

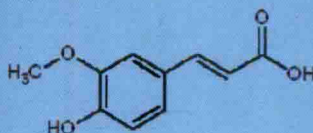
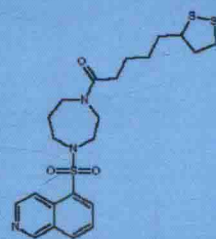
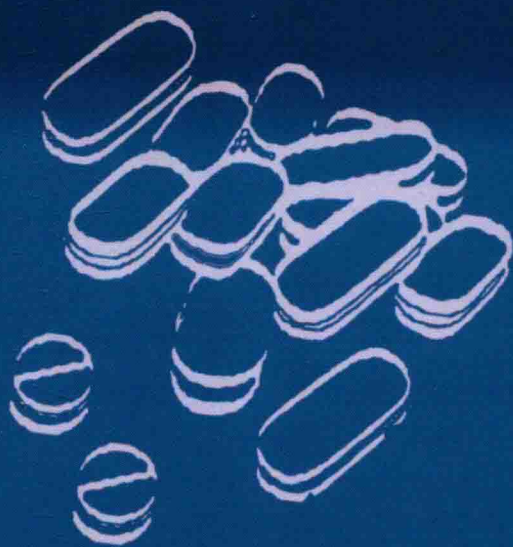


普通高等教育“十三五”规划教材

药物筛选和成药性评价的 基础与实践

The Basics and Practice of Drug Screening and Druggability Evaluation

皮荣标 主编



中山大学出版社
SUN YAT-SEN UNIVERSITY PRESS

流外借



普通高等教育“十三五”规划教材

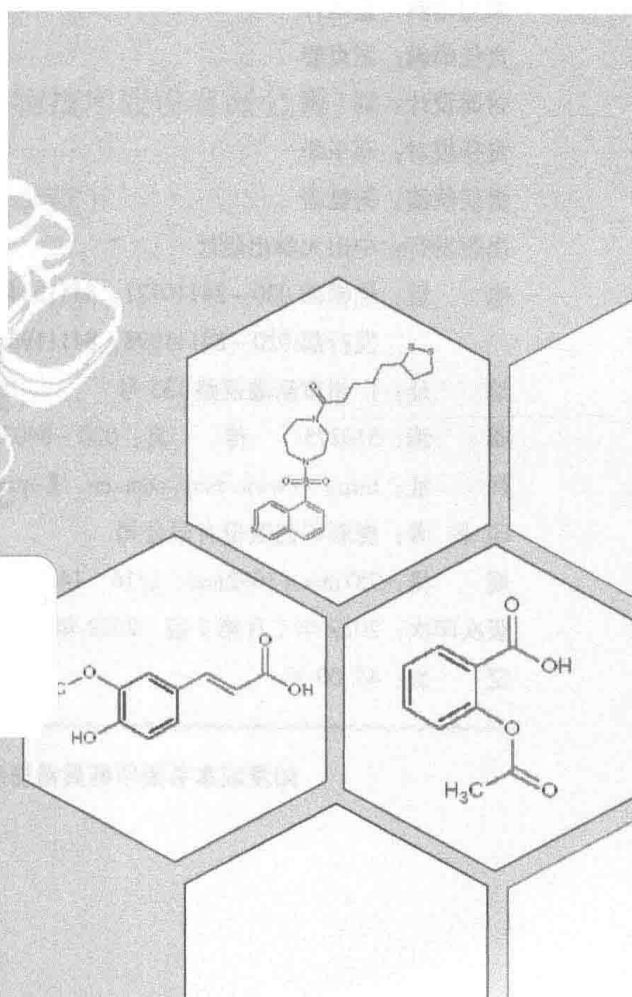
药物筛选和成药性评价的基础与实践

皮荣标 主编



中山大学出版社
SUN YAT-SEN UNIVERSITY PRESS

· 广州 ·



版权所有 翻印必究

图书在版编目 (CIP) 数据

药物筛选和成药性评价的基础与实践/皮荣标主编. —广州: 中山大学出版社, 2019. 1

ISBN 978 - 7 - 306 - 06444 - 8

I. ①药… II. ①皮… III. ①药理学—医学院校—教材 IV. ①R96

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2018) 第 214983 号

YAOWUSHAIXUAN HE CHENGYAOXINGPINGJIA DE JICHU YU SHIJIAN

出 版 人: 王天琪

策划编辑: 金继伟

责任编辑: 谢贞静

封面设计: 刘 桦

责任校对: 邓子华

责任技编: 何雅涛

出版发行: 中山大学出版社

电 话: 编辑部 020 - 84110771, 84113349, 84111997, 84110779

发行部 020 - 84111998, 84111981, 84111160

地 址: 广州市新港西路 135 号

邮 编: 510275 传 真: 020 - 84036565

网 址: <http://www.zsup.com.cn> E-mail: zdcbs@mail.sysu.edu.cn

印 刷 者: 虎彩印艺股份有限公司

规 格: 787mm × 1092mm 1/16 14 印张 330 千字

版次印次: 2019 年 1 月第 1 版 2019 年 1 月第 1 次印刷

定 价: 45.00 元

如发现本书因印装质量影响阅读, 请与出版社发行部联系调换

本书编委会

主 编 皮荣标

副主编 李 民 钟国平 邱玉文

李卓明 陈健文 陈少锐

编 委 (按姓氏笔画排序)

