

· 综述 ·

以 DNA 为作用靶追踪分离天然植物药活性成分*

陈业高 张 燕¹(昆明 650092 云南师范大学化学化工学院化工与制药系; ¹昆明 650031 昆明医学院化学教研室)

摘要 目的: 从天然植物药中分离活性成分。方法: 综述 DNA 与其靶向分子的作用方式以及 DNA 为作用靶的生物活性筛选系统跟踪分离天然植物药活性成分的情况。结果: 应用 DNA 为作用靶的生物活性筛选系统跟踪分离天然植物药成分可快速有效地得到活性化合物。结论: DNA 与其靶向分子相互作用的研究对阐述抗肿瘤、抗病毒药物及致癌物的作用机理和筛选新的药物活性成分具有重要的意义。

关键词 DNA; DNA 靶向分子; 活性成分

DNA-targeting bioassay guided isolation of active principles from natural medicinal plants

Chen Yegao (Chen YG), Zhang Yan (Zhang Y) (*Department of Chemical Engineering and Pharmacy, School of Chemistry and Chemical Engineering, Yunnan Normal University, Kunming 650092; ¹Department of Chemistry, Kunming Medical College, Kunming 650031*)

ABSTRACT OBJECTIVE: Isolate active compounds from natural medicinal plants. **METHODS:** Review interaction styles of DNA with DNA-targeting molecules and bioassay guided isolation of active principles from natural medicinal plants. **RESULTS:** Bioassay guided isolation of compounds from natural medicinal plants could provide active principles quickly and efficiently. **CONCLUSION:** Studies on interactions between DNA and DNA-targeting molecules are of great importance to elucidating the action mechanisms of some antitumor, antiviral drugs and some carcinogens, and to screening new active compounds.

KEY WORDS DNA, DNA-targeting molecules, active principles

从天然产物,尤其是具有临床应用基础的传统植物药中寻找治疗疾病的活性成分一直是医药工作者研究的热点之一。传统的天然药物研究一般是先提取、分离鉴定植物中的化学成分,然后对得到的化合物进行活性筛选。其缺点是花费多、工作量大、筛选中率低而且易漏筛,因此应用生物活性检测跟踪和指导活性成分的分离已越来越多的应用于天然药物的研究与开发^[1]。

追踪分离天然活性成分能否取得成功,关键在于有无好的生物活性测试模型。历史上大部分的药物都是通过筛选被发现的。为了与疾病作斗争,人们发展了各种模拟疾病过程或状态的体内和体外系统,用这些系统来筛选和评价来自植物、动物、微生物发酵以及人工合成的各种化合物。这种筛选的方法在发现新药过程中起了很大作用,一直到今天仍然是各国寻找新药经常采用的方法。

1 核酸作为药物作用的靶

生物活性检测模型可以有整体动物、器官、组织、细胞、酶或受体以及体内生物活性物质等。采用整体动物进行的实验与人比较接近,但是实验费时费钱,现象复杂,加上动物个体差异及病理模型的难于建立等因素,作为指导分离过程的活性筛选方法不太适宜。

随着医学和生物学的进展以及人们对疾病发生、发展的更深入的了解,生物活性筛选系统已由简单直观的动物模型转变成针对疾病治疗靶点的命中率更高的筛选体系。新药研究的一个新的趋势是基于机理的药物设计(mechanism based drug design)。因为对某一疾病的生物学和化学有了更多的了解,就有可能选择阻止疾病过程的一些特殊的分子靶。这些靶可以是蛋白质(如酶、受体)或核酸(DNA, RNA)^[2]。

理论上来看,核酸应是药物设计时更重要的生物靶,因为所有的酶和受体都是蛋白质从 DNA 经转录、翻译等过程产生的。分子生物学和分子药理学的发展使人们能够从基因水平上理解某些疾病的发病机理, DNA 靶向化合物成为很重要的药物选择对象。临床上使用的很多抗癌药物都以 DNA 为作用的主要靶点,通过与癌细胞 DNA 发生相互作用破坏其结构,进而影响基因调控与表达的功能,表现出抗癌活性。一些抗艾滋病的药物也是以 DNA 为作用靶点的分子。此外,一些致癌物也能与 DNA 形成加合物,这种加合物也可

