

大鼠中不可推论到人的5种毒性病理改变

周 飞^{1*}, 黄暨生¹, 王浩安², 郭秋平¹

1. 广州医药研究总院有限公司药物非临床评价研究中心, 广东 广州 510240

2. 成都华西海圻医药科技有限公司, 四川 成都 610041

摘要: 在药物临床前研究中, 动物毒理试验获得的结果可以指导临床研究, 为临床试验中可能出现的毒性反应提供预测。由于不同种属间存在一定差异, 所以不是所有毒性反应都可以推论到人。简述了大鼠中不可推论到人的5种毒性病理改变: 肝细胞肥大协同甲状腺腺泡细胞肥大或增生、 α 2u-球蛋白肾病、胰岛纤维化、苯巴比妥诱导的肝脏肿瘤、睾丸间质细胞肿瘤, 为临床前安全性评价毒性病理改变的解析及对临床试验毒性反应的预测提供参考。

关键词: 大鼠; 毒理试验; 种属差异; 毒性病理; 临床前安全性评价

中图分类号: R944.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2020) 03-0554-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.03.036

Five negative human-translated rodent specific pathogenesis in toxicological pathology

ZHOU Fei¹, HUANG Jisheng¹, WANG Haoan², GUO Qiuping¹

1. Drug Non-clinical Evaluation Center of Guangzhou Institute of Pharmaceutical Industry, Guangzhou General Pharmaceutical Research Institute, Guangzhou 510240, China

2. West China Frontier Pharma Technology, Chengdu 610041, China

Abstract: The results of pre-clinical study can be guidance of the clinical study and applied for adverse predicting. But not all the results can be translated to human due to the species differences. Here we introduce five rat-specific histo-toxicologic findings, such as: hypertrophy of hepatocyte associated with hypertrophy or hyperplasia of thyroid follicle cells, α 2u-globulin nephropathy, fibrosis of pancreas islet, liver tumor induced by phenobarbital, Leydig cell tumor of testis, which can not be translated to human and for providing reference for explanation of histo-toxicologic finding and the prediction of the clinical study.

Key words: rat; toxicological study; species difference; toxicological pathology; pre-clinical safety evaluation

药物非临床研究获得的结果可以指导药物临床研究, 为临床试验可能出现的毒性反应提供预测, 而这种模式的基础是动物出现的毒性反应可以映射出临床用药后人可能会出现同样的反应。啮齿类动物作为毒理试验、致癌试验、人类疾病模型等研究的主要实验系统, 已被广泛应用于生物医药研究^[1]。大多数通过大小鼠毒理试验获得的化学危害信息及研究结果可以应用到相关临床研究中^[2], 但由于不同种属间存在着一定的差异, 所以不是所有动物试验获得的结果都可以推论到临床研究。

1962年Litchfield^[3]首先研究了药物在动物试验中引起的毒性反应及其在临床试验中引起毒性反

应的对应性, 通过统计6类不同药物在大鼠、狗、人体中引起的毒性反应发现, 仅出现于大鼠的药物毒性反应在临床试验中发生同样反应的概率最低, 仅出现于狗的毒性反应在临床试验中发生同样反应的概率次之, 同时出现于大鼠和狗的毒性反应在临床试验中发生同样反应的概率最高。而Olson等^[4]通过调查12家药企150余种化合物的数据后也发现, 啮齿类和非啮齿类动物中都出现的毒性反应与人毒性反应的一致率为71%, 仅非啮齿类动物中出现的毒性反应与人毒性反应的一致率为63%, 而仅啮齿类动物中出现的毒性反应与人毒性反应的一致率为43%。Rozenzweig等^[5]认为毒性预

收稿日期: 2019-10-05

基金项目: 国家科技重大专项重大新药创制(2018ZX09721004-001-003)

*通信作者: 周 飞(1987—), 男, 工程师, 研究方向为 毒性病理。E-mail: feika110@hotmail.com

测试中,犬对胃肠道毒性的预测比较好,而犬、猴对肾脏和肝脏毒性可能存在过度预测的倾向。尽管在各种属动物毒理试验中肝毒性反应的发生率很高,但其对临床试验肝毒性的预测率却不高。