皮荣标 (中山大学药学院)

李 民 (中山大学药学院)

李卓明 (中山大学药学院)

邱玉文 (广州博济医药生物技术股份有限公司)

陈少锐 (中山大学中山医学院)

陈江英 (中山大学药学院)

陈健文 (中山大学药学院)

钟国平 (中山大学药学院)

前 言

21 世纪经济社会的高度发展,对医药学教育产生了深刻的影响。实验教学是对医药专业学生的实践能力和创新能力培养的重要方法和途径。药理学是医药学各专业重要的基础课程,其科学理论源自新药创新实验和临床实践检验,为重要的课程之一。药物发现的综合性系列大实验是药理教学中不可缺少的组成部分,是为了完善药学本科教学体系,使药学系本科生掌握药物研发的基本技术与方法,熟悉新药发现的常规流程,了解药物筛选的模型及疾病模型的复制等理论与实验技能,培养学生综合应用所学药专业知识。在本课程的教学实践中,使学生进一步巩固所学的基础理论,掌握药物研发实验的基本操作方法和技能,培养学生理论联系实际、科学严谨的工作程序与求实作风。

药物发现的综合性系列大实验教材是实施实践教学的重要依据,也是提高实验教学质量的重要保证。为适应药学教学改革的需要,培养实用创新人才,编者根据多年的教学和新药评价经验,结合教学和新药申报的要求编写了本书。

本书为高校医药相关专业药理学课程的配套实验教材。全书紧扣药理学课程教学要求,紧密结合医药行业应用实际需要,体现系统性、科学性、实用性与创新性。教材分为基础理论与实践应用部分,包括药物筛选的方法与技术、药效学研究方法与技术、非临床药代动力学研究的方法与技术和安全药理学研究方法与实践两部分内容。本书的特色之处在于紧扣医药行业需求,介绍和实践在理论基础指导下的实用技术技能,促使产、学、研相结合,力求学以致用。本书旨在帮助学生在系统学习药理学时,加深学生对药理基本知识、基本理论的理解,加强学生对药理实验技术技能的掌握,培养学生的动手能力、创新能力和解决实际问题的能力,学习后能很快胜任药物筛选和成药性评价的工作。本书可供高校医药相关专业本科、专科学生使用,也可作为药理学实验研究工作者和从事药物评价的科研人员的参考用书。

由于编者水平有限,书中不妥之处在所难免,恳请广大专家、师生批评指正,使之更加丰富、完善,更适合医药创新人才的培养。

编者

2018 年 7 月于广州

目 录

第一编 理 论 基 础

第一章 药物筛选的方法与技术	1
一、概述	1
二、药物筛选新技术	1
三、药物筛选技术的应用及研究现状	6
四、抗肿瘤药物的筛选方法	7
第二章 非临床药代动力学研究的方法与技术	11
一、概述	11
二、药物的体内过程	11
三、药代动力学参数	12
四、非临床药代动力学研究内容与方法	14
五、非临床药代动力学研究在新药研发与评价中的作用	18
第三章 毒理学研究方法与技术	21
一、概述	21
二、经典毒理学研究方法	22
三、整体动物在药物毒理学研究中的应用	26
四、体外替代实验技术的发展	27
五、组学技术的发展	28
第四章 安全药理学研究方法与技术	29
一、研究目的	30
二、基本原则	30
三、试验设计的基本要求	31
四、数据处理与结果评价	37
第五章 药效学研究方法与技术	38
一、基本概念	38
二、研究内容	38

