

2002

# 药理学进展

主编 苏定冯 缪朝玉 王永铭



人民卫生出版社

# 药理学进展

(2002)

名誉主编 金正均 张均田 林志彬

主 编 苏定冯 缪朝玉 王永铭

编者 (以姓氏笔画为序)

|     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|
| 王 昊 | 王怀良 | 王泽剑 | 王慧涵 |
| 丛文铭 | 冯永红 | 左建平 | 刘兆平 |
| 刘皋林 | 朱文玲 | 吴葆杰 | 张均田 |
| 张浣清 | 张岫美 | 张树辉 | 李学军 |
| 李明华 | 李凌松 | 李晓玉 | 李菊香 |
| 杨朋远 | 芮耀诚 | 苏定冯 | 邱 瑜 |
| 陆 阳 | 陆利民 | 陈红专 | 孟 夏 |
| 林志彬 | 胡国渊 | 荣征星 | 贺晨霞 |
| 唐朝枢 | 贾竹青 | 陶 霞 | 曹济民 |
| 曾昭全 | 韩力薇 | 缪朝玉 | 戴德哉 |
| 魏文树 | 魏炜明 |     |     |

人 民 卫 生 出 版 社

**图书在版编目 (CIP) 数据**

药理学进展. 2002/苏定冯等主编. -北京:  
人民卫生出版社, 2002  
ISBN 7-117-05062-4

I. 药… II. 苏… III. 药理学-进展-文集  
IV. R96-53

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 052996 号

---

**药 理 学 进 展 (2002)**

---

主 编: 苏定冯 缪朝玉 王永铭  
出版发行: 人民卫生出版社 (中继线 67616688)  
地 址: (100078) 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼  
网 址: <http://www.pmph.com>  
E - mail: [pmph@pmph.com](mailto:pmph@pmph.com)  
印 刷: 北京通县永乐印刷厂  
经 销: 新华书店  
开 本: 787×1092 1/16 印张: 13.5  
字 数: 316 千字  
版 次: 2002 年 10 月第 1 版 2002 年 10 月第 1 版第 1 次印刷  
标准书号: ISBN 7-117-05062-4/R·5063  
定 价: 28.00 元

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究  
(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

# 前言

《药理学进展(2002)》在各位作者和出版社编辑的努力下,及时与大家见面了。本书的内容以最近一年的一些学术会议的大会邀请报告为主。这些会议包括:第四届中法药理学会会议(2001年7月9日~10日,法国里昂),第三届海峡两岸心血管科学研讨会(2001年9月20~23日,庐山),第三届21世纪新药研讨会(2001年12月2~5日,上海),2001年心血管临床基础研究年会(2001年2月8日~10日,北京)等。此外,今年自由选题投稿明显增加。

《药理学进展(2002)》内容丰富。你知道有多少活性药物来源于植物吗?你知道灵芝是怎样抗肿瘤的吗?中国药理学学会的主要领导人张均田教授和林志彬教授分别对以上两个问题作了深刻地阐述。分子生物学方面的文章在本书中有7篇,分别论述功能基因组、蛋白质组学、药物基因组学和基因治疗等。自主神经与心血管疾病的关系、离子通道病与抗心律失常药的关系等均值得大家共同关注。除了经典的药理学外,本书还刊登了一篇皮肤药理学研究概况。

《药理学进展》自1997年以来每年出版一本,这是第6本。本书对国内药理学界已产生相当大的影响。除了被用作药理学教师和研究人员的参考书外,本书还被用作研究生入学考试的参考书、研究生教学的参考书等。本书的成功首先取决于作者的权威性。现任IUPHAR主席Vanhoutte教授曾为本书撰文;国内多位院士均是本书的作者。特别值得一提的是,经常为本书写稿的金国章教授和唐希灿教授在今年初光荣地当选为院士。此外,许多文章均是该领域最权威的教授所作。与作者的权威性一样,本书的成功还取决于出版社的权威性。新,是本书最大的特色。因为她每年出版一本,从收稿到出书间隔只有5个月,使她具有保持“新”的特色的可能性;由于作者是各领域的权威,对该领域的进展长期跟踪,使她具备了保持“新”的特色的必要条件;与其他大型参考书不同,本书没有任何章节、内容等方面的限制,给了她具有“新”的特色的广阔空间。当然,本书的成功,离不开广大读者的呵护。让我们共同努力,将本系列书越办越好。

主编

2002年8月于上海

# 目 录

|                                          |                   |
|------------------------------------------|-------------------|
| 来源于药用植物的新药概述 .....                       | 张均田 (1)           |
| 孤儿 G 蛋白偶联受体研究策略——功能基因组                   |                   |
| 研究的成功范例 .....                            | 李菊香 唐朝枢 (9)       |
| 心脏自主神经重塑与心源性猝死的关系 .....                  | 曹济民 (26)          |
| 蛋白质组学——药物发现的新途径 .....                    | 李学军 (32)          |
| 改善 ABR 功能作为心血管疾病防治的新策略 .....             | 缪朝玉 苏定冯 (40)      |
| 干细胞与心肌缺血性疾病 .....                        | 张浣清 贾竹青 李凌松 (46)  |
| M 胆碱受体激动剂治疗阿尔采末病研究进展 .....               | 陈红专 邱 瑜 荣征星 (52)  |
| 药物基因组学与高血压病的治疗 .....                     | 陶 霞 刘皋林 苏定冯 (60)  |
| 高血压基因治疗的进展及前景 .....                      | 陆利民 (71)          |
| 辣椒素及其受体的药理学研究 .....                      | 李明华 胡国渊 (82)      |
| 反义寡核苷酸类药物的一些研究进展 .....                   | 杨朋远 芮耀诚 (90)      |
| 腺病毒载体在基因治疗中的应用和发展 .....                  | 韩力薇 孟 夏 陈红专 (96)  |
| 血管内皮细胞产生基质金属蛋白酶及活性调节 .....               | 王杰松 芮耀诚 (103)     |
| 降钙素基因相关肽及其基因治疗研究进展 .....                 | 贺晨霞 缪朝玉 (109)     |
| 肺动脉高压的 5-HT 受体与 G 蛋白                     |                   |
| 之间的协同调节机制 .....                          | 王怀良 (115)         |
| $\beta$ 受体阻滞剂在心力衰竭中应用的进展 .....           | 朱文玲 (118)         |
| $\text{Na}^+/\text{H}^+$ 交换系统与心脏疾病 ..... | 刘皋林 陶 霞 (124)     |
| 灵芝抗肿瘤作用的研究进展 .....                       | 林志彬 (134)         |
| 灵芝多糖的药理作用及作用机制 .....                     | 王慧涵 王怀良 (139)     |
| 自由基与免疫系统功能调节 .....                       | 冯永红 左建平 李晓玉 (145) |
| 过氧化物酶体增生激活型受体 $\gamma$ 与                 |                   |
| 发展抗动脉粥样硬化药 .....                         | 吴葆杰 张岫美 刘兆平 (152) |
| 活性氧损害与药物防治研究进展 .....                     | 魏文树 曾昭全 (159)     |
| 皮肤药理学研究概况 .....                          | 胡晋红 朱全刚 (164)     |
| 阿尔采末病的分子机制及其药物新靶点 .....                  | 王泽剑 陆 阳 陈红专 (171) |
| 孤儿毒蕈碱乙酰胆碱受体 $m_5$ 的研究进展 .....            | 王 昊 陆 阳 陈红专 (177) |
| 硝酸酯类药物的耐受性问题 .....                       | 魏炜明 魏文树 苏定冯 (184) |
| 线粒体——肿瘤诊断和治疗的靶点 .....                    | 张树辉 丛文铭 (191)     |
| 心肌离子通道病及研究抗心律失常药的思考 .....                | 戴德哉 (202)         |
| 征稿启示 .....                               | (212)             |