药物安全评价中,动物出现了过多或严重的不良反应可能会对该药物是否进入临床试验起着直接的影响。如果动物试验中出现的不良反应为动物种系所特有的改变,而不能推论到人上,则对于该药物来说是个好的消息。由于一个未知的种属特有的毒性反应而被终止开发的好药,对人来说是一个巨大的损失。所以知晓非临床药物评价试验中出现的毒性改变是否为种属所特有的非常重要。本文通过简述5种大鼠特有的、不能推论到人的毒性病理改变,为临床前安全性评价中毒性病理改变的解析及对临床试验毒性反应的预测提供参考。

1 肝细胞肥大协同甲状腺腺泡细胞肥大或增生

苯巴比妥^[6-12]、N-乙烯基吡咯烷酮二聚体^[6]、非核苷逆转录酶抑制剂^[7]、白三烯拮抗剂^[8]、辛伐他汀^[8]等很多药物及化合物都能引起大鼠肝细胞肥大协同甲状腺上皮细胞肥大或增生,但未见引起人及其他种属动物出现相应改变。研究表明,大鼠出现以上改变的机理为药物或化合物引起大鼠肝细胞内质网增生,药物代谢酶(drug metabolizing enzyme, DME)表达上调,肝细胞肥大、功能增强,使主要通过肝细胞代谢分解的循环甲状腺激素(T3、T4)清除率升高;其次,啮齿类动物缺乏与T4结合能延长其半衰期的球蛋白(Thyroxine binding globulin, TBG)故大鼠甲状腺激素半衰期相比于其他种属而言非常短,所以因循环血液中的甲状腺激素的降低反馈引起下丘脑促甲状腺素释放激素(thyrotropin-releasing hormone, TRH)及垂体促甲状腺激素(thyroid-stimulating hormone, TSH)上调,引发甲状腺腺泡细胞肥大或增生^[6-14]。因此大鼠长期给予上述药物可导致肝细胞肥大并引起甲状腺上皮细胞肥大/增生及肿瘤的产生,当以上药物加大剂量用于狗或猴时,均未见DME引起的T3、T4、TSH及甲状腺肥大或增生的改变,同时以上药物于临床使用中,也未见引起人的TSH升高,故可能不存在甲状腺肿瘤发生的风险。这个经典的毒性作用被认为是大鼠所特有的,且存在明显的性别差异,以雄性大鼠更敏感,而人及其他种属动物不会出现相应的病理改变^[6-14]。

2 α 2u-球蛋白肾病

石蜡、十氢化萘、柠檬烯、异佛尔酮等药物或化

合物可引起大鼠 α 2u-球蛋白肾病或肾脏肿瘤的发生,但未见引起人及其他种属动物肾脏有相应改变^[15-16]。 α 2u-球蛋白是雄性成年大鼠肝脏合成的特有的低分子蛋白,成年大鼠每天经肾脏滤过50 mg α 2u-球蛋白,其中40%由尿液排出,60%被重吸收分解^[17-18]。相比于其他滤过的蛋白而言, α 2u-球蛋白最难分解,一旦其吸收与分解的平衡被打破最易于肾小管上皮细胞中蓄积。以上药物或化合物可以通过非共价键的形式与之相结合,增大其在肾小管上皮细胞中降解难度,从而聚集于细胞中,表现为球形或多角形的均质嗜伊红小体,称为透明小滴^[15-18]。透明小滴持续在肾小管上皮细胞内蓄积,进而导致以肾小管上皮细胞变性坏死,肾小管再生,肾间质炎症及纤维化改变为特征的 α 2u-球蛋白肾病,甚则可引发肾脏肿瘤的发生^[15]。 α 2u-球蛋白为雄性成年大鼠特有,雌性大鼠、人及其他种属动物均未见该蛋白,所以由 α 2u-球蛋白引起的肾脏病理改变、肿瘤不会出现在雌性大鼠、人及其他种属动物^[15-18]。

