

## 溃疡性结肠炎非临床药效学模型及其在新药研究中的应用建议

周植星<sup>#</sup>, 陈美灵<sup>#</sup>, 崔 岚, 张晓东<sup>\*</sup>

国家药品监督管理局 药品审评中心, 北京 100022

**摘要:** 溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种反复发作的慢性非特异性炎症疾病。由于UC病因复杂, 发病环节多, 治愈难度大, 复发率高, 预后较差且增加患结肠癌的风险而被世界卫生组织列为现代难治疾病之一。UC临床常用的治疗方法是药物治疗, 氨基水杨酸类和糖皮质激素类药物是UC活动期治疗的首选药物, 免疫抑制剂通常用于重症难治性UC的治疗。近年来, UC治疗药物临床试验申请 (IND) 呈现上升趋势。非临床药效学试验是支持药物进入II期探索性临床试验的重要依据, 而动物模型是非临床药效学研究的关键因素。目前UC非临床研究模型比较成熟, 近年来随着转基因 (transgenic, Tg) 和基因敲除 (knock out, KO) 技术的发展, 可以选择使用各种UC动物模型解决与UC相关的特定病理生理问题, 并对特定成分/途径相关的候选药物进行非临床药效学评价。本文对目前UC非临床药效学模型种类、潜在的病理生理学基础进行综述, 并根据各模型特点对其在新药研发中的应用提出一些建议, 以期UC药物非临床药效学评价以及UC治疗药物的研发提供参考。

**关键词:** 溃疡性结肠炎; 药效学; 动物模型; 非临床药效学评价; 转基因; 基因敲除

中图分类号: R975 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 05-1010-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.05.027

## Nonclinical pharmacodynamic model of ulcerative colitis and its application suggestions in new drug research

ZHOU Zhixing, CHEN Meiling, CUI Lan, ZHANG Xiaodong

Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100022, China

**Abstract:** Ulcerative colitis (UC) is an idiopathic chronic relapsing-remitting inflammatory disease. Owing to its etiological complexity, onset variability, curable difficulty, high recurrence rate, poor prognosis and increasing risk of colon cancer, UC has been listed as one of the most formidable diseases by the World Health Organization. Drug treatment is the conventional method for UC, aminosalicylates and glucocorticoids are the first choice to treat active UC. Immunosuppressants are mostly used in severe refractory UC. In recent years, the investigational new drug (IND) of UC therapeutic drugs has shown an upward trend. Nonclinical pharmacodynamic test is an important basis to support the entry of drugs into phase II exploratory clinical trial, and animal model is the key factor of nonclinical pharmacodynamic research. At present, the nonclinical research model of UC is relatively mature. In recent years, with the development of transgenic (Tg) and gene knockout (KO) technology, we can choose to use various UC animal models to solve specific pathophysiological problems related to UC, and evaluate the nonclinical pharmacodynamics of candidate drugs related to specific components/pathways. This paper reviews the types of nonclinical pharmacodynamic models and potential pathophysiological basis of UC, and puts forward some suggestions on their application in new drug research and development according to the characteristics of each model, in order to provide reference for the nonclinical pharmacodynamic evaluation of UC drugs and the research and development of UC therapeutic drugs.

**Key words:** ulcerative colitis; pharmacodynamics; animal model; nonclinical pharmacodynamic evaluation; transgene; gene knockout

溃疡性结肠炎 (ulcerative colitis, UC) 是一种反复发作的慢性非特异性炎症疾病, 病变主要局限于

大肠黏膜及黏膜下层, 呈连续性弥漫性分布。病变大多自直肠开始, 呈逆行性发展, 累及直肠和乙状

收稿日期: 2022-02-02

<sup>#</sup>共同第一作者: 周植星, 博士, 副研究员, 主要从事新药药理毒理审评工作。E-mail: zhouzhx@cde.org.cn

陈美灵, 主管药师, 主要从事新药药理毒理审评工作。E-mail: chenml@cde.org.cn

<sup>\*</sup>通信作者: 张晓东, 博士, 主任药师, 主要从事新药药理毒理审评工作。Tel: (010)85243167 E-mail: zhangxd@cde.org.cn

结肠多见。主要临床表现为腹泻、腹痛、黏液脓血便及里急后重。其病理表现为黏膜及黏膜下层炎细胞浸润、形成多发性溃疡,与结肠癌的发生有一定关联<sup>[1]</sup>。因其病因复杂,发病环节多,治愈难度大,复发率高,预后较差且增加患结肠癌的风险而被世界卫生组织列为现代难治疾病之一。临床常用的治疗方法是药物治疗,氨基水杨酸类和糖皮质激素类药物是UC活动期治疗的首选药物,对于重症难治性UC通常选择免疫抑制剂治疗。目前对于重症难治性UC治疗药物有限,且存在不良反应多,存在较大的未被满足的临床需求,因此UC治疗药物的研发是当前新药研究的热点之一。非临床药效学试验是支持药物进入II期探索性临床试验的重要依据,而动物模型是非临床药效学研究的关键因素。

