

· 基础研究 ·

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2024.23.003

网络首发 [https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240827.1123.005\(2024-08-27\)](https://link.cnki.net/urlid/50.1097.R.20240827.1123.005(2024-08-27))以牛蛙为实验对象药物拮抗参数测定的教学实验条件构建^{*}金 悠¹, 刘 慧², 杨 方¹, 王 芳², 余上斌^{1△}(1. 华中科技大学国家级基础医学实验教学示范中心, 武汉 430030; 2. 华中科技大学
同济医学院基础医学院药理学系, 武汉 430030)

[摘要] **目的** 探讨实验对象牛蛙在药效动力学实验-药物量效曲线绘制及竞争性拮抗剂 pA₂ 测定中的应用。**方法** 以牛蛙腹直肌为标本, 采用半对数摩尔浓度累积给药法, 观察竞争性拮抗药筒箭毒碱对激动剂乙酰胆碱(ACh)收缩作用的影响。**结果** 以 200~250 g 牛蛙(雌雄不限)的腹直肌为标本, $1.3 \times 10^{-4} \sim 1.3 \times 10^{-1}$ mol/L 系列浓度的 ACh 溶液能够使大多数标本在第 2、3 次给药时引起收缩反应, 且可使标本的收缩达到最大效应; 0.4×10^{-3} mol/L 筒箭毒碱溶液可有效拮抗 ACh 的作用; 此外标本产生的收缩效应与实验动物为蟾蜍时的效应具有高度相关性($r > 0.90$)。**结论** 牛蛙拮抗参数测定条件可满足实验要求。

[关键词] 牛蛙; 乙酰胆碱; 量效曲线; 筒箭毒碱; 拮抗参数 pA₂**[中图分类号]** R-4 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2024)23-3535-05Construction of teaching experimental conditions for determination of drug antagonism parameters with bullfrog as experimental object^{*}JIN You¹, LIU Hui², YANG Fang¹, WANG Fang², YU Shangbin^{1△}

(1. National Demonstration Center for Experimental Teaching of Basic Medicine, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China; 2. Department of Pharmacology, School of Basic Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China)

[Abstract] **Objective** To explore the application of bullfrog as the experimental object in pharmacokinetic experiment drug dose-effect curve drawing and competitive antagonist pA₂ determination. **Methods** The rectus abdominis muscle of bullfrog served as the sample. The semi-logarithmic molal concentration accumulation method was used. The effect of competitive antagonist-tubocurarine on the contraction action of acetylcholine (ACh) agonist was observed. **Results** The rectus abdominis of bullfrog (regardless of gender) weighed 200–250 g served as the sample. The ACh solution of $1.3 \times 10^{-4} - 1.3 \times 10^{-1}$ mol/L series concentrations could cause the contraction reaction of most specimens when adding the second and third doses, moreover which could make the contraction of the sample to reach the maximum effect; 0.4×10^{-3} mol/L tubocurarine solution could effectively antagonize the effect of ACh; in addition, the contraction effect generated the specimen was highly correlated with the effect of bullfrog or toad as the experiment animal. **Conclusion** The determination conditions of bullfrog antagonistic parameters could meet the experimental requirements.

[Key words] bullfrog; acetylcholine; dose-effect curve; tubocurarine; antagonistic parameter pA₂

“药物量效曲线绘制及竞争性拮抗剂 pA₂ 测定”是验证药理学有关药效动力学知识的代表性实验之一, 对帮助医学生了解药物剂量与效应之间的关系^[1]、学习离体器官实验的研究方法具有重要意义。2020 年 9 月 30 日国家林草局发布了《关于规范禁食野生动物分类管理范围的通知》^[2], 对蟾蜍等 64 种野生动物提出了分类管理要求。蟾蜍不再适合用于常规药理学实验, 寻找其他动物替代蟾蜍是很有必要的。牛蛙属于蛙科, 蟾蜍属于蟾蜍科动物, 两者虽然

