• 专 论 •

药物毒理学技术方法研究进展

杨佳梅[1]，刘 妍[2]，申秀萍[2]，张宗鹏[2*]
1. 天津中医药大学，天津 300193
2. 天津市新药安全评价研究中心，天津 300301

摘 要：药物是否安全和有效是药物研发成功与否的决定性因素。就药物研发的整个流程而言，毒性是终止药物研发的重要原因之一。药物毒理学研究贯穿于新药发现阶段、临床前安全性评价和上市后跟踪监督的全过程，因此药物的毒理学研究至关重要。简要综述了药物毒理学研究过程中所涉及的技术方法以及研究新动向，并主要介绍了组学技术的发展。

关键词：毒理学；替代实验；组学技术
中图分类号：R965.3 **文献标志码**：A **文章编号**：1674 - 6376 (2012) 04 - 0241- 05

Research progress in technical methods on drug toxicology

YANG Jia-mei[1], LIU Yan[2], SHEN Xiu-ping[2], ZHANG Zong-peng[2]
1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China
2. Tianjin Center for Drug Safety Evaluation and Research, Tianjin 300193, China

Abstract: If the drug is safe and effective is the decisive factor to determine whether the drug development is successful or not. As far as the entire drug development process is concerned, toxicity is one important reason for the termination of drug development process. Studies on drug toxicology are throughout the entire process of drug discovery stage, preclinical safety evaluation, and after-sale track supervision, as a result the drug toxicology studies is critical. This article briefly summarized the technology, methods, and new research trends involved in drug toxicology studies, and introduced the development of omics technology.

Key words: toxicology; replace experiment; omics technology

药物毒理学研究贯穿于新药发现阶段、临床前安全性评价和上市后跟踪监督的全过程，因此药物的毒理学研究显得至关重要。本文简要综述了药物毒理学研究过程中所涉及的技术方法以及研究新动向，并主要介绍了组学技术的发展。

1 整体动物在药物毒理学研究中的应用

1.1 正常动物

在毒理学领域，药物的安全性评价体系常用到正常动物，包括啮齿类动物（如大鼠、小鼠、豚鼠、仓鼠等）和非啮齿类动物（如家兔、比格犬、猴、小型猪等），这些正常动物主要用于进行急性毒性实验、长期毒性实验和特殊毒性实验等。通过不同的给药方式给予相应的受试药物一定时间后，采用特定方法测定各项生理生化指标用于评价受试药物对健康动物有无毒性，并以此确定试验动物对毒物的毒性反应、中毒剂量（poisoning dose）和致死剂量（lethal dose）等，为药物进入临床阶段提供参考依据并将结果外推至人类。经过毒理学工作者的不断努力，传统的急性毒性实验已经在减少动物的使用量上取得了很大的进步，主要表现为应用上下法、固定剂量法、探测剂量法、近似致死剂量法等新的方法替代传统的急性毒性实验，并已经很大程度上减少了实验动物的使用量。

1.2 基因动物

对受试物进行器官毒性评价等研究时，经常使用各种模型动物。将诱发性模型动物、转基因动物、基因敲除动物应用到实验当中，进而研究各种模型下应用受试物后机体的异常反应，以寻找预测各类

收稿日期：2012-04-17
基金项目：“重大新药创制”科技重大专项“十二五”计划（2012ZX09505001-001）
作者简介：杨佳梅（1985—），女，硕士生，主要从事药理学及毒理学研究。E-mail: yangjm200@163.com
*通讯作者 张宗鹏，男，研究员。E-mail: zhangzp166@163.com

疾病更加有效的手段。石艳等[1]用庆大霉素诱导急性肾损伤大鼠模型来测定肾损伤分子-1（kim-1）的表达，并明确了 kim-1 可作为庆大霉素所致肾小管损伤的早期诊断标志物。在毒理学研究领域中，重要的问题是如何把从整体动物获得的资料外推至人类，把体内外信息结合，把复杂的整体系统化为简单的可控系统，以及如何提高检测的敏感性等。建立转基因动物模型为解决这些问题提供了新手段。