# 来源于药用植物的新药概述\*

张均田

(中国医学科学院、中国协和医科大学药物研究所 北京 100050)

在古代,主要采用植物和动物物质防治疾病。即使在现代社会,来源于天然产物的药物仍是医生治疗疾病的主要手段,例如来自植物的吗啡、强心苷、麦角、阿托品、利血平和来自动物的雌激素、雄激素、胰岛素以及来自微生物的种种抗微生物药等。

我国近年来强调把新药研究放在天然产物特别是中草药上,其主要理由是:中医学已有 2000 多年的历史,形成了系统的、独特的理论并积累了丰富的临床经验,在中医药理论与经验的指导下有更多的机会发现新药,减少盲目筛选。

中医及各民族医用于治疗各种疾病的药用植物约 5000 多种。2000 年版的中国药典收载的中药为 531 种。从中药中已分离出 517 种具有药理活性的成分,其中,生物碱占首位(202),其次是酚类(177)和萜类(158)化学物。已开发出具有不同药理作用的 140 多种新药:34 种防治心血管系统疾病药物,21 种抗癌药,21 种作用于中枢神经系统药物,15 种作用于呼吸系统药物,17 种抗微生物药,14 种作用于消化系统药物,9 种抗寄生虫病药物,5 种用于计划生育,1 种扩瞳药。

上述药物根据其特性再分为四类:①已知化合物但有新的用途;②新化合物和新的用途;③药用植物有效成分的半合成或化学结构改造;④中药有效成分的人工全合成。来源于中草药的新药中,45 种是新化合物、新用途,105 种是已知化合物但有新用途。已开发成功的新药中有 100 种从天然产物提取而得,45 种是天然成分半合成、全合成或结构改造物。下面举例介绍。

## 一、影响中枢神经系统(CNS)的新药

### (一) CNS 兴奋药

一叶萩碱是从 *Securinega suffruticosa* Rehd 分得的一种生物碱,1963 年我国和日本科学家同时报道了它的化学结构。

一叶萩碱能兴奋中枢且主要作用于脊髓,其性质类似土的宁。但是,用放射配基结合试验证明,一叶萩碱对<sup>3</sup>H-muscimol 结合位点有亲和力,用蛙(*Rana Castesbeiana*)离体灌注脊髓标本观察到,一叶萩碱能抑制 GABA 诱导的膜去极化而对甘氨酸和牛磺酸引起的膜去极化无抑制作用,这些结果表明,一叶萩碱像荷包牡丹碱一样是一种 GABA 受体拮抗剂。

已知 GABA 是一抑制性神经递质,对学习、记忆产生负面影响。药理学研究表明,D-一叶萩碱毒性低,但在跳台和避暗试验中对小鼠的记忆获得和再现过程有明显易化

---

\* 本文曾于 2001 年 7 月在法国里昂第三届中法药理学术会议上作大会报告

作用。虽然 L-一叶萩碱也有改善记忆作用，但毒性大。在电生理研究中，L-和 D-一叶萩碱能增强突触基础传递和高频刺激引起的 LTP 的幅度。

一项有趣的试验表明，静注 L-一叶萩碱  $1\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  对脊髓反射无影响，剂量增至  $5\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  能增加多突触反射和单突触反射，此兴奋作用仅维持 5min。当剂量增至  $10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时，动物的气管内高度分泌，于给药后 5~10min 内死亡。静注 D-一叶萩碱  $20\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  显著增加多突触反射并持续 40min 之久，剂量增至  $40\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ，多突触反射的幅度进一步增高，单突触反射也有明显增加，后者持续时间较短。这一结果可从代谢研究得到解释：无论在大鼠或小鼠，静脉注射或口服，D-一叶萩碱在脊髓内的含量及保留时间均高于 L-一叶萩碱。

## (二) CNS 抑制剂

灵芝被神化为是一治疗各种疾病的万能药，其实际可能性是对多种疾病具有一定程度的治疗作用。现代药理研究证明，灵芝 (*Ganoderma Leyess ex Fr*) 的孢子水溶性成分和 *G. Capense* (Lloyd) Teng 的菌丝体水溶性部分能减少自主活动，延长巴比妥睡眠时间，拮抗各种中枢兴奋药的兴奋作用，增强各种中枢抑制剂的抑制作用和改善小鼠的肝功能。上述孢子及菌丝体水溶性制备物已推荐于临床治疗进行性肌营养不良，萎缩性肌强直和某些神经系统疾病，观察到有较好的治疗效果。为解释此作用，一种除草剂 2, 4-二氯苯氧基醋酸 (2, 4-D) 用于产生动物的实验性肌强直并伴有血清醛缩酶升高，于注射 2, 4-D 之前 0.5h 腹腔注射菌丝体水溶性制备物能显著地阻止血清醛缩酶的升高。后来证明，尿嘧啶和尿核苷是防止血清醛缩酶升高的有效成分。最近，已从 *Ganoderma lucidum* (Leyes Ex Fr) Karst 分出一种多糖 B (GL-B)，分子量约为 7000~9000，GL-B 具有激活生理系统免疫活性的作用包括促进天然杀伤细胞、细胞毒淋巴细胞、IL-2、L3T4<sup>+</sup> 和 Lyt<sup>2</sup> 细胞亚型及许多其他细胞因子。灵芝多糖与化疗或放疗合用可增强肿瘤病人的治疗效果。

## 二、抗胆碱药

在我国青海、西藏高原的当地人民使用莨菪类植物 (*Scopolia tangutica Maxim*) 缓解解疼痛，过量导致阿托品样的中毒症状。已从这一植物的地上部分分离出一种新的生物碱——山莨菪碱 (anisodamine)，其化学结构与阿托品的差异仅是托品环的 6 位上多一个羟基。