UC发病的病因复杂,涉及遗传、微生物、环境和其他未知因素。UC动物模型可通过化学刺激物或细菌感染诱发。近年来随着转基因(transgenic, Tg)和基因敲除(knock out, KO)技术的发展,可以选择使用各种UC动物模型解决与UC相关的特定病理生理问题,并对特定成分/途径相关的候选药物进行非临床药效学评价。本文对目前UC非临床药效学模型种类、潜在的病理生理学基础及各类模型在新药研发中的应用情况进行综述,为UC药物非临床药效学评价以及UC治疗药物的研发提供参考。

## 1 UC非临床药效学模型种类

### 1.1 化学药物和细菌诱导的UC结肠炎动物模型

UC样表现可以通过化学或细菌感染诱导实验动物造模,该类模型的优点是造模相对简单且成本较低。目前大量的文献针对小鼠的模型,也可以选择其他动物种属(如斑马鱼、大鼠和小型猪等)进行,实验动物的选择和诱导方法取决于需要解决的具体问题。

**1.1.1 葡聚糖硫酸钠(DSS)诱导的UC模型** 用DSS诱导是一种常用的造成溃疡形成和炎症的方法。严格地说,DSS本身并不直接引起肠道炎症,它会对肠上皮产生化学损伤,导致肠黏膜固有层和黏膜小室暴露于肠腔内抗原和肠道细菌,引发炎症。DSS所致的UC模型的特点取决于以下几个因素,具体包括DSS剂量(通常为1%~5%)、持续时间(急性或慢性)、动物种属(C3H/HeJ和BALB/c小鼠更易受感染)、动物的性别(雄性小鼠更易受感染),以及动物的微生物环境[(在无茵(GF)级或无

特定病原体(SPF)级环境下受感染不同]。此外,给予DSS的小鼠也表现出不同的疾病严重程度,除非动物接受多脉冲DSS给药,否则UC模型表现缺乏人类UC疾病表现的慢性变化。尽管如此,DSS所致的UC模型仍然是常用的,因为DSS造模方法简单,通常采用2.0%~5.0% DSS水溶液供动物自由饮用,易于控制剂量和持续时间,以确定严重程度,便于研究炎症或恢复过程。虽然该模型最早的变化是结肠隐窝逐渐破裂,但在后期恢复阶段,巨噬细胞和分化的CD4<sup>+</sup>T细胞在肠黏膜固有层基础部分的伤口愈合区变得更加突出。据报道,DSS引起的UC模型应用于化合物、基因/细胞治疗和微生物干预的药效学研究并获得较好的效果<sup>[2]</sup>。

**1.1.2 恶唑酮或三硝基苯磺酸(TNBS)诱导的UC模型** 恶唑酮和TNBS均具有半抗原性质,可诱导T细胞介导的免疫反应。给小鼠直肠内注射半抗原1%恶唑酮(溶于50%乙醇溶液)可导致急性结肠炎,该模型的特点是T细胞介导的2型(Th2)免疫反应,白细胞介素-4(IL-4)和白细胞介素-5(IL-5)的产生明显增加,并伴有体质量减轻、腹泻、溃疡和大肠上皮细胞减少。自然杀伤T细胞及其相关细胞因子(主要是IL-13)也与恶唑酮诱导结肠炎的过程密切相关<sup>[2]</sup>。许多研究已经利用恶唑酮诱导UC模型来检测疾病的病理和治疗措施。在恶唑酮处理的小鼠中发现,烟碱上调了CD4<sup>+</sup>T细胞上的烟碱型乙酰胆碱受体,增加了调节性T细胞(Treg)的数量,并伴随着Th17细胞数量的减少,导致炎症表型的改善。TNBS诱导的小鼠UC模型以IL-12驱动的TH1反应为主,通常采用100~150 μL 2.5%~3% TNBS的50%乙醇溶液灌肠制备小鼠UC模型。烟碱治疗TNBS诱导的小鼠出现CD样Th1相关炎症,增加Th17细胞数量与炎症反应加剧有关<sup>[3]</sup>。另一项研究表明,在TNBS诱导的小鼠UC模型中,3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶A还原酶抑制剂可抑制Th1反应和减轻肠道炎症,但在恶唑酮诱导UC模型中则无这种作用<sup>[4]</sup>。这些实例说明了在探索药物/化合物对特定疾病的治疗潜力时选择合适的模型的重要性。

**1.1.3 醋酸诱导的UC模型** 直肠内注射稀醋酸可以对黏膜上皮造成化学损伤,从而诱发一种类似UC的暂时性表型。该模型导致直肠溃疡和黏膜损伤有时可延伸到肠黏膜固有层,在小鼠模型中在几天内开始愈合,但在大鼠模型中需要几周。由于高浓度的醋酸灌肠往往会导致穿孔,经过改进和优化醋酸的浓度和接触时间,使用4%的醋酸,暴露15~

