

细胞组学及其在药物研发中的应用

王元忠 葛志强 元英进*

(天津大学制药工程系, 天津 300072)

摘要 细胞组学(cytomics)是一门基于细胞分析技术的科学,它是在细胞水平对生物体系的研究,具有真实、简单和系统性的特点,在生物医学研究中有很好的应用前景。现对细胞组学的概念、特点和内容进行介绍,并结合药物研发的现状和过程,综述了细胞组学在药物研发各阶段的应用,最后对其前景进行了展望。

关键词 细胞组学; 细胞分析; 药物研发; 应用

在当今的制药行业中,不断加大的投入并没有带来更多的可用于治疗的药品,这种投入与产出的不平衡一直困扰着制药行业和科学界^[1]。而药物研发的低效率和高风险性正是这一问题的主要原因^[2,3],因此越来越多的研究将重点集中在降低药物研发过程的失败率。人类基因组的完成为药物的研发提供了更多的信息库和先进的技术,然而当前的先进手段包括基因组学和蛋白质组学等高通量的方法并不能完全解决药物研发的主要问题^[4]。生物体是复杂的系统,单单从分子和蛋白质水平进行的体外研究是不够的,要真正获知药物的作用位点及其机制,必须从更高水平包括细胞水平、组织水平甚至是整个生物体系来进行药物效应的研究。从系统生物学的角度而言,细胞水平的研究能反映生物体的真实情况,有助于疾病机制的阐明,也有利于药物作用点的确定以及药物的筛选,基于细胞的药物作用模型也将对传统的疾病模型作重要的补充^[5]。细胞组学(cytomics)作为一门以单细胞为研究对象的新学科,正是采用系统生物学的思路,将细胞的生理变化集中反映在分子表型的变化,简化了研究的过程,而且真实反映了生物机体的状态,在药物研发过程中展现了很好的应用前景^[6]。

1 细胞组学的发展及内容

1.1 细胞组学的概念

细胞组学最早是由 Davies 等^[7]在 2001 年提出,他们在进行豌豆细胞骨架的研究中,应用细胞分析技术分离鉴定细胞骨架的蛋白质分子,并提出了细胞骨架的研究是植物“细胞组学”研究的前提。随后,生物医学各个领域的专家对细胞组学进行了多

角度的讨论并促成 2003 年细胞组学会议的召开。自此,细胞组学的研究及其在生物医学领域的应用全面展开,细胞组学的概念也因不同的研究角度而有不同的说法。国际分析细胞学会(International Society for Analytic Cytology, ISAC)称细胞组学是将基因组学、蛋白质组学与细胞或组织动态功能整合在一起的科学,是基于细胞定量、定性分析的科学;德国马普学会的 Valet 认为,细胞组学(<http://www.biochem.mpg.de/valet/cytomics.html>)是在多个细胞组并存的细胞异质群体中,应用多参数细胞分析技术,获得由细胞遗传和外界环境影响的细胞分子表型的最精确、最大量的信息;CARDIFF 系统生物学研究中心认为细胞组学(<http://www.uwcm.ac.uk/cisb/research/cytomics.htm>)致力于从单个细胞水平研究细胞系统的分子结构和功能,其主要通过先进的研究手段并结合详尽的生物信息获取。这些概念尽管在字面上存在一定的差异,但其本质是一致的,细胞组学是以基因组数据库为基础,结合基因组学和蛋白质组学的技术,在单细胞水平上获取细胞分子表型的信息,进而研究细胞的结构以及内部的功能的科学。

1.2 细胞组学的特点

不同于传统的生物分析技术,细胞组学具有其独特之处,而这也是这门新科学的优势所在。归纳其特点有以下 3 个方面:

(1)细胞组学是在单细胞水平上进行分析,反

收稿日期: 2005-09-07 接受日期: 2005-11-16

国家杰出青年基金资助项目(No.20425620)

* 通讯作者。Tel: 022-27403888, Fax: 022-27403888, E-mail:

yjyuan@tju.edu.cn

映了细胞的真实情况,避免因组织或细胞体系不同细胞间存在异质性而造成研究结果的偏差^[8]。Szaniszlo等^[9]在进行微阵列分析之前对复杂细胞体系进行分类,通过比较分析得出,在进行微阵列分析之前采用CD4⁺进行的细胞分类选择排除了细胞体系中不同的细胞组分对结果的干扰,使微阵列分析的结果更真实,更有意义。

