

研究生教学用书

药理学研究的新思路与新靶点

The New Targets and Ideas in
Pharmacological Research

陈晓光 主 编

郭 颖 副主编

中国协和医科大学出版社

第23卷第4期

药理学研究的新思路与新靶点

New Ideas and Targets in
Pharmacological Research

主编 王 强

副主编 张 明

中国医药出版社

研究生教学用书

药理学研究的新思路与新靶点

陈晓光 主 编

郭 颖 副主编

编 委 (以姓氏笔画为序)

王 楠 王晓良 叶 菲 申竹芳

朱传江 朱海波 张 丹 张建军

李 燕 杜冠华 陈乃宏 陈晓光

侯 琦 胡卓伟 郭 颖 彭 英

编委单位 中国医学科学院药物研究所



中国协和医科大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

药理学研究的新思路与新靶点 / 陈晓光主编. —北京: 中国协和医科大学出版社, 2012. 8
ISBN 978 - 7 - 81136 - 734 - 8

I. ①药… II. ①陈… III. ①药理学 - 研究 IV. ①R96

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 157162 号

药理学研究的新思路与新靶点

主 编: 陈晓光

责任编辑: 庞红艳

出版发行: 中国协和医科大学出版社

(北京东单三条九号 邮编 100730 电话 65260378)

网 址: www.pumcp.com

经 销: 新华书店总店北京发行所

印 刷: 北京佳艺恒彩印刷有限公司

开 本: 787×1092 1/16 开

印 张: 18.25

字 数: 400千字

版 次: 2012 年 9 月第1版 2012 年 9 月第1次印刷

印 数: 1—3000

定 价: 45.00 元

ISBN 978 - 7 - 81136 - 734 - 8/R · 734

(凡购本书, 如有缺页、倒页、脱页及其他质量问题, 由本社发行部调换)

内 容 简 介

本书从防治重大疾病药物研究的药理学研究最新进展入手，着重介绍了药理学研究中所涉及的表观基因组学、酶、受体、离子通道、蛋白、细胞信号转导通路等相关新靶点，结合疾病发生发展过程中的病理生理机制以及药理学研究特点，较详尽地介绍了作用于心脑血管、神经精神、代谢综合征、抗肿瘤、抗炎免疫、抗病毒等方面药物及治疗性疫苗研究的新思路和新靶点，并从系统生物学的角度，阐述了药物研究的新思路。本书注重科研思维方法的培养，引导学生把握新药研究当前国际发展的前沿领域，使学生对当前药理学研究的新理论和新靶点有一定的了解，为寻找这一领域新的研究课题提供思路，为今后的科学研究奠定良好的基础。该书主要面向医药院校的研究生和从事新药研究的科研人员，既可作为一本教学用书，也可作为一本专业参考书。

前言

“药理学研究的新思路与新靶点”课程自2006年9月授课以来,经6年的授课实践和学生反馈,已经得到广大学生的认可和欢迎。在2006年开始授课之初,各位授课老师编写教学内容相关的大纲,该大纲受到医药学研究生的好评。由于时间的关系,原预计的一些内容没有来得及完稿,即使已写进书本的内容,随着时间的推移,已经有许多新进展的内容和新靶点及思路需要更新,所以我们有出版一本教材的想法。经与中国协和医科大学出版社协商,不谋而合决定出该书。我们在2006年编写大纲的基础上,邀请近年来活跃在新药研究领域、目前正工作在科研第一线并在某一领域具有一定学术地位和教学经验的中青年学者组成编写班子,制定了编写大纲。

本书定位于全国高等医药院校及研究机构的药学、医学研究生,侧重于科研,同时也兼顾临床医学研究生。按照研究生培养目标要求,突出研究生教学特点,强调应用基础与进展、广度与深度并重,从防治重大疾病药物研究的药理学研究最新进展入手,着重介绍药理学研究中所涉及的表观基因组学、酶、受体、蛋白、细胞信号转导通路等相关新靶点,结合疾病发生发展过程中的病理生理机制以及药理学研究特点,较详尽地介绍了作用于心脑血管、神经精神、代谢综合征、抗肿瘤、抗炎免疫、抗病毒等方面药物及治疗性疫苗研究的新思路和新靶点。本教材注重科研思维方法的培养,引导学生把握新药研究当前国际发展的态势,使学生对当前药理学研究的新理论和新靶点有初步的了解,为寻找这一领域新的研究课题提供思路,为以后的科学研究打下良好的基础。

本书有别于以往的教材,避免成为单纯灌输理论知识的教科书,而是充分体现一种研究思路,教会学生科研思维的方法。因此,每章(节)编写时遵循“概况→现状与进展→存在问题与发展方向”这样一个顺序进行,突出研究生教材区别于其他教材的特色,力保全书思路的统一性及整体性。该书编写格式也力求与国际接轨,全书统一建立主题词索引,编出新意,编出特色。

