。因此,A β 依然是目前 AD 研究中最重要靶点。

2 秀丽隐杆线虫 AD 模型的建立与应用

2.1 模型建立依据 传统的新药发现途径是基于大量的化合物在各种活性指标测定模型下通过广泛筛选获得,该方法称为随机筛选或普筛^[10]。随着各学科技术的发展,出现了多种高效、精确的细胞分子水平药物筛选模型和方法,如上世纪 80 年代的组化化学、高通量筛选,90 年代的计算机虚拟筛选,再到当今的合理药物设计思想以及系统生物学技术如生物芯片技术、蛋白组学技术、代谢组学技术、网络药理学技术等^[11]。抗阿尔茨海默药物“多奈哌齐”即是借助计算机辅助药物设计研制而成^[12]。相较于整体动物模型,细胞分子水平筛选模型可以同时进行精确靶点的大规模筛选,如高通量筛选技术每日可筛选数万种至数十万种样品,但整体动物筛选模型的最大优点是可以从整体水平,直观地反应出药物的治疗作用、不良反应以及毒性作用。由整体动物模型获得的筛选结果对预测被筛选样品的临床价值和应用前景具有十分重要的价值^[13]。尤其对于 AD 这种发病机制复杂的疾病,整体动物模型依然具有不可替代的重要作用。

包括 AD 在内的神经退行性疾病在机制与治疗等方面的研究相对落后于其他疾病,一部分原因在于对这些疾病的认识不足,这主要源于人脑难以获得且缺少实用的天然动物模型,随着科学技术的不断发展,人们发现某些神经退行性病变与特定的蛋白和基因相关,可以通过建立转基因动物模型来克服天然模型不足的缺陷^[14]。1991 年夏天,第一只表达

人淀粉样前体蛋白(amyloid precursor protein, APP)的转基因小鼠模型被建立^[14]。基因定向和转基因小鼠被发展为 AD 模型的新方向,然而鼠类的基因调整需要较长时间,因此它并不适合用来进行大批量药物的筛选。

秀丽隐杆线虫是一种可以独立生存的线虫,生活在温度恒定的环境,自 1965 年科学家 Sydney Brenner 利用线虫研究细胞凋亡遗传调控的机制^[15]之后,线虫便成为分子生物学和发育生物学研究领域的一种新的模式生物。1992 年 Christopher D. Link 以淀粉样蛋白假说为支撑机制,尝试建立秀丽隐杆线虫 AD 模型^[14]。1995 年,Link 成功获得了表达 unc-54/A β ₁₋₄₂ 的转基因线虫,新的线虫模型展示了清晰的显型,当其表达 A β 毒性时会出现渐进式瘫痪且可被 A β 特异性染料刚果红和硫代素 S 染色^[14]。转基因线虫具有的表达 A β 毒性及其氧化应激反应^[16]、可观察到细胞膜损伤^[17]以及与人类基因的高保守率^[18]等条件,为其成为 AD 模型提供了充分的可行性依据。

2.2 模型特点

2.2.1 简单的生物形态 线虫体型小(约 1 mm),全身透明,无需解剖即可直接在镜下观察。同时,线虫拥有数量恒定的体细胞数量和稳定的细胞谱系,成年雌雄同体线虫由 959 个体细胞组成,其中 302 个为神经元。White 等^[19]使用连续切片电子显微镜构建线虫 302 个神经元的神经线路图,他们发现了 5 000 个化学突触,600 个缝隙连接和 2 000 个神经肌肉结头,并且这些神经节点的位置相当的一致。

2.2.2 易于养殖 线虫可自主活动、取食,在液态与固态培养基中均可培育,并可在 -80 ℃ 条件下低温冻存。在实验室中,它通常被保持在接种有大肠杆菌作为食物来源的琼脂平板上。线虫繁殖量很大,一只雌雄同体线虫一次可产卵 300 枚以上,与雄虫交配后,产卵量可达 1 000 枚以上。寿命分析实验中个体差异对寿命的影响很大,而线虫实验群体容易放大,而且可以大量获得同步化(生长期处于同一阶段)的线虫,以此来消除这种影响,从中得到的寿命指标更准确、可靠。线虫可在实验室环境下大规模繁殖、培育的特点为大规模的药物筛选提供了极大地便利^[20]。

2.3 生命周期短 线虫的生命周期非常短暂,在 20 ℃ 时的平均寿命约 2~3 周。使得研究人员可以很好地观察影响衰老和生命周期的遗传机制,并为大规模筛选抗衰老药物提供了一种很好的工具^[14]。此外,

