评述

军事医学科学院药物毒理学研究 30 年回顾

吴纯启, 王全军, 关勇彪, 王和枚, 丁日高*, 廖明阳

军事医学科学院毒物药物研究所, 国家北京药物安全评价研究中心, 北京 100850

* 联系人, E-mail: dingrigao@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2011-07-16; 接受日期: 2011-08-27

doi: 10.1360/052011-613

摘要 军事医学科学院的药物毒理学研究源远流长、与时俱进, 经过近 