Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội:
Khoa học Tự nhiên và Công nghệ
Website: https://js.vnu.edu.vn/NST

Xây dựng mô hình sàng lọc *in vitro* hoạt chất hướng đích dựa trên các thụ thể hệ thần kinh trung ương tái tổ hợp

Phạm Thị Hồng Nhung[1,*], Đinh Đoàn Long[1]

[1]*Khoa Y Dược, Đại học Quốc gia Hà Nội, 144 Xuân Thủy, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam*

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017
Chỉnh sửa ngày 20 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Thụ thể ở hệ thần kinh trung ương là một đích tác dụng quan trọng của thuốc, liên quan đến nhiều bệnh lý thần kinh. Chính vì vậy, nghiên cứu được thực hiện với mục tiêu xây dựng mô hình sàng lọc *in vitro* các hoạt chất hướng đích là các thụ thể ở hệ thần kinh trung ương. **Phương pháp:** Xây dựng hệ thống cDNA mang gen mã cho các thụ thể; sử dụng các vector Semliki Forest virus để biểu hiện nhanh và mạnh các thụ thể trên tế bào động vật có vú; sử dụng phép thử tương tác với thụ thể để nghiên cứu dược lý in vitro của tinh chất / dịch chiết methanol dược liệu. **Kết quả:** biểu hiện thành công 4 thụ thể, bước đầu xây dựng được 24 cDNA mã cho các thụ thể và 1 kit sàng lọc dược liệu với thụ thể neurokinin-1. **Kết luận:** mô hình sàng lọc thuốc *in vitro* đã được xây dựng thành công và ứng dụng trên thụ thể NK1 với độ nhạy và độ đặc hiệu cao. Đây là một công cụ hữu ích cho các nghiên cứu phát triển thuốc hướng đích tác dụng lên hệ thần kinh trung ương.

Từ khóa: Thụ thể hệ thần kinh trung ương tái tổ hợp, sàng lọc thuốc *in vitro*, hoạt chất hướng đích, Semliki Forest virus.

1. Đặt vấn đề

Trong các đích tác dụng của thuốc, thụ thể kết cặp G-protein (viết tắt là GPCR) hiện là đích tác động quan trọng của nhiều thuốc, được tập trung nghiên cứu do liên quan đáng kể đến sinh lý bệnh của cơ thể [1]. Theo thống kê năm 2017, có 108 GPCR là đích tác dụng của 475 (chiếm khoảng 34%) thuốc được Cơ quan Quản lý Thực phẩm và Thuốc Hoa Kỳ (viết tắt là FDA) phê duyệt. Nhiều GPCR phân bố ở hệ thần kinh trung ương đóng vai trò sinh lý chủ chốt trong nhận thức, tâm trạng, ham muốn, đau đớn và sự dẫn truyền synap [2]. Thuốc tác động lên các thụ thể hệ thần kinh trung ương là một trong những thuốc được sử dụng sớm nhất và vẫn là nhóm thuốc dược lý được sử dụng rộng rãi nhất hiện nay. Chúng bao gồm các loại thuốc được sử dụng để điều trị một loạt các bệnh lý thần kinh, tâm thần cũng như giảm đau, giảm buồn nôn, giảm sốt và các triệu chứng khác [3].

Với hàng trăm nghìn thuốc thử đang có hiện nay (các hợp chất tinh khiết hóa tổng hợp, các phân đoạn/dịch chiết thu từ nguồn dược liệu tự nhiên), việc xây dựng các mô hình sàng lọc *in*