转基因动物模型主要分为一般毒性研究模型、致突变检测模型、致癌检测模型、生殖检测模型和毒物代谢研究模型。如 C-fos-LacZ 转基因小鼠可用于神经毒性的研究，Corchero 等[2]成功制备了表达人类 CYP2D6 基因的转基因鼠模型，并用循环系统药物异喹胍进行验证，研究发现在该药的代谢过程中 CYP2D6 基因的表达受 HNF4α 调控，在无 HNF4α 时异喹胍 4-羟化酶活性降低了 50%，显示 CYP2D6 模型可以很好地应用于药理、毒理的临床前研究。近年来也有学者将绿色荧光蛋白转基因小鼠应用于毒理学中，这些转基因动物的应用不仅提高了实验动物的敏感性，也一定程度上满足了动物福利的要求，并且大大缩短了药物毒性评价时间。

继转基因技术后，基因敲除动物技术掀起又一场分子生物学技术的革命。这是一种在基因组水平上改变或破坏靶基因结构，使其功能完全丧失的实验技术。该系统的建立，使得对基因靶位时间和空间上的操作更加明确、效果更加可靠，它的发展将为发育生物学、分子遗传学等学科提供一种全新的研究手段，具有广泛的应用前景。目前，基因敲除动物模型主要用于遗传性疾病的研究，现在也用于器官移植、免疫耐受、基因功能鉴定以及表型研究。Shimada 等[3]首次建立了 P53 和 E 钙蛋白基因的小鼠弥散性胃癌模型，研究了以上两种基因对转移弥散性胃癌小鼠的协同抗癌活性。研究发现该模型可以很好地阐明遗传性胃癌的发病机制，并为预防和治疗弥散性胃癌提供了新的重要途径。

整体动物在毒理学研究中应用广泛，不同的转基因动物模型和基因敲除动物模型的建立，将对阐明外源化学物毒性作用机制起到重大作用。但是该方法制作基因动物模型效率低，动物行为难以控制，且基因整合机制不清，存在一定局限性。

2 体外替代实验技术的发展

使用正常动物的实验在毒理学研究的应用中存在着不敏感、周期长、所需受试物样品多、所需实验动物量大、难以揭示毒作用位点和毒作用机制以及结果可靠性差等问题。而模型动物也存在着制造价格昂贵、受世界动物保护法限制等不足之处。因此，在“3R”原则（替代、优化、减少，replacement、refinement、reduction）的指导下，一些发达国家率先开展了替代方法的研究。目前体外替代方法的研究已成为实用性毒理学领域研究的新方向。主要包括离体器官实验和体外细胞培养实验。这类方法的应用一方面解决了整体动物实验中大量使用实验动物且以动物濒死或死亡为终点的伦理问题，另一方面增加了实验过程中的可控因素，提升了实验结果的可靠性。

2.1 离体器官实验

以体内脏器为基础的体外模型，一方面保留着完整的营养供给系统，能够确保在一定时间内保持离体器官的正常生理活性及生化功能，另一方面离体系统可排除其他组织器官的干扰，可控制受试物浓度，并可定量观察受试物对离体系统的毒性作用。目前，离体器官实验主要采用离体灌流技术，包括离体的肝脏、肾脏、心脏灌流技术等，用于研究外源化合物的靶器官毒性，如采用该技术研究抗病毒鸟苷酸类似物 AM188 以及其前体药 AM365 在肝脏的代谢情况；应用循环式离体大鼠肝脏灌流技术研究抗癌药物喜树碱和羟基喜树碱的代谢产物[4]。离体器官实验的缺陷在于受时间限制以及操作复杂，但是排除了体内其他脏器及系统的影响，因此在药物毒性评价中应用广泛。

2.2 体外细胞培养

体外细胞培养使毒理学研究从简单的整体动物实验深入到复杂的细胞和分子水平，脱离了整体稳态和内分泌调控作用，从蛋白质、酶、受体、分子通道以及遗传因素等方面解析了药物与机体间的相互作用，在投药准确性和结果可靠性上显示了优越性。作为体外细胞实验金标准的原代肝细胞培养技术广泛应用在毒理学研究各领域，如通过测定培养肝细胞中转氨酶的活性，评价有机和无机化合物的肝细胞毒性[5]，通过体外培养原代人肾细胞评价霉菌素在人体外肾细胞的吸收、分布、代谢和毒性作用，都获得了很好的结果[6]。有学者在建立胚胎干细胞测试模型（EST）时发现 EST 能对大多数化学物的胚胎毒性进行正确分类，并且其结果与整体动物体内实验一致[7]。万旭英[7]尝试建立大鼠腔前卵泡体外培养体系，并用此体系初步验证了 4 种卵巢