3 大鼠胰岛纤维化

许多药物,如二甲磺酸丁酯(Busulfan)、凝血因子Xa抑制剂利伐沙班(Rivaroxaban)、脾酪氨酸激酶抑制剂、Bruton's 酪氨酸激酶抑制剂等能引起大鼠药物相关性胰岛纤维化或大鼠自发性胰岛纤维化发生率及程度升高;而以上药物应用到人及其他种属动物,如狗或猴,胰岛均未见有相应的病理改变^[19]。胰岛纤维化是老龄大鼠常见的自发性改变,表现为胰岛毛细血管出血,胰岛周边色素沉着,胰岛中有大量的纤维组织增生,并且随着年龄的增长,病变发生率逐渐升高,其中雄性发生率高于雌性^[19-23]。目前对大鼠自发性或药物相关胰岛纤维化未见定论,但主要学说中以大鼠胰岛血供的独特解剖结构学说较具说服力。在大多数哺乳动物中,胰腺的主要血液供应为血液进入胰腺后先直接供应胰岛,出胰岛后通过腺泡门脉系统扩散到周边外分泌部;然而在大鼠中,血液进入胰腺后一分为二,分别通过两条不同的血管供应外分泌部和胰岛,最终于胰岛周边的腺泡门脉系统汇合^[24]。因此很多学者认为以上药物引起的大鼠胰岛纤维化为大鼠特有的,不会引起人及其他种属动物出现此改变^[19-24]。

4 苯巴比妥诱导的大鼠肝脏肿瘤

苯巴比妥是一种巴比妥类药物,主要作用于中枢神经系统,适应于治疗失眠、手术前麻醉、紧急癫痫控制等^[25]。研究表明,苯巴比妥可以诱导大鼠肝

细胞增生甚至肿瘤的发生^[26]。其诱导大鼠肝脏肿瘤的机制与激活肝细胞中组成性雄烷受体(constitutive androstane receptor, CAR)有关,主要过程包括:CAR激活,增加肝细胞DNA复制和合成,诱导细胞色素P450 CYP2B亚家族酶系、肝细胞肥大、肝细胞变异灶增加和肝细胞腺瘤或癌^[27]。然而,流行病学研究并没有在人类中发现苯巴比妥诱导肝脏肿瘤的证据^[26],这是由于人类肝细胞对苯巴比妥和其他CAR活化剂类药物的促有丝分裂作用无反应,因此未在人类肝细胞发现类似刺激大鼠肝细胞DNA复制的作用,人类长时间使用苯巴比妥和其他CAR活化剂类药物不会增加患肝脏肿瘤的风险^[28]。

5 大鼠睾丸间质细胞肿瘤

研究表明雌激素激动剂、促性腺激素释放激素激动剂,多巴胺受体激动剂及过氧化物酶体增生物激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor α , PPAR- α)激动剂等能诱导大鼠睾丸间质细胞肿瘤的发生,然而大鼠睾丸间质细胞肿瘤与人睾丸肿瘤的发生并没有生物学关联^[1,29-31]。文献将其原因概括为以下几点差异性^[1]:(1)血清蛋白的差异性:大鼠缺乏与性激素相结合的球蛋白,该蛋白可在人肝脏中合成,主要与睾酮相结合,从而降低了睾酮的代谢及清除率,对短期睾酮的变化起缓冲作用;(2)对人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, hCG)的反应不同:对hCG的研究发现,大鼠对hCG反应为睾丸间质细胞增生,而人则表现为肥大,再则大鼠因hCG而分泌的雄激素及有丝分裂的反应要比人高出100多倍;(3)睾丸间质细胞上受体种类及数量的不同:大鼠睾丸间质细胞黄体激素(luteinizing hormone, LH)受体是人的10倍,每个间质细胞上的促黄体激素释放激素受体是人的14倍以上,其中促性腺素释放激素(gonadotropin releasing hormone, GnRH)受体为大鼠特有的而人没有;(4)对催乳素的敏感性不同:大鼠睾丸间质细胞对催乳素更敏感,而人睾丸间质细胞不表达催乳素受体;(5)随年龄升高LH的分泌不同:随着年龄的增长大鼠LH会分泌减少,而男性LH的分泌则没有变化。此外睾丸间质细胞肿瘤发生率差异很大:F344大鼠睾丸间质细胞肿瘤发生率比人高190万倍,SD大鼠则比人高13万倍^[27]。基于以上大鼠与人之间的种属差异,大多学者认为以上药物引起大鼠睾丸间质细胞肿瘤的结果对其临床研究的贡献不大^[1,14,29-31]。

除上述5类大鼠特有的病理改变或过程外,溴隐亭(多巴胺激动剂)可引起大鼠内分泌紊乱导致子宫内膜异位癌的发生,而不会引起女性类似的内分泌紊乱,故不会导致人出现类似的改变^[14]。大鼠胆管纤维化及进行性心肌病也被报道为大鼠特有的病理改变^[32-33]。大鼠特有的病理改变通常被认为是不可推论到人的,故在临床前安全性评价研究对临床试验毒性反应的预测需考虑大鼠特有的病理改变,这对于相关研究结果的解释及对临床研究结果的预测具有决定性作用。

