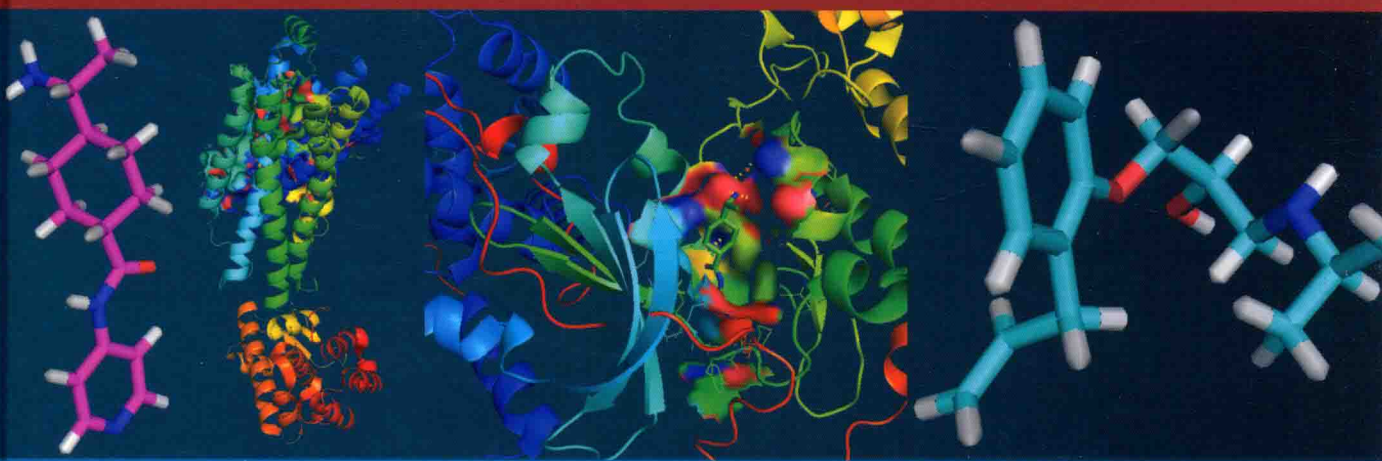


分子药理学

段为钢 云 宇 主编



科学出版社

分子药理学

主 编 段为钢 云 宇

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

本书从药物与靶点相互作用的角度进行编写,对药物作用的本质进行了阐释,内容包括药物与受体、离子通道、转运体、酶、核受体的相互作用,以及药物基因组学、转基因动物和免疫治疗等。本书试图从药物与靶点相互作用的角度解释药物的作用和不良反应,并指导新药设计。因此,本书内容主要以药靶方式而不是传统基于器官/系统的方式进行编排。

本书信息量大,图表丰富,反映了当前的研究进展,适合药理学专业的高年级本科生、研究生,以及从事药物研发和生物医学工作的科技人员阅读。

图书在版编目(CIP)数据

分子药理学 / 段为钢, 云宇主编. —北京: 科学出版社, 2015.3
ISBN 978-7-03-043553-8

I. 分… II. ①段… ②云… III. 分子-药理学 IV. R966

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2015)第 045368 号

责任编辑: 沈红芬 / 责任校对: 张怡君

责任印制: 肖 兴 / 封面设计: 陈 敬

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

北京通州皇家印刷厂 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2015 年 3 月第 一 版 开本: 787 × 1092 1/16

2015 年 3 月第一次印刷 印张: 30 1/4

字数: 700 000

定价: 158.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

前 言

随着现代生物学和药学的不断交流与融合,分子生物学理论和技术已经渗透到药理学的方方面面,分子药理学于是就诞生了。国际上1965年就诞生了《分子药理学》(*Molecular Pharmacology*)杂志,介绍分子药理学方面的最新研究成果。目前国内许多高校的医药类研究生教育也引入了分子药理学必修课或选修课,有的甚至在本科高年级也开设该课程。虽然国内也有有关分子药理学内容的书出版,但相对系统地介绍分子药理学的书仍不多见,以至于相关内容以讲座、综述、讲义的形式在各高校出现。本书的作者是从事分子生物学、分子药理学或药理学教学和科研的教授、副教授或博士,本书的内容和选题也受到基础药理学相关教学与教材的启发。本书在基础药理学的基础上,从分子层面介绍药物作用的机制和可能的新药研发手段。考虑到本书的广度和深度,本书可作为辅导教材,也可作为研究生授课老师很有价值的背景材料和新药研发人员的读物,对其他相关的生物医学专业的学生也很有用。

本书阐述了基因如何影响生理功能,也阐述了药物在治疗疾病时,遗传背景如何影响药理效应。本书试图从药物与靶点相互作用的角度探寻药物的作用机制,解释药物的作用和不良反应,并设计新药。因为遗传背景不同和表达谱的差异,本书也支持医生根据个人的基因组和表达谱实施个性化治疗。本书采用的是基于药靶的方式而不是传统基于器官/系统的方式进行编排,反映了当前的研究进展,也反映了根据基因和源于蛋白质结构进行计算机药物设计的研究潮流。本书信息量较大,图表丰富。

