

药物非临床毒性试验周围神经系统组织病理学评估研究进展

李 慧^{*}, 葛建雅^{*}, 闫振龙, 钱 庄, 胡文元, 钟小群, 胡 静, 陈晓俊, 李一昊, 彭瑞楠, 王 娅, 缪成贤, 邵 薇, 张亚群^{*}, 吕建军^{*}

益诺思生物技术南通有限公司, 江苏 南通 226133

摘 要: 药物非临床毒性试验周围神经系统(peripheral nervous system, PNS)组织病理学评估分为4种情况:未知或预期无神经毒性的一般毒性试验、可能有躯体神经毒性的一般毒性试验、可能有自主神经病的一般毒性试验以及预期有神经毒性作用的专门神经毒性试验。美国毒性病理学会(Society of Toxicologic Pathology, STP)推荐最佳实践建议的目的是确保在药物非临床一般毒性试验和专门神经毒性试验的4种情况下,对PNS组织进行一致性、高效率取材、处理和评估。综述了PNS解剖的基本结构、PNS毒性试验情况分类及取材建议、PNS毒性试验不同情况下最佳实践建议、PNS神经病理学评估分析策略以及评估结果的记录,以期为我国药物非临床毒性试验中周围神经系统组织病理学评估提供一定参考。

关键词: 药物非临床评价; 毒性试验; 周围神经系统; 组织病理学; 美国毒性病理学会

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)08-1500-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.08.006

Research progress in histopathology assessment of peripheral nervous system during nonclinical toxicity studies of drugs

LI Hui, GE Jianya, YAN Zhenlong, QIAN Zhuang, HU Wenyuan, ZHONG Xiaoqun, HU Jing, CHEN Xiaojun, LI Yihao, PENG Ruinan, WANG Ya, MIAO Chengxian, SHAO Wei, ZHANG Yaqun, LYU Jianjun

InnoStar Bio-tech Nantong Co., Ltd., Nantong, Nantong 226133, China

Abstract: There are four different situations encountered in histopathology assessment of peripheral nervous system (PNS) during nonclinical toxicity studies, consisted of general toxicity studies where neurotoxicity is unknown or not anticipated, general toxicity studies where somatic PNS neurotoxicity is suspected, general toxicity studies where autonomic PNS neuropathy is suspected, and dedicated neurotoxicity studies where a neurotoxic effect is expected. Current best practice recommendations of the US Society of Toxicologic Pathology (STP) are designed to ensure consistent and efficient sampling, processing and evaluating of PNS tissues for the four different situations. The basic structure of PNS anatomy, different situations and recommendations for sampling of the PNS during toxicity studies, best practice recommendations for different situations of the PNS during toxicity studies, strategy for PNS neuropathology analysis, as well as neuropathology documentation are reviewed in the paper, in order to provide some references for histopathology assessment of PNS during nonclinical toxicity studies of drugs in China.

Key words: nonclinical assessment of drugs; toxicity study; peripheral nervous system (PNS); histopathology; US Society of Toxicologic Pathology (STP)

周围神经系统(peripheral nervous system, PNS)由神经干、神经丛、神经节及神经终末装置等组成,用于探索和响应外部(感觉和运动纤维)和内部(自主性纤维,由副交感神经和交感神经分支组成)环境中的刺激。中枢神经系统(central nervous system, CNS)通过PNS与全身所有其他器官或系

收稿日期: 2022-04-24

基金项目: 江苏省新药一站式高效非临床评价公共服务平台建设项目(BM2021002)