三、药效学研究的目的地及意义	38
四、药效学研究的常用方法	39
五、用动物实验评价新药的要点	43
六、药效学研究的一般原则	44

第二编 实 验

第一章 药物筛选实验	45
实验一 抑制细胞增殖化合物筛选	45
实验二 蛋白酶 Caspase-3 抑制剂筛选	48
实验三 NF κ B 核转位化合物筛选	52
实验四 抗谷氨酸诱导的 HT-22 细胞损伤化合物筛选	55
实验五 抗 AChE/BuChE 化合物筛选	57
实验六 化合物 $\times \times \times$ 体外抑菌 MIC 测定实验	60
第二章 非临床药代动力学实验	63
实验一 HPLC - MS/MS 测定 SD 大鼠血浆化合物 $\times \times \times$ 浓度的 方法建立与确证	63
实验二 SD 大鼠单次灌胃化合物 $\times \times \times$ 后的药代动力学研究	69
实验三 SD 大鼠单次静脉注射化合物 $\times \times \times$ 后的药代动力学研究	74
第三章 毒理学与安全药理学实验	79
实验一 化合物 $\times \times \times$ 腹腔注射 KM 小鼠急性毒性试验 (LD_{50} 测定)	79
实验二 针对中枢神经系统的安全药理学考察	87
实验三 针对心血管系统和呼吸系统的安全药理学考察	88
第四章 药效学实验	90
实验一 化合物 $\times \times \times$ 抗大鼠局灶性脑缺血损伤实验	90
实验二 化合物 $\times \times \times$ 抗裸鼠/普通小鼠皮下移植肿瘤实验	93
实验三 化合物 $\times \times \times$ 抗小鼠肠道细菌感染实验	96
实验四 化合物 $\times \times \times$ 抗二甲苯导致的小鼠耳廓肿胀实验	99
实验五 化合物 $\times \times \times$ 抗东莨菪碱诱导的学习记忆障碍实验	100
实验六 化合物 $\times \times \times$ 抗高血压实验	103
实验七 化合物 $\times \times \times$ 降血脂及抗动脉粥样硬化实验	107
实验八 化合物 $\times \times \times$ 对 STZ 诱导的 II 型糖尿病大鼠药效学实验	110

附 录

附录 1	微型化合物库	115
附录 2	常用抗肿瘤实验所用细胞株 (NCI-60)	119
附录 3	常用剂量换算表	122
附录 4	药物安全药理学研究技术指导原则	124
附录 5	药物单次给药毒性研究技术指导原则	129
附录 6	药物非临床药代动力学研究技术指导原则	138
附录 7	中药、天然药物综述资料撰写的格式和内容 的技术指导原则	153
附录 8	药品注册申报资料的体例与整理规范	160
附录 9	药物筛选与成药性评价常用试验记录模板	165

第一编 基础理论

第一章 药物筛选的方法与技术

一、概述

药物筛选就是对新的可能被研制成药物的各种物质，包括天然的或化学合成的化合物、蛋白多肽、天然产物和海洋产物等，应用适当的筛选方法和筛选技术，检测其可能存在的药理活性，确定待研究的先导化合物，为开发新药提供实验依据。这一研究过程是待开发药物从实验室研究到临床应用的重要纽带，也是提高研发效率、缩短周期、减少成本、降低风险，使新药研发能够持续进行的关键。药物筛选历史悠久，所采用的筛选技术、筛选方法也在不断进步；而新技术的应用，促进了药物筛选的发展。目前，药物筛选技术大致可以分为四种，即分子水平筛选、细胞水平筛选、整体动物水平筛选和虚拟筛选。

二、药物筛选新技术

（一）分子水平筛选技术

生物大分子是构成生命的重要基础物质，主要包括核酸、蛋白质和糖类等。生命现象的发生依赖于大分子的结构和功能以及生物大分子之间的相互作用。因此，对其结构和功能以及分子间相互作用的研究，有助于在分子水平上认识生命的本质。以病理模型中起关键调控作用的生物大分子为靶标，运用高科技手段进行药物筛选，从而发现有生物活性的药物，是一种广泛应用于药物筛选的方法。

1. 高通量药物筛选技术

高通量筛选（high-throughput screening, HTS）技术产生于 20 世纪 80 年代后期，

它是在传统的筛选技术的基础上,应用先进的分子生物学、细胞生物学、计算机和自动化控制等学科寻找新药的一种高新技术,是利用以药物作用靶点为主要对象的细胞和分子水平的筛选模型,根据样品和靶点结合的表现,判断化合物生物活性的一种技术方法,具有微量、快速、灵敏、准确和高效等特点。

HTS 体系由 5 部分组成:①化合物样品;②分子细胞水平的特异性体外体内筛选模型;③高灵敏度检测系统;④自动化操作系统;⑤数据库管理系统。化合物样品主要从天然产物和人工合成化合物中分离纯化。从天然产物中分离出的化合物,母核结构和活性基团是长期自然选择形成的,所表现出来的生物活性具有人工合成化合物所不能比拟的优势。与此同时,组合化学和组合化合物库的应用就是为了适应 HTS 而发展起来的新兴领域,不仅为创新药物的发现提供了基础,也对 HTS 效率提出新的要求,使 HTS 朝着日筛选规模越来越大、速度越来越快的方向发展。目前,已经形成了可日筛选 10 万样次的超高通量筛选技术 (ultra high throughput screening, uHTS)。