* 国家自然科学基金, No 30160093; 云南省科委国际合作, No 2000 C007

能是癌病的预警标志物。因此, DNA 与其靶向分子相互作用的研究不论对阐述抗癌、抗病毒药物和致癌物的作用机理, 还是对药物的体外筛选都具有非常重要的意义。

2 DNA 与其靶向分子相互作用的方式

如何使药物选择性地作用于病变细胞而对正常细胞没有损害, 一直是药物设计中的关键问题, 以 DNA 为靶分子的药物的选择性取决于与 DNA 结合的特异性。药物对 DNA 的序列选择性识别(sequence selectivity)、位点专一性识别(site specificity)及形状选择性识别(shape selectivity)已成为当今的研究热点。以 DNA 的空间结构的运动性为基础研究小分子与 DNA 的相互结合, 是以 DNA 为靶分子进行药物设计的分子基础。这种结合按化学键来划分主要有共价键及非共价键结合两种。共价结合中既包括与亲核试剂也包括与亲电试剂作用, 主要表现为 DNA 的烷基化及 DNA 的链间交联和链内交联等。非共价结合则以三种不同的方式进行: (1) 外部静电作用, (2) 沟区结合, 分为大沟区结合及小沟区结合, (3) 嵌插结合^[3]。

2.1 与 DNA 共价结合的药剂

早期使用的绝大多数抗癌药仅具有简单的使 DNA 烷基化的功能, 如氮芥。它们对细胞的作用基本上没有选择性, 而且很多药物还发现其本身就有致癌作用, 所以临床使用有严重的毒副作用。以后发展的多是一些天然抗癌抗生素, 它们的共同特征是首先与 DNA 形成非共价复合物, 然后再与之共价结合。这些杂环化合物包括氮丙啶类(aziridines), 如丝裂霉素 C(mitomycin C)、氨基霉素(anthramycin)、茅屋霉素(tomaymycin)等以及螺环丙烷类如 CC-1065。它们最初的作用是干扰 DNA、RNA 的合成来达到杀菌的目的。但很多这类化合物却也表现出了明显的抗癌活性, 而且具有选择性毒性, 它们可能对 DNA 有特异的结合从而对肿瘤细胞的代谢有潜在的影响。

2.2 与 DNA 非共价结合的药剂

大多数药与 DNA 的作用都是非共价结合。非共价键一般称作次级键, 属于弱作用键, 而在分子水平的生命现象中, 上述弱作用键是一种决定性的因素, 形成了各种大分子生物功能所要求的空间结构, 因而主导着药物分子与 DNA 作用的特异性。

2.2.1 沟区结合药剂

沟区结合, 即 DNA 靶向分子与 DNA 的大沟或小沟的碱基对边缘直接发生作用。很多蛋白质与 DNA 特异性的结合是通过 DNA 大沟区作用, 而药物小分子多数在小沟区作用。大小沟区在电势能、氢键特征、立体效应和水合作用上都有很大的不同。典型的小沟区结合的药物分子多含有非稠合的芳环体系, 能通过一定的旋转后结合在小沟中的 AT 富集区, 并且在靶向分子的供体基团与小沟中 A 的 N3 或 T 的 O2 这些受体间常常有氢键。虽然同样的基团在 GC 碱基对上也存在, 但是鸟嘌呤上的氨基在氢键形成时有立体障碍, 对于药物进入 GC 富集区有一定的抑制。小沟区结合的药物就这样选择性地作用于 DNA 双螺旋结构中 AT 较为丰富的

片段, 通过氢键、范德华力等作用, 非嵌入性地捆缚住 DNA, 从而阻止 DNA 的模板复制, 起到抗病毒、抗肿瘤的作用。

2.2.2 嵌插结合药剂

嵌插结合, 即在碱基对之间嵌入平面的或几乎平面的芳香环系统。嵌插结合的作用力来自芳环的离域 π 体系与碱基的 π 体系间的 π - π 相互作用及疏水相互作用。这是药物分子与 DNA 发生作用的最重要的形式之一。通常稠合芳环体系都倾向于结合在 GC 富集区, 而对于一些含有庞大取代基的分子, 如吡啶环取代的卟啉分子在与 DNA 作用时, 吡啶环取代基尽量旋转, 以保持与母环的共平面, 从而形成良好的堆积形状与 DNA 碱基嵌合。当 DNA 靶向分子嵌入 DNA 碱基对之间后, 有的可以直接抑制 DNA 复制与转录, 有的则在经过进一步活化后, 使 DNA 断裂受损而影响其功能。临床上广泛使用的抗癌药阿霉素(adriamycin)及与之结构很近似的柔红霉素(daunomycin)均为典型的 DNA 嵌入剂。

2.2.3 静电结合药剂

静电结合, 即分子通过非特异性的相互作用结合于带负电荷的 DNA 双螺旋外部。通常认为这种作用模式在作为药物的应用上价值不大, 但也并非完全如此。例如, 四(4-N-甲基吡啶基)卟啉(TMPyP)带正电的侧链与 DNA 磷酸酯骨架间的静电作用对它能嵌入结合在 GC 碱基对之间起了必不可少的稳定作用。

