

在药物安全性评价中组织学技术流程的探讨

郭景玥, 高广深, 裴天仙, 存庆, 高广深, 胡金芳, 申秀萍, 郭传敏*

天津药物研究院新药评价有限公司, 天津市新药非临床评价技术工程中心, 天津 300301

摘要: 药物安全性评价中毒性病理学评价是最重要的一个步骤, 而毒性病理学评价作为药物安全性评价体系中重要的一环, 用以确定损伤靶器官、靶组织的形态及程度变化, 评价受试药物是否具有毒性并判断其能否推向临床的重要指标。对组织学技术进行质量控制与评估则是确保毒性病理诊断准确性及一致性的重要前提。该文对组织学技术流程进行叙述并探讨流程中相关影响因素。

关键词: 药物安全性评价; 毒性病理; 组织学技术; 人工假象

中图分类号: R965.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2018)08-1554-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.08.033

Discussion on process of histological techniques in evaluation of drug safety

GUO Jingyue, GAO Guangshen, PEI Tianxian, CUN Qing, GAO Guangshen, HU Jinfang, SHEN Xiuping, GUO Chuanmin

Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Assessment Co., Ltd., Tianjin 300301, China

Tianjin Engineering Research Center of Drug Preclinical Assessment Technology, Tianjin 300301, China

Abstract: The evaluation of toxicological pathology is the most important step in the evaluation of drug safety, which is an important part of system in drug safety evaluation. It is used to identify the changes in morphology and degree of target organs and target tissues, to evaluate whether the drugs are toxic and judge they can be enter the clinic or not. The quality control and evaluation of histological techniques is an important prerequisite to ensure the accuracy and consistency of the diagnosis of toxicological pathology. This paper describes the process of histological techniques and discusses the related factors in the process.

Key words: evaluation of drug safety; toxicological pathology; histological techniques; artifact

药物的安全性评价是新药从研发到申报所必须提供的资料内容, 其研究结果直接影响药企对药物后续的临床研究及开发价值的判断; 毒性病理学评价作为药物安全性评价体系中重要的一环, 用以确定损伤靶器官、靶组织的形态及程度变化, 评价受试药物是否具有毒性并判断其能否推向临床的重要指标^[1-2]。对组织学技术进行质量控制与评估是确保毒性病理诊断准确性及一致性的重要前提^[3-5]。本文对组织学技术流程进行叙述并探讨流程中相关影响因素。

1 取材

1.1 标本标记

各病理室都会按照自身条件与需求合理制定送检标本识别方法并给出标本号, 标本号码编制应包括年份、月份、顺序等, 例如采取年份、试验顺序、批次、

动物号及顺序号组合进行排列, 用以保证标本号唯一性、规范性及可识别性, 确保送检标本与标记一致。

1.2 资料准备

在进行动物组织取材前技术人员需要根据剖检时大体病理学检查结果进行取材。通过剖检记录与相应标本进行核检时, 常规大体病理学检查未出现异常或出现相关靶器官、靶组织病变及异常脏器都需按照病理室制定的标准操作规程 (Standard Operating Procedures, SOP) 进行取材, 各病理室需要制定不同给药途径下、常规及异常脏器标本处理 SOPs, 要严格按照相关 SOPs 的程序进行操作, 避免在切修中出现错取、漏取而影响病理诊断。

1.3 标本取材

动物组织取材参照啮齿类动物与非啮齿类动物

收稿日期: 2018-04-04

基金项目: 国家科技重大新药创制项目 (2015ZX09501004); 天津市科技计划项目 (16PTGCCX00090)

第一作者: 郭景玥, 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事毒性病理研究。Tel: (022)84845246 E-mail: guojy@tjipr.com

*通信作者: 郭传敏, 女, 研究员, 主要从事毒性病理方向研究。

标本取材,将取材方式、方法进行合理规范化、标准化。根据美国毒性病理学会(Society of Toxicologic Pathology, STP)推荐组织病理学检查的组织器官并结合国家食品药品监督管理总局(China Food and Drug Administration, CFDA)发布的指导原则^[6-8],对相关脏器组织进行切修并按SOPs规定放置入相应包埋盒中;表1为CFDA推荐的组织病理学推荐需要进行病理检查的组织。切