HTS 筛选模型以分子水平居多。根据生物分子的类型,分子水平的药物筛选模型主要分为受体、酶、离子通道、基因和其他类型的模型,其特点是药物作用靶标明确,应用这些模型可以直接得到药物作用机制的信息。以作用于酶的药物筛选为例,主要是观察药物对酶活性的影响。将酶、底物、待筛选药物及相应的溶剂通过自动化的移液操作系统加入到微孔板中,反应后,将微孔板放入到具有高灵敏度的检测系统中,如酶标仪,根据反应体系的特点,进行光吸收检测、荧光检测或者化学发光检测等,检测结果通过强大的计算机处理系统分析处理后导出,从而筛选出有活性的药物。整个过程可以完全自动化,高效快速,减少人为因素干扰,提高实验结果的准确性和可靠性 (图 1-1-1)。

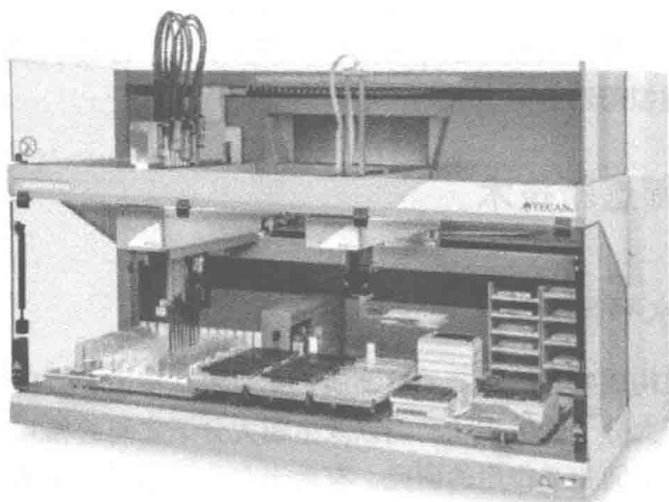


图 1-1-1 高通量筛选系统

2. 表面等离子共振技术

表面等离子共振 (surface plasmon resonance, SPR) 是指当一束平面单色偏振光以一定角度入射到镀在玻璃表面的薄层金属膜上发生全反射时, 若入射光的波向量与金属膜内表面电子的振荡频率相一致, 则光线被耦合入金属膜, 引发电子共振。共振的产生会使反射光的强度在某一特定的角度大大减弱, 反射光消失的角度称为共振角。共振角的大小随金属表面折射率的变化而变化, 而折射率的变化又与金属表面结合物的分子质量成正比。由此, 20 世纪 90 年代, 发展出了应用 SPR 原理检测生物传感芯片 (biosensor chip) 上的配体与分析物作用的新技术。

在 SPR 技术中, 待测生物分子被固定在生物传感芯片上, 另一种被测分子的溶液流过表面, 若二者发生相互作用, 则芯片表面折射率会发生变化, 从而引起共振角的改变, 通过检测该共振角的变化, 来实时监测分子间相互作用的动力学信息。虽然 SPR 筛选通量不及 HTS, 但其不需要任何标记, 能在更接近生理溶液环境中直接研究靶标和分析物的相互作用, 因此 SPR 在药物研究中占据着重要地位。SPR 技术主要应用于核酸和小分子、蛋白和小分子、蛋白和蛋白、核酸和蛋白之间的相互作用分析, 得到两者之间的相互作用曲线及动力学参数, 为进一步的研究提供可靠的数据支撑。

3. 基因工程技术

基因工程技术也被称为重组 DNA 技术, 将基因工程技术方法 (如重组受体、转基因动物、基因探针等) 应用于药物筛选中, 在发现和研制新药过程中有非常重要的作用。

(1) 重组受体与药物筛选。受体技术 (receptor technology, RT) 就是利用从器官中分离出的细胞膜受体, 将其作为模型, 在体外试管中研究药物。传统受体是从大量的组织匀浆中提取制备的, 随着分子生物学技术在药理学领域中的渗透, 研究者能够把受体或受体的亚型从人体组织中克隆出来, 然后再在微生物或哺乳动物细胞内表达。由于受体参与机体的各种生理和病理过程的调控, 并且是药物作用的主要靶点之一, 因此, 应用重组受体筛选药物得到重视和应用。重组受体与传统受体的实验相比较, 具有人源性基因、受体纯度高、制备量大和经济实用等特点。目前, 已经建立了多种重组受体并应用于药物筛选, 如亲代谢型谷氨酸受体、神经肽 Y 受体、A3 肾上腺素受体以及各种细胞因子可溶性受体和各种脂蛋白受体等。但重组受体存在的问题为: 发现疾病通路的关键靶点是一项艰苦的工作, 异源表达有一定的困难。

(2) 基因探针与药物筛选。基因探针是指能识别特异性碱基顺序的有标记的单链 DNA (或 RNA) 分子片断。将基因探针与被检测的基因中的同源互补序列杂交, 从而检测出所要查明的基因, 称之为基因探针技术。目前, 研究者已经尝试将此技术应用于新药筛选中。例如, 研究发现红霉素、四环素、利福霉素和两性霉素等重要的抗生素, 均作用于多聚乙酰生物合成途径, 同样作用于这一生物合成途径的放线紫红素, 在其生物合成基因簇完全研究清楚后, 已经建立了以 act I、act II 等基因片段作为探针, 应用 DNA-DNA 同源杂交技术 (southern 印迹), 直接筛选产生作用于多聚乙