(2)细胞组学的思路与传统的不同^[10,11],传统的策略主要立足于对各个基因功能的研究,然后再考察它们在细胞中的作用以及相互联系,而细胞组学则集中于细胞中分子表型的分析。细胞表型是基因和环境因素共同作用的结果,这样可以先不用对具体的分子机制做过多、过细的研究,而是用整体的思想来寻找特异的分子作用靶点,然后再分析这些分子的具体功能及作用模型。这一研究策略很好地应用了人类基因组的信息库,代表了一种更为高效和简单的策略。

(3)细胞组学是在单细胞水平上蛋白质组和基因组研究的结合。主持细胞组学的Robinson指出,细胞组学是阐明细胞(组)功能与蛋白质组关系(<http://www.biotech.iastate.edu/facilities/protein/seminars/PF2D/presentations/robinson.pdf>)的科学。Robinson的研究小组将分选后的细胞应用PF2D进行蛋白质组的分析,得到特殊状态下的细胞蛋白表达的异同,实现了单细胞水平的蛋白质组学研究。另一方面,Ulrich等^[12]的研究表明分子抗体(aptamers)和抗体的发展,使得细胞组学和基因组学、蛋白质组学的研究合成一体,他们应用分子抗体对细胞进行标记,实现了原位的细胞内分子和蛋白质功能的分析。

1.3 细胞组学的研究方案

细胞组学是一种新的研究理念,同时它也是一门基于细胞分析技术的学科^[13],细胞组学的发展有赖于先进分析手段和新的生物技术的发展。概括其研究方案主要包括以下几方面:

(1)细胞鉴别。通过细胞分选可以排除异质细胞体系因细胞间的不同对单细胞研究产生的干扰,反映细胞的真实情况。其过程用细胞功能的相关指标进行标记,包括膜上表面抗原、Ca²⁺以及对核酸物质进行染色,经过流式细胞仪或者光学显微分析可以对细胞的形态包括细胞膜、细胞核、细胞器等三维重构,实现细胞的辨别。通过标记可以用于不同类细胞的辨别,也可用于同类细胞在不同活力状态,包括凋亡或者死亡状态的辨别。细胞辨别

后,可以通过细胞分选仪实现细胞分离,再进行后续的蛋白质和基因研究;也可以直接在细胞群中进行细胞的研究,通过细胞标记可以获得同类细胞在不同状态下的表型信息,实现在复杂细胞系统如神经系统中以及在组织水平上的细胞组学分析。

(2)细胞分析。单细胞分析可以对同类细胞在不同状态下包括正常和疾病,以及疾病状态和给药后进行分析,从而得到特异的表型差异(组)作为医学研究的判定指标。细胞分析是细胞组学研究的核心,细胞可同时标记上一系列相关的抗体和分子探针,再通过多参数的流式细胞仪或荧光显微镜进行分析,得到一系列差异的图谱。新型的显微分析技术,更多抗体包括专为细胞组学的分子标记的出现,以及多色荧光标记技术的发展使细胞的分析所用的参数越来越多,细胞结构和功能的研究也更为精细。

(3)数据的处理。由细胞分析获得的谱图经过数据转化、筛选、分类、标准化处理,成为生物医学研究可利用和共享的数据。数据的处理,是细胞组学重要的一环,在概念中明确指出,细胞组学要获得细胞的尽可能多的信息,数据的处理便是将这些信息进行抽提,获得与医药研究最相关、最有用的数据。数据的处理过程主要采用聚类分析、模式识别、神经网络等方法^[14]进行分析,而细胞组学研究中,Classif1(<http://www.biochem.mpg.de/valet/classif1.html>)的数据筛选方式在疾病预测中有很好的应用^[14],所获得的一系列数据也可以用于药物的开发。

2 细胞组学在药物研发中的应用

细胞组学分析可以反映细胞混合体各个方面的变化,包括特殊过程的细胞时相变化以及分子空间结构的变化,这为分子药物的筛选和研发提供有效的路线,并可用于药物开发的全过程,包括药物作用点的寻找和确定,引导筛选及优化甚至到临床前的研究,而且作为新的药物研发手段,细胞组学显示出很多的优势。

2.1 药物作用位点的确定

只有深入了解疾病的机制,才能确定最合适的药物作用位点以便进行合理的药物筛选和后续的研究开发。因此,药物作用位点的确定需要对高层次的细胞内物质的功能间的关系以及在疾病状态下所发生的变化有个全面的研究^[15],应用细胞组学进行

