

【专论】

药物毒理学研究中体外替代试验研究现状及展望

霍桂桃, 文海若, 吕建军*, 屈哲, 林志, 耿兴超, 霍艳, 王雪

中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

摘要: 药物的安全性和有效性是药物研发成功的决定因素, 而药物毒性是终止药物研发的关键因素之一。相关监管指南和指导原则为利用动物进行毒理学研究及生物测试或其他相关试验制定了基本标准。动物体外替代试验不仅遵守了国际上提倡的“3R原则”, 也符合毒理学学科发展、社会经济发展及新药研发的要求。动物体外替代试验已成为21世纪毒性测试的重要方向, 毒性测试的重点将集中在敏感性终点的选择与评价、细胞-反应网络、高通量与中高通量筛选方法的构建及应用、作用机制及作用模式、毒性通路以及系统生物学效应等方面, 并且已获得药物研发领域广泛的支持和监管部门的认可, 具有广阔的发展前景和重要的应用价值。

关键词: 药物; 毒理学; 体外替代试验; 药物毒性; 药物研发

中图分类号: R991 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 12-2133-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.12.001

Current situation and prospects of *in vitro* alternative tests in drug toxicological study

HUO Guitao, WEN Hairuo, LÜ Jianjun, QU Zhe, LIN Zhi, GENG Xingchao, HUO Yan, WANG Xue

Beijing Key Laboratory for Safety Evaluation of Drugs, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

Abstract: The safety and efficacy of drugs are the determinants of the success of drug discovery and development, and drug toxicity is one of the key factors in stopping drug development. The relevant regulatory guidelines and principals establish basic standards for the use of animals for toxicological studies and biological tests or other related tests. *In vitro* alternative tests not only comply with the internationally promoted "3R Principles", but also the needs and scientific requirements for the development of toxicology disciplines, socio-economic development and the development of emerging therapeutic methods. *In vitro* animal alternative testing has become an important direction for toxicity testing in the 21st century. The focus of toxicity testing will focus on the selection and evaluation of sensitive endpoints, cell-response networks, the construction and application of high- and medium-throughput screening methods, mechanisms of action and modes of action, toxic pathways, and system biology effects, etc.. *In vitro* alternative test is being widely recognized and approved by the regulatory authorities, and has broad prospects for development and important application value.

Key words: drug; toxicology; *in vitro* alternative tests; drug toxicity; drug development

药物的安全性和有效性是评价药物质量的决定因素, 而药物毒性是决定药物研发成败的关键因素之一。毒理学研究贯穿于药物研发的整个阶段, 是药物临床前以及临床研究中至关重要的环节。

收稿日期: 2018-05-24

基金项目: “十二五”国家科技重大专项课题“符合中药特点的有毒中药安全评价关键技术”(2015ZX09501004-002); “十二五”国家科技重大专项课题“生物大分子药物特殊评价关键技术研究”(2015ZX09501007-004)

第一作者: 霍桂桃, 副主任药师, 从事临床前药物安全性评价毒性病理学诊断工作。E-mail: huoguitao@nifdc.org.cn

文海若, 副研究员, 从事临床前药物遗传毒性评价工作。Tel: (010)67872233-8221 E-mail: hairuowen@163.com

*通信作者: 吕建军, 主任药师, 从事临床前药物安全性评价毒性病理学诊断工作。Tel: (010)67872233-8210 E-mail: lujianjun@nifdc.org.cn

随着毒理学研究领域的兴起,实验动物被广泛用于新型化合物、药品、农药、医疗器械、生物技术药物的安全性评价和疗效测试^[1]。利用动物进行研究或检测对于满足监管要求和保护及促进人类、动物和环境健康非常必要。虽然监管部门已经批准了60多种动物实验替代方法,但在安全性评价领域仍在大量使用动物^[2]。传统的毒理学试验使用实验动物的数量大、试验周期长、费用高,而且由于动物种属差异等原因,导致试验结果外推至人体毒性风险评估时存在很大的不确定性^[3]。近年来,动物试验替代方法越来越受到国内外毒理学研究者的关注和重视,尤其是体外替代试验研究得到长足发展,并已成为外源性化合物毒性检测的主要研究领域并被广泛应用^[4-5]。本文从发展和实施体外替代试验的主要原因、3R原则的含义、3R原则下的体外试验、体外试验及生物标志物的应用等方面进行阐述,以期为我国药物毒理学体外替代研究方法提供一些参考。

1 发展和实施体外替代试验的主要原因

发展和实施动物试验体外替代试验有许多原因,其中3个主要原因^[2,6-7]是:1)体外试验一经开发和验证,可以低成本、高效益、省时的方式提供药物的毒性及疗效信息,这些信息也可以提高整个动物试验研究的效率,降低毒性试验、代谢和疗效测试中所需的动物数量,有利于节省空间和时间;2)使用人体细胞系进行体外检测在确保人类风险评估、了解药物作用机制、敏感性和靶向治疗等方面非常有用,从而为现有及新兴治疗方法提供探索机会;3)人类细胞模型或细胞系可以提供与人类风险和/或功效相关的毒物或治疗信息,可以为重复给药毒性试验选择合适的动物模型。