由于编者们的编书经验不足,加之时间较紧,不当之处在所难免,恳请各位老师和同学们在阅读过程中给予批评指正。

在本书成书过程中,得到中国协和医科大学出版社的鼎力支持,中国医学科学院药物研究所的金晶博士、陈勃博士、郭家梅女士承担了大量的辅助工作,在此一并致以诚挚的谢意。

陈晓光
2012年5月于北京

目 录

第一章 绪论	(1)
第一节 药物靶点研究的历史	(1)
第二节 药物靶点的概念及分类	(2)
第三节 药物靶点在新药研究中的作用	(4)
第四节 药物靶点研究的思路与方法	(5)
第二章 细胞膜离子通道活性与细胞凋亡通路的药理学机制	(7)
第一节 细胞膜离子通道与细胞凋亡	(7)
第二节 脑缺血引起的神经元凋亡	(11)
第三节 老年性痴呆与神经凋亡	(15)
第四节 肿瘤细胞凋亡与离子通道相关的研究	(19)
第三章 系统生物学与药物研究新思路	(24)
第一节 系统生物学与药物发现	(24)
第二节 系统生物学在药物研究中的作用	(26)
第四章 P-gp 与药物的相互作用及 P-gp 抑制剂的研究	(30)
第一节 P-gp 的结构及功能	(30)
第二节 P-gp 对药代动力学的影响	(33)
第三节 药物与 P-gp 相互作用的研究方法	(35)
第四节 P-gp 抑制剂研究进展	(39)
第五章 抗糖尿病药物研究的新思路和新靶点	(44)
第一节 抗糖尿病药物研究概况	(44)
第二节 抗糖尿病药物研究新思路	(45)
第三节 抗糖尿病药物新靶点及新药研发动态	(50)
第六章 抗代谢综合征药物研究的新思路	(55)
第一节 代谢综合征	(55)
第二节 肥胖症	(60)
第三节 非酒精性脂肪肝病	(69)

第四节 骨骼肌组织与代谢综合征	(72)
第七章 基于蛋白酪氨酸激酶受体及细胞内信号转导通路为靶点的抗肿瘤	
新药研究	(76)
第一节 蛋白酪氨酸激酶	(76)
第二节 酪氨酸蛋白激酶受体转导通路	(80)
第三节 基于酪氨酸蛋白激酶及其受体为靶点的抗肿瘤新药研究	(81)
第四节 靶向细胞内信号转导系统的小分子药物	(84)
第八章 基于表观基因组靶点的药物研究	(89)
第一节 DNA 甲基化修饰	(89)
第二节 组蛋白乙酰化修饰	(92)
第三节 展望	(95)
第九章 治疗性疫苗研究新思路	(97)
第一节 肽和蛋白型治疗性疫苗	(97)
第二节 核酸型治疗性疫苗	(101)
第三节 T 细胞型治疗性疫苗	(105)
第十章 炎症的免疫生物学机制和慢性病：抗炎药物开发的新机会	(110)
第一节 炎症反应概述	(110)
第二节 炎症反应的诱导物	(112)
第三节 炎症的感受器和信号转导通道	(116)
第四节 炎症的效应分子和介质分子	(121)
第五节 参与炎症反应的其他介质	(128)
第六节 炎症的转归	(128)
第七节 抗炎药物的开发	(131)
第十一章 基于自身免疫性疾病的炎性介质及信号通路为靶点的免疫调节剂的	
研究	(137)
第一节 自身免疫性疾病与炎症介质	(137)
第二节 自身免疫性疾病炎症介质及调节信号通路	(144)
第三节 自身免疫性疾病治疗药物与研究进展	(152)
第十二章 以病毒进入宿主细胞为靶点的药物研究	(163)
第一节 包膜病毒进入宿主细胞的路径	(163)
第二节 作用于病毒吸附/结合细胞表面的药物靶点	(166)

