

·综述·

秀丽隐杆线虫在医药学领域的应用和进展

贾熙华*, 曹 诚

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

摘要: 模式生物秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 对基础生物学研究贡献卓著。随着功能基因组时代的到来, 线虫被视为可借以探明人类致病基因或致病相关因子, 寻找可能的药物靶点的强大工具。这得益于线虫的丰富的可利用生物学信息, 灵活多样的遗传学可操作性, 简易的培养维持条件, 尤其是其独特的生理特点适合于大规模化学药物的体内筛选或全基因组功能研究。本文将从新药研发的角度总结线虫的特点, 与人类基因的同源性, 讨论以线虫为技术平台的药物研发主要方法, 以及成功案例, 并探讨线虫在医药学领域的发展热点。

关键词: 线虫; 人类疾病; 药物靶点; 高通量筛选

中图分类号: Q959.17

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2009) 07-0687-08

Caenorhabditis elegans: a powerful tool for drug discovery

JIA Xi-hua*, CAO Cheng

(Institute of Bioengineering, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

Abstract: A simple model organism *Caenorhabditis elegans* has contributed substantially to the fundamental researches in biology. In an era of functional genomics, nematode worm has been developed into a multi-purpose tool that can be exploited to identify disease-causing or disease-associated genes, validate potential drug targets. This, coupled with its genetic amenability, low cost experimental manipulation and compatibility with high throughput screening in an intact physiological condition, makes the model organism into an effective toolbox for drug discovery. This review shows the unique features of *C. elegans*, how it can play a valuable role in our understanding of the molecular mechanism of human diseases and finding drug leads in drug development process.

Key words: *Caenorhabditis elegans*; human disease; drug target; high throughput screening

为研究神经系统的发育, Brenner^[1]于 20 世纪 70 年代初将秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 介绍给了生物学家, 随着人们对它的逐渐认识, 秀丽隐杆线虫以其独特的优势成为生物学家借以了解诸多基本生命现象如: 细胞分化、细胞凋亡、神经发育、性别分化和衰老等的优良工具。近年来, 秀丽隐杆线虫也获得了药物学家的青睐, 成为一个崭新的药物或靶蛋白筛选的技术平台。本文将从药物研发的角度讨论线虫作为模式生物的特点, 利用线虫进行疾病机制分析和药物筛选, 相关技术的发展与成功应用以及线虫在新药发现与人类疾病研究领域的前景。

1 秀丽隐杆线虫为什么“秀丽”

秀丽隐杆线虫 (以下简称线虫) 有许多优点: ① 容易培养。实验用线虫一般于 20℃ 培养在琼脂平板上或液体培养基中, 食物是大肠杆菌 OP50。② 繁殖快, 且多产。一只雌雄同体野生型线虫可以产出 300 个左右的后代, 若与雄虫交配, 后代数则可多达 1 000 个。20℃ 时, 野生型线虫的生长周期仅 3 d 左右, 平均寿命为 3 周。许多实验结果在 1~2 周, 甚至几天即可获得。③ 实验以动物整体为对象, 且实验规模容易放大。线虫成虫体长 1 mm, 体径 30 μm。24 孔板上的一个孔内可固体或液体培养上百条线虫, 化合物筛选容易放大到 96 孔^[2], 384 孔^[3], 甚至 1 536 孔平板^[4]。从培养板的准备, 加入待检测化合物, 试验

收稿日期: 2008-11-27.

*通讯作者 Tel: 86-10-66181481, E-mail: xihuajia@yahoo.com

用虫的种入，到最后表型的筛选或特定生化指标的测定均可以实现全/半自动化。一些人类疾病发病机制涉及细胞与组织器官间的相互作用，时间因素亦卷入病程，要在体外重建类似的非动物病理模型用以药物研究十分困难，如神经肌肉性疾病。利用生化反应，体外培养细胞或细菌/酵母的药物研究往往效率高但相关性差。线虫则能较好平衡这两方面。当药物在体内的作用靶点不止一个时，整体动物试验往往能提供更准确的评估。其他常用多细胞模式生物，如果蝇、斑马鱼、大鼠和小鼠等，用于大规模药物筛选的可操作性不强甚至不可能实现。④ 线虫身体透明。普通的解剖显微镜即可满足常规实验所需。相差显微镜，多光子荧光显微镜 (multiphoton fluorescence microscope) 等可直接观察活体、简单固定或染色后的细胞和组织，还有虫体内表达的绿色荧光蛋白 GFP。这一特点已被用于基于线虫的高通量筛选 (high throughput screening, HTS) 并获得了成功^[5]。

40 多年来，对线虫的组织、细胞及分子水平的广

泛深入的生物学研究，为其在药理学领域的应用打下了基础。线虫的遗传学操作简单易行，杂交、突变体获得、基因敲除、外源基因表达和转基因动物构建等技术方法相当成熟。通过比较基因组学方法 (comparative genomics) 推测出线虫的近 2 万个蛋白序列中 83% 有人类的同源基因^[6]，一些重要的信号传导途径也高度种间保守。人类很多遗传性疾病可以采用这个看似与人类迥异、生理组织结构等也相对简单的线虫来研究。

2 线虫基因组的保守性、与人类疾病的相关性

据人类孟德尔遗传资料库在线 (OMIM) 的最新统计数据 (截至 2008-10-03)，疾病症状明确、致病基因已锁定的人类遗传型疾病共有 2 397 种。线虫信息库 (wormbase) 中收录的人类遗传疾病同源基因 (orthologue) 至少有 809 个，该数据与 Culetto^[7]和 Rubin^[8]估计的 42% 大体一致。表 1 中列举部分突变体表型明显的线虫基因与对应的人类基因以及人类遗传性疾病。