种属不同, 但牛蛙可人工繁殖, 易获取, 腹直肌标本取材也同样简便。因此, 本研究旨在探讨以牛蛙为实验对象, 选择适宜剂量的乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)^[3]和筒箭毒碱(tubocurarine)^[4], 以便达到“药物量效曲线绘制及竞争性拮抗剂 pA₂ 测定”的实验要求, 现报道如下。

1 材料与方法**1.1 材料****1.1.1 实验动物**^{*} 基金项目: 华中科技大学 2023 年实验技术研究项目(HZKJSYJSXM2023084)。 [△] 通信作者, E-mail: jinyou81@163.com。

成年健康普通级牛蛙,由上栗县卓越水产养殖专业合作社提供。水生野生动物经营利用许可证号为(萍)水野经字(2020)2号。

1.1.2 试剂与仪器

氯化 ACh、五水盐酸筒箭毒碱、分析纯购自美国 Sigma 公司。BL-420F 生物信号采集系统、压力换能器购自成都泰盟软件有限公司,电子天平(A11048 型)购自上海安亭电子仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 标本制备与固定

牛蛙断头处死或用捣髓针破坏其脊髓,仰卧固定于蛙板上。从耻骨端沿腹白线剪开腹部皮肤,暴露斜纹腹直肌,沿肌丝走向,在靠近腹白线(中间部位)或远离腹白线(边侧部位)处,取宽 0.3~0.5 cm、长 1.0~1.5 cm 的肌肉标本,迅速转移至含有 10 mL 任氏液的器官浴槽中,通入混合氧气(95% O₂ + 5% CO₂),前负荷给 1 g 力,加入 ACh(1.3×10⁻² mol/L) 20 μL 检查标本活性。选取活性较好标本,用任氏液连续冲洗 2~3 次,使标本张力回到基线附近,继续平衡 0.5 h 后开始实验。平衡期间每间隔 15 min 更换 1 次任氏液。

1.2.2 量效曲线绘制

标本稳定后,每个标本分别按照半对数摩尔浓度累积法^[5-9],依次加入不同浓度的激动剂 ACh 溶液。9 次给药体积依次为 10、20、70、20、70、20、70、20、70 μL,前 3 次给药浓度为 1.3×10⁻⁴ mol/L,4、5 次浓度为 1.3×10⁻³ mol/L,6、7 次浓度为 1.3×10⁻² mol/L,8、9 次浓度为 1.3×10⁻¹ mol/L ACh 溶液。不同 ACh 浓度对量效曲线影响的实验中仅改变 ACh 给药浓度,不改变给药剂量。记录每次给药后的最大收缩效应,以便制作 ACh 的第 1 条量效曲线。计算各浓度效应百分比即 ACh 各浓度引起的收缩效应与最大效应的比值。以效应百分比为纵坐标,ACh 浓度的负对数值为横坐标,用平滑曲线将各数据点连接起来绘制量效曲线图^[10-14]。当累积给药至收缩张力达到最大时,用 10 mL 任氏液连续冲洗标本两次,当张力恢复到基线水平时加入竞争性拮抗剂筒箭毒碱,10 min 后重复给予不同浓度的 ACh 溶液,绘制第 2 条量效曲线。

1.3 统计学处理

采用 SPSS23.0 软件进行数据分析,计数资料以例数或百分比表示,Pearson 检验分析相关性^[15-17]。

2 结 果

2.1 不同浓度 ACh 对量效曲线绘制的影响

以 200~250 g 雄性牛蛙腹白线两侧肌肉为标本,1.0×10⁻⁴~1.0×10⁻¹ mol/L、1.3×10⁻⁴~1.3×10⁻¹ mol/L、1.5×10⁻⁴~1.5×10⁻¹ mol/L 系列浓度 ACh 溶液的量效曲线图见图 1。结果显示,1.0×10⁻⁴~1.0×10⁻¹ mol/L ACh 溶液在绘制量效曲线