本书的完成得到了云南中医学院、昆明医科大学和河南省食品药品检验所等单位的大力支持,也得到了云南省高校中医药调节机体微环境应用基础 Research 科技创新团队的支持。李玛琳教授和卿晨教授为本书的编写提出很多建设性意见,在此表示衷心的感谢。尽管编者花了很大心血进行编写并校对,但书中错误在所难免,对此读者可以与联系人段为钢交流,将相关信息发到 deardwg@126.com,在此先表示感谢。

编 者
2014年10月

目 录

1 绪论	1
1.1 分子药理学	1
1.2 分子药理学研究内容和研究对象	1
1.3 分子药理学和经典药理学及分子生物学的关系	2
1.4 与分子药理学有关的主要方法和技术	3
1.5 分子药理学的发展简史	6
1.6 本书的内容	10
1.7 与分子药理学有关的生物信息网站	11
参考文献	13
2 药物作用的基础	15
2.1 药物的分子结构	15
2.2 药靶	32
2.3 药物与靶点的识别	40
2.4 超分子理论	45
2.5 定量构效关系	46
2.6 分子药理学与药物发现	49
2.7 小结	50
参考文献	50
3 药靶分子克隆	51
3.1 引言	51
3.2 “传统”药理学	51
3.3 DNA 重组技术与药理学	52
3.4 药靶克隆	53
3.5 DNA 克隆能提供什么样的信息	58
3.6 比较克隆药靶和天然药靶的药理学特性	61
3.7 孤儿 GPCR 中的反向药理学	62
3.8 小结	65
参考文献	65
4 G 蛋白偶联受体	67
4.1 GPCR 简介	67
4.2 G 蛋白	72
4.3 信号转导通路	75
4.4 GPCR 信号的脱敏和下调	80
4.5 GPCR 的组成型活性	82
4.6 复杂的 G 蛋白偶联	84
4.7 激动剂的定向信号	85
4.8 GPCR 的别构调节剂	86

4.9 GPCR 的药理学分子伴侣	87
4.10 GPCR 的二聚化	88
4.11 GPCR 的剪接变体	101
4.12 小结	105
参考文献	106
5 离子通道	109
5.1 离子通道简介	109
5.2 电压门控离子通道	111
5.3 其他类电压门控离子通道	126
5.4 配体门控离子通道	148
5.5 小结	165
参考文献	166
6 转运体	170
6.1 简介	170
6.2 分类	171
6.3 转运体的结构分析	173
6.4 转运体家族的药理学意义	176
6.5 转运体和细胞稳态	204
6.6 小结	208
参考文献	208
7 酶	212
7.1 简介	212
7.2 酶的系统分类和命名	212
7.3 氧化还原酶类	213
7.4 转移酶类	217
7.5 水解酶类	224
7.6 裂合酶类	228
7.7 异构酶类	230
7.8 合成酶类	231
7.9 rho 激酶分子药理学	232
7.10 小结	242
参考文献	242
8 转录因子和基因表达	245
8.1 基因表达简介	245
8.2 转录因子	246
8.3 CREB	252
8.4 核受体	256
8.5 过氧化物酶体增殖体活化受体	258
8.6 生长因子	265

8.7 可变剪拼	265
8.8 RNA 编辑	268
8.9 RNA 编辑的重要性	275
8.10 小结	289
参考文献	289
9 囊性纤维化：遗传病的现代疗法	294
9.1 简介	294
9.2 囊性纤维化跨膜电导调控子	298
9.3 CFTR 的突变	303
9.4 囊性纤维化发病率	304
9.5 囊性纤维化动物模型	305
9.6 药物治疗	305
9.7 基因治疗	311
9.8 小结	316
参考文献	316
10 药物基因组学	319
10.1 简介	319
10.2 人类基因组的遗传变化类型	319
10.3 巯基嘌呤 S-甲基转移酶和 K^+ 通道多态性	320
10.4 多态性影响药物代谢	321
10.5 检测遗传多态性的方法	327
10.6 药物转运体的遗传变异	329
10.7 G 蛋白偶联受体的遗传变异	332
10.8 小结	342
参考文献	342
11 细胞钙活动	344
11.1 简介	344
11.2 钙的测定	345
11.3 胰腺外分泌	355
11.4 胰腺腺细胞的钙信号	358
11.5 细胞核钙信号	371
11.6 小结	377
参考文献	377
12 信号复合物：蛋白质-蛋白质相互作用和脂筏	380
12.1 细胞信号复合物简介	380
12.2 GPCR 相互作用蛋白简介	380
12.3 研究 GPCR 相互作用蛋白的方法	381
12.4 GPCR 相互作用蛋白的功能	385
12.5 GPCR 信号复合物	389

12.6 GPCR 和离子通道复合物	396
12.7 离子通道信号复合物	397
12.8 开发作用于 GPCR 相互作用蛋白的药物	398
12.9 开发针对蛋白质-蛋白质相互作用的药物	398
12.10 脂筏	399
12.11 受体介导的内胞作用	403
12.12 信号内体	403
12.13 小结	405
参考文献	406
13 基因工程小鼠	408
13.1 基因工程简介	408
13.2 基因组学和序列数据的积累	408
13.3 模式动物小鼠	411
13.4 基因工程技术简述	412
13.5 原核注射	414
13.6 基因打靶	419
13.7 基因工程小鼠的示例	425
13.8 小结	427
参考文献	428
14 重组蛋白和免疫治疗	431
14.1 免疫治疗简介	431
14.2 免疫治疗的历史背景	431
14.3 免疫治疗的基础	432
14.4 免疫治疗的种类	433
14.5 人源化抗体治疗	436
14.6 免疫治疗的临床实践	441
14.7 免疫治疗的利与弊	442
14.8 前景	443
14.9 小结	444
参考文献	444
名词解释	445
缩略词	461
后记	473