2 3R原则的含义

世界各地的学术界、企业界和政府部门的大多数科学家都认为动物试验应该符合伦理,尽可能减轻对动物造成的痛苦,而且需要开发动物试验的替代试验。指导全球利用动物进行试验研究的3R原则为减少(reduce)、替代(replace)、优化(refine)^[8-9]。减少是指保证研究者能从较少的实验动物中获取同等水平的信息,或从相同数量的实验动物中获取更多信息的策略;替代(replace)是指在可能获得相似研究目标的前提下,优先使用非动物研究的方法代替动物研究的方法。优化(refine)是指减轻或将动物的疼痛和痛苦最小化,以及提高所使用动物的福利。因此动物试验替代方法可相应分为减少性

替代、替代性研究及优化性替代。减少性替代是指在确保获得等同研究信息甚至更多有用信息的前提下,采用新的替代方法以减少使用动物的数量和/或缩短动物试验的周期。替代性研究主要是指采用无脊椎动物(如细菌、昆虫等)或非脊椎动物试验手段(培养的动物或人源的细胞、组织和器官)替代脊椎动物试验;优化性替代则是指在动物饲养、管理和/或试验过程中,采用新技术新方法对原有试验方法进行完善,提高试验的规范水平及实验动物的福利^[10]。由此可见,替代从不同层次和不同角度体现了3R原则的内容。这些原则是制定动物试验替代方法的根本原因,是使用适宜的动物种类、确定使用动物数量、产品研发和培训的理由。

3 3R原则下的体外试验

目前体外细胞培养是替代动物试验最成功和最希望的替代试验。可以通过保持与体内相同细胞、组织和器官的性质及特征的方法,在培养物中制备和维持分离的细胞、组织和器官^[11]。在受控的试验条件下允许使用上述体外系统所产生的数据,这体现了在没有诸多复杂因素影响下动物试验的特征。例如,已经利用培养的细胞生产单克隆抗体,从而替代了可导致动物疼痛及痛苦的抗体制备方法^[12]。目前已经进行了大量有价值的体外细胞培养研究。国家疾病研究交流中心(The National Disease Research Interchange)为各国研究人员提供了130多种人体组织用以研究50多种疾病,包括癌症、糖尿病和青光眼^[9]。目前可利用细胞和组织培养物筛选新的治疗方法并用于检测产品的安全性,还可通过利用基因芯片技术检测人肝细胞中的基因表达来预测肝脏毒性^[3,13]。

一些体外试验已经得到验证和/或正在进行评估,以替代引起动物疼痛和痛苦的体内试验。这些体外试验用于确定例如光毒性、皮肤和/或眼睛刺激性和腐蚀性、免疫毒性、骨髓毒性、磷脂病、肾毒性和遗传毒性^[9,14-18]。表1列出了最常用的体外试验方法。

4 体外试验及生物标志物的应用

体外试验系统中的毒性生物标志物具有作为病理过程或相关生化或分子指标的可定量测量的特性。在预测人体临床试验结果的临床前检测的发展中价值很大。例如,体外测定药物诱发的肝损伤(drug-induced liver injury, DILI)的方法是公认的^[19]。高通量筛选(High-Throughput Screening, HTS)和高含量筛选(High-Content Screening, HCS)

表1 3R原则下最常用的体外试验

Table 1 The most commonly used in vitro tests under the 3R principle

试验	目标	优点
3T3 NRU 光毒性试验	体外鉴定光毒性	部分替代在体内研究光毒性效应的研究
牛角膜浑浊/渗透性检测	兔眼睛刺激性和腐蚀性的体内 Draize 检测法的体外替代试验	替代体内研究方法检测眼睛刺激性或严重损伤
人类角膜上皮(HCE-Test)	体外替代兔体内 Draize 试验	同上
3D 人体皮肤模型	皮肤刺激性和腐蚀性的兔体内 Draize 试验的体外替代	如上所述的皮肤刺激性或腐蚀性替代试验。如果应用 UV 灯光,可用于光反应的化学物质检测
Mishell-Dutton 培养	啮齿类动物免疫毒性检测(斑块检测)的体外替代。免疫反应在体外发生	在血细胞培养物中进行检测,无动物牺牲。可以对不同物种的血液进行检测、对比,能更好地对人类进行预测
CFU-GM 检测	主要为用于肿瘤指征的骨髓毒性的体外筛选	骨髓毒性的早期检测
磷脂质病检测	用于诱发磷脂质症药物的体外筛选	药物不良性质的早期鉴定
肾毒性生物标志物	肾毒性的早期及敏感性预测	更敏感的生物标志物
重复给药毒性研究中遗传毒性试验的整合	重复给药毒性研究中大鼠微核试验和彗星实验	与整体评估具有更好的相关性

能够高效筛选大型新化学物质(New Chemical Entity, NCE)库^[20-21]。仪器设备和生物标志物的持续发展可推进并加强研究人员提出合适的、可预测方法的能力。体外替代方法和生物标志物的结合可以阐明肝细胞的损伤机制,并且显著提高研究人员对药物安全性和疗效的理解^[9]。当这些方法和生物标志物被证明具有体外-体内相关性时,就可以更有效地管理特定药物开发的风险-收益比,从而为患者和制药公司带来更安全和更成功的结果。本文主要就体外遗传毒性检测方法和体外药理活性试验方法方面的主要应用进行介绍。