^{*}共同第一作者: 李 慧, 硕士, 从事药物非临床安全性评价毒性病理学诊断工作。E-mail: hli-2@innostar.cn

葛建雅, 硕士, 从事药物非临床安全性评价毒性病理学诊断工作。E-mail: jyge@innostar.cn

^{*}共同通信作者: 张亚群, 助理研究员, 从事药物非临床安全性评价毒性病理学诊断工作。E-mail: yqzhang@innostar.cn

吕建军, 主任药师, 从事药物非临床安全性评价毒性病理学诊断工作。E-mail: jjlv@innostar.cn

统(如内脏器官和肌肉骨骼系统)进行交流^[1-2]。非临床毒性试验中的神经病理学评估可以识别并判断新生物分子或新化学实体对人类所造成的潜在风险,但由于PNS复杂的结构导致其试验设计、样本制备和组织病理学评估等方面都面临较大的挑战^[3]。目前不同的监管机构评估PNS所使用的样本、程序和指南均有所不同^[3-4]。药物非临床毒性试验将PNS神经病理学评估分为一般毒性试验和专门神经毒性试验。药物非临床研究质量管理规范(good laboratory practice, GLP)中关于一般毒性试验的神经病理学分析的监管指南相对简单,相比之下,专门神经毒性试验的指南相当详细,因为神经系统评估是神经毒性试验的主要关注点^[4]。2018年美国毒性病理学会(Society of Toxicologic Pathology, STP)年会举办了为期半天的PNS神经毒性研究相关会议,着重介绍了在评估新分子实体所需毒性试验中PNS的评估方法^[5],STP还组建了1个工作组,对药物非临床毒性试验PNS的取材、处理和分析提供最佳实践建议。本文对PNS解剖的基本结构、PNS毒性试验情况分类及取材建议、PNS毒性试验不同情况下最佳实践建议、PNS神经病理学评估分析策略以及评估结果的记录进行综述,以期为我国药物非临床毒性试验中PNS组织病理学评估提供一定参考。

1 PNS解剖的基本结构

PNS是CNS的外围分支,通过与脑和脊髓的联系对全身器官和生理过程进行调控。由于PNS和CNS的结构和功能有所不同,目前倾向于在解剖学上将二者视为不同结构分开描述,有助于人们更好地理解神经系统^[6]。PNS包括与脑相连接的脑神经;与脊髓相连接的脊神经;与脑和脊髓相连的内脏神经,主要由神经节、神经干、神经丛及神经终末装置组成。脑神经与脑相连,共12对,分为运动神经(动眼神经、滑车神经、外展神经和副神经)、感觉神经(嗅神经、视神经和位听神经)和混合神经(三叉神经、面神经、舌咽神经、迷走神经和舌下神经),脑神经所含纤维不尽相同,主要有3类:仅含感觉纤维的感觉性神经、仅含运动纤维的运动性神经、既含有感觉纤维又含运动纤维的混合性神经。脊神经共有31对,包括8对颈神经、12对胸神经、5对腰神经、5对骶神经、1对尾神经,脊神经为混合性神经,含有感觉纤维和运动纤维。内脏神经根据纤维的性质分为内脏运动神经和内脏感觉神经。内脏运动神经(自主神经系统)又分为交感神经、副交感

神经^[1, 7-9]。

PNS主要负责与CNS和其他各系统器官进行沟通 and 联系,负责信息传入和传出。毒性病理从业人员需要对常用实验动物PNS不同神经的解剖结构、组成、功能和种属差异有详细的了解,正确清晰的认知是对PNS病理组织样本进行正确有效的解剖、取材、保存、处理和评估的前提和基础。

2 PNS毒性试验情况分类及取材建议

目前,药物非临床毒性试验将PNS神经病理学评估分为一般毒性试验和专门神经毒性试验。一般毒性试验包括以下3种情况:(1)未知或预期无神经毒性的一般毒性试验,即既往研究数据表明无潜在的PNS神经毒性,而且目前试验存活期未见行为或神经系统异常表现;(2)可能有躯体神经毒性的一般毒性试验,即具有周围神经病的存活期表现或其他数据反映了躯体[运动和(或)感觉]神经和(或)其神经节的可能损伤;(3)可能有自主神经病的一般毒性试验,即存活期有周围神经病的表现或其他数据表明自主神经和(或)神经节受损。专门神经毒性试验(被列为第4种情况),是指预期有神经毒性作用的专门神经毒性试验,即根据人类流行病学结果、动物试验[体内和(或)体外]数据以及作用方式(mode of action, MOA)或定量构效关系(quantitative structure-activity relationship, QSAR)与已知神经毒性药物的相似性,表明受试物在相似暴露情况下发生PNS神经毒性的可能性很高的试验^[2-3]。一些受试物可能同时影响躯体神经和自主神经,因此可能需要增加取材(结合情况2和情况3)对PNS进行全面评估。