1 绪 论

1.1 分子药理学

药理学(pharmacology)是研究药物与机体(含病原体,包括微生物、寄生虫和肿瘤)相互作用的科学。药物的作用(药物效应动力学, pharmacokinetics)和机体对药物的处置(药物代谢动力学, pharmacodynamics)本质上就是药物分子与机体(生物大)分子相互作用的结果,其作用后的效果可以表现在细胞、亚细胞水平,组织器官水平,甚至整体水平。与药物分子直接相互作用的生物分子则称为靶点(target,也叫靶标)。因此,作为药理学的一个分支,分子药理学(molecular pharmacology)是一门在分子水平研究药物及其作用靶点的学科。

1.2 分子药理学的研究内容和研究对象

1.2.1 作用机制和作用机理

药物的作用机制(mechanism)是一个比较严格的概念,指的是药物分子和作用靶点相互作用,即药物和药靶分子如何通过多种作用力(氢键、范德华相互作用、疏水相互作用、离子键等)发生亲和或影响其他活性物质与靶点发生亲和的过程。而药物的作用机理(principle)则是一个相对宽泛的概念,即只要在非整体层面阐述药理效应的原理均可称为作用机理,因此作用机理包含从组织器官、细胞乃至分子水平阐明药物作用的原理,即也包含上述的作用机制内容。狭义的作用机理一般不包含作用机制,以与其相区别。

1.2.2 药物效应和生物活性

药物效应(effect)是药物作用于机体后在整体层面表现出的形态学或功能学变化。而在非整体水平(如组织器官、细胞、分子水平)表现出的变化一般称之为生物活性(bioactivity,或 activity)。值得注意的是分子水平的活性不一定是作用机制,尽管作用机制一定是分子水平的。如长期使用 β 受体抑制剂普萘洛尔导致 β 受体上调,最终导致机体对去甲肾上腺素敏感(药理效应增强),其机制仍然是 β 受体抑制, β 受体表达上调只是普萘洛尔长期作用后继发的分子层面的“药理效应”,而非机制。

因此,作用机制导致药理效应,非整体层面的“药理效应”则是生物活性(药理活性),分子层面的活性不一定是作用机制,只有由药物分子直接导致的分子层面生物活性才是作用机制。

1.2.3 分子药理学的研究内容

由于药物作用的药效和药代动力学变化是药物分子与机体生物分子相互作用的结果,因此分子药理学研究的内容主要就是研究药物的作用机制和作用机理(特别是分子和细胞层面的机理)。分子药理学的主要任务也就是阐明药物作用、不良反应、药代动力学变化的机制和机理,为新药研发提供源头创新。在我国,绝大多数中药(活性成分)的作用机制尚未阐明,分子药理学的引入,有望为中药的作用机制阐明,开发新型中医药提供推动力。