Table 1 秀丽隐杆线虫基因及其相对应的人类疾病同源基因 (基于 wormbase WS200^[8])

线虫基因/蛋白	人类疾病/人类基因	线虫表型
<i>abl-1</i> 非受体型酪氨酸激酶	慢性髓细胞样白血病- <i>ABL 1</i>	抗志贺氏菌感染，细胞凋亡异常
<i>abtm-1</i> 线粒体 ABC 转运子	铁粒幼红细胞性贫血、脊髓小脑运动失调症- <i>ABCB7</i>	胚胎期死亡，绝育
<i>ads-1</i> 烷基二氢丙酮磷酸合成酶	肢近端型点状软骨发育不良- <i>AGPS</i>	发育停滞，胚胎期死亡
<i>atx-3</i> Ataxin 3	Machado-Joseph 病- <i>ATXN3</i>	胚胎期死亡，野生型表型
<i>apr-1</i> APC 蛋白	家族性腺瘤性息肉病- <i>APC</i>	胚胎期死亡，有丝分裂纺锤体异常等
<i>asah-1</i> N 酰基鞘氨醇酰胺水解酶	法伯脂肪肉芽肿病- <i>ASAH</i>	短寿
<i>bcs-1</i> 线粒体 ATP 酶	Bjornstad 综合征, GRACILE 综合征- <i>BCS1L</i>	胚胎期死亡，发育停滞，绝育，体透明，病态等
<i>cbp-1</i> CBP/p300 样结合蛋白	Rubinstein-Taybi 综合征- <i>CREBBP</i>	无外阴，生长缓慢，胚胎期死亡等
<i>cep-1</i> p53 样蛋白	Li-Fraumeni 综合征，肺癌等- <i>TRP53</i>	胚胎期死亡，细胞凋亡异常，对离子辐射敏感等
<i>chk-2</i> 周期检测点激酶	Li-Fraumeni 综合征- <i>CHK2</i>	胚胎期死亡，绝育，高雄虫率
<i>cpt-1, cpt-2</i> 肉毒碱棕榈酰转移酶	肉毒碱缺乏症- <i>CPT1A</i>	形态异常，胚胎期死亡
<i>csb-1</i> 转录修复因子	Cockayne 综合征- <i>ERCC6</i>	UV 诱导的细胞凋亡增加等
<i>cua-1</i> 铜离子转运 ATP 酶	Hailey-Hailey disease 病- <i>ATP7A</i>	胚胎期死亡，运动失调，生长缓慢等
<i>daf-12</i> 甾醇类核受体	抗维生素 D 佝偻病- <i>VDR</i>	短寿，dauer 形成缺陷等
<i>daf-18</i> 脂肪磷酸酶	Cowden 病，癌症- <i>PTEN</i>	生长缓慢，短寿，dauer 形成缺陷等
<i>dop-2</i> 多巴胺受体	Myoclonus-dystonia 综合征- <i>DRD2</i>	化学趋化性缺陷
<i>egl-15</i> FGF 样受体	Pfeiffer 综合征- <i>FGFR1</i>	排卵困难，生长缓慢，aldicarb 抗性等
<i>elpc-1</i> 延伸体复合物蛋白亚基	家族性自主神经失调综合征- <i>IKBKAP</i>	胚胎期死亡
<i>exc-5</i> 鸟嘌呤核苷酸交换因子	Aarskog 综合征- <i>FGD1</i>	运动失调等
<i>fbn-1</i> fibrillin 蛋白	Marfan 综合征- <i>FBN1</i>	蜕皮缺陷，运动失调，产死卵等
<i>fcd-2</i> 类贫血 D2 蛋白	范可尼贫血- <i>FANCD2</i>	排卵缺陷，细胞凋亡水平增加等
<i>gspd-1</i> 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶	贫血- <i>G6PD</i>	虫体苍白，生长缓慢，胚胎期死亡等
<i>him-6</i> ATP 依赖的 DNA 螺旋酶	Bloom 综合征- <i>BLM</i>	后代高雄虫率，后代数减少等
<i>hrp-1</i> 含 RRM domain 分子	Haw River 综合征- <i>DRPLA</i>	体长，后代数减少，外阴异常等
<i>itsn-1</i> Intersectin 分子	慢性肉芽肿- <i>NCF1</i>	Aldicarb 超敏感

