

药理实验方法学

——新技术与新方法

● 刘建文 主编 ● 季光 魏东芝 副主编



化学工业出版社

现代生物技术与医药科技出版中心

华东理工大学研究生教育基金资助

R965.2
L724

药理实验方法学

——新技术与新方法

刘建文 主 编

季 光 魏东芝 副主编



化 学 工 业 出 版 社

现代生物技术与医药科技出版中心

· 北 京 ·

(京) 新登字 039 号

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.
北京：化学工业出版社，2003.6
ISBN 7-5025-3271-4

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 (2003) 第 015257 号

药理实验方法学

——新技术与新方法

刘建文 主 编

季 光 魏东芝 副主编

责任编辑：杨燕玲

文字编辑：李 瑾 王忠敏

责任校对：陶燕华

封面设计：蒋艳君

*

化 学 工 业 出 版 社 出版发行
现代生物技术与医药科技出版中心

(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)

发行电话：(010) 64982530

<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销

北京云浩印刷有限责任公司印刷

三河市前程装订厂装订

开本 787 毫米×1092 毫米 1/16 印张 18 字数 438 千字

2003 年 6 月第 1 版 2003 年 6 月北京第 1 次印刷

ISBN 7-5025-3271-4/R·85

定 价：40.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者，本社发行部负责退换

编写人员名单

主 编 刘建文

副 主 编 季 光 魏东芝

主 审 李仪奎

参编人员 (以姓氏笔画为序)

王中奇 刘 萍 刘建文 李仪奎

何建成 季 光 郑培永 徐振晔

陶移文 梅郁盈 黄 哲 魏东芝

序

在人类文明的发展史，对于医和药的认识萌芽于史前期，随着人类文明的进步和科技的发展，医和药在不同的历史时期尤其是近代取得了快速的发展，并为人类的健康做出了卓越的贡献。

药理学是重要基础医学学科之一，其主要任务是研究药物对机体的作用和作用原理。1953年DNA双螺旋结构的发现，叩开了“生命之谜”的大门，随着生命科学在20世纪的崛起和发展，由此引发的一系列重大成果推动着分子生物学的概念和技术全面渗透到药学学科的研究之中。世纪之交人类基因组序列测定的完成，对制药的原理和工程产生了深远的影响。药理学研究已从整体—器官—细胞进入分子水平，其技术和方法，与时俱进，迅猛发展，其中分子药理学是药理学的前沿，不仅大大提高了药理学基础研究水平，而且促进了基础医学和药学理论的发展，提高了新药开发的成功率。我国欲在药理药效学研究领域有所突破和发展并赶超国际先进水平，首先离不开先进的研究技术和方法。主编刘教授建文先生，20世纪90年代初获医学博士学位后有志于药学研究，两次东渡，求学扶桑，从事分子药理学研究，再获日本博士学位，建文先生多年来笔耕不止，著作颇丰，本书即是刘主编多年工作之心得，又为各位编写人员智慧之结晶，方法详尽，先进性和实用性较高，具有可操作性，是一本很好的新药开发研究的参考书。

是为序。



中国中西医结合学会肝病专业委员会主任委员

中华医学会肝病专科分会副主任委员

上海中医药大学副校长、教授、博士生导师

2003年4月于沪上

前 言

当前，随着生命科学技术突飞猛进的发展，极大地促进了药理学研究的进展——细胞生物学、分子生物学、免疫学等各门学科的发展，为药理药效学研究提供了新的方法和技术。本书就是在这样一种时代背景条件下写成的。作者期望本书不仅适用于大学院校相关专业的研究生教学和课题研究，而且也可为科学研究和开发新药服务。作者认为，这是一本药理药效研究及机理研究的实用型工具书。

本书突出体外研究和分子水平的研究，强调科学性、先进性和实用性，重点以方法学的详细介绍为主，具有可操作性，尤其对研究生的课题研究具有较高的参考价值。全书中围绕每一种实验，均介绍几种方法，供读者根据各自的实验条件选择使用。

