

【 毒理学评价专栏 】

临床前药物安全性评价中的毒性病理学

林 志, 吕建军, 霍桂桃, 张 頔, 杨艳伟, 张 硕, 王 雪, 李 波, 屈 哲*

中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心 药物非临床安全性评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

摘 要: 毒性病理学是从形态学的角度阐明药物毒性造成的组织损伤, 包括药物损伤类型、作用部位、病变程度和预后等基本问题, 为临床前药物安全性评价研究提供客观准确的数据支持。因此, 毒性病理学在药物安全性评价中具有重要作用, 其数据或结论常常决定了许多药物研发项目的终止或继续。从毒性病理学的特点、规范性管理、病理学新技术的发展(包括原位杂交、激光扫描细胞技术、激光捕获显微切割等), 以及毒性病理学发展面临的问题等方面进行了简要论述。

关键词: 毒性病理学; 药物毒性; 药物安全性评价; 规范性管理; 病理技术

中图分类号: R994.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2017)04-0450-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.04.004

Toxicological pathology in preclinical drug safety evaluation

LIN Zhi, LV Jian-jun, HUO Gui-tao, ZHANG Di, YANG Yan-wei, ZHANG Shuo, WANG Xue, LI Bo, QU Zhe

National Center for Safety Evaluation of drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

Abstract: Toxicological pathology is a morphological elucidation of tissue damage caused by drug toxicity, including damage type, location, severity grade and prognosis. It provides objective and accurate data to support preclinical drug safety evaluation. Therefore, toxicological pathology plays an important role in drug safety evaluation, and the pathologic data or conclusion often determines the termination or continuation in many drug development projects. In this paper, the characteristic of toxicological pathology, standardized management, the development of new techniques including in situ hybridization, laser scanning cytometry and laser capture microdissection, and related problems in pathology are discussed briefly.

Key word: toxicological pathology; drug toxicity; drug safety evaluation; standardized management; pathologic technique

毒性病理学是指从形态学的角度研究药物毒性所造成的组织细胞形态结构的变化, 以帮助确定药物作用的靶器官、靶部位的损伤特点、程度以及损伤后的修复过程或最终的转归, 通过分析组织损伤的病理机制, 从而阐明药物所导致的具有剂量-效应关系的形态学变化^[1]。毒性病理学评价是临床前药物安全评价的重要组成部分, 它为药物的安全性提供了客观准确的科学数据, 因此毒性病理学在药物研究中具有重要作用^[2]。动物毒性实验、致畸致突变实验和长期致癌性实验都需要进行病理学检查, 并且随着实验的周期延长, 组织病理学检查的结果就更为重要。随着科学技术的快速发展, 毒

性病理学家由于具有兽医学、医学教育和培训背景, 对于解剖学、生理学和疾病发病机制的理解更为全面, 因而在药物开发、毒理学研究和药物安全性评价中发挥越来越重要的作用^[3-5]。总之, 组织病理学能够揭示药物导致的组织器官损伤的类型、作用的部位、病变的程度和最终的转归等基本问题, 是药物临床前安全性评价中最为重要的环节^[6-7]。本文从毒性病理学的特点、规范性管理、病理学新技术的发展(包括原位杂交、激光扫描细胞技术、激光捕获显微切割等), 以及毒性病理学面临的问题等方面进行简要论述, 以期更好地为临床前药物安全性评价服务。

收稿日期: 2017-01-02

基金项目: 国家科技重大专项(2015ZX09501007-004); 重大新药创制(2015ZX09501004-002)

作者简介: 林 志, (1977—)女, 博士, 副研究员, 研究方向为药物临床前安全性评价。Tel: (010) 67872233 E-mail: linzhi@nicpbp.org.cn

