

知识介绍

发现天然活性物质的潜在途径 ——生物胺转运体的靶标筛选

杨丰科, 杨翠萍, 陈 芳

(青岛科技大学化工学院, 山东 青岛 266042)

摘要:生物胺转运体(BAT)是生物膜上的一种蛋白质,它通过将底物从细胞外转运到神经末端来终止多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)和去甲肾上腺素(NE)的作用。大量药物和给药方法以BAT为靶点,以底物或抑制剂的形式发挥作用。本文总结了作用于BAT上的药物活性的几种测量方法,并以麻黄碱及其立体异构体为例来讨论这些方法用来发现天然活性物质的潜在应用。

关键词:生物胺转运体;靶标筛选;测量方法;神经递质

中图分类号:Q819

文献标识码:A

文章编号:0253-4320(2006)05-0067-03

Targeted screening for biogenic amine transporters: Potential applications for natural products

YANG Feng-ke, YANG Cui-ping, CHEN Fang

(College of Chemical Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China)

Abstract: Biogenic amine transporters (BATs) are integral membrane proteins that terminate the actions of dopamine (DA), serotonin (5-HT) and norepinephrine (NE) by pumping these substrates from the extracellular space back into the nerve terminal. Numerous drugs and medications target BATs, acting as inhibitors or substrates. This paper reviews some of the methods used to measure the activity of test drugs at the BATs. These methods include traditional uptake inhibition assays and transporter binding assays, as well as methods to determine if a test agent is a BAT substrate or inhibitor. The potential application of these methods for characterizing natural products will be discussed in reference to results obtained with "purified" natural products, such as ephedrine stereoisomers.

Key words: biogenic amine transporters; targeted screening; determining method; neurotransmitter

精神兴奋剂在体内能刺激心血管、提高情绪以及导致较少的睡眠,较大剂量或较长时间服用后,这些药物能使人思维混乱甚至有严重的精神病症状。许多精神兴奋剂被认为与中枢神经系统的单胺神经元,如去甲肾上腺素(NE)、多巴胺(DA)、5-羟色胺(5-HT)等相互作用,转运体调节单胺介质的吸收是大脑中单胺信号不活跃的主要机制,相应地,有大量治疗性和滥用的药物与单胺介质部位相互作用。苯丙胺是这类药物的原型,其主要代表为甲基苯丙胺和苯丙胺,它们主要是由麻黄碱或伪麻黄碱合成而来^[1]。然而同样是苯丙胺这种物质,它可以是有较好疗效的药物,也可能是被滥用的毒品,这取决于给药背景^[2-3]。

最近有报道^[4]介绍通过调查精神兴奋剂与单胺

转运体的相互作用来弄清这些药物是怎样作用于大脑的,从这些研究中得到的知识能帮助抵制药物依赖型兴奋剂和其他精神紊乱病的发生。本文主要介绍用于检测配体与BAT作用的分析方法及这些方法对发现天然产物的潜在应用。

1 检测BAT配体的方法

放射性配体结合分析是检测试剂在BAT活性的最直接的途径。这些方法主要运用特制的膜来完成,这种膜是从脑组织或细胞表达克隆转运体中得到的。用来分析BAT的电线放射性配体包括^[3H]GBR12935、^[3H]CFT和DAT的^[125I]RT1-55、SERT的^[3H]帕罗西汀以及NET的^[3H]尼索西汀。由于^[125I]RT1-55的适应范围非常广,一般选用这种放

收稿日期:2006-02-18

基金项目:国家自然科学基金资助课题(30571463)

作者简介:杨丰科(1962-),男,硕士,教授,主要从事药物合成、生物制药和有机合成方面的研究,0532-84023703, yangtheresa@sina.com。

射性配体来标记在细胞中表达的克隆 DAT、SERT 和 NET。在脑组织中通过运用阻碍体的饱和浓度掩盖竞争结合部位来优化一种转运体的选择性结合分析方法是非常重要的。

用转运体结合分析法来筛选对 BAT 有活性的试剂的一个限制因素是底物和配体的亲和力较低。例如有报道^[5]的 DAT,其底物(+)苯丙胺的亲和力在 DAT 结合分析中要比 DA 吸收分析弱得多。因此 BAT 吸收抑制分析不仅提供 BAT 配体功能作用的信息,而且当它与 BAT 结合分析中的数据结合时,就可用来测定一个配体是 BAT 抑制剂还是其底物,然而这是一种间接方法。测量脑部神经介质的传统方法是用超级融合的方法,在此过程中,转运体抑制剂和底物之间的区别是很明显的,当甲基苯丙胺在剂量依赖方式下释放^[3H]DA 时,转运抑制剂茛达曲林在释放分析中有很低的活性,显然茛达曲林将甲基苯丙胺释放曲线调整至合适剂量,而它们本身不起作用。