实验研究表明，山莨菪碱的中枢作用是阿托品的  $1/25 \sim 1/6$ ，给麻醉猫服用大剂量 ( $20\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) 山莨菪碱几乎不引起兴奋，而阿托品  $2 \sim 3\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  注射就能引起兴奋。实验结果也指出，山莨菪碱对唾液腺分泌的抑制作用明显小于阿托品，二者均可扩大小鼠的瞳孔，但阿托品所用剂量是山莨菪碱的  $1/10$ 。山莨菪碱在小鼠的毒性也小于阿托品。临床上山莨菪碱用于治疗各种感染性 (如中毒性细菌性痢疾、暴发性流脑、中毒性肺炎和出血性肠炎等) 休克，配合其它治疗措施，可显著降低死亡率。其主要机制是改善内脏微循环。

近年来的重要发现是托品生物碱类用于吗啡成瘾的治疗，用放射免疫试验发现尿中吗啡排出增加，从临床上 147 例海洛因成瘾患者证明，治疗组尿中吗啡阴性反应率达到 98%，几乎所有病人的撤退症状均消失。

樟柳碱 (anisodine) 是从山莨菪类植物分离出的另一新生物碱, 其化学结构与东莨菪碱区别在于托品酸分子上多一个羟基。樟柳碱的中枢作用弱于东莨菪碱而接近阿托品。在相同剂量下, 樟柳碱、山莨菪碱能拮抗有机磷农药如 DFP、敌百虫和 E605 的毒性, 而樟柳碱在三者中的拮抗作用最显著。静脉注射阿托品的毒性最大, 山莨菪碱、东莨菪碱和樟柳碱的毒性依次降低。樟柳碱临床上用于治疗偏头痛和由于血管痉挛所致的眼底病变以及有机磷农药中毒的解救; 樟柳碱也用于晕机、晕车等, 有较好效果。

### 三、用于心、脑血管疾病的药物

对急性脑卒中的治疗, 重要的是尽快恢复缺血区的血液供应和保护神经元免遭延迟性神经元损伤。一种有效药物的作用靶点应置于神经元损伤和死亡有关过程。干预脑缺血病理生理过程相关的药物如钙拮抗剂、EAA 拮抗剂、自由基清除剂等, 已在临床广泛使用, 但是这些治疗药物的成功率低。T-PA 是一种溶栓药已用于临床治疗发病 3h 内的急性脑卒中, 但治疗窗超过 3h 便存在严重出血并发症。至今, 极少药物能有效地用于临床治疗急性脑缺血性卒中, 因此, 开发治疗脑卒中的新药十分重要。芹菜甲素 1-NBP (1-3-n-butyphthalide) 是从芹菜籽分离出的一种化合物。合成的消旋 NBP (dl-3-n-butyphthalide) 已作为抗脑缺血药进入临床Ⅲ期, 采用双盲、随机和安慰剂对照方法对其疗效进行评价, 数以百例的临床试验结果表明, NBP 具有良好效果。NBP 的抗脑缺血作用及其作用机制总结如下: NBP 能改善中脑动脉结扎大鼠的脑能量代谢, 减少脑梗死面积、脑水肿和神经症状, 也能改善 MCAO 和 SAH 模型鼠的局部脑血流量以及延缓 SHRSP 大鼠的生存时间和改善其神经症状。关于其作用机制: (1) 改善脑微粒体功能如增加复合体Ⅳ活性、膜流动性和膜电位以及抑制细胞色素 C 的释放; (2) 减低由缺氧、缺糖或 thapsigargin 引起的细胞内钙的升高; 膜压钳试验证明 NBP 是一钙通道阻滞剂; (3) 增加培养中牛内皮细胞内 cNOS 活性、NO 和 PGI<sub>2</sub> 含量。总之, NBP 作用机制研究结果可解释其神经保护作用 and 微循环的改善作用从而达到抗脑缺血目的。

从 *Menispermum dauricum* DC 分得的四氢异唑啉类被证明能阻断 L-型钙通道, 其中的汉防己碱和 (-) 蝙蝠葛苏林碱 (daurisoline) 已用于临床治疗高血压。(-) 蝙蝠葛苏林碱有与汉防己碱相似的结构, 但其作用方式不同于汉防己碱与异搏定, 其实验依据是: 乙酰胆碱引起 cGMP 积累的这一作用, 因无钙溶液中予温育或去内皮制备而取消。(-) 蝙蝠葛苏林碱能抑制乙酰胆碱引起的血管松弛和 cGMP 的积累, 而异搏定不影响乙酰胆碱引起的血管反应。在另一实验中, (-) 蝙蝠葛苏林碱能选择性和有效地拮抗平滑肌中钙通道活性。

### 四、抗肿瘤药

对数千种植物样品进行筛选, 发现下述化合物对啮齿类动物肿瘤有肯定的抑制作用: Hainanolid, taxol (紫杉醇), vinblastine (长春花碱), vincristine (长春新碱), camptothecin (喜树碱), 10-hydroxycamptothecin (10-羟基喜树碱), colchicines (秋水仙碱), harringtonine (三尖杉酯碱), homoharringtonine (高三尖杉酯碱), sophocarpine (异苦参碱), monocrotaline (农吉利碱), indirubin (靛玉红), rubescensin (冬凌草素) nitidine chloride (氯化两面针碱), tetradrin, curcumol (姜黄醇), curdione (莪术二酮),



aritolone, matridine (苦参次碱), ginsenoside RH<sub>2</sub> 和 ginsenoside Rg<sub>3</sub> (人参皂苷 RH<sub>2</sub> 和 Rg<sub>3</sub>)。

从植物青黛 (*Indigofera tinctoria*) 分得的靛玉红 (indirubin) 被证明是一抗癌物, 从 indigo 和 indoxyl 为中间体经二步反应合成出靛玉红, 药理研究证明, 靛玉红能抑制大鼠 Walker 癌肉瘤和小鼠 Lewis 肺癌, 临床应用, 靛玉红治疗慢性粒细胞性白血病在脾脏缩小和获得最大治疗效应所需的时间与马利兰 (myleran) 相同, 优点是不抑制骨髓。其主要副作用是刺激胃肠道导致腹痛和出血, 甲异靛 (methyloindigotin) 是靛玉红的一种衍生物, 它对白血病的抑制作用明显优于靛玉红且无胃肠道刺激作用, 现已投放市场取代靛玉红。

一系列研究指出, 靛玉红抑制慢性粒细胞性白血病病人以及移植性动物肿瘤细胞内 DNA 的合成, 主要是阻断 DNA 的多聚化而不影响前体的合成, 也不抑制蛋白质生物合成。故靛玉红的作用靶点是 DNA 生物合成代谢系统。甲异靛则不但抑制 DNA 生物合成, 也抑制微管蛋白。

