

临床生化指标在新药临床前研究中的毒理学意义

孔庆喜, 罗 曼, 赵 煜, 阳 华

康龙化成北京生物技术有限公司 病理部, 北京 102206

摘 要: 临床生化指标主要用来检测碳水化合物、脂类、蛋白质、尿液、肝胆、心血管、肌肉、胃肠道系统的代谢。临床检验的个体或汇总数据要在病理报告中分析并在实验报告中述及。阐明了临床生化指标在药物临床前研究中的毒理学和生物学意义, 从而考察和反映了临床生化指标对动物机体总的代谢、营养和健康状态的影响, 同时为建立和定期更新实验室各实验动物临床检验的背景值提供了参考与比较。

关键词: 临床生化指标; 毒理学意义; 临床前研究

中图分类号: R994

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2014)05-0472-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.05.022

Toxicological significance of clinical biochemical indicators in preclinical studies for new drugs

KONG Qing-xi, LUO Man, ZHAO Yu, YANG Hua

Pharmaron Biotechnology Limited Company, Beijing 102206, China

Abstract: Clinical biochemistry indicators can be used for the test of the metabolism of carbohydrates, lipids, proteins, urine, hepatobiliary, cardiovascular, musculoskeletal, and gastrointestinal systems. Individual and summary data of clinical examination should be analyzed in the pathology report and described in the study report. This paper expounds the toxicological and biological significance of clinical biochemical indicators in drug preclinical studies, in order to study and reflect their impacts to the total metabolism, nutrition, and health status in the animal body, and to establish and termly update the background baseline of each experimental animal in CRO's clinical pathology lab for reference and comparison.

Key words: clinical biochemical indicators; toxicological significance; preclinical studies

新药临床前研究中病理学评价主要依靠数据和标本, 即临床检验结果、大体解剖和组织病理学发现通常是主要的毒性信息来源^[1], 尤其是临床生化测试的结果对毒性病理学靶器官的确定具有重要的参考价值和解释意义。血、尿的临床检验报告不是简单的罗列数据, 更重要的是分析各项测试指标的变化是否具有毒理学或生物学意义、并确定其是否与供试品相关。临床生化测试的指标通常包括 22 项^[2]: 丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、乳酸脱氢酶 (LDH)、肌酸激酶 (CK)、胆固醇 (TC)、三酰甘油 (TG)、血糖 (GLU)、碱性磷酸酶 (ALP)、 γ -谷氨酰氨基转肽酶 (GGT)、总胆红素 (TBIL)、肌酐 (CRE)、尿素氮 (BUN)、血尿素氮/肌酐 (BUN/C, 计算比值)、总蛋白 (TP)、白蛋白 (ALB)、球蛋白 (GLO, 总蛋白减白蛋白

计算)、白蛋白/球蛋白 (A/G, 计算比值)、钠 (Na)、钾 (K)、氯 (Cl)、磷 (P)、钙 (Ca) 和镁 (Mg)。

临床生化指标通常用来检测和反映碳水化合物、脂类、蛋白质、尿液、肝胆、心血管、胃肠道的代谢, 但对神经系统的毒性却缺乏提示^[3]。评价临床检验结果是否可靠有意义, 个体的参数不能孤立的评价, 要结合其他发现 (主要是病理组织学改变、临床症状、摄食、体质量变化等), 考察是否具有有一致性, 以便于正确的解释。另外, 当每组动物数少于 3 时, 通常分析比较组间个体值, 不需计算均值, 此时个体值比均值更有意义。

临床检验的个体或汇总数据要在病理报告中分析以及实验总报告中述及, 描述哪些临床检验结果的变化是与受试物相关、与实验其他数据有关联、阐明其毒理学或生物学意义, 最后要总结在哪些剂

收稿日期: 2014-05-08

作者简介: 孔庆喜 (1977—), 男, 硕士, 研究方向为毒性病理评价。Tel: (010)56375333 E-mail: keith.kong@pharmaron-bj.com