2.3 对 DNA 有断裂作用的药剂

DNA 断裂在 DNA 修复、转录及突变中是很重要的一个生物学过程。目前, DNA 断裂剂主要有两大类: 天然抗生素 DNA 断裂剂和合成的 DNA 断裂剂。如临床上使用的抗癌药物博来霉素(bleomycin)便是一种典型的 DNA 切割化合物, 分子结构的特殊性使其能够识别并结合在 DNA 中 5'-GC-3' 序列的鸟嘌呤上, 然后经一系列化学反应最终导致 DNA 断裂。这种双功能性对于发展有效的抗肿瘤药物具有非常重要的指导意义。事实上, 已有大量研究根据这一原理把对 DNA 具有剪切功能的分子与能对 DNA 序列进行特异性识别的分子连接起来, 以合成序列特异性更高的人工核酸酶或抗肿瘤药物。

3 DNA 为作用靶追踪分离天然植物药活性成分

鉴于 DNA 与其靶向分子间相互作用在药物设计与合成、作用机理及筛选方面的重要意义, 国外已有学者应用 DNA 与药物作用的生物活性筛选模型, 指导从天然植物、海洋生物和微生物发酵物中分离活性成分, 以发现新的生物活性物质及有新作用机制的活性化合物。应用的模型有 DNA 切割活性^[4-6]、比色法^[7]和 HPLC 法^[8-10]等。如弗吉尼亚大学化学系 Hecht 教授和发现紫杉醇的三角研究所 Wall 和 Wani 教授研究组分别应用 DNA 切割活性跟踪分离植物活性成分, 已得到一些可切割 DNA 的活性化合物; Pezzuto 等以 DNA 为亲合探针, HPLC 检测模型随机筛选植物提取物, 从有活性的 *Albizia amara* 中跟踪分离得到 4 个结构奇特的大环生物碱, 经活性测试证实有一系列的生物活性。Gupta 等用 DNA 相互作用模型筛选巴拿马植物, 结果与盐水虾毒

性(brine shrimp toxicity)和肿瘤抑制测试结果平行^[11]。虽然这些筛选模型有待进一步改进和完善,但作为实验室初步筛选,其灵敏度高,设备要求简单。

4 结 语

植物化学研究手段的迅猛发展,为天然药物的开发研究提供了丰富多样的化学成分分离手段和结构鉴定技术,而相反地,目前生物活性检测模型的不足及落后状况已经成为天然药物研究过程中的主要障碍。但在我国这方面研究还不普遍,天然药物化学研究尚处于提取、分离、结构和发现新化学成分为目的的阶段。天然药物化学应该是研究天然有用成分特别是生物活性成分的科学,和我国丰富的天然资源特点相结合,又和多种学科如生命科学和有机化学等渗透交叉相结合,才有可能创新。我国植化工作者每年从传统植物药中分离出大量化合物,相当一部分为新结构。若能在分离过程中应用一些简单的生物活性检测模型如DNA相互作用模型进行跟踪,在提取物或纯样品极微量的情况下即可有目的地得到活性成分。这将大大提高药物研究与开发的效率,减少时间和财力的浪费,而且防止漏掉活性先导化合物。

参考文献

- 1 周俊,谭宁华.中国植物化学的回顾和展望.化学通报,1999,(12):21
- 2 张礼和等编著.以核酸为作用靶的药物研究.第1版.北京:科学出版社,1997:8
- 3 张蓉颖,庞代文,蔡汝秀.DNA与其靶向分子相互作用研究进

展.高等学校化学学报,1999,20(8):1210

- 4 Huang, L, Wall M, Wani M, et al. New compounds with DNA strand-scission activity from the combined leaf and stems of *Uvaria hamiltoni*. *J Nat Prod*, 1998, 61(4): 4468
- 5 Lytollis W, Scannell R, An H, et al. 5-Alkylresorcinols from *Hakea trifurcata* that cleave DNA. *J Am Chem Soc*, 1995, 117(51): 12683
- 6 Hecht S M. Natural products that cleave DNA. *Pure & Appl Chem*, 1989, 61(3): 577
- 7 Burren N, Frigo A, Rasmussen R, et al. A colorimetric microassay for the detection of agents that interact with DNA. *J Nat Prod*, 1992, 55(11): 1582
- 8 Pezzuto J, Mar W, Lin L, et al. DNA-based isolation and the structure elucidation of the budmunchiamines, novel macrocyclic alkaloids from *Albizia amara*. *Heterocycles*, 1991, 32(10): 1961
- 9 Mar W, Tang, Cordell G, et al. Biological activity of novel macrocyclic alkaloids (budmunchiamines) from *Albizia amara* detected on the basis of interaction with DNA. *J Nat Prod*, 1991, 54(6): 1531
- 10 Pezzuto J, Che C, Mcpherson D, et al. DNA as an affinity probe useful in the detection and isolation of biologically active natural products. *J Nat Prod*, 1991, 54(6): 1522
- 11 Gupta M, Monge A, Karikas G, et al. Screening of Panamanian plants with DNA intercalation assays. *Int J Pharmacognosy*, 1996, 34(1): 19