

METHODOLOGY OF NEW TECHNIC AND METHOD PHARMACOLOGY EXPERIMENT

- 抗肿瘤药理实验方法
- 抗衰老药理实验方法
- 抗炎和免疫抑制药理实验方法
- 常见抗肝损伤与抗肝纤维化药理实验方法

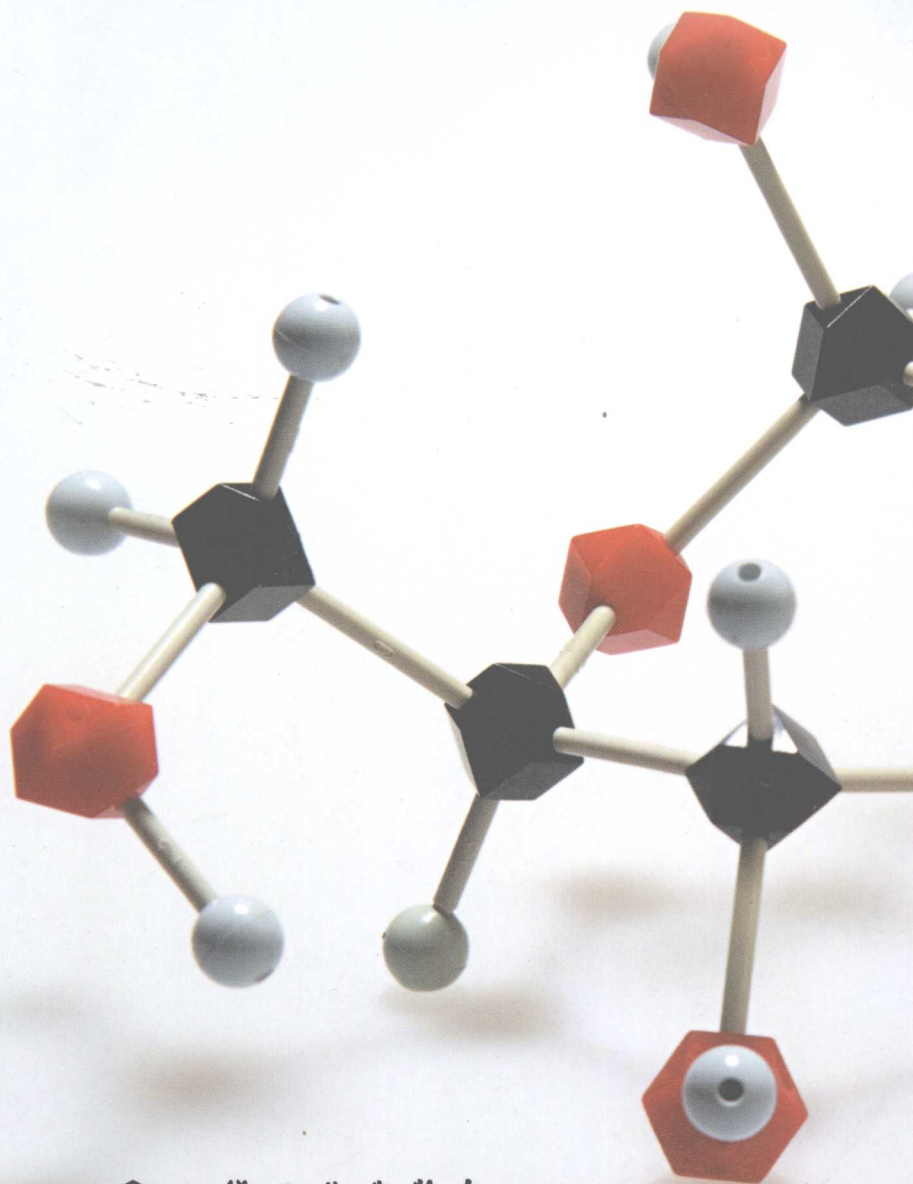
- 降血糖药理实验方法
- 降血脂与降血压药理实验方法
- 抗血栓与抗动脉硬化药理实验方法

- 神经系统药理学实验方法
- 透皮吸收作用的实验方法
- 造血系统药理实验方法
- 中医证的模型实验方法

药理实验方法学 ——新技术与新方法

第二版

刘建文 主编



化学工业出版社
生物·医药出版分社

药理实验方法学

——新技术与新方法

(第二版)
刘建文 主编



化学工业出版社
生物·医药出版分社

· 北京 ·

图书在版编目(CIP)数据

药理实验方法学——新技术与新方法/刘建文主编.
—2版.—北京:化学工业出版社,2007.10
ISBN 978-7-122-01064-3

I. 药… II. 刘… III. 药理学-实验方法
IV. R965.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 137374 号

化学工业出版社
北京

(第二版)
主编 刘建文

责任编辑:杨燕玲
责任校对:王素芹

装帧设计:潘 峰

出版发行:化学工业出版社 生物·医药出版分社
(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷:大厂聚鑫印刷有限责任公司

