

【专论】

药物安全性研究中免疫系统的病理学评价

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

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: 免疫系统是一个复杂的、涉及多个器官的系统, 自身易受年龄、性别、环境等多个因素的影响, 其正常的生理变异较大, 因此在临床前安全性研究中评估药物所致的免疫毒性是一个巨大的挑战。目前, 免疫系统的组织形态学评价是确定免疫毒性公认的基石。就免疫系统病理学评价相关的指导原则, 以及胸腺、脾脏、淋巴结等重要免疫器官的病理学评价进行简要论述, 以帮助毒性病理学家准确和一致性评价免疫系统中预期的或意外的药物所致的毒性改变。

关键词: 药物安全; 免疫系统; 病理学评价; 一致性评价

中图分类号: R967 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2017) 01 -0001 - 04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.01.001

Pathological evaluation of immune system in drug safety study

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

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

Abstract: The immune system is a complex system involving multiple organs, and it is vulnerable to age, gender, environment and other factors. For a variation normal physiological range, it is a great challenge to evaluate drug-induced immunotoxicity in preclinical safety study. Histomorphologic assessment of the immune system is a recognized cornerstone in the identification of immunotoxicity at present. In this paper, the principles of pathological evaluation for immune system, and pathological evaluation for important immune organs including thymus, spleen, lymph nodes are discussed briefly, so that it is intended to assist toxicity pathologists in the accurate and consistent characterization of intended and unintended drug-induced alterations of the immune system.

Key words: drug safety; immune system; pathological evaluation; consistency evaluation

免疫系统是一个复杂的、不断更新的系统, 它包括临时激活的胚胎内外遗岛、卵黄素、胎盘、肝脏, 以及永久性的重要免疫器官(胸腺、淋巴结、脾脏、骨髓等)。经典的免疫功能是通过免疫细胞及其亚型表面的大量特异性分子、受体和复合体相互作用而实现的。众所周知, 免疫系统的组织形态学评价是确定免疫毒性公认的基石^[1-2]。目前, 国际协调会议(International Conference on Harmonization, ICH) S8 指南以及美国毒性病理学会颁布的“免疫系统组织病理学的最佳操作指南”中对免疫系统评估提供了详细的方法, 以帮助准确和一致性评价免疫系统中预期的或意外的药物所

致的免疫系统改变^[3-5]。作为毒性病理学家, 不但需要根据免疫系统相关的分子和细胞生物学特点, 确定淋巴器官的组织形态学改变, 而且需要理解这些变化的病理生理学影响, 能够合理地对这些变化进行免疫生理学解释。笔者对免疫系统病理评价的相关指导原则, 以及胸腺、脾脏、淋巴结等重要免疫器官的组织病理学评价进行论述, 以期对新药评价的相关研究有益。

1 免疫系统的常规病理学评价的最佳操作指导原则

2005年9月, 基于广泛的科学讨论形成了一份ICH S8 指导原则“人用药物免疫毒性研究”^[3]。根据ICH S8 的要求, 所有新的研发药物均需要进行

收稿日期: 2016-11-01

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

作者简介: 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@nicpbp.org.cn

*通信作者 李 波, 研究员, 研究方向为药物临床前安全性评价。Tel: (010) 67876252 E-mail: libo@nicpbp.org.cn

潜在的免疫毒性评价。标准化的毒性研究(STSs)作为第一步的设计,如果认为适当可补充额外的免疫毒性研究。通过对STS观测的所有数据进行权重分析后,包括临床病理终点的血液学(重点是白细胞计数及分类计数)、临床生化(其是球蛋白和A/G比值)、淋巴器官的大体病理学观察、胸腺和脾脏的脏器质量,以及胸腺、脾脏、骨髓、Peyer氏结(PPs)、引流淋巴结,以及至少一个其他淋巴结的亚结构的组织病理学检查,然后确定是否需考虑存在潜在的免疫毒性。

同年,毒性病理学会(STP)工作小组(WG)推出了免疫系统常规病理学评价的最佳操作指南^[5],其中对大体观察、脏器质量、组织病理学检查等相关内容进行了确定和讨论。首先,工作组同意推荐的组织病理学检查不要求免疫组织化学检查,淋巴组织的盲法评分,或者淋巴组织细胞悬浮液的流式细胞学检查。这些特殊技术是非常有用的,但是不需要在常规基础上使用。仅仅当在标准化的毒性研究中观测到免疫系统的潜在毒性时,才可使用这些技术,以便回答特殊的科学问题。

关于淋巴器官质量的意义,免疫系统常规病理学评价最佳操作指南中提到以下几点^[5]:(1)常规应该记录并评估胸腺和脾脏的质量;(2)对于这些脏器质量的解释应该考虑研究中所有其他的临床数据、临床病理学、组织病理学数据;(3)脾脏和胸腺质量的改变(伴随有组织病理学变化)是系统免疫调节的可靠指标;(4)脾脏和胸腺质量与周围淋巴结的变化相比是更为可靠的淋巴组织反映指标。实际上,淋巴结质量并不推荐,因为一致性的组织收集与处理很困难,并且缺乏这样的组织学数据库。