4.1 体外遗传毒性检测

体外遗传毒性试验通常用于对小分子化合物和中药等的潜在致癌性进行预测。传统的试验方法包括细菌回复性突变试验、培养细胞微核试验和染色体畸变试验等。随着分子生物技术的突飞猛进,近年来出现了多种新型遗传毒性试验方法。以下分别从基因突变、染色体损伤、DNA 断裂以及生物标志物不同检测终点对经典的和最新的体外遗传毒性试验方法进行介绍。

4.1.1 基因突变检测 细菌回复性突变试验(Ames 试验)由 Bruce Ames 于 1974 年建立并得名。该方法使用一系列经基因修饰的依赖于组氨酸或赖氨酸生长的菌株对受试物的致突变(移码或置换)能力进行评价。Ames 试验是对人类致癌物预测性最佳的试验,被全球卫生监管部门视为预测化合物人类

致癌潜力的检测金标准^[22],也是 QSAR 构效关系建立的遗传毒性数据库的重要数据基础^[23]。其中鼠伤寒沙门菌可检出碱基置换和 GC 碱基对移码突变,而大肠杆菌可检出 AT 碱基对损伤。然而传统的 Ames 试验消耗大量试验耗材,因此基于微孔板(6 孔板、24 孔板和 96 板)的 Ames 试验当前已用于药物毒性初筛。Gee 等^[24]使用沙门混合菌株(TA7001-TA7006)开发了基于 384 孔板液态培养法的 Ames II 试剂盒可同时对 T:A 和 C:G 点突变能力进行检测,与传统 Ames 试验相比,两者对啮齿类动物致癌性的预测度接近,且检测结果一致性超过 80%^[25]。

当 Ames 试验不适用时(如受试物存在抑菌性),基于哺乳动物细胞的小鼠淋巴瘤细胞 tk 基因突变试验(MLA)和 HPRT 基因突变试验或为受试物的致突变性评价的备选方案。此外,也可使用 TK6 细胞或 L5178Y 细胞通过流式细胞计数法检测表型为 GPI(-)的细胞出现率(即体外 Pig-a 基因突变试验)对受试物的致突变能力进行评价^[26]。然而,体外 Pig-a 基因突变试验当前处于开发阶段,其检测效果尚有待大规模实验室间验证。

4.1.2 染色体损伤检测 染色体畸变(chromosomal aberrations, CA)是通过在显微镜下直接观察染色体结构和数目变化的细胞遗传学方法,常见的 CA 类型包括,染色体插入、缺失、易位、核内复制、多倍体、染色单体畸变和染色体增多或丢失等。它

是“三品一械”(保健食品、化妆品、药品、医疗器械)上市前常规开展的毒理学试验项目^[27-28],也是药物遗传毒性杂质评价除 Ames 试验外的第二试验方法选择^[29]。通过对 CA 类型进行比较,有助于了解受试物的作用机制。如某类仅导致染色体交换的受试物,无法在同样以染色体损伤为检测终点的微核试验中检出。体外 CA 试验通常使用中国仓鼠卵巢细胞(CHO)和中国仓鼠成纤维肺细胞(CHL),其染色体较大而数目较少,核型稳定而定义明确,细胞分裂间隔相对较短。虽然 CA 是直接而主观的检测遗传毒性水平的方法,它并不适用于自动化改良,并且依赖于技术熟练的细胞遗传学家对 CA 进行分析和评价。

除染色体畸变试验外,微核形成率的增加是良好的染色体损伤生物标志物,临床可使用人类外周血样本微核率作为调整化疗药物剂量的参考指标。微核(micronucleus, MN)通常是在细胞分裂后遗留在细胞核外部的断裂的染色体片段或整条染色体。其形成原因与直接染色体断裂或有丝分裂器损伤有关。体外微核试验常用细胞系包括 CHO、CHL、中国仓鼠肺上皮细胞(V79)、小鼠淋巴瘤细胞(L5178Y)、人类淋巴母细胞(TK6)和原代人淋巴细胞等。通过荧光原位杂交(FISH)等免疫荧光方法^[30],可进一步判断微核中是否含有着丝粒,从而分析微核的构成为整条染色体或染色体断片并对受试物的作用机制作进一步判断。体外微核试验也可结合高内涵和流式细胞计数的方法改进^[31-32],从而实现试验方法标准化和检测高通量。

4.1.3 DNA 断裂检测 彗星试验(即单细胞凝胶电泳试验, single cell gel electrophoresis, SCGE)是在单个细胞水平检测 DNA 单链或双链断裂的试验方法,该方法因细胞核 DNA 在受损后电泳迁移速率不同可形成“彗星”样形态而得名。该方法在环境毒理学及药物毒理学等多领域具有广泛应用^[33],人外周淋巴血细胞彗星试验结果提示,年龄及污染因素与彗星拖尾的形成存在一定关联^[34]。彗星试验不依赖于细胞核型,体外培养细胞普遍可用于开展彗星试验用以检出短期出现的、尚未固定的(可修复的)DNA 损伤。如检测样本中存在脱嘌呤或脱嘧啶位点,可在强碱条件下转换为 DNA 断裂。因此当解旋和电泳条件为 pH>13.0 时,可同时兼顾 DNA 单链、双链断裂及碱性不稳定点^[35]。此外,在试验中增加细菌甲酰嘧啶 DNA 糖基化酶(FGP)、核酸内切酶 III、8 羟基鸟苷 DNA 糖基化酶(hOGG1)等预处