## 五、抗痴呆药

现已在临床用于轻度至中度早老性痴呆 (AD) 的药物包括他克林 (tacrine) 多奈哌齐 (donepezil, E2020) 和其它乙酰胆碱酯酶抑制剂。他克林的临床有效量少自 80mg · d<sup>-1</sup> 大至 120mg · d<sup>-1</sup> 以上。但其毒副作用为胃肠道反应, 严重的肝功能异常限制了它的临床应用。E2020 优于他克林之处是每天用药一次, 无显著的肝脏毒性。石杉碱甲 (Huperzine A) 是从 *Huperzia serrate* 分得的一种生物碱, 是一作用强、可逆性的胆碱酯酶 (Ach E) 抑制剂, Huperzine A 抑制 Ach E 的作用强度较小于 E2020, 但强于他克林, 毒扁豆碱和加兰他敏。因 Huperzine A 抑制 Buch E 所需剂量高, 故其选择性优于 E2020。Huperzine 已在多种模型上被证明是一有效的增加认知功能的药物, 临床研究说明, Huperzine A 0.03 ~ 0.05mg 能增加老年人、血管性痴呆和 AD 病人的记忆商, 外周胆碱副作用小。

黄皮酰胺 (clausenamide) 存在于植物 [*Clausena lansium* (Lour)] 中的形式是消旋体 (±)。现已合成成功并拆分为 (-)-黄皮酰胺和 (+)-黄皮酰胺。(-)-黄皮酰胺 (5、10mg · kg<sup>-1</sup>, 口服) 在改善樟柳碱和环己烯亚胺所致记忆障碍的剂量是脑复康 (500mg · kg<sup>-1</sup>) 的 1/100 ~ 1/50; (+)-黄皮酰胺无效。在麻醉和清醒大鼠 (-) 黄皮酰胺 (1 ~ 4nmol 静注或 8、40mg · kg<sup>-1</sup> 口服) 剂量依赖性地增强突触基础传递和高频刺激引起的 LTP 的幅度, 静注 (+)-黄皮酰胺 4nmol 无影响甚至产生抑制作用。脑复康 20nmol 既不增加群峰电位也不加强高频刺激引起的 LTP。(-) 黄皮酰胺改善记忆和增强 LTP 的作用机制是: (1) 适度增加细胞内钙和钙依赖性及非钙依赖性地释放谷氨酸; (2) 加强中枢胆碱系统功能包括脑内乙酰胆碱含量及胆碱乙酰转移酶活性的增加; (3) 增加脑内蛋白质合成和神经营养因子 BDNF 的表达; (4) 给断乳小鼠口服 (-) 黄皮酰胺 4 周剂量为 5 ~ 10mg · mg<sup>-1</sup>, 能增加动物脑皮层厚度和海马区锥体细胞层的突触密度。给成年鼠口服 8 和 40mg · kg<sup>-1</sup> (-) 黄皮酰胺 10 天, 能增加齿状回和 CA<sub>3</sub> 区苔藓纤维末梢发芽数。研究和比较了 (-)-黄皮酰胺和 (+) 黄皮酰胺对 Aβ<sub>25-35</sub> 所致空间辨别障碍的影响, Morris 水迷宫测试结果表明, 从脑室内注射凝聚态 Aβ<sub>25-35</sub> 后第

8 天开始口服 ( - ) 黄皮酰胺 8 和  $40\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 能显著减轻空间学习记忆障碍, ( + ) 黄皮酰胺和脑复康均无效。AD 的特征之一是因神经元凋亡而致神经细胞丢失, 从而引起脑功能的退化, Bcl-2 相关家族的蛋白分子或促进和抑制细胞凋亡。采用三种凋亡模型包括自己建立的 Bax  $\alpha$  高表达的 PC12 细胞株用于研究 ( - ) 黄皮酰胺的抗神经细胞凋亡作用。结果证明, ( - ) 黄皮酰胺  $10^{-5} \sim 10^{-7} \text{mol/L}$  能显著减少细胞凋亡数, 其可能的机制是抑制 Bax、c-myc 和 p53 的表达, 促进 Bcl-2 的表达和增加线粒体膜电位、复合体 I、IV 活性以及抑制细胞色素 C 的释放。

## 六、作用于肝脏系统的药物

中药五味子 (*Fructus schizandrac*) 是一种固涩滋补药, 20 年前临床上用其粉剂或蜜丸治疗某些病毒性及化学性肝损伤, 特别是降低血清转氨酶作用明显, 根据临床这一发现, 遂进行了详细的化学和药理研究。

用于药理学研究的三种肝损伤模型分别由  $\text{CCl}_4$ 、硫代乙酰胺、乙炔雌二醇环戊醚产生, 五味子果仁的醇提取物 (AEKFS) 能降低上述三种化学药品引起的 SGPT 的升高, 减低  $\text{CCl}_4$  所致肝脂肪堆积和肝损伤程度, 增加糖原生成和血清蛋白质的合成。化学家从 AEKFS 分出 7 种活性成分: 五味子甲素、五味子乙素、五味子丙素、五味子醇甲、五味子醇乙、五味子酯甲、五味子酯乙, 其中的五味子丙素、五味子醇乙、五味子酯甲与乙为新成分, 所有 7 种成分如同 AEKFS 一样具有多方面的药理作用, 五味子醇降低 SGPT 作用最强。在合成一系列五味子丙素的类似物中, 联苯双酯或 DDB (dimethyl-4, 4'-dimethoxyl-5, 6'-dimethylene, dioxybiphenyl-2, 2'-dicardsoylate) 被证明有很好的治疗慢性肝炎作用, 20 世纪 80 年代末, DDB 出口至韩国和印度尼西亚, 最近出口到埃及等国。双环醇 (bicycol) 是 DDB 的衍生物, 去年被国家药品监督管理局批准为一类新药。

双环醇具有明显的肝保护和一定的抗肝炎病毒作用, 口服剂量  $50$ 、 $100$ 、 $200\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  能保护因  $\text{CCl}_4$ 、D-氨基半乳糖胺、乙酰氨基酚和卡介苗 + 脂多糖 (LPS) 引起的肝损伤, 表现在 ALT 和 AST 的降低及肝组织形态损伤的改善, 双环醇体外给药对 2. 2. 15 细胞株分泌 HbeAg 和 HbsAg 有抑制作用, 对鸭病毒性肝炎血清和肝脏的 DHBV-DNA 有显著抑制作用, 还能保护肝细胞核 DNA 免疫性损伤和减少细胞凋亡的发生。已完成 I 期、II 期和 III 期对乙型肝炎治疗作用的观察。多中心、双盲、随机和安慰剂对照试验 ( $n=269$ ) 结果表明, 经双环醇治疗 3 个月后, 绝大多数 ALT 的升高均降至正常范围内。停药 3 个月之后, 70% 病人的血清 ALT 和 AST 水平仍在正常限内, 具有 HbeAg 和 HBV-DNA 阳性的 20. 8% 和 39. 0% 的病人接受双环醇治疗 6 个月后变成阴性, 停药 3 个月后, HbeAg 和 HBV-DNA 阴性率增至 29. 0% 和 45. 7%。总之, 双环醇是治疗慢性乙型病毒性肝炎有良好前景的新药。