*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-904833155.
Email: nhungpham_smp@vnu.edu.vn
https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4724

vitro với độ nhạy và độ đặc hiệu cao mà chi phí và thời gian thực hiện được rút ngắn trở nên rất cần thiết. Việc phát hiện các hợp chất hướng đích là các thụ thể thần kinh trung ương góp phần làm rõ cơ chế tác dụng của thuốc thử, tìm ra dược chất tiềm năng cho phát triển thuốc. Thụ thể thần kinh trung ương tái tổ hợp trở thành công cụ hiệu quả cho nghiên cứu dược lý phân tử này bởi khả năng biểu hiện mạnh và đồng nhất trên các dòng tế bào động vật so với dạng tự nhiên. Chính vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành với mục tiêu xây dựng mô hình sàng lọc *in vitro* các hoạt chất hướng dựa trên các thụ thể GPCR tái tổ hợp phân bố ở hệ thần kinh trung ương, đánh giá kết quả bước đầu với thụ thể neurokinin -1 (viết tắt là NK1R). Mô hình này phản ánh một ứng dụng trực tiếp của công nghệ protein tái tổ hợp trong việc nghiên cứu phát hiện, thiết kế và phát triển các dược chất có tiềm năng mới. Thụ thể được biểu hiện sử dụng hệ thống vector Semliki Forest Virus (viết tắt là SFV) như mô tả ở tài liệu [4]. Đây là một trong những hệ thống biểu hiện được đánh giá là hiệu quả nhất trên các dòng tế bào động vật [5].

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị thuốc thử

Dịch chiết tổng số dược liệu được pha trong dung môi thích hợp đến nồng độ gốc 50 mg/ml, sẵn sàng cho định lượng các hợp chất quan tâm bằng các kỹ thuật hóa phân tích như HPLC hoặc các phép thử tương tác với thụ thể.

Để thử tương tác với thụ thể, dịch chiết và tinh chất được pha loãng theo dãy logarit với nồng độ phổ biến được sử dụng lần lượt là 10^{-1} - 10^{3} µg/mL và 10^{-3} - 10^{3} µM. Thuốc thử sẽ được bổ sung vào đĩa nuôi tế bào theo tỉ lệ 1/9 về thể tích để đảm bảo thể tích dung môi < 2% thể tích phép thử, đồng thời nồng độ dịch chiết cao nhất đạt 10^{-3} µg/mL.

Biểu hiện thụ thể tái tổ hợp trên tế bào động vật sử dụng hệ thống Semliki Forest Virus

Bước đầu tiên, chúng tôi sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử để tạo ra cDNA mã cho các thụ thể từ các mẫu sinh phẩm. Sau đó, 4 cDNA mã hóa cho 4 thụ thể phân bố ở hệ thần kinh trung ương là NK1R, $GABA_A$, benzodiazepine và histamine H1 được lựa chọn chuyển vào vector nhân dòng pSFV. pSFV mang cDNA thụ thể và vector pSFV-helper được đồng biến nạp bằng xung điện vào tế bào BHK để nhanh chóng tạo hạt virus SFV với số lượng lớn. Hạt virus tiếp theo được hoạt hóa bằng α-chymotrypsin và lây nhiễm vào các dòng tế bào động vật có vú (vốn bình thường không biểu hiện loại thụ thể tương ứng), cho phép nhanh chóng tạo ra lượng lớn tế bào biểu hiện thụ thể tái tổ hợp.

Thực hiện phép thử tương tác với thụ thể để sàng lọc nhanh dược liệu

Nghiên cứu dược lý in vitro của các thuốc thử với thụ thể tái tổ hợp được đánh giá qua tương tác trực tiếp bằng cách sử dụng phối tử đánh dấu (với thụ thể $GABA_A$, benzodiazepine, histamine H1 có phối tử cạnh tranh tương ứng là GABA, diazepam và Promethazin-HCl) và gián tiếp qua phép thử chức năng (phép thử Fura-2 với thụ thể NK1 có chất chủ vận tương ứng là Substance P (viết tắt là SP) và chất đối vận là Apipretant (viết tắt là AP). Các phép thử được thiết kế trên đĩa 96 giếng như hình 3. Mỗi phân tích với đều được lặp lại 3-4 lần. Các nghiên cứu định lượng thành phần hóa học của mỗi dịch chiết có thể được tiến hành song song để tìm mối quan hệ giữa hàm lượng các chất hóa học trong các dịch chiết tương ứng với hoạt lực của chúng.