量下发生了这些受试物相关的临床检验改变。

本文综述了酶类、非酶类和电解质类生化检测指标在药物临床前研究中对动物机体总的代谢、营养和健康状态的影响,为建立和定期更新实验室各实验动物临床检验的背景值提供了参考与比较。

1 酶类生化指标

1.1 ALT

ALT 主要存在于肝细胞内,其他组织内含量极少或无,所以很有特异性,是肝脏唯一的特异性酶,主要体现在人类、狗、大鼠、小鼠和猴,豚鼠除外。ALT 升高即表示肝脏受损肝细胞膜发生了损伤,例如缺氧、肝脏脂肪变性、肝细胞坏死等。狗的肝脏受到毒性攻击 12 h 内 ALT 活性就可升高,1~2 d 内达到顶峰,ALT 半衰期大概为 60 h。但是,几天后 ALT 的值可能令人费解地严重降低,严重低于背景值或自身受试给药前(predose)测试值,原因分析为肝细胞发生了大块性(包括桥接)变性或坏死后续酶的供应耗尽。

1.2 AST

AST 存在于肝脏和肌肉内,所以不是肝脏特异性酶^[4]。肝脏损伤时,AST 会伴随 ALT 升高,但是单纯的 AST 升高不能表示肝功受损^[5]。AST 也存在于红细胞内,因而溶血或肌肉损伤(例如静脉或皮下注射给药)也能导致血清中 AST 升高;肌肉损伤若 AST 和 ALT 同时出现升高,通常 AST 比 ALT 升高显著。在小鼠和非人灵长类动物被抓取控制(handling)^[6]的程度也是评价 AST 升高考虑的因素之一。狗的 AST 半衰期大约为 12 h。

1.3 LDH

当肝脏损伤时也能升高,但 LDH 也不是肝脏特异性酶,更多的是提示肌肉损伤如骨骼肌、心肌的变性坏死,当骨骼肌损伤时 AST 也相应升高。

1.4 CK

受应激(stress)影响显著,在非人灵长类尤其甚、且个体差异显著,同时 LDH 和 AST 也伴随升高。另外,复杂的静脉穿刺给药以及强饲(gavaged)也能影响血清中 CK、LDH 以及 AST 的活性显著升高。

1.5 ALP

ALP 是狗胆汁淤积的敏感信号,但缺乏特异性,增高的 ALP 活性反映了狗肝同工酶的变化,但别的同工酶,特别是骨同工酶、糖皮质激素诱导的酶类也要考虑为 ALP 增高的潜在来源。幼龄动物 ALP 显著高于成年动物,主要是因为骨同工酶在血

清中活跃显著,特别是在约 6 周龄的大鼠(实验启动前)血清中 ALP 表现最高。狗肝脏和骨中同工酶的半衰期大约为 3 d。在非人灵长类 ALP 常常表现较高、个体差异大^[7];大鼠耗食下降则可导致 ALP 升高。

1.6 GGT

GGT 在某些品系动物中如狗发生肝胆疾病时虽没有 ALP 敏感,但比其特异性高,并且活性不受骨增生的影响。而在非人灵长类肝胆疾病时,GGT 表现比 ALP 更敏感、特异性也更高。大鼠和小鼠血清 GGT 的活性总的来说太低以至于不能被量化测出,可见 GGT 的检测仅适用于非啮齿类,存在着种属差异。

2 非酶类生化指标

2.1 TC 与 TG

TC、TG 和 GLU 三者具有代表性的反映了机体总体代谢情况,而不是单纯的作为某一特定器官毒性的信号。TC、TG 来源于日粮摄入特别在肝内合成,构成乳糜微粒;TC 是参与合成胆汁酸、皮质甾类和性激素固酮类必不可少的原料;TG 是机体能量的来源。轻度或中度的 TC、TG 的升高、降低在毒理实验中常见,而其确切的机制常常不得而知,几个可能的影响因素包括摄食消耗、体质量变化、机体行为、肝功能以及激素平衡水平。

2.2 GLU

GLU 浓度取决于肠吸收、肝脏合成、组织对糖的摄入。影响血糖动态平衡几种激素中最重要的是减低血糖作用的胰岛素(胰岛 β 细胞分泌)以及升高血糖作用的胰高血糖素(胰岛 α 细胞分泌)。血糖水平的维持是通过肝脏肝糖分解、糖酵解以及糖质新生来实现。