本书涉及的交叉学科领域较广，在编写过程中可能存在不少缺点和不当之处，衷心地希望读者批评指正！

最后，感谢化学工业出版社的编辑和各位同仁对本书的大力支持！感谢各位作者为本书做出的贡献！

刘建文

2002. 12. 20

目 录

第 1 章 药理学研究的新进展	1
1.1 离体实验	1
1.2 在体实验	2
1.3 分子水平的药物筛选	2
1.3.1 受体技术与药物筛选	3
1.3.2 重组受体与药物筛选	5
1.3.3 转基因动物与药物筛选	8
1.3.4 生物芯片与药物筛选.....	12
1.3.5 基因工程技术与药物筛选.....	14
1.3.6 蛋白质组学与药物筛选研究.....	15
第 2 章 抗肿瘤作用的实验方法	21
2.1 移植性肿瘤整体动物实验法.....	21
2.1.1 人体肿瘤动物体内移植的基本原则.....	21
2.1.2 实体瘤动物模型的建立和药物疗效评价.....	22
2.1.3 非实体瘤动物模型的建立和药物疗效评价.....	24
2.2 抑制肿瘤增殖作用的体外实验方法.....	25
2.2.1 肿瘤细胞的培养.....	25
2.2.2 细胞排染试验.....	26
2.2.3 细胞生长曲线.....	26
2.2.4 药物的抗癌作用测定.....	27
2.2.5 克隆形成试验.....	27
2.3 抑制诱癌作用的观察.....	28
2.3.1 诱癌动物模型的建立.....	28
2.3.2 诱癌的体外模型建立.....	29
2.4 抗肿瘤转移作用的实验方法.....	30
2.4.1 转移体内模型的开发与评价.....	30
2.4.2 肿瘤细胞实验转移体内模型的建立.....	33
2.4.3 肿瘤细胞转移体外模型的建立.....	34
2.4.4 培养小室模型建立癌细胞移动实验模型.....	37
2.4.5 重层培养肿瘤细胞三维模型的建立.....	37
2.4.6 肿瘤细胞浸润能的分析.....	40
2.4.7 肿瘤细胞移动能的分析.....	41
2.4.8 肿瘤细胞分泌 MMPs 的分析	43
2.4.9 抑制肿瘤血管新生作用的实验方法.....	48
2.4.10 肿瘤细胞 Telomerase DNA 的检测	49

2.5	诱导癌细胞凋亡作用的实验方法	59
2.5.1	诱导细胞凋亡的因素	59
2.5.2	细胞凋亡的检测方法	60
2.6	逆转肿瘤耐药性作用的实验方法	74
2.6.1	肿瘤耐药性作用的机制与原理	74
2.6.2	逆转肿瘤多药耐药性作用的药物筛选法	75
第3章	抑制自由基作用的实验方法	92
3.1	自由基损伤细胞的体外模型建立	92
3.1.1	H ₂ O ₂ 损伤细胞的体外模型建立	92
3.1.2	过氧化脂质损伤细胞的体外模型建立	92
3.2	自由基测定法	92
3.2.1	血清中过氧化脂质测定	92
3.2.2	组织中过氧化脂质测定	94
3.2.3	脂褐素测定	94
3.2.4	化学发光 CDCFH-DA 的测定	95
3.2.5	电子自旋共振法 (ESR) 对自由基的测定	95
3.2.6	羟基自由基的测定	96
3.2.7	过氧化氢的测定	98
3.2.8	超氧化物歧化酶 (SOD) 的测定	100
3.3	氧化应激相关基因 NF- κ B 的检测	104
3.3.1	NF- κ B 的细胞免疫化学染色法	104
3.3.2	悬浮细胞的 NF- κ B 的细胞免疫化学染色法	105
3.3.3	NF- κ B 聚丙烯酰胺凝胶电泳法	105
3.3.4	NF- κ B 的原位杂交法	106
第4章	抗炎和免疫抑制作用的实验方法	108
4.1	自身免疫性肝炎	108
4.1.1	实验动物模型的建立	108
4.1.2	观察指标	108
4.2	实验性免疫性肝纤维化	114
4.2.1	实验性免疫性肝纤维化模型的建立	114
4.2.2	实验指标观察	116
4.3	溃疡性结肠炎	125
4.3.1	药理学方法	126
4.3.2	免疫法	128
4.3.3	病症结合模型	128
4.3.4	指标观察	129
4.4	变应性鼻炎	135
4.4.1	卵白蛋白诱导	135
4.4.2	豚草花粉诱导	135
4.4.3	蒿属花粉诱导	136