作用位点的选择和确定有着得天独厚的优势^[6]。

细胞组学的分析可以得到一系列与疾病相关的细胞表型变化，从而确定一系列可用于药物筛选的表型组^[6]，这些用于筛选的“标志物”，比传统的胞外体系研究更能反映真实情况。例如神经系统中，由于神经细胞的多样性以及分离和测定神经细胞存在的巨大困难，体外的研究根本无法得到神经系统的精确信息，而 Arrasate 等^[6]采用细胞组学的方法，通过原位的显微分析方法可以对神经系统中的单细胞进行追踪，而且可以捕获到细胞内蛋白质的动态变化过程，获得神经细胞在整个细胞周期的变化趋势。这种在单细胞水平对复杂系统的监测，可应用于很多的生物系统，进而确定具体生物过程的机制。通过这种方法可以获得机体在疾病状态下所表现出来的差异，这些差异既可以作为疾病的一个预测指标，同时也代表了药物作用的相应靶点，为新药研发提供很多的“准靶点”。

另外，细胞组学研究得到的结果可以反向引导基因和蛋白质的研究，通过表型的变化，找到某些蛋白质或者基因作为疾病的生物标志物，这为药物作用点的确定提供很好的信息。譬如在基因药物作用点筛选中的应用，Quark 生物技术公司的 Einat 通过基因干扰阻断某个基因，然后通过细胞分选仪获得需要的细胞表型，最后在这一细胞群中经过二次筛选寻找基因作用点，他通过这种方式筛选到了用于糖尿病药物筛选的可能的作用基因。

2.2 疾病模型的建立

当前药物研发的低效率很大一部分的原因就是用于药物筛选的疾病模型不能反映机体真实状况，对后续过程缺乏预测力^[7]，建立细胞水平的疾病模型可以对细胞在体内以及组织中功能和表型的变化进行分析^[8]，能真实反映机体状态，是传统的疾病模型的很好补充。体系中细胞间的异质性是药物研发的一大障碍^[8]，药物的开发过程因不同的细胞而异。在药物实验中，当获知不同培养体系中存在差异，并认为这是由于外加物质对细胞的影响，但事实上可能只是细胞本身存在的差异包括活细胞的类型和数量所导致，因此挑选合适的细胞群对药物的研发有很大的意义。细胞组学的一个很重要的功能就是对细胞群进行分选，通过高速的细胞分选仪，可以快速的分开不同类型的细胞，这样就可以获得最佳的一组细胞能够对外加的刺激产生最明显的反应。比如通过多参数的流式细胞分析技术，能同时

对细胞的大小、活力进行检测，这样便可以通过细胞的分析将活的细胞和凋亡或者死亡的细胞分开，再进行药物的筛选使得药物的作用不会被细胞本身的差异所掩盖。

2.3 药物的筛选

随着细胞分析技术的逐渐成熟，细胞组学的平台包括流式细胞分析仪和光学显微分析技术已经在高通量的药物筛选中有很好的应用。流式细胞的分析平台在药物筛选已有广泛的应用，并出现了商业化的自动分析系统，Young 等^[19,20]应用 HyperCyt[®]，进行生物活性物质以及甲酰缩氨酸受体的配体分子的筛选，实现在 96 孔板中的高通量筛选。而更多的荧光抗体的出现和多色分析技术的发展，自动分析的显微成像系统在小分子药物的筛选也有很好的应用^[21,22]。

细胞组学研究所应用的高清晰度和高通量的自动成像系统克服了显微分析中人为因素造成的误差并为研究者们提供了一套适合于高通量筛选的技术路线^[23]，主要包括以下四点：(1)能反映细胞信息的分子探针；(2)细胞体系的基因操作以控制基因和蛋白质的表达；(3)基于细胞的研究寻找药物的作用位点；(4)数学分析以提高识别。基于这一技术路线，很多公司已经研发了用于高通量筛选的分子探针并且在药物研发中有了广泛应用。DRAQ5^[24]便是一个很好的用于高通量药物筛选的分子探针，它能很好的结合 DNA 分子，并能用于单激光扫描中的活细胞或者固定细胞染色，实现高通量分析。商业化的 DRAQ5[™]，已经很好地应用于 G 蛋白偶联受体家族(GPCRs)的配体以及调控 GPCR 的药物的南通筛选^[23]。

2.4 药物的临床前分析

临床前的分析包括药物吸收、分布、代谢、排泄与毒性和活性的分析，药物临床前的研究对于后续的药物研究成功率有很大的意义^[25]。传统的体外研究方案包括毒性基因组学在药物毒性分析中应用较多，但由于体外实验往往和机体真实情况相差太多，不能降低药物在最后的临床实验中的失败率。系统生物学的方案^[26]为药物的临床前分析提高了可靠性，减少后续研究的失败率。细胞组学采用的是一种基于单细胞的系统生物学策略，可以获得一系列细胞功能的表征，以此作为“标记物”，进行药物的活性和毒性分析更能反映药物的实际效应；应用细胞组学平台进行高通量的药物活性检测