## 七、抗 氧 剂

从中药中分离的许多化合物均有抗氧化活性, 最有效的当属从中药丹参分出的丹酚酸 A 和 B。丹酚酸 A 和 B 能抑制 NADPH-维生素 C 和  $\text{Fe}^{2+}$ -半胱氨酸引起的脑、肝、肾微粒体脂质过氧化反应。该 2 种化合物的抗氧化活性比维生素 E 强 100 ~ 200 倍。丹酚酸 A 和 B 能显著降低氧自由基和羟基自由基的形成。

采用大鼠中脑动脉闭塞模型 (MCAO), 静注丹酚酸 B  $10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  能减轻神经缺失症状, 减少梗死面积、水含量和翻转 SOD、GSH、ATP 的降低和 MDA 与 LA 的增多, 特别是增加线粒体 P/O 比值、复合体 I 与 IV 的活性。线粒体在细胞凋亡中至为关键。由缺血或其它损伤引起线粒体屏障功能的丧失, 会导致细胞色素 C 的释放, 进而激活 Caspase 导致细胞凋亡。研究证明, 3、6、 $10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的丹酚酸 B 对脑缺血所致的线粒体膜肿胀、膜电位降低和细胞色素 C 释放增多等改变均有明显的逆转作用。丹酚酸 B 还能抑制皮层 Caspase-3 mRNA 和活化的 Caspase-3 蛋白的高表达。因而, 脑缺血-再灌注引起的神经元凋亡受到明显地抑制。此外, 丹酚酸 A 和 B 对脑缺血-再灌注所致学习、记忆障碍和心脑缺血-再灌注所致的心室纤维震颤均有明显改善作用。

$\beta$ -淀粉样肽 ( $\text{A}\beta$ ) 是 AD 病人老年斑的主要成分, 研究证明只有凝聚态、纤维丝状的  $\text{A}\beta$  具有神经毒性。抑制纤维形成被认为是减缓 AD 发病过程的可能途径之一。研究证明, 置  $\text{A}\beta_{1-40}$  于  $25^\circ\text{C}$  30h 后, 出现凝聚和纤维形成, 温孵时间延长, 纤维形成增多, 加入丹酚酸 B  $10 \sim 100\text{nmol/L}$  于第 30h 可完全防止纤维形成。在第 48h 和 100h 也有明显的抑制纤维形成的作用。研究还证明,  $\text{A}\beta_{1-40}$  和  $\text{A}\beta_{25-35}$  均引起 PC12 细胞和 PC12-PS2NH1411 细胞 (早老素 2 高表达 PC12 细胞株) 凋亡, 丹酚酸  $1 \times 10^{-8} \sim 10 \times 10^{-6}\text{mol/L}$  能显著抑制细胞凋亡。为了解其抗凋亡机制, 观察到丹酚酸 B 在抗凋亡剂量下能抑制两种细胞株 Par-4 的表达和降低细胞内钙、ROS 和 MDA。如同在脑缺血-再灌注模型上所观察到的, 丹酚酸 B 能明显改善  $\text{A}\beta$  所致的线粒体损伤。

## 八、人 参 研 究

人参被称之为“百草之王”, 是一滋补强壮药, 人参及其皂苷成分尤其是  $\text{Rg}_1$  和  $\text{Rb}_1$  具有广泛的生物学活性。已证明人参提取物和  $\text{Rg}_1$ 、 $\text{Rb}_1$  能改善记忆全过程和各种记忆缺失剂所致的记忆障碍, 其作用机制是多重的, 如  $\text{Rg}_1$  和  $\text{Rb}_1$  增加脑内蛋白质合成和血浆中 ACTH 水平。对 7 种中枢神经性递质受体 ( $\alpha_1$ 、 $\alpha_2$  和  $\beta$  肾上腺素受体, DA、5-HT、GABA 和 M-胆碱受体) 均不呈现特异性结合, 但连续腹腔注射  $\text{Rg}_1$  和  $\text{Rb}_1$  5 天后, M-胆碱密度大大增加。与此同时, 脑内乙酰胆碱含量增加。突触是神经系统的基本结构, 在神经间传递、加工和整合过程中起重要作用。给刚断乳幼鼠喂服  $\text{Rg}_1$  和  $\text{Rb}_1$  4 周后, 脑重、脑皮层厚度和海马突触数均明显增加。对阐明其促智作用机制提供了形态学依据。

细胞凋亡或程序性细胞死亡 (PCD) 调节失控是肿瘤、艾滋病、自身免疫性疾病和 AD 以及 CNS 其他退行性疾病发病的部分原因, 我国药理学家首次证明  $\text{Rg}_1$  是一抗神经细胞凋亡剂并证明其作用机制与降低细胞内钙、增加 SOD 活性、减少 NO 含量及 NOS 活性、增加 bcl-2 表达有关。把 24 ~ 27 月龄老年鼠与撤血清致皮层细胞凋亡的研究进行比较, 得到了相同的结果。

现代社会竞争激烈, 各种应激引起的疾病与促进衰老日益严重, 但对抗应激药物的研究甚少。研究证明, 重复或慢性应激能损伤学习、记忆和性功能, 降低血中性激素和增加血中肾上腺皮质激素水平。 $\text{Rb}_1$  2.5、5、 $10\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  能改善学习记忆和性功能 (接近、跨骑与交配行为增多), 增加血中性激素和降低血中肾上腺皮质激素水平, 慢性应激引起的其他后果是去甲肾上腺素和兴奋性氨基酸的释放增加, 脑内神经营养因子

BDNF和NF-3表达的降低。这些改变均与脑的退行性病有关，称之为拟老化反应。Rb<sub>1</sub>能抑制去甲肾上腺素的释放和增加BDNF与NT-3的表达。

已知老化伴有T细胞功能的降低，采用24~27月龄老年鼠进行的研究表明，无论是体外或体内试验，Rg<sub>1</sub>能增加淋巴细胞增殖和IL-2的产量，Northern和Western印迹法证明，Rg<sub>1</sub>增加IL-2 mRNA和蛋白的表达，也增加IL-2受体(α链)的表达，Rg<sub>1</sub>之所以能选择性地改善老年鼠免疫功能，可能是淋巴细胞内cAMP和cGMP增加的结果。

