

药品临床前慢性毒理实验质量控制因素分析

周顺长¹, 杜佐华², 曾繁典², 袁宗辉³

(1. 华中科技大学同济医学院实验动物学部, 武汉 430030; 2. 华中科技大学同济医学院药理学系, 武汉 430030; 3. 华中农业大学国家兽药残留基准实验室, 武汉 430070)

[摘要] 药品临床前大鼠慢性毒性实验是药物非临床安全性研究的重要组成部分, 是药物非临床毒理学研究中综合性最强、获得信息最多和对临床指导意义最大的研究。该文结合我国药品非临床前大鼠慢性毒理实验规定及实验室十余个大鼠慢性毒理学实验的经验和教训, 分析探讨了实验中动物实验质量的控制问题。认为大鼠实验技术因素的质量控制和值得关注的影响动物实验结果的环境控制、动物福利控制、误差控制决定着大鼠慢性毒理学实验结果的客观性, 直接影响药物的安全性评价结果, 其标准化问题应引起新药研发人员及管理机构的重视。

[关键词] 毒理, 慢性; 动物实验; 质量控制; 大鼠

[中图分类号] R99

[文献标识码] B

[文章编号] 1004-0781(2010)02-0265-03

尽管随着分子生物学理论和方法应用于毒理学研究, 出现了使外源性化学物毒性评价发展到体外细胞、分子水平的毒性测试与人体志愿者试验相结合的新模式, 某些复杂的整体实验将逐步为体外实验或构效关系数学模式所代替。但整体动物实验和人体观察相结合, 在相当长一段时期内仍然是药物毒理学评价中重要和必要的手段。大鼠慢性毒理学实验是药物临床前安全性研究有机组成部分, 是药物临床前毒理学研究中综合性强、获得信息多、对临床指导意义大、难以承受重复实验的研究。笔者在本文中结合我国药品临床前大鼠慢性毒理实验规定及实验室十余个大鼠慢性毒理学实验的经验和教训, 分析探讨了大鼠慢性毒理学实验中影响动物实验质量的因素。

1 大鼠毒理学实验中实验技术因素的质量控制

1.1 动物临床观察指标的质量控制 在药品临床前大鼠毒理学实验研究过程中, 其临床观察指标主要包括行为活动、体质量、增质量、饲料生物利用度等。这些指标中除行为活动外, 体质量、增质量、饲料生物利用度指标均为需要统计分析的客观指标。因其贯穿于整个实验周期, 数据的客观性与实验环境、给药过程中动物感受是否舒适、动物密度、动物健康状况等因素相关。在动物临床指标统计分析前控制体系中, 笔者认为实验环境应选择 SPF 级动物实验室; 动物密度应 ≤

每笼 2 只; 体质量在实验前应适应环境周期 ≥ 1 周; 计算饲料摄入量每日应称质量, 每周给药完毕即计算大鼠的饲料生物利用度, 比较分析各组动物饲料生物利用度的统计学意义; 分析产生差异的原因, 讨论差异是否与动物自发性疾病(如大鼠自发性糖尿病会引起大鼠饲料生物利用度明显增大)有关, 同时应排除营养因素或给药途径对动物的损伤因素; 在动物行为活动指标观察中应在每日投药过程中重点观察大鼠投药部位是否发生充血、水肿、呕血, 是否发生动物争斗外伤、皮毛稀疏竖散、粪便性状改变等变化, 并及时处理与药物因素无关的改变, 并详细记录, 认真分析。