表1 重复给药毒性试验技术指导原则CFDA推荐的组织病理学检查组织列表(适用于所有物种)

Table 1 CFDA-recommended list of tissues to be examined histopathologically in guidelines of repeat-dose toxicity test technique (for all species where applicable)

脏器	脏器
心脏	唾液腺
主动脉	淋巴结(给药途径相关)
肺脏(附主支气管)	淋巴结(较远距离)
肝脏	坐骨神经
肾脏	骨骼肌
肾上腺	皮肤
脑(大脑、小脑、脑干)	脊髓(3个部位:颈椎、中段胸椎、腰椎)
垂体	阴道
胸腺(或胸腺区域)	骨(股骨)
甲状腺(含甲状旁腺)	骨髓(胸骨)
脾脏	睾丸
胃	附睾
胰腺	前列腺
十二指肠	精囊(如果有)
空肠	子宫
回肠	子宫颈
盲肠	乳腺
结肠	卵巢
直肠	输卵管
食管	所有大体观察到异常的组织
胆囊(如果有)	组织肿块
膀胱	给药部位
眼	
哈氏腺(如果有)	

修的组织块厚薄需均匀,一般以0.2~0.4 cm为宜。脏器过小的组织如啮齿类动物的肾上腺、脑垂体以及较容易发脆的组织如甲状腺、肝脏、淋巴结等,切修时可适当稍厚一些;而对脂肪组织、皮肤组织

等切修可稍微薄些,以保证组织脱水一致性。对异常的组织可采取矢状面、冠状面、横断面进行切修。

2 组织处理

2.1 脱水

组织处理过程第一步是从切修后组织中除去非结合水及水溶性固定剂。脱水试剂具有亲水性,因其水分子可以和极性基团相互作用。脱水应缓慢地进行,脱水剂初始浓度不宜过大,如组织内液体浓度与组织外液体浓度梯度差过高,会导致细胞变形,造成过度脱水或者不完全脱水;过度脱水会使组织变硬、变脆并产生皱缩现象;不完全脱水会导致组织变软,透明剂无法浸入^[9-11]。常规脱水剂使用乙醇作为介质,一般先浸入70%的乙醇,随后再依次梯度增高;对于柔软的组织,一般建议先浸入30%的乙醇,用以保证组织不会过度脱水。

苯酚具有软化硬组织的作用,所以在对致密纤维组织、肌腱、角质块进行脱水时,可以在95%的乙醇中添加适量4%的苯酚以起到软化效果。其他实验室可能会使用工业用甲基化酒精、甲醇、2-丙醇/异丙醇、丁醇等脱水试剂,它们与乙醇的使用方法是一致的。

2.2 透明

透明剂为碳氢化合物,起到调节脱水剂与渗透剂的作用,它作为两者之间的介质,可以很好的与这两种试剂相溶。常规使用的透明剂多为二甲苯、甲苯及氯仿。甲苯与二甲苯相似,但长时间浸泡甲苯对组织的损伤更小,但它比二甲苯更容易挥发;氯仿常用于处理中枢神经系统的组织。由于透明剂渗透率较高,延长透明时间会使组织变脆,所以应在确保切修不同密度的组织厚度合理的前体下制定透明时间,确保组织能够充分透明^[12]。

2.3 浸蜡及包埋

石蜡适用于多种用途,是由石油裂解产生的长链烃混合物。在病理实验室,石蜡是最常用的渗透剂和包埋剂。作为渗透剂使用时需注意其良好的溶解性能可使透明剂例如二甲苯含量逐渐升高,容易使组织变脆,所以应及时更换渗透剂。作为包埋剂使用时可以在操作中对石蜡进行快速冷却,包埋时快速冷却可以使石蜡形成小的结晶结构,减少组织在切片过程中造成人工假象^[13-15]。包埋过程中应参照组织切修记录,确保组织及异常损伤部位均置于石蜡包埋盒相应位置中。组织包埋应遵循各实验室SOPs,按大小或硬度合理分配位置并按定向包埋,