*通信作者 屈 哲, 博士, 研究方向为药物临床前安全性评价。Tel: (010) 67872233 E-mail: quzhe@nicpbp.org.cn

1 药物安全性评价中毒性病理学的特点

根据任进教授等的论述,药物安全性评价中毒性病理学具有以下几个特点^[8-9]:(1)通过肉眼观察以及显微镜观察的图像,对其形态特点进行描述;(2)根据所观察的形态学特点,与正常状态时的形态进行比较,从而推断出可能存在的病理改变;(3)需要综合分析考虑动物的临床症状、血液生化、尿液、脏器质量等指标;(4)由于动物与人体在组织形态学方面存在很大的差异,因此不能简单地将病理变化的结果直接外推于人;(5)病理学检查具有主观性,病理学家需要不断地学习和总结前辈专家形态学的经验。因此,病理学是需要多学科相结合的一门交叉学科,需要经验丰富的病理学家对病理数据进行综合分析,才能获得准确客观的结果。

2 毒性病理学评价的规范性管理

毒性病理学评价的规范性管理包括组织标本处理的标准操作规程、毒性病理学检查的标准操作规程、毒性病理学评价的质量保证、专业术语及病理报告的规范性几个方面。

2.1 组织标本处理的标准操作规程

组织标本的标准化处理是病理学检查的关键步骤之一。因为不同实验室的病理技术人员如果在组织标本的取材、包埋、染色中缺乏统一的规范性操作标准,会使同一脏器由于取材的不同切面,或者包埋方向的不一致,以及染色深浅等导致的病理组织形态的差异,致使各实验室之间的病理数据缺乏有效比较和分析的可能。

欧洲 20 多个大型制药企业以及研究机构的病理学家和病理技术人员总结自己的工作经验,于 1995 年发表了最早的致癌性毒性研究中组织取材的标准化操作程序^[10]。文章中指明这项工作的主要目的是确定标准的操作技术,规定了每一个器官组织应该修取的具体位置和在切片上的方向、修取组织的大小、修取组织切面的数量等。尽管最初的目的仅仅是针对致癌性实验所建立的标准化取材指导原则,但是目前在许多短期毒性试验中也参考应用。如,较大的脏器(肝脏和肺脏)就明确规定应该取是哪几叶、哪几个切面。如果是空腔脏器(膀胱和子宫等),还需要规定取材切割的方向纵切还是横切。标本的处理应当尽可能地减少误差,每天应成比例地处理对照组和给药组。如果进行特殊染色,应该设定相应的阴性对照组和阳性对照组,以帮助排除假阴性和假阳性。每一个切片都应注明实验

编号、动物编号、病理编号、切片或蜡块编号^[11-12,7]。

2.2 毒性病理学检查的标准操作规程

首先,病理学家应该确保在标准化的切片中所有的组织都含有需要检查的所有形态,并且保持一致性。如果由于取材的偏差,造成组织形态的不完整,则必须要求技术人员重新取材制片。如果组织丢失或者部分缺失,比如肾上腺的髓质、垂体的神经部、肠道或气管的黏膜面等,则需要技术人员重新进行修取,如果还是达不到阅片的要求,病理学家需要提交差异性报告说明,在报告中解释说明该偏差是否会影响药物的安全性评价^[13]。

其次,病理学家应当使用标准的术语和诊断标准^[14-15]。术语选择最重要是清晰准确地描述病变的特征,如果简单的术语无法准确描述复杂病变时,可以采用描述性语言进行文字说明。病理学家的阅片常常有不同的方式,即按动物的不同进行显微镜检查和按脏器的不同进行显微镜检查。不同动物检查的方式有利于全面了解到该动物的整体健康状况,而不同脏器检查的方式则更集中观察某一种特定病变的变化,有利于病理学家保持病变分级的一致性。药物有时会加重动物的自发性病变,因此病理学家应该采用严格的分级系统,并对同一病变的分级保持一致性。通常严重程度分为 4 级,即极轻度、轻度、中度和重度。各种分级的每一级别应当包括靶器官病变的描述,这对于解释严重性和分级数据是非常重要的。