骨质疏松症是一老年病，在绝经期及绝经后妇女的发生率尤高，雌激素替代治疗虽有一定效果，但担心肿瘤的发生和子宫内膜增生。

卵巢切除(OVX)是研究绝经后骨质疏松的一个可供评价骨密度和其他生化改变的有效模型。切除卵巢6个月后的大鼠椎骨、胫骨等骨密度降低，骨小梁减少，骨窝陷增大，长期服用雌激素虽有一定效果但作用不明显，人参总皂苷及Rg<sub>1</sub>在改善骨质疏松，促进成骨细胞增殖等方面有显著的作用。骨成型蛋白-7(bone morphogenetic protein-7, OP-1)是TGFβ超家族成员之一，在骨骼发育的分化调节中起重要作用，骨质疏松症患者的OP-1在肾、脑和其他组织中的表达很低，在OVX大鼠也见到此现象，人参总皂苷能增加肾脏和脑内OP-1的表达，人参总皂苷和Rg<sub>1</sub>还能增加成骨细胞内碱性磷酸酶及cAMP的含量，有助于解释人参皂苷的抗骨质疏松作用。

国内有关人参研究的新发现还有许多，限于篇幅在此不赘。

## 九、抗 疟 药

广东民间使用鹰爪植物(*Artabotrys hexapetalas*)治疗疟疾。中国化学家从此植物分离出2个新化合物——鹰爪素甲和乙，抗疟试验结果显示鹰爪素A的作用强于鹰爪素B，少量临床病例也证明有效。有趣的是该化合物含有在天然产物中罕见的过氧基团。无独有偶，后来从*Artemisia annua* L分得的青蒿素也是一个含过氧基团的化合物。

2000年前，从长沙出土的汉代(公元前206年至公元后220年)墓中的“五十二方”中就记载有这一植物。这一药物首次作为抗疟药收集在金代(265-420)的医学著作中。根据WHO的统计，疟疾是一严重的传染性疾病，世界上超过5亿人感染疟疾，其中1亿是儿童。有效的抗疟药于20世纪40年代发现，但因抗氯喹和抗其他药物疟原虫的出现，使现有药物很难治愈疟疾，青蒿素及其衍生物artemisinin和artemether是具有作用快、高效和低毒的抗疟药。用于恶性疟特别是脑型恶性疟效果好。其抗疟机制是化合物中的过氧基团与含于红细胞的Fe<sup>2+</sup>反应生成自由基，结合到疟原虫上的受体，导致疟原虫死亡。

## 十、抗艾滋病药物

911从褐藻中分得并经化学修饰，是一含有一定比值的1,4-相连β-D-甘露糖醛酸与α-L-古洛糖醛酸的硫酸多糖。

采用体内体外方法研究了海洋多糖药911的抗艾滋病作用，结果表明911抑制急性和慢性HIV-I感染MT4和H9细胞的中位浓度分别是4.44g·ml<sup>-1</sup>和0.32g·ml<sup>-1</sup>。体内研究证明，口服911 64和320mg对SIV-感染猴的病毒滴度和RNA的复制均有明显抑制作用。观察到911对CD4<sup>+</sup>细胞的保护作用 and 增加抗体活性。随后，研究发现911可显

著干扰 HIV-1 在 MT4 细胞上的吸附和抑制 HIV-1 逆转录酶活性。这些发现指明, 911 能在体内外抑制艾滋病毒的复制是由于阻断了病毒在宿主细胞上的吸附, 干扰了逆转录酶的活性和提高了免疫功能。911 现已进入临床试用。

(因限于篇幅, 本文以化学结构为主的图表和 121 篇参考文献均省略)

# 孤儿 G 蛋白偶联受体研究策略 ——功能基因组研究的成功范例\*

李菊香 唐朝枢

(北京大学医学部生理学和病理生理学系 北京 100083)

随着人类基因组计划的顺利完成,公布了基因组静态的几乎全部碱基序列,推动了世纪之交的生物学走向以功能基因组学(即基因组动态的生物学功能的研究)为标志的后基因组时代,从根本上改变了传统的生物学思维模式<sup>[1]</sup>。功能基因组研究的目标,主要是应用生物信息学方法,高通量地注释基因组所编码产物的生物学功能,该领域已成为后基因组时代的研究热点<sup>[1]</sup>。后基因组研究的内容主要包括3个层次:基因组组成元素的识别;注释所有的基因组编码区或称“开放阅读框架”和基因之间的相互作用及比较基因组学的研究<sup>[2]</sup>。G 蛋白偶联受体(GPCR)是一类非常重要的细胞膜表面受体,约占人类基因组的3%<sup>[3,4]</sup>。孤儿 G 蛋白偶联受体(oGPCRs)系指尚未找到天然配体的 GPCRs<sup>[3]</sup>。在仅知道 GPCR 基因序列的情况下,用高通量的方法分离出相应的天然配体,谓之孤儿受体策略(Orphan receptor strategy)。后者代表一种成功的功能基因组研究方法,使经典的配体-受体-功能的研究模式发生了重大转变。1987 年, Kobilka 等在《Nature》撰文,发表其发现的第一个 oGPCR,其后, Fargn 等证明该受体的配体为 5-HT<sub>1A</sub><sup>[5]</sup>。因对 oGPCR 的研究意味着发现其尚未了解的内源性配体,对生命科学的研究和发展具有深远的影响,故 oGPCRs 的研究渐成后基因组时代功能基因组学研究的热点之一<sup>[3,7]</sup>。在研究的较短时间内发现、分离和鉴定了许多孤儿 G 蛋白偶联受体及其内源性配体,而且随着对孤儿受体的研究进展,对受体-配体作用的模式的认识也发生了改变,如细胞质膜受体识别配体的特异表型,不仅决定于受体的结构,而且还与膜上某些调节蛋白的功能有关。oGPCRs 研究策略是目前功能基因组研究取得重大进展的成功范例,本文就 oGPCR 研究的方法、特点和新发现作一简介,以阐述后基因组时代的受体研究和认识受体识别配体的新模式。

## 一、孤儿 G 蛋白偶联受体及特征

GPCRs 家庭成员都具有 7 个  $\alpha$  螺旋的跨膜域(TMs),N-端游离于细胞膜外侧,C 端位于细胞浆内。根据 GPCRs 与相应配体作用的性质可主要将其分为 A、B 和 C 三型,其中 A 型与视紫质有关,B 型与钙调蛋白有关,C 型与有代谢倾向的受体相关<sup>[3]</sup>。特异配体与 GPCRs 结合后,通过诱导组成 G 蛋白的  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  三个亚单位所形成的异源三聚体的变化来激活细胞内的信号通路。其中, $\alpha$  亚单位分子量为 39~46kD, $\beta$ 、 $\gamma$  亚单位通常组成紧密的二聚体,共同发挥作用<sup>[3,4,6]</sup>。大多数 oGPCRs 在细胞内介导的信号转

