

临床前药物安全性评价中关于肝细胞肥大的探讨

林志[#], 张 嶝[#], 屈 哲, 杨艳伟, 王 雪, 吕建军, 霍桂桃^{*}

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: 临床前药物安全性评价研究中常常发现药物可诱导实验动物的肝细胞肥大, 可能并伴有肝脏质量增加或血清生化中肝损伤指标的变化。近年来研究表明, 众多化合物可以通过激活核内激素受体组成雄甾烷受体 (CAR) 或过氧化物酶体激活受体 α (PPAR α) 的机制诱导肝细胞肥大, 并且该作用机制具有啮齿类动物的种属特异性, 与人类缺乏相关性。然而, 如何判定肝细胞肥大是不良反应还是非不良反应 (适应性反应) 是病理学家与毒理学家面临的挑战。该文从肝细胞肥大的定义、肝脏质量、临床病理学变化以及组织病理学变化等全面阐述了肝细胞肥大的特点, 并依据证据权重分析方法探讨评估肝细胞肥大的预测风险。

关键词: 肝细胞肥大; 肝脏质量; 临床病理学; 不良反应; 非不良反应

中图分类号: R 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2019) 01-0215-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.01.034

Discussion on hepatocyte hypertrophy in preclinical drug safety evaluation

LIN Zhi, ZHANG Di, QU Zhe, YANG Yanwei, WANG Xue, LÜ Jianjun, HUO Guitao

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

Abstract: Preclinical drug safety evaluation studies have often found that drugs can induce hepatocyte hypertrophy in experimental animals, which may be accompanied by increased liver weight or changes of the indicators of liver injury in serum. Recent studies have shown that hepatocyte hypertrophy may be induced by many xenobiotics through a common mechanism of activation of the nuclear receptors CAR (constitutive androstane receptor) or PPAR α (peroxisome activated receptor alpha), and the mechanism is rodent-specific and is not related to humans. However, it is a common challenge for pathologists and toxicologists to clearly define what is considered adverse or non-adverse (adaptive response) in the context of hepatocellular hypertrophy. In this paper, the characteristics of hepatocellular hypertrophy were discussed from the definition, liver weights, clinical pathology and histopathology changes, and the predictive risk of hepatocellular hypertrophy was evaluated by weight of evidence analysis.

Key words: hepatocellular hypertrophy; liver weight; clinical pathology; adverse reaction, non-adverse reaction

啮齿类动物的亚慢性和慢性毒性研究发现多种药物或化合物可诱导肝脏肿大。毒理学专家对于该类型改变与肝毒性的相关性、相同剂量下致癌性研究终末点以及与人类的相关一直存在争论。2012年欧洲毒性病理学会举办了专家研讨会, 针对药物诱导的肝细胞肥大的相关问题进行了深入地探讨, 包括啮齿类动物肝细胞肥大的意义, 如何判定非不良反应 (non-adverse) 和不良反应 (adverse),

以及长期研究中啮齿类动物肝细胞肥大与人的相关性等。该会议所形成的观点对于临床前安全性评价中如何对药物诱导的肝细胞肥大的风险评估以及临床用药指导具有深远的意义。笔者将根据研讨会专家所形成的意见, 从肝细胞肥大的定义、肝脏质量增加、临床病理学变化、组织病理学变化以及肝细胞肥大的风险评估等方面逐一进行详细论述。

收稿日期: 2018-08-26

基金项目: 国家科技重大专项“生物大分子药物特殊评价关键技术研究”(2015ZX09501007); 重大新药创制“符合中药特点的有毒中药安全性评价关键技术研究”(2015ZX09501004-002)。

#第一作者: 林志, 博士, 研究方向为药物临床前安全性评价。Tel: (010) 67872233 E-mail: linzhi@nifdc.org.cn

张 嶝, 学士, 研究方向为药物临床前安全性评价。Tel: (010) 67872233 E-mail: zhangdi@nifdc.org.cn

*通信作者: 霍桂桃, 副主任药师, 研究方向为药物临床前安全性评价。Tel: (010) 67876252 E-mail: huoguitao@nifdc.org.cn