1.3 分子药理学和经典药理学及分子生物学的关系

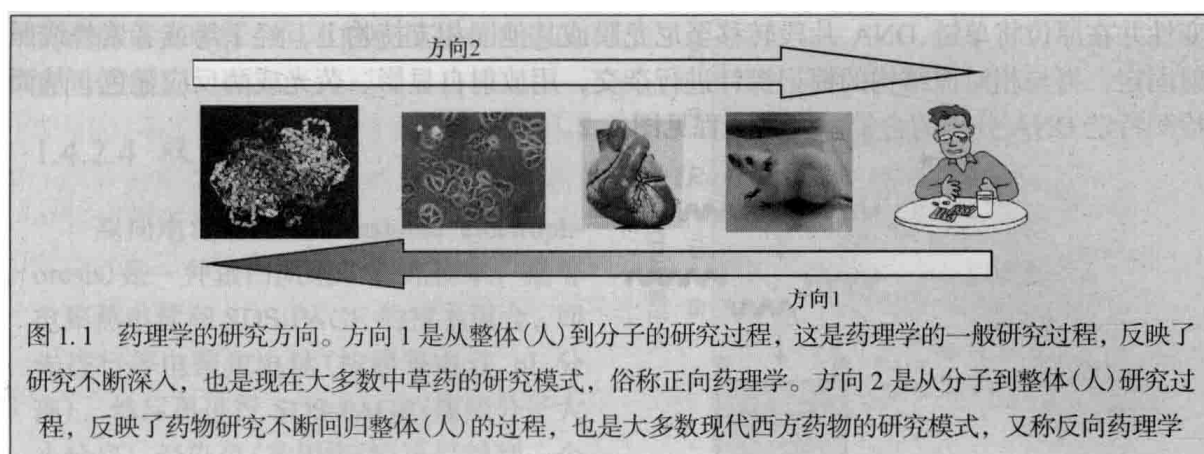
1.3.1 分子药理学和经典药理学的关系

经典药理学(也称传统药理学)历史悠久,而分子药理学的出现则是生物学阐明“中心法则”后的产物,也是近代和现代物理学、化学及生物学技术发展的结果。经典药理学一般在整体、组织器官水平来研究药物,因此从研究层次来讲,分子药理学要比它深得多。尽管如此,分子药理学仍然在经典药理学的框架、范畴和规律下开展工作,只是从分子层面进行进一步的阐明,因此是经典药理学研究的深入。如经典药理学中量效曲线的S形曲线规律、受体上调和下调规律、药理学实验的设计原则等。同样,分子层面的研究也必须得到细胞、组织器官和整体层面的药理学支撑。否则就没有“药”的意义。因此,分子药理学是经典药理学的进一步发展,两者相互补充,相互支撑。

关于药理学研究对象的近似问题

人们对药物的研究是无止境的。药物是治疗人类疾病的,最理想的对象是直接研究人,如历史传说中的“神农尝百草”就是人体直接试验,后来我国的大多数中草药基本上也是直接的人体试验。人类进入到文明社会后,由于伦理学(如《赫尔辛基宣言》)的限制,直接在人体进行试验国际上是禁止的。因此只好用动物来模拟人体(动物进化程度越高,与人越接近;实际上即使是人体之间也是有差异的);随着研究的深入,研究者进一步用动物的组织器官甚至细胞来模拟人的疾病;最终用分子来模拟(图 1.1)。从人到动物、组织器官、细胞、分子,反映了研究的深入,但也要清楚地认识到,每一步深入也是一种近似。只有有了这种近似,研究才能得以广泛进行并不断深入。一般而言,分子研究相对方便,并可以进行大规模研究(筛选),研究最费时费力、通量最低的是人体研究。

然而,正因为有这些近似,非人体研究获得的结果可能会发生偏离甚至重大偏离,这就又需要不断进行修正或验证。因此,分子研究结果必须经得起细胞学研究,最终要经得起整体动物研究或人体研究的检验。当然,人体研究是很严格的,必须获得当地政府和伦理委员会许可(参见新药研究的过程图 2.34)。



1.3.2 分子药理学和分子生物学的关系

分子药理学是在分子层面研究药理学，一方面涉及药物分子，一方面涉及生物分子，特别是生物大分子。而生物大分子中的 DNA、RNA 和蛋白质则是分子生物学研究的主要范畴。尽管分子生物学的主要目的是阐明自然状态下的生命规律，但采用药物干预也很常见。从发展的时代看，分子药理学也是分子生物学发展之后的结果；从研究方法看，分子药理学吸纳了很多的分子生物学方法，如 Southern 印迹、Western 印迹、下拉试验(Pull down)、分子克隆等。从某种程度上说，分子药理学更像分子生物学在药理学中的应用。

1.4 与分子药理学有关的主要方法和技术

1.4.1 分子药理学研究方法

分子药理学研究方法基本上与经典药理学研究方法一致，也可分为基础药理学方法和临床药理学方法。其中基础药理学方法又可以分为实验药理学方法和实验治疗学方法。

1.4.2 分子药理学技术

充分借用分子生物学技术则是分子药理学的技术特征。分子生物学技术是日益发展的，因此分子药理学技术也是不断发展的。目前的常用技术有检测核酸的 Southern 印迹、Northern 印迹、核酸测序等技术；检测蛋白质的 Western 印迹、双向电泳、免疫沉淀、Pull down 等；分子克隆用到的基因工程技术及动物转基因技术等。

1.4.2.1 Southern 印迹

Southern 印迹(Southern blot)是进行基因组 DNA 特定序列定位的通用方法。其基本原理是：具有一定同源性的两条核酸单链在一定的条件下，可按碱基互补原则特异性杂交形成双链。一般利用琼脂糖凝胶电泳分离经限制性内切酶消化的 DNA 片段，将胶上的 DNA

变性并在原位将单链 DNA 片段转移至尼龙膜或其他固相支持物上，经干烤或者紫外线照射固定，再与相对应结构的标记探针进行杂交，用放射自显影、荧光或酶反应显色，从而检测特定 DNA 分子的含量。大体流程见图 1.2。