酰途径的抗生素产生菌的方法。

(3) 基因芯片技术与药物筛选。基因芯片技术是将核酸片段种植到一个支持物上(如膜、玻璃或塑料核硅片等),与检测样品杂交后由标记分子对杂交体进行标记,经自动阅读设备分析杂交结果。基因芯片是近年来发展起来的一种能平行、快速地检测基因图表及基因表达的技术方法,是药物筛选的有力工具,在药物靶标筛选、药理学、药物基因组学、毒理学和改变药物作用方式等方面均有广泛的应用。利用基因芯片可进行准确、快速和大信息量的检测,不但缩短筛选所需的时间,而且基因芯片能同时对全部基因变化进行跟踪检测,从基因水平解释药物的作用机制,使开发的新药的安全性得到明显提高,它的突出特点是高通量、高集成、高平行性、微型化及自动化。基因芯片法现已应用于抗菌药物的研究与开发,如病原体的确定、结核分枝杆菌利福平抗药性基因的筛选等。其他应用的领域还包括抗肿瘤药物、内分泌激素类药物等的筛选。更重要的是,用基因芯片技术来筛选和研究开发我国的中药资源,适合我国的国情,可研究开发具有自主知识产权的新药,对于改变我国制药业长期落后的现状,意义重大。

(二) 细胞水平筛选技术

细胞生物学研究已经成为生命科学研究领域中最为重要的部分,尤其步入后基因组时代,科学家们不再简单割裂地研究单个基因或单个蛋白的功能,他们开始从一个功能整体的角度去考虑问题。HTS 技术单指标的筛选方法,已经不能满足药物发现的需要,而且也不利于对化合物活性的综合评价。因此,以多指标多靶点为主要特点的高内涵药物筛选(high content screening, HCS)技术应运而生。HCS 的仪器一般由白色连续光源、多通道滤光片(适于常用的荧光染料)、显微镜模块和进行图像获取的高速高分辨率的 CCD 照相机组成,同时还可以配备细胞培养和自动加样模块进行长时间全自动的实验分析。基于激光的硬件聚焦系统使得自动对焦在 200 ms 之内,再结合软件聚焦,完善了对拍摄对象的快速定位和图像获取。除了图像获取部分外,图像采集、图像分析和数据储存也是高内涵药物筛选设备的主要组成部分(图 1-1-2)。

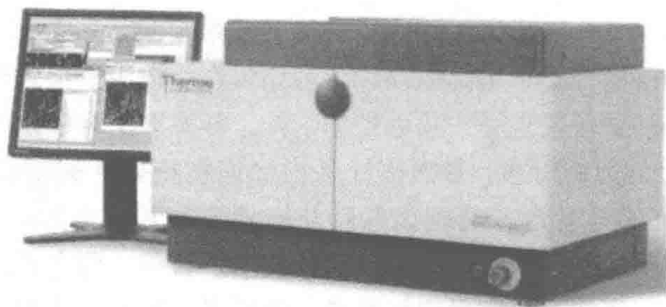


图 1-1-2 高内涵筛选系统

从20世纪70年代, Talyor最早提出高内涵概念开始, 该课题组一直致力于开发定量研究细胞的新工具。1996年, Talyor成立了Cellomics公司, 并于1999年研制开发并生产了世界第一台商用HCS仪器。进入21世纪, 单克隆抗体技术、细胞的制备方法、荧光染料的开发、仪器设备的改进以及计算机的发展, 使得HCS技术作为一项生物检测技术日臻完善, 应用领域日趋广泛。

HCS模型主要建立在细胞水平, 涉及的靶点包括细胞的膜受体、胞内成分和细胞器等, 通过观察和分析样品对固定或动态细胞的形态、生长、分化、迁移、凋亡、代谢及信号转导等多个方面的作用, 最终确定样品的活性和可能的毒性。HCS技术克服了以往细胞研究领域的“串行”研究方法(即细胞周期→细胞毒理→信号转导→代谢调控等)效率低、速度慢的弱点, 在同一个实验中, 就可以完成各种对于细胞生理现象本质的研究。这不仅大大提高了研究效率, 降低了研究成本, 避免了大量的重复劳动, 还获得了比之前成倍, 甚至成百倍的海量数据, 为各项研究提供了第一手实践材料。