第三节	作用于病毒膜融合的药物靶点	(172)
第四节	一种安全的细胞水平病毒进入抑制评价模型	(174)
第十三章	心脑血管疾病药物的新靶点——AMP 激活的蛋白激酶	(179)
第一节	AMP 激活的蛋白激酶 (AMPK) 的发现历程	(180)
第二节	结构与活性调节	(180)
第三节	AMPK 激动剂	(185)
第四节	与心脑血管疾病的关系	(188)
第五节	潜在问题及发展方向	(199)
第十四章	抗帕金森病药物研究相关的新靶点	(203)
第一节	以变异基因为靶点是抗帕金森病药物研究的突破口	(203)
第二节	家族性帕金森病的分类	(204)
第三节	帕金森病相关的药物研究新靶点展望	(208)
第十五章	防治阿尔茨海默病药物研究的新思路与新靶点	(210)
第一节	AD 相关流行病学调查	(210)
第二节	AD 临床症状	(211)
第三节	AD 的诊断	(213)
第四节	AD 发病机制和药物治疗的研究现状与进展	(217)
第十六章	神经炎症相关新靶点及药物开发新思路	(235)
第一节	神经炎症的定义及组成	(235)
第二节	神经元、小胶质细胞、星形胶质细胞构成的神经网络以及 在神经炎症中的作用	(235)
第三节	神经炎症与多种疾病的关系	(236)
第四节	小胶质细胞和星形胶质细胞上可以被药物调控的靶点	(238)
第五节	总结	(250)
第十七章	以线粒体为治疗靶点的神经退行性疾病的新药研究	(252)
第一节	线粒体的结构和功能	(252)
第二节	神经退行性疾病中的线粒体改变	(256)
第三节	以线粒体为靶点开发神经退行性疾病的治疗药物	(267)
索引词		(278)

第一章 绪 论

第一节 药物靶点研究的历史

传统上讲,新药的研究与生命科学的发展密不可分。19 世纪和 20 世纪初叶,药物的来源主要是从天然产物中分离和提取,如在 19 世纪初叶 Sertuner 从阿片中提出吗啡, Pelletier 和 Magendie 从吐根中提取吐根碱,后来又有毛果芸香碱的提纯,以及麦角生物碱、阿司匹林、磺胺类药物、胰岛素、青霉素和激素等。20 世纪初,英国的 Henry H. Dale 因研究麦角的毒素而发现其中阻断交感神经的成分,在研究毒素的作用时发现了拟副交感神经的毒蕈碱, J. N. Langley 从研究阿托品和毛果芸香碱拮抗作用的结果中提出“接受物质 (receptive substance)”的概念。而真正提出药物靶点这一概念的是德国细菌学、血液学、免疫学和化学药物治疗学家,诺贝尔奖获得者 Paul Ehrlich,他以发现砷矾钠治疗梅毒著称,该发现被认为是首个以特异病原体为靶点的药物。他首先提出了“药物靶点”的概念,将化学药物治疗通俗比喻为“魔术弹”。后来他系统地研究了上千种有机砷化合物杀死锥虫和螺旋体的作用,并提出了化学治疗 (chemotherapy) 这一名词,到了 20 世纪 40 年代,青霉素提纯的成功真正实现了他的设想。青霉素的作用是结合青霉素结合蛋白,抑制细菌细胞壁的合成,而哺乳动物细胞一般并无细胞壁,因此毒性很小。根据同样设想,人们开始了针对各个系统疾病相关靶点药物的研究,突出的有抗高血压药和神经系统药物,这些药物的药理学研究代表了这一时代关于神经递质及受体学说的发展。20 世纪 50 年代初期,已经知道神经末梢以释放化学递质传递冲动,并且知道乙酰胆碱和去甲肾上腺素作为神经递质发挥作用。在 20 多年里从乙酰胆碱和去甲肾上腺素结构衍生的合成化合物中筛选出不少新药,可在体内器官和体外组织细胞模拟或阻断神经递质的作用,如各种神经节阻断剂、肾上腺素受体阻断剂等,以及后来和近年发现的噻嗪类利尿药、钙通道阻滞剂、血管紧张素转换酶抑制剂、血管紧张素 II 受体阻断剂和肾素抑制剂等,极大地推动了心脑血管药理学和神经药理学的发展。

20 世纪 60 年代以来,医学的发展促进了新药靶点的发现,药物研究的方向也逐渐转向以病因为靶点,如钙通道阻滞剂、非甾体抗炎药、抗病毒药和免疫抑制剂等。肿瘤属于一类多病因和多阶段的进展性疾病,多数很难从单一病因解决。而一些病因较为明确的肿瘤,例如乳头状瘤病毒引起的子宫颈癌、HBV 导致的肝癌、HIV 导致的 NHL 和多发性血管瘤等,无论从预防和治疗的角度来考虑,抗病毒治疗仍然是较好的选择。近年来,随着分子生物学技术的提高和从细胞受体和增殖调控的分子水平对肿瘤发病机制的进一步认识,开始了针对细胞受体、关键酶、基因和细胞内信号转导通路中关键结点分子为靶点的治疗,人们称之为“靶向治疗”。这些领域包括具有靶向性的生长因子受体阻断剂、激酶抑制剂,