装 订:三河市万龙印装有限公司

787mm×1092mm 1/16 印张 32 3/4 字数 828 千字 2008 年 1 月北京第 2 版第 1 次印刷

购书咨询:010-64518888 (传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

定 价:69.00 元

版权所有 违者必究

本书编写人员

主 编 刘建文

副 主 编 殷 明 季 光 刘成海

编写人员 (按姓氏笔画排序)

王中奇	王泽剑	王春丽	叶邦策	冯 琴
吕 靖	刘 萍	刘成海	刘建文	闫秀川
李 婷	李长龙	杨靖亚	吴宏忠	何建成
张小东	季 光	周 滔	周时高	郑培永
胡义扬	殷 明	高 峰	陶艳艳	蔡 敏
魏华凤				

第二版前言

人类生命科学研究的新思路、新技术和新方法不断发展,为药理学研究提供了新的技术和方法,同时也极大地促进了药理学研究的进展。本书编写的宗旨,就是应用生命科学研究的新技术、新方法,研究物质的药理学作用及其分子机理。

本书第一版自2003年6月出版,受到广大读者的欢迎,出版社多次印刷发行。在经过4年后,作者应出版社之邀,再次组织有关专家们进行修订、改版。在修订的过程中,我们深感再版的责任与压力。我们力求做到:①继续突出分子水平的研究,为研究物质的作用靶点和分子机理提供可行的实验方法;②强调新颖性的同时,更加突出实用性,在介绍一类药理学实验研究时,尽量多介绍几种实验方法,使读者能根据自己实际研究中的仪器、设备等条件,灵活选用实验方法;③保持精练性,删减了一些实践下来较陈旧的方法,增加了大量新的方法。在第一版的基础上,本版增加的全新章节包括:抗衰老药理实验方法、降血糖药理实验方法、神经系统药理实验方法、造血系统药理实验方法和中医证的模型实验方法。

当然,药理学研究的领域广泛,方法学的发展更是日新月异,本书不可能囊括所有。本书如能对读者有所启示,供其借鉴,则将是作者的最大荣幸!药理实验研究,往往困难重重、失败累累,尽管本书中介绍的方法均经过作者们亲自实践总结,但读者难免还会在实验中遇到不顺。因此我们衷心地希望读者提出批评和指正!

感谢各位同仁和化学工业出版社的编辑对本书的大力支持!感谢各位作者做出的贡献!感谢华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室对本书的支持!

刘建文
2007年10月

目 录

第 1 章 引言	1
1.1 离体实验和在体实验	1
1.2 药理学技术新进展	2
1.2.1 受体技术与药物筛选	3
1.2.2 转基因动物与药物筛选	7
1.2.3 基因探针技术与药物筛选	12
1.2.4 基因芯片与药物筛选	14
1.2.5 药物基因组学	18
1.2.6 蛋白质组学与药物筛选研究	19
1.2.7 代谢组学与药理新进展	21
1.2.8 系统生物学与新药开发	22
参考文献	24
第 2 章 抗肿瘤药理实验方法	26
2.1 移植性肿瘤整体动物实验法	26
2.1.1 人体肿瘤动物体内移植的基本原则	26
2.1.2 实体瘤动物模型的建立和药物疗效评价	27
2.1.3 非实体瘤动物模型的建立和药物疗效评价	29
2.2 抑制肿瘤增殖作用的体外实验方法	29
2.2.1 肿瘤细胞的培养	30
2.2.2 评价方法	31
2.3 抑制诱癌作用的观察	33
2.3.1 诱癌动物模型的建立	33
2.3.2 诱癌的体外模型建立	34
2.4 抗肿瘤转移作用的实验方法	35
2.4.1 转移体内模型的开发与评价	35
2.4.2 肿瘤细胞实验转移体内模型的建立	38
2.4.3 肿瘤细胞转移体外模型的建立	39
2.4.4 培养小室模型建立癌细胞移动实验模型	42
2.4.5 重层培养肿瘤细胞三维模型的建立	43
2.4.6 肿瘤细胞浸润能的分析——复合培养法在体外建立癌细胞浸润模型	45
2.4.7 肿瘤细胞移动能的分析	46
2.4.8 肿瘤细胞分泌 MMP 的分析	49
2.4.9 抑制肿瘤血管新生作用的实验方法	54
2.4.10 肿瘤细胞 Telomerase DNA 的检测	55
2.5 诱导癌细胞凋亡作用的实验方法	66
2.5.1 诱导细胞凋亡的因素	66