淋巴组织改变的半定量描述被认为是淋巴组织病理学检查最佳操作指南的核心,也是推荐的组织病理学检查的核心。2012年,Elmore^[6]对免疫系统的组织病理学评价提出了更新,再次强调了淋巴组织改变的半定量描述。总之,该方法是强调了以下几个概念:(1)每一个淋巴器官均有分隔的区域行使不同的功能;(2)这些区域应该单独评估变化;(3)应该采用描述性术语,而不是解释性术语表述这些区域的变化。详细地进行组织变化的分区评价可以提供病变的有用的病理生物和生物学的解释。每一个试验中设定相同年龄和性别的对照组是非常关键的,可以确保评价的准确性。此外,如果某

一区域存在异常时,需要对该特殊区域进行观察。

当开始评估免疫系统时,病理学家应该首先从这些基本问题开始^[5-6]:(1)淋巴器官的大体观察是体积变大还是变小;(2)大体观察中淋巴器官的形状、质量、颜色或质地是否与正常背景和(或)对照组有差异;(3)器官大小的变化是否因为镜下发现某一特定区域的成分出现改变(如细胞、基质、水肿液);(4)器官大小的改变是否由于某一或多个区域细胞数量发生改变,即镜下观察到细胞数量的增加或减少;如果是,确定是何种细胞受累;(5)累及的特定区域;(6)确定这些变化是由于所在区域原有定居细胞还是外来迁移的细胞造成。通过这种简单的方法,能够揭示这些复杂组织形态变化所提示的毒性意义。

2 胸腺的病理学评价

大多数急性和亚慢性重复给药毒性研究中啮齿类动物的胸腺很明显,然而人的胸腺在10岁左右就开始退化,到30岁左右基本由脂肪和结缔组织所替代。因为成年人的胸腺基本上是缺如的,所以化合物导致的胸腺细胞数目减少与人的相关性是有疑议的^[7]。但是,临床前安全性评价中,实验动物胸腺的变化仍视为一个有意义的指针,提示可能会对免疫系统造成影响^[8]。

大多数物种在性成熟的阶段开始经历退化。胸腺减少的淋巴细胞是经由凋亡以及吞噬细胞清除,标志性改变就是出现“星空”现象,这就是皮质易染体巨噬细胞数目增加的结果^[8-9]。因此,考虑受试动物的年龄、品系、性别以及动物种属非常重要。特别在啮齿类动物,更需要区别动物性别进行比较,雌性动物相比雄性动物具有更为明显的上皮样结构。皮质胸腺淋巴细胞的背景性凋亡是正常退化过程的一部分,在大鼠的亚慢性或慢性研究期间该变化可能会出现显著性增加,因此仔细地检测对照组动物对于确定该变化是否由供试品诱导的非常重要^[10-11]。

毒性研究中如果有供试品诱导的直接效应或应激导致的间接效应时,胸腺皮质组织学特点为胸腺皮质细胞数目的减少,不同程度地伴随有增加的淋巴细胞凋亡,易染体巨噬细胞数目增加(星空现象),Hassal小体角化的增加,以及皮髓质分界不清。随着这些变化的发展,胸腺可能变得破破烂烂,严重的时候皮质和髓质的相对比例发生反转。如果能确定组织变化具有剂量相关性,那么对于确定该病

变与供试品相关就非常重要。对镜下改变做出解释有时更困难,这是因为识别损伤和(或)应激的强度或持续时间,以及损伤和组织收集的时间等均会影响形态学的呈现。如果单次给药后是急性严重的损伤,但是组织收集延后,那么整个器官凋亡可短暂出现,然后快速被清除,之后仅仅留下细胞数目减少的图像,而缺乏明显的凋亡小体或易染体巨噬细胞。与之相反,如果损伤是持续的并且很强,或者如果在损伤之后能及时地收集组织,那么病变可以看到大量的不同的易染体巨噬细胞^[12]。

3 脾脏的病理学评价

在免疫毒性分析中,脾脏质量尤其是相对脑质量是一个非常重要的指标。人们发现脾脏质量的减轻在啮齿类动物的系统性免疫毒性中是一个可靠指标,尤其是伴有组织形态的变化时。但是,在犬的脾脏不完全放血时,会导致错误的脾脏质量增加,所以评估犬的脾脏质量是有问题的。不完全放血还会使得淋巴成分呈减少的表现,因为大量的红细胞堆积并压迫骨髓。仔细地组织学检查能帮助确定是否存在放血不完全,如果存在组织人工假象则必须对脾脏质量数据进行解释^[13]。