不同监管机构在评估PNS完整性时使用的样本和程序有所不同^[4]。STP认为PNS取材、处理和评估应当足够详细,以便可以对上述4种不同情况下的非临床毒性试验中的PNS进行系统分析,但需要具有一定灵活性,允许合同研究组织(contract research organization, CRO)或药物非临床安全性评价机构对现有程序进行适当的修订来更好进行PNS的评估。STP的最佳实践建议是确保在非临床一般毒性试验和专门神经毒性试验所遇到的4种不同情况下,对PNS组织进行一致性、高效率取材、处理和评估。针对4种情况,STP最佳实践建议取材策略如下:(1)情况1,评估可以仅限于一条感觉运动脊髓神经;(2)情况2,至少评估脊神经或背根神经节;(3)情况3,至少评估自主神经或自主神经节;(4)情况4,评估应该包括上述情况2和(或)情况

3的策略,具体评估策略要根据研究目的来确定^[2-3]。STP推荐的GLP条件下药物非临床毒性试验关于PNS取材、处理和评估最佳实践建议也适用于非GLP探索性研究。

3 PNS毒性试验不同情况下最佳实践建议

PNS病理组织取材策略对于整个评估过程至关重要,PNS取材策略应以存活期观察到的神经系统表现或受试物/靶点的其他信息为指导。对于某一毒性试验,CRO或药物非临床安全性评价机构应慎重考虑PNS取材样本以及是否需要应用特殊的组织学处理和(或)探索性技术,并使用证据权重(weight of evidence, WOE)的方法。目前,对于上述4种情况PNS的取材、处理的程序大致相同,包括固定、包埋、染色等,但不同情况下可以选择不同方法进行处理。对于上述4种情况,通常收集双侧PNS组织(例如神经、神经节和效应器官)进行处理和评估。神经和骨骼肌(效应器官)应在横向和纵向切面两个方向进行评估。STP推荐的光学显微镜评估最佳实践是在预先了解试验设计的情况下进行半定量分析,专题病理学家(或同行评议病理学家)可以自行决定是否对PNS组织进行随后的“盲检”分析,但通常只是为了帮助确定剂量反应和(或)建立未观察到有害作用剂量(no observed adverse effect level, NOAEL)。

3.1 情况1的最佳实践建议

对于情况1,STP最佳实践建议至少取材以下组织:(1)1个脊神经,例如坐骨神经或胫神经;(2)试验方案要求的脏器中的自主神经节;(3)脊髓(颈段和腰段);(4)1个效应器官(例如腓肠肌内侧头);(5)至少1个腰椎的背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)。如果神经或脊髓病变需要进一步描述,则可以利用背根神经节进行评估。样本处理策略为常规中性缓冲10%福尔马林(neutral buffered 10% formalin, NBF)溶液固定、石蜡包埋、苏木精-伊红(hematoxylin and eosin, HE)染色^[10-12]。

3.2 情况2的最佳实践建议

STP最佳实践建议至少取材以下组织:(1)3个脊神经,通常取材坐骨神经(最常取材坐骨神经的远端分支)以及至少2个其他神经,例如胫神经、腓总神经、足底神经、隐神经、腓肠神经或啮齿动物的尾神经;(2)脊髓(至少颈段和腰段);(3)至少4个DRG和相关的脊神经根;(4)1个三叉神经节及相关神经纤维。样本常规处理(NBF浸泡固定、石蜡包埋和HE染色),必要时可采取以下3种处理策

略:(1)无甲醇甲醛(methanol-free formaldehyde, MFF)或医用级戊二醛(medical-grade glutaraldehyde, MGG,通常为2.5%)固定而不是NBF以便减少人工假象;(2)如果需要进一步描述在HE染色切片中观察到的PNS变化,则可以考虑对至少1个脊神经进行连续切片,然后进行特殊染色,以突出显示轴突(银染)或髓鞘(髓鞘染色);(3)至少1个神经应该横切,在MGG中浸泡后固定,然后用锇酸固定液固定、树脂包埋、甲苯胺蓝染色进行光镜检查^[13-14]。