2.5.2 细胞凋亡的检测方法	67
2.6 逆转肿瘤耐药性作用的实验方法	81
2.6.1 肿瘤耐药性作用的机制与原理	81
2.6.2 逆转肿瘤多药耐药性作用的药物筛选法	82
参考文献	104
第3章 抗衰老药理实验方法	107
3.1 抗皮肤衰老作用的实验方法	107
3.1.1 皮肤组织的细胞培养	107
3.1.2 紫外线损伤皮肤模型的建立	109
3.2 寿命试验法	110
3.2.1 果蝇寿命延长试验法	110
3.2.2 家蚕寿命延长试验	111
3.2.3 二倍体细胞寿命试验	111
3.3 抑制自由基药理实验方法	112
3.3.1 自由基损伤细胞的体外模型建立	112
3.3.2 自由基测定法	113
3.3.3 氧化应急相关基因 NF- κ B 的检测	124
参考文献	127
第4章 抗炎和免疫抑制药理实验方法	128
4.1 抗自身免疫性疾病的体外模型建立	128
4.1.1 原代培养小鼠脾脏淋巴细胞的刀豆蛋白增殖模型	128
4.1.2 原代培养小鼠脾脏淋巴细胞的脂多糖增殖模型	129
4.1.3 大鼠脾脏 DC 细胞的制备	129
4.1.4 小鼠腹腔巨噬细胞的制备	130
4.1.5 体外混合淋巴细胞反应模型	131
4.1.6 相关细胞因子的测定	131
4.2 抗自身免疫性疾病的体内模型建立	132
4.2.1 自身免疫性肝炎	132
4.2.2 实验性免疫性肝纤维化	140
4.2.3 溃疡性结肠炎	152
4.3 变应性鼻炎	163
4.3.1 卵白蛋白诱导	163
4.3.2 豚草花粉诱导	164
4.3.3 蒿属花粉诱导	164
4.3.4 二异氰酸甲苯酯 (TDI) 诱导	165
4.3.5 观察指标	165
4.4 支气管哮喘	168
4.4.1 哮喘动物模型	168
4.4.2 观察指标	172
4.5 自身免疫性甲状腺炎	174
4.5.1 动物模型的建立	175
4.5.2 观察指标	175

4.6 类风湿性关节炎	180
4.6.1 疾病实验模型的制作	180
4.6.2 指标观察	183
4.7 系统性红斑狼疮	188
4.7.1 实验模型	188
4.7.2 指标观察——IL-10 的测定	191
4.8 血小板减少性紫癜	191
4.8.1 免疫学造模基本程序	191
4.8.2 免疫性血小板减少性紫癜家兔模型	192
4.8.3 免疫性血小板减少性紫癜小鼠模型	192
4.8.4 其他造模方法	193
4.8.5 中医证候模型	193
4.8.6 体外实验	194
4.8.7 观察指标	194
4.9 子宫内膜异位症	196
4.9.1 手术造模	196
4.9.2 在体模型	197
4.9.3 离体模型	198
4.9.4 指标检测	199
参考文献	203

第5章 常见抗肝损伤与抗肝纤维化药理实验方法

5.1 急性肝损伤药理实验方法	206
5.1.1 模型制备	206
5.1.2 指标观察	208
5.2 肝纤维化模型与药理实验方法	211
5.2.1 常见模型制备方法与特点	211
5.2.2 主要研究内容与方法	214
5.3 非酒精性脂肪肝模型及其药理实验方法	221
5.3.1 常见模型制备方法与特点	221
5.3.2 观察指标	224
5.4 肝细胞分离培养与肝细胞损伤体外实验	226
5.4.1 肝细胞分离培养	227
5.4.2 肝细胞损伤模型诱导	227
5.4.3 主要观察内容与方法	228
5.4.4 注意事项	229
5.5 肝细胞凋亡药理实验方法	229
5.5.1 模型建立	229
5.5.2 检测方法	232
5.6 肝星状细胞分离培养与肝星状细胞活化体外实验方法	234
5.6.1 肝星状细胞分离培养方法	235
5.6.2 肝星状细胞活化模型诱导	237
5.6.3 观察指标	238
参考文献	241