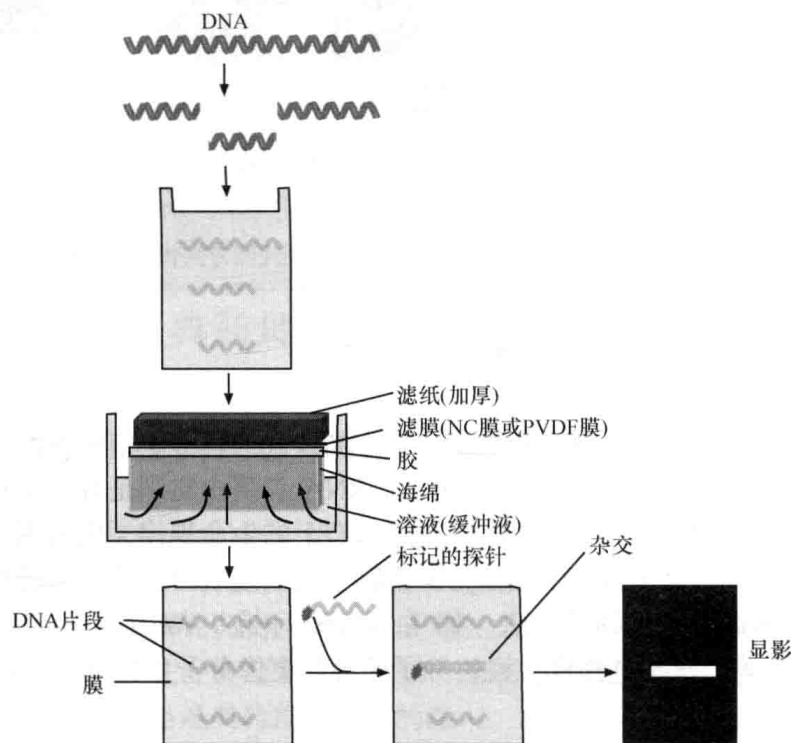


图 1.2 Southern 印迹的流程。提取到的 DNA 先进行酶切,然后进行 SDS-PAGE 电泳(变性电泳形成单链), 继而进行转膜,转膜后再和探针(荧光标记或放射性核素标记)杂交,杂交后显影。根据显影的位置和探针序列即可识别出相应的 DNA

1.4.2.2 Northern 印迹

Northern 印迹(Northern blot)是一种在 RNA 水平检测基因表达的方法，通过 Northern 印迹可以检测到细胞在生长发育特定阶段、胁迫或病理环境下特定基因表达情况。其原理和方法与 Southern 印迹非常相似。

1.4.2.3 Western 印迹

Western 印迹(Western blot)采用的是十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)，被检测物是蛋白质，“探针”是抗体，“显色”用的是标记的二抗。经过 SDS-PAGE 分离的蛋白质样品，转移到固相载体(例如硝酸纤维素薄膜或 PVDF 膜)上，固相载体以非共价键形式吸附蛋白质，且能保持电泳分离的多肽类型及其免疫学活性不变。以固相载体上的蛋白质或多肽作为抗原，与对应的抗体起免疫反应，再与荧光、酶或放射性核素标记的第二抗体反应，经过底物显色或放射自显影以检测电泳分离的特定靶基因表达的蛋白成分。该技术也广泛应用于检测蛋白表达水平。与免疫组化相比，该技术用到分子质量信息(电泳)和抗体特异性信息，因此假阳性率较免疫组化要低，得到的表达上调或

下调信息更可靠；但不能获得蛋白表达的空间信息。

1.4.2.4 双向电泳

双向电泳 (two-dimensional electrophoresis) 是一种蛋白质组学研究技术，是等电聚焦电泳和 SDS-PAGE 的技术组合，即先进行等电聚焦电泳 (按照等电点 pI 分离)，然后再进行 SDS-PAGE (按照分子大小分离)，经染色 (常用银染) 可以得到一个二维分布的蛋白质电泳图 (图 1.3)。因此，双向电泳检测获得的信息比 Western blot 丰富 (等电点信息和分子质量信息)。只是双向电泳采用的主要是银染，检测灵敏度要比 Western blot 低。双向电泳是发现新蛋白类靶点的重要方法。

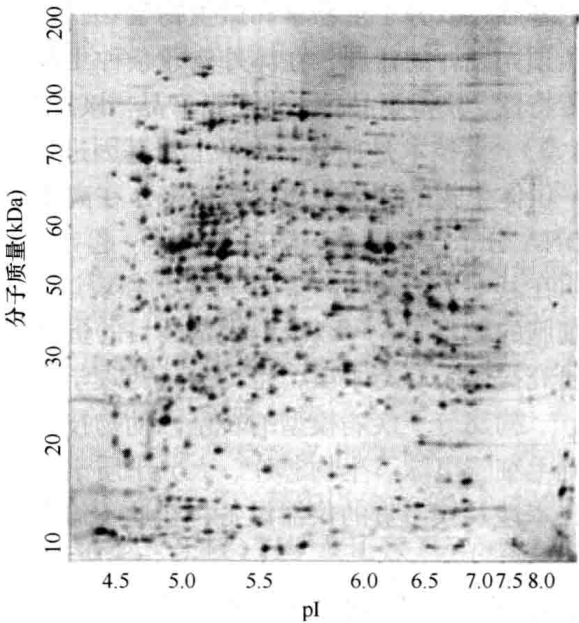


图 1.3 双向电泳图谱。横轴反映蛋白质的等电点 (pI)，纵轴反映蛋白质的分子质量

1.4.2.5 免疫沉淀

免疫沉淀 (immunoprecipitation) 是利用抗体特异性反应富集纯化目的蛋白的一种方法。抗体与细胞裂解液或表达上清中相应的蛋白结合后，再与蛋白 A/G (Protein A/G) 或二抗偶联的琼脂糖 (agarose) 或葡聚糖 (sepharose) 珠子孵育，通过离心得到珠子-蛋白 A/G 或二抗-抗体-目的蛋白复合物，沉淀经过洗涤后，重悬于电泳上样缓冲液，煮沸 5~10min，在高温及还原剂的作用下，抗原与抗体解离，离心收集上清，上清中包括抗体、目的蛋白和少量的杂蛋白 (图 1.4)。