1.2 血液学样本的质量控制 大鼠慢性毒理学实验中血液学常规的检测项目主要有红细胞计数(RBC)、血红蛋白定量(Hb)、白细胞计数及其分类计数(WBC + DC)、血小板计数(PT)、凝血时间(CT); 血清生物化学检测项目主要有天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)、清蛋白(ALB)、总胆固醇(T-CHO)、总胆红素(T-BIL)、空腹血糖(GLU)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cr)。苗现存等^[1]发现, 溶血血清的 ALT、AST、LDH、CK、K⁺、CHOL 值明显高于不溶血血清, ALP 活性则随溶血而降低。程树军等^[2]用低温冻融法制备不同溶血程度血浆, 发现溶血对猴和犬血浆 ALT、AST、LDH、ACP、CK、ALP、γ-GT 等 7 种酶及 TBIL、K⁺、P 等 3 种成分产生显著影响, ALT、AST、LDH、ACP、CK 等酶活性和 TBIL、K⁺ 值随溶血加重而升高, ALP、γ-GT 的活性和 P 值随溶血加重而降低。李金钟^[3]认为溶血可引起血清中 LDH、ACP、AST、CK、ALT、K⁺、TBIL 等升高, 而使 ALP、γ-GT 降低。由此可见, 血清是否溶血与检测结果的客观性有明显关系。在

[收稿日期] 2009-04-25

[作者简介] 周顺长(1968-), 男, 湖北黄冈人, 工程师, 在读硕士, 主要从事药物毒理、药理学工作。电话: 027-83692752, E-mail: schzhou@sohu.com。

[通讯作者] 袁宗辉(1958-), 男, 湖北天门人, 教授, 博士, 博士生导师。E-mail: yuan5802@public.wh.hb.cn。

大鼠血液样本采集中,采样途径与全血、血清样本的质量及实验检测有关。大鼠的断头法、腋下动静脉法、摘眼球法、腹主动脉法、眼眶静脉窦毛细管导出法均可采到检测样本所需要的全血 1 mL 和血清 2 mL,而产生的血清和全血样本质量各不相同,进而可能对生化、血常规检测指标造成一定的影响(见表 1)。笔者的实践经验表明,大鼠眼眶静脉窦毛细管导出法,不仅对动物损伤小、样本溶血率低、可重复采样等优势,而且使大鼠慢性毒理实验中分阶段检测药物对造血系统、生化系统的影响成为可能,是一种相对好的血液样本采样途径。

1.3 动物病理组织标本分析前的质量控制 组织病理学检查对于判断实验动物的毒性靶器官或靶组织具有重要意义。在长期毒理学实验中有重要地位,是评价药物毒性的重要依据^[4]。组织病理学检查对判断动物的毒性靶器官或靶组织具有重要意义。笔者实践中使用的组织学检测前优质标本取材流程为:①根据实验取材项目设计表格,需要取得脏器系数的器官或组织和其他器官或组织分别标示于一个完整的记录单元中;②使用 250 mL 广口瓶贮存新鲜配制的 10% 甲醛溶液 180 ~ 200 mL 备用;③对拟取材的大鼠进行解剖分组顺序编号;④大鼠麻醉状态下,股动脉放血致死→胸腔组织(胸腺、心、肺)→腹腔组织(胃、十二指肠、空肠、回肠、盲肠、直肠、肝、脾、胰腺、肾上腺、肾、卵巢、子宫、膀胱、前列腺、睾丸、附睾)→颈、脑部组织(甲状腺、脑、垂体、脊髓)。其中胸腺、胰腺、肾上腺、卵巢、甲状腺、垂体、脊髓等腺体组织或微小组织应使用擦镜纸或纱布非挤压式包裹置于 3.6% ~ 4.0% 甲醛。这样使浸泡于甲醛溶液中的易混淆脏器在进行石蜡包埋时容易分辨,同时保证病理组织学检查中组织样本数目完整;其他组织除大体观察有明显病灶的组织外,要求动物组织样本均取自该组织的代表区。

1.4 动物实验中的给药途径不同而引起的取材质量控制 因临床给药途径不同,在大鼠慢性毒理实验项目中存在不同的给药方式,主要给药途径有灌胃、直肠、舌下、腹腔注射、肌肉注射、皮肤涂抹等。对于其日