理,可用于判断受试物的致断裂效应是否与氧化应激或甲基化作用机制有关^[36]。

当 DNA 双链断裂发生后,机体自身的修复机制可促进其附近的组蛋白 H2AX 可迅速磷酸化并富集于断裂位点,从而放大 DNA 损伤信号促使相关修复蛋白质进行损伤修复。根据上述原理,可以 γ -H2AX 为遗传毒性生物标志物来识别 DNA 双链断裂^[37],该方法可通过流式细胞计数或免疫组化的方法对免疫荧光标定的 γ -H2AX 水平进行分析,从而评价受试物作用下形成的 DNA 双链断裂位点多寡。当前 Litron 等公司和实验室已在上述基础上开发综合 p53、磷酸化组氨酸 H3 等指标的 DNA 损伤检测方法^[38],然而 γ -H2AX 检测法尚未积累足够背景数据并形成标准化试验指导原则。

4.1.4 生物标志物检测 近年来,与细胞增殖和肿瘤相关因子等的遗传毒性生物标志物逐渐成为遗传毒性评价新方法开发的热点。如,针对细胞增殖的负调控因子 GADD45 基因(Growth arrest and DNA damage inducible genes)的 GADD45 - GFP GreenScreen HC 试验。该基因是第一个被发现的 P53 调控的基因^[39],与 DNA 修复损伤和细胞周期调控密切相关^[40]。该方法构建含 EGFP 绿色荧光标记的 GADD45 基因启动子的人淋巴瘤 TK6 细胞,并通过检测荧光强度来提示 GADD45a 基因表达水平,从而对受试物的细胞毒性和遗传毒性进行评价^[41],试验方法较为简便且可实现高通量筛选。通过使用多种已知遗传毒性和非遗传毒性化合物对该方法进行验证,发现 GreenScreen HC 检测结果与文献符合率高达 93%^[42]。

4.1.5 整合的体内遗传毒性试验方案 因缺乏可以同时涵盖突变、染色体损伤和 DNA 断裂的遗传毒性检测方法,为全面考察受试物遗传毒性,通常需要开展标准化遗传毒性组合试验。ICH 在 2011 年颁布的药物遗传毒性研究技术指导原则的修订草案 ICH S2(R1)中建议在体内遗传毒性研究中,除针对染色体损伤的微核试验或染色体畸变试验外,可增加如肝细胞彗星试验等体内试验作为第二遗传学终点^[43]。该草案强调可联合多个检测终点开展遗传毒性评价,如在同一个人动物试验系统开展两个或更多不同遗传终点的检测项目,并建议将遗传终点毒性试验整合到重复给药毒性试验中,该策略也体现了动物福利 3R 原则。研究提示,将骨髓或外周血微核试验与 2 周或 4 周重复给药方案结合实施是可行的^[44-45]。然而在实际试验设计方面,遗传毒性

试验的给药剂量通常高于重复给药毒性研究的设置。此外,在考虑将多终点遗传毒性检测整合入重复给药毒性试验时,应根据受试物的毒性机制和在体内代谢分布等具体情况决定采样时间与采样部位。

4.2 体外药理学活性试验

药理学是对药物在生物系统中作用的研究,包括治疗或毒性作用。体外药理学领域利用实验室培养的细胞模型和离体组织技术研究药物的作用,并预测药物在体内模型中的药效作用^[46]。体外药理学数据为化合物在临床阶段的试验成功提供了宝贵的资料。多个合同研究组织提供了多种经过验证并涵盖广泛作用靶点的体外药理学检测方法,该方法除了确定新的化学物质对作用靶点的药效外,还可以进行选择性的筛选和分析^[9]。这些检测可以作为独立的筛选方法或筛选平台。研究中选用的有助于实现3R原则的药理学试验及生物标志物见表2。以下就离体组织和受体结合研究进行介绍。

4.2.1 离体组织 在药物作用的分子机制研究中,受体是最重要的环节。通过观察和定量组织对药物的一些生理反应来研究受体的特征,是研究药物-受体相互作用的间接药理学方法。化合物的药理活性可以通过离体组织试验快速获得。由于这些

使用简单易行,20世纪初的研究人员就能够定义药物和受体之间的相互作用、预测药物作用,并制定药物受体理论的数学模型^[47]。已有文献报道了多种离体组织中同一类型受体的分离方法,其中最常用的离体组织类型来源于心肌、血管平滑肌和胃肠及其他平滑肌^[48-50]。