6 结语

药物临床前研究是采用动物对药物的安全性进行评价,其获得的结果,可以指导药物临床研究,为临床试验可能出现的毒性反应提供预测,而这种模式的基础是动物出现的毒性反应可以映射出临床用药后人可能会出现同样的反应。但研究表明,因不同种属间存在着一定差异,所以不是所有动物试验获得的结果都可以推论到人。文中列举了大鼠肝细胞肥大协同甲状腺腺泡细胞肥大或增生、 α 2u-球蛋白肾病、胰岛纤维化、苯巴比妥诱导的肝脏肿瘤、睾丸间质细胞肿瘤的5中特有的病理改变均为先在大量药物临床前研究毒性试验中观察发现,然后再进行机制研究。通过现象与机制的结合,分析得出不同种属间生理及分子水平上存在的差异,而该差异导致了药物研究结果的不同。所以在分析特定种属药物试验结果时一定要考虑到不同种属的差异性,从而做出准确的预测。希望今后会有更多动物毒性反应与人关联性的统计分析,发现更多种属特异性毒性反应及其机理,为临床研究中可能出现的毒性反应做出更好的预测。

参考文献

- [1] Steinbach T J, Maronpot R R, Hardisty J F. *Hamilton & Hardy's Industrial Toxicology* [M]. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2015: 1189-1196.
- [2] Hard G C, Rodgers I S, Baetcke K P, et al. Hazard evaluation of chemicals that cause accumulation of alpha 2u-globulin, hyaline droplet nephropathy, and tubule neoplasia in the kidneys of male rats [J]. *Environ Health Perspect*, 1993, 99: 313-349. Doi: 10.1289/ehp.9399313.
- [3] Litchfield J T, John T. Part XVI. Evaluation of the safety of new drugs by means of tests in animals [J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1962, 3(5): 665-672.
- [4] Olson H, Betton G, Robinson D, et al. Concordance of the Toxicity of Pharmaceuticals in Humans and in Animals [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2000, 32(1):