对于致癌性研究,病理学家主要的责任就是区别增生、非典型性增生和肿瘤。如果可能也需要对肿瘤的良恶性以及原发肿瘤或转移性肿瘤进行判断。此外,病理学家也需要分析动物的死亡原因。Snyder 等^[16]2016 年提出了啮齿类动物实验(尤其是衰老实验)死亡原因分析的推荐方法,包括主要死亡原因,多个促成原因以及死亡原因未知。主要死亡原因是指能够发现引起动物死亡最显著的病变;促成性死亡原因是指发现的病变本身不能立即导致动物死亡,但是却有助于动物的发病,促成性原因被认为在机制上与死亡相关;组织病理学未发现与死亡相关的病变,无法判断动物死亡原因的可归为死亡原因未知。

2.3 毒性病理学评价的质量保证

影响毒性病理学评价质量的最主要的是“诊断偏移”现象。诊断偏移指的是在一个实验中,病变的术语或者病变的严重程度存在变化。在一个大的

研究项目中, 偏移是常见的现象。因为众多的动物组织切片需要在一个比较长的时间里完成, 因此病理学家可能在病变术语以及分级的判定中出现的漂移, 最终干扰药物毒性的准确判断。因此, 当病理学家意识到在术语诊断和病变严重程度分级存在偏移时, 需要采用盲法进行切片的再评价^[14, 17]。盲法指的是病理学家在阅片之前, 遮盖切片的信息, 不知道切片属于给药组还是对照组动物。但是, “盲法”阅片多用于病理学检查的后期, 即在发现相关病变后, 用以评价特定组织器官的变化, 以保持统一实验中诊断术语以及病变的严重程度分级的一致性。

通常在研究开始的初始病理学检查阶段, 病理学家不主张采用双盲法阅片, 因为双盲法阅片可能会导致检查时间的增长, 并且可能存在细微病变的遗漏。缺乏分组信息, 病理学家在判定药物相关病变与正常生理偏差更加困难, 致使一些用药组和对照组之间重要的、微小的病变未能发现, 严重影响了病理学评价的准确性。双盲法阅片适用于病理学检查的后期, 常常用于已经确定药物作用的靶器官后, 对于靶器官的病变进行再评价^[14]。双盲法还适用于评价已知毒性症状并明确损伤病变的研究。因此, 建议在新药的临床前安全性评价或新种属动物的再次研究中首先需要了解动物分组以及其他一些相关信息后, 进行显微镜检查。在病理学检查的后期再采用双盲法进行阅片, 以帮助确定靶器官病变术语以及病变严重程度分级的一致性, 并判定研究中无毒副反应剂量水平 (no-observable-effect-level, NOEL)。

目前, 欧洲和美国的制药企业以及药品监管部门均认为病理学的同行评议可以提高组织病理学评价的质量。通过同行评议病理学家的复核, 针对特殊组织的特定病理变化进行再评价, 以确保诊断术语以及病变的严重程度分级保持一致性, 从而增加了组织病理学观察准确性的可信度^[18-19]。病理同行评议可以是实验室内部非正式的小组读片, 也可以在不同实验室之间的正式阅片评议。同行评议通常在实验方案中注明, 并在完成研究的最终报告前完成。同行评议病理学家复查部分动物的切片或某一特定组织器官的所有切片, 并对专题病理学家的结果进行复核, 对病变做出解释。但是复核的变动不需要正式的记录, 不作为原始资料归档, 在实验结束前只需要提供一份专题病理学家和同行评议

病理学家都同意研究报告中的结果, 出具同行评议声明。此外, 另一种同行评议的方式为回顾性同行评议。回顾性同行评议发生于研究报告之后, 往往具有特定的要求。因此, 回顾性同行评议后任何改变都需要产生补充报告, 并按照药物非临床研究质量管理规范 (good laboratory practices, GLP) 要求对所有同行评议产生的数据进行归档。