毒物的卵巢毒性，初步验证了邻苯二甲酸二乙基己酯（DEHP）雌性生殖毒性是通过其代谢产物邻苯二甲酸单乙基己酯（MEHP）作用的。与离体靶器官实验模型相比，细胞培养可延长靶器官的存活时间，给实验操作和毒性观察带来极大便利，并且单层培养的细胞可用于研究毒物对完整细胞功能的影响。

当前，毒理学界对模式生物斑马鱼的关注度颇高。斑马鱼胚胎提供了复杂的多细胞系统，被称为培养细胞检测和整体动物实验间的桥梁，主要用于药物急性毒性研究[9]，成为近年来国内外学者研究的热点之一，尤其是国内一些学者将其应用于中药毒性研究当中。斑马鱼具有敏感性超强、被测药物使用量少以及具有整体器官模型的特点，非常适合多成分、多效应、多靶点的中药的毒作用研究。姜玮等[10]用斑马鱼初步观察甘遂不同提取物的急性毒性。通过将不同浓度的甘遂提取物添加到斑马鱼生活的水中，观察给药 96 h 后鱼的死亡情况，发现甘遂先醇提后水提产物的急性毒性最强，单纯水提物毒性最弱，该结果为判断待测药物毒性的大小提供了依据，这些研究成果对建立中药毒性评价新方法新体系做出了重要贡献。

3 组学技术

3.1 “组学”的形成

传统的体内体外实验主要以整体动物或应用体外培养低等生物、高等生物的组织、细胞、细胞器为模型，以细胞学、生理学、形态学和代谢等生物学指标为检测终点，对药物进行早期毒性筛选及机制研究。生物物种间生理代谢均存在差异，将以上实验结果外推至人类，预测药物对人体的毒性反应是否可靠，仍是值得深究的问题。为了弥补传统毒理机制研究方法的不足，近年来国内外毒理学工作者正致力于一系列的组学技术研究。目前把对细胞内 DNA、RNA、蛋白质、代谢中间产物的整体分析手段称为组学技术，主要包括基因组学（genomics）、蛋白质组学（proteomics）和代谢组学等。Nount 等[11]利用这些组学技术对候选新药进行毒理机制研究，从而开创了“反向毒理学”的药物毒性机制研究新模型。组学技术的发展实现了从器官、组织水平向分子甚至基因水平的飞跃。这使人们对基因和基因组的认识，对生命本质的认识和认识生命、健康的手段取得了重要的进展[12]。

3.2 基因组学

基因组学利用基因组学的相关信息，将遗传学与生物信息学相结合，从基因整体水平研究外源化合物的毒性作用，建立毒性作用与基因表达变化之间的关系，从而有效监测接触外源化合物后基因水平的改变，继而筛选和鉴别潜在的遗传毒物，并快速确定未知毒物的作用机制。

毒物基因组学（toxicogenomics）将基因组学方法与技术应用于毒理学研究领域，主要采用 DNA 微阵列技术研究毒物和毒作用机制，其快速发展为毒理学开辟了新的研究领域。基因组学技术有助于对毒物进行分类、检测，鉴定毒作用机制亚型，判断细胞损伤的严重程度并阐明化学物的各种量－效关系。Gresham 等[13]认为，几乎所有毒物反应均伴有基因表达谱的改变，且此改变具有高灵敏度和高特异性。基因组学为毒理学提供了更加灵敏、全面的机制研究平台，从而更好地应用于药物安全性评估。同时通过基因组学技术还可发现最相关和最敏感的基因改变从而用于危险性评估，如 DNA 损伤修复基因的表达可作为遗传毒性的标志之一。早期出现瞬时改变的基因可能与机体的应激反应有关，而长期作用下发生改变的基因可能与慢性毒作用有关或仅仅是机体的适应性反应，这种分析方法对于了解具有慢性毒性、致癌性或继发毒性效应的化合物非常有益[12]。杨宝华等[14]利用毒理基因组学技术研究纳米铜的肝脏毒性机制，发现该外源化学物的毒性机制可能与能量代谢紊乱和氧化应激性损伤相关。还可以利用基因组学技术，通过“桥接生物标志物”[15]来减少风险评估中的不确定性，帮助决定一种实验物种是否与另一种相关，从而将结果外推至人类，在安全允许范围内进行人体实验。