\* 本文曾在 2001 年 12 月全国心血管基础与临床研究年会上报告

导机制尚不清楚<sup>[3,8]</sup>。目前已从公用数据库中分离出 300 个左右的完全开放式阅读框架,可编码 GPCR 超家族成员,其中的 191 个可被约 70 个已知的配体激活,归为已知的受体;108 个为 oGPCRs<sup>[3]</sup>。根据人类基因组核苷序列,预计可发现 200~500 个 oGPCRs<sup>[3]</sup>。现在,已可通过应用序列标记表达分析 (EST)、低严格杂交筛选和退化性多聚酶链反应 (PCR) 等基因组测序计划所采用的技术来分离和鉴别 oGPCRs<sup>[3,4,6]</sup>。

oGPCRs 与 GPCR 有共同的结构特点,但是 oGPCRs 的相关配体未知,功能不确定<sup>[3,4,6]</sup>,与已知的 GPCRs 间氨基酸序列的同源性一般不到 45%<sup>[3]</sup>。oGPCRs 与 GPCRs 相同,除了具有 7 个疏水  $\alpha$  螺旋跨膜区段外,还具有以下结构特点<sup>[1,2,3]</sup>:(1) 在起始的两个胞外环上有一个保守的半胱氨酸残基,可能与受体的稳定性有关;(2) 在其跨膜域 3 (TM3) 的下游可发现有 GPCR 标志性的三联序列 (典型的为 DRY),该序列与 GPCR 和 G 蛋白之间的相互作用有关;(3) oGPCRs 胞外 N 末端有糖基化位点,但磷酸化和棕榈酰化位点定位于胞内的 C 末端,后二个位点与受体通路和信号的转导有关;(4) G 蛋白异源三聚体 (由  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  亚单位组成) 的功能是将与细胞膜结合的 GPCRs 和细胞内效应分子联系起来。G 蛋白可因  $\alpha$  亚单位的不同分为 4 个家族<sup>[1,2]</sup>:  $G_s$ 、 $G_i$ 、 $G_{q/11}$  和  $G_{12/13}$ 。受  $G\alpha$  调控的主要有腺苷酸环化酶 ( $G_s$  介导激活效应,  $G_i$  介导抑制效应)、磷脂酶 C (PLC) ( $G_{q/11}$  介导激活效应) 和  $K^+$  通道 ( $G_i$  介导激活效应)。此外,  $G\beta$  和  $G\gamma$  异源二聚体亚单位也有调节功能,可激活 PLC<sup>[3]</sup>。当相应的配体与 GPCR 结合后, GPCR 激酶 (GRK) 成员将其 C 末端磷酸化,磷酸化的 GPCRs 可与视紫红质抑制蛋白 (arrestine) 结合,而终止由 GPCR 介导的细胞反应<sup>[3]</sup>。

## 二、孤儿 G 蛋白偶联受体策略

### (一) 克隆候选 oGPCR 和分离其特异配体

根据候选 oGPCR 的基因序列,先从 cDNA 文库中找出其基因编码,再克隆出相应的 oGPCR,然后采用不同的方法分离其内源性配体<sup>[6,7,9,10,11]</sup>。(1) 用已知受体的配体检验高度相关的 GPCRs (氨基酸组成序列的同源性显示其相关程度),如用 Edg1 受体的激动剂鞘氨醇-1-磷酸 (S1P) 检验新分离出的 Edg3 和 Edg5 受体,发现二者均为 S1P 相关受体,氨基酸序列的同源性在 50% 以上<sup>[11]</sup>。(2) 明确 oGPCR 的基因表达方式和已知配体基因表达方式之间的关系,以便将候选的 oGPCR 基因与已分离出的受体相匹配。这种方法发现了孤儿受体 RDC7 和 RDC8 的配体为腺苷  $A_1$  和  $A_{2A}$ <sup>[3]</sup>。(3) 通过功能分析检测各种组织提取物,可指导配体的分离、纯化和分子特性的研究。用这种方法发现的配体有 Nociceptin、Hypocretin、Apelin/催乳素释放激素和 Ghrelin 等<sup>[7,12]</sup>。(4) 在试图寻找 oGPCRs 配体时,可首先用受体家族的已知配体来评估其与 oGPCRs 的相互作用<sup>[3]</sup>。

### (二) 确定 oGPCRs 的功能——孤儿受体策略

以孤儿受体作“诱饵”,寻找新配体的方法称孤儿受体策略<sup>[3,4,6,7,10,11]</sup>。其原理为将克隆的孤儿受体基因转染到载体细胞内,载体细胞表达出的受体暴露于可能含有其天然配体的组织提取物,如果组织提取物中具有所表达受体的特异配体,则配体与受体相互作用诱导产生细胞内第二信使,载体细胞内第二信使的水平可作为监测孤儿受体的配体纯化的参数。因组织提取物的成分较复杂,其它的非配体分子也可诱发载体细胞产生

第二信使效应，这部分效应可参照未转染孤儿受体基因的载体细胞与组织提取物间的第二信使效应（本底）并从中扣除。孤啡肽（orphanin）的发现便是孤儿受体策略成功的例子之一<sup>[6,7,12,13]</sup>。

oGPCR 策略需要建立一种高通量的筛选方法，该方法应该与主要的细胞内信号转导途径（例如腺苷酸环化酶、PLC、磷脂酶 A<sub>2</sub>、钾离子通道、cGMP 磷酸二酯酶）或与细胞代谢无关（不论表现为激活还是抑制），但可从中获得配体受体活化的信息。至今尚未能建立这种理想的高通量分析方法，目前使用一种显微生理测量仪，可通过检测哺乳动物细胞利用能量时胞外基质的酸化程度，鉴定 oGPCR 相应的配体<sup>[14]</sup>。由于所有信号的转导途径均导致能量的消耗，故该法不需确定胞内信号转导机制。oGPCR APJ（即 Apelin）的配体和哺乳动物的 RF-胺肽类即是用该方法鉴定出来的<sup>[14]</sup>。

现今用于识别配体的主要检测手段为分析 PLC 活化后的细胞内 Ca<sup>2+</sup> 浓度的变化<sup>[3,6]</sup>，这种方法稳定性较高，并可实现自动化检测（细胞内信息经大幅度放大后信噪比仍然较高）和高通量能力（自动检测，96 ~ 384 孔板的分析能力）。具体方法有：（1）荧光成像阅读器法（FLIPR）<sup>[15]</sup>，目前已用该法发现 8 个 oGPCRs<sup>[6]</sup>。（2）细胞可视技术（Cell visualization）<sup>[3,9]</sup>，已发现 3 个 oGPCRs<sup>[3]</sup>。（3）水母素发光法<sup>[16,17]</sup>，检测这种对钙敏感的受体蛋白的发光情况，发现了 4 个 oGPCRs<sup>[3]</sup>。（4）爪蟾卵母细胞法<sup>[18]</sup>，用电生理方法检测，发现了 2 个 oGPCRs<sup>[3]</sup>。（5）利用磷脂酶 A<sub>2</sub>（PLA<sub>2</sub>）-Ca<sup>2+</sup> 途径识别配体，通过采用花生四烯酸释放法测定放射性配体与 oGPCRs 结合后的放射性活性，筛选其特异配体。现已用该法发现 2 个 oGPCRs<sup>[3]</sup>。（6）利用腺苷酸环化酶途径所引起的 cAMP 变化来识别配体的方法已发现 5 个 oGPCRs<sup>[3]</sup>。（7）对 G 蛋白门控型内向矫正型钾离子通道（GIRK K<sup>+</sup> Channel）的研究<sup>[13]</sup>可采用爪蟾卵母细胞分析法，记录钾离子内流的电生理变化筛选 GPCR 的配体，用该法发现了 2 个 oGPCRs<sup>[3]</sup>。此外，尚有酵母 LacZ 受体分析法<sup>[19]</sup>，用该法已分离出 KIAA0001，但其介导的信号转导途径不明。