第 6 章 降糖药理实验方法	244
6.1 糖尿病动物模型	244
6.1.1 I 型糖尿病动物模型	244
6.1.2 II 型糖尿病动物模型	246
6.2 降糖药物药效评价方法	250
6.2.1 空腹血糖测定	250
6.2.2 糖耐量试验	250
6.2.3 胰岛素敏感性	250
6.3 细胞水平降糖药物筛选方法	252
6.3.1 脂肪细胞、骨骼肌细胞-葡萄糖消耗及葡萄糖转运实验	252
6.3.2 HepG2 细胞-葡萄糖消耗实验	253
6.3.3 胰岛 β 细胞-促胰岛素分泌实验	253
6.4 分子水平降糖药物筛选方法	253
6.4.1 α -糖苷酶抑制剂筛选	254
6.4.2 蛋白酪氨酸磷酸酶-1B 抑制剂筛选	254
6.4.3 二肽基肽酶 IV (DPP IV) 抑制剂筛选	254
6.4.4 醛糖还原酶抑制剂筛选	255
6.5 降糖药物筛选的靶点	255
6.5.1 胰岛素及其类似物	255
6.5.2 α_2 -肾上腺素受体拮抗剂	255
6.5.3 ATP 敏感的 K^+ 通道	255
6.5.4 血糖调节剂	256
6.5.5 胰岛素增敏剂	256
6.5.6 α -葡糖苷酶抑制剂	256
6.5.7 诱导型一氧化氮合酶抑制剂	256
6.5.8 蛋白质酪氨酸磷酸酶-1B 抑制剂	256
6.5.9 二肽基肽酶 IV (DPP IV) 抑制剂	256
6.5.10 肉碱脂酰转移酶抑制剂	256
6.5.11 磷酸二酯酶抑制剂	256
6.5.12 基质金属蛋白酶 (MMP) 抑制剂	257
参考文献	257

第 7 章 降血脂与降血压药理实验方法	259
7.1 高脂血症实验动物模型的建立	259
7.1.1 高脂饲料诱发高脂血症动物模型	259
7.1.2 非喂养法诱发高脂血症动物模型	263
7.2 调节血脂作用的药效学实验方法	264
7.2.1 血脂含量的测定	264
7.2.2 超速离心法对实验动物进行脂蛋白的分离提取	269
7.2.3 载脂蛋白含量测定	270
7.2.4 几种血清载脂蛋白测定方法	271
7.2.5 低密度脂蛋白受体活性的测定	274
7.2.6 脂质过氧化物 LPO 的测定	277
7.2.7 瘦素和胰岛素的测定	278

7.2.8	血液宏观流变学实验方法——血液黏度测定法	278
7.3	实验性高血压动物模型建立及药效学观察	279
7.3.1	实验性高血压实验模型的建立	279
7.3.2	观察指标	286
	参考文献	298

第8章 抗血栓与抗动脉硬化药理实验方法 300

8.1	血管内皮细胞的功能及其在药理药效研究中的意义	300
8.2	血管内皮细胞的分离培养	301
8.2.1	分离牛的主动脉血管内皮细胞	301
8.2.2	分离和培养人脐动脉、脐静脉血管内皮细胞	301
8.3	血管内皮细胞的损伤模型建立	302
8.3.1	胆固醇对血管内皮细胞的损伤模型建立	302
8.3.2	血管内皮细胞的氧化活性物质损伤模型建立	303
8.3.3	血管内皮细胞的 DPPH 损伤模型建立	305
8.3.4	活体血管内皮细胞损伤模型的建立	305
8.3.5	大鼠主动脉血管内皮损伤模型的建立	306
8.4	血管内皮细胞分泌功能测定	306
8.4.1	血管内皮细胞分泌活性物质的收集	306
8.4.2	血管内皮细胞分泌活性物质的测定	307
8.4.3	血管内皮细胞分泌功能的电泳分析	312
8.4.4	血管内皮细胞分泌功能的相关基因分析	315
8.5	血管平滑肌细胞的分离培养	321
8.5.1	血管壁生长控制	321
8.5.2	血管内皮细胞对平滑肌细胞功能的调节	321
8.5.3	血管平滑肌细胞在抗动脉硬化药物研究中的应用	322
8.5.4	血管平滑肌细胞的分离培养	323
8.5.5	抑制血管平滑肌细胞增生作用的实验方法	323
	参考文献	324

第9章 神经系统药理实验方法 325

9.1	神经细胞原代培养	325
9.1.1	神经细胞原代分散培养	325
9.1.2	神经元细胞原代培养	327
9.1.3	神经胶质细胞培养	329
9.1.4	分离细胞悬液的接种密度和活性评估	333
9.1.5	培养神经细胞的鉴别与定性	335
9.2	培养神经细胞的病理模型	336
9.2.1	低氧低糖模型	336
9.2.2	谷氨酸毒性模型	336
9.2.3	氧应激模型	337
9.2.4	高钾毒性模型	338
9.2.5	机械损伤	338
9.2.6	NO 毒性模型	339