4.2.2 受体结合研究 放射性配体结合研究已经用于鉴定和描述各种组织中的受体位点。这些研究促进研究人员对配体(内源性和外源性)和受体分子之间相互作用的了解,并阐明了药物作用的模式和可能导致受体功能改变的机制。通过这些研究可以确定两个主要参数,即给定的一类受体位点的“密度(B_{max})”及其同各种配体的“亲和力”^[51]。把上述研究确定的值与来自体外和体内功能研究的值进行比较,药理学方法和放射性配体结合方法在受体表征方面存在细微的差异。受体结合研究缺乏功能性反应,但激动剂与结合位点的相互作用及其对温度、各种离子的敏感性以及对鸟嘌呤核苷酸的敏感性可以提供有效提示^[9,52]。膜制剂几乎没有扩散障碍,因此可以很好地估计药物在受体室中的实际浓度。此外,放射性配体结合研究识别配体结合位点,其可能代表或可能不代表真正的受体。因此,必须谨慎对待结果。

在药物研发项目中,使用来自重组细胞和天然

表2 研究中选用的有助于实现3R原则的生物标志物

Table 2 Biomarkers for 3R principles in research

类型	生物标志物
受体-G	腺苷、降钙素、内皮素、组胺、神经介肽、激肽原、肾上腺素大麻素γ-氨基丁酸、白细胞三烯、神经肽Y、松弛素、血管紧张素、趋化因子、甘丙肽、黑皮质素、神经降压素、血清素、Apelin、胆囊收缩素、胰高血糖素、M受体、食欲素、尾加压素II、蛙皮素、补体5a、谷氨酸、神经激肽、飘零能、加压素、缓激肽、多巴胺、神经肽W/B、神经肽S、前列腺素类物质、生长抑素、钙敏感、游离脂肪酸、生长激素、N-甲酰基肽、甲状旁腺激素、蛋白酶激活、促肾上腺皮质激素释放因子、糖蛋白激素、溶血磷脂、孤儿药(A类)、促甲状腺激素释放激素、血管活性肠肽、降钙素基因相关的肽、促性腺激素释放激素、黑色素浓缩激素、阿片类和阿片样药物、血小板激活因子
离子通道-电	钙通道、钾通道、钠通道、瞬时受体电位通道
压门控通道	
转运蛋白	腺苷转运蛋白、大麻类转运蛋白、血清素、多巴胺、GABA、溶质载体(SLC)转运蛋白、TP结合盒(ABC)转运蛋白、胆碱转运蛋白、去甲肾上腺素
激酶	蛋白酪氨酸激酶、蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶、非典型激酶、其他激酶
表观遗传学	DNA甲基转移酶、DNA修复和有丝分裂酶、去甲基化酶、拓扑异构酶、组蛋白甲基转移酶、组蛋白乙酰转移酶
&DNA相关	
其他	磷酸酶、蛋白酶、环氧化酶、HIV蛋白酶

组织的膜开发并实施了多种治疗靶标如G蛋白偶联受体(GPCR)、离子通道(包括hERG)、转运蛋白等的放射性配体结合研究^[53-55]。数百种体外试验可用于利用分离或克隆的动物和/或人类受体、离子通道、酶、转运蛋白和其他成分来确定药物或化学品的疗效和安全性。

4.3 体外药物处置研究

药物处置研究是机体处理化学物质的过程,即机体对药物的吸收、分配、代谢和清除(Absorption, Distribution, Metabolism, and Elimination, ADME)^[56]。药效学过程则描述了化学物质或受试物质如何在分子、细胞、器官、宿主和群体水平影响有机体^[57]。随着对ADME分子基础的理解,使得在超越完整的人体或动物中研究药动学变得可能。通过将体外特征性的具体过程数据与描述全身药动学过程之间相互作用的计算机模型结合在一起,可以预测完整的生物体暴露后将会发生什么。体外ADME研究的主要用途包括^[58-59]:1)预测体内的药动学;2)提供和/或描述ADME过程以及利用体外检测观察体内效果;3)预测药物之间的相互作用。体外ADME研究有助于优化候选药物的药动学特征,确定代谢途径并为体内研究的设计提供有价值的信息。根据厂家对ADME参数的要求,目前已有多个合同研究组织可提供标准化和定制检测分析,主要包括生理生化研究、吸收/分布检测、代谢稳定性研究、CYP450检测及药物转运蛋白的检测^[60-62]。利用体外方法预测体内药动学的2个重大挑战是确定体外条件和体内情况下的药动学特征之间的联系及开发和实施计算机模拟与建模。

4.4 斑马鱼模型

多年来小鼠模型一直用于检测新药,但其成本很高。斑马鱼由于其遗传的易跟踪性和饲养方式简便,已成为研究胚胎发育和人类疾病发病机制的重要脊椎动物模型^[63]。此外,斑马鱼幼虫是一种有吸引力的药物筛选工具,因其个体小(2 mm)和身体透明性使其容易在多孔培养板中繁殖,并可通过荧光检测技术进行评估。相关的实验结果也表明,斑马鱼胚胎对心血管疾病药物、抗血管生成药物和抗癌药物的反应与哺乳动物模型相似^[64]。这表明斑马鱼模型可以作为药物发现和筛选过程中体外模型和体内模型之间的桥梁。此外,药物所导致的斑马鱼和其他哺乳动物的病理变化也相似。目前斑马鱼模型已经用于肿瘤异种移植模型及肿瘤转移、抗癌药物研发以及基于表型的药物发现等方面的