毒理实验中 GLU 升高的常见原因包括动物未禁食、动物处于濒死状态、胰岛素受拮抗、不限于应激反应导致的儿茶酚胺大量释放(兴奋、剧痛、恐惧、失血、脱水、缺氧)、以及应激促进肾上腺糖皮质激素分泌都会调节血糖升高。相比之下,由于体外糖酵解、动物耗食下降、营养吸收不良、体质量增长受抑制、严重肝脏疾病、脓毒血症以及禁食(尤其表现在非人灵长类)等都会导致 GLU 明显降低。

2.3 TP

血清总蛋白比血浆中蛋白低 3~5 g/L,因其不包含凝血过程中消耗的纤维蛋白原以及凝血因子等。解释生化蛋白的变化要结合动物体内水合作用

的状况。贫血时生化蛋白本当发生低下,但可能被机体脱水掩饰而表现升高,血液学在脱水的动物也会表现出假象性的升高,如血红蛋白浓度(HGB),由于脱水血清中水分减少致使HGB相对增高。单纯脱水时,白蛋白(ALB)、球蛋白(GLO)会对应地增高。

静脉注射给药如发生严重的注射部位血管及皮下出血、水肿、炎症、坏死而导致严重渗出,TP、ALB、GLO及ALB/GLO比都会降低;摄食下降也是血液蛋白下降的因素之一。对于小鼠和狗来说,ALB半衰期分别为2d或8d。某例大鼠连续给药7d血液白蛋白不足反映白蛋白同化下降,可能因为耗食下降、消化或吸收不良、或者肝脏病变。在狗血液白蛋白不足很可能的原因为血管、泌尿系统肾脏或胃肠道发生了损伤导致蛋白从血、尿、便中丢失。GLO主要在肝脏合成,GLO升高最常见的原因是脱水或者继发于抗原刺激的多克隆丙种球蛋白病。ALB会选择性地丧失或者生成减少,如当肾病或者肝病时,此时白/球比降低;但当球蛋白同时伴随着丧失或者不能合成,如出血、肠病、渗出或同化作用不全时,会出现全血液蛋白不足,ALB/GLO比却仍表现正常。

2.4 TBIL

总胆红素(TBIL)升高,在毒理实验中常见于采血不当引起的溶血或药物诱导的溶血(hemolysis)、胆汁淤积(cholestasis)以及总胆管结石阻塞(见于大鼠),致癌实验中发生肝细胞癌或胰腺腺癌的动物TBIL也常见升高。肝脏门脉周病变导致的高胆红素血症明显重于小叶中央肝病诱发的改变。

2.5 CRE和BUN

CRE和BUN升高表现在如下几种情况:肾前性、肾性氮血症肾小球滤过率下降,肾前性氮血症出现脱水。肾前性氮血症消化道出血会导致BUN升高。肾脏毒性时,CRE改变倾向于伴随BUN的变化。

3 电解质类检测指标

K在酸毒症、无尿或少尿性肾病时升高,食欲减退时下降。Na和Cl在机体脱水时升高,在多尿型肾功能衰竭、胃肠道功能衰竭、以及利尿剂作用下Na和Cl降低。血中Ca和P的浓度受甲状旁腺素、降钙素和维生素D调节,表现的是肠吸收、骨形成、尿排泄三者之间的一个动态平衡。血钙的升高并不常见,甲状旁腺功能亢进(甲状旁腺主细胞分泌的甲状旁腺素作用是促进骨内钙盐溶解释放入血、促进小肠和肾小管对钙的吸收)以及肾脏疾病时血钙出现升高或者反而降低。在毒理试验中低血钙常继发于低白蛋白。P升高见于肾小球滤过率(肾前性、肾性、肾后性)降低以及骨增长的影响,P降低见于严重的摄食下降。

4 结语

临床生化测试的各项指标是否具有毒理学意义不是简单的、孤立的,指标间尤其是反应同一脏器功能的指标应协同分析,并结合动物的营养状态、代谢及排泄变化、临床症状、以及给药特点进行综合评价。