9.2.7	A β 毒性模型	339
9.2.8	血红素损伤模型	340
9.3	神经干细胞研究方法学	341
9.3.1	神经干细胞培养的原理及分离方法	341
9.3.2	胚胎神经干细胞培养法	342
9.3.3	神经干细胞的冷冻保藏与复苏	344
9.3.4	神经干细胞的免疫组织化学鉴定法	344
9.3.5	待测药物对神经干细胞增殖、分化的影响	345
9.4	脑片膜片钳研究技术与方法	347
9.5	学习、记忆的研究方法	353
9.5.1	回避反应实验	353
9.5.2	迷宫实验	355
9.5.3	操作式条件反射	359
9.5.4	记忆障碍动物模型	361
9.5.5	给药方案、对结果的评价及有关问题	362
9.6	痛觉模型及测定	363
9.6.1	物理性疼痛模型	363
9.6.2	化学性刺激模型	366
9.6.3	内脏痛	369
9.6.4	神经源性疼痛	372
9.6.5	受体水平评价阿片类化合物活性	376
9.7	抗焦虑药物研究方法	383
9.7.1	大鼠高架十字迷宫实验	383
9.7.2	大鼠高架 T 型迷宫	384
9.7.3	明暗穿箱实验	384
9.7.4	大鼠开场实验	385
9.7.5	大鼠咬木塞试验	385
9.7.6	大鼠群居接触实验	385
9.7.7	分离发声实验	386
9.7.8	大鼠 Vogel 冲突实验	386
9.7.9	孔板实验	387
9.7.10	大鼠条件性防御掩埋实验	387
9.7.11	小鼠四板法	388
9.7.12	大鼠电击足部的僵住行为法	388
9.7.13	新异刺激抑制大鼠进食法	388
9.8	阿尔茨海默病及有关痴呆研究模型	388
9.8.1	神经细胞培养	389
9.8.2	A β 毒性模型建立	389
9.8.3	动物模型	389
9.8.4	胆碱能损伤致痴呆模型	391
9.9	脑缺血动物实验模型	392
9.9.1	全脑缺血动物模型	392
9.9.2	局灶性脑缺血模型	395
9.9.3	缺血性脑损伤的评价方法	401

9.9.4 动物模型中缺血性脑损伤的影响因素	403
9.10 帕金森病动物模型	405
9.10.1 MPTP 模型	405
9.10.2 6-羟基多巴胺 (6-OHDA) 模型	407
9.10.3 鱼藤酮模型	408
9.10.4 果蝇模型	409
9.11 抗癫痫惊厥药物在体实验方法	410
9.11.1 急性实验性惊厥模型	410
9.11.2 慢性实验性癫痫模型	411
9.11.3 原发性实验性癫痫模型	415
9.12 抑郁动物模型	418
9.12.1 应激模型	418
9.12.2 神经生化模型	423
9.12.3 遗传型抑郁动物模型	427
9.12.4 孤养或分养动物模型	429
9.12.5 其他动物模型	430
9.13 大鼠记录突触可塑性的方法	432
9.13.1 脑片上记录 LTP 的方法	434
9.13.2 在体 LTP	437
9.14 中枢神经通路损毁方法	442
9.14.1 电解损毁法	442
9.14.2 化学损毁法	443
9.14.3 手术损毁法	445
9.14.4 外周神经的损伤	445
9.15 药物依赖性实验	446
9.15.1 身体依赖评价模型	446
9.15.2 精神依赖性评价模型	449
9.15.3 离体回肠纵肌实验模型	453
9.16 镇静、催眠作用研究方法	454
9.16.1 镇静作用研究	454
9.16.2 催眠作用研究	455
9.17 中枢给药方法	457
9.17.1 小鼠脑室给药法	458
9.17.2 大鼠侧脑室给药法	458
9.17.3 大鼠脑内神经核团给药法	458
9.17.4 脑室灌流法	459
9.17.5 微量透析泵	460
参考文献	461
第 10 章 透皮吸收作用的实验方法	467
10.1 透皮吸收作用的评价	467
10.1.1 皮肤的生理构造	467
10.1.2 影响透皮吸收的生理因素	467