30 s, 醋酸所致结肠炎的优点是成本低, 给药方便<sup>[5]</sup>。有大量的报道描述了可以改善醋酸所致UC的化合物, 其中包括针对氧化应激的化合物, 如*N*-乙酰半胱氨酸、曲美他嗪、维生素E和褪黑素等, 表明醋酸引起的UC模型是干预氧化应激药物的一种较好的模型<sup>[6]</sup>。值得注意的是, 在醋酸诱导的前24 h内所观察到的上皮损伤本质上不是免疫性的。因此, 设计针对免疫反应的药物应该在诱导24 h后进行检测。

**1.1.4 沙门菌引起的UC模型** 革兰阴性菌鼠伤寒沙门菌和都柏林沙门菌是可引起肠道疾病的食源性肠道细菌病原体。将鼠伤寒沙门菌直接经口感染会导致全身感染, 从而掩盖肠道炎症的表型, 所以可以通过给予抗生素对小鼠进行预处理, 以破坏共生菌群, 并允许更好地定植伤寒沙门菌, 从而导致细菌在1 d内高密度生长。这种定植引起的初始炎症具有与人UC相似的组织病理学特征, 包括上皮性隐窝丢失、糜烂和中性粒细胞浸润。值得注意的是, 这种UC诱导模式通常会在感染后5~7 d内导致全身感染。因此, 鼠伤寒沙门菌感染是研究UC急性期而非晚期的一个有价值的模型。

沙门菌是一种很好的载体, 可将某些基因成分引入黏膜, 以诱导对结肠炎疫苗的免疫应答。沙门菌能有效地侵入肠上皮和肠道集合淋巴结。小鼠接种含有*znuABC*操纵子缺失的减毒突变株鼠伤寒沙门菌, *znuABC*操纵子能编码一个锌吸收转运体负责在被感染的宿主中吸收锌, 引起有效的免疫反应, 并保护小鼠免受随后的沙门菌感染<sup>[7]</sup>。此外, 阐明伤寒沙门菌如何与宿主上皮细胞相互作用有助于进一步了解预防UC发病的机制。例如, 用适当的抗体或抑制剂阻断结肠中的宿主炎症诱导蛋白可以防止鼠伤寒沙门菌定植于肠上皮, 从而防止进一步侵袭<sup>[8]</sup>。

## 1.2 转基因或基因敲除UC动物模型

近年来随着转基因和基因敲除技术的发展, 可以选择使用各种UC动物模型解决与UC相关的特定病理生理问题。通过基因工程进行造模的优点是靶点针对性强, 可以通过特定的靶点(如免疫相关和肠道黏膜屏障相关)设计相应的UC动物模型。

**1.2.1 IL-7转基因(Tg)小鼠UC模型** IL-7是一种多向性细胞因子, 其基因是与UC相关的候选易感基因。肠上皮细胞(IECs)表达IL-7, 它是调节表达IL-7受体(IL-7R)的淋巴细胞的发育和稳态的调节因子。在UC患者中, IL-7表达明显上调, 并在维持

结肠黏膜中记忆性CD4<sup>+</sup>T细胞长期生存发挥作用<sup>[9]</sup>。IL-7似乎通过特异性表达在CD4<sup>+</sup>T细胞上的IL-7R $\alpha$ 链介导慢性结肠炎的持续存在, 而不是在其他类型的细胞上表达<sup>[10]</sup>。因此, 阻断IL-7R功能在抑制过继转移引起的小鼠肠道炎症中有效。用特异性抗IL-7R抗体治疗小鼠结肠炎模型(如幽门螺杆菌感染*Mdr 1*基因敲除小鼠)也可抑制巨噬细胞和树突状细胞的增殖。表达IL-7互补DNA的IL-7 Tg小鼠在1~3周龄时自发急性结肠炎, 其特征包括中性粒细胞和淋巴细胞浸润<sup>[11]</sup>。IL-7 Tg小鼠在8~12周龄出现直肠脱垂和间歇性肠道出血, 直肠侵蚀、杯状细胞丢失和偶见隐窝脓肿。黏膜淋巴细胞IL-7R的上调与UC的进展有关<sup>[12]</sup>。因此, 通过IL-7 Tg小鼠模型有助于了解T细胞介导的结肠炎发病机制, 可为针对T细胞功能靶点的干预治疗提供理论依据。

**1.2.2 T细胞受体 $\alpha$ 链(T cell receptor  $\alpha$ , *TCR $\alpha$ )*基因敲除(KO)小鼠UC模型** *TCR $\alpha$*  KO小鼠自发地发展为慢性结肠炎, 该模型是由Th2型免疫反应介导, 与人UC相似, 其炎症模式主要局限于结肠黏膜。4~6月龄时, 约60%的*TCR $\alpha$*  KO小鼠产生软便, 伴随着杯状细胞的丢失, 以及在受影响的肠黏膜固有层中出现主要由淋巴细胞和中性粒细胞组成的混合细胞浸润<sup>[13]</sup>。在SPF环境中饲养的*TCR $\alpha$*  KO小鼠出现自发性结肠炎, 但在GF或普通环境(conventional, CV)中则不发生<sup>[14]</sup>。当SPF出生的*TCR $\alpha$*  KO小鼠随后转移到CV环境中时, 小鼠轻度结肠炎的症状出现减轻<sup>[15]</sup>。这支持了早期生活暴露于环境微生物可以防止以后生活中的结肠炎风险的假说。