可以说，基因组学技术的发展对毒理学研究方法、技术的改进产生了巨大的影响，但是基因组学理论尚不完善，存在着一些亟待解决的问题。例如，基因组学技术无统一的标准要求；基因表达的改变与疾病的关联问题模糊不清等。

3.3 蛋白质组学

当从 mRNA 水平考虑和对单个蛋白质进行的研究已无法满足后基因组时代的要求时，蛋白质组学（proteomics）应运而生。蛋白质组学是指研究蛋白质组或应用大规模蛋白质分离和识别技术研究蛋白质组的一门学科，是在蛋白质整体上对疾病机制、细胞模式、功能联系等方面进行探索的科学。蛋白质组学以直接参与生命活动的蛋白质为研究目标，界定表达蛋白质过程中涉及的影响因素，现已广泛

融入环境科学、生态毒理学等众多领域。

目前，对蛋白质组进行分离的方法有多种，主要包括二维凝胶电泳、二维液相色谱、毛细管电泳和液相色谱-毛细管电泳等技术。蛋白质组完成分离之后继而通过质谱技术、蛋白质测序技术、氨基酸组成成分分析等技术对其进行鉴定以及功能研究。刘建军等[16]对纳米二氧化硅致 HaCaT 表皮细胞毒性作用的蛋白质组学研究发现，不同粒径不同剂量纳米二氧化硅均使 HaCaT 细胞的半数生物学性状发生改变，包括相对增殖率、细胞周期和细胞凋亡，且纳米颗粒的粒径与相对增殖率以及细胞凋亡之间存在明显相关性。

毒理蛋白质组学[17]作为毒理基因组学的延伸也已经应用到毒理学研究领域当中，是一种利用全蛋白质表达分析技术，确认生物物种受有害外源化学物影响的关键蛋白质和信号通路的组学技术。该技术通过比较特定细胞、组织或器官在毒物作用前后蛋白质谱发生的变化，在短时间内筛选出与毒物相关的差异蛋白，再通过抗体分析技术快速寻找新的毒性蛋白标志物，因此比传统毒理学研究方法更具灵敏性和特异性[18]。Kumagai 等[19]对放线菌酮诱导的大鼠肝细胞凋亡进行了毒理蛋白质组学研究，发现放线菌酮通过抑制 CHOP 合成而使 Akt/PKB 失活，从而增加了 CHOP 介导的肝细胞凋亡。

3.4 代谢组学

基因组学、蛋白质组学的迅猛发展为毒理学研究带来了新的发展契机，大大促进了毒理学的发展。然而，基于蛋白质组学的研究不能提供机体对外源性毒物刺激的整体应答信息，也不能反映出基因、疾病、毒物等相关因素之间的交互作用，存在一定的局限性。因此，继基因组学、蛋白质组学之后产生了一种重要的系统生物学——“代谢组学”（metabonomics）。代谢组学是应用现代分析方法对某一生物或细胞在某一特定生理时期内所有低相对分子质量代谢产物同时进行定性和定量分析的一门学科，被认为是“组学”研究的终点，具有全面、高通量、无偏差地研究生物体内代谢途径的特点。