总之, 病理学同行评议的实施极大地提高了诊断术语的准确性和一致性, 并使得病理学检查更加完整。例如, 同行评议中可报告未被发现的药物相关病变。然后, 同行评议确定研究中的靶器官以及相应的病理学改变, 并确定适当的无毒副反应剂量水平。最终, 同行评议确定这些病理学结果解释的正确性, 以保证研究中的药物导致的病变已经发现, 正确诊断并做出相应的解释^[20]。如果同行评议病理学家与专题病理学家在诊断或者病变的解释中出现分歧时, 可以通过病理学工作组 (PWG) 对最终的结果进行仲裁^[21]。病理学工作组是由 4~6 名经验丰富的病理学家组成的, 集中重评某项研究特定靶器官损伤。通过重新读片和讨论, 解决具有异议的问题, 最终达成一致性的诊断。

2.4 专业术语及病理报告的规范性

组织病理学诊断由于主要是主观的图像观察, 因而采用准确的诊断术语以及病变严重程度分级对于病理数据的分析和解释是至关重要的。如果存在诊断术语错误或者不一致, 可能会影响药物毒性的判断和风险评估。因此, 病理诊断术语应该准确、客观、简洁清晰地描述了关键形态学的改变。目前, 影响诊断术语准确的主要原因有以下几个: 病理学家的教育培训背景; 不同的病理学家共同完成同一个研究中的不同部分实验; 诊断的漂移; 病变的复杂性等。其中, 最为关键的原因就是缺乏诊断术语以及诊断标准的标准^[22]。然而, 值得庆幸的是世界各国的实验室都意识到确定标准化的诊断术语以及诊断标准的重要性, 因为它直接影响了管理机构对新药申报资料的评审和批准, 以及各个实验室之间的互认。

近年来世界卫生组织 (WHO) 和各个国家的毒性病理学会等都已采取了积极措施。如, 美国毒性病理学会 (STP) 对啮齿类动物部分组织器官病理诊断名称 (术语) 标准化系统进行了整理、公布。目前, 由 STP、欧洲毒性病理学会 (ESTP)、英国毒性病理学会 (BSTP) 和日本毒性病理学会 (JSTP)

联合开展了国际合作项目,即大、小鼠病变术语和诊断标准的国际统一项目(international harmonization of nomenclature and diagnostic criteria for lesions in rats and mice, INHAND)。目前该项目正在进行中,已经完成了9个系统的增生性和非增生性病变的统一的术语和诊断标准,相应内容可在全球开放注册术语信息系统(global open Registry Nomenclature Information System, go RENI)中查询^[23]。

3 毒性病理学的技术发展

随着科学技术的发展,毒性病理学研究也出现了巨大的变化。传统的毒理学检测终点仅对组织病理改变进行评估,其过程繁琐且不敏感,不能反映某些重要的生物学变化。此外,由于受教育及工作背景差异的影响,病理学家的主观性突出,已经无法满足药物毒性研究的高标准要求。因此,一些新技术、新方法逐渐应用到毒性病理学的评价过程中,包括免疫组化、原位杂交、原位聚合酶链反应(PCR)、激光扫描显微镜技术、激光捕获显微切割技术等,通过这些技术不但观察到组织细胞原位的形态结构特征,而且在细胞水平对DNA、RNA和蛋白质进行空间定位^[9]。

3.1 原位杂交以及原位PCR技术

原位杂交是采用标记的互补DNA、RNA或修饰的核酸链来定位部分组织或细胞中的特定的DNA或RNA序列。原位PCR是在组织或细胞标本切片上直接进行PCR,通过细胞中特定DNA的扩增,检测细胞的靶基因。它不但可以确定靶基因存在于何种细胞中,也能帮助人们认识靶基因与细胞之间的关系。原位杂交和原位PCR目前正成为临床病理学诊断的一项具有高特异性、高灵敏性的新技术,有助于病理学家在分子和细胞水平对疾病的病理机制以及疾病转归进行深入研究。Meyer等^[24]将荧光原位杂交技术与免疫荧光技术结合,采用线性LNA/DNA寡核苷酸探针,用以观察和检测细胞内特定的核酸和蛋白,包括18s和28s核糖体RNA以及多聚腺苷酸化mRNA。因此,该方法可以广泛用以研究细胞应激中RNA的表达、转运以及mRNA翻译的变化。

3.2 激光扫描细胞技术

激光扫描细胞技术(laser scanning cytometry, LSC)是药物研发中组织切片定性和定量分析的重要方法^[25]。该技术有效地结合了流式细胞组织结构