对大多数器官而言,脾脏对于损伤所表现出的形态学变化非常有限。这些变化包括骨髓的动脉周围淋巴鞘(PALS)、边缘区(MZ)和滤泡中的细胞密度减低,伴有或不伴有凋亡和易染体巨噬细胞的增加,PALS或骨髓细胞密度增加,年龄相关的萎缩,被膜纤维化,髓外造血的减低或增加,梗死,炎症和坏死^[14-15]。其他可能的组织形态学变化还包括淀粉样变性、磷脂、脂肪沉积(脂肪浸润)、色素沉着。此外,值得注意的是非人灵长类动物(NHPs)的脾脏,由于具有防御性,因此存在许多发达的次级淋巴滤泡。在某些淋巴滤泡的中心可能存在无定形的嗜酸性物质,这可能是持续性抗原刺激的结果和潜在抗原抗体复合物的沉积^[16]。因此,在非人灵长类动物的脾脏中可以观察到大的、形态不同的淋巴滤泡,并具有不规则和奇怪的生发中心。这既可发生于野外捕获的食蟹猴,也可发生于繁育的食蟹猴中,可能是慢性寄生虫(包括疟疾)、细菌或病毒感染的结果。

评估任何一种属动物脾脏的变化时,主要的挑战是有时所有区域的变化是相似的,而不是仅单一区域受累及。所以,脾脏组织学特点上与对照组相似,但是大体上却小于对照组。仔细地评估脏器质

量是有意义的,大多数案例中在确定脾脏组织学变化相关性之前,必须有至少25%~35%脏器质量的减少。同时将对照组和给药动物的脾脏组织学切片并排放在一张白纸上,这对于确定脾脏相对大小和形状的亚肉眼评估是非常有帮助的。然后提出这些问题:(1)给药动物的脾脏是否明显小于对照组动物;(2)在一个横截面上,脾脏边缘是钝圆的,还是尖锐的;(3)表面是否凹陷、扁平或膨胀(肿胀)。回答上述问题可以帮助确定是否脾脏受到影响,该病变是局灶性的,还是弥漫性的^[12, 14]。

4 淋巴结的病理学评价

外周淋巴结正常的组织学特征差异很大,并与病理学改变的淋巴结特征相重叠^[17]。收集、包埋和切片的细微差异可导致内在巨大差异,因此很难获得外周淋巴结组织学特征的一致性。除了颌下淋巴结和肠系膜淋巴结外,并不推荐收集和检查其他外周淋巴结,除非这些淋巴结是外来物质的引流部位,或者显示出大体的变化。药物引流部位的淋巴结代表了一个较高的药物暴露的第一淋巴组织屏障,因此可能提供一些影响免疫系统的线索。肠相关淋巴组织(GALT),包括Peyer氏结合肠系膜淋巴结,应该在任何一个标准解剖中进行收集,并且认为这些淋巴组织是经口给药的近端暴露部位。与之相似的是,支气管相关淋巴组织(BALT)在经肺给药时应该检查。气管、支气管淋巴结在大多数STSs中并不取材,但是肺内暴露评估研究中需要进行收集。如果经鼻给药途径暴露的研究则需要考虑收集鼻相关淋巴组织(NALT)。

与功能活化或疾病状态有关的淋巴结组织形态的变化非常有限,这些改变包括淋巴细胞数目的增多或减少,炎症,坏死,凋亡和瘤样病变。值得注意的是毒理学研究中的许多淋巴结的改变反映了正常的功能,而不是病理改变,比如滤泡增生、髓窦组织细胞增生、髓窦红细胞增多、颗粒聚集。淋巴结最常见的改变就是反应性淋巴增生(reactive lymphoid hyperplasia, RLH)。RLH可以是特异性的,如病毒或细菌来源的抗原,也可以是非特异性的,如化学污染物、颗粒物或组织损伤。RLH显现出复杂的改变,可累及一个或多个原驻细胞群和(或)迁移的细胞群,该变化可能是局部的病变,也可能是全身的病变。滤泡增生表现为次级淋巴滤泡的体积增大和数量增多,这是一种体液免疫应答的反应。高度增大和融合的淋巴滤泡可见于长期抗

原刺激,但是犬和非人灵长类动物并不常见^[18]。

混合型肉芽肿性和化脓性肉芽肿样病变可见于细菌、真菌或寄生虫感染的淋巴结,淋巴结结构的部分或全部受累及,结构由于炎症反应而导致破坏。肉芽肿性炎症可伴有较多的上皮样巨噬细胞的聚集,存在于淋巴结的基质和髓索处。这个病变不能与窦组织细胞增生相混淆,窦组织细胞增生是指空泡化/泡沫样的巨噬细胞聚集在髓索内,被认为是肠系膜淋巴结常见的正常变化。但是,如果发生率增加或病变程度的加重就有可能与给予供试品相关。髓索中浆细胞的增生在啮齿类动物的颌下淋巴结中常单独存在^[17]。