时第 4 次给药时才能使部分标本产生收缩效应,且第 9 次给药时标本效应还有上升趋势,说明肌肉收缩未达到最大效应,未能达到量效曲线绘制的实验要求。1.5×10⁻⁴~1.5×10⁻¹ mol/L ACh 溶液使大多标本第 1 次给药时就产生了效应,不利于学生观察 ACh 的最小有效浓度。而 1.3×10⁻⁴~1.3×10⁻¹ mol/L 系列浓度的 ACh 溶液能够使大多数标本在第 2 次给药时超过最小有效浓度产生收缩效应,第 5 次给药时张力平均升高最多,且第 9 次给药时张力改变的效应较小,说明该批标本的收缩张力基本已达最大,即使再增加 ACh,标本也不再收缩,据此绘制的 ACh 量效曲线可呈现典型的“S”形。故 1.3×10⁻⁴~1.3×10⁻¹ mol/L 系列浓度的 ACh 溶液能够满足绘制量效曲线的实验要求。

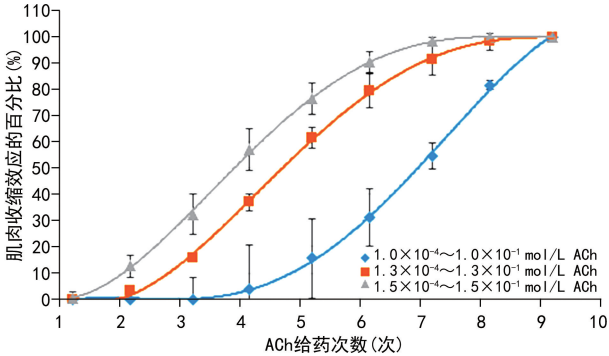


图 1 不同浓度 ACh 对牛蛙腹直肌的影响(n=8)

2.2 牛蛙体重对 ACh 量效曲线绘制的影响

以腹白线两侧肌肉为标本,3 种不同体重范围(130~180、200~250、270~320 g)雄性牛蛙 ACh 量效曲线见图 2。当牛蛙体重为 130~180 g,大多数标本 ACh 在第 4 次给药时才起效,第 9 次给药时效应依旧呈上升趋势,如果补充 ACh,标本可能会继续收缩,张力持续上升。当牛蛙体重达 270~320 g 时,部分标本在 ACh 第 3 次给药时轻微收缩,且张力改变最大值较小,说明标本内在活性较差,不利于 pA₂ 值的测定。而当牛蛙体重为 200~250 g 时,部分标本在 ACh 第 2 次给药时即可超过最低有效浓度引起收缩,第 5 次给药时张力平均升高最多,且第 9 次给药时效应改变较小,说明该批标本的收缩程度基本已达最大,即使再增加 ACh,标本也无继续收缩的空间,据此绘制的 ACh 量效曲线可呈现典型的“S”形。

2.3 牛蛙性别对 ACh 量效曲线绘制的影响

以腹白线两侧肌肉为标本,200~250 g 雄性、雌性牛蛙 ACh 量效曲线见图 3。从量效曲线图可以看出,两条量效曲线非常接近。雄性与雌性牛蛙的量效曲线均呈“S”形,基本已达到标本的最大收缩效应。说明性别对该体重范围牛蛙药物量效曲线测定的影响较小,雌、雄牛蛙均可用作 ACh 量效曲线的绘制。

2.4 标本部位对 ACh 量效曲线绘制的影响

以 200~250 g 雄性牛蛙腹白线(中间部位)、远离

腹白线(边侧部位)肌肉为标本,ACh 量效曲线见图 4。结果显示,两条量效曲线趋势基本一致,均可达到标本的最大效应,说明源自体重 200~250 g 的牛蛙腹直肌不论取材部位,均可用作测定药物量效曲线的标本。

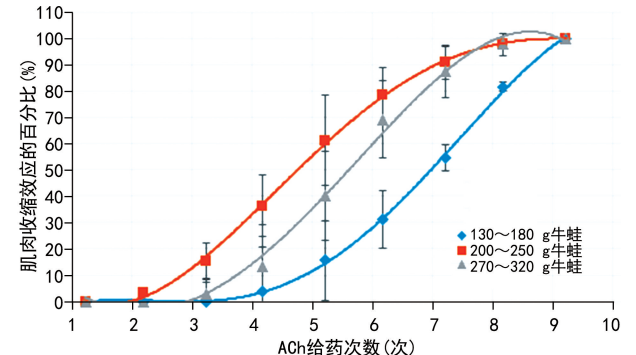


图 2 ACh 对不同体重牛蛙腹直肌的影响 (n=8)