与转基因 AD 鼠模型相比, 线虫的饲养成本更低, 所需空间更小, 总体节省约 90 % 以上, 可大规模饲养繁殖, 饲养周期短, 可利用率高。每批线虫存活周期短, 可极大地缩短实验探索研究的周期。同时, 线虫的短寿命不但可以更快地模拟衰老进程, 也可以很好地检测转基因模型是否成功, 相比哺乳动物, 线虫在初期模型中具有显著的优势。

2.4 与人类基因的高度保守 线虫基因测序在 1998 年就已经完成, 从而使得线虫成为第一个完成基因测序的多细胞生物, 拥有详细的基因图谱和完全测序基因组^[21]。据一项蛋白质组学比较研究^[22]表明, 线虫蛋白质组至少有 83 % 具有人同源基因^[23], 而且至今发现的 17 条信号传导途径, 线虫具有其中 12 条。同时, 线虫的繁殖方式对于基因研究来说非常理想, 雌雄同体的线虫很容易进行自繁殖或与雄性进行同系繁殖, 有利于保持其基因结构的一致性, 还可以避免近亲繁殖对寿命的影响。而这个问题是果蝇和鼠类动物模型普遍存在而又难以避免的^[24]。

近年来在无脊椎动物系统中模拟人类神经退行性疾病取得了丰硕的成果, 在这一类模型中秀丽隐杆线虫与黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*) 在 AD 的研究应用中处于领先地位。但黑腹果蝇的生活模式限制了其在高通量药物筛选中的应用, 而斑马鱼(*Danio rerio*) 更适合用于骨骼、血液、视觉方面的人类疾病研究。因此, 相比于其它无脊椎动物模型, 线虫在筛选抗 AD 药物的研究中具有显著的优势。值得一提的是, 果蝇、斑马鱼和鼠类等如果用于大规模药物筛选, 可操作性不强甚至不可能实现, 因为它们均无法放入多孔板中进行自动检测^[25]。

3 秀丽隐杆线虫模型抗 AD 中药筛选的思路与展望

在 AD 临床治疗中, 中医师使用频率最高的治则治法依次为益精填髓、化痰和活血。常用中药依次为石菖蒲、川芎、丹参、远志、何首乌^[23]。尽管补益药、活血药在 AD 的临床治疗中取得了一定的成效, 但中药成分复杂, 协同作用强, 因此, 筛选抗阿尔茨海默病中药成分不能仅局限于临床高频药物, 应拓宽筛选范围。

目前通过实验筛选出的抗阿尔茨海默病中药成分或制剂如灯盏花素、姜黄素、白藜芦醇、茶多酚等原属植物^[23]均较少用于临床治疗 AD。对于开发治疗 AD 的中药制剂还存在以下困难: (1) 中草药种类繁多, 目前被开发出应用于痴呆治疗的中药仍然非常

少, 这虽为新药筛选提供了宝贵的资源, 但也导致药物筛选的工作量巨大。(2) 虽然现代化计算机分子对接以其快速、高效筛选的特点被广泛亲赖, 但是使用计算机分子对接软件进行药物筛选需要读取单体化合物的国际化合物标识(InChI)或简化分子线性输入规范(canonical SMILES), 而一味中药所含有的单体成份有数十种甚至上百种, 其中有相当比例尚未阐明可供计算机读取的分子结构, 这为计算机筛选增加了很大的困难。因此, 使用计算机辅助设计筛选中药成分受到了很大的局限。基于以上两点, 我们发现秀丽隐杆线虫模型正为我们提供了这样一种简单高效的药理学分析工具, 他的优势完全弥补了以上两点不足并且充分展现了这一模型应用的优势: (1) 在中药成分不明确或难以提取分离时, 可直接使用中药有效部位或提取物在线虫模型上进行筛选^[24-26]。(2) 尽管秀丽隐杆线虫缺少自适应免疫系统和循环系统, 也不能模拟 AD 的所有方面, 如缺少有髓鞘的神经细胞和小胶质细胞, 但它操作简单、筛选周期短、能提供多个靶点, 相比于其他模型与方法, 秀丽隐杆线虫在筛选抗阿尔茨海默病中药成分中具有巨大的优势。因此, 与中医药相结合, 充分地挖掘对于秀丽线虫的应用研究, 可为中医药在老年痴呆的研究中提供更广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] World Health Organization. Neurological disorders: public health challenges [EB/OL]. (2006) [2016-05-10]. http://www.who.int/mental_health/neurology/neurodiso/en/.
- [2] PRINCE M, WIMO A, GUERCHET M, et al. World Alzheimer Report 2015: The Global Impact of Dementia: An analysis of prevalence, incidence, cost & trends[R]. London: Alzheimer's Disease International, 2015.
- [3] PRINCE M, ALBANESE E, GIERCHET M, et al. World Alzheimer Report 2014: Dementia and Risk Reduction, an analysis of protective and modifiable factors[R]. London: Alzheimer's Disease International, 2014.
- [4] Prince M. World Alzheimer Report 2009: The Global Prevalence of Dementia[R]. London: Alzheimer's Disease International, 2009.
- [5] RYAN N S, ROSSOR M N, FOX N C. Alzheimer's disease in the 100 years since Alzheimer's death[J]. Brain, 2015, 138(12): 3816-3821.
- [6] HARDY J A, HIGGINS G A. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis[J]. Science, 1992, 256(5054): 184-185.
- [7] DRACHMAN D A. The amyloid hypothesis, time to move on: Amyloid is the downstream result, not cause of Alzheimer's disease [J]. Alzheimer's & Dementia, 2014, 10(3): 372-380.
- [8] GONZALEZ-NARANJO P E, CAMPILLO N, PERE C, et al. Multitarget cannabinoids as novel strategy for Alzheimer disease [J].