基因组学、转录组学、蛋白质组学技术直接或间接地反映毒物的毒作用，得到的数据信息只反映了引起终点变化的可能性，代谢组学与其他相关技术的整合则可以判定毒性终点的生物标志物，为推断毒性发生机制以及毒性评价提供可靠的科学依据。目前来说，代谢组学技术可以提供有关药物毒理、药物药效学评价、药物作用机制、临床诊断以及基因功能等方面的信息。该研究常用核磁共振和质谱联用技术，包括气相色谱-质谱联用仪和液相色谱-质谱联用仪等。其中核磁共振光谱分析法应用最为广泛，具有不损害样品、处理方法简单、无需分离过程等优点，但其检测灵敏度较低。Nicholson[20]研究小组多年来致力于代谢组学的研究，用代谢组学方法对药物毒性影响的组织器官及其位点进行判断进而推测药物作用机制，并确定毒性潜在生物标志物，为药物的毒性评价做出了巨大贡献。单纯的应用代谢组学技术并不能显示其方法的先进性，West 等[21]对人胚胎干细胞（hESCs）进行代谢组学方面的研究，得到了发育毒性的生物标志物的方法，并建立了相应的体外发育毒性预测模型和分析方法，为推断药物及药物的毒性发生机制和评价外源化合物的毒性提供科学依据。

另外，采用代谢组学的方法研究各类中药毒性的分子机制、毒性剂量与时间效应的关系，为建立全新的中药毒性评价新方法新体系做出了重要贡献。赵剑宇等[22]利用基于核磁共振（NMR）的代谢组学技术测定给予不同剂量关木通煎剂后不同时间大鼠尿液代谢物的动态变化，并基于此改变分析了其与靶器官毒性的相关性。实验结果表明，关木通可损害肾脏且其对动物的毒性作用有明显的剂量相关性。魏来等[23]利用核磁共振代谢组学研究朱砂的神经毒性作用，发现朱砂具有一定神经毒性，并呈现出特定的量效反应关系。王喜军等[24]以 UPLC/QTOF 分析系统为核心手段，研究了四氯化碳诱导大鼠肝损伤后代谢组的变化趋势，以及茵陈蒿汤干预后的肝损伤大鼠代谢组的回调趋势，证实了茵陈蒿汤对四氯化碳导致大鼠肝损伤具有一定的预防作用。

利用组学技术可在相当短的时间提供比一般毒理试验更多的有用信息，并可以在很大程度上改善整体动物实验带来的动物消耗量大、费时、费力、种属差异大等缺点。我国学者利用组学技术开展毒作用的环境应答基因表达、功能和多态性的研究，在寻找环境暴露生物标志物方面取得了重大成果。

4 展望

除此之外，还有一些新方法有待国内外学者进一步研究与提高，如用于系统预测 *n′*-甲基烟酰胺（NMEs）潜在毒性的硅上发现技术，广泛应用于遗传毒理学领域的 Gadd45 Green Screen 实验技术、改

进的 Ames 实验技术即 AmesⅡ技术、高通量体外彗星实验技术、流式细胞术检测微核实验技术等，这些新技术对遗传毒性早期评价具有重要意义[25]。纳米技术在环境与生物效应中的应用也越来越广泛，还有应用于研究分子结构的基础领域、毒物分析化验、临床诊断、药物筛选与研制等方面的 SELEX 技术。

科学技术不断发展进步，应用于药物毒理学研究的技术方法不断更新。虽然在相当一段时间内毒理学实验研究主体仍然是整体动物，但在尽快掌握国内外核心技术的同时应积极加强国内外合作，积极探索更接近人类解剖生理学的动物种属或其他意识薄弱、无意识的低等生物作为模式生物，结合最新的组学、分子生物学技术而更加准确、全面地反映毒理学、生物学的终点，提高毒理学实验研究的有效性和可靠性。为药物的毒理学研究提供更加可靠的保证，也为人类的健康事业做出更大的贡献。

参考文献

[1] 石 艳, 王陆飞, 罗 萍, 等. 庆大霉素诱导急性肾损伤大鼠模型肾损伤分子-1 的表达 [J]. 中国生物制品学杂志, 2010, 23(7): 700-703.

[2] Corchero J, Granvil C P, Akiyama T E, *et al*. The CYP2D6 humanized mouse: Effect of the human CYP2D6 transgene and HNF4α on the disposition of debrisoquine in the mouse [J]. *Mol Pharmacol*, 2001, 60(6): 1260-1267.

[3] Shimada S, Mimata A, Mogushi K. Synergistic tumour suppressor activity of *E*-cadherin and P53 in a conditionnal mouse model for metastatic diffuse-type gastic canser [J]. *Stomach*, 2012, 61(3): 344-353.

[4] 金 晶, 黄芝瑛. 离体肝灌流技术在药物和毒理学研究中的应用 [J]. 毒理学杂志, 2008, 22(3): 239-241.