应用上述技术在方法学上取得了重大进展。其一，在研究 PLC-Ca<sup>2+</sup> 信号通路时，发现宿主细胞 G 蛋白补体的表达既可增补 PLC 的活化和动员胞内 Ca<sup>2+</sup>，也可用以调控胞内信号通路<sup>[3]</sup>；其二，天然形成的杂合 Gα 蛋白（G<sub>15</sub> 和 Gα<sub>16</sub>）和嵌合 Gα 亚单位（Gα<sub>q5</sub>）中，G<sub>q</sub> 亚单位的 5 个 C'-末端氨基酸可被与腺苷酸环化酶相连的 G<sub>i</sub> 亚单位上的相应氨基酸所取代，这种杂合 Gα 蛋白和 Gα<sub>q5</sub> 有利于分析 G 蛋白功能<sup>[3]</sup>。其三，Gα<sub>q</sub> 家族亚单位的补体 G<sub>q11</sub> 可用于检测生长激素促分泌素（GHs）或 Ghrelin 受体<sup>[4]</sup>。有报道采用嵌合 G 蛋白的 Ca<sup>2+</sup> 分析法鉴别出黑色素浓集激素受体<sup>[18]</sup>。

### （三）医学生物学发展新模式

1. oGPCRs 与反向生理学 利用已表达的功能性孤儿受体对已知的生物活性物质进行筛选，或用于纯化各种组织中的肽类，对其功能进行研究，这种研究策略被称为“反向生理学”。即从克隆的受体开始研究，最终达到阐明激素和递质的生理功能的目的<sup>[7,12,13]</sup>。采用反向生理学分离出的第一个肽与阿片肽非常相似，但具有镇痛效应，命名为孤啡肽（Orphanin FQ）或 Niciceptin（OFG/NOC）。从已知受体去发现和分析配体生理学功能已成为一种新研究模式<sup>[7,12]</sup>。Birgul 等<sup>[13]</sup>采用从哺乳动物生长抑素受体的保守区域诱导所得的退化性寡核苷酸引物，发现从果蝇 *Melanogaster* 属中获得的新 G 蛋白偶联受体与哺乳动物生长抑素/促生长抑素神经肽/阿片样受体的结构相似，然后应用反



向生理学研究策略, 利用表达有果蝇孤儿受体的蛙卵母细胞分离其潜在的配体。从果蝇的头提取液中分离纯化出一种新的八肽——昆虫 allatostatin。这种肽可调控昆虫变形期保幼激素 (juvenile hormone) 的合成及内脏肌肉的收缩等多种生理功能。

2. oGPCRs 与反向药理学 传统的药理学往往在对疾病作深入研究之后, 针对疾病状况发现候选的治疗药物。反向药理学是指药物的发现先于对其作用模式和机制的了解<sup>[3,4,6,10]</sup>。因 GPCRs 是目前 50% 以上的市售药物的作用靶位, 生理功能尚未阐明的 oGPCRs 可能代表未来对疾病治疗的靶位, 具有潜在临床意义<sup>[3]</sup>。反向药理学研究途径之一便是采用 oGPCR 分离天然 (可能是未发现过的, 也可能是已发现的) 或人工合成的配体, 如果 oGPCR 对人工合成的配体所产生的生物学效应有利于疾病的改善或有致病作用时, 将有助于发现和研制有临床应用价值的候选药物<sup>[3,4,10]</sup>。传统药理学和反向药理学研究模式用下图作简要说明。

传统药理学: 疾病状态 → 内源性物质的生物活性 → 受体和/或生物学效应 → 候选药物

反向药理学: 疾病状态 → 生物学效应 → 候选药物 → 受体 → 内源性物质的生物活性

或 受体 → 内源性活性物质的主要生物活性 → 生物学效应 → 疾病状态 → 候选药物

图1 传统药理学和反向药理学的流程

3. oGPCRs 与反向药理学研究 GPCRs 潜在的临床应用价值在于可利用其分离高度选择性的内源性或非内源性药理学配体。目前对 GPCR 的研究主要集中在利用多种途径分离 oGPCRs 的内源性配体方面<sup>[3,4]</sup>, 一旦找到与 oGPCRs 的生理功能相匹配的配体, 则有可能从 oGPCRs 家族中筛选出新的药物作用靶点<sup>[3,4,6,10]</sup>。Civelli 在总结 oGPCRs 对脑功能和脑疾病研究的影响时指出, 在不一定了解新神经肽功能的情况下, 便可设计出该神经肽的化学替代物。这种方法在神经肽系统的研究中非常重要, 而且极可能发现疗效优异的新药<sup>[11]</sup>。

### 三、孤儿 G 蛋白偶联受体策略的应用

oGPCR 策略的应用在近十多年的时间内发现并克隆了大量孤儿受体, 并鉴定出其内源性配体, 发现了其重要功能。以下介绍部分成功的范例。

#### (一) G-21

1988 年, Fargin A 等利用全长  $\beta_2$  肾上腺素能受体探针, 以同源性筛选的方法进行严格杂交, 分离出含有一个无内含子的基因组克隆 G-21, 其碱基序列与肾上腺素能受体相似, 与肾上腺素受体基因的核苷酸序列有 35% 相同。猴肾细胞可短暂表达该基因组克隆的蛋白质产物, 后者具有与 5HT<sub>1A</sub> 受体结合的配体的所有特性, 说明 G-21 的配体为 5-HT<sub>1A</sub>。该受体介导的生理效应与焦虑和高血压有关<sup>[6,9]</sup>。

#### (二) RDC7 和 RDC8

RDC7<sup>[3]</sup> 于 1991 年以同源性筛选及 PCR 方法被分离鉴定, 在大脑皮层、甲状腺滤泡细胞、屏状核、扁桃腺、海马和睾丸中的表达较丰富。RDC7 的内源性配体为腺苷 A<sub>1</sub>。转染有 RDC7 的 CHO 细胞中, A<sub>1</sub> 激动剂 CPA (N<sub>6</sub>-环戊基腺苷) 可使弗司扣林 (forskolin) 激活的细胞内累积的 cAMP 下降 80%。此外尚发现转染插有 RDC7 cDNA 的 pSVL 结构的 Cos 细胞膜可与另一个重组配体 CHA (N<sub>6</sub>-环己基腺苷) 特异结合;