4.4.4	二异氰酸甲苯酯 (TDI) 诱导	136
4.4.5	观察指标	136
4.5	支气管哮喘	138
4.5.1	哮喘动物模型	139
4.5.2	观察指标	141
4.6	自身免疫性甲状腺炎	143
4.6.1	动物模型的建立	143
4.6.2	观察指标	145
4.7	类风湿性关节炎	149
4.7.1	疾病实验模型的制作	149
4.7.2	观察指标	150
4.8	系统性红斑狼疮	154
4.8.1	实验模型	154
4.8.2	IL-10 的测定	155
4.9	血小板减少性紫癜	156
4.9.1	免疫学造模基本程序	156
4.9.2	其他造模方法	157
4.9.3	中医症候模型	157
4.9.4	体外实验	157
4.9.5	观察指标	157
4.10	子宫内膜异位症	158
4.10.1	手术造模	158
4.10.2	指标检测	158
第 5 章	抗肝损伤作用的实验方法	163
5.1	肝细胞损伤的体外模型建立	163
5.1.1	试剂的配制	163
5.1.2	操作方法	163
5.2	肝细胞损伤的体外模型的建立	164
5.2.1	四氯化碳 (CCl ₄) 体外肝细胞损伤模型	164
5.2.2	醋氨酚体外肝细胞损伤模型	164
5.2.3	过氧化氢 (H ₂ O ₂) 体外肝细胞损伤模型	164
5.2.4	氰化钾缺氧肝细胞损伤模型	164
5.2.5	硫代乙酰胺 (TTA) 体外肝细胞损伤模型	164
5.2.6	内毒素体外肝细胞损伤模型	164
5.2.7	半乳糖胺 (GalN) 体外肝细胞损伤模型	164
5.3	肝细胞分泌功能测定	164
5.3.1	胶原生成率的测定	164
5.3.2	白蛋白分泌量的测定	165
5.3.3	ALT、AST 的测定	165
5.3.4	cAMP、cGMP 的测定	165

5.3.5	肝细胞 DNA 合成速率的测定 (采用 ³ H-TdR 掺入法)	165
5.3.6	肝细胞谷胱甘肽过氧化物酶 (GSHpx) 活性测定	165
5.4	肝脏星状细胞的分离与培养	166
5.4.1	实验材料的准备	166
5.4.2	试剂的准备	166
5.4.3	实验方法	166
5.5	肝星状细胞体外模型及功能测定	167
5.5.1	肝星状细胞增殖模型 (PDGF-BB 刺激法)	167
5.5.2	细胞增殖的测定	167
5.5.3	胶原生成率的测定	168
5.6	实验性肝损伤体内模型	168
5.6.1	化学性肝损伤模型	168
5.6.2	免疫性肝损伤模型	169
5.6.3	酒精性肝损伤模型	169
5.6.4	其他多种动物种系复制模型	172
第 6 章	降脂降压作用的实验方法	174
6.1	高脂血症实验动物模型的建立	174
6.1.1	高脂饲料诱发高脂血症动物模型	174
6.1.2	非喂养法诱发高脂血症动物模型	175
6.2	调节血脂作用的药效学实验方法	176
6.2.1	血脂含量的测定	176
6.2.2	超速离心法对实验动物进行脂蛋白的分离提取	180
6.2.3	载脂蛋白含量测定	182
6.2.4	几种血清载脂蛋白测定方法	183
6.2.5	低密度脂蛋白受体活性的测定	186
6.2.6	脂质过氧化物 LPO 的测定	188
6.3	实验性高血压动物模型建立及药效学观察	190
6.3.1	实验性高血压实验模型的建立	190
6.3.2	实验药物作用后的观察指标	195
第 7 章	抗血栓、抗动脉硬化作用的实验方法	208
7.1	血管内皮细胞的功能及其在药理药效研究中的意义	208
7.2	血管内皮细胞的分离培养	209
7.2.1	分离牛的主动脉血管内皮细胞	209
7.2.2	分离和培养人脐动、静脉血管内皮细胞	209
7.3	血管内皮细胞的损伤模型建立	210
7.3.1	胆固醇对血管内皮细胞的损伤模型建立	210
7.3.2	血管内皮细胞的氧化活性物质损伤模型建立	211
7.3.3	血管内皮细胞的 DPPH 损伤模型建立	212
7.3.4	活体血管内皮细胞损伤模型的建立	213
7.4	血管内皮细胞分泌功能测定	214