(三) 整体动物水平筛选

用整体动物进行药物筛选, 是长期以来倍受重视的方法。单纯从新药筛选的角度看, 整体动物筛选模型的最大优点是可从整体水平直观地反映出药物的治疗作用、不良反应以及毒性作用。由整体动物模型获得的筛选结果, 对预测被筛选样品的临床价值和应用前景具有十分重要的价值。整体动物模型包括正常动物和疾病动物模型。由于正常动物并不能充分反应药物在病理条件下的治疗作用, 在药物筛选中应用更多的是整体动物疾病模型。因此, 研究和制备更多的整体疾病动物模型, 成为药物研究领域长期的重要课题。理想的疾病动物模型应具备的基本条件是病理机制与人类疾病的相似性、病理表现的稳定性和药物作用的可观察性。由于整体动物的特殊性, 决定了药物筛选的过程主要依赖于手工操作, 而且只能对有限的样品进行筛选, 特别是人类目前在实验动物身上复制出的动物疾病模型还十分有限, 使用整体动物模型筛选新药具有显著的局限性、低效率和高成本等不足之处。

转基因动物是用实验方法将外源性基因导入动物的染色体基因组内成功进行整合, 并能遗传给后代的一类动物。由于转基因动物在医学研究中可以真实地体现目的基因的活动特征, 把整体水平、细胞水平、分子水平的研究有机地联系起来, 可在不破坏原有机体运作系统的前提下, 对一个或多个因素进行研究, 使问题简单化。利用转基因动物可建立敏感动物品系和与人类相同疾病的动物模型, 将其用于药物筛选, 避免了传统动物模型与人类某种症状相似的疾病在致病原因、机理方面不尽相同的缺点, 其结果准确、经济、实验次数少, 大大缩短了实验时间, 已经成为研究者进行“药物筛选”的一种实用的科技手段。目前, 培育出较多用于药物筛选研究的转基因动物, 已在抗肿瘤药物、抗艾滋病病毒药物、抗肝炎病毒药物、肾脏疾病药物、抗老年痴呆药物、抗帕金森病药物等的筛选中取得了突破性进展。

目前, 转基因动物存在的问题有: 选择实验动物的种属差异、性别不均衡, 转基

因产物并不一定能长期表达,目的基因能否准确地定位于等位基因上等技术性问题。另外,建立转基因动物模型需明确疾病的基因背景和克隆表达。不过,随着转基因动物技术日臻完善,以目前的发展趋势看,转基因动物作为疾病模型用于药物筛选具有广阔的应用前景。

(四) 虚拟筛选

药物虚拟筛选是一门应用信息科学、计算机科学、生物计算数学、比较生物学等学科的观点和方法对生命现象及其组成分子(核酸、蛋白质等)与药物分子或化学结构间的相互作用进行研究的学科。它以计算机为工具,以互联网为平台,对生物信息进行提取、储存、加工和分析,用信息理论和生物数学的方法去理解和阐述生物大分子与药物分子间相互作用,最终对它们进行处理和应用。

传统药物研究周期长,针对性差,不能做到“快速筛选,精准开发”。药物虚拟筛选通过数学和计算机的分析手段将生命的数据(基因和蛋白)变为可商业化的信息,从而大大缩短药物及生物技术产品开发的时间。药物虚拟筛选可以帮助研究者有目的地了解研制药物的信息,建立自主信息系统,选定目标,针对病因及发病机制开发药物;可以设计正常与疾病状态下生化代谢途径的计算机模型,并在此模型上确定最佳治疗点,获得理想的药理作用目标;更有利于新药的理性设计、从已有药源(天然药物等)筛选未被发现或利用的新活性物质等。同时,可在很短的时间内对上万种待筛选样品进行筛选,使药物筛选速度加快,并对基因变化进行跟踪检测,那些在传统药物筛选方式下难以察觉的副作用也会立即表现出来,极大地提高了新药研发速度。然而,虚拟筛选的所有结果都需要最后的生物学验证。

三、药物筛选技术的应用及研究现状

(一) 国内外药物筛选技术的应用研究现状

高通量筛选(HTS)自提出之日起就显示了其强大的生命力,近10年来的发展更确定了其无可比拟的优势。西方国家的大制药公司纷纷投入巨资研究和开发HTS技术,并利用它进行日常筛选。比如,通过在心律失常发生发展中具有关键作用的离子通道靶点的研究,提出了具有良好理论和试验基础的抗心律失常靶点假说;用于筛选炭疽致死因子抑制剂;应用报告基因检测和3-DQSAR分析方法高通量筛选蜕皮激素特效药。HTS技术为寻找一些治疗严重疾病的药物开辟了新路,如其在Ⅱ型糖尿病药物筛选中的应用就是典型例证。在此基础上,随着生物芯片等生物科技的引入,HTS技术逐步向超高通量药物筛选发展。

HCS技术的问世揭开了药物筛选研究新的一页,使人们从疾病相关基因调控通路和网络水平上研究药物的作用机制、代谢途径和潜在毒性等,也使在细胞水平全面评价活性化合物的成药性成为可能。作为药物筛选技术发展前沿的HCS已在新药研