针对某些特定细胞标志物的单克隆抗体, 针对某些癌基因和癌细胞的遗传学标志的药物, 抗肿瘤血管生成药物, 抗肿瘤疫苗, 基因治疗等, 给肿瘤的治疗带来了新的曙光。

第二节 药物靶点的概念及分类

药物靶点是指药物在体内的作用结合位点, 包括基因位点、受体、酶、离子通道、核酸等生物大分子。

现代新药研究与开发的关键首先是寻找、确定和制备药物筛选靶标——分子药物靶标。选择确定新颖、有效的药物靶标是新药开发的关键。目前已经发现的药物作用靶点约有 500 个。研究表明, 蛋白质、核酸、酶、受体等生物大分子不仅是生命的基础物质, 有些也是药物的作用靶点。现有药物中, 以受体为作用靶点的药物超过 50%, 是最主要和最重要的作用靶点; 以酶为作用靶点的药物占 20% 之多, 特别是酶抑制剂, 在临床用药中具有特殊地位, 以离子通道为作用靶点的药物约占 6%; 以核酸为作用靶点的药物仅占 3%, 其余近 20% 药物的作用靶点尚待研究发现。

合理化药物设计 (rational drug design) 可以依据生命科学研究中所揭示的包括酶、受体、离子通道、核酸等潜在的药物作用靶位, 或其内源性配体以及天然底物的化学结构特征来设计药物分子, 以发现选择性作用于靶点的新药。

大多数药物通过与器官、组织、细胞上的靶点作用, 影响和改变人体的功能, 产生药理效应。由于药物结构类型的千差万别, 因而呈现诸多作用靶点。有些药物只能作用在单一靶点, 有些药物可以作用在多个靶点。

一、以受体为靶点的药物

受体是一类介导细胞信号转导的功能性蛋白质, 可以识别某种微量化学物质并与之结合, 通过信息放大系统, 触发后续的生理或药理效应。

以受体作为靶点的药物习惯上称为分子激动药或拮抗药。激动药按其活性大小可分为完全激动药和部分激动药, 例如吗啡为阿片受体 μ 完全激动药, 而丁丙诺啡则为阿片受体 μ 部分激动药。拮抗药分为竞争性拮抗药和非竞争性拮抗药, 竞争性拮抗药与激动药同时应用时, 能与激动药竞争与受体的结合, 降低激动药与受体的亲和力, 但不降低内在活性; 非竞争性拮抗药与激动药同时应用时, 既降低激动药与受体的亲和力, 又降低内在活性。如阿托品为竞争性 M 型乙酰胆碱受体拮抗药, 而酚苄明则为非竞争性肾上腺素 α 受体拮抗药。

受体的类型主要包括: ①G 蛋白偶联受体, 是鸟苷酸结合调节蛋白的简称, 大多数受体属于此种类型。许多神经递质和激素受体需要 G 蛋白介导细胞作用, 如 M 型乙酰胆碱、肾上腺素、多巴胺、5-羟色胺、嘌呤类、阿片类、前列腺素、多肽激素等; ②门控离子通道型受体, 存在于快速反应细胞膜上, 受体激动时导致离子通道开放, 细胞膜去极化或超极化, 引起兴奋或抑制。N 型乙酰胆碱、 γ -氨基丁酸 (γ -amino butyric acid, GABA)、天门冬氨酸等属于此类受体; ③酪氨酸激酶受体, 如表皮细胞生长因子、血管内皮细胞生

长因子、血小板衍生的生长因子和一些淋巴因子受体等；④细胞内受体，如甾体激素、甲状腺素等。

二、以酶为靶点的药物

酶是由活细胞合成的对特异底物高效催化的蛋白质，是体内生化反应的重要催化剂。由于酶参与一些疾病的发生发展过程，在酶催化下产生一些病理反应介质或调控因子，因此成为一类重要的药物作用靶点。此类药物多为酶抑制剂，全球销量排名前 20 位的药物，有 50% 是酶抑制剂。酶抑制剂一般对靶酶具有高度的亲和力和特异性。酶抑制剂种类繁多，药理效应各异。

三、以离子通道为靶点的药物

离子通道是细胞膜上的蛋白质小孔，属于跨膜的生物大分子，具有离子泵的作用，可选择性地允许某种离子出入。离子经过通道内流或外流跨膜转运，产生和传输信息，成为生命活动的重要过程，以此调节多种生理功能。现有药物主要以 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 等的离子通道作为靶点。

以 K^+ 通道作为靶点的药物，主要为 K^+ -ATP 通道激活剂和拮抗剂。激活剂亦称 K^+ 通道开放药，如抗高血压药中的血管扩张剂尼可地尔、吡那地尔、色满卡林等，作用机制是 K^+ 通道的开放，致使 K^+ 外流增加，导致细胞膜超极化，阻止 Ca^{2+} 内流，促进 Na^+ - Ca^{2+} 交换，导致 Ca^{2+} 外流，增加钙储池中的膜结合 Ca^{2+} ，最终使细胞内的 Ca^{2+} 量降低，血管平滑肌松弛，外周阻力减少，血压下降。拮抗剂亦称 K^+ 通道阻滞药，如抗心律失常药胺碘酮、索他洛尔、N-乙酰普鲁卡因酰胺、氯非铵、多非利特、溴苄胺、司美利特等，作用机制是抑制 K^+ 外流，延长心肌动作电位时程和有效不应期。此外治疗 2 型糖尿病的磺酰脲类药物，如甲苯磺丁脲和格列本脲也属于 K^+ 通道阻滞剂。