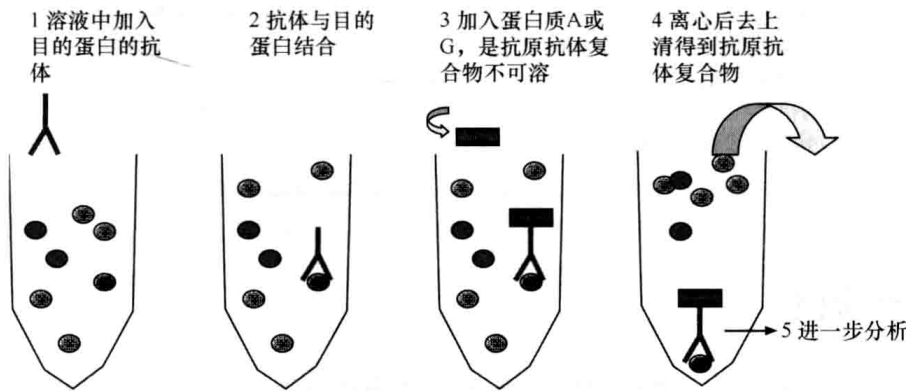


图 1.4 免疫沉淀原理图。步骤 3 也可加入凝胶或磁珠偶联的二抗来替代蛋白质 A 或 G

1.4.2.6 基因工程技术

基因工程 (genetic engineering) 又称基因拼接和 DNA 重组技术，是以分子遗传学为理

论基础，以分子生物学和微生物学(细胞生物学)的现代方法为手段，将不同来源的基因按照预先设计的蓝图，在体外构建杂种 DNA 分子，然后导入活细胞，以改变生物原有的遗传特性、获得新品种、生产新产品。该技术实际上是多个分子生物学技术的组合体(详见第 4 章)。该技术是在分子水平上对基因进行操作的复杂技术。它用人为的方法将所需要的某一供体生物的遗传物质提取出来，在离体条件下用适当的工具酶进行切割后，将它与载体 DNA 分子连接起来，然后与载体一起导入某一更易生长、繁殖的受体细胞中，以让外源物质在其中“安家落户”，进行复制和表达，从而获得新物种的一种崭新技术。通过提取改造细胞的靶蛋白，可以获得大量的目的蛋白(分子克隆)。基因工程技术为基因的结构和功能研究提供了有力手段，也为分子药理学提供了模型细胞和模型分子。

构建分子疾病模型的转基因动物技术参见第 13 章。除此之外，分子药理学还可能用到毛细管电泳、生物芯片、大分子质谱、MNR、大分子结晶和 X 射线衍射等技术。相关技术涉及较昂贵的仪器设备，在此不做介绍。

1.5 分子药理学的发展简史

药理学一直伴随着人类历史的发展而发展，数学、物理学、化学和生物学等基础科学(国外也称为前药理学 pre-pharmacology)是药理学发展的支柱。根据药理学的定义并结合我们的教学经历，按照认识规律可将药理学的发展归纳为五个阶段^[1]，其中第四阶段以后进入到分子药理学时期(表 1.1)。

表 1.1 药理学发展阶段简表

阶段	时间(年)	开始的标志性事件	归属	相当的传统阶段	特点
一	~前 1550	无记载	史前阶段		无文字史料记载，只有传说故事
二	前 1550~	《埃伯斯医药集》成书	经验阶段	本草学阶段	化学成分和作用靶点均不清楚
三	1805~	1805 年 Friedrich Serturmer 首先从植物药鸦片中分离出吗啡	药物成分清楚阶段	近代药理学阶段	药物的化学成分开始清楚
四	1905~	1905 年 Langley J.N.证实了受体的存在	作用靶点清楚阶段	分子(现代)药理学阶段	药物的作用靶点开始清楚
五	1996~	1996 年设计 Imatinib 成功	主动阶段		根据靶点结构主动设计药物

1.5.1 第一阶段

早期人类在与疾病作斗争的同时自然也会发现某些食物(药物)能改变机体的某些功能，从而达到防病治病的目的。由于这一阶段还处在被动的自由探索阶段，未能形成足够的经验，也未能通过文字记录下来，因此也称之为史前阶段。此阶段，知识极度匮乏，先民们主要采用试错法(try and error)进行药物防病治病的探索。因此，这种“临床试验”导致此阶段的药理学发展充满了风险，中毒死亡时有发生。尽管这种“临床试验”有悖于现

代伦理学要求,但这种大胆尝试还是为积累防治病的经验起到了关键作用,推动着药理学的发展。在中国,“神农尝百草,一日遇七十毒”的传说是反映先民在药理学方面探索的经典故事。