10.2 透皮吸收作用的测定方法	470
10.2.1 透皮吸收作用的 <i>in vitro</i> 测定方法	470
10.2.2 透皮吸收作用的 <i>in vivo</i> 测定方法	474
参考文献	478
第 11 章 造血系统药理实验方法	480
11.1 常见造血系统疾病的动物模型	480
11.1.1 再生障碍性贫血小鼠动物模型的建立	480
11.1.2 小鼠溶血性贫血动物模型	481
11.1.3 大鼠缺铁性贫血动物模型 1	481
11.1.4 大鼠缺铁性贫血动物模型 2	482
11.1.5 免疫性血小板减少性紫癜动物模型	482
11.1.6 小鼠体内血栓形成动物模型	483
11.1.7 人急性髓系白血病原代白血病细胞 SCID 小鼠模型	483
11.1.8 人 T 淋巴细胞白血病细胞裸小鼠异种移植模型的建立	484
11.1.9 SCID-人类急性早幼粒细胞白血病 (APL) 动物模型的建立	484
11.1.10 白细胞减少症动物模型	485
11.1.11 同源移植和异源移植动物模型	485
11.2 造血系统药物体外筛选模型	487
11.2.1 常用造血系统细胞条件培养液的制备	487
11.2.2 造血干/祖细胞体外半固体培养支持物制备	488
11.2.3 红系祖细胞集落刺激活性药物筛选	488
11.2.4 粒单系集落刺激活性药物筛选	489
11.2.5 巨核系造血祖细胞集落刺激活性药物筛选	490
11.2.6 骨髓细胞增殖模型	490
11.2.7 骨髓细胞长期培养模型	490
11.3 造血系统相关指标测定	491
11.3.1 骨髓细胞凋亡及细胞周期测定	491
11.3.2 骨髓细胞 CD34 抗原检测	492
11.3.3 骨髓组织学观察	492
11.3.4 骨髓单个核细胞分离纯化	493
11.3.5 脾集落形成单位 (CFU-S) 测定	493
11.3.6 BMMNC 的分离	493
11.3.7 CFU-F 培养及计数	493
11.3.8 BMSC 层黏附能力测定	494
参考文献	494
第 12 章 中医证的模型实验方法	495
12.1 病-证结合模型	495
12.1.1 高血压脑出血肝阳上亢证	495
12.1.2 黄疸病阴黄证	496
12.1.3 心力衰竭肾阳虚证	496
12.1.4 多发性肌炎脾虚证	497
12.1.5 卵巢癌气虚血瘀证	498

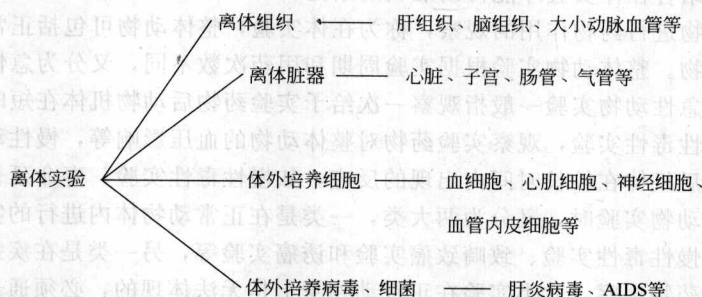
12.1.6	高脂血症气郁血瘀证·····	498
12.1.7	眩晕气虚血瘀证·····	499
12.1.8	血栓形成血瘀证·····	500
12.1.9	多发梗死性痴呆脾虚浊瘀证·····	500
12.2	中医证的模型·····	501
12.2.1	寒凝血瘀证·····	501
12.2.2	脾胃湿热证·····	501
12.2.3	胃热证·····	502
12.2.4	心气虚证·····	502
12.2.5	脾不统血证·····	503
12.3	证本质研究·····	503
12.3.1	心肌缺血·····	503
12.3.2	脾阴虚证·····	504
12.3.3	肾阴虚证·····	505
12.3.4	寒、热、脾虚、肾虚型乳腺癌模型·····	505
12.3.5	继发性红细胞增多症·····	506
12.3.6	失眠模型·····	507
12.4	小结·····	507
	参考文献·····	508

第1章 引言

药理学是一门研究药物和机体（包括病原体）的相互作用及其规律的学科。随着生物技术及分子生物学的发展，许多新的技术和方法应用到药理学研究中，极大地拓展了药理学实验方法。药理学实验一般包括离体实验、在体实验和分子药理学实验。

1.1 离体实验和在体实验

离体实验是指通过体外实验方法观察实验药物的药理药效，实验材料包括各种实验动物的离体脏器、离体组织、离体或体外培养的各种细胞、试管内或培养基内的细菌、病毒等病原体。



离体实验的优点是在实验中不仅能严格地控制好条件，而且重复性好、实验周期短、用药量少、节省动物等。近年来，随着体外培养技术和相关学科如生物化学、分子生物学、分子病理学、免疫学等的不断发展，极大地促进了离体实验技术的发展。