3. Kết quả nghiên cứu

Xây dựng hệ thống vector mang cDNA mã hóa cho các thụ thể tái tổ hợp

Chúng tôi đã xây dựng được hệ thống 24 vector mang cDNA mã hóa cho 24 loại GPCR khác nhau, bảo quản lâu dài ở dạng plasmid DNA ở -80ºC.

Nghiên cứu dược lý in vitro của các thuốc thử với thụ thể hệ thần kinh trung ương tái tổ hợp

Thông số động học của thuốc thử (EC_{50}/K_d đối với chất chủ vận; hoặc IC_{50}/K_i đối với chất đối vận) ở Bảng 1 được xác định qua đường cong Liều - Đáp ứng.

Bảng 1. Thông số động học của thuốc thử với thụ thể nghiên cứu

Thụ thể	Phối tử	Thông số động học
Neurokinin-1	Substance P	K_d = 7,32 ± 1,24 nM
	Aprepitant	K_i = 41,1 ± 9,90 nM
$GABA_A$	GABA	K_i = 100,8 ± 3,27 nM
Benzodiazepine	Diazepam	K_i = 19,4 ± 2,15 nM
Histamine H1	Promethazin-HCl	K_i = 3,3 ± 0,26 nM

Thiết kế kit sàng lọc hoạt chất hướng đích với thụ thể neurokinin-1

Hình 2. Bộ kit biểu hiện thụ thể Neurokinin -1 tái tổ hợp của người (hNK1-R) dùng cho 1 đĩa 96 giếng.

Để thuận tiện cho người sử dụng, bộ kit thử thuốc với thụ thể NK1R được thiết kế gồm 6 ống, lần lượt chứa: tế bào CHO, hạt virus SFV mang gen mã NK1R, α-chymotrypsin, aprotinin để dừng phản ứng hoạt hóa virus, chất chủ vận SP và chất đối vận AP (hình 2). Quy trình biểu hiện và dùng NK1R để thử thuốc được mô tả trong hình 3. Khi tiến hành nghiên cứu, người sử dụng chỉ cần thao tác từ bước hoạt hóa virus bằng α -chymotrypsin, cho lây nhiễm vào tế bào CHO để tạo dòng tế bào CHO biểu hiện mạnh NK1R sau 24 giờ nuôi cấy.