究的多个方面开始应用,并且随着其操作系统和应用工具的不断开发,成为基于细胞的药物筛选靶点优化、二次筛选、先导化合物的确立以及药物结构与功能关系研究的重要技术手段。HCS 技术在细胞生长、细胞与细胞器形态学变化、信号传导通路和细胞毒性等研究中的应用,进一步体现了它在实际应用中的巨大潜力。

(二) 药物筛选技术的前景与展望

就当前新药筛选的两大技术而言,HTS 技术研究在国内外已比较成熟,并且得到了广泛应用。但应用 HTS 发现创新药物也存在一些问题,如体外模型的筛选结果与整体药理作用的关系,对 HTS 模型的评价标准,筛选模型的新颖性和实用性的统一以及新的药物作用靶点的研究和发现等,仍然是目前药物筛选领域研究的重要课题。HCS 技术虽尚处于发展初期,但它的巨大潜力和在新药研发领域将要占据的地位不容小视。随着现代科学技术的发展,HCS 还将被不断完善与发展,尤其是在荧光检测、HCS 筛选试剂、多功能多参数筛选方法以及与之匹配的软件开发应用等方面都有待进一步发展。

四、抗肿瘤药物的筛选方法

(一) 动物移植性肿瘤实验法

1. 概况

迄今为止,动物移植性肿瘤实验法仍是最通用的方法。现有移植性肿瘤接种成功率接近 100%,可在同一时间内获得大量(几十至数百只或更多)生长相对均匀的肿瘤,以供实验所需。动物多选用小鼠,偶亦见大鼠和地鼠,雌雄皆可,但每批实验只用一个性别;一般给药 7~14 d,在第 8~15 d 可解剖动物获得结果。本方法可以判断在动物耐受剂量下,药物是否有明显抑制肿瘤生长的作用,这是任何体外试验不能代替的,其结果可作为判别抗癌药物临床疗效的根据。

在筛选抗肿瘤药物时,一种药物未必对各种类型的动物移植性肿瘤都有效,选择单一瘤株来筛选可能漏筛药物,特别是当动物肿瘤的生物学特点与人的有较大差距时,假阴性的可能性更大。因此,最好采用 3 种瘤株,即肉瘤、腹水性肿瘤和白白血病瘤株,国内常采用 S180、艾氏癌腹水型和小鼠白血病瘤株。此外,由于动物瘤株恶性程度高,生长迅速,对药物的敏感性比人类自发的癌瘤高得多,因此认为本法的命中率低。美国国立癌症研究所为了寻找对人癌特定细胞有效的药物,采用人癌(主要是肺癌、结直肠癌、乳腺癌、肝癌、胃癌等)细胞株经体外试验法初步筛选有效的药物,然后将人癌细胞接种到 T 细胞免疫缺陷的裸小鼠或免疫抑制小鼠造模,以确证药物对人癌的作用。对于新药,我国在常规方法第一轮筛选有效的基础上,也推荐用人癌细胞异种移植模型进行第二轮筛选。

2. 瘤株选择

目前,临床上常用的抗肿瘤药多数是先经动物移植性肿瘤筛选而发现。从寻找新

药的角度来看,按照我国目前的条件和情况,筛选细胞毒性药物可选用肉瘤 S180 实体型、艾氏癌腹水型 (EAC)、肝癌 Hep 腹水型 (HAC) 或实体型 (H22)、Lewis 肺癌 LL/2、白血病 P388 或 L1210、黑色素瘤 B16、肉瘤 S37、肠癌 C38、C26 及瓦克瘤肉瘤 W256 等瘤株。

3. 疗效评价

(1) 实体瘤要求模型对照组小鼠平均瘤重不小于 1 g, 且瘤重小于 0.4 g 的小鼠不超过 20%。其疗效以肿瘤抑制率 (tumor inhibition ratio) 表示。计算方法如下:

$$\text{肿瘤抑制率}(\%) = (1 - T/C) \times 100\%$$

其中, T 指给药组平均瘤重, C 指模型对照组平均瘤重。

当天然药抑制率大于 30%, 化学药大于 40%, 且经统计学处理有显著差异时, 认为药物可能有效, 需继续重复, 连续 3 次, 若疗效稳定, 则评定此药有一定疗效。

(2) 腹水性肿瘤实验期间逐日记录动物的死亡情况。模型对照组动物通常在 2 ~ 3 w 内全部死亡, 个别存活时间太长需剔除, 但各组亦应相应剔除 1 只。如治疗期间模型对照组动物于 7 d 内的死亡率超过 20%, 则表示实验失败; 若对照组 20% 动物存活 4 w 以上, 则实验亦应作废。治疗组观察时间一般为 30 d (生存超过此限者, 仍按 30 d 计算)。其疗效以生长延长率表示, T 为给药组平均存活时间, C 为模型对照组平均存活时间, 计算公式如下:

$$\text{生长延长率}(\%) = (T/C - 1) \times 100\%$$

(二) 肿瘤细胞体外筛选法

分子药理学、细胞生物学、分子生物学和生物化学等学科的发展为药物筛选提供了新的方向。细胞水平的药物筛选模型具有药物用量少、药物作用机制比较明确和大规模筛选等优点。目前, 在细胞水平上对抗肿瘤天然药物的筛选主要是采用选取几种肿瘤细胞系, 以培养细胞为实验模型, 用结晶紫染色测定法、噻唑蓝法、丽丝胺罗丹明 B 法等检测天然药物及其提取物或单体的体外抗肿瘤作用。