续表

线虫基因/蛋白	人类疾病/人类基因	线虫表型
<i>kqt-3</i> K ⁺ 通道亚基	长 QT 综合征- <i>KCNQ1</i>	排便循环长, 吞咽循环不规则
<i>lig-1</i> DNA 连接酶	联合垂体激素缺乏症- <i>LHX3</i>	胚胎期死亡, 细胞内吞缺陷等
<i>lig-4</i> DNA 连接酶 IV	LIG4 综合征- <i>LIG4</i>	早期无丝分裂异常等
<i>lov-1</i> 离子通道亚基	染色体显性多囊肾病- <i>PKD1</i>	雄虫交配能力低, 生长缓慢
<i>lis-1</i> WD40 重复序列蛋白	无脑回畸形- <i>LIS1</i>	运动失调, 排卵困难, 发育停滞等
<i>mec-6</i> 对氧磷酶	冠状动脉疾病- <i>PON1</i>	机械刺激不敏感
<i>msh-6</i> DNA 错配修复分子	直肠癌- <i>MSH6</i>	产卵缺陷, 突变率高
<i>mrp-5</i> 多药耐药性相关蛋白	囊性纤维化- <i>CFTR</i>	Aldicarb 抗性, 表皮泡囊肿, 运动迟缓等
<i>ncr-1</i> , <i>ncr-2</i> 胆固醇转运相关蛋白	C 型 Niemann-Pick 症- <i>NPC1</i>	胚胎期死亡, 涕灭威 Aldicarb 超敏感, 后代数减少等
<i>nuo-1</i> 泛醌氧化还原酶辅酶	Leigh 综合征- <i>NDUFB1</i>	体短小, 生长缓慢, 后代数量减少等
<i>ocrl-1</i> 肌醇 3-磷酸磷酸酶	Lowe Oculocerebrorenal 综合征- <i>OCRL</i>	Aldicarb 超敏感, 氟烷抗性
<i>par-4</i> 丝氨酸/苏氨酸激酶	Peutz-Jeghers 综合征- <i>STK11</i>	Paraquat 超敏感, 无肠道等
<i>pdr-1</i> E3 泛素蛋白连接酶	青少年型帕金森病- <i>PARK2</i>	胚胎期死亡, 蛋白沉积
<i>pek-1</i> 类 eIF-2 α 激酶	Wolcott-Rallison 综合征- <i>EIF2AK3</i>	体短小, 运动迟缓, 肠内空泡等
<i>pgp-2</i> ABC 转运子	Crohn 病- <i>ABCB1</i>	虫体脂肪量减少
<i>pkd-2</i> 多囊肾病蛋白	常染色体显性多囊肾病- <i>PKD2</i>	雄虫交配能力低, 对机械刺激不敏感
<i>pmr-1</i> PMR 型高尔基 ATP 酶	Hailey-Hailey 病- <i>ATP2C1</i>	氧化应激能力降低
<i>prx-2</i> , <i>prx-3</i> , <i>prx-5</i> , <i>prx-13</i> , <i>prx-19</i> 过氧化物酶体组装蛋白	Zellweger 综合征- <i>PXMP3</i> , <i>PEX3</i> , <i>PXR1</i> , <i>PEX13</i> , <i>PXF</i>	体短小, 生长缓慢, Aldicarb 抗性
<i>pqn-85</i> Prion 样富 Q/N domain 蛋白	Cornelia de Lange 综合征- <i>NIPBL</i>	染色体分离异常, 体苍白, 运动失调等
<i>ptc-1</i> , <i>2</i> , <i>3</i> PATCHED 类膜蛋白	Basal cell nevus 综合征- <i>PTCH</i>	体短小, 运动失调等
<i>ptps-1</i> 6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶	高苯丙氨酸血症- <i>PTS</i>	5-羟色胺缺陷
<i>rad-54</i> DNA 修复因子	结肠癌, 非何杰金瘤- <i>RAD54</i>	减数分裂异常, 不育, 应激能力降低等
<i>ref-2</i> 细胞融合调节因子	前脑无裂畸形- <i>ZIC2</i>	外阴突起, 运动失调, 绝育, 排卵困难等
<i>rrpy-1</i> 乙酰胆碱受体相关蛋白	Congenital Myasthenic 综合征- <i>RAPSN</i>	Levamisole 反应缺陷, 体内脂肪量增高
<i>sbds-1</i> 核仁蛋白	Shwachman-Bodian-Diamond 综合征- <i>SBDS</i>	短寿
<i>sca-1</i> 肌浆网钙 ATP 酶	Brody 病- <i>ATP2A1</i>	胚胎期死亡, 发育停滞, 绝育, 体形瘦, 病态等
<i>sdha-1</i> 琥珀酸脱氢酶	Leigh 综合征- <i>SDHA</i>	生长缓慢, 体苍白等
<i>sdhd-1</i> 琥珀酸脱氢酶亚单位 D	副神经节瘤- <i>SDHD</i>	胚胎期死亡, 发育停滞, 体透明等
<i>spe-15</i> 肌球蛋白	常染色体显性遗传非综合征型耳聋- <i>MYO6</i>	后代数减少, 绝育, 卵细胞缺陷等
<i>spk-1</i> 丝氨酸/苏氨酸激酶	Coffin-Lowry 综合征- <i>RSK2</i>	外阴突出, 发育停滞, 生殖腺增殖异常等
<i>sqv-3</i> β -1,4-半乳糖基转移酶	Ehlers-Danlos 综合征- <i>B4GALT7</i>	外阴形状异常, 绝育, 发育停滞等
<i>tag-173</i> 分支链酮酸脱氢酶 E1	糠糖尿病- <i>BCKDHB</i>	胚胎期死亡, 发育停滞, 绝育, 运动失调, 病态等
<i>tax-2</i> , <i>tax-4</i> 环核苷酸门控通道亚基	视网膜色素变性- <i>CNGB1</i> , <i>CNGA1</i>	绝育, 化学和光趋化能力缺陷等
<i>tnt-3</i> 肌钙蛋白	家族性肥厚型心肌病- <i>TNNT2</i>	体内脂肪量减少, 高病原菌易感性, 吞咽循环缺陷等
<i>umps-1</i> 尿核苷单磷酸合成酶	乳酸酸尿症- <i>UMPS</i>	生长缓慢, 绝育
<i>unc-2</i> 压力门 Ca ²⁺ 离子通道亚基	脊髓小脑共济失调- <i>CACNA1A</i>	Aldicarb 抗性, 运动失调, 吞咽循环不规则等
<i>unc-8</i> DEG/ENaC 离子通道亚基	Liddle syndrome 综合征- <i>ENaCB</i>	体卷曲, 运动失调
<i>unc-26</i> 聚磷酸肌醇磷酸酶	Lowe oculocerebrorenal 综合征- <i>SYNJ1</i>	体抽搐, 咽部运动失调等
<i>unc-52</i> 基膜蛋白多糖	Schwartz-Jampel 综合征- <i>HSPG2</i>	运动失调, 生长缓慢, 排卵缺陷等
<i>unc-68</i> ryanodine 受体亚基	恶性高热症- <i>RYR1</i>	Aldicarb 抗性和 ouabain 抗性, 运动失调等
<i>vab-10</i> spectraplakins 分子	大疱性类天疱疮- <i>BPAG1</i>	胚胎期死亡, 发育停滞, 绝育, 运动失调, 病态等
<i>vab-15</i> MSH 样转录因子	Witkop 综合征- <i>MSX1</i>	胚胎期死亡, 绝育, 运动失调等
<i>vhl-1</i> E3 泛素连接酶	Von Hippel-Lindau 综合征- <i>VHL</i>	生长缓慢, 排卵缺陷等
<i>wrn-1</i> ATP 依赖的 DNA 螺旋酶	Werne 综合征- <i>WRN</i>	体短小苍白, 短寿等
<i>wve-1</i> , <i>wsp-1</i> 肌动蛋白调节分子	WISKOTT-ALDRICH 综合征- <i>WASP</i>	胚胎期死亡, 发育停滞, 绝育等
<i>xbx-7</i> X-Box 启动子成分	Meckel 综合征- <i>MKS1</i>	排卵缺陷
<i>xpg-1</i> DNA 修复酶	XPG/Cockayne 综合征- <i>ERCC5</i>	胚胎期死亡, UV 超敏感