对*TCR $\alpha$*  KO小鼠进行了几种治疗干预试验。*TCR $\alpha$*  KO小鼠每日经口给药地塞米松3 mg·kg<sup>-1</sup>可有效预防杯状细胞流失和白细胞浸润<sup>[16]</sup>。抗IL-4抗体的免疫治疗也可以通过控制Th2型细胞因子的产生来抑制结肠炎的临床症状和组织学改变<sup>[17]</sup>。应用纯化免疫球蛋白G与单克隆抗体抑制结肠上皮细胞的反应性, 可以减轻B细胞缺乏的*TCR $\alpha$*  KO小鼠结肠炎症状<sup>[18]</sup>。一氧化碳可通过抑制IL-1 $\alpha$ / $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 和IL-4, 同时诱导产生IL-10, 对*TCR $\alpha$*  KO小鼠产生抗炎作用<sup>[19]</sup>。

**1.2.3 Wiskott-Aldrich综合蛋白(WASP)KO小鼠UC模型** Wiskott-Aldrich综合症患者不仅有免疫缺陷, 而且经常出现自身免疫症状, 5%~10%的患者出现结肠炎症<sup>[20]</sup>。Wiskott-Aldrich综合症患者缺

乏 WASP 或表达一种有缺陷的 WASP, 该蛋白是造血细胞特有的细胞内分子。由于 WASP 在肌动蛋白聚合中的主要生物学作用, 其对细胞的运动、激活和信号传递等多种细胞功能至关重要。与人类 WASP 缺乏相似, 129 SvEv 背景的 *WASP* KO 小鼠从 4 月龄时出现自发性结肠炎, 在 6 月龄时可观察到完全外显率, 该模型炎症与人类 UC 相似, 如炎症全结肠模式以及结肠肠黏膜固有层中 Th2 型细胞因子的升高。最初认为与 WASP 缺乏相关的异常激活的效应 T 细胞和调节性 T 细胞功能失调是结肠炎发生的唯一原因, 后来研究发现 *WASP* KO 小鼠先天免疫细胞在破坏黏膜调节中也起着重要作用<sup>[21]</sup>。该模型用于研究 UC 发病机制的优势是 Th2 型细胞因子升高, 与人类疾病相似, 有相同基因缺陷的一部分患者也患有结肠炎, 均存在调节性 T 细胞和天然免疫细胞功能异常。

使用 *WASP* KO 动物对几种治疗策略进行了研究。将表达 *WASP* 基因通过逆转录病毒转染至 *WASP* 缺陷的造血干细胞后, 移植到经致死性照射小鼠体内, 使得结肠炎随成熟 B 细胞和 T 细胞的正常而减弱, 而对照组移植 *WASP* 缺陷骨髓细胞的嵌合小鼠则出现结肠炎<sup>[22]</sup>。此外, 考虑到 UC 患者产生较低水平的肠碱性磷酸酶, *WASP* KO 小鼠经口给予肠碱性磷酸酶治疗后发现可以减轻结肠炎, 减少细胞浸润, 减少 IL-4 和  $\gamma$  干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 的产生<sup>[23]</sup>。每周注射抗 IL-4 抗体可直接中和 IL-4, 持续 8 周可改善疾病<sup>[24]</sup>。有研究表明用 1 种 IL-10 融合蛋白在 *WASP* 缺陷型天然免疫细胞嵌合小鼠中可以完全阻断结肠炎的发生<sup>[21]</sup>。

**1.2.4 多重耐药性基因 1a (multi-drug resistance gene-1a, *Mdr1a*) KO 小鼠 UC 模型** *Mdr1a* 编码细胞表面 P 糖蛋白 (P-glycoprotein, P-gp), 该蛋白可转运亲水性/疏水性小分子穿过细胞。*Mdr1a* KO 小鼠在 SPF 环境下饲养约有 25% 动物在 8~36 周龄时发生结肠炎, 而在 GF 环境中不发生。该模型的组织学表现包括黏膜增厚和杯状细胞丢失, 同时伴有结肠内的隐窝脓肿和溃疡<sup>[25]</sup>。*Mdr1a* KO 小鼠缺乏处理上皮细胞中细菌降解产物的能力, 这些细菌产物的积累增加了对邻近 T 细胞的过量/异常抗原呈递, 导致明显的 T 细胞活化状态, 从而导致结肠炎。由于缺乏 P-gp, 限制了诱导 Treg 细胞的发育, 从而产生较少的功能性 Foxp3 阳性 Treg 细胞, 减少了 IL-10 的产生, 从而控制和调节肠道炎症<sup>[26]</sup>。小鼠造血干细胞 *Mdr1a* 缺乏比仅在 IECs 中缺乏 *Mdr1a* 导致的结