1.5.2 第二阶段

以公元前约 1550 年的《埃伯斯医药集》(*Ebers' Papyrus*)成书为标志,药理学的发展进入到第二阶段。在这一阶段,药物的化学本质和靶点也是不清楚的。但这一阶段开始对第一阶段形成的散在经验进行系统归纳总结,取得了更好的应用效果并形成一定的理论。由于此阶段的药物以植物为主,以动物药、微生物药及矿物药为辅,所以常称之为本草学阶段。此阶段形成的药理学知识是根据经验归纳提升的,缺乏严格意义上的“实验”研究结果,因此也称之为经验阶段。在中国,本草学方面的著作很多,其中以公元前 1 世纪的《神农本草经》和明代李时珍的《本草纲目》最为著名。在这一阶段,古埃及还有 *Edwin Smith Papyrus*,以及中世纪的 *Kitab al-Saydah*、*The Canon of Medicine*、*De Medicinis Universalibus et particularibus* 等。

需要说明的是,在此阶段部分无机药物的成分也开始清楚。但此阶段发现的无机物无特定作用靶点,其疗效多由其理化性质决定,如碳酸钠、硅酸、砷酸的应用等。因此药用无机物的发现一般不认为是药物分子清楚的标志性事件。为了解释药物的作用,此阶段也产生了许多理论,其中以中国的“阴阳五行”、“四气五味”等理论最为著名。

在这一阶段,对药物本质的认识主要停留在“天然材料”阶段。由于把握不住药物的本质,很难科学地指导药物的临床实践,也很难充分发挥药物的应有疗效。另外由于信息传播不发达,用药经验的积累和传承非常重要,如中国历史上许多医家派系均有独特的用药规律。在此阶段用药物对付常见病、多发病尚可,但对突发病、特别是传染病难以为力。

1.5.3 第三阶段

该阶段以 1805 年德国科学家 Friedrich Serturmer (1783~1841) 提取并证实^[2]阿片中活性成分吗啡为标志。从此,药物的化学本质开始清楚。吗啡具有很强的生物活性,甚至吗啡从发现到现在一直是经典的镇痛药并写进教科书。吗啡来自于天然药物阿片,其生物活性基本上能解释阿片的主要药理作用,因此吗啡的提纯,特别是生物活性的验证标志着药理学的发展进入一个新的阶段。后来,具有生物活性的天然产物不断发现,如土的宁、奎宁、水杨酸等。因此,此阶段也可视为分子药理学的萌芽阶段。

进入此阶段后,药理学越来越重视药物的化学本质。随着有机化学的发展,化学合成物质(含半合成)开始成为药物,如阿司匹林(1899 年)。在实践方面,此阶段开发了注射剂,并试用于某些肿瘤^[3]和感染^[4]的治疗,这为防病治病提供了新的手段。尽管如此,感染性疾病及其并发症仍是这一阶段危害人类健康的主要疾病。这些疾病的治疗临床多以重金属制剂为主要药物,如汞制剂、砷制剂等,疗效差毒性大。由于对药物作用的靶点认识不清,此阶段也很难针对性地开发出高效低毒的药物。

1.5.4 第四阶段

1905 年 Langley J.N. (1852~1925)^[5]证实了箭毒和尼古丁通过某个“靶点”影响骨骼肌舒缩,由此证实了受体的存在,他当时将这种“靶点”称为肌肉的“receptive substance”。此事件标志着药物作用的靶点开始清楚,药理学的发展进入一个新的时代。如果借用“黑箱效应”一词来描述药理学发展阶段,那么第一、二阶段属于“全黑”状态,第三阶段属于“半黑”状态,而受体证实,“黑箱”开始被彻底打破,药理学的发展开始进入“白”的状态。

在此阶段,由于生物化学和分子生物学的发展,生物大分子不断发现,包括受体、离子通道、酶及核酸。也就是在这个阶段,许多药物的作用靶点相继被找到并确认,如胆碱酯酶^[6]、肾上腺素受体^[7]等,药理学的发展进入到一个新的高潮。

需要说明的是,此阶段的药理学发展依然遵从先活性成分(药物)后靶点的道路,即正向药理学。在活性信息方面缺乏靶点三维结构的指导,许多具有突破性的活性成分发现均来自“偶然”或是大规模的“盲目”活性筛选结果。活性成分找到后,在此基础上再以此为“母版”,通过结构改造获得新型药物。

如在偶然发现青霉素后的几十年,不但找到了青霉素的抗菌机制和耐药机制,还对其结构母核进行修饰,生产出大量的半合成青霉素,由此克服了原青霉素抗菌谱窄、不能口服、对铜绿假单胞菌无效等缺点。随着青霉素及半合成青霉素的推广使用,许多感染变得可控,使人类的平均寿命明显延长。但青霉素等抗菌药物的滥用,使得细菌的进化不断加快,甚至产生了“无药可治”的“超级细菌”^[8],这是当初的研究者始料不及的。

由此可见,该阶段及以前的发展阶段,药理学的发展整体上均处于一个“被动”状态。

根据药理学的定义,受体靶点的提出只是分子药理学的起始阶段;中心法则的阐明和分子生物学方法在药理学中的应用才标志着药理学的发展进入到分子药理学时期。

1.5.5 第五阶段

当科学家认识了药物的化学本质和靶点的本质(特别是靶点的空间结构)后,根据靶点设计药物是药理学发展的必然。一旦靶点导向的药物设计成功,则标志着药理学的发展进入到另一个新阶段。