以 Na^+ 通道作为靶点的药物，主要为 I 类抗心律失常药，作用机制是阻滞 Na^+ 内流，抑制心脏细胞动作电位振幅及超射幅度，使其传导减慢，有效不应期延长。按阻滞 Na^+ 通道程度的不同， Na^+ 通道阻滞剂分为 A、B、C 三个亚类。A 类中度阻滞 Na^+ ，对 Na^+ 通道的活性中度抑制（30%），减慢传导，延长复极，代表药有奎尼丁、普鲁卡因胺；B 类轻度阻滞 Na^+ ，对 Na^+ 通道活性轻度抑制（10%），传导微减或不变，加速复极，代表药有利多卡因、苯妥英钠；C 类重度阻滞 Na^+ ，对 Na^+ 通道的活性重度抑制（50%），明显减慢传导，对复极影响较小，代表药有氟卡尼、普罗帕酮。

以 Ca^{2+} 通道作为靶点的药物，临床上称为 Ca^{2+} 通道阻滞剂或钙拮抗药，是发现最早、研究最深的以离子通道为靶点的药物，作用机制是抑制细胞外 Ca^{2+} 跨膜内流而产生药理效应。根据世界卫生组织（World Health Organization, WHO）的建议，将此药分为选择性 Ca^{2+} 通道阻滞剂和非选择性 Ca^{2+} 通道阻滞剂。选择性 Ca^{2+} 通道阻滞剂包括：I 类苯烷胺类，如维拉帕米、噻帕米、加洛帕米等；II 类二氢吡啶类，如硝苯地平、尼莫地平、尼伐地平、拉西地平、尼卡地平、尼群地平、氨氯地平等；III 类苯噻氮草类，如地尔硫草、二氯喹利等。非选择性 Ca^{2+} 通道阻滞剂包括：IV 类二苯哌嗪类，如桂利嗪、氟桂利嗪等；V

类普尼拉明类，如普尼拉明；Ⅵ类其他类，如哌克昔林。

以 Cl^- 通道作为靶点的药物，这类药是近年来研究发现的苯二氮草类药物，如地西洋、氟西洋、氯氮草、三唑仑、咪达唑仑、溴替唑仑、氟硝西洋等，属于 γ -氨基丁酸（GABA）调控的 Cl^- 通道启开剂。当 GABA 受体被 GABA 激活时， Cl^- 通道开放， Cl^- 内流，细胞内 Cl^- 增加，产生超极化而引起抑制效应，导致镇静、催眠等药理作用。

四、以核酸为靶点的药物

核酸包括 DNA 和 RNA，是指导蛋白质合成和控制细胞分裂的生命物质。干扰或阻断细菌、病毒和肿瘤细胞增殖的基础物质核酸的合成，就能有效地杀灭或抑制细菌、病毒和肿瘤细胞。以核酸作为靶点的药物主要包括一些抗生素、抗病毒药、喹诺酮类抗菌药、抗肿瘤药等。

作用于 RNA 靶点的药物：包括利福霉素类抗生素，作用机制是影响 RNA 的合成；抗肿瘤药阿糖胞苷、氟尿嘧啶、放线菌素 D、柔红霉素、多柔比星等，作用机制是抑制 RNA 的合成。

作用于 DNA 靶点的药物：包括喹诺酮类抗菌药，作用机制是阻断 DNA 的合成；抗病毒药阿昔洛韦、阿糖腺苷、齐多夫定等，作用机制是干扰 DNA 的合成；抗肿瘤药氮芥、环磷酰胺、塞替派、甲氨蝶呤、羟基脲、丝裂霉素、博来霉素、白消安（马利兰）、顺铂、喜树碱等，作用机制是破坏 DNA 的结构和功能。

第三节 药物靶点在新药研究中的作用

新药的研发，涉及多个学科和领域。近年来，随着分子生物学、药物化学、分子药理学、计算化学等学科的发展，新药的研发已经从最初的以经验性为主向理论指导下进行药物分子设计方向发展。其研究开发的程序一般为，首先选定药物作用的靶点，生物靶点的选定是研制药物的起始点。分子生物学上发现的一些新颖的重要的酶、受体或离子通道等都将成为研制独特作用机制的药物的新靶点。