- Current Alzheimer Research, 2013, 10(3): 229-239.
- [9] KARRAN E, HARDY J. A critique of the drug discovery and phase 3 clinical programs targeting the amyloid hypothesis for Alzheimer disease [J]. Annals of neurology, 2014, 76(2): 185-205.
- [10] 顾慧. 计算机辅助药物设计在治疗老年痴呆药物虚拟筛选和 HIV 抗药性研究中的应用[D]. 上海: 上海交通大学, 2009.
- [11] 涂瑶生, 孙冬梅, 陈玉兴, 等. 中药新药筛选新技术及实践[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2014, 16(8): 1696-1702.
- [12] KAWAKAMI Y, INOUE A, KAWAI T, et al. The rationale for E2020 as a potent acetylcholinesterase inhibitor [J]. Bioorganic & medicinal chemistry, 1996, 4(9): 1429-1446.
- [13] 胡娟娟, 杜冠华. 药物筛选模型研究进展[J]. 基础医学与临床, 2001, 21(4): 302-305.
- [14] LINK C D. C. elegans models of age-associated neurodegenerative diseases: Lessons from transgenic worm models of Alzheimer's disease [J]. Exp Gerontol, 2006, 41(10): 1007-1013.
- [15] LAI C H, CHANG L Y, LIU C S, et al. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in Caenorhabditis elegans by comparative proteomics[J]. Genome Res, 2000, 10(5): 703-713.
- [16] MOREIRA P I, HONDA K, LIU Q, et al. Oxidative stress: the old enemy in Alzheimer's disease pathophysiology[J]. Curr Alzheimer Res, 2005, 2(4): 403-408.
- [17] DEMURO A, MINA E, KAYED R. Calcium dysregulation and membrane disruption as a ubiquitous neurotoxic mechanism of soluble amyloid oligomers[J]. J Biol Chem, 2005, 280(17): 17294-17300.
- [18] HENGARTNER M O, HORVITZ H R. C. elegans cell survival gene ced-9 encodes a functional homolog of the mammalian proto-oncogene bcl-2. Cell, 1994, 76 (4): 665-676.
- [19] WHITE J B, SOUTHGATE E, THOMSON J N, et al. The structure of the nervous system of Caenorhabditis elegans[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 1976, 275(938): 327-348.
- [20] 万风奇. 利用秀丽隐杆线虫评价传统补益类中药复方的抗衰老药效及其机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2012.
- [21] THE C. ELEGANS SEQUENCING CONSORTIUM. Genome sequence of the nematode C. elegans: a platform for investigating biology [J]. Science, 282(5396): 2012-2018.
- [22] KEOK T C Y, RICKER N, FRASER R, et al. A small-molecule screen in C. elegans yields a new calcium channel antagonist [J]. Nature, 2006, 441(7089): 91-95.
- [23] 韩德军, 杨锡燕, 时晶, 等. 中药治疗痴呆随机对照文献治法及用药规律分析[J]. 中医杂志, 2014, 55(12): 1051-1054.
- [24] ZHANG W, ZHI D, REN H, et al. Shengmai Formula Ameliorates Pathological Characteristics in AD C. elegans[J]. Cellular and Molecular Neurobiology, 2016, 36(8): 1-12.
- [25] WANG Q, YANG F, GUO W, et al. Caenorhabditis elegans in Chinese Medicinal Studies: Making the Case for Aging and Neurodegeneration[J]. Rejuvenation Research, 2014, 17(2): 205-208.
- [26] ZHANG Y, LV T, LI M, et al. Anti-aging effect of polysaccharide from Bletilla striata on nematode Caenorhabditis elegans[J]. Pharmacognosy Magazine, 2015, 11(43): 449.

(编辑: 邹元平)