(三) 作用微管蛋白的天然抗肿瘤药物的筛选方法

微管 (microtubule) 是由 $\alpha\beta$ 微管蛋白异二聚体聚合而成的管状聚合物, 是真核细胞骨架的重要组成部分。微管参与许多细胞功能, 包括维持细胞形态、胞内物质的运输、细胞器的定位、鞭毛和纤毛的运动、染色体运动和细胞分裂等。无论是促进微管蛋白聚合、稳定已形成的微管类药物, 还是抑制微管蛋白聚合类药物, 都通过影响肿瘤细胞的有丝分裂过程, 使其生长受到抑制。作用于微管的药物如紫杉醇 (paclitaxel, Taxol) 和长春新碱正是通过上述机制达到抗肿瘤目的, 且与其他类型药物相比具有更好的疗效。因此, 微管已成为临床治疗肿瘤的有效靶点。

(四) 应用肿瘤新生血管生成抑制的筛选方法

实体瘤的生长、浸润和转移依赖于血管生成。肿瘤的新生血管是实体瘤发生发展

的一个重要因素，它为肿瘤的生长提供必需的营养和氧气。在其生成过程中血管内皮生长因子以及酪氨酸激酶受体具有极其重要的作用。目前，已发现有许多天然药物及其有效成分可以通过多种途径来抑制肿瘤新生血管的生成，如人参皂苷 Rg3 和熊果酸等。

（五）端粒酶活性为作用靶点的筛选方法

端粒酶是维持端粒长度的逆转录酶，端粒酶的存在，能够修补 DNA 复制的缺陷，让端粒不会因细胞分裂而有所损耗，使得细胞分裂的次数增加，对细胞增殖、衰老及永生化和癌变起重要作用，在多数肿瘤中表达较高。实验证明端粒酶与恶性肿瘤密切相关，如果端粒酶疗法进展顺利的话，将有望成为肿瘤治疗的新手段。因此，端粒酶已成为当前肿瘤治疗的新靶点。

（六）以 DNA 拓扑异构酶为靶点筛选天然抗肿瘤药物

DNA 拓扑异构酶（DNA topoisomerase）是真核细胞和原核细胞中的基本酶，广泛分布于细胞核内，通过 DNA 链的切割、转移和再连接来改变 DNA 的拓扑结构。DNA 拓扑异构酶在细胞代谢过程中起着极其重要的作用，如 DNA 复制、基因转录、翻译、DNA 重组和有丝分裂等。抗癌药物喜树碱（camptothecin）及其衍生物的作用靶点是真核生物 DNA 拓扑异构酶 I，吡啶类化合物、鬼臼毒素类化合物、异黄酮类化合物、阿霉素等则作用于真核生物 DNA 拓扑异构酶 II。这些药物可通过抑制 DNA 拓扑异构酶 I、II 引起 DNA 双螺旋的一条或两条链的断裂，从而导致肿瘤细胞的死亡。

（七）应用调节细胞信号转导通路的筛选方法

在细胞中，各种信号转导分子相互识别、相互作用，将信号进行转换和传递，构成信号转导通路（signal transduction pathway）。跨膜信号转导的一般步骤包括：特定的细胞释放信息物质，信息物质经扩散或血循环到达靶细胞，与靶细胞受体特异性的结合，受体对信号进行转换并启动细胞内信使系统，靶细胞产生生物学效应。在肿瘤生长、转移过程中起重要作用的一些生长因子及其受体都是通过信号转导起作用的。细胞信号转导异常，会导致恶性肿瘤快速增殖、无限生长。随着近年来分子肿瘤学、分子药理学的发展，信号转导在肿瘤形成过程中的作用机制正在逐步被阐明，信号转导通路已成为抗肿瘤药物研究的新靶点。近年来，部分抗肿瘤药物的研发已从传统的细胞毒药物转移到针对肿瘤细胞信号转导通路的新型抗肿瘤药物。正常细胞和肿瘤细胞在多种信号转导通路的关键组分之间存在巨大差异，因此，靶向这些组分的抗肿瘤药物具有高选择性、高效、低毒的特征。目前，药物干预肿瘤细胞信号转导通路主要是通过环腺嘌呤核苷酸-蛋白激酶 A 通路、酶联受体信号通路、磷脂酰肌醇信号通路、钙和钙调蛋白通路等几个通路实现。