保留的优势,主要与免疫荧光联合用于培养细胞以及组织切片的检测。通过激光扫描显微镜可以评价石蜡组织或冰冻组织中可发光的免疫组化或组织化学产物,即利用倒置散射测量或组合荧光倒置散射测量,自动测定发光的免疫组化及组织化学切片中的细胞或细胞核增殖标记指数、细胞面积(如细胞肥大)、间质成分、染色强度(如细胞质或细胞器的蛋白含量)等。因此,该技术可进行标准化的定量分析。此外,采用Qdot[®]纳米晶体标记技术可以在一张切片中检测多个标志物。激光扫描细胞技术的优势主要是自动化、高通量检测能力(一次能同时进行180张切片的扫描分析),并且与其他半定量或定量检测结果具有高度相关性,能够产生具有生物学意义的形态终末数据。该技术的缺点很少,但是非结构细胞质抗原标记的显色强度积分量化的动态检测范围狭窄,因此该技术采用荧光标记时更为合适^[26]。

3.3 激光捕获显微切割技术

随着人类基因组列表的增加,人们面临的一个重要的科学挑战就是如何在实际的组织中准确地认识和了解推动正常组织形态变化和进展的分子事件。激光捕获显微切割技术(laser capture microdissection, LCM)可以帮助我们准确地获取组织切片中特定的显微结构,将感兴趣的细胞转移至已经被激光激活的聚合膜上,直观地进行视觉检测。通过LCM技术直接从染色组织中的纯细胞中获得cDNA文库,并从显微切割的人体组织标本中直接检测相应基因的表达。因此,这种指纹基因表达模式的检测可以提供关于病因的关键线索,最终有助于针对单个个体的分子诊断以及个体化治疗。特定病理损伤变化的特定分子可能成为早期影像诊断以及治疗的靶点^[27]。

4 目前存在的问题与解决方法

我国毒性病理学的发展仅仅在最近的十几年,尤其是伴随着临床前药物安全性评价GLP实验室的发展而不断提高。与国际毒性病理学专业学科相比,我国在许多方面存在差距,如缺乏规范性统一的病理学评价标准,组织诊断质量不高,术语及诊断标准混乱,从事该专业的病理学家经验、教育背景和培训不同等,这些因素都影响病理学数据的客观准确性。可喜的是,2015年我国成立了中国毒性病理学委员会,该委员通过会议培训、专业书籍翻译出版等方式积极推动我国毒性病理学的发展。

此外,我国实验动物的基础研究比较落后,尤其是比较组织学、病理学、比较毒理学以及实验动物相关背景性疾病等学科研究较少。因此,加快比较医学的发展,深入了解动物组织病理学与人体的差异,有助于准确地做出病理评价。总之,我国药物临床前安全性评价的组织病理检查的发展机遇与挑战并存,通过推进实验动物病理的培训,推动标准化管理,从而促进我国药物毒性病理学学科快速发展^[27]。因此,各新药安全性评价中心可以参照国际先进经验,分阶段制定近期目标和远期目标,从最基本的工作做起,脚踏实地一步步赶上来。