[27]和毒性分析[28],也大大提高了药物研发的效率;另一方面,将毒性基因组学与细胞组学结合在一起,也将在药物活性和毒性研究中显示出很好的实力。

3 展望

细胞组学是在单细胞水平将基因组学和蛋白质组学联合起来研究细胞及组织的动态功能的科学。细胞组学采用的研究策略相比基因组和蛋白质组研究的策略更为简单和高效,而且它得到的数据模式与日常的医学用药密切相关,为疾病的预测和药物的研发提供了很好的手段。细胞组学是一门崭新的科学,但随着高通量流式细胞分析技术、光学显微技术以及多色抗体标记技术的整合和发展,细胞组学的研究平台将不断成熟。细胞组、基因组和蛋白质组的结合,以及基于组织水平的细胞组学[29]的发展,为药物的研发提供了更为全面和完整的信息。而且,将细胞组学的研究手段整合到药物研发的各个阶段,以及分析技术的商业化,将大大提高药物研发的效率和成功率。

参考文献 (References)

- [1] Booth B *et al. Nat Rev Drug Discov*, 2004, **3**: 451
- [2] Dickson M *et al. Nat Rev Drug Discov*, 2004, **3**: 417
- [3] Kola I *et al. Nat Rev Drug Discov*, 2004, **3**: 711
- [4] Horrobin DF. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, **2**: 151
- [5] Dimitrova DS *et al. J Cell Sci*, 2002, **115**: 4037
- [6] Valet G *et al. J Biol Regul Homeost Agents*, 2004, **18**: 87
- [7] Davies E *et al. Plant Sci*, 2001, **160**: 185
- [8] Tarnok A. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2004, **18**: 92
- [9] Szaniszló P. *Cytometry A*, 2004, **59**: 191
- [10] Valet G. *Cell Prolif*, 2005, **38**: 171
- [11] Valet G. *Cytometry A*, 2005, **64**: 1
- [12] Henning Ulrich. *Cytometry A*, 2004, **59**: 220
- [13] Valet G *et al. Cytometry A*, 2004, **59**: 167
- [14] Valet G. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2002, **16**: 164
- [15] Lindsay MA. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, **2**: 831
- [16] Arrasate M *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, **102**: 3840
- [17] Booth B *et al. Nat Rev Drug Discov*, 2003, **2**: 609
- [18] Kenakin T. *Nat Rev Drug Discov*, 2003, **2**: 429
- [19] Young SM. *J Biomol Screen*, 2004, **9**: 103
- [20] Young SM *et al. J Biomol Screen*, 2005, **10**: 374
- [21] Yarrow JC *et al. Comb Chem High Throughput Screen*, 2003, **6**: 279
- [22] Mitchison TJ. *Chembiochem*, 2005, **6**: 33
- [23] Smith PJ. *Business Briefing: Pharmatech*, 2004: 40
- [24] Yuan CM *et al. Cytometry B Clin Cytom*, 2004, **58**: 47
- [25] Nassar AE *et al. Drug Discov Today*, 2004, **9**: 1055
- [26] Ekins S *et al. Trends Pharmacol Sci*, 2005, **26**: 202
- [27] Perlman ZE *et al. Chembiochem*, 2005, **6**: 145
- [28] Bugelski PJ *et al. Pharm Res*, 2000, **17**: 1265
- [29] Coulton G. *J Mol Histol*, 2004, **35**: 603

Cytomics and Its Applications to Drug Discovery and Development

Yuan-Zhong Wang, Zhi-Qiang Ge, Ying-Jin Yuan*

(Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology,
Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract Cytomics was a new technology based on cytometry, it represented a simple and systemic strategy that could reflect the actual bio-progress and had a good potential in biomedical study. In this review, the progress in cytomics, the technical features, the techniques and the applications of cytomics to the stages of drug discovery and development were summarized, finally the trends of cytomics was discussed.

Key words cytomics; cytometry; drug discovery and development; applications

Received: September 9, 2005 Accepted: November 16, 2005

This work was supported by the National Science Fund for Distinguished Young Scholars (No.20425620)

*Corresponding author. Tel: 86-22-27403888, Fax: 86-22-27403888, E-mail: yjyuan@tju.edu.cn