3.3 情况3的最佳实践建议

STP最佳实践建议至少取材以下组织:(1)多个自主神经节;(2)自主神经,如迷走神经和交感神经链;(3)节后副交感神经节,如肠道的迈斯纳神经丛和肠系膜的奥尔巴赫神经丛;(4)交感链神经节及其神经根,以及心脏的窦房结和房室结;(5)躯体神经和神经节,例如坐骨神经和4个DRG;(6)脊髓(颈段、胸段和腰段)。常规处理(NBF或MFF浸泡固定、石蜡包埋和H&E染色)适用于大多数自主PNS样本。MGG中后固定、锇酸固定液固定及树脂包埋适用于较细的自主神经干。

3.4 情况4的最佳实践建议

STP最佳实践建议应该取材以下组织:(1)至少3个脊神经(坐骨神经、胫神经、腓神经、隐神经、腓肠神经、足底神经或尾神经);(2)脊髓(颈段、胸段和腰段);(3)至少6个DRG和相关的脊神经根;(4)三叉神经节。样本处理策略包括:(1)通过无甲醇固定剂(通常为MFF或MFF和MGG混合溶液)进行灌流固定;(2)石蜡包埋,但是至少2个远端神经(通常是胫神经和更远端的分支)进行横切,MGG和锇酸固定液后固定,树脂包埋;(3)石蜡包埋的神经和神经节常规HE染色,必要时可进行轴突和髓鞘染色。树脂包埋的神经用甲苯胺蓝染色^[3, 15]。

4 PNS神经病理学评估分析策略

除药物非临床毒性试验PNS组织病理学评估的上述4种情况外,STP关于半定量组织病理学评价和严重程度分级的最佳实践建议也同样适用于PNS^[16]。毒性病理学家在进行PNS组织病理学评估应检查PNS组织是否存在形态学改变,并描述其特征,包括受累及的细胞群[如神经元和(或)施万细胞]和组织结构(如细胞胞体、轴突或髓鞘),并确定可能的靶器官,以及是否与受试物相关。在进行PNS组织病理学评估时还应注意,轴突或髓鞘的原发性损伤所释放的相关的分子信息可能会引起

PNS成分的继发性病变,还要注意将PNS病变和处理过程所致的人工假象相鉴别。

CNS的神经毒性病变通常难以恢复,而PNS病变通常可以部分恢复,即不一定能够完全恢复PNS组织的原有结构或功能。因此,需要建立评估PNS病变是否已恢复的适当方法,比如在药物非临床毒性试验的试验方案中设计恢复期,用于检查PNS病变的恢复情况。原发性轴突病的恢复可表现为广泛的施万细胞增殖,出现“宾格尔带(bands of Büngner)”,提示轴突再生。在轴突再次延伸穿过受累及区域之前,这些宾格尔带产生的髓磷脂比正常少。原发性髓鞘病的恢复可表现为细胞核数量增加(这是因为新生的施万细胞通常体积较小,因此比原来的施万细胞覆盖轴突区域略少),以及轴突周围髓鞘的逐渐恢复。

虽然PNS病变可能会随着时间的推移而消退,但工作组没有具体的数据来支持药物非临床毒性试验方案设计恢复期的具体时间。PNS病变完全恢复通常需要较长时间,例如,用有机磷酯处理的鸡在暴露后7周神经结构表现出部分但不完全恢复,但在暴露后9周几乎完全恢复^[17]。大鼠正中神经受到外伤(挤压),神经纤维的数量在损伤后24周恢复,但轴突直径、神经纤维直径和髓鞘厚度仍然没有完全恢复正常^[18]。研究者也发现光镜评估可能会低估PNS病理组织再生的程度^[19]。总之,对PNS恢复的具体情况难以明确诊断和解释(尤其是轴突较长的大型动物)。工作组建议,在确定非临床毒性试验的恢复期具体时间时,应采取具体情况具体分析(case-by-case)的原则,这将有助于评估PNS病变的恢复情况。