参考文献

- [1] 李珊珊,李波,王军志. 药物毒性病理学概述 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(6): 534-536.
- [2] Seaton M. The study pathologist's role in GLP studies: a regulator's perspective [J]. Toxicol Pathol, 2014, 42(1): 285.
- [3] 屈哲,吕建军,林志,等. 毒性病理学家资质认证的全球化进展 [J]. 中国药事, 2016, 30(4): 378-383.
- [4] 吕建军,霍桂桃,林志,等. 毒性病理学家在基因组和后基因组时代的作用 [J]. 中国药事, 2016, 30(11): 1147-1155.
- [5] Maronpot R R. The role of the toxicologic pathologist in the post-genomic era [J]. J Toxicol Pathol, 2013, 26(2): 105-110.
- [6] 弓雪莲,陆国才,袁伯俊,等. 药物毒性病理学研究技术新发展 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(1): 24-27.
- [7] 裴天仙,郭景玥,杨东,等. 在药物安全性评价中毒性病理的操作流程即重要性 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(4): 254-258.
- [8] 任进. 毒性病理学基本原则和方法的探讨 [J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4): 280-281.
- [9] Haschek W M, Rousseaux C G, Wallig M A, et al. Haschek and Rousseaux's handbook of toxicologic pathology [M]. 3rd ed. Amsterdam, the Netherlands, Elsevier/Academic press, 2013: 1-9.
- [10] Ruehl-Fehlert C, Kittel B, Morawietz G, et al. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice-part 1 [J]. Exp Toxicol Pathol, 2003, 55(2/3): 91-106.
- [11] 张岷,林志,李珊珊,等. 临床前药物安全性评价中大小鼠组织取材标准化的探讨 [J]. 中国新药杂志, 2009, 18(3): 201-205.
- [12] 刘向云,邱晓燕,吴建辉,等. 药物毒性病理学中脏器取材标准方法探讨 [J]. 毒理学杂志, 2005, 19(3 S1): 282-283.
- [13] 韩铁,吴纯启,廖明阳. 毒性病理评价的质量保证 [J]. 中国新药杂志, 2006, 15(6): 406-410.
- [14] Crissman J W, Goodman D G, Hildebrandt P K, et al. Best practice guideline: toxicologic histopathology [J]. Toxicol Pathol, 2004, 32(1): 126-131.
- [15] 吕建军,林志,屈哲,等. 药物临床前安全性评价毒性病理学诊断术语和诊断标准项目及数据库简介 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(9): 1640-1644.
- [16] Snyder J M, Ward J M, Treuting P M. Cause-of-death analysis in rodent aging studies [J]. Vet Pathol, 2016, 53(2): 233-243.
- [17] Ward J M, Hardisky J F, Hailey J R, et al. Peer review in toxicologic pathology [J]. Toxicol Pathol, 1995, 23(2): 226-232.
- [18] Morton D, Sellers R, Barale-thomas E, et al. Recommendations for pathology peer review [J]. Toxicol Pathol, 2010, 38(7): 1118-1127.
- [19] Fikes J D, Patrick D J, Francke S, et al. Scientific and regulatory policy committee review: review of the organisation for economic co-operation and development (OECD) guidance on the glp requirements for peer review of histopathology [J]. Toxicol Pathol, 2015, 43(7): 907-914.
- [20] 吕建军,屈哲,霍桂桃,等. OECD 组织病理学同行评议 GLP 要求指导原则解读 [J]. 中国药事, 2016, 30(10): 968-976.
- [21] Mann P C, Hardisty J H. Pathology working groups [J]. Toxicol Pathol, 2014, 42(1): 283-284.
- [22] 程树军,黄韧. GLP 药物安全性评价中毒性病理学存在的问题及对策 [J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(1): 51-54.
- [23] 吕建军,范玉明,林志,等. 毒性病理学大鼠和小鼠病变术语和诊断标准国际同一项目简介 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(15): 1749-1753.
- [24] Meyer C, Garzia A, Tuschl T. Simultaneous detection of the subcellular localization of RNAs and proteins in cultured cells by combined multicolor RNA-FISH and IF [J/OL]. Methods, 2016, S1046-2023(16): 30314. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2016.09.010>.
- [25] Krull D L, Peterson R A. Preclinical applications of quantitative imaging cytometry to support drug discovery [J]. Methods Cell Bio, 2011, 102(1): 291-308.
- [26] Peterson R A, Krull D L, Butler L. Applications of laser scanning cytometry in immunohistochemistry and routine histopathology [J]. Toxicol Pathol, 2008, 36(1): 117-132.
- [27] Nicole L, Simone, Robert F, et al. Laser-capture micro dissection: opening the microscopic frontier to molecular analysis [J]. Trends Genet, 1998, 14(7): 272-276.
- [28] Weber K. Role of the study pathologist [J]. Toxicol Pathol, 2014, 42(1): 276-277.