从理论上讲,只要人类疾病的靶蛋白或调控途径是物种间保守的,就可能利用模式生物来进行研究。基因以及许多重要的信号传导途径从人到线虫都高度保守,如 RAS 信号途径、TGF- β 信号途径、Notch 信号途径、Wnt 信号途径、胰岛素信号途径等。信号传导一旦有缺陷,引起多种疾病,包括癌症^[9–11]。更为复杂的生命现象,如衰老,研究用模型首推线虫,衰老机制的 4 个理论都是由线虫实验结果总结^[12]。成功的线虫病理模型包括溶酶体病^[13]、阿尔茨海默症 (Alzheimer's, AD)^[14]、多囊肾病 (polycystic kidney disease)^[15]、Duchenne 肌营养不良症^[16]、过氧化物生物合成缺陷^[17]等。已有的关于线虫的丰富详实的生物学知识是研究人类疾病、开发新药的强大基础。

3 线虫在新药发现中的运用

发现新药就是找到能治愈疾病或缓解疾病症状的天然或合成产物,这种产物可以是激动剂或拮抗剂,也可以影响信号调控途径的某蛋白酶活性抑制剂或激活因子。一个新药的诞生通常需要 10~15 年,大部分工作是确定致病靶点和 (或) 调控途径。因为这决定了药物设计或筛选的方向。一般来讲,利用线虫研发新药的流程是:人/线虫间的同源基因 (orthologues) 查找和确定,基因的功能分析比较,建立疾病模型,最后是化学筛选 (chemical screening) 或遗传筛选 (genetic screening)。由于很多线虫基因的研究已经相当深入,可直接从疾病模型着手。

3.1 建立人类疾病的线虫模型

建立人类疾病的线虫模型是疾病研究和随后的药物筛选的关键一步,之前的工作主要是通过生物信息学方法锁定人的同源基因,借助文献,线虫信息库,生物学实验等全面了解基因和蛋白的生物学功能,蛋白质关系网等,关于这方面工作可参阅有关文献^[18,19]。建立疾病模型大致有如下方法。

3.1.1 转基因动物模型 就是将外源基因微注入线虫的性腺体 (gonad),使基因在染色体外以非孟德尔式遗传和表达。这是线虫研究中的一个常规技术,外源 DNA 在线虫细胞染色体外形成一个大集合 (array),偶尔也会随机整合入染色体,通常情况下 7~10 d 即可得到一个转基因动物。缺点是并不是所有后代都能继承外源 DNA 集合,外源基因的表达和遗传稳定性因基因不同而不同。该方法已用于建立神经系统退化性疾病的线虫模型。如亨廷顿病的已知病因是 huntingtin 蛋白末端的多聚谷氨酰胺延伸 (polyQ)。将人 huntingtin 的 N 末端基因序列注射入线虫构建的转

基因动物同样表现出神经细胞凋亡,神经细胞上蛋白沉积随年龄逐步增加的症状^[20]。利用此模型,Voisine 等^[21]检验了 9 个可能有临床治疗效果的药物,其中 4 个能缓解 polyQ 的毒性,以 FDA 批准的亨廷顿病治疗药物光辉霉素 (mithramycin) 和氯化锂表现尤为突出。他们认为该模型将来可用于更大规模的药物筛选,其他的还有阿尔茨海默病模型^[22],Tau 疾病模型^[14,23]。Pfizer 公司正用人 presenilin 基因构建的转基因线虫 AD 模型来大规模筛选抑制剂。