1 肝细胞肥大的定义

在讨论肝细胞肥大前,必须明确肝细胞肥大的诊断。肝细胞肥大常常发生于给予酶诱导剂之后,继发于微粒体酶的增加^[1]。因肝细胞胞浆内蛋白或细胞器(如滑面内质网、过氧化物酶体、线粒体)的增加而促使肝细胞体积增大。经典的肝细胞肥大并没有肝细胞数目或是DNA的增加,但是可伴有丝分裂的增加(例如PPAR- α 激动剂)。值得注意的是,肝细胞增大或肿大如果是糖原、脂类或其他物质聚集,或是表现为细胞的变性、坏死等,则不能诊断为“肝细胞肥大”。实际上,药物或化合物诱导的肝脏肿大可能是多种因素导致的,不但有阶段1和阶段2药物代谢酶的异常,也可能存在基本的细胞基本活动异常,即氧化应激、脂肪酸代谢、能量代谢、细胞转化肝细胞胞浆和细胞核形态异常等^[2]。伴随着肝细胞结构的改变,血浆中肝源性酶出现增加,如转氨酶、碱性磷酸酶、 γ 谷氨酰转移酶。

大鼠、小鼠病变术语与诊断标准的国际协调(INHAND)中关于诊断肝细胞肥大的病理标准如下^[3]:增大的肝细胞着色可能不同;胞浆是均质的或颗粒的;可能出现带状分布(小叶中心、汇管区、中间带区域);累及大多数或所有小叶;肝细胞板结构可能消失;窦状隙压缩;同时可能发生变性和/或单细胞坏死;肝肿瘤呈大规模膨胀,改变增长模式;失去小叶结构;再生性增生结节;扭曲小叶形状;细胞变异灶-通常细胞离散的集中在肝实质中;肝细胞变性,即受影响的细胞胞浆颗粒及嗜酸性增加;肝细胞贮存病;多倍体-核大和/或双核肝细胞。

2 肝脏质量

肝脏质量增加是一个敏感的毒性指标,它常与组织病理学变化相关联。器官质量/体重的相对质量可以避免体重变化较大时对脏器质量改变的干扰^[4]。在啮齿类动物的研究中,因为通常使用的动物较多,这些数据都采用同期对照进行统计学分析获得 P 值,脏器质量的变化呈明显的剂量-效应关系,所以脏器质量数据可以帮助判断是否存在肝细胞肥大,即便组织学变化相对改变很轻微。肝脏质量增加与微粒体酶诱导作用相关,但微粒体酶的诱导作用的强度与肝脏质量变化幅度及肝细胞肥大的程度不一定相关^[5]。

研究表明在啮齿类2年的致癌性试验中,肝脏质量增加与肝细胞肿瘤的发生相关,但是与人类不相关^[6]。在138个农药化合物的研究调查中,肝脏质量增加(>150%)会诱导小鼠发生肝脏肿瘤^[7]。与

之相似的一项研究评估了小鼠肝脏质量的增加、组织病理学变化以及致癌性之间的相关性,结果表明小鼠“肝细胞肥大”是肝脏肿瘤发生的最佳预测指标。在大鼠研究中的调查发现了类似的规律,即肝脏质量的增加与肝脏肿瘤的发生密切相关,甚至仅仅依赖于肝脏质量增加就能预测11例致肝癌发生大鼠研究中的8例,但是也存在预判了26例假阳性以及遗漏3例真阳性^[6]。

此外,禁食对肝脏质量变化也会产生影响^[8]。大鼠肝脏质量增加会在喂食后维持8 h,增加的部分主要原因是水(66%)和糖原量的增加。禁食过夜可以快速消减这些物质,这也是空腹条件下肝脏质量减轻的原因^[9]。因此,禁食对于毒理实验非常重要。首先,禁食一夜会减少一些临床病理学参数的差异,也有利于对照组与处理组之间的统计学分析。其次,在毒性研究中暴露于外源性有害物质的动物会出现摄食减少,表现出肝脏糖原储存减少。因此,动物暴露于外源性物质后导致肝糖原的减少,可能会在统计学上掩盖肝脏质量增加,而禁食后会减轻这种干扰作用。