寻找新的药物作用靶点是新药创制的前提。一个新的药物靶点的发现预示着可找到作用机制和化学结构全新的药物，揭示疾病的发病机制及提供防治各种疾病的新的治疗方法。随着生命科学的发展以及分子生物技术的进步而引出的新的药物靶向策略，逐渐取代了以往传统式的药物设计和化学修饰模式，采用某一被认为与某种疾病相关的生物分子为靶点进行化合物设计合成和筛选的方法，以期获得选择性高、特异性强、副作用小的药物。药物作用新机制和新靶点研究的突破，往往会推动创新药物研究产生划时代的飞跃。

药物的作用靶点不仅为揭示药物的作用机制提供了重要信息和入门途径，而且对新药的开发研制、建立筛选模型、发现先导化合物，也具有十分重要的意义。如第一个上市的 H_2 受体阻断剂西咪替丁，在极短的时间内就成为治疗胃溃疡的首选药物；第一个用于临床的羟甲基戊二酸单酰辅酶 A 还原酶抑制剂洛伐他汀，对杂合子家族性高胆固醇血症、多基因性高胆固醇血症、糖尿病或肾病综合征等各种原因引起的高胆固醇均有良好的疗效。

第一个作用于 Bcr-Abl 酪氨酸激酶抑制剂伊马替尼, 单药用于慢性粒细胞白血病 98% 患者给药后 3 周内获临床血液学的完全缓解, 5 个月观察, 缓解率 53%, 其中完全缓解 (complete response, CR) 10%。急性期患者, 55% 有效。用于晚期、转移性胃肠道基质瘤均有效, 总有效率为 88%, c-kit 表达阳性的患者有效率 54%, 另有 34% 的患者为稳定。上述实例表明, 药物的作用靶点一旦被人们认识和掌握, 就能获取新药研发的着眼点和切入点。

虽然药物的作用靶点已成为合理药物设计的重要依托, 但是人体的构成和功能非常复杂, 受到多种因素的调控, 存在许多天然屏障和各种平衡, 对某一特定功能, 在某些情况下会有几种酶、受体、离子通道或其他生物大分子参与, 兼有扩增系统和反馈抑制等制约。另外, 药物与靶点结合发挥作用, 还要经过吸收、转运、分布、代谢和排泄等药代动力学过程。因此要掌握药物作用靶点的规律, 并成功用于新药开发, 仍然面临着极大的挑战。

第四节 药物靶点研究的思路与方法

疾病特异性蛋白的发现, 为药物设计提供了丰富的靶点。通过比较药物作用前后蛋白质谱的差异, 可从中发现有效的药物作用靶点或相关疾病的分子标志物。据粗略估计, 有 5000 ~ 10 000 个药物潜在靶点, 而已开发成功的靶点仅有 500 个左右。研究表明, 90% 的药物潜在靶点为蛋白质。新的药物靶点可能来源于:

1. 新基因靶点 利用计算机从表达序列标志数据库和基因序列数据库中寻找新的药物靶点, 采用经典的克隆方法确认。

2. 转录水平的靶点 采用 RNA 干扰技术、基因芯片技术筛选鉴别诸如核酸、反义寡核苷酸、小干扰 RNA 等反映 mRNA 表达水平的基因靶点。

3. 蛋白分子靶点 采用发光辅助激光灭活技术、双向凝胶电泳和蛋白质微阵列技术可发现包括抗体和胞内抗体、寡聚核苷酸适配子、多肽以及蛋白质在内的分子靶点。

从基因组中拉网式搜寻, 发现靶基因, 确定靶基因氨基酸序列和靶蛋白的三维结构。

生物芯片在药物靶点发现与药物作用机制研究中可发挥重要的作用, 采用模式生物细胞进行实验, 条件容易控制, 对模式生物基因表达的研究将启发人们发现和确认新的药物作用靶点。目前, 已有多种模式生物 (如酵母) 的基因组计划已经完成。酿酒酵母 (*saccharomyces cerevisiae*) 就是一种可用来进行药物筛选的较为理想的模式生物。它是真核生物而且基因组已全部测序, 细胞繁殖快, 易于培养, 与哺乳动物细胞有许多共同的生化机制。现在已经发现, 在酵母细胞中存在许多与人类疾病相关的基因。如人类 Werner 综合征表现出早熟的特征, 其细胞的生活周期变短。人类与此疾病相关的基因与酵母中编码 DNA 解旋酶的 SGS1 基因极为相似。Botstein 等得到了 SGS1 基因突变的酵母菌株, 此突变菌株生活周期变短, 细胞的表型特征与患有 Werner 综合征的细胞相似。已有一些研究小组根据公布的酵母基因组序列, 用 PCR 方法扩增了酵母 6000 多个开放阅读框 (open reading frame, ORF) 片段, 制成 DNA 芯片, 在整个基因组的范围内对酵母的基因表达进行检测。