常接触部位组织如灌胃之咽、直肠给药之直肠、舌下给药之舌黏膜组织、腹腔注射之皮肤、肌肉注射之肌肉组织、皮肤涂抹给药之皮肤在组织学检查中可以有效地分析药物的慢性直接接触与接触组织的药物毒理学反应。尽管其组织学样本并不是病理组织学检查的必检项目,但在毒理学研究中可能通过对直接接触药物部位的检测结果分析药物慢性刺激对直接刺激局部组织的影响,还可以分析药物吸收和给药技能合理与否。

2 值得关注的影 响大鼠毒理学实验结果的环境、动物福利、误差控制

2.1 毒理学实验中的环境控制 在不同环境中进行动物实验的大鼠,无论是在 SPF 环境,还是在清洁级环境,亦或是普通级环境,对照组和药物组动物均不同程度地存在因环境所致的炎性细胞浸润或间质性肺炎等病理变化,这些变化与实验环境级别及日常消毒措施合理与否息息相关(见表 2)。样本固定前的大体解剖观察处理与组织学检查结果具有直接关系,取样以肉眼能观察到病灶的肺叶和表面观察正常的肺叶各取一为原则,在同一个受试动物肺组织中不可单一地单纯选择大体观察异常的小叶或大体观察正常的小叶样本。

2.2 毒理学实验中的动物福利控制 采用动物进行药物毒理研究,会导致动物紧张、疼痛、呼吸困难、痉挛、颤抖、腹泻、孔道出血、瘫痪、休克,甚至死亡。因此,它们在遇到恐惧或恶劣环境时,不仅在身体上,在生理上亦会患病。控制原则为实验人员投药过程时间宜短不宜长,抓取动物轻拿轻放,血清采样宜快不宜慢,尽量提供人为因素影响小的实验环境。要达到这一目的,就要求实验研究人员具备爱护动物之心和熟练的动物实验技能并贯穿于整个实验周期。

2.3 毒理学实验中的误差质量控制 在大鼠慢性毒理学实验中系统误差主要与样本的随机性、实验操作的一致性、流程的恒定性有关。①抽样误差:一般情况下,慢性毒性实验中每个实验组应使用相等数量的雌、雄动物。每组动物大鼠至少 20 只。如实验周期 > 3 个月,应根据需要增加数量至每组 30 ~ 40 只。体质量

表 1 不同采样途径对血清及全血样本质量的比较

方法	采样动物状况	采样后动物状况	血液成分	全血样本 凝血可能性	凝血样本 溶血可能性	二次采样 可能性
断头法	非麻醉	死亡	动脉血、静脉血、组织液	++	+	0%
腋下动静脉法	非麻醉	死亡	动脉血、静脉血	+	+ -	0%
摘眼球法	非麻醉	可能死亡	动脉血、静脉血	+	+ -	约 50%
腹主动脉法	麻醉	死亡	动脉血	-	-	0%
眼眶静脉窦法	非麻醉	存活	静脉血	-	-	约 80%

“++”:可能性极大;“+”:有可能;“+ -”:可能或不可能;“-”:不可能

表 2 不同实验环境下阴性对照组大鼠肺组织病理学特点

环境	给药方式 与时间	大鼠/ 只	肺部病变特点
清洁级	舌下给药 12 周	10	6 只大鼠轻度间质血管周围炎性细胞浸润, 4 只大鼠极轻度
	舌下给药 26 周	20	4 只大鼠肺间质血管周围不同程度淋巴细胞浸润
	恢复 4 周	10	2 只大鼠肺间质血管周围不同程度淋巴细胞浸润
SPF 级	舌下给药 12 周	10	2 只大鼠肺组织间质类可见散在小灶性淋巴细胞浸润
	舌下给药 27 周	20	3 只大鼠肺组织间质类可见散在小灶性淋巴细胞浸润
	恢复 4 周	10	无肺组织慢性炎症改变