肠炎更为严重, 这表明免疫细胞来源的 P-gp 在结肠炎的发展中发挥了关键作用。姜黄素可减少 *Mdr1a* KO 小鼠炎症的形成并改善结肠炎组织病理学特征<sup>[27]</sup>。在 DSS 致小鼠 UC 模型中, 乳酸菌在正常和炎症条件下均可上调 P-gp 的表达, 降低髓过氧化物酶活性及减轻组织病理学损伤症状。这些结果提示, *Mdr1a* KO 小鼠可用于抗肠上皮屏障功能障碍的药物研究以及阐明益生菌治疗的作用机制<sup>[28]</sup>。

**1.2.5 *IL-2* KO 小鼠 UC 模型** IL-2 是 CD4<sup>+</sup> T 细胞产生的一种有效的调节细胞因子, 通过促进 T 淋巴细胞的增殖来增强刺激反应。*IL-2* KO 小鼠在 4 周龄前存活和发育正常, 此后死亡率达 50%。其余小鼠在 CV 环境中饲养至 6 周龄时, 出现外显率为 100% 的结肠炎症, 但在 GF 环境中不出现。这种炎症的临床症状和组织学特征与人 UC 有明显的相似之处, 包括隐窝脓肿、溃疡和杯状细胞丢失。值得注意的是, GF 环境下饲养的 *IL-2* KO 小鼠表现出骨髓造血细胞紊乱、淋巴细胞增生、溶血性贫血和全身自体免疫, 但不出现结肠炎。SPF 环境下小鼠只在 17~20 周龄时才开始出现结肠炎症, 是通过提高 T 细胞和 B 细胞的激活来介导结肠炎的发生<sup>[29]</sup>。这些 T 细胞可能是通过树突状细胞抗原呈递的改变而被激活的。在 *IL-2* KO 小鼠炎症条件下结肠 DC 细胞增加 4~5 倍, 并在 T 细胞和 B 细胞附近聚集定位<sup>[30]</sup>。

已经确定了调控 *IL-2* KO 小鼠结肠炎严重程度的特异性靶点。研究显示, 与未处理的小鼠相比, 2,4,6-三硝基酚-卵白蛋白免疫的 *IL-2* KO 小鼠显示了更严重的肠道炎症, 给药抗  $\alpha$ E $\beta$ 7 整合素单克隆抗体可以减轻肠道炎症, 与肠黏膜固有层中 CD4<sup>+</sup> T 细胞及 IFN- $\gamma$  生成的减少有关<sup>[31]</sup>。此外, 在 8 周龄 *IL-2* KO 小鼠饮用水中加入绿茶多酚提取物治疗, 1 周后可见血清 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$  的产生降低, 6 周后自发性结肠炎的组织学评分进一步改善<sup>[32]</sup>。

**1.2.6 抑制性 G 蛋白  $\alpha$ 2 亚单位 (*Gai2*) KO 小鼠 UC 模型** *Gai2* KO 小鼠在 5~7 周龄表现出明显的致死性弥漫性结肠炎表型, 与 UC 具有相似的表现和组织病理学特征, 包括结肠增厚、淋巴细胞和中性粒细胞浸润、隐窝和杯状细胞丢失以及隐窝脓肿<sup>[33]</sup>。将 *Gai2* KO 小鼠脾脏 CD3<sup>+</sup> T 细胞移植到免疫缺陷小鼠可导致严重结肠炎<sup>[34]</sup>。造血组织中的 B 细胞似乎是控制 *Gai2* KO 小鼠结肠炎表型的重要调节因子, 其表现为脂多糖 (lipopolysaccharide,

LPS)诱导后的B细胞增殖和产生IL-10的减少。从野生型小鼠肠系膜淋巴结(MLN)中分离出的B细胞可以保护 *Gai2* KO小鼠免受结肠炎的侵袭<sup>[35]</sup>。

对 *Gai2* KO小鼠进行UC药效学试验,在改善结肠炎方面取得了积极的结果。*Gai2* KO小鼠腹腔注射非细胞组成的百日咳杆菌疫苗,导致肠内调节性IL-10的产生增加,同时伴有结肠炎显著减轻,治疗后CD4<sup>+</sup>T细胞过度增殖得到了控制,同时活化的Th1型CD4<sup>+</sup>T细胞凋亡增加<sup>[36]</sup>。从 *Gai2* KO小鼠获得的结肠体外培养物对甲基强的松龙的应答方式类似于经口给药小鼠的结肠,表明其机制是由炎症相关基因的表达决定。因此,结肠培养系统,也可以用来进行UC治疗药物药理实验<sup>[37]</sup>。

## 2 不同UC动物模型在新药研发试验设计中的应用建议

对于首创新药(first in class),从新药的发现到开发阶段推进通常需要在动物模型中进行概念验证(proof-of-concept),以证明该候选药物的潜在药效,为临床试验提供依据。对于该类药物,如果是生物制品,还需关注种属选择的合理性,如果动物模型非相关动物种属,候选药物与动物相关靶点不具有亲和力,可以采用人源靶点转基因动物或采用同源替代物进行药效学试验。