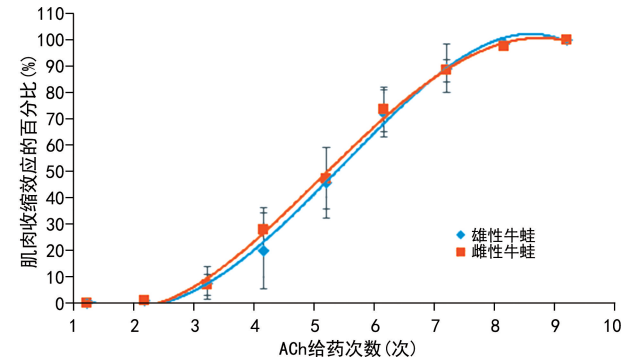


图 3 ACh 对不同性别牛蛙腹直肌的影响 (n=8)

2.5 筒箭毒碱浓度对拮抗参数测定的影响

表 1 不同浓度筒箭毒碱作用前后 ACh 起效时的给药次数 (n, 次)

牛蛙编号	0.1×10 ⁻³ mol/L 筒箭毒碱时 ACh 给药次数		0.4×10 ⁻³ mol/L 筒箭毒碱时 ACh 给药次数		1.0×10 ⁻³ mol/L 筒箭毒碱时 ACh 给药次数	
	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)
1	3	4	2	4	3	5
2	3	3	3	4	2	6
3	2	3	3	5	2	6
4	2	3	3	5	3	7
5	4	4	4	6	3	6
6	4	4	2	4	4	6
7	2	3	2	5	3	7
8	3	3	3	5	2	5
平均值	2.88	3.38	2.75	4.75	2.75	6.00

(-):器官浴槽中无筒箭毒碱;(+):器官浴槽中有筒箭毒碱。

2.6 蟾蜍、牛蛙实验结果对比分析

2019 级本科生以蟾蜍为实验对象、应用 1.0×10⁻⁴~1.0×10⁻¹ mol/L ACh 和 1.0×10⁻³ mol/L 筒箭毒碱溶液时标本张力测定结果原始图见图 5A。2023 级本科生以 220~280 g 牛蛙为实验对象、应用 1.3×10⁻⁴~1.3×10⁻¹ mol/L ACh 和 0.4×10⁻³ mol/L 筒箭毒碱溶液时标本张力测定结果原始图见

以 200~250 g 雄性牛蛙腹白线两侧肌肉为标本,竞争性拮抗剂筒箭毒碱(0.1×10⁻³ mol/L、0.4×10⁻³ mol/L、1.0×10⁻³ mol/L)存在的条件下,ACh 引发收缩效应时的给药次数见表 1。结果显示,半数牛蛙标本(第 2、5、6、8 个)加入 0.1×10⁻³ mol/L 筒箭毒碱溶液后与无筒箭毒碱时开始产生收缩效应的给药浓度数相同,说明低浓度筒箭毒碱的拮抗作用表现较弱。1.0×10⁻³ mol/L 筒箭毒碱溶液可以使半数牛蛙标本(第 2、3、4、7 个)首次产生收缩效应的给药次数增加 4 次,呈现的拮抗作用太强烈,导致第 2 条量效曲线大多数仅 3~4 个有效数据,不能满足数据处理的要求。只有在 0.4×10⁻³ mol/L 筒箭毒碱溶液存在的条件下,ACh 溶液能够使大多数标本首次产生收缩效应的给药次数延后 3 个点,既能够让学生观察到筒箭毒碱的拮抗作用,又有 5~6 个有效数据,满足计算拮抗参数数据处理的要求。