释放分析中基本的方法首先是将含有神经递素的突触体培养足够的时间使其含量稳定,在稳定态加入试验试剂后停止反应,然后迅速过滤,可以通过测量滤液中氘的含量测定释放量。许多实验在产生选择抑制测定时有 2 个关键因素:培育的时间和分析中利血平的包含物。利血平通过囊泡中单胺转运体(VMAT₂)来阻止其中累积的^[3H]神经传导素进入小粒储存起来^[6],由此将释放分析定位在通过血浆膜 BAT 累积的细胞质^[3H]神经传导素库中。在^[3H]NE 分析中,没有利血平的作用,^[3H]NE 永远达不到想要的水平,且甲基苯丙胺不释放累积的^[3H]NE,然而在利血平作用时,^[3H]NE 累积达到稳定水平,且甲基苯丙胺大量释放^[3H]NE。

在接种后很短时间即终止反应能检测释放剂,但不能检测吸收抑制剂。GBR12935 释放^[3H]DA 的能力在很短的时间内就降低了,而(+)-甲基苯丙胺释放^[3H]DA 的能力不随接种时间而改变,短接种后氘量的不同能成功区别再吸收抑制剂和释放剂^[7]。在稳定态,^[3H]神经传导素的持续再吸收是与其突触体的自发分泌相匹配的,一种再吸收抑制剂,通过阻碍^[3H]神经传导素的再吸收,允许自发传递速率超过再吸收速率,并且现有的氘以一种依赖时间的方式而减少,这 2 种速率间的平衡决定了有吸收抑制剂存在下释放的速率。已经发现含有的^[3H]以一种相对较慢的速率流失,释放剂通过载体调节交换释放累积的^[3H]神经传导素的过程相当迅

速。结果是再吸收阻碍物或底物的较短接种时间,以及预先使^[3H]神经传导素达到稳定态使得再吸收阻碍物在释放分析中几乎无活性,而底物则有充分活性在一些情况下比再吸收分析活性更高。

2 应用 BAT 分析法来研究天然产物

以麻黄碱为例,文献[8]提到苯丙拉明作为一种影响交感神经系统的典型化合物,通过多种机制来起作用,其中包括对肾上腺素受体的直接兴奋作用以及通过载体与去甲肾上腺素的交换来间接起作用。苯丙拉明中的代表药物是麻黄碱,这是一种长期研究且应用广泛的兴奋剂,可作为处方药及非处方药使用,用其来治疗哮喘、降血压、解充血、中枢刺激及厌食,麻黄碱也有一些负面作用,它可作为非法生产甲基苯丙胺的前体,并且它的潜在毒性甚至有致人死亡的能力。

麻黄碱含有 2 个手性中心,因此与它相关的苯丙拉明族含有 4 个立体异构体,分别是(-)-麻黄碱、(+)-麻黄碱、(-)-假麻黄碱、(+)-假麻黄碱。苯丙拉明的结构与苯异丙拉明、甲基苯丙胺、苯丙胺和苯丙醛胺甲卡西酮、氨基苯丙酮只在立体化学及苯甲酸部位的氧化态不同^[9]。甲基苯丙胺和苯丙胺缺少苄基取代基,而(S)-甲卡西酮和(S)-氨基苯丙酮可看作是麻黄碱和降麻黄碱的类似物,此时苄基被氧化成相应的酮。

许多含有麻黄碱的中草药制剂都是由天然富含麻黄碱的麻黄属植物制备的,这些植物除含麻黄碱外还含有其他苯丙拉明类成分,最近一项研究中有人调查这些制剂与大量的克隆人体原体作用,用生物胺体对其进行详细描述,并且将它们与相应的苯丙醛胺、苯异丙拉明进行比较,人们发现麻黄碱及其衍生物选择性作用于去甲肾上腺素转运体(NET)底物而对肾上腺素原体没有显著活性^[10]。

麻黄碱经常被形容为既有直接又有间接药物类交感神经作用的试剂。“间接”是指通过释放 NE 来起调节作用,“直接”是指通过肾上腺素受体的直接刺激作用来调节。在细胞表达系统应用克隆受体以前,用同样含有肾上腺素神经的组织系统来测定麻黄碱的兴奋效应^[11]。通过这些分析,要区分麻黄碱对肾上腺素受体的直接兴奋作用以及由麻黄碱刺激 NE 释放调节肾上腺素受体的作用是困难的。例如,用利血平耗尽内生的 NE,(-)-麻黄碱对 β -受体有较强的直接兴奋作用。基于此,Vansal 和 Feller 运用克隆 β -肾上腺素受体,报道了一种在克隆人体 β

受体中对(-)-麻黄碱 Kact 吸收为 550 nm。NE 释放的 EC50 为 43 nm,这是一个非常低的值,表明(-)-麻黄碱及其有关的试剂对克隆 β 肾上腺素和 α 肾上腺素受体有明显的亲和性^[12]。

3 结语

BAT 代表了药物发展中重要的靶向药物并且是麻黄属植物和阿拉伯茶等自然物质的靶点。检测 BAT 配体的方法大多可较强地及大规模地使培养基进行高通量筛选,且易于筛选自然物质或合成物质的混合物。