[5] 郭宇航, 王乃平, 黄仁彬. 肝细胞体外培养及其在药理毒理学研究中的应用 [J]. 西北药学杂志, 2008, 23(1): 58-60.

[6] 唐爱存, 张志伟, 黄仁彬. 原代肾细胞体外培养及其在药物毒理学中的应用 [J]. 中外健康文摘, 2009, 8(8): 211-214.

[7] Scholz G, Pohl I, Genscholo E, *et al*. Embryotoxicity screening using embryonic stem cells *in vitro*: Correlation to *in vivo* terotogenicity [J]. *Cells Tissues Organs*, 1999, 165: 203-211.

[8] 万旭英. 大、小鼠卵泡培养方法及其在雌性生殖毒性研究中的应用 [D]. 上海: 第二军医大学, 2008.

[9] Lieschke G J, Currie P D. Animal models of human disease: Zebrafish swim into view [J]. *Nat Rev Genet*, 2007, 8(5): 353-367.

[10] 姜 玮, 王新敏, 唐于平, 等. 甘遂不同提取物对斑马鱼急性毒性的初步观察 [J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(1): 53-56.

[11] NOUNT. *Toxicogen Omics*, *A New Paradigm of Toxicology* [M]. TOkya: Springer-Verlag. 2003: 3-11.

[12] 张晓芳, 袁伯俊, 陆国才, 等. 药物毒理学研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2010, 19(24): 2298-2302.

[13] Gresham V, Mcleod H L. Genomics: Applications in mechanism elucidation [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2009, 61(5): 369-374.

[14] 杨宝华, 吴纯启, 王全军, 等. 利用毒理基因组学技术研究纳米铜的肝脏毒性机制 [A]. //中国毒理学会第五次全国学术大会论文集 [C]. 贵阳: 中国毒理学会, 2009.

[15] Selvarajah G T, Kirpensteijn J. Prognostic and predictive biomarkers of canine osteosarcoma [J]. *Vet J*, 2010, 185(1): 28-35.

[16] 刘建军, 何浩伟, 龚春梅, 等. 纳米二氧化硅致 HaCaT 表皮细胞毒性作用的蛋白质组学研究 [A]. //中国毒理学会第五次全国学术大会论文集 [C]. 贵阳: 中国毒理学会, 2009.

[17] Merrick B A. Toxicoproteomics in liver injury and inflammation [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2006, 1076: 707-717.

[18] 王 莹, 王全军, 廖明阳. 蛋白质组学技术在药物肝毒性研究中的应用 [J]. 中国新药杂志, 2008, 17(4): 348-352.

[19] Kumagai K, Ando Y, Kiyosawa N, *et al*. Toxico-proteomics investigation of the molecular mechanisms of cycloheximide-induced hepatocellular apoptosis in rat liver [J]. *Toxicology*, 2006, 228(2/3): 299-309.

[20] Kevn H C, Ebbels T M D, Bollard M E, *et al*. Geometric trajectory analysis of metabolic responses to toxicity can define treatment specific profiles [J]. *Chem Res Toxicol*, 2004, 17(5): 579-587.

[21] West P R, Weir A M, Smith A M, *et al*. Predicting human developmental toxicity of pharmaceuticals using human embryonic stem cells and metabolomics [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 247(1): 18-27.

[22] 赵剑宇, 颜贤忠, 彭双清. 利用代谢组学技术研究中药关木通的肾毒性作用 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2007, 9(5): 54-59.

[23] 魏 来, 廖沛球, 李晓晶. 代谢组学方法对朱砂神经毒性的研究 [A]. //第十六届全国波谱学学术会议论文摘要集 [C]. 海口: 中国物理学会波谱专业委员会, 2010.

[24] 王喜军, 孙文军, 孙 晖, 等. CCl_4 诱导大鼠肝损伤模型的代谢组学及茵陈蒿汤的干预作用研究 [J]. 世界科学技术: 中医药现代化, 2006, 8: 101-103.

[25] 武元峰, 栾 洋, 戚新明, 等. 遗传毒性早期快速评价方法 [J]. 药物评价研究, 2011, 34(4): 244-250.