3.1.2 野生型或突变体动物模型 线虫遗传中心 (Caenorhabditis Genetics Center, CGC) 保存并提供超过 1 万种各种线虫突变体,是丰富和宝贵的共享资源,不仅包括许多与人类疾病基因或调节因子基因同源的突变体线虫,还包括同一基因的不同突变体,如原癌基因 ras 在人和线虫中高度保守,CGC 中心有多达 54 种不同 *let-60* (线虫 LET-60 即是人 RAS) 的线虫,包括 RAS 活性全部丧失、部分丧失、活性增加、某特定功能位点突变、与其他调节因子双突变体和三突变体等等。根据研究目的,挑选合适的突变体线虫,即可立即实验。成功的例子如针对衰老的研究,直接以野生型 N2 或突变体线虫 (如 *daf-16*, *daf-9* 等) 为实验动物,已有多种天然或合成的药物报道能延长线虫的寿命^[24]。线虫的 *dys-1* 基因与导致人 Duchenne 肌营养不良症 (DMD) 的 dystrophin 基因同源,线虫双突变体 *dys-1*, *hnh-1* 表现出类似人类 DMD 的肌肉组织逐渐退化,丧失运动功能的病症,是个良好的 DMD 模型^[25]。已报道应用于医药研发的线虫突变体目前尚只是 CGC 丰富贮藏的冰山一角,更多的可供做药物的 (drugable) 靶蛋白等待开发。

3.1.3 化学诱导模型 同样的化合物或药物,在哺乳动物和线虫中引起的表型很多情况下不同,当以线虫为实验动物时,可供分析的稳定线虫表型是用化学诱导法建立线虫疾病模型的前提。例如,目前治疗尿失禁的药物多是 G 蛋白偶联受体的拮抗剂,不良反应较大。体外大鼠膀胱组织筛选得到了化合物 BMS-192364,为了找出该药物的靶点,Fitzgerald 等^[26]转向了线虫。BMS-192364 使野生型线虫产生明显的排卵困难 (egg-laying defective, Egl-d),利用这一模型,最终阐明了 G- α q 和 RGS 为可能的靶蛋白。另外一个例子是 MPP+帕金森氏线虫模型,神经毒素 1-甲基-4-苯基吡啶 (1-methyl-4-phenylpyridinium, MPP) 诱发多巴胺能神经元凋亡,处理过的线虫运动能力下降,死亡数增加。该模型可用于帕金森氏治疗药物的药效评估^[27]。

3.2 正向遗传学方法 (forward genetics)

即从表型到基因型的研究策略。Ras 信号传导途径和胰岛素信号途径中的各个成员的发现就是通过这种经典遗传学方法。该方法的突出优点是突变体的产生不带有任何偏见,而且,欲寻找的未知修饰蛋白(modifiers)、抑制因子(suppressors)或协同因子(co-operateor)并不一定与已知蛋白直接物理接触,只要是功能上紧密关联,就有同样的检出机会。药物的不良反应,脱靶效应(off-target effects)可能是影响了除靶点外的其他蛋白,药物的抗性可能是新抑制因子的产生。探明药物的作用方式(mode of action)为设计更为专一的新药提供线索。用诱变剂如甲基磺酸乙酯(ethane methyl sulfonate, EMS)诱导 DNA 的随机突变,筛选预定表型的线虫突变体,利用两点/三点定位法(two-point/three-point mapping)或单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)方法进行突变基因的染色体定位,获得基因序列,然后进一步了解相应基因和蛋白的细胞、组织表达、功能、相互作用蛋白等。例如,吸入性全身麻醉(volatile general anaesthetics, VAs)的分子机制至今不明,迄今只在线虫中发现了编码突触融合蛋白(syntaxin)的 *unc-64* 基因突变体能完全抗 VAs 的作用, Hawasli 等^[28]用 EMS 诱导突变 *unc-64*, 随后从 F2 后代中检出 14 个突变株,最后证明功能缺失型(loss of function) *slo-1* 突变体和功能获得型(gain of function) *egl-30* 突变体具有 VAs 抗性。据此认为神经递质水平的上升是抗麻醉反应的原因。

3.3 反向遗传学方法 (reverse genetics)

即从基因型到表型的研究策略。了解基因生物功能最常规的手段之一是使基因失活,观察该基因功能缺失后的表型变化。有两种方法构建功能陷型突变体线虫:一是传统的建立突变体线虫库,然后设计出目标基因的引物,借助 PCR 方法甄选出突变体^[29];二是 RNA 干扰(RNA Interference, RNAi)。通过线虫浸泡、喂食或注射方法,均可消除或降低目标基因的表达。1998 年线虫全部基因组序列的完成使全基因组 RNAi 成为发现新基因或基因新功能的高效工具,覆盖 87%线虫全部基因的 RNAi 库已建立并商品化。根据 Geneservice 公司的产品手册, RNAi 实验大致分为 4 步,即多孔(24 孔, 96 孔等)培养平板的准备(液体或固体 NGM 培养基);加入带插入基因序列的细菌克隆并室温过夜待干;加入 L4 期线虫, RNAi 发生作用,使相应基因失活或功能降低;若干天后,筛查预期表型。大规模的 RNAi 筛选可以借助仪器而实