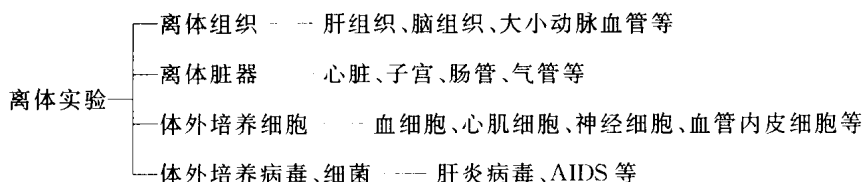
7.4.1	血管内皮细胞分泌活性物质的收集	214
7.4.2	血管内皮细胞分泌活性物质的测定	214
7.4.3	血管内皮细胞分泌功能的电泳分析	217
7.4.4	血管内皮细胞分泌功能的相关基因分析	221
7.5	血管平滑肌细胞的分离培养	226
7.5.1	血管壁生长控制	226
7.5.2	血管内皮细胞对平滑肌细胞功能的调节	227
7.5.3	血管平滑肌细胞在抗动脉硬化药物研究中的应用	227
7.5.4	血管平滑肌细胞的分离培养	228
7.5.5	抑制血管平滑肌细胞增生作用的实验方法	229
第8章	抗衰老、抗痴呆作用的实验方法	230
8.1	抗皮肤衰老作用的实验方法	230
8.1.1	皮肤组织的细胞培养	230
8.1.2	紫外线损伤皮肤模型的建立	232
8.1.3	人皮肤老化的 <i>in vivo</i> 模型建立	233
8.1.4	细胞的胶原合成定量测定法	233
8.1.5	皮肤色素抑制作用的观察方法	234
8.1.6	药物对紫外线损伤皮肤细胞 DNA 短片化的检测	234
8.1.7	表皮细胞 Telomer DNA 的分析	235
8.2	神经细胞的分离培养	237
8.2.1	大脑皮层神经细胞的分离培养	237
8.2.2	星形胶质细胞的分离培养	237
8.2.3	雪旺细胞的分离培养	238
8.2.4	实验药物对神经细胞作用的观测	239
8.3	神经细胞的损伤体外模型建立	240
8.3.1	氧化活性物质对神经细胞损伤模型的建立	240
8.3.2	缺血缺氧对神经细胞损伤模型的建立	241
8.3.3	其他神经细胞损伤模型的建立 (以 PC ₁₂ 细胞作为实验靶细胞)	242
8.4	抑制神经细胞损伤的药效作用观察	242
8.4.1	药物作用于细胞的形态观察	242
8.4.2	实验细胞的生物化学测定	242
8.4.3	PC ₁₂ 细胞对神经营养性活性物质的体外观察	244
8.4.4	实验药物对神经损伤模型的作用	245
8.5	神经营养因子类药物的作用观察	245
8.6	老年痴呆体内动物模型的建立	246
8.7	寿命试验法	247
8.7.1	果蝇寿命延长试验法	247
8.7.2	家蚕寿命延长试验	248
8.7.3	二倍体细胞寿命试验	248
第9章	透皮吸收作用的实验方法	251