- 56-67.
- [5] Rozenzweig M, Hoff D D V, Staquet M J, et al. Animal toxicology for early clinical trials with anticancer agents [J]. *Cancer Clin Trials*, 1981, 4(1): 21-28.
- [6] Yang Y, Ciurlionis R, Kowalkowski K, et al. *N*-vinylpyrrolidone dimer, a novel formulation excipient, causes hepatic and thyroid hypertrophy through the induction of hepatic microsomal enzymes in rats [J]. *Toxicol Lett*, 2012, 208(1): 82-91.
- [7] Zabka T S, Fielden M R, Garrido R, et al. Characterization of xenobiotic-induced hepatocellular enzyme induction in rats: anticipated thyroid effects and unique pituitary gland findings [J]. *Toxicol Pathol*, 2011, 39(4): 664-677.
- [8] Smith P F, Grossman S J, Gerson R J, et al. Studies on the mechanism of simvastatin-induced thyroid hypertrophy and follicular cell adenoma in the rat [J]. *Toxicol Pathol*, 1991, 19(3): 197-205.
- [9] Lees J F, Alexander W D, Lewis M, et al. Role of TSH in the changes in thyroidal metabolism of [³⁵S] methimazole in phenobarbital and thyroxine-treated rats [J]. *Endocrinology*, 1977, 100(3): 765-769.
- [10] Comer C P, Chengelis C P, Levin S, et al. Changes in thyroidal function and liver UDPglucuronosyltransferase activity in rats following administration of a novel imidazole (SC-37211) [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1985, 80(3): 427-436.
- [11] Oppenheimer J H, Bernstein G, Surks M I. Increased thyroxine turnover and thyroidal function after stimulation of hepatocellular binding of thyroxine by phenobarbital [J]. *J Clin Invest*, 1968, 47(6): 1399-1406.
- [12] Johnson S, McKillop D, Miller J, et al. The effects on rat thyroid function of an hepatic microsomal enzyme inducer [J]. *Hum Exp Toxicol*, 1993, 12(2): 153-158.
- [13] Maronpot R R, Yoshizawa K, Nyska A, et al. Hepatic enzyme induction: histopathology [J]. *Toxicol Pathol*, 2010, 38(5): 776-795.
- [14] Alison R H, Capen C C, Prentice D E. Neoplastic Lesions of questionable significance to humans [J]. *Toxicol Pathol*, 1994, 22(2): 179-186.
- [15] Hard G C, Rodgers I S, Baetcke K P, et al. Hazard evaluation of chemicals that cause accumulation of α 2 u-globulin, hyaline droplet nephropathy, and tubule neoplasia in the kidneys of male rats [J]. *Environ Health Perspect*, 1993, 99(1): 313-349.
- [16] Jacobsen B, Freichel C, Eichinger-Chapelon A, et al. Drug-induced obstructive and retrograde nephropathy associated with α 2u-globulin in male rats [J]. *Toxicol Pathol*, 2019, 47(2): 138-149.
- [17] Hamamura M, Oshikata T, Katoku K, et al. Two types of deposits, hyaline droplets and eosinophilic bodies, associated with α 2u-globulin accumulation in the rat kidney [J]. *J Toxicol Pathol*, 2017, 30(4): 275-282.
- [18] Neuhaus O W, Flory W, Biswas N, et al. Urinary excretion of α 2u-globulin and albumin by adult male rats following treatment with nephrotoxic agents [J]. *Nephron*, 1981, 28(3): 133-140.
- [19] 周 飞, 王浩安. 大鼠自发性及药物相关性胰岛纤维化研究进展 [J]. *实验动物与比较医学*, 2019, 39(3): 249-252.
- [20] Kaduk B, Husslein E M, Siegfried A. Morphology of the chronic toxicity of busulfan on the islets of Langerhans in the rat [J]. *Hepatogastroenterology*, 1987, 34(3): 108-112.
- [21] FDA. Harlow P P. Pharmacology review(s) (Application Number: 202439Orig1s000) [EB/OL]. (2011-02-04) [2019-05-01]. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/202439Orig1s000PharmR.pdf.
- [22] Long A J, Sampson E, McCarthy R W, et al. Syk inhibition induces platelet dependent peri-islet hemorrhage in the rat pancreas [J]. *Toxicol Pathol*, 2016, 44(7): 998-1012.
- [23] Erickson R I, Schutt L K, Tarrant J M, et al. Bruton's tyrosine kinase small molecule inhibitors induce a distinct pancreatic toxicity in rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2017, 360(1): 226-238.
- [24] Brennenman K A, Ramaiah S K, Rohde C M, et al. Mechanistic investigations of test article-induced pancreatic toxicity at the endocrine-exocrine interface in the rat [J]. *Toxicol Pathol*, 2014, 42(1): 229-242.
- [25] Abou Khaled K J, Hirsch L J. Updates in the management of seizures and status epilepticus in critically ill patients [J]. *Neurol Clin*, 2008, 26(2): 385-408.
- [26] Braeuning A. Liver cell proliferation and tumor promotion by phenobarbital: relevance for humans? [J]. *Arch Toxicol*, 2014, 88(10): 1771-1772.
- [27] Elcombe C R, Peffer R C, Wolf D C, et al. Mode of action and human relevance analysis for nuclear receptor-mediated liver toxicity: a case study with phenobarbital as a model constitutive androstane receptor (CAR) activator [J]. *Crit Rev Toxicol*, 2014, 44(1): 64-82.
- [28] Lake B G. Human relevance of rodent liver tumour formation by constitutive androstane receptor (CAR) activators [J]. *Toxicol Res (Camb)*, 2018, 7(4): 697-717.
- [29] Prentice D E, Meikle A W. A review of drug-induced Leydig cell hyperplasia and neoplasia in the rat and some comparisons with man [J]. *Hum Exp Toxicol*, 1995, 14(7): 562-572.

- [30] Cook J C, Klinefelter G R, Hardisty J F, et al. Rodent leydig cell tumorigenesis: a review of the physiology, pathology, mechanisms, and relevance to humans [J]. *Crit Rev Toxicol*, 1999, 29(2): 169-261.
- [31] Klaunig J E, Babich M A, Baetcke K P, et al. PPAR α agonist-induced rodent tumors: modes of action and human relevance [J]. *Crit Rev Toxicol*, 2003, 33(6): 655-780.
- [32] Gopinath C, Mowat V. Toxicologic pathology forum*: opinion on designation of adverse and nonadverse histopathological findings in toxicity studies: the pathologist's dilemma [J]. *Toxicol Pathol*, 2019, 47(5): 564-573.
- [33] 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(7 Suppl): 5S-81S.