现半自动化或全自动化。譬如,线虫分拣分配仪有 Union Biometrica 公司的 COPAS BIOSORT, NemaPharm 公司的 Dispenser, 还有 Rohde 等^[30]设计的 Microfluidic System, Elegenic 公司的 HiDI2100 数字成像仪能自动收集分析某些线虫的生理表型,包括短胖(dumpy)、瘫痪(uncoordinated)、生长慢(slow growth)、排卵困难(egg-laying defect)等,生化指标如荧光强度、染料浓度、细菌光密度、或某化学成分如虫卵壳的特异蛋白的浓度。已有较多关于全基因组 RNAi 筛选的研究,其中一篇^[31]所用的 RNAi 库涵盖 16 757 个线虫基因,目的是寻找影响脂肪代谢相关基因,研究人员分别分析了 4 种线虫,包括野生型 N2 和 *daf-2*, *daf-16*, *tub-1* 突变体,尼罗红染料(Nile red)染色脂肪,气相色谱法自动分析读取数据,共发现有 417 个基因能调节线虫体内脂肪量,其中约一半有哺乳动物同源对等物(homologues),而且首次发现与脂肪代谢相关。这项工作是功能基因组学领域的一个突破,也是线虫全基因组 RNAi 在医药学中的成功应用。

RNAi 库收录的基因可以根据目的仅是感兴趣的蛋白亚群,以减少工作量和干扰。如所有 G 蛋白偶联受体库,蛋白激酶库,某一染色体上所有基因等。

实际药物研究中,正、反向遗传学方法往往可以联合应用,例如 Bristol-Myers Squibb 公司的尼基转移酶(farnesyl transferase)抑制剂 FTIs 的曲折研发过程。FTIs 设计用来治疗因 RAS 蛋白活性异常导致的多种癌症。最初,从体外细胞实验得到的 FTIs 表现相当完美,在临床应用时,脱靶效应令研究人员迷惑不解,利用 *cep-1* 突变体线虫,通过 EMS 诱导突变法和 RNAi 法,确定 FTIs 另外一个直接的靶蛋白是 Rab 香叶烯基转移酶(Rab geranylgeranyltransferase)。这个结果为新一代的 FTI 设计提供了方向^[32]。

3.4 高通量药物先导化合物的筛选

高能量药物筛选是最能体现线虫在新药研发领域优势的一个实际应用,目的是找到药物先导化合物(drug leads)。线虫是目前最适合大规模药物筛选的多细胞动物,既提供了一个完整动物实验系统,又避免了小鼠模型的高价费时。药物先导化合物的可靠性、相关性很大程度上决定于所选用的线虫模型,越是对人对应基因同源性高,或者能更全面模拟人类疾病病理,阳性筛出药物更有可能进入下一步药物开发流程。多伦多大学 Roy 等^[33]于 2006 年发表了具有里程碑意义的 HTS 文章。筛选了 14 100 种小分子化合物,发现其中 308 个化合物能引起野生型线虫

各种表型异常,一种叫 nemadipine-A 的化合物类似抗高血压药 1,4-二氢吡啶类 (DHPs), nemadipine-A 使线虫发生明显的形态缺陷和排卵困难,通过正向遗传学方法确定 L 型钙离子通道的 $\alpha 1$ 亚单位是 nemadipine-A 的作用靶点,与美国 FDA 批准的 DHPs 已知的作用机制完全一致^[33]。同年 11 月,具体实验技术发表在 Nature Protocol^[5]上。Roy 等证明了线虫作为药物筛选平台和探明药物作用机制工具盒的成功性。Chronogen 公司为寻找能降低脂肪代谢的化合物,利用 *clk-1* 缺陷型线虫的排便循环 (defecation cycle) 的长短直接受胆固醇量调节的表型,筛查了多达 20 000 种小分子化合物,得到 190 个阳性反应的化合物 (Hits),再用人肝癌细胞 HepG2 验证,其中 15 个为阳性,能减少细胞 ApoB100 的分泌,代号为 CHGN005 的化合物的效应最明显,随后在小鼠活体高血脂模型中也验证了 CHGN005 降低血脂的效应^[34]。结果显示了线虫的强大新药开发应用前景。

待筛选的小分子化合物库可以是人工合成,也可以是天然产物,数量从十几多至上万种不等。一些生物公司 (如 Tripos, ChemBridge 等) 提供这类小分子化合物库。化合物的设计一般遵从某些基本原则,如 Lipinski CA 的“5 个 5 原则”,以保证良好的药代动力学,同时在核心结构的基础上结构多样化,以增加得到阳性先导物的几率。美国国立癌症中心 (NCI) 还提供自世界各地收集的天然化合物库。

新药发现的另一个捷径是老药新用,比如日本的 Sosei 公司,专门收集购买因各种原因退出临床期试验的药物候选物、淘汰的已上市药物或药物模板,通过药物重生计划 (drug reprofiling) 企图发掘他们可能的适应证, Sosei 的一个共 54 种“中途夭折”药物库在线虫中重新筛选,原适应证是心血管疾病、临床三期退出的 F-1349 在线虫中发现具有明显的降低 TGF- β 信号途径的效果,使 *daf-7*, *daf-4* 等 TGF- β 信号途径的缺陷突变体线虫的组成性休眠体 dauer 形成率大幅上升。已知 TGF- β 信号途径的失调是肺、肝纤维化的一个重要原因。F-1349 在人肺腺癌细胞 A549 和小鼠模型中也表现出同样治愈效果,目前, F-1349 等 ACAT 抑制剂的新临床适应证已经申请了专利^[35]。

以线虫为先导物筛出率一般为小分子化合物总数的 2%~3%,该结果与以斑马鱼为平台的筛出几率相似^[5]。斑马鱼近几年也被发展为药物大规模筛选平台,从实验操作来看,线虫简单快速,而斑马鱼因培养条件和发育时间的问题有所限制;另外,它