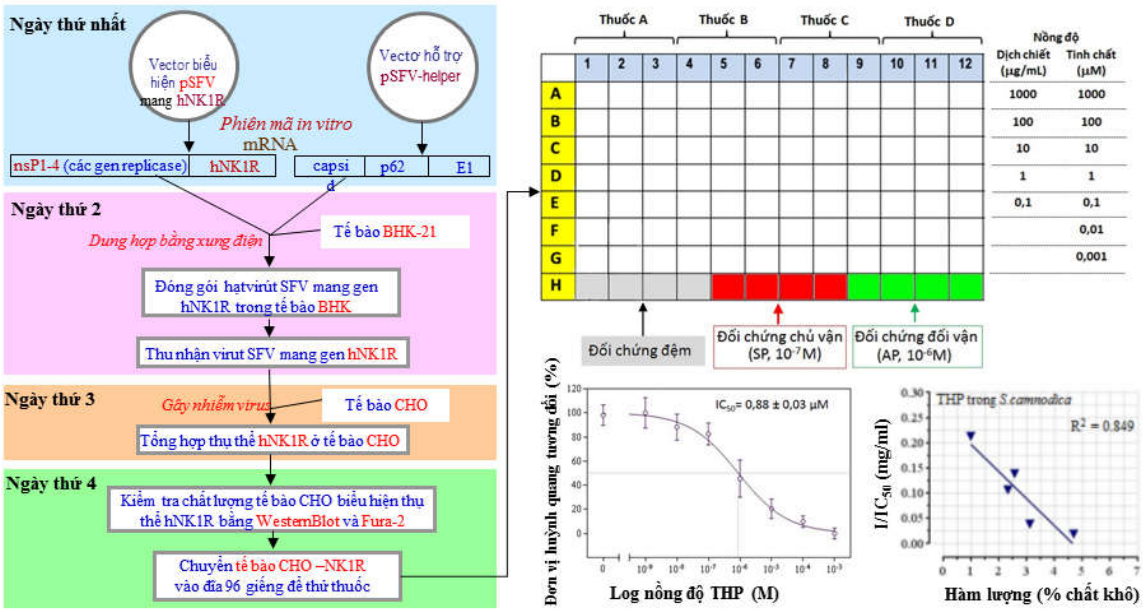
Áp dụng bộ kit này, chúng tôi cũng thành công trong việc sử dụng thụ thể NK1R tái tổ hợp để sàng lọc nhanh dịch chiết methanol và tinh chất thu từ 10 loài cây dược liệu cổ truyền Việt Nam bao gồm Canh ki na (*Cinchona officinalis* L), Đảng sâm (*Codonopsis javanica* Blume), Cỏ mần trầu (*Eleusine indica* L), Ba kích (*Morinda officinalis* How), Râu mèo (*Orthosiphon stamineus* Benth), Sâm vũ diệp (*Panax bipinnatifidus* Seem), Tam thất hoang (*Panax stipuleanatus* Tsai & Feng), Hồ tiêu đen (*Piper nigrum* L), Hòe (*Stypnolobium japonicum* (L.) Schott) và Bình vôi (*Stephania cambodica* Gagnep), công bố một số kết quả chính trên tạp chí Planta Medica Letters [6]. Chúng tôi bước đầu nhận định thụ thể NK1R là đích dược lý đáng quan tâm đối với tetrahydropalmatine (viết tắt là THP, còn có tên khác là rotudin) chiết xuất từ Bình vôi. Như kết quả ở Hình 3, có mối tương quan chặt giữa hàm lượng THP được phân tích trong các mẫu Bình vôi với dược lực (I/IC_{50}) trong các các dịch chiết (giá trị $R^2 = 0.849$).

4. Thảo luận

Thụ thể neurokinin -1 (viết tắt là NK1R) là đích tác dụng của các nhiều thuốc an thần, giảm đau, kháng viêm, tăng cường miễn dịch, chống nôn trong điều trị ung thư [7]. Việc xác định được THP từ cây Bình vôi có hoạt tính ức chế NK1R ở cấp độ invitro tương đồng với các tác dụng sinh lý được biết từ lâu của chúng và một số kết quả nghiên cứu dược lý invivo [8]. Ở góc độ khác, sự biến động về hàm lượng các chất và hoạt độ ức chế thụ thể giữa các dịch chiết trong cùng một loài ủng hộ cho quan điểm tiêu chuẩn hóa dược liệu trong quá trình sản xuất thuốc là hết sức cần thiết. Theo đó, việc sử dụng các mô hình thụ thể tái tổ hợp sẽ cung cấp một công cụ mạnh cho các nghiên cứu dược lý học phân tử và sàng lọc thuốc từ các nguồn dược liệu Việt Nam cũng như tiêu chuẩn hóa các chế phẩm từ

chúng. Hiện nay không chỉ Việt Nam mà trên thế giới, xu hướng phát triển các thuốc dược liệu có thành phần từ tự nhiên nhưng được nghiên cứu cơ chế tác động rõ ràng, tối ưu thành phần, có thử nghiệm bài bản ngày càng phát triển bởi chúng ít gây tác dụng phụ, phù hợp với quy luật sinh lý của cơ thể hơn các thuốc tân dược. Bên cạnh đó, các nhà khoa học hi vọng từ nguồn dược liệu tự nhiên và vốn trí tuệ bản địa của các cộng đồng dân tộc, qua nghiên cứu có thể cung cấp những hợp chất có hoạt tính sinh học cao, giúp tạo ra các loại thuốc mới có hiệu quả chữa cho các bệnh hiểm nghèo còn chưa có thuốc đặc trị.