差异应不超过平均体质量的 20%^[5]。如日本新药株式会社中央研究所进行盐酸塞利洛尔 9 个月给药期毒理学实验, 动物数为大鼠 200 只(0, 450 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 各 60 只, 100, 2 000 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 各 40 只)。由于动物数量多, 因此各阶段的随机分组和抽样处理尤为关键。笔者的控制模式为: 将适应 SPF 环境后的大鼠按照体质量分层, 然后按事先确定的随机数字分组, 各层间距 ≤ 10 g; 中期取样时根据随机数字确定抽样顺序, 按照体质量大小序号的随机号抽样; ②系统误差。包括下列两类情况。实验技术熟练因素造成的误差: 在毒理学实验研究中, 为了真实反映外来化合物的毒性, 除了要统一各种实验条件外, 每日的给药时间应一致。一是可比性强, 二是为了避免错误而影响其他药理实验甚至临床用药。比如同一剂量的戊巴比妥钠(35 mg · kg⁻¹) 在不同的时间给大鼠注射, 麻醉时间可以相差很大^[6]。因此, 应将实验人员的技术熟练因素以一定的模式贯穿于各实验组中, 在整个给药期中给药人员每天应互换给药的组别, 同时应保证给药时间的准确性和一致性; 流程造成的误差控制: 系统误差可因分析方法、仪器校正错误、试剂纯度不够、检测者的感观、环境因素改变等因素造成; 随机可能因动物实验过程中各种随机因素的共同作用等因素造成。如实验过程的温度波动-电压变化-仪器故障-操作技术差别等; 过失误差可因工作人员不负责任(器皿不净、加样错误、计算错误)而造成。这些误差因素与实验结果判断有直接关系。在药物安全性评价中, 系统误差与动物是否接受了足够的药物及其在动物体

的代谢时间相关。比如空腹抽血与进食后抽血, 对临床患者的 TG、CK、Cho、GLU 等有明显影响。因此每个实验期进行动物抽样时, 就要求严格按照同等的禁食时间对大鼠禁食。因此要特别注意各组实验大鼠采样的随机性与均一性。

3 结语

溶血对实验动物血液指标有不同程度影响, 也是临床生化检验中最常见的干扰和影响因素。在大鼠慢性毒理学实验中应严防血清溶血。眼眶静脉窦毛细管导出法是一种减少溶血的可行采样途径。必要时重新制备不溶血样品; 其次, 发生溶血而又不宜重复获得的样品, 应根据溶血程度对测定结果做出合理评估。

组织病理学检查中应合理评价组织学病变与环境、营养、实验技术之间的关系, 正确判断药物对靶器官的损伤程度。

大鼠慢性毒性实验中应将随机、对照、重复的原则贯穿于整个实验周期。尽量减少系统误差, 避免随机误差, 不出现过失误差。

总之, 大鼠慢性毒理学实验中实验技术因素的质量控制、值得关注的因素影响动物实验结果的环境、福利、实验误差控制等方面决定着大鼠慢性毒理学实验结果的客观性, 直接影响药物的安全性评价结果, 动物实验流程的规范化、标准化问题应引起新药研发人员及管理机构的重视。

[DOI] 10. 3870/yydb. 2010. 02. 054

[参考文献]

- [1] 苗现存, 刘凤霞, 谢丛喜. 溶血对临床生化检验的影响及对策[J]. 中华现代中西医杂志, 2005, 3(6): 543 - 544.
- [2] 程树军, 黄 韧, 梁金强, 等. 实验动物血液检验中溶血因素的干扰和影响[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 6(1): 1 - 3.
- [3] 李金钟. 影响检验质量的重要环节: 检验分析前的质量控制[J]. 中国医院管理杂志, 1998, 18(4): 32.
- [4] 王治乔, 袁伯俊. 新药临床前安全性评价与实践[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 1997: 59.
- [5] 卫生部药政管理局. 中药新药研究指南[M]. 北京: 中华人民共和国卫生部药政管理局, 1994: 205.
- [6] 汤宏斌. 实验动物学[M]. 武汉: 湖北人民出版社, 2006: 275.