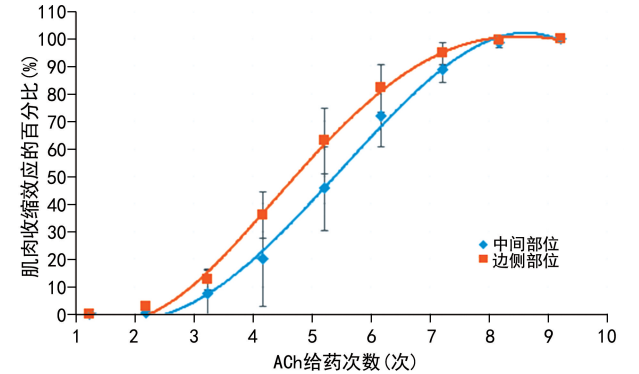


图 4 ACh 对牛蛙不同部位腹直肌的影响 (n=8)

图 5B。

两次实验在绘制量效曲线时均在第 3 次给药时产生收缩效应,第 9 次给药时标本收缩效应较小,说明标本基本已达到最大效应,满足药物量效曲线绘制的实验要求。在有竞争性拮抗剂筒箭毒碱存在时,标本都在第 4 次给药时才开始收缩,且收缩的力度明显低于无筒箭毒碱时量效曲线中第 4 次给药时的力度,

既表现了筒箭毒碱的竞争性拮抗作用,又满足了拮抗参数数据处理的要求。无筒箭毒碱时 ACh 量效曲线的 Pearson 相关系数(r)为 0.95,有筒箭毒碱存在时 ACh 量效曲线的 r 为 0.91。故以 200~250 g 牛蛙(雌雄不限)为实验对象,应用 0.4×10^{-3} mol/L 筒箭

毒碱溶液时标本在 $1.3 \times 10^{-4} \sim 1.3 \times 10^{-1}$ mol/L ACh 溶液的刺激下产生的收缩效应与实验动物为蟾蜍时基本一致,相关系数 $r > 0.90$,满足“药物量效曲线及拮抗参数 pA2 测定”的实验教学要求。

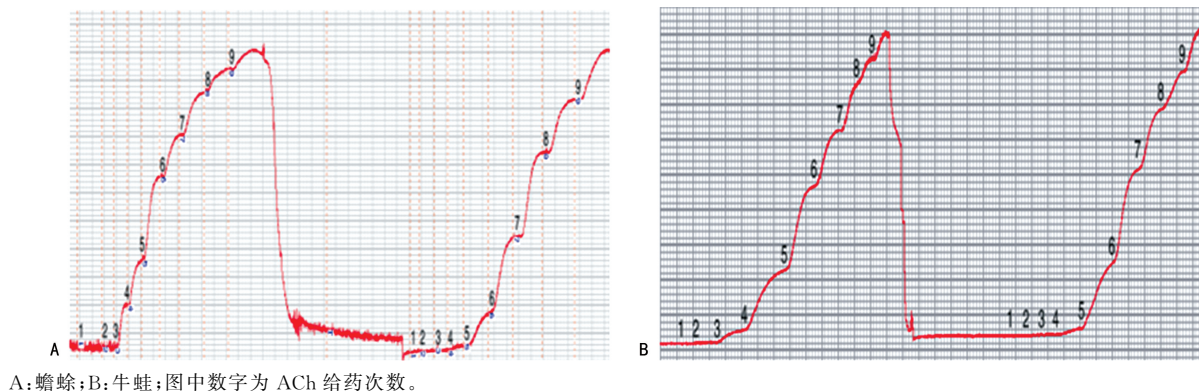


图 5 pA2 实验结果

3 讨 论

“药物量效曲线及竞争性拮抗剂 pA2 的测定”是药理学实验经典项目,是研究药物效应的重要方法,同时也是联系药学与医学、基础与临床的桥梁技术。除蟾蜍腹直肌^[6,18]外,也有文献报道选用豚鼠回肠^[19-20]、家兔空肠^[21-22]、大鼠胃底肌^[23-24]等观察药物的收缩或舒张作用效应。本实验结果显示,以牛蛙作为拮抗参数 pA2 测定实验的研究对象具有以下优点:(1)在实验动物遴选,家兔最贵,价格几乎是牛蛙的 8 倍,豚鼠、大鼠饲养成本也较高;使用牛蛙可降低实验成本,且以腹直肌为标本,操作简单、干净、易掌握。(2)蟾蜍是野生分类管理动物,其耳后腺可分泌毒液,多生活在水底淤泥或烂草里;以蟾蜍为实验动物有潜在的操作风险,存在安全隐患。(3)牛蛙生长速度快^[25-26],环境适应能力强,生存的水质较清新,其易得性和清洁程度更符合医学实验对动物的要求。