3 临床病理学变化

肝脏损伤的临床病理学指标众多,最重要的就是丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)。给予钠、苯巴比妥(典型的混合CYP 2B/3A诱导剂)时,ALT和AST的增加低于对照组的2倍,组织学可见明显的小叶中心性肝细胞肥大^[10]。给予3-甲基胆蒎(CYP 1A诱导剂)时,无血浆ALT或AST的变化^[11]。给予过氧化物酶体增殖物(PPAR α 激动剂和CYP 4A诱导剂)时,血浆ALT和AST出现极轻微的增加,而肝脏质量出现显著性增加^[12]。总之,血浆ALT增加2~4倍时,才考虑可能存在肝细胞的损害^[13]。

在犬中,微粒体酶诱导剂可导致碱性磷酸酶(ALP)活性的增加。研究表明,犬中ALP活性的增加,伴有肝脏质量增加和组织学肝细胞肥大的改变,但是缺乏肝细胞的变性,则考虑为适应性反应而不是药物的不良反应^[14]。此外,苯巴比妥、卡瓦胡椒等可诱导肝细胞中 γ 谷氨酰转移酶(γ -GT)的增加^[15-16]。肝细胞内 γ -GT的变化比血浆 γ -GT的变化明显。胆汁淤积也会导致类似的 γ -GT的增加。给予肝酶诱导剂血浆胆红素的水平通常不会增加,它的变化主要反映了肝脏的胆汁流动受损,红细胞破坏增加,或是胆红素代谢降低等。其他与肝脏损伤相关的参数还包括凝血酶原时间、活化部分凝血酶

原时间、乳酸脱氢酶(SDH)、山梨醇脱氢酶(SDH)和 α -谷胱甘肽S-转移酶(AgSt)、苹果酸脱氢酶(MDH)、鸟氨酸氨甲酰转移酶(OCT)和谷氨酸脱氢酶等。

总之,即使缺乏组织病理学变化,临床病理参数的任何一致性的、显著性的、不利的变化可视为与人类健康相关的不良反应。但是,轻微地高于正常值的变化,认为是一种适应性反应。换言之,在未发现与之相关的组织病理学改变时,影响单个临床生化参数超出历史对照值的变化通常可以被视为“非不良反应(non-Adverse)”^[17]。

4 组织病理学改变

通常在解剖时,最先发现肝脏肿大即肝脏体积增大,称量时发现肝脏质量增加。肝脏质量增加/肝脏肿大相关的形态学改变包括增生、肥大、炎症、纤维化、代谢物的异常蓄积、颗粒或裂解产物、肿瘤和充血^[2]。当缺乏明显的不良反应(如炎症、坏死、变性)时,肝脏质量的增加就需要考虑是否存在肥大、增生,或者两者均有。

大鼠和小鼠中肝细胞肥大呈弥漫性或带状,常常见中央静脉区域。偶尔,如给予食蟹猴非诺贝特和环丙贝特也可在汇管区发现肝细胞肥大,而中央静脉区未见肝细胞肥大。欧洲毒性病理学会(ESTP)专家组认为,通常肝脏质量增加至少20%时才会组织形态学上观察到肝细胞大小的增加^[1]。通常低倍镜下肝细胞的形态变化表现为区域性肝细胞大小和嗜酸性增加,伴有核密度的相对减少。不同类型的肝细胞肥大(不同细胞器的增加)具有不同的染色特点^[17]。给予PPAR α 激活剂后,肝细胞体积变大,胞浆嗜酸性颗粒状。氯丹致肝细胞成为巨大怪异的肝细胞,形成肝细胞多倍体。给予COX抑制剂后,电镜下肝细胞内可见滑面内质网增多。