生化检测通常被要求在单次或多次给药的一般毒理实验中进行^[8],但对2年大鼠或6个月转基因小鼠慢性或致癌实验,美国食品和药物管理局(FDA)、美国环境保护署(EPA)、经济合作与发展组织(OECD)等药品申报监督机构或组织颁布的法规或指导原则对其临检要求不尽一致^[9],见表1。

如果在实验12或18个月时有改变发生,FDA要求末期解剖都应再测试全血细胞计数;末期解剖时对照组和高剂量组进行的白细胞分类计数,如有改变发生或别的数据提示有必要,EPA要求对其他剂量组和(或)实验12个月、18个月的血涂片也进行分类计数。在以前的文献中,FDA、EPA、OECD对除致癌实验外要求也不尽一致^[10]。

当前,美国兽医临床病理学会公布了临床检验行业指导原则^[1],旨在统一全球药物研发及生物技

表1 FDA、EPA、OECD致癌实验临床检验指导原则

Table 1 Regulatory guidelines for clinical pathology testing recommendations in carcinogenicity study by FDA, EPA, and OECD

组织	指导原则	版本号	受试物	血液样本采集时间/月	血液学	生化、血凝及尿分析
FDA	Redbook 2000, chapter IV.C.6	Jan/06	食品添加剂	0.5/3/6/12/(18/end) 含尿液采集	全血细胞计数	需要
EPA	OPPTS 870.4200	Aug/98	农药	12/18/end	血涂片	不需要
OECD	451	Sep/09	化学品	由SD决定	由SD决定	由SD决定

术公司的临床检验实验室的操作规范以及技术标准。按指导原则操作的实验室获得的数据有一定的可比性和参考性,这样使得实验室间的检验结果得到彼此甚至国际间的互认成为可能,也使得探索建立地区性甚至全球性的临床检验背景数据库也成为可能。

总之,临床生化是考察和反映动物机体总的代谢、营养和健康状态,主要分析肝功和肾功两大指标。分析毒理实验生化结果是否具有毒理学意义,还需要关联组织病理靶器官病变、血液学和尿检等结果。另外要注意生化测试的指标有种属差异的特点,所以有必要建立和按年度定期补充更新机构内各种实验动物临检背景值以供参考比较。

参考文献

- [1] Kanno J. Clinical pathology testing regulatory concerns [J]. *Toxicol Pathol*, 1992, 20(3Part 2): 534-537.
- [2] Tomlinson L, Boone L I., Ramaiah L, *et al.* Best practices for veterinary toxicologic clinical pathology, with emphasis on the pharmaceutical and biotechnology industries [J]. *Veter Clin Pathol*, 2013, 3(42): 252-269.
- [3] Carakostas M C. Interpreting clinical laboratory data in safety assessment studies [J]. *Toxicol Pathol*, 1992, 20(3Part 2): 480-483.
- [4] Solter P F. Clinical pathology approaches to hepatic injury [J]. *Toxicol Pathol*, 2005, 3(3): 9-16.
- [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: 810-828.
- [6] Boone L, Meyer D, Cusick P, *et al.* Selection and interpretation of clinical pathology indicators of hepatic injury in preclinical studies [J]. *Veter Clin Pathol*, 2005, 3(34): 182-187.
- [7] Hall R L, Everds N E. Factors affecting the interpretation of canine and nonhuman primate clinical pathology [J]. *Toxicol Pathol*, 2003, 31(Suppl): 6-10.
- [8] Thompson M B. Clinical pathology in the national toxicology program [J]. *Toxicol Pathol*, 1992, 20(3Part 2): 484-489.
- [9] Young J K, Hall R, O'Brien P, *et al.* Best practices for clinical pathology testing in carcinogenicity studies [J]. *Toxicol Pathol*, 2011, 39: 429-434.
- [10] Hall R L. Clinical pathology for preclinical safety assessment: current global guidelines [J]. *Toxicol Pathol*, 1992, 20(3Part 2): 472-476.