从人类基因组计划和微生物基因工程中发现的新药靶点数量日益增加,用于高通量筛选的新靶点也将越来越多。分子多样性成了决定这些新的检测方法价值的因素,因此,利用天然产物来获得药物先导物的前景会比以前更好。随着分离纯化技术的日益发展,纯品可获得性日渐提高,天然产物为快速出现的大量的新靶点提供了更多的检测机会。与组合化学相比,天然产物是惟一能够既提供结构信息又可通过计算化学和相关技术来创造疗效好的化合物。因而以后天然产物的开发,与利用结构化学数据相关联,这些数据又与目标蛋白质和基因相关联,并且通过计算分子模型产生新的化学实体。由于其结构的多样性,天然产物在从药物经验筛选向合理药物设计的转变过程中起到重要的作用。

参考文献

- [1] Adell A, Artigas F. Differential effects of clomipramine given locally or systemically on extracellular 5-hydroxytryptamine in raphe nuclei and frontal cortex. An in vivo brain microdialysis study [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 1991, 343: 237 - 244.
- [2] Amara S G, Kuhar M J. Neurotransmitter transporters: recent progress [J]. *Annual Review of Neuroscience*, 1993, 16: 73 - 93.
- [3] Amara S G, Sonders M S. Neurotransmitter transporters as molecular targets for addictive drugs [J]. *Drug and Alcohol Dependence*, 1998, 51: 87 - 96.
- [4] Andersen P H, Jansen J A, Nielsen E B. [3H]GBR 12935 binding in vivo in mouse brain: labelling of a piperazine acceptor site [J]. *European Journal of Pharmacology*, 1987, 144: 1 - 6.
- [5] Blakely R D, De Felice L J, Hartzell H C. Molecular physiology of norepinephrine and serotonin transporters. (Review) [J]. *Journal of Experimental Biology*, 1994, 196: 263 - 281.
- [6] Masson J, Sagne C, Hamon M, et al. Neurotransmitter transporters in the central nervous system [J]. *Pharmacological Reviews*, 1999, 51: 439 - 464.
- [7] Mateo Y, Pineda J, Meana J J. Somatodendritic alpha2-adrenoceptors in the locus coeruleus are involved in the in vivo modulation of cortical norepinephrine release by the antidepressant desipramine [J]. *Journal of Neurochemistry*, 1998, 71: 790 - 798.
- [8] Rothman R B, Baumann M. Therapeutic and adverse actions of serotonin transporter substrates [J]. *Pharmacology and Therapeutics*, 2002, 95: 73 - 88.
- [9] Rothman R B, Baumann M H. Monoamine transporters and psychostimulant drugs [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2003, 479: 23 - 40.
- [10] Rothman R B, Ayestas M A, Dersch C M, et al. Amirex, fenfluramine, and chlorphentermine are serotonin transporter substrates: implications for primary pulmonary hypertension [J]. *Circulation*, 1999, 100: 869 - 875.
- [11] Rothman R B, Baumann M H, Dersch C M, et al. Amphetamine-type central nervous system stimulants release norepinephrine more potently than they release dopamine and serotonin [J]. *Synapse*, 2001, 39: 32 - 41.
- [12] Rothman R B, Blough B E, Baumann M H. Appetite suppressants as agonist substitution therapies for stimulant dependence [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2002, 965: 109 - 126. ■

国家环保总局与陶氏化学公司 清洁生产示范合作项目开局顺利、成绩斐然

自 2005 年 3 月国家环境保护总局与陶氏化学 (Dow Chemical) 公司正式启动“清洁生产示范合作项目”至今仅 1 年的时间内,该项目已经取得了显著的经济和环境效益,产生了良好的社会反响。

2005 年度合作项目进展顺利,共有 7 个省市的 19 家企业参与了该项目,覆盖了化工、印染、酿造、电子、食品等多个行业;来自地方环保局、清洁生产审核机构和 19 家试点企业的 250 多名代表接受了培训,推动了试点省市的清洁生产工作。在 2005 年度项目实施过程中,辽宁省环保局、浙江省环境科学研究院、深圳竞华电子有限公司等 12 家试点单位被评为优秀试点单位。

通过清洁生产审核,19 家企业共提出清洁生产方案 798 个,已经实施的方案 538 个,2 个月获得的经济效益为 1 724.75 万元,折合成年效益为 10 348.5 万元;获得的环

境效益:减少废水排放 338.3 万 m³,减少废气排放 553.5 t,减少废液排放 432.39 t,减少固体废弃物 487 t,节电 83.51 万 kWh,节省蒸汽 27 797 t,节水 170.91 万 t,节省煤 2 557 t。计划下一步实施的方案 91 个,预计将获得的经济效益为 24 006.35 万元,环境效益还将进一步扩大。

陶氏化学公司亚太区兼大中华区总裁麦健铭先生表示:“我们很欣喜地看到清洁生产示范合作项目实施仅一年的时间,就取得了如此显著的经济效益和环境效益。这有力地证明,企业开展清洁生产总是能获得很好的回报。我很高兴地看到陶氏正在为推动中国的可持续发展而继续贡献力量”。

2006 年项目将在北京、内蒙古自治区等 7 个省、自治区、直辖市的 21 个企业开展清洁生产审核的试点。(杨)