5 肝细胞肥大的风险评估

近50年以来,毒理学研究中关于肝细胞肥大的毒理学意义都是专家争论的焦点。美国环境保护署(EPA)和联合国粮食组织/世界卫生组织(FAO/WHO)指出肝脏肥大在缺乏组织病理学改变以及相关临床病理学改变的情况下不能判定为不良反应^[18]。因此,判定肝细胞肥大是不良反应还是非不良反应(即适应性反应),主要依赖于两个主要方面^[17,19]:(1)是否存在结构变性或坏死的组织形态变化。具体而言,包括肝细胞坏死、纤维化、炎症、脂肪空泡变性,胆管/卵圆细胞增生、变性、纤维化和胆

汁淤积,以及肝脏内其他类型细胞的坏死和变性。(2)是否具有生物学意义的生化指标的改变。具体而言是指至少2/3倍的ALT升高,或者存在其他指标的升高,包括ALP、AST、 γ -GT和GLDH。如果一个研究项目中,肝细胞相对质量出现显著性增高,肝细胞除了肥大之外,还存在结构变性或坏死的组织形态变化或者显著性血液生化相关参数的升高(尤其是ALT升高超过2/3倍正常值),则该案例中的肝细胞肥大属于不良反应。如果仅仅观察到肝脏质量增加以及肝细胞肥大,则需要从受试物的作用机制进行分析。如果是AhR活化作用或者已知明确肝毒性的机制,则肝细胞肥大为不良反应。如果是CAR、孕烷x受体(PXR)、PPAR α 作用或者机制不明,则认为是非不良反应即适应性反应。

尽管大多数肝细胞肥大被认为是适应性反应,但是肝细胞肥大与肝癌之间的关联性仍然是人们所担忧的。研究表明,长时间给予CAR激活剂如苯巴比妥,会导致大鼠和小鼠发生品系及种属特异性的肝脏肿瘤的发生^[19]。其发生机制为依赖于体细胞突变,导致S期DNA合成的刺激,促使肝细胞增生以及凋亡的减少。停药后,可以完全恢复到正常肝细胞大小,并伴有凋亡的增加。此外,短期研究中(3个月~1年)肝脏质量增加 $\geq 150\%$,即使未观察到其他的不良反应,也可能导致大鼠和小鼠的长期致癌性试验中肝脏肿瘤的发生。研究证实酶诱导剂导致的啮齿类动物肝脏的增生/肿瘤与人类无相关^[17,20]。但是,数据表明某些化合物致肝细胞肥大与肝癌发生存在一定的关联性,主要依赖于化合物的分子作用机制,因此更多的科学研究包括作用方式分析(the mode of action, MOA)以及基因组学研究以帮助阐明肝细胞肥大与肝癌发生之间的相关性。

6 小结

肝脏因对化合物的清除和代谢具有重要作用,所以在重复毒性研究中肝脏毒性的评价非常重要。肝脏质量增加、肝细胞肥大或肝细胞增生为特征的肝脏肿大是毒理学研究中最为常见的效应之一。认识肝细胞肥大的毒理学意义对于药物的风险评估尤为重要,包括肝细胞肥大的诊断标准、肝脏质量增加的意义、临床病理学变化、组织形态学改变特征以及与肝癌发生的相关性等。酶诱导剂引起的肝细胞肥大通常认为是一种适应性反应,而肝细胞肥大伴有坏死、炎症、细胞增生或者其他重要的临床生化指标改变时认为是一种不良反应。肝细

胞肥大与肝癌发生之间的相关性主要依赖于肝细胞肥大的分子作用机制。总之,科学性分析毒性研究中药物诱导的肝细胞肥大是否为不良反应用于药物安全性评估以及临床用药指导具有重要的意义。