例如按纤维平行走向,组织定向包埋有利于减少切片时的阻力。

3 组织切片

组织切片术是将组织切成薄片,并在显微镜下进行镜检的一种方法。切片机一般有多种类型,例如轮转式、滑道式等,不同仪器各有其优缺点,技术人员应根据实验室需求及自己的适应条件合理选择切片机。技术室一般都会使用一次性刀片,需要注意的是如果刀片在夹卡装置上安置过紧,无论哪种切片机都会导致部分组织出现人工假象。切片由于机器类型的不同方法不尽相同,但需要注意冷却过的蜡块在室温中会有一定的膨胀,粗修与切片时间稍久会导致实际切片稍厚于机器设定的厚度。

干燥箱在进行烤片时应将温度设定在石蜡的熔点左右。如果太热常会导致细胞变形,出现核固缩或核内空泡,有时甚至会破坏核的细微结构^[16-17]。而当对干燥易碎或者神经组织进行烤片时,为防止组织开裂推荐 37℃ 干燥 24 h。

4 组织染色

目前病理实验室通常应用苏木素伊红染色(Hematoxylin And Eosin, HE)。苏木素将细胞核染成蓝黑色,伊红将细胞质及结缔组织纤维染成橘红或鲜红色。绝大多数实验室都是通过采购市售 HE 染色剂并取得良好效果,但仍需要了解苏木素伊红染色原理以便在常规染色过程中出现问题时可以想出应对办法。

苏木素是苏木树的提取物,其氧化物苏木红是一种天然染料;由于其属于阴离子,亲和力较弱,所以通常需要添加阳离子试剂使其具有可结合性^[18-19]。通过添加不同的媒介物使得苏木素有多种不同的使用方法,常用的有 Ehrlich 苏木素、Mayer 苏木素、Harris 苏木素等。还有一些例如 Cole 苏木素、Carazzi 苏木素、Gill 苏木素等非常用试剂。

Ehrlich 苏木素、Mayer 苏木素及 Harris 苏木素都含有不同量的钾明矾或铵明矾,再通过添加其他化合物形成,例如 Ehrlich 苏木素含有冰醋酸、甘油及无水酒精, Mayer 苏木素含有水合氯醛、柠檬酸及碘酸钠, Harris 苏木素含有碘酸钠及氧化汞等。由于成分不同所以染色时间、以及染色针对性各有不同, Ehrlich 苏木素可以处理一些组织经酸处理过的切片; Mayer 苏木素不需要分化,可用于糖原染色以及一些其他染色技术中细胞核的复染色; Harris 苏木素可用于表皮脱落细胞的染色^[20-21]。在目前众

多改良苏木素中,也有试剂公司通过研究添加不同复合成分使苏木素不需要反蓝及分化就可以达到很好的染色效果。

伊红染料与苏木素配合使用,染色后自来水的冲洗和酒精脱色都可以起到分化作用,使其能够使不同类型胞浆和纤维结缔组织等染成深浅不一的红色^[22-23]。

HE 染色受试剂、病理室环境及温湿度影响较大^[24],同一厂家的不同批次染料都可能呈现出不同染色效果,染色是整个技术工作能否全部完成最后关键步骤,技术人员要根据实际情况设定不同染色时间及染色方法来保证染色质量。

5 总结

组织学技术是组织病理学的基础,在处理组织切片中任何一个步骤都是需要严谨的,取材的厚度、切修及范围,脱水中对不同组织脱水时间进行控制以防止过脱或不完全脱,包埋定向以及切片技术,染色控制等^[3,25]。处理过程中每一步都可以影响切片的质量,染色的效果,出现人工假象会影响最后的毒性病理诊断,而人工假象在不同领域都会造成负面影响^[26]。在药物安全性评价中病理诊断极为重要,要尽可能减少任何能潜在影响病理诊断的因素。技术人员要严格遵守 SOPs,对出现的问题及时总结归纳,优化 SOPs 操作,保证各条件下仪器的最佳使用状态,使病理制片整个技术流程能够科学有序得到开展,各分步技术操作既能独立完成又能有效与其它部分紧密协作,保证切片一致性、完整性。

本文主要对毒性病理中组织学技术部分进行简述并简要探讨在操作过程中需要注意的问题,组织学技术大都依靠实际经验,文章更多的进行理论引导以希望技术人员能够建立各自病理实验室技术体系,逐步建立以技术体系为标准的管理制度,实现技术室由经验型管理传统向科学管理型转变。