研究^[65-66]。

5 展望

21世纪的药物毒性测试终点将由动物试验转向基于人源性细胞系、细胞和/或细胞组分等动物试验替代方法的检测策略。未来药物毒性测试的研究内容主要包括化合物的特性分析、含毒性通路及靶向测试的毒性测试,以及剂量-反应与毒性数据外推模型的研究。毒性测试的重点将集中于敏感性终点的选择与评价、细胞-反应网络、高通量与中通量筛选方法的构建及应用、作用机制及作用模式、毒性通路以及系统生物学效应等方面。生物标志物的鉴定、开发和验证也将在实现3R原则方面发挥重要作用。目前,全球正在努力并把精心设计的分析方法、仪器和策略落实到药物发现和开发中,同时,全球监管机构也与学术界和制药行业积极合作。这种集体协作和多机构基金资源的有效利用将推动并实现在毒性和药效试验中充分减少、优化和替代动物使用。展望未来,随着生物标志物的发现和仪器的不断创新,相信“芯片上的肝脏”,“芯片上的人体”等观念和梦想将成为现实。

6 结语

尽管体外替代试验存在自身的局限性,如体外试验系统不能适用于所有组织和器官,而且在体外培养条件下不存在吸收、分布、代谢和排泄的正常系统机制等。但无论从药物毒理学的学科发展还是从经济角度考虑,体外替代法对外源性化学物质危害评价及管理均具有重要意义,在减少动物使用、缩短试验周期、减少试验影响因素、降低试验成本及阐明外源性化学物质的毒性机制以及提高动物福利等方面均较传统动物试验有显著的优势。另外,每一种体外替代试验的应用都需要进行反复验证并得到法规的认可,这需要花费较多的时间和精力来完成,同时,也会因替代方法的使用而产生新的问题。因此,要借鉴国外体外替代试验的经验,加强体外替代试验的研究、验证与法规认可,推动替代方法在药物毒理学研究领域的应用,为我国药物研发、质量评价和公众用药安全有效提供技术保障。

参考文献

- [1] Stokes W S. Validation and regulatory acceptance of toxicological testing methods and strategies[M]. In: Hayes A W and Kruger C L (eds) Hayes' principles and methods of toxicology. 6th ed. Boca Raton: CRC Press, 2014, pp. 1103 - 1128.

- [2] Stokes W S. Animals and the 3Rs in toxicology research and testing: the way forward [J]. Human Exp Toxicol, 2015, 34(12): 1297-1303.
- [3] May J E, Xu J, Morse H R, et al. Toxicity testing: the search for an *in vitro* alternative to animal testing [J]. Br J Biomed Sci, 2009, 66(3): 160-165.
- [4] 彭双清, 郝卫东, 伍一军, 等. 毒理学替代法[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2009: 5-16.
- [5] Berg N, De Wever B, Fuchs H W, et al. Toxicology in the 21st century--working our way towards a visionary reality [J]. Toxicol In Vitro, 2011, 25(4): 874-881.
- [6] Piersma A H, Burgdorf T, Louekari K, et al. Workshop on acceleration of the validation and regulatory acceptance of alternative methods and implementation of testing strategies [J]. Toxicol In Vitro, 2018, 8 (50): 62-74. [Epub ahead of print]
- [7] Stokes W S. Best practices for the use of animals in toxicological research and testing [J]. Ann N Y Acad Sci, 2011, 1245: 17 - 20.
- [8] Beken S, Kasper P, van der Laan J W. Regulatory acceptance of alternative methods in the development and approval of pharmaceuticals [J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 856: 33-64.
- [9] Gupta R C. Biomarkers in toxicology [M]. Academic Press, 2014. Gopala Krishna, Saryu Goel and Kavya A. Krishna. Chapter7: Alternative animal toxicity testing and biomarkers.pp: 129-147.
- [10] 汪岩, 牛志刚, 王昂, 等. 药物毒理学及其动物替代的研究进展 [C]. 中国北方第十三届实验动物科技年会论文集, 2015 沈阳.
- [11] Eskes C, Boström A C, Bowe G, et al. Good cell culture practices & *in vitro* toxicology [J]. Toxicol In Vitro, 2017, 45(Pt 3): 272-277.
- [12] Rokni M, Razavi A R, Shokri F, et al. Enhancement of monoclonal antibody production after single and combination treatment of the hybridoma cells with all-trans retinoic acid and docosahexaenoic acid: An *in vitro* and *in vivo* study [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 59: 295-300.
- [13] Dearfield K L, Gollapudi B B, Bemis J C, et al. Next generation testing strategy for assessment of genomic damage: A conceptual framework and considerations [J]. Environ Mol Mutagen, 2017, 58(5): 264-283.
- [14] Kim J, Lee H, Selimović Š, et al. Organ-on-a-chip: development and clinical prospects toxicity assessment with an emphasis on bone marrow [J]. Drug Saf, 2015, 38 (5): 409-418.
- [15] Brannen K C, Chapin R E, Jacobs A C, et al. Alternative models of developmental and reproductive toxicity in pharmaceutical risk assessment and the 3Rs [J]. ILAR J, 2016, 57(2), 144-156.
- [16] Planz V, Lehr C M, Windbergs M. *In vitro* models for evaluating safety and efficacy of novel technologies for skin drug delivery [J]. J Control Release, 2016, 91(4): 1638-1648.
- [17] Onoue S, Suzuki G, Kato M, et al. Non-animal photosafety assessment approaches for cosmetics based on the photochemical and photobiochemical properties [J]. Toxicol In Vitro, 2013, 27(8): 2316-2324.
- [18] Sánchez-Romero N, Schophuizen CM, Giménez I, et al. *In vitro* systems to study nephropharmacology: 2D versus 3D models [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 790: 36-45.
- [19] Dvorak Z. Opportunities and challenges in using human hepatocytes in cytochrome P450 induction assays [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2016, 12(2): 169-174.
- [20] Yasgar A, Titus S A, Wang Y H, et al. A High-Content Assay enables the automated screening and identification of small molecules with specific ALDH1A1-Inhibitory activity [J]. PLoS One, 2017, 12(1): e0170937.
- [21] Zhu Z, Yang C J. Hydrogel droplet microfluidics for high-throughput single molecule/cell analysis [J]. Acc Chem Res, 2017, 50(1): 22-31.
- [22] Kirkland D, Zeiger E, Madia F, et al. Can *in vitro*, mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or *in vivo*, genotoxic activity? I. Reports of individual databases presented at an EURL ECVAM Workshop [J]. Mut Res Gen Toxicol Environm Mutag, 2014, 775-776: 69-80.
- [23] Cassano A, Raitano G, Mombelli E, et al. Evaluation of QSAR models for the prediction of ames genotoxicity: a retrospective exercise on the chemical substances registered under the EU REACH regulation [J]. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2014, 32 (3): 273-298.
- [24] Maron G P, Maron D M, Ames B N. Detection and classification of mutagens: a set of base-specific Salmonella tester strains [J]. 1994, 91(24): 11606-11610.
- [25] Kamber M, Flückigerisler S, Engelhardt G, et al. Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity [J]. Mutagenesis, 2009, 24(4): 359-366.
- [26] Krüger C T, Hofmann M, Hartwig A. The *in vitro* PIG-A gene mutation assay: mutagenicity testing via flow cytometry based on the glycosylphosphatidylinositol (GPI) status of TK6 cells [J]. Arch Toxicol, 2015, 89(12):