9.1 透皮吸收作用的评价	251
9.2 透皮吸收作用的测定方法	252
9.3 透皮吸收作用的体内测定方法	252
9.3.1 实施例一	253
9.3.2 实施例二	254
9.3.3 实施例三	255
第 10 章 中药血清药理实验方法	258
10.1 确定供血清动物	258
10.2 给药剂量和次数	258
10.3 采血时间与方法	259
10.3.1 采血时间	259
10.3.2 采血的方法	259
10.4 血清灭活	260
10.5 血清的添加量和方法	260
10.6 含药血清的保存	260
10.7 实验设计注意点	261
10.7.1 空白血清本身的活性	261
10.7.2 不同剂量组的设置	261
10.8 体内中药的酶免疫测定法	267
附 录	269
附录 1 t 界值表	269
附录 2 离心机转速 (r/min) 与相对离心力 (RCF) 的列线图	270
附录 3 人和动物间接体表面积折算的等效剂量比率表	271
附录 4 药物的量和浓度	271
附录 5 各种 pH 值的 Tris 缓冲液的配制	272
附录 6 DNA 分子量标准品电泳后在胶上的大小	273
附录 7 常用电泳缓冲液	274
附录 8 凝胶加样缓冲液	274

第 1 章 药理学研究的新进展

1.1 离体实验

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，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。



离体实验的优点是不仅在实验中能严格地控制好条件，而且还有重复性好、实验周期短、用药量少、节省动物等优点。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，通过离体的实验观察，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。离体实验在药物定向初筛过程中，具有实验周期短、用药量少、节省费用的优点，从而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，用体细胞培养技术对药物的毒性和活性作用进行观察，在国际上已被广泛采用。细胞株具有遗传特性均一或相似的性能，可使药物的筛选工作变得变动很稳定、很方便、很经济。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、作用的时间、作用的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素。

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，直接观察实验药物对靶细胞靶位点的作用，即可以直接观察到该药物的作用。例如，动脉硬化的病灶存在的平滑肌细胞，正常的平滑肌细胞内丝状纤维占大部分，起血管的收缩与松弛的作用，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器官发达，细胞的增殖与游走能力亢进。因此，如果能在体外观察到实验药物能改变平滑肌细胞内的异常变化，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、磷酸氯喹等抗阿米巴药物对阿米巴寄生虫

的作用，实验提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药性，不少肿瘤细胞获得抗药性后，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，如果能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）和免疫功能（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。

1.2 在体实验

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的次数不同，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、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，如糖尿病、动脉粥样硬化、高血压症、消化性溃疡、肝损伤等的动物模型。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，药理学研究分出了神经药理、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%以上是采用在体实验动物来进行的。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、硅沉着病、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。

1.3 分子水平的药物筛选

现代科技的发展为高效率地进行药物筛选提供技术条件。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。

1.3.1 受体技术与药物筛选

受体技术(receptor technology, RT)就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相似作用的激动剂,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。

受体技术具有如下优点。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,避免了喂食动物的肠肝代谢的影响。④可进行功能性筛选。应用活性物质诱发的正性作用实验或负性作用实验,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。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药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)。

1.3.1.1 受体筛选药物模式

(1) 基于转录的细胞内受体配基筛选 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。

通过细胞内受体介导起作用的现有药物应用极为广泛,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,是新药发展方向。比如视黄酸可激活6种受体亚型,合成针对受体亚型的化合物,其作用具有选择性,可减少不良反应,目前这类药物正在进行治疗肿瘤和皮肤病的临床试验。部分激动剂是另一类具有选择性

作用的化合物,其作用机制是通过诱导产生有益效应的受体激活构象。比如 Tamoxifen,保留了雌激素对骨骼的有益作用,但拮抗其刺激乳腺癌细胞的生长。又如糖皮质激素抑制与炎症过程有关的基因(如胶原酶基因)表达,但同时激活参与代谢的基因表达,因而临床上用糖皮质激素治疗炎症副作用较大。因此寻找一种具有抗炎作用,而不存在目前类固醇抗炎药物副作用的化合物非常有意义,通过对糖皮质激素受体突变体的研究表明存在这种可能。