Trong mô hình này, các hợp chất có hoạt tính tương tác đặc hiệu với các thụ thể đích thường được xem là các dược chất tiềm năng và tiếp tục được thử nghiệm ở cấp độ cơ thể (trên động vật thí nghiệm và lâm sàng). Những hiểu biết về sự hoạt hóa thụ thể còn cho phép phát triển các thuốc theo cơ chế "Biased agonism", trong đó thuốc sử dụng là chất chủ vận thay thế có khả năng kích hoạt đường dẫn tín hiệu nội bào mong muốn, giảm thiểu các phản ứng phụ không mong muốn của con đường tín hiệu do chất chủ vận sinh lý kích hoạt [9].



Hình 3. Các công đoạn trong quá trình sàng lọc thuốc, lấy ví dụ với thụ thể thụ thể neurokinin -1 và kết quả của tetrahydropalmatine (viết tắt là THP) chiết xuất từ Bình vôi.

Hiện nay có rất nhiều phép thử tương tác với thụ thể được sử dụng. Mỗi phương pháp có ưu và nhược điểm riêng và quyết định sử dụng phương pháp nào phụ thuộc vào tính sẵn có, chi phí của thuốc thử, thiết bị cũng như các tính chất dự kiến của các phân tử đích. Hầu hết các công nghệ sàng lọc hiện nay dựa vào các cơ chế hoạt động của GPCR cổ điển như khả năng liên kết phối tử, liên kết GTP, hình thành cAMP hay sự thay đổi Ca^{2+} nội bào. Sự phát triển của công nghệ cho phép việc sàng lọc đạt được những tiến bộ to lớn trong những năm gần đây. Các phép thử chức năng ngày càng đơn giản hơn và nhanh hơn khi thực hiện trên các đĩa 96 giếng hay 384 giếng kết hợp với tự động hóa. Mấu chốt đưa hiệu suất sàng lọc theo mô hình này lên cao là sử dụng hệ thống vector SFV để tạo ra lượng lớn tế bào động vật biểu hiện mạnh

một loại GPCR tái tổ hợp. Một bình T75 nuôi cấy tế bào BHK tạo ra lượng virus đủ để lây nhiễm cho 20 bình T75 chứa tế bào CHO đạt độ đồng dòng 70 đến 80%. Quá trình để virus được hoạt hóa, lây nhiễm và biểu hiện trên tế bào CHO chỉ mất 24 giờ và sau đó mỗi bình T75 này đủ cung cấp tế bào biểu hiện thụ thể tái tổ hợp cho 3 đĩa 96 giếng. Ngoài ta, SFV có ưu điểm nữa là có thể lây nhiễm trên nhiều dòng tế bào động vật có vú [10]. Vật chủ tối ưu biểu hiện các gen mã cho GPCR của người hiển nhiên chính là các tế bào động vật có vú với đầy đủ các cơ chế biến đổi, vận chuyển cũng như sự có mặt của G-protein. Các vector SFV nhiễm trên tế bào động vật có vú có thể cải thiện mức độ biểu hiện một cách hiệu quả nhờ có khả năng di chuyển từ tế bào chủ này sang tế bào chủ khác và có các promoter rất mạnh, những promoter này được đánh giá là "đỉnh cao" của biểu hiện gen. Xét về tính an toàn, SFV không gây bệnh truyền nhiễm ở người và được coi là ít nguy hiểm cho nhân viên phòng thí nghiệm hơn các virus cùng họ khác. SFV được phân loại là virus an toàn sinh học độ 3 ở Mỹ và cấp độ 2 ở Châu Âu (E. C. Council Directive 93/88/EEC, 1993) [11]. Ngoài ra, hệ vector SFV chúng tôi sử dụng cũng được thiết kế để tăng tính an toàn nhờ một số yếu tố như: các vector cDNA được sử dụng đều có nguồn gốc từ một dòng đã được làm suy yếu khả năng gây bệnh; các gen cấu trúc và các gen tái bản của SFV được tách và tái cấu trúc thành 2 vector riêng biệt (vector nhân dòng và helper) nên virus mất khả năng tái sản xuất sau khi lây nhiễm; phức protein p62 (gồm E3và E2) không được phân tách thành 2 tiểu phần do có 3 thay đổi về axit amin nên virus chỉ nhiễm sau khi hoạt hóa bằng chymotrypsin.