- 2429-2443.
- [27] 国家食品药品监督管理总局. 国家食品药品监督管理总局关于发布化妆品安全技术规范(2015年版)的公告(2015年第268号). [EB/OL]. (2015-12-23)[2018-2-24]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL1870/140161.html>.
- [28] International Conference on Harmonization(ICH). Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2(R1)(Step 4 version)[S]. 2016.
- [29] R. Frötschl, L. Müller. ICH M7: Guideline for the assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit carcinogenic risk [J]. Bull Sch Orient Safr Stud, 2015, 38(3): 658-661.
- [30] Decordier I, Mateuca R, Kirsch-Volders M. Micronucleus assay and labeling of centromeres with FISH technique [M]. Drug Saf Eval, 2011, 115-136.
- [31] 文海若, 宋捷, 毛志慧, 等. 啮齿类动物骨髓微核试验规范化方法介绍及背景数据采集 [J]. 药物评价研究, 2017, 40(5): 638-641.
- [32] Lukamowicz M, Woodward K, Kirsch-Volders M, et al. A flow cytometry based *in vitro* micronucleus assay in TK6 cells—Validation using early stage pharmaceutical development compounds [J]. Env Mol Mutag, 2011, 52(5): 363-372.
- [33] Jha A N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay [J]. Mutagenesis, 2008, 23(3): 207.
- [34] Erismis Uc, Ibrahim Hc, Konuk M. Evaluation of DNA damage in eurasian marsh frogs (*pelophylaxridibundus*) by comet assay for determination of possible pollution in the different lakes in central anatolia, Turkey [J]. Bull Env Cont Toxicol, 2013, 90(6): 660.
- [35] Bausinger J, Speit G. The impact of lymphocyte isolation on induced DNA damage in human blood samples measured by the comet assay [J]. Mutagenesis, 2016, 31(5): 567.
- [36] Smith C C, O'Donovan M R, Martin E A. hOGG1 recognizes oxidative damage using the comet assay with greater specificity than FPG or ENDOIII [J]. Mutagenesis, 2006, 21(3): 185-190.
- [37] Watters G P, Smart D J, Harvey J S, et al. H2AX phosphorylation as a genotoxicity endpoint [J]. Mutat Res, 2009, 679(1-2): 50-58.
- [38] Bryce S M, Bemis J C, Mereness J A, et al. Interpreting *in vitro* micronucleus positive results: Simple biomarker matrix discriminates clastogens, aneugens, and misleading positive agents [J]. Env Mol Mutag, 2014, 55(7): 542-555.
- [39] Kastan M B, Zhan Q, Eldeiry W S, et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia [J]. Cell, 1992, 71(4): 587-597.
- [40] Zhan Q. GADD45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage [J]. Mutat Res, 2005, 569(569): 133-143.
- [41] Hastwell P W, Chai L L, Roberts K J, et al. High-specificity and high-sensitivity genotoxicity assessment in a human cell line: validation of the GreenScreen HC GADD45a-GFP genotoxicity assay [J]. Mutat Res, 2006, 607(2): 160-175.
- [42] Birrell L, Cahill P C, Tate M, et al. GADD45a-GFP GreenScreen HC assay results for the ECVAM recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of new genotoxicity tests [J]. Mutat Res, 2010, 695(1-2): 87-95.
- [43] International conference on Harmonisation (ICH); guidance on S2(R1). Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use; availability. notice [J]. Fed Reg, 2012, 77(110): 33748-33749.
- [44] Asanami S, Shimono K, Sawamoto O, et al. The stability of rat peripheral blood in subchronic studies for the micronucleus assay [J]. Mutat Res, 1995, 347(2): 73.
- [45] Cammerer Z, Elhajouji A, Suter W. *In vivo*, micronucleus test with flow cytometry after acute and chronic exposures of rats to chemicals [J]. Mutat Res, 2007, 626(1-2): 26.
- [46] Monk K R, Hamann J, Langenhan T, et al. Adhesion G protein-coupled receptors: from *in vitro* pharmacology to *in vivo* mechanisms [J]. Mol Pharmacol, 2015, 88(3): 617-623.
- [47] Frecker V. Theoretical prediction of drug-receptor interactions [J]. Drug Metabol Drug Interact, 2011, 26(3): 91-104.
- [48] Sanger G J, Broad J, Kung V, et al. Translational neuropharmacology: the use of human isolated gastrointestinal tissues [J]. Br J Pharmacol, 2013, 168(1): 28-43.
- [49] Yeo J M, Tse V, Kung J, et al. Isolated heart models for studying cardiac electrophysiology: a historical perspective and recent advances [J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2017, 28(3): 191-200.
- [50] Avolio E, Alvino V V, Ghorbel M T, et al. Perivascular cells and tissue engineering: Current application and untapped potential [J]. Pharmacol Ther, 2017, 171: 83-92.
- [51] Fang Y. Ligand-receptor interaction platforms and their applications for drug discovery [J]. Expert Opin Drug Discov, 2012, 7(10): 969-988.
- [52] Zeilinger M, Pichler F, Nics L, et al. New approaches for