(2) 基于转录的细胞因子受体配基的筛选 近年来,细胞因子受体信号转导的研究发展迅速,揭示了细胞因子通过受体介导调节基因表达的一些重要事件,其中信号转导及转录激活蛋白(STAT)在细胞因子受体信号传递中起关键性的作用。STAT 与其相应的结合序列(SBE)结合,诱导基因的表达。基于上述研究结果,把 SBE 与报告基因(如荧光素酶基因、氯霉素乙酰基转移酶基因)连接,导入含有相关细胞因子受体的细胞中,可发展一种基于细胞的细胞因子受体激动剂和拮抗剂的筛选方法。临床观察发现一些重组的细胞因子有较好的应用效果,如重组人粒细胞集落刺激因子和重组人红细胞生成素等,但存在生产困难、不能口服和稳定性差等缺点。因此,利用上述细胞筛选方法筛选作用于受体的小分子有机化合物具有重要意义。

(3) 利用重组可溶性受体和同位素标记配基的药物筛选 传统的受体筛药法是利用表达受体的细胞制备膜受体,通过受体与配基反应,再经过分离过程。最近英国学者报道,利用重组可溶性 p55TNF- α 从 NATCHEM 库中筛选出天然的受体拮抗剂。利用从公司购买的重组可溶性 p55TNF- α 受体蛋白质,包被培养板,再用 ^{125}I TNF- α 进行受体与配基反应,洗板后在 γ 计数仪上测量放射性。目前已从库中筛选出两个具有受体拮抗剂性质的天然产物。与基于细胞的筛选方法不同,这种方法不受有机试剂最大浓度的限制和干扰细胞膜物质存在的影响,具有特异性、可靠、易自动化等优点,但需处理放射性废物。

(4) 利用重组可溶性受体和肽库筛选 小分子模拟肽重组可溶性受体蛋白通过抗体固体化在微量滴定板的孔里,然后加入单个克隆的噬菌体短肽库进行筛选。主要步骤包括受体制备、肽库构建、初筛(panning)、phase ESISA、阳性克隆 DNA 提取和序列测定、氨基酸残基序列推导、系列肽合成和同源性分析、受体竞争结合试验、确定与受体有高亲和力的肽结构。文献报道利用噬菌体表面表达技术进行受体配基肽模拟物筛选的有红细胞生成素受体、血小板生成素(TPO)受体、阿片受体、糖蛋白 II b/III a、E 选择素、白细胞介素-1 受体、整合素等。最近文献报道的 TPO 受体肽激动剂模拟物筛选,发现仅由 14 个氨基酸残基组成的短肽,通过共价连接二聚体的活性与重组 TPO 等同,结构与天然 TPO 无同源性,表明从肽库筛选受体配基的肽模拟物必将对药物发现发生重大影响。

(5) 重组配基固化的受体结合法筛选 化合物在微量滴定板的孔里包被配基,用牛血清白蛋白封闭未反应位点,加入可溶性受体(如白细胞介素-1 受体)或受体与样品(如微生物发酵产物)一起加入,与固化配基结合的受体数量可用酶标的抗体测定,计算出样品的一半抑制浓度(IC_{50})。这一筛选同样无基于细胞的受体筛药法的缺点,可实现筛选过程的完全自动化,因而可发展成高效的筛药法。

1.3.1.2 药物筛选的几个过程

高效的受体筛药法分阶段进行。对大量的化合物首先进行初筛,新近发展的 HTS 模型每天可筛选多达 5 万个化合物。初筛的结果以“是”或“否”的形式表示,反映化合物对靶受体有无亲和力。如利用基于细胞信号转导的筛选方法,则在初筛阶段即能确定化合物属于激动剂性质或拮抗剂性质。接着对初筛“命中”的活性化合物进行强度的检测,设置若干个