虽然UC动物模型有助于理解药物的作用机制,但动物模型在预测UC临床疗效方面还有一定的局限性,特别的单一的动物模型很难预测临床疗效。许多因素可以导致动物模型和临床之间的脱节,包括生物学上的种属差异,动物造模时间过短,疾病的异质性和药物与同源替代的差异等。如何通过有效的非临床试验解决以上问题值得探讨。首先,可以通过药物在不同的UC模型中进行药效评估,通过不同的疾病诱导的机制,可以更好地评估药物的治疗价值。其次,在不同实验室开展不同模型的药效实验,可以避免自实验室特定环境和标准化方案的偏差对实验结果的影响<sup>[38]</sup>。此外,在缺乏反映动物模型中黏膜愈合影响的内镜结果的情况下,需要对其他疾病结果进行更严格的分析。因为组织病理学改善可以预测UC的长期临床缓解,所以组织病理学结果对于药效学试验结果至关重要。在理想情况下,应同时报告疾病活动度指数评分和组织病理学评分。另外,由于结肠不同部位在微生物群组成、免疫反应和表观遗传谱方面存在不同,推荐对肠内不同部位进行组织病理学检查<sup>[39-40]</sup>。

不同的UC模型都有优缺点,在使用不同的模

型评估不同药物的体内疗效时,需关注以下方面<sup>[41]</sup>:(1)临床上一般是在疾病确诊后进行药物治疗。在动物模型中预防给药并不能代表预期药物的临床使用,虽然预防给药能研究药物的作用机制,但它们缺乏与UC相关的复杂性;(2)与急性模型比较,在长期慢性模型中进行药效学试验,可能更能反映与人类疾病相关的复杂的免疫表现;(3)依赖于微生物组存在的模型与临床UC相关性较好,虽然很可能表现出与临床UC病理相似的特征,但是在不同的实验室可能缺乏可重复性;(4)动物模型与影响药物治疗方法的相关性。阐明靶点作用机制,以及试验终点与临床终点的相关性,在动物模型的选择中至关重要。

根据目前可供研究UC动物模型,以及随着UC潜在分子发病机制研究的进展,可以利用这些资源,针对UC治疗靶点信息选择最佳的动物模型进行实验设计。在药物早期发现阶段可以使用线虫、果蝇和斑马鱼等低等生物模型进行筛选和试验,这为高通量药物筛选和靶点确认提供了1种方便快捷的方法。在确定了候选药物和药物靶点后,可以进一步使用小鼠模型进行研究。首先要确定适合该靶点作用机制研究的动物模型,如T细胞介导的UC可选择 *IL-7* Tg小鼠、*TCR $\alpha$*  KO小鼠、*WASP* KO小鼠、*Gai2* KO小鼠或 *IL-2* KO小鼠,B细胞介导的UC可选择 *Gai2* KO小鼠,肠道屏障功能障碍UC可选择 *Mdr1a* KO小鼠。值得注意的是,小鼠饲养环境和设施的清洁度(如GF、SPF或CV)将对结果产生重要的影响,包括小鼠结肠炎的渗透性和严重程度等。如果候选药物(如中药)在不确定靶点和作用机制情况下,化学诱导的小鼠UC模型可能是合适的选择。与自发模型相比,化学造模的优点是造模剂量和持续时间易于控制,因剂量和持续时间可影响结肠炎的严重程度。当在啮齿动物结肠炎模型中观察到新的候选药物/治疗措施的预期结果时,如有必要,进一步的研究可以扩展到更大的动物模型,如猪或绵羊。猪小肠的形态和生理与人的相似程度很高,因此可以更好地反映患者的反应<sup>[42]</sup>。最后,可以将候选药物在动物模型中测试中阳性结果扩展为人类UC患者的临床试验中。

## 3 结语与展望

近年来,UC治疗药物临床试验申请(IND)呈现上升趋势。非临床药效学试验作为支持药物进入II期探索性临床试验的重要依据,在IND申报中具有举足轻重的作用。在新药注册过程中,申请人作为