参考文献

- [1] Ennulat D, Magid-Slav M, Rehm S, et al. Diagnostic performance of traditional hepatobiliary markers of drug-induced liver injury in the rat [J]. *Toxicol Sci*, 2010, 116(2): 397-412.
- [2] Maronpot R R, Yoshizawa K, Nyska A, et al. Hepatic enzyme induction: Histopathology [J]. *Toxicol Pathol*, 2010, 38(5): 776-795.
- [3] Thoolen B, Maronpot R R, Harada T, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system [J]. *Toxicol Pathol*, 2010, 38(7Suppl): 5s-81s.
- [4] Sellers R S, Morton D, Michael B, et al. Society of toxicologic pathology position paper: Organ weight recommendations for toxicology studies [J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(5): 751-755.
- [5] Ennulat D, Walker D, Clemo F, et al. Effects of hepatic drug-metabolizing enzyme induction on clinical pathology parameters in animals and man [J]. *Toxicol Pathol*, 2010, 38(5): 810-828.
- [6] Allen D G, Pearse G, Haseman J K, et al. Prediction of rodent carcinogenesis: An evaluation of prechronic liver lesions as forecasters of liver tumors in ntp carcinogenesis studies [J]. *Toxicol Pathol*, 2004, 32(4): 393-401.
- [7] Carmichael N G, Enzmann H, Pate I, et al. The significance of mouse liver tumor formation for carcinogenic risk assessment: Results and conclusions from a survey of ten years of testing by the agrochemical industry [J]. *Environ Health Perspect*, 1997, 105(11): 1196-1203.
- [8] Li X, Elwell M R, Ryan A M, et al. Morphogenesis of postmortem hepatocyte vacuolation and liver weight increases in sprague-dawley rats [J]. *Toxicol Pathol*, 2003, 31(6): 682-688.
- [9] Rothacker D L, Kanerva R L, Wyder W E, et al. Effects of variation of necropsy time and fasting on liver weights and liver components in rats [J]. *Toxicol Pathol*, 1988, 16: 22-26.
- [10] Boll M, Weber L W, Font M, et al. The enzyme inducers 3-methylcholanthrene and phenobarbital affect the activities of glucocorticoid hormone-regulated enzymes in rat liver and kidney [J]. *Toxicology*, 1998, 126(1): 127-136.
- [11] Lake B G, Evans J G. Effect of pretreatment with some mixedfunction oxidase enzyme inducers on the acute hepatotoxicity of coumarin in the rat [J]. *Food Chem Toxic*, 1993, 31(12): 963-970.
- [12] Peterson R L, Casciotti L, Block L, et al. Mechanistic toxicogenomic analysis of way-144122 administration in sprague-dawley rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2004, 196(1): 80-94.
- [13] FDA. Guidance for industry: Drug-induced liver injury: Premarketing clinical evaluation [EB/OL]. (2011-07-29). <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm174090.pdf>.
- [14] Robertson D G, Loewen G, Walsh K M, et al. Subacute and subchronic toxicology studies of CL-986, a novel anti-inflammatory compound [J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1993, 20(4): 446-455.
- [15] Clayton N P, Yoshizawa K, Kissling G E, et al. Immunohistochemical analysis of expressions of hepatic cytochrome P450 in F344 rats following oral treatment with kava extract [J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2007, 58(4): 223-236.
- [16] Sirica A E, Jicinsky J K, Heyer E K. Effect of chronic phenobarbital administration on the gamma-glutamyl transpeptidase activity of hyperplastic liver lesions induced in rats by the Solt/Farber initiation: selection process of hepatocarcinogenesis [J]. *Carcinogenesis*, 1984, 5(12): 1737-1740.
- [17] Hall A P, Elcombe C R, Foster J R, et al. Liver hypertrophy: A review of adaptive (adverse and non-adverse) changes-conclusions from the 3rd international ESTP expert workshop [J]. *Toxicol Pathol*, 2012, 40(7): 971-994.
- [18] Liu S, Kawamoto T, Morita O, et al. Discriminating between adaptive and carcinogenic liver hypertrophy in rat studies using logistic ridge regression analysis of toxicogenomic data: The mode of action and predictive models [J]. *Toxicol Appl pharmacol*, 2017, 318: 79-87.
- [19] Thoolen B, Ten Kate F J, van Diest P J, et al. Comparative histomorphological review of rat and human hepatocellular proliferative lesions [J]. *Toxicol Pathol*, 2012, 25(3): 189-199.
- [20] Lake B G. Human relevance of rodent liver tumour formation by constitutive androstane receptor (CAR) activators [J]. *Toxicol Res*, 2018, 7(4): 697-717. doi: 10.1039/c8tx00008e.