针对不同的模式动物与研究目的不同,分析所采用的样本也有所不同,但主要取决于研究目的。如评估Tanezumab对成年非人灵长类动物交感神经系统的影响中,研究评估主要包括对上颈和颈胸神经节的神经细胞死亡和形态,以此判断药物是否对交感神经系统的影响^[20]。如评估硼替佐米(Bortezomib)引起的神经性疼痛中,主要收集坐骨神经和DRG^[21],如取小型猪神经。对于大多数毒性研究,除非预期或看到自主神经(副交感神经或交感神经)体征,否则只能采集躯体神经,在这种情况下,也可以获取自主神经。如取小型猪神经节,在大多数毒性研究中,体神经节是必须获取的,而自主神经节是否获取则需要进行评估。一般收集的典型体神经节是DRG,有时是三叉神经节(颅神

经V)^[22]。总之,在PNS神经病理学评估分析策略中,应依据不同的研究目的正确地选择实验动物,在良好实验室规范和标准操作规程(standard operating procedure, SOP)下。合理规范地选择实验动物与建立最佳的取材标准,将有利于更好进行PNS神经病理学评估。

5 PNS神经病理学评估结果的记录

关于记录PNS神经病理学评估结果,药物非临床安全性评价毒性试验的总结报告中应包含常规病理学报告的所有内容(例如报告正文以及动物个体表和动物汇总表),同时提供特定PNS神经病理学评估所用程序或方法的详细描述(如固定剂和固定方法、包埋和染色程序等)。在需要明确的情况下,应在总结报告中包含选择此程序或方法的根本原因。工作组建议在动物个体表中PNS病变应包括其特定的解剖部位(如坐骨神经或DRG),而不是更笼统的术语(如神经、外周神经或神经节),并且应在报告中明确说明PNS取材的关键部位和组织名称。工作组建议对试验方案要求检查的PNS组织使用特定术语报告PNS病变。此外,工作组建议将试验方案要求检查的非神经组织或脏器内任何PNS组织(例如脑神经干、壁内自主神经节)中明显与受试物相关的病变作为特定组织(方案变更后),输入组织病理学数据表中,并提供对PNS组织进行系统地组织病理学检查的原始记录的文件。如果总结报告中没有包括具体的处理程序或特殊方法描述,则应在机构参考文件(如SOP)中提供关于PNS组织处理程序或特殊方法的详细说明。毒性病理学家需要在病理学报告中对PNS病理结果进行描述,如病变、部位、分布、特征、严重程度分级、是否为受试物相关病变和有害作用的判断,以及病变可能的发病机制和受试物可能的作用方式分析等。

6 结语和展望

目前,遵从GLP规范的药物非临床毒性试验和非GLP探索性试验中,PNS样本取材、处理和组织病理学评价方法在不同机构之间存在一定的差异。PNS病理样本取材、处理、评估和报告等程序应取决于试验的最终目的,合理规范地选择实验动物模型与建立最佳的取材标准,并使用WOE的方法。通过提高PNS取材、处理和评估的一致性,可以有效提高PNS神经毒性的风险评估的准确性。必要时,可以采用其他特殊诊断技术来更好地描述PNS病变,例如透射电子显微镜(transmission electron

microscope, TEM)、形态计量学、体视学等^[23-24]。在确定药物非临床毒性试验的恢复期具体时间时,应采取具体情况具体分析的原则来评估PNS病变的恢复情况。