5. Kết luận

Chúng tôi đã xây dựng được mô hình sàng lọc *in vitro* hoạt chất hướng đích tác động qua thụ thể hệ thần kinh trung ương sử dụng hệ thống biểu hiện Semliki Forest Virus trên tế bào động vật; bước đầu áp dụng thành công với thụ thể neurokinin -1.

Tài liệu tham khảo

[1] Lim W.K., GPCR drug discovery: novel ligands for CNS receptors, Recent Pat CNS Drug Discov. 2 (2007) 107.

[2] Zhu M., Bowery N.G., Greengrass P.M., Phillipson J.D., Application of radioligand receptor binding assays in the search for CNS active principles from Chinese medicinal plants, J. Ethnopharmacol. 54 (1996) 153.

[3] John A. G., Roger A. N., Basic & Clinical Pharmacology - Chapter 21: Introduction to the Pharmacology of CNS Drugs, McGraw-Hill Education, 2015.

[4] Phạm Thị Hồng Nhung, Hoàng Thị Mỹ Nhung, Đinh Đoàn Long, Cải biến vectơ hệ Virus Semliki Forest (SFV) nhằm biểu hiện thụ thể GPCR của người Việt Nam, Tạp chí Khoa học ĐHQGHN: Khoa học Tự nhiên và Công nghệ 31 (2015) 47.

[5] Berglund P., Sjoberg M., Garoff H., Atkins G.J., Sheahan B.J., and Liljestrom P., Semliki Forest virus expression system: production of conditionally infectious recombinant particles, Biotechnology 11 (1993) 916.

[6] Dinh DL, Pham THN, Hoang TMN, Trinh TC, Vo TTL, Pham TH, Kenneth L., Interaction of Vietnamese medicinal plant extracts with recombinantly expressed human neurokinin-1 receptor, Planta Medica Letters, 2(2015)42.

[7] Rosso M., Mũ Noz M., Berger M., The Role of Neurokinin -1 Receptor in the Microenvironment of Inflammation and Cancer, The Scientific World Journal, 2012 (2012)1.

[8] Tô Việt Bắc, Bùi Minh Đức, Phạm Thị Kim, Thử nghiệm khả năng gây độc trên chuột của chế phẩm rotundin, Tạp chí Y hoc Việt Nam, 7(1994)46.

[9] Violin J.D., Crombie A.L., Soergel D.G., Lark M.W., Biased ligands at G-protein-coupled receptors: promise and progress, Trends Pharmacol Sci, 35(2014) 308.

[10] Lundstrom K., Henningsen R., Semliki Forest virus vectors applied to receptor expression in cell lines and primary neurons, J. Neurochem 71 (1998).

[11] Federal Register 58 No. 19, Addition of Appendix DL-X to the NIH guidelines regarding Semliki Forest virus. Human Gene Therapy. 1993. p.5.

Establishment of an *in vitro* Screening Model of Bioactive Compounds Using the Recombinant Central Nervous System Receptors

Pham Thi Hong Nhung, Dinh Doan Long

VNU School of Medicine and Pharmacy, 144 Xuan Thuy, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

Abstract: The central nervous system receptors are important targets of the drugs, involved in many neurological diseases. Therefore, this study was designed to build an in vitro screening model using recombinant receptors distributed in the central nervous system (CNS). **Method:** construction of cDNA system encoding for receptors; using Semliki Forest virus for the rapid and high expression of receptors in mammalian cell lines; designing binding assays for in vitro pharmacological studies of compounds and methanol plant extracts. **Results:** 24 cDNAs encoding for receptors and 1 screening kit with neurokinin-1 receptor were constructed; 4 receptors were expressed successfully. **Conclusion:** The in vitro screening model was established successfully and applied for NK1 receptors with high sensitivity and specificity. This model is a useful tool for discovery and development of target compounds acting in the CNS.

Keywords: Recombinant CNS receptors, an *in vitro* screening assays, bioactive compounds, Semliki Forest virus.