离体实验主要应用于如下几个方面：

(1) 药物筛选 定向初筛是观察实验药物可能具有的某种药理作用，通过离体实验观察，大致了解药物作用的初步信息，为进一步制定较全面的实验计划提供依据。离体实验被广泛应用于新药的开发研究中。

离体实验中，体细胞的培养被广泛地用来进行药物的筛选，通过体细胞培养技术观察药物毒性和活性作用，在国际上已被广泛采用。细胞株具有遗传均一性或相似性，因此药物筛选过程中的变动很稳定，且方便、经济。用细胞株来进行实验药物研究，可准确地控制药物作用的对象、时间、剂量和细胞生长的条件，如抗肿瘤作用的药物可直接作用于源于人体内的肿瘤细胞，从而可直接观察药物对肿瘤细胞的作用。可以避免在定向初筛过程中在体实验的靶细胞针对性不强、体内药物代谢反应、动物种系及个体间的耐药缺陷等因数。

近年来，随着分子病理学研究的不断发展，对各种疾病的靶分子认识越来越清楚，因此，通过离体实验方法，可以直接观察实验药物对靶细胞靶位点的作用，即直接观察到该药物的作用。例如，正常的平滑肌细胞内丝状纤维占大部分，引起血管的收缩与松弛作用，而动脉硬化灶内的平滑肌细胞内丝状纤维明显减少，取而代之的是细胞内的小胞体和线粒体等发达的器官，致使细胞的增殖与游走能力亢进。因此，如果在体外观察

到实验药物能改变平滑肌细胞内的异常变化,且抑制平滑肌细胞的增殖游走性亢进,则能成为有效的抑制动脉硬化的药物。

(2) 药物作用机理的探讨 离体实验可有效地观察实验药物的作用规律和特征,通过离体实验可了解实验药物作用的速度、最低有效浓度以及药物作用于靶细胞的环节。例如,用细胞电泳技术测定甲硝唑、替硝唑、盐酸依咪丁、磷酸氯奎等抗阿米巴药物对阿米巴寄生虫的作用,实验显示后三种药物能使电泳率减慢,表面电荷减少,提示药物对阿米巴膜起作用,而前面两种药物对膜电位无影响。

(3) 抗药性研究 疾病对药物产生抗性是一个很普遍的现象,离体实验在观察药物抗性中也有很重要的作用。如肿瘤细胞最易产生抗性,不少肿瘤细胞获得抗性后,能将细胞内的抗癌药物排出细胞外,从而影响药物对细胞的作用。通过体外实验,如果观察到某种药物能增加肿瘤细胞内的抗癌药物浓度,则提示该实验药物具有抗肿瘤细胞对药物的耐受作用,可提高癌细胞对化疗药物的敏感性。

离体实验的不足之处是离体状态下环境简单而体内环境复杂,各系统对实验药物也有调节功能、代谢功能、修饰功能(如肝脏,肾脏等脏器可对药物的生物化学增强或减弱)、免疫功能(药物作用于免疫系统引起免疫反应)等方面的作用,从而使体内与体外药理药效产生差异。离体实验在模拟疾病模型上有很大的差距,因此,离体实验的结果要结合在体实验才能得出准确的结论。

对整体动物进行药物作用的观察,称为在体实验,整体动物可包括正常动物和疾病病理模型动物。整体动物实验根据实验周期和用药次数不同,又分为急性实验和慢性实验两种,急性动物实验一般指观察一次给予实验药物后动物机体在短时间内出现的反应,如急性毒性实验,观察实验药物对整体动物的血压影响等,慢性动物实验一般指多次给药后机体在较长时间内出现的反应,如慢性毒性实验,寿命延长实验等。

进行整体动物实验时,又分为两大类,一类是在正常动物体内进行的实验,如急性毒性实验、慢性毒性实验、致畸致癌实验和诱癌实验等,另一类是在疾病模型基础上进行的实验药物观察,此类实验在正常动物身上是无法体现的,必须通过病理模型来模拟疾病,才能观察出实验药物的药理药效作用。这类病理模型多数是慢性的,如糖尿、动脉粥样硬化、高血压症、消化性溃疡、肝损伤等动物模型。当然,实验性病理模型与临床疾病也存在一定的差异,也并不是说人类的每一种疾病都能建立较理想的病理模型。