本文简要介绍了PNS解剖的基本结构、PNS毒性试验情况分类及取材建议、STP对PNS毒性试验不同情况的最佳实践建议、PNS神经病理学评估分析策略以及评估结果的记录等内容,希望能够为中国药物非临床毒性试验PNS神经病理学评价提供一定参考,并为中国毒性病理学从业人员更规范地取材、处理、观察、描述、评估、记录和报告PNS病变提供思路和借鉴。随着中国毒性病理学从业人员素质的进一步提高与加强,希望我国能够尽快建立规范的PNS评价体系并且形成同行评议的标准。以便最终为中国PNS神经毒性评价指导原则的制定和药物非临床神经毒性研究提供重要的参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Catala M, Kubis N. Gross anatomy and development of the peripheral nervous system [J]. *Handb Clin Neurol*, 2013, 115: 29-41.
- [2] Bolon B, Bradley A, Butt M T, et al. International regulatory guiding documents and best practice recommendations on peripheral nervous system (PNS) histopathologic evaluation in good laboratory practice (GLP) -compliant animal toxicity studies [J]. *Toxicol Pathol*, 2020, 48(1): 78-86.
- [3] Bolon B, Krinke G, Butt M T, et al. STP Position Paper: Recommended best practices for sampling, processing, and analysis of the peripheral nervous system (nerves and somatic and autonomic ganglia) during nonclinical toxicity studies [J]. *Toxicol Pathol*, 2018, 46(4): 372-402.
- [4] Bolon B, Bradley A, Butt M, et al. Compilation of international regulatory guidance documents for neuropathology assessment during nonclinical general toxicity and specialized neurotoxicity studies [J]. *Toxicol Pathol*, 2011, 39(1): 92-96.
- [5] Pardo I D, Rao D B, Butt M T, et al. Toxicologic pathology of the peripheral nervous system (PNS): Overview, challenges, and current practices [J]. *Toxicol Pathol*, 2018, 46(8): 1028-1036.
- [6] Sharma A K, Morrison J P, Rao D B, et al. Toxicologic pathology analysis for translational neuroscience: Improving human risk assessment using optimized animal data [J]. *Int J Toxicol*, 2016, 35(4): 410-419.
- [7] Vilholm O J, Christensen A A, Zedan A H, et al. Drug-induced peripheral neuropathy [J]. *Bas Clin Pharmacol Toxicol*, 2014, 115(2): 185-192.
- [8] Klein R, Klein B E, Moss S E, et al. The wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy: XVII. the 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type 1 diabetes [J]. *Ophthalmology*, 1998, 105(10): 1801-1815.
- [9] Bolon B. Comparative and correlative neuroanatomy for the toxicologic pathologist [J]. *Toxicol Pathol*, 2000, 28(1): 6-27.
- [10] Bolon B, Garman R H, Pardo I D, et al. STP position paper: recommended practices for sampling and processing the nervous system (brain, spinal cord, nerve, and eye) during nonclinical general toxicity studies [J]. *Toxicol Pathol*, 2013, 41(7): 1028-1048.
- [11] Cerri P S, Sasso-Cerri E. Staining methods applied to glycol methacrylate embedded tissue sections [J]. *Micron*, 2003, 34(8): 365-372.
- [12] Abram S E, Yi J, Fuchs A, et al. Permeability of injured and intact peripheral nerves and dorsal root ganglia [J]. *Anesthesiology*, 2006, 105(1): 146-153.
- [13] Vleggeert-Lankamp C L. The role of evaluation methods in the assessment of peripheral nerve regeneration through synthetic conduits: A systematic review. Laboratory investigation [J]. *J Neurosurg*, 2007, 107(6): 1168-1189.
- [14] Watson C, Sengul G, Tanaka I, et al. The spinal cord of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) [J]. *Neurosci Res*, 2015, 93: 164-175.
- [15] Rao D B, Little P B, Malarkey D E, et al. Histopathological evaluation of the nervous system in National Toxicology Program rodent studies: A modified approach [J]. *Toxicol Pathol*, 2011, 39(3): 463-470.
- [16] Schafer K A, Eighmy J, Fikes J D, et al. Use of severity grades to characterize histopathologic changes [J]. *Toxicol Pathol*, 2018, 46(3): 256-265.
- [17] Jortner B S, Shell L, el-Fawal H, et al. Myelinated nerve fiber regeneration following organophosphorus ester-induced delayed neuropathy [J]. *Neurotoxicology*, 1989, 10(4): 717-726.
- [18] Muratori L, Ronchi G, Raimondo S, et al. Can regenerated nerve fibers return to normal size? A long-term post-traumatic study of the rat median nerve crush injury model [J]. *Microsurgery*, 2012, 32(5): 383-387.
- [19] Ronchi G, Jager S B, Vaegter C B, et al. Discrepancies in quantitative assessment of normal and regenerated peripheral nerve fibers between light and electron microscopy [J]. *J Peripher Nerv Syst*, 2014, 19(3): 224-233.