以蟾蜍为实验对象进行本实验时,器官浴槽中 ACh 第 2 或第 3 次给药时已超过最小有效浓度,蟾蜍腹直肌收缩,表现为张力增加;有竞争性拮抗剂筒箭毒碱存在时 ACh 第 4 或第 5 次给药时起效。而在相同实验条件下更换实验动物为牛蛙后,ACh 一般都是第 4 或第 5 次给药时才起效;筒箭毒碱存在时,激动剂的最小有效浓度增加更多,有时甚至到第 8 次给药时才起效,造成有效数据量不足,严重影响拮抗参数 pA2 值的计算。这提示牛蛙对 ACh 的激活效应反应较迟钝,而对竞争性拮抗剂筒箭毒碱的拮抗作用非常敏感,因此重新摸索了实验条件。实验动物由蟾蜍改为牛蛙后,ACh 起始浓度必须由 1.0×10^{-4} mol/L 增加为 1.3×10^{-4} mol/L,才能使标本在第 2 或第 3 次给药时的作用下起效,第 9 次给药时达到最大效应;鉴于筒箭毒碱对牛蛙腹直肌的收缩具有较强的拮抗

作用,筒箭毒碱溶液浓度由 1.0×10^{-3} mol/L 降为 0.4×10^{-3} mol/L,且选用 200~250 g 牛蛙(雌雄不限)后标本产生的收缩效应与实验动物为蟾蜍时基本一致,达到了“药物量效曲线及拮抗参数 pA2 测定”的实验教学要求。

本实验技术稳定成熟,涉及的标本制备、离体器官孵育、给药、生物信号采集与数据处理、曲线绘制和结果计算等步骤,学生可在带教教师指导下独立完成;整个过程中烦琐的注意事项也有利于激发学生的主观能动性,促进学生通过自主学习来了解知识、理解知识及应用知识,提高学生观察问题、解决问题的能力^[27-28],同时更能够使大学生深刻理解在科研的道路上“细节决定成败”,培养其严谨的科学作风。

参考文献

- [1] 王恒,吉杨丹,陈林.网络视域下大专院校“药理学”教学改革策略探讨[J].教育教学论坛,2023,8(33):89-92.
- [2] 国家林业和草原局.国家林业和草原局关于规范禁食野生动物分类管理范围的通知[EB/OL].(2020-09-30)[2024-01-19].https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/2020-10/06/content_5549490.htm.
- [3] RAHMAN M M, BASTA T, TENG J, et al. Structural mechanism of muscle nicotinic receptor desensitization and block by curare[J]. Nat Struct Mol Biol, 2022, 29(4): 386-394.
- [4] PATEL S, SHUKLA J, JAIN S, et al. Repositioning of tubocurarine as analgesic and anti-inflammatory agent: exploring beyond myorelax-