们各自适合的人类疾病模型有所不同,如线虫在衰老以及老年性神经退行性疾病方面的模型较成功;而骨骼、血液、视觉方面的人类疾病则斑马鱼有优势^[36]。

4 线虫的其他医药相关用途和应用前景

线虫的许多“亲戚”,如蛔虫、钩虫、丝虫等是人和 (或) 牲畜的致病寄生虫。线虫纲寄生虫目前尚不可体外培养,虽然线虫与线虫寄生虫从基因水平到生理水平仍有诸多差别,但它对绝大多数的驱虫剂 (anthelmintics) 敏感,自然而然成为研究这些寄生虫致病机制和发现新型杀虫药物的首选平台^[37]。Jones 等^[38]详尽综述了近年来在此方面的进展。

现在,线虫也更多地走入环境毒理学家的视野。人类生活环境中的重金属、杀虫剂、电离辐射等基因毒素 (genotoxin),对人类健康的影响令人担忧,线虫既可以作为了解它们的作用机制,评估其危害性的工具,也可以作为筛选平台或生物传感器从生物医学角度为政府和大众提供预防及医疗信息^[39]。只要解决了线虫模型能模拟物理或化学毒素的作用机制,或其中的一个方面,相信线虫将在环境毒理学领域有更广泛的应用。

细菌的抗药性及临床真菌感染的普遍性,使发现新型抗生素迫在眉睫,1999 年第 1 例细菌感染的线虫模型建立以后^[40],人们才开始关注线虫能否在此领域有所作为,现在已有利用线虫大规模筛选新抗生素药物的报道^[41, 42]。

线虫在基础生物学和医药学研究领域贡献卓著。国外有不少医药研发公司是以线虫为核心技术平台: Axys Pharmaceuticals; Cambria Biosciences, LLC; CyberGenome Technologies, LLC; Devgen; Divergence LLC; Exelixis Pharmaceuticals, Inc.; The Nef Lab, Hoffmann-La Roche, Basel。不可否认,线虫作为新药研发的工具仍有缺憾之处,首要问题是线虫的表皮 (cuticle) 通透性差,多数药物主要通过线虫的口器和咽进入消化道和身体,相对用药量大而药物的有效浓度难以确定,若某化合物对线虫无效,原因既可能是对线虫根本不起作用,也可能是无法进入体内。有人考虑利用表皮缺陷线虫如 Bis、Bus 突变体等以增加通透性,因为乙醇容易渗透过线虫表皮^[43],以乙醇为溶剂可能有帮助,但应考虑到这些新因素的引入会给结果增添复杂性。作为一种黑箱式 (black box) 筛选技术,尝试系列药物浓度也是对策之一。其他的不足之处还包括线虫的神经元细胞对 RNAi 不敏感;线虫没有心脏、获得性免疫系统、呼吸系统等,所以一些人类疾病无法在线虫中模拟。鉴于线虫

与人类种间距离太远,线虫的作用仍是在药物研发初期,快速粗筛,提供线索,Hits 需要再经过哺乳动物模型的“细筛”。

线虫的基础科研固然重要,将之介绍给我国的医药研发人员并使之成为新药开发的一个强大工具也是当务之急,因为有自主知识产权的化学新药在我国几乎是空白,另外,中草药成分极其复杂,各种生物碱类、甙类、酮类即天然小分子化合物,其生物活性鉴定完全可以利用低成本高效率的线虫技术,希望小小的线虫能帮助国内制药企业尽快走出以生产仿制药为生的桎梏。

致谢:上饶师范学院的吴京红同志为本文提供大量协助。

References

- [1] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans* [J]. Genetics, 1974, 77: 71–94.
- [2] Simonetta SH, Golombek DA. An automated tracking system for *Caenorhabditis elegans* locomotor behavior and circadian studies application [J]. J Neurosci Methods, 2007, 161: 273–280.
- [3] Benedetti MG, Foster AL, Vantipalli MC, et al. Compounds that confer thermal stress resistance and extended lifespan [J]. Exp Gerontol, 2008, 43: 882–891.
- [4] Verwaerde P, Cuvillier G. Improved assay techniques using nematode worms: USA, US7083947 [P]. 2006-08-01.
- [5] Burns AR, Kwok TCY, Howard AI, et al. High-throughput screening of small molecules for bioactivity and target identification in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature Protocols, 2006, 1: 1906–1914.
- [6] Lai CH, Chou CY, Chang LY, et al. Identification of novel human genes evolutionarily conserved in *Caenorhabditis elegans* by comparative proteomics [J]. Genome Res, 2000, 10: 703–713.
- [7] Culetto E, Sattelle DB. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes [J]. Hum Mol Genet, 2000, 9: 869–877.
- [8] Rubin GM, Yandell MD, Wortman JR, et al. Comparative genomics of the eukaryotes [J]. Science, 2000, 287: 2204–2215.
- [9] Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling [J]. Nature, 2001, 411: 355–365.
- [10] Stylianou S, Clarke RB, Brennan K. Aberrant activation of notch signaling in human breast cancer [J]. Cancer Res, 2006, 66: 1517–1525.
- [11] Janssens N, Janicot M, Perera T. The Wnt-dependent signaling pathways as target in oncology drug discovery [J]. Invest New Drugs, 2006, 24: 263–280.
- [12] Olsen A, Vantipalli MC, Lithgow GJ. Using *Caenorhabditis elegans* as a model for aging and age-related diseases [J]. Ann NY Acad Sci, 2006, 1067: 120–128.
- [13] De Voer G, Peters D, Taschner PE. *Caenorhabditis elegans* as a model for lysosomal storage disorders [J]. Biochim Biophys Acta, 2008, 1782: 433–446.
- [14] Kraemer BC, Zhang B, Leverenz JB, et al. Neurodegeneration and defective neurotransmission in a *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100: 9980–9985.
- [15] Barr MM. *Caenorhabditis elegans* as a model to study renal development and disease: sexy cilia [J]. J Am Soc Nephrol, 2005, 16: 305–312.
- [16] Gaud A, Simon JM, Witzel T, et al. Prednisone reduces muscle degeneration in dystrophin-deficient *Caenorhabditis elegans* [J]. Neuromuscul Disord, 2004, 14: 365–370.
- [17] Thieringer H, Moellers B, Dodt G, et al. Modeling human peroxisome biogenesis disorders in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. J Cell Sci, 2003, 116: 1797–1804.
- [18] Wheelan SJ, Boguski MS, Duret L, et al. Human and nematode orthologs-lessons from the analysis of 1800 human genes and the proteome of *Caenorhabditis elegans* [J]. Gene, 1999, 238: 163–170.
- [19] Longman D, Johnstone IL, Caceres JF. Functional characterization of SR and SR-related genes in *Caenorhabditis elegans* [J]. EMBO J, 2000, 19: 1625–1637.
- [20] Alter JR, MacDonald ME, Hart AC. Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 179–184.
- [21] Voisine C, Varma H, Walker N, et al. Identification of potential therapeutic drugs for Huntington's disease using *Caenorhabditis elegans* [J]. PLoS One, 2007, 2: e504.
- [22] Link CD. *C. elegans* models of age-associated neurodegenerative diseases: lessons from transgenic worm models of Alzheimer's disease [J]. Exp Gerontol, 2006, 41: 1007–1013.
- [23] Voisine C, Hart AC. *Caenorhabditis elegans* as a model system for triplet repeat disease [J]. Methods Mol Biol, 2004, 277: 141–160.
- [24] Collins JJ, Evason K, Kornfeld K. Pharmacology of delayed aging and extended lifespan of *Caenorhabditis elegans* [J]. Exp Gerontol, 2006, 41: 1032–1039.
- [25] Collins CA, Morgan JE. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies [J]. Int J Exp Pathol, 2003, 84: 165–172.
- [26] Fitzgerald K, Tertyshnikova S, Moore L, et al. Chemical