责任主体,应该重视非临床药效学研究,目前在IND申报中申请人存在一个误区,就是重视非临床安全性研究,忽视非临床有效性研究,认为新药的有效性可以完全通过临床试验验证。这种观点是片面的,在患者人群进行的临床试验中(通常为II、III期临床试验),如果没有充分的有效性支持,患者没有足够的获益,对参与临床试验的受试者具有潜在的风险,也不利于临床试验资源的优化配置。UC非临床研究模型比较成熟,对于小分子和中药品种,由于没有明显种属特异性,可以采用化学药物和细菌诱导模型,对于生物制品如单抗,由于存在较强的种属特异性,可以采用转基因或基因敲除动物模型,同时需考虑种属选择性。总之,非临床药效学评价的最终目的是为新药临床应用提供依据,使得有未被满足的临床需求的新药最快上市,满足患者的需求。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Chow D K L, Leong R W L, Tsoi K K F, et al. Long-term follow-up of ulcerative colitis in the Chinese population [J]. *Am J Gastroenterol*, 2009, 104(3): 647-654.
- [2] Goyal N, Rana A, Ahlawat A, et al. Animal models of inflammatory bowel disease: A review [J]. *Inflammopharmacology*, 2014, 22(4): 219-233.
- [3] Galitovskiy V, Qian J, Chernyavsky A I, et al. Cytokine-induced alterations of  $\alpha 7$  nicotinic receptor in colonic CD4 T cells mediate dichotomous response to nicotine in murine models of Th1/Th17- versus Th2-mediated colitis [J]. *J Immunol*, 2011, 187(5): 2677-2687.
- [4] Ikeda M, Takeshima F, Isomoto H, et al. Simvastatin attenuates trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis, but not oxazolone-induced colitis [J]. *Dig Dis Sci*, 2008, 53(7): 1869-1875.
- [5] Elson C O, Sartor R B, Tennyson G S, et al. Experimental models of inflammatory bowel disease [J]. *Gastroenterology*, 1995, 109(4): 1344-1367.
- [6] Tahan G, Gramignoli R, Marongiu F, et al. Melatonin expresses powerful anti-inflammatory and antioxidant activities resulting in complete improvement of acetic-acid-induced colitis in rats [J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(3): 715-720.
- [7] Mann B J, Burkholder B V, Lockhart L A. Protection in a gerbil model of amebiasis by oral immunization with *Salmonella* expressing the galactose/N-acetyl D-galactosamine inhibitable lectin of *Entamoeba histolytica* [J]. *Vaccine*, 1997, 15(6/7): 659-663.
- [8] Mizoguchi E. Chitinase 3-like-1 exacerbates intestinal inflammation by enhancing bacterial adhesion and invasion in colonic epithelial cells [J]. *Gastroenterology*, 2006, 130(2): 398-411.
- [9] Watanabe M, Watanabe N, Iwao Y, et al. The serum factor from patients with ulcerative colitis that induces T cell proliferation in the mouse *Thymus* is interleukin-7 [J]. *J Clin Immunol*, 1997, 17(4): 282-292.
- [10] Shinohara T, Nemoto Y, Kanai T, et al. Upregulated IL-7 receptor  $\alpha$  expression on colitogenic memory CD4<sup>+</sup> T cells may participate in the development and persistence of chronic colitis [J]. *J Immunol*, 2011, 186(4): 2623-2632.
- [11] Willis C R, Seamons A, Maxwell J, et al. Interleukin-7 receptor blockade suppresses adaptive and innate inflammatory responses in experimental colitis [J]. *J Inflamm (Lond)*, 2012, 9(1): 39.
- [12] Watanabe M, Ueno Y, Yajima T, et al. Interleukin 7 transgenic mice develop chronic colitis with decreased interleukin 7 protein accumulation in the colonic mucosa [J]. *J Exp Med*, 1998, 187(3): 389-402.
- [13] Mombaerts P, Mizoguchi E, Grusby M J, et al. Spontaneous development of inflammatory bowel disease in T cell receptor mutant mice [J]. *Cell*, 1993, 75(2): 274-282.
- [14] Dianda L, Hanby A M, Wright N A, et al. T cell receptor-alpha beta-deficient mice fail to develop colitis in the absence of a microbial environment [J]. *Am J Pathol*, 1997, 150(1): 91-97.
- [15] Shimomura Y, Mizoguchi E, Sugimoto K, et al. Regulatory role of B-1 B cells in chronic colitis [J]. *Int Immunol*, 2008, 20(6): 729-737.
- [16] Nishiyori A, Nagakura Y, Ichikawa K. Piroxicam accelerates development of colitis in T-cell receptor alpha chain-deficient mice [J]. *Eur J Pharmacol*, 2009, 615(1/2/3): 241-245.
- [17] Iijima H, Takahashi I, Kishi D, et al. Alteration of interleukin 4 production results in the inhibition of T helper type 2 cell-dominated inflammatory bowel disease in T cell receptor alpha chain-deficient mice [J]. *J Exp Med*, 1999, 190(5): 607-615.
- [18] Mizoguchi A, Mizoguchi E, Smith R N, et al. Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice [J]. *J Exp Med*, 1997, 186(10): 1749-1756.
- [19] Sheikh S Z, Hegazi R A, Kobayashi T, et al. An anti-inflammatory role for carbon monoxide and heme oxygenase-1 in chronic Th2-mediated murine colitis [J]. *J Immunol*, 2011, 186(9): 5506-5513.