- the reliable *in vitro* assessment of binding affinity based on high-resolution real-time data acquisition of radioligand-receptor binding kinetics [J]. EJNMMI Res, 2017, 7 (1): 22.
- [53] Franchet C, Dorange I. GPCR binding technologies: An overview [J]. Curr Top Med Chem, 2015, 15(24): 2476-2483.
- [54] Yanamandra M, Mitra S, Giri A. Development and application of P13K assays for novel drug discovery [J]. Expert Opin Drug Discov, 2015, 10(2): 171-786.
- [55] Yan M, Zhang K, Shi Y, et al. Mechanism and pharmacological rescue of berberine-induced hERG channel deficiency [J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 5737-5747.
- [56] Tsaioun K, Blaauboer B J, Hartung T. Evidence-based absorption, distribution, metabolism, excretion (ADME) and its interplay with alternative toxicity methods [J]. ALTEX, 2016, 33(4): 343-358.
- [57] Ishida S. Organs-on-a-chip: Current application and consideration points for *in vitro* ADME-Tox studies [J]. Drug Metab Pharmacokinet, 2018, 33 (1): 49-54.
- [58] Blaauboer B J. The integration of data on physic-chemical properties, *in vitro*-derived toxicity data and physiologically based kinetic and dynamic as modeling a tool in hazard and risk assessment. A commentary [J]. Toxicol Lett, 2003, 138 (1-2): 161-171.
- [59] Andrade E L, Bento A F, Cavalli J, et al. Non-clinical studies in the process of new drug development-part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies [J]. Braz J Med Biol Res, 2016, 49 (12): e5646.
- [60] Zhuang L, Xia H, Gu Y, et al. Theory and application of microdialysis in pharmacokinetic studies [J]. Curr Drug Metab, 2015, 16(10): 919-931.
- [61] Jaroch K, Jaroch A, Bojko B. Cell cultures in drug discovery and development: The need of reliable *in vitro-in vivo* extrapolation for pharmacodynamics and pharmacokinetics assessment [J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 147: 297-312.
- [62] Desai P V, Sawada G A, Watson I A, et al. Integration of *in silico* and *in vitro* tools for scaffold optimization during drug discovery: predicting P-glycoprotein efflux [J]. Mol Pharm, 2013, 10 (4): 1249-1261.
- [63] Dai Y J, Jia Y F, Chen N, et al. Zebrafish as a model system to study toxicology [J]. Env Tox Chem, 2014, 33 (1): 11-17.
- [64] Sarmah S and Marrs J A. Zebrafish as a vertebrate model system to evaluate effects of environmental toxicants on cardiac development and function [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(12): 2123.
- [65] Zhang R, Barbieri C M, Garcia-Calvo M, et al. Moderate to high throughput *in vitro* binding kinetics for drug discovery [J]. Front Biosci (Schol Ed), 2016, 8: 278-297.
- [66] Liu X, Baarsma H A, Thiam C H, et al. Systematic identification of pharmacological targets from small-molecule phenotypic screens [J]. Cell Chem Biol, 2016, 23(10): 1302-1313.