- genetics reveals an RGS/G-protein role in the action of a compound [J]. PLoS Genet, 2006, 2: 0425–0437.
- [27] Braungart E, Gerlach M, Riederer P, et al. *Caenorhabditis elegans* MPP⁺ model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings [J]. Neurodegener Dis, 2004, 1: 175–183.
- [28] Hawasli AH, Saifee O, Liu C, et al. Resistance to volatile anesthetics by mutations enhancing excitatory neurotransmitter release in *Caenorhabditis elegans* [J]. Genetics, 2004, 168: 831–843.
- [29] Liu LX, Spoerke JM, Mulligan EL. High-throughput isolation of *Caenorhabditis elegans* deletion mutants [J]. Genome Res, 1999, 9: 859–867.
- [30] Rohde BE, Zeng F, Gonzalez-Rubio R, et al. Microfluidic system for on-chip high-throughput whole-animal sorting and screening at subcellular resolution [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104: 13891–13895.
- [31] Ashrafi K, Chang FY, Watts JL, et al. Genome-wide RNAi analysis of *Caenorhabditis elegans* fat regulatory genes [J]. Nature, 2003, 421: 268–272.
- [32] Lackner MR, Kindt RM, Carroll PM, et al. Chemical genetics identifies Rab geranylgeranyl transferase as an apoptotic target of farnesyl transferase inhibitors [J]. Cancer Cell, 2005, 7: 325–336.
- [33] Kwok TC, Ricker N, Fraser R, et al. A small-molecule screen in *C. elegans* yields a new calcium channel antagonist [J]. Nature, 2006, 441: 91–95.
- [34] Hihi AK, Beauchamp MC, Branicky R, et al. Evolutionary conservation of drug action on lipoprotein metabolism-related targets [J]. J Lipid Res, 2008, 49: 74–83.
- [35] Hekimi S, Hihi AK, Branicky RS, et al. Acat inhibitors and their use in the prevention or treatment of fibrosis: WO, UN, WO/2008/058383 [P]. 2008-05-22.
- [36] Kari I G, Rodeck U, Dicker AP. Zebrafish: an emerging model system for human disease and drug discovery [J]. Clin Pharmacol Ther, 2007, 82: 70–80.
- [37] Prichard RK, Geary TG. Drug discovery: fresh hope to can the worms [J]. Nature, 2008, 452: 157–158.
- [38] Jones AK, Buckingham SD, Sattelle DB. Chemistry-to-gene screens in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nat Rev Drug Discov, 2005, 4: 321–330.
- [39] Leung MC, Williams PL, Benedetto A, et al. *Caenorhabditis elegans*: an emerging model in biomedical and environmental toxicology [J]. Toxicol Sci, 2008, 106: 5–28.
- [40] Tan MW, Rahme LG, Sternberg JA, et al. *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 2408–2413.
- [41] Breger J, Fuchs BB, Aperis G, et al. Antifungal chemical compounds identified using a *C. elegans* pathogenicity assay [J]. PLoS Pathog, 2007, 3: e18.
- [42] Moy TI, Ball AR, Anklesaria Z, et al. Identification of novel antimicrobials using a live-animal infection model [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103: 10414–10419.
- [43] Mitchell PH, Bull K, Glautier S, et al. The concentration-dependent effects of ethanol on *Caenorhabditis elegans* behaviour [J]. Pharmacogenomics J, 2007, 7: 411–417.