- [20] Dupuis-Girod S, Medioni J, Haddad E, et al. Autoimmunity in Wiskott-Aldrich syndrome: Risk factors, clinical features, and outcome in a single-center cohort of 55 patients [J]. *Pediatrics*, 2003, 111(5 Pt 1): e622-e627.
- [21] Nguyen D D, Wurbel M A, Goettel J A, et al. Wiskott-Aldrich syndrome protein deficiency in innate immune cells leads to mucosal immune dysregulation and colitis in mice [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143(3): 719-729.
- [22] Klein C, Nguyen D, Liu C H, et al. Gene therapy for Wiskott-Aldrich syndrome: Rescue of T-cell signaling and amelioration of colitis upon transplantation of retrovirally transduced hematopoietic stem cells in mice [J]. *Blood*, 2003, 101(6): 2159-2166.
- [23] Tuin A, Poelstra K, de Jager-Krikken A, et al. Role of alkaline phosphatase in colitis in man and rats [J]. *Gut*, 2009, 58(3): 379-387.
- [24] Nguyen D D, Maillard M H, Cotta-de-Almeida V, et al. Lymphocyte-dependent and Th2 cytokine-associated colitis in mice deficient in Wiskott-Aldrich syndrome protein [J]. *Gastroenterology*, 2007, 133(4): 1188-1197.
- [25] Panwala C M, Jones J C, Viney J L. A novel model of inflammatory bowel disease: Mice deficient for the multiple drug resistance gene, *mdr1a*, spontaneously develop colitis [J]. *J Immunol*, 1998, 161(10): 5733-5744.
- [26] Tanner S M, Staley E M, Lorenz R G. Altered generation of induced regulatory T cells in the FVB.*mdr1a*<sup>-/-</sup> mouse model of colitis [J]. *Mucosal Immunol*, 2013, 6(2): 309-323.
- [27] Nones K, Dommels Y E M, Martell S, et al. The effects of dietary curcumin and rutin on colonic inflammation and gene expression in multidrug resistance gene-deficient (*mdr1a*<sup>-/-</sup>) mice, a model of inflammatory bowel diseases [J]. *Br J Nutr*, 2009, 101(2): 169-181.
- [28] Saksena S, Goyal S, Raheja G, et al. Upregulation of P-glycoprotein by probiotics in intestinal epithelial cells and in the dextran sulfate sodium model of colitis in mice [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2011, 300(6): G1115-G1123.
- [29] Sadlack B, Merz H, Schorle H, et al. Ulcerative colitis-like disease in mice with a disrupted interleukin-2 gene [J]. *Cell*, 1993, 75(2): 253-261.
- [30] Cruickshank S M, English N R, Felsburg P J, et al. Characterization of colonic dendritic cells in normal and colitic mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(40): 6338-6347.
- [31] Lúdvíksson B R, Strober W, Nishikomori R, et al. Administration of MAb against alpha E beta 7 prevents and ameliorates immunization-induced colitis in IL-2<sup>-/-</sup> mice [J]. *J Immunol*, 1999, 162(8): 4975-4982.
- [32] Varilek G W, Yang F, Lee E Y, et al. Green tea polyphenol extract attenuates inflammation in interleukin-2-deficient mice, a model of autoimmunity [J]. *J Nutr*, 2001, 131(7): 2034-2039.
- [33] Rudolph U, Finegold M J, Rich S S, et al. Ulcerative colitis and adenocarcinoma of the colon in G alpha i2-deficient mice [J]. *Nat Genet*, 1995, 10(2): 143-150.
- [34] Bjursten M, Willén R, Hörnquist E H. Transfer of colitis by Galphai2-deficient T lymphocytes: Impact of subpopulations and tissue origin [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2005, 11(11): 997-1005.
- [35] Dalwadi H, Wei B, Schrage M, et al. B cell developmental requirement for the G alpha i2 gene [J]. *J Immunol*, 2003, 170(4): 1707-1715.
- [36] Öhman L, Willén R, Hultgren O H, et al. Acellular *Bordetella pertussis* vaccine enhances mucosal interleukin-10 production, induces apoptosis of activated Th1 cells and attenuates colitis in *Gai2*-deficient mice [J]. *Clin Exp Immunol*, 2005, 141(1): 37-46.
- [37] Fritsch Fredin M, Vidal A, Utkovic H, et al. The application and relevance of *ex vivo* culture systems for assessment of IBD treatment in murine models of colitis [J]. *Pharmacol Res*, 2008, 58(3/4): 222-231.
- [38] Voelkl B, Vogt L, Sena E S, et al. Reproducibility of preclinical animal research improves with heterogeneity of study samples [J]. *PLoS Biol*, 2018, 16(2): e2003693.
- [39] Chateau T, Feakins R, Marchal-Bressenot A, et al. Histological remission in ulcerative colitis: Under the microscope is the cure [J]. *Am J Gastroenterol*, 2020, 115(2): 179-189.
- [40] Erben U, Loddenkemper C, Doerfel K, et al. A guide to histomorphological evaluation of intestinal inflammation in mouse models [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2014, 7(8): 4557-4576.
- [41] Bilsborough J, Fiorino M F, Henkle B W. Select animal models of colitis and their value in predicting clinical efficacy of biological therapies in ulcerative colitis [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2021, 16(5): 567-577.
- [42] Lin J, Hackam D J. Worms, flies and four-legged friends: the applicability of biological models to the understanding of intestinal inflammatory diseases [J]. *Dis Model Mech*, 2011, 4(4): 447-456.

[责任编辑 刘东博]