浓度, 得出活性化合物的一半抑制浓度和解离常数, 描述化合物的作用强度并与现有的同类药物比较, 决定是否进入特异性筛选。特异性筛选通常用 30~40 种不同的受体和已知的激动剂和拮抗剂, 观察在靶受体以外的受体上是否被激活或抑制, 确定活性化合物的交叉反应性和潜在的副作用。

通过上述 3 个药物筛选阶段, 发现值得研究的先导化合物, 可能因作用弱、药动学性质不理想或存在交叉反应不能直接进入临床前药物评价。经典的先导物结构改造方法是合成类似物、同源物或衍生物等, 从中筛选出药理特性更好的化合物, 同时获得定量构效关系的参数和药效团。近几年随着计算机辅助药物设计的发展, 更多地利用推理性药物设计方法和已有的配基与受体反应的参数, 加快先导物结构优化的过程。如从肽库中筛选出具有天然细胞因子活性的短肽, 由于肽易被降解, 因此把肽类先导结构转化为稳定的和口服有效的先导结构非常有意义。可选择的方法是进行肽的骨架和侧链用化学的方法加以修饰或通过短肽与受体胞外区进行功能模拟, 将所得的结合物形状、电荷等参数用于非肽类小分子基本结构的设计, 定向合成小分子有机化合物, 从中筛选出小分子有机物的先导结构。

定向受体的筛药法是发现新化合物的重要途径, 已取得较大进展。今后将会更多地利用组合化学技术合成小分子有机化合物库作为受体筛选法的化合物来源。利用生物学技术建立更灵敏、可靠的生物学检测方法, 并在初筛阶段提供亲和力和功能活性的参数。依据目前可得到的人类基因组信息, 越来越多的与疾病相关的特异受体亚型被识别和确认, 成为作用更专一的药物作用靶。药物筛选与推理性药物设计将更加密切结合, 从而大大加快了先导化合物发现的进程。

1.3.2 重组受体与药物筛选

在药物筛选领域, 受体技术是近年来发展起来的一种体外实验模型, 具有如下优点: ①高度灵敏、高度专一; ②药物筛选快速、经济; ③直接在结合部位筛选药物的活性, 防止漏筛, 可进行功能性筛选; ④数据的可信度高, 得到美国 FDA 的承认, 加快了新药的审批速度。目前, 受体技术的应用影响着整个制药工业, 几乎世界上所有大的制药公司和实验室都已将受体技术作为一种常规的药物筛选手段。重组受体 (又称为克隆受体或高级受体) 是随着人们对分子克隆研究的进一步深入、不断完善受体技术而产生的。

1.3.2.1 重组受体的产生

传统的受体制备是从大量的组织匀浆中提取, 过去近 20 年中用这种方法制备受体确实促进了新药研究的进程, 然而用这种方法制备的受体纯度低、成本高、制备量少, 由于组织中某些受体或受体亚型含量很少, 获得这些受体或亚型就很困难。生物技术的进步为重组受体技术的产生奠定了基础, 它把受体或受体亚型的基因从人体组织中克隆出来, 再在微生物或哺乳动物细胞内表达。重组受体与传统的受体制备技术相比, 其优点很多: ①受体是人的而不是动物的, 所以用重组受体所得的试验结果与在人体试验的结果直接相关; ②可大量制备受体, 并能得到只在特定组织中存在、用传统制备方法难以获得的受体; ③用克隆方法可得到纯的受体; ④重组受体在细胞内或细胞膜上, 包含了 G 蛋白等信号转导系统, 更接近人体的自然状态; ⑤重组受体更经济等。重组受体的诸多优点吸引着越来越多的人用重组受体进行药物筛选的研究。

1.3.2.2 重组受体在药物筛选中的应用

Hodgson 报道, Strosberg 工作组用大肠杆菌作为受体基因表达系统表达了 β_1 和 β_2 -肾上腺素受体, 并在细菌表面表达了 5-HT_{1A}、5-HT_{1D} 以及各种多巴胺受体亚型。酵母、哺乳