药物与细胞相互作用, 将引起细胞外部形态及内部正常代谢过程的一系列变化。其内部生理活动的变化可集中表现在其基因表达的变化上。通过测定分析药物对细胞的基因表

达的影响,可推测药物的作用机制,评价药物活性及毒性,进而确证药物靶点或者发现新的药物靶点。通过 DNA 芯片测定药物诱导的细胞基因表达变化来进行药物筛选与研究,对那些用常规方法很难追踪监测的药物或需要很长时间才能得到药物临床实验结果的情况,显得尤为有用。通过监测阳性药物处理前后组织细胞基因表达变化情况可以获得许多十分有价值的信息。首先,经药物处理后表达明显改变的基因往往与发病过程及药物作用途径密切相关,很可能是药物作用的靶点或继发事件,可作为进一步药物筛选的靶点或对已有的靶点进行验证;其次,药物处理后基因表达的改变对药物作用机制研究有一定的提示作用。

理论上讲,药物作用诱导的细胞基因表达变化应与缺失编码该药物作用靶点的基因引起的基因表达变化相似。如果突变基因所编码的蛋白质参与的生物途径受药物的影响,则药物诱导该变种的基因表达变化与药物诱导野生株基因表达变化将不同。用这种策略不仅可以确证药物作用靶,还可以发现未曾引起人们注意的作用靶,并可从这些被忽略掉的靶中推测药物的毒副作用。

随着生命科学各个领域不断取得突破性的进展,各种关键技术已在新药研究开发的各个领域得到广泛应用,特别是后基因组时代的功能基因组学、药物蛋白组学给新药研究开发带来了更大的发展空间。随着对各种功能基因在人体生理生化及疾病发生发展过程中所起作用的不断认识,越来越多的研究利用功能基因寻找药物作用的新靶点,进而发现新作用机制的新药,再通过转基因动物模型的建立,使得动物疾病模型与实际发病机制更为接近,更加有利于提高新药发现的概率。

(陈晓光)

第二章 细胞膜离子通道活性与细胞凋亡通路的药理学机制

离子通道 (ion channels) 是一类跨膜糖蛋白, 它们聚集起来并镶嵌在细胞膜上形成亲水性孔道。细胞膜对无机离子的跨膜运输有被动运输 (顺离子浓度梯度) 和主动运输 (逆离子浓度梯度) 两种方式, 被动运输的通路即称为离子通道。离子通道是神经、肌肉、腺体等许多组织细胞膜上的基本兴奋单位, 它们能产生和传导电信号, 与多种生命活动过程密切相关 (如程序性细胞死亡)。近年来研究发现, 除具有重要的生理功能外, 离子通道还参与心脑血管、神经退行性疾病和肿瘤的发生。

离子通道依据其活化的方式不同, 可分两类: 一类是电压活化的通道, 即通道的开放受膜电位的控制, 如 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Cl^- 和一些类型的 K^+ 通道; 另一类是受体或配体活化的通道, 即通过化合物与膜上受体相互作用而激活的通道, 如乙酰胆碱 (acetyl choline, ACh) 受体通道、氨基酸受体通道、 Ca^{2+} 活化的 K^+ 通道等。近年来研究发现, 离子通道除可以直接影响细胞功能, 还可调节细胞的凋亡过程及许多疾病的病理过程, 并成为潜在的药物靶点。本章将在介绍离子通道和细胞凋亡的基础上, 深入阐述离子通道在脑缺血、老年性痴呆和肿瘤发病机制中的作用。

第一节 细胞膜离子通道与细胞凋亡

凋亡 (apoptosis), 即程序性细胞死亡, 在正常情况下可促进组织细胞发育和保持动态平衡, 但是在某些化学、物理、环境或遗传学方面的损伤因素作用下可介导病理性细胞死亡, 这种病理性调控在某些疾病状态下尤为突出, 如癌症、自身免疫性疾病和神经退行性病变如阿尔茨海默病 (Alzheimer disease, AD) 等。凋亡主要的生化改变是蛋白水解酶 caspase 的激活。Caspase 的激活主要有两条途径。一条是外在通路 (即死亡受体通路), CD95、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, $\text{TNF-}\alpha$) 和 Fas 配体等激活死亡受体, 使邻近细胞膜的 caspase 8 和/或 caspase 1 被激活, 继而 procaspase 3 被分解产生活性因子 caspase 3。第二条通路是内在通路 (即线粒体死亡通路), 线粒体是细胞生命活动控制中心, 它不仅是细胞呼吸链和氧化磷酸化的中心, 而且是细胞凋亡调控中心。实验表明了细胞色素 C (CytC) 从线粒体释放是细胞凋亡的关键步骤。释放到细胞质的 CytC 与凋亡相关因子 1 (Apaf-1) 结合, 使其形成多聚体, 并促使 caspase 9 与其结合形成凋亡小体, caspase 9 被激活, 被激活的 caspase 9 能激活其他的 caspase 如 caspase 3 等, 从而诱导细胞凋亡。此外, 线粒体还释放凋亡诱导因子, 如 AIF, 参与激活 caspase。最初凋亡是通过形态学特征定义的, 包括胞体缩小 (apoptotic volume decrease, AVD), 核浓缩, 染色质边缘化, DNA 片段