- ant activity[J]. *Biochem Pharmacol*, 2022, 205: 115248.
- [5] 路夏莉, 陈根, 李洁. 热应激对大鼠肠系膜动脉 EDHF-途径介导的内皮依赖性舒张功能的影响[J]. *湘南学院学报(医学版)*, 2023, 25(4): 1-6.
- [6] 余万桂, 钱锋. 医学机能学实验指导[M]. 南京: 东南大学出版社, 2021: 162.
- [7] 周金娜. 三七皂苷与类似物结构改造及舒张心脑血管活性研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2021.
- [8] 李建婷, 付守廷, 胡春. 色满类化合物 HEF-05 对兔离体血管平滑肌舒张作用的研究[J]. *中南药学*, 2019, 17(2): 195-198.
- [9] 刘帅. 小檗碱对糖尿病大鼠血管神经功能损伤的作用[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.
- [10] 阿来·木合亚提. 新型喹唑啉酮类化合物 9050 效应评价及其神经环路机制研究[D]. 北京: 军事科学院, 2023.
- [11] 曹永孝, 曹蕾, 米燕妮, 等. 对《药理学》教材中质反应量效曲线的探讨[J]. *医学教育研究与实践*, 2023, 31(4): 448-454.
- [12] 沈金花, 张梦菲, 乐艳玲, 等. 雪茶乙醇提取物缓解哮喘症状的作用机理[J]. *中南民族大学学报(自然科学版)*, 2023, 42(5): 609-619.
- [13] 张盼, 韩莉花, 王婷, 等. 环孢菌素 A 对大鼠血压的影响[J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(11): 1557-1561.
- [14] 徐少君, 梁双琴, 赵乐, 等. 大蒜辣素对肺动脉高压模型大鼠的保护作用及机制研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2023, 34(8): 1061-1068.
- [15] ADLER J, PARMRYD I. Quantifying colocalization by correlation; the Pearson correlation coefficient is superior to the Mander's overlap coefficient[J]. *Cytometry A*, 2010, 77(8): 733-742.
- [16] WANG Z, LUO P, CHENG L, et al. Hapten-antibody recognition studies in competitive immunoassay of α -zearalanol analogs by computational chemistry and Pearson correlation analysis[J]. *J Mol Recognit*, 2011, 24(5): 815-823.
- [17] ZHANG X, BAI Y, TANG Q, et al. Development of epitopephore-based rational hapten design strategy: a combination of theoretical evidence and experimental validation[J]. *J Hazard Mater*, 2023, 445: 130615.
- [18] 朱延河, 王涛, 李帆, 等. 课程思政在机能实验教学中的评价分析与改革探讨: 基于西安交通大学医学部医学生问卷调查的统计分析[J]. *医学教育研究与实践*, 2020, 28(4): 652-656.
- [19] 何贤芳, 王万林, 王鸿颖, 等. 艾纳香油通过 NF- κ B 非经典信号影响花生四烯酸代谢缓解 LPS 所致巨噬细胞的炎症反应[J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2024, 45(2): 216-225.
- [20] 刘源, 王乔, 范辉宇, 等. 中医脾胃与胆碱能神经相关性的研究进展[J]. *光明中医*, 2023, 38(15): 3059-3062.
- [21] 文静, 罗凯萍, 方莹滢, 等. 桃金娘叶乙醇提取物对小鼠蓖麻油性腹泻及兔离体空肠平滑肌的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(2): 396-401.
- [22] 方莹滢. 穿心莲乙醇提取物对小鼠腹泻及对家兔空肠离体平滑肌的影响及其作用机制的研究[D]. 南充: 川北医学院, 2023.
- [23] DI NATALE M R, PATTEN L, MOLERO J C, et al. Organisation of the musculature of the rat stomach[J]. *J Anat*, 2022, 240(4): 711-723.
- [24] DI NATALE M R, ATHAVALA O N, WANG X, et al. Functional and anatomical gastric regions and their relations to motility control[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2023, 35(9): e14560.
- [25] DOS SANTOS N N, ALVES A X, REIS G P A, et al. Stress and recovery of american bullfrog after biometry management: biochemistry and erythrogram responses[J]. *Aquacult Int*, 2023, 31(4): 2113-2125.
- [26] WANG Z, XU Y, HUANG L, et al. Ultrastructural characteristics and morphological relationships of cardiomyocytes and telocytes in the myocardium of the bullfrog (*Rana catesbeiana*) [J]. *Anat Histol Embryol*, 2024, 53(1): e13008.
- [27] 郭占斌. 高校药理学实验教学改革创新研究[J]. *科教导刊*, 2020(9): 42-43.
- [28] 王博, 郗红娟, 王同慧, 等. 信息化平台下的药理学实验改革[J]. *中国多媒体与网络教学学报*, 2020(7): 201-203.

(收稿日期: 2024-02-28 修回日期: 2024-07-29)

(编辑: 袁皓伟)