比格犬的淋巴结如颌下淋巴结、腋窝淋巴结和腠窝淋巴结中可见大量的嗜酸性粒细胞,而肠系膜淋巴结和肝的淋巴结很少见该变化^[12]。人们认为这种嗜酸性粒细胞特定分布的基础是无临床意义的,大多数犬都常见蠕形螨、疥癣螨感染,包括特定饲养的比格犬。总之,当淋巴结中出现嗜酸性粒细胞或嗜中性粒细胞数目增多时,需要确定这些细胞是由于其他组织的炎症所以迁移至此,还是因为淋巴结本身存在急性炎症,或者两种情况并存,这是非常重要的。因此,当低倍镜下观察淋巴结时整体的细胞密度呈正常,仍需要在高倍镜检查淋巴结,尽管此时没有解剖结构的破坏,仍需确认正常的常驻细胞没有被其他细胞所替代。

5 结语

免疫系统的复杂性使其组织病理学评价具有极大的挑战性,而良好的组织病理学评价是确定生物创新型药物免疫毒性的重要工具。采用“权重分析方法”客观评价免疫器官的大体改变、脏器质量(尤其是脾脏、胸腺)、其他器官的病理学改变以及临床病理学变化。通过准确记录每一特定区域淋巴细胞或其他类型细胞的变化,结合特定器官及细胞的生理学功能,确定可能存在的靶细胞以及相应的病理学改变。总之,最终病理学数据的解释和分析需要慎重考虑研究动物物种的差异以及随年龄变化免疫系统自身复杂的生理性改变。

参考文献

- [1] Haley P J. The role of histopathology in the identification of immunotoxicity [J]. J Immunotoxicol, 2005, 2(4): 181-183.
- [2] Kuper. C F, Harleman J H, Richter-Reichelm H B, et al.

Histopathologic approaches to detect changes indicative of immunotoxicity [J]. Toxicol Pathol, 2000, 28(3): 454-466.

- [3] ICH: S8(Step 4) Immunotoxicity Studies For Human Pharmaceuticals [EB/OL]. (2005-09-15) [2016-10-02]. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S8/Step4/S8_Guideline.pdf.
- [4] 霍 艳, 李 波. 药物免疫毒性评价技术要求的国内外进展 [J]. 中国药理学杂志, 2006, 41(20): 1525-1529.
- [5] Haley P, Perry R, Ennulat D, et al. STP position paper: best practice guideline for the routine pathology evaluation of the immune system [J]. Toxicol Pathol, 2005, 33(3): 404-408.
- [6] Elmore S A. Enhanced histopathology of the immune system: a review and update [J]. Toxicol Pathol, 2012, 40(2): 148-156.
- [7] Wanda M. Haschek, Colin G, et al. Handbook of toxicologic pathology [M]. The second edition. New York: Academic Press, 2002.
- [8] Pearse G. Histopathology of the thymus [J]. Toxicol Pathol, 2006, 34(5): 515-547.
- [9] Pearse G. Normal structure, function and histology of the thymus [J]. Toxicol Pathol, 2006, 34(5): 504-514.
- [10] Cesta M F. Normal structure, function and histology of the spleen [J]. Toxicol Pathol, 2006, 34(5): 455-465.
- [11] 林 志, 李珊珊, 张 嶝, 等. 胸腺在免疫毒性病理学评价中的作用和意义 [J]. 中国新药杂志, 2009, 18(24): 22-25.
- [12] Sahota P S, Popp J A, Jerry F H, et al. Toxicologic Pathology [M]. Florida: CRC Press, 2013, 521-526.
- [13] Sellers R S, Morton D, Michael B, et al. Evaluation of organ weights for rodent and non-rodent toxicity studies: a review of regulatory guidelines and a survey of current practices [J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(5): 751-755.
- [14] 林 志, 李珊珊, 张 嶝, 等. 药物临床前安全性评价中脾脏的作用和意义 [J]. 医学研究杂志, 2010, 39(1): 111-113.
- [15] Baldrick P. Dose site reactions and related findings after vaccine administration in safety studies [J]. J Appl Toxicol, 2016, 36(8): 980-990.
- [16] Cesta M F. Normal structure, function and histology of the spleen [J]. Toxicol Pathol, 2006, 34(5): 455-465.
- [17] Elmore S A. Lymph node histopathology [J]. Toxicol Pathol, 2006, 34(5): 425-454.
- [18] Kovacs M S, Mc Kiernan S, Potter D M, et al. An epidemiological study of interdigital cysts in a research Beagle colony [J]. Contemp Top Lab Animal Sci, 2005, 44(4): 17-21.