随着与其他学科的交叉发展,药理学又分支出了神经药理、生化药理、酶药理、多肽药理、分子药理、膜受体药理等。各学科不但理论互相渗透,实验技术更是彼此不分,互相借助。各种实验方法和尖端技术绝大部分是通过在体实验来进行,根据国际杂志论文的统计,药理学研究论文的60%以上是采用实验动物来进行的。各种疾病,如高血压、动脉硬化、心脏病、甲状腺疾病、糖尿病、肥胖症、肺炎、支气管哮喘、肺气肿、矽肺、神经系统疾病、精神病、重症肌无力、胃病、肾病、肺病、胰腺病、肝胆病、畸形、传染病及外科病等在实验药物的治疗及痊愈的机制以及生理、生化、病理、免疫等各方面的机理,都经过在体实验加以观察或证实。

1.2 药理学技术新进展

现代科技的发展为高效率地进行药物筛选提供新技术和新方法。近年来发展了用于高通量筛选的紫外、荧光和发光检测法。20世纪80年代中期,实验室自动化工作站的应用,使药物筛选工作的工作强度、实验成本和样品需要量降低。随着对药物作

用机制的深入认识,酶和受体与疾病的关系不断阐明,一系列新技术如受体技术、重组受体、双杂交技术、转基因动物、基因芯片技术、蛋白质组学技术等出现,为建立高特异性的筛选模型奠定了基础。这些方面的不断进步,促使药物筛选由整体动物实验为主转变为体外实验为主,形成了高通量药物筛选的模式,使大规模高效率的药物筛选工作在世界范围内广泛开展起来。

1.2.1 受体技术与药物筛选

在药物筛选领域,受体技术(receptor technology, RT)是近年来发展起来的一种体外实验方法,是利用从器官中分离出细胞膜受体作为模型,在体外试管中研究药物。大多数受体是嵌入到细胞膜的脂蛋白或糖蛋白,作用于受体的外源性药物可以是与内源性物质作用相似的激动剂,也可以是起阻断作用的拮抗剂,不少药物是受体拮抗剂。近年来,RT被用于药效学的分子筛选和开发新药,使药物研究进入了一个新的时代。

受体技术的优点有:①快速经济。药物与受体在短时间内即可达到结合平衡,与计算机技术结合,可特异性地筛选活性化合物,成为筛选有效药物的有效途径。②灵敏度高。高活性的放射性标记配体与受体作用时,其 K_D 范围可达到nmol或pmol水平,极大地提高了检测灵敏度。③弥补动物实验的不足。RT可使药物直接作用于受体部位,避免了喂食动物时肝脏代谢的影响。④可进行功能性筛选。应用活性物质诱发的正性作用试验或负性作用实验,可测知某一化合物诱导的激动作用或抑制已知激动剂的作用,以确定其功能。⑤分析药效基团。RT可同时测定出近百个受体和几十个功能性数据,与化合物结构联系起来,可分析出药效基团,通过分子模拟,找出最佳构象,筛选出符合临床要求的新药。⑥数据的可信度高。可及早筛选选择性差的药物,得到美国FDA的承认,加快了新药的审批速度。正因为这些优点,RT的应用正在影响着整个制药工业。目前,几乎世界上所有大制药公司和实验室,都已经把RT作为一种常规的药物筛选手段。

受体参与机体的各种生理和病理过程,是药物作用的主要靶标之一。近年来随着分子生物学技术在药理学领域中的渗透,尤其是人类基因组计划的进行,新的受体及其亚型不断被发现。这些新受体亚型的功能及其在疾病发展过程中的作用逐渐被阐明。国际上一些大制药公司为开发新药,竞相投资于以这些克隆受体亚型为靶标的药物筛选,成为推动受体药物筛选发展的主要力量。化合物合成技术的进步也对高效受体筛选药物方法的发展起着重要的推动作用。在检测方法方面,除经典的放射性配基结合实验外,还采用酶联免疫吸附法、液相近邻检测(scintillation proximity assay)、时间分辨荧光(time resolved fluorescence)和荧光相关光谱学等。这些方法具有高效、可靠和微量等特点,从而使受体药物筛选法发展成为高通量筛选(high-throughput screening, HTS)。

1.2.1.1 受体筛选药物模式

(1) 基于转录的细胞内受体配基筛选方法 这一筛选方法是建立在克隆人细胞内受体和与其相互作用的DNA序列(激素反应序列)认识的基础上,通过共转染能表达细胞内受体和报告基因(如荧光素酶基因)的质粒。其中报告基因受包含相关激素反应序列的启动子控制。配基激活表达的受体,然后受体与激素反应序列结合,诱导易于检测的报告基因表达。这种方法适用于细胞内受体激动剂、部分激动剂和拮抗剂的筛选。

现有药物中通过细胞内受体介导起作用的应用极为广泛,但由于不良反应较多,限制使用。用分子生物学的方法发现具有良好受体亚型选择性的化合物,是新药的发