酪氨酸激酶是参与肿瘤增殖的关键分子之一,一直受到肿瘤研究者的关注。1996 年^[9,10],根据酪氨酸激酶的结构成功设计出 imatinib,并通过活性验证(该药 2001 年被 FDA 批准上市)。此事件标志着药理学的发展进入到第五阶段,即“主动”阶段。

在此阶段,成功设计并上市的酪氨酸激酶抑制剂还有 gefitinib、erlotinib 等^[11]。除此以外,抗体药物也得到了很好发展,如封闭乳腺癌 Her-2/neu 蛋白的 Herceptin(赫赛汀)^[12]、封闭肿瘤 CD20 抗原的 Mabthera(美罗华)等也相继上市^[13]。在此基础上,利用抗体的特异性,设计出抗体偶联(包被)的主动靶向药物也得到了突破性发展。此阶段开发的这些药物,均具有较高的科技含量,具有高效低毒、针对性强的特点,这是以往药物不可比拟的,这为临床用药提供了新的选择。

特别地,过去的30年是分子药理学发展的黄金阶段。主要的里程碑事件有:1986年首个G蛋白偶联受体(GPCR)—— β_2 肾上腺素受体的克隆^[14],紧接着是其他肾上腺素受体基因家族的克隆及其他GPCRs基因的克隆。20世纪80年代分子生物学呈爆炸式发展,克隆了许多离子通道亚基(例如N-型乙酰胆碱受体和电压门控 Na^+ 通道)基因和核受体基因。药靶克隆一直保持着较高的速度直到20世纪90年代。但直到人类基因组计划完成的2001年,主要药靶家族的基因数量才得以确定。据估计,人类基因组的克隆也将发现许多潜在的新药靶。模式动物小鼠(2002年)和大鼠(2004年)基因组计划的完成对分子药理学研究极为有利。

基因克隆和表达技术可以大量精确地获得药物作用的分子信息,这是传统药理学方法采用动物离体组织研究无法实现的。在GPCRs的研究中,详尽的表达谱分析将运用到一系列分子生物学技术,比如原位杂交、RT-PCR(反转录聚合酶链反应)和Northern印迹。而且,可将克隆的GPCR基因装入一个简单的DNA质粒,这就能在第一时间用细胞系转染表达GPCRs。这样,可在不表达某受体亚型的细胞上表达该受体亚型,进而可以细致地研究该受体的药理学(如第二信使通路)特征;如果采用组织标本这是很难完成的。另外,如点突变技术能让药理学家基于已有认识进一步研究复杂的结构-功能关系;比如确定哪个氨基酸残基在配体和受体的结合中最为重要。随着克隆和表达技术的进一步发展,在体操控基因表达也变得可行。现在从整个基因组中删除某个基因(基因敲除),或在特定组织器官中删除某个基因(条件敲除)并研究随后的变化已经很普遍了(第13章)。同样,采用基因敲入技术将突变型的基因插入到生物基因组也是可行的(第13章)。这些转基因技术既可以让分子药理学家在体研究发育学和生理学方面的基因功能,也可用于建立疾病模型。

分子生物学的技术变革促使人们不断开发新技术,研究重要药理学靶点的信号转导,比如受体和离子通道。这些技术包括报告基因技术、用于活细胞标记的绿色荧光蛋白(GFP)技术和用于蛋白-蛋白相互作用的酵母双杂交技术。本书将在相关章节详尽介绍以上技术和其他的分子生物学新技术。21世纪初的另一个巨大突破是基于X射线晶体学的高分辨率膜蛋白结构成像技术。该技术测定了第一个GPCR和离子通道的X射线衍射结构,这让科学家们能在分子水平认识这些蛋白的功能。的确,晶体学是药物发现的重要工具,因为晶体结构可用于虚拟药物设计(in silico drug design)。最近,研究者用NMR谱获得了 β_2 肾上腺素受体高分辨率的结构信息^[15]。NMR技术早已用于其他药靶如激酶的研究,用该技术进行结构研究的显著优势是可以获得GPCR及被配体激活后的动态数据,这是X射线衍射技术不可能实现的。用于药靶研究的分子药理学技术参见图1.5。

有意思的是,尽管分子生物学技术的发展使我们获得了更多的药靶知识,上市的新药数量却是明显下滑的^[16]。然而,由于新药上市大概需要15年的周期,就此判断人类基因组计划对于新药发现的冲击力还为时过早。据估算,2009年全球药品市场的销售额是8150亿美元。然而,几年之后医药企业主要面临的问题是大品种药品的专利

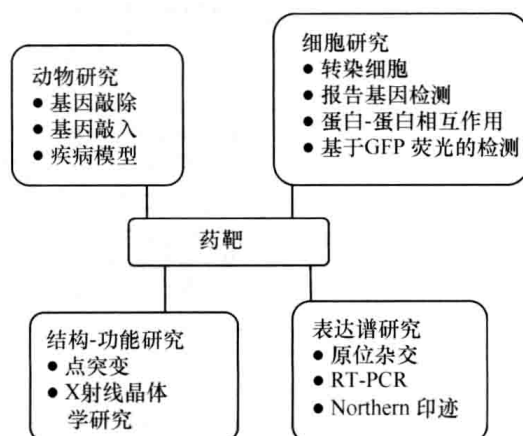


图 1.5 分子药理学研究中涉及药靶研究的分子生物学方法