化及凋亡小体的形成。AVD 一般分两个阶段,早期细胞体积缩小,发生在 CytC 释放和 caspase 激活之前,主要通过细胞膜上的离子通道和转运体调节;后期体积缩小与 DNA 片段化和细胞核破坏同时发生。Caspase 的增加促进后期 AVD 形成。早期和后期 AVD 虽然可能是不同的机制介导,但都有膜离子通道和转运体的参与,引起相应的细胞内离子稳态的改变。

Bcl-2 家族参与凋亡的调控,这一家族有众多成员,如 Bcl-2、Bcl-w、Bcl-xl、Bax、Bak、Bad、Bim 等,它们分别既有抗凋亡作用,也有促凋亡的作用。多数成员间有两个结构同源区域,在介导成员之间的二聚体化过程中起重要作用。Bcl-2 成员之间的二聚体化是成员之间功能实现或功能调节的重要形式。Bcl-2 生理功能是阻遏细胞凋亡,延长细胞寿命。Bcl-2 可以定位于线粒体、内质网以及核膜上,通过阻止线粒体细胞色素 C 的释放而发挥抗凋亡作用。此外, Bcl-2 具有保护细胞的功能。最近几年,凋亡的离子方面的调控逐渐引起人们的注意,认为凋亡不仅可由基因调控,也受细胞内的离子稳态调节,尤其钾离子通道在凋亡中发挥重要作用。

一、钾离子稳态与细胞凋亡

钾通道 (potassium channel) 主要有五类:①电压门控钾通道 (K_v 家族);②钙激活钾通道 (K_{Ca} 家族);③内向整流钾通道 (K_{ir} 家族);④ATP 敏感钾通道 (K_{ATP} 家族);⑤双孔钾通道 ($K2P$ 家族)。 K^+ 是细胞内的主要离子 (大约 140mmol/L), 而 Na^+ 、 Ca^{2+} 和 Cl^- 浓度比 K^+ 低得多,因此细胞内 $[K^+]_i$ 和相应的水分子的运动是胞质容积的主要决定因素。在早期研究中,由于缺乏 K^+ 损失和凋亡相联系的证据,只是观察到损伤因素可促进 K^+ 损失进而刺激细胞成熟和致炎因子白细胞介素 1β (IL- 1β) 的释放。IL- 1β , 后来命名为 caspase-1, 是凋亡信号家族的一员。在人外周血单核细胞, Na^+ 、 Ca^{2+} 内流不会引起 IL- 1β 的激活,但是缬氨霉素和尼日利亚菌素引起 $[K^+]_i$ 减少后却可激活 IL- 1β 。而高钾或钾通道阻滞剂 (TEA 或 4AP) 可阻断 IL- 1β 的激活。说明胞内 K^+ 的减少对于激活 IL- 1β 的翻译后修饰是必要的。同时也说明 K^+ 和 Ca^{2+} 一样,是多种酶的调控剂,能影响蛋白质的结构并且改变蛋白酶和核酸酶的活性。最近研究也证实 K^+ 刺激 IL- 1β 的活化是由不依赖 Ca^{2+} 的磷脂酶 A2 介导的。

Cidlowski 实验室证实 K^+ 剂量依赖地抑制 caspase 3 酶原的体外激活,而正常浓度的 K^+ (约 140mmol/L) 能够完全抑制 caspase 和内切酶的激活。当 $[K^+]_i$ 从正常 (140mmol/L) 减至 56mmol/L 时,可检测到 DNA 的片段化,可被 KCl 抑制 (K_i 约为 70mmol/L)。

细胞内 K^+ 耗竭是凋亡的触发剂还是凋亡的结果,目前仍然是争论的焦点。许多类型的细胞由缬氨霉素诱导凋亡后,破坏 K^+ 稳态足以引起凋亡。而且细胞膜上过表达钾通道后也可以诱导或促进凋亡的发生。然而,其他的研究却认为如要激活 caspase 家族的蛋白酶及核小体切割酶,还需要其他因素的参与。在低钾的缓冲液中, caspase 3 酶原不能被激活;将无活性的核酸酶放在缺 K^+ 的缓冲液中,也不足以引起 DNA 降解。而当细胞处于低张且低钾溶液时也不发生凋亡。在无细胞的凋亡体系中,生理浓度的 K^+ (100 ~ 140mmol/L) 可抑制 HeLa 细胞核的染色质凝集和 DNA 的片段化,此时细胞核所处的环境是苍术苷 (atract-