参考文献

- [1] 董延生. 药物安全性评价毒性病理平台的规范化建设与实践 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2012.
- [2] 王和枚, 董延生, 韩 刚, 等. GLP 条件下毒性病理学的规范化建设与实践 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013(3): 455-456.
- [3] 英 永, 王韶艳, 屈卉锦, 等. 浅谈药物安全性评价中病理技术质量控制与评估 [J]. 药学研究, 2011, 30(4): 234-235.
- [4] Wallace Hayes A, Kruger C L. Hayes' Principles and

- Methods of Toxicology [M]. 6th ed. Boca Raton: CRC Press. 2014: 572-593.
- [5] Kim Y M, Paik S G. Induction of expression of inducible nitric oxide synthase by Taxol in murine macrophage cells [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 326(2): 410-416.
- [6] Bregman C L, Adler R R, Morton D G, et al. Recommended tissue list for histopathologic examination in repeat-dose toxicity and carcinogenicity studies: a proposal of the Society of Toxicologic Pathology (STP) [J]. Toxicol Pathol, 2003, 31(2): 252-253.
- [7] 胡春燕. FDA、OECD 及 CFDA 指导原则关于药物临床前毒理病理学研究的要求[C]// 中国毒理学会毒理学专业委员会会员代表大会会议. 2015.
- [8] 药物重复给药毒性研究技术指导原则 [S]. 国家食品药品监督管理总局, 2014.
- [9] 赵阿红, 宋一民, 尹玉慧, 等. 病理组织脱水的质量控制与管理 [J]. 医疗卫生装备, 2009, 30(3): 111-112.
- [10] Stowell R E. Effect on tissue volume of various methods of fixation, dehydration, and embedding [J]. Stain Technol, 2009, 16(2): 67-83.
- [11] 刘 瑾, 袁怀志. 自动组织脱水机乙醇浓度变化对组织脱水的影响及采取对策的探讨 [J]. 重庆医学, 2017, 46(6): 829-831.
- [12] Luna L G. Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts [J] Histopathologic Methods and Color Atlas of Special Stains and Tissue Artifacts, 1992.
- [13] Goldberg M S, Wetherington S J, Susa J S, et al. Characterization of tissue and slide artifacts from automated embedding systems [J]. Am J Dermatopathol, 2015, 37(11): 846-849.
- [14] 屈 哲, 林 志, 吕建军, 等. 影响药物毒性神经病理学评价质量的主要因素 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(9): 1348-1354.
- [15] 郑 翔, 毕文杰. 以四氢呋喃为脱水剂的石蜡显微制片经验及优势分析 [J]. 解剖学杂志, 2014, 37(4): 560-562.
- [16] Carson F L. Histotechnology: a self-instructional text [M]. 1990.
- [17] Jones M L. Histotechnology: A self instructional text [J]. J Histotechnol, 2015(3): 97.
- [18] Feldman A T, Dapson R W. The Chemistry of Fixation and Staining: I. Basic Concepts [J]. J Histotechnol, 2013, 3(4): 132-135.
- [19] Nancy. 苏木素的种类及其配制法、伊红染液的配制法-常规石蜡切片制作 [EB/OL]. (2010-08-09)[2018-03-04] http://www.microimage.com.cn/xwjs/2010/0809/article_4995.html.
- [20] Akita M, Kaneko K. An improved alum hematoxylin method with application of Mayer's hemalum for staining of elastic fibers [J]. Stain Technology, 1981, 56(5): 327-328.
- [21] Rastogi V. Comparison of Alum Hematoxylin - Harri's, Mayer's and Ehrlich [M]. LAP LAMBERT Academic Publishing, 2012.
- [22] 章克萍, 龙 飞, 周 莹. 组织染色剂伊红 Y 的化学性质及改良配制法探讨 [J]. 南昌大学学报: 医学版, 2007, 47(1): 92.
- [23] 王 伯. 病理学技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000.
- [24] 马 峰, 刘仲祥. 病理技术 HE 染色用于病理诊断中的价值分析 [J]. 中国实验诊断学, 2015(12): 2103-2104.
- [25] 梁英杰. 临床病理学技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2011.
- [26] 高 颖, 吕艳萍. 病理技术质量控制常见的问题与方法对策研究 [J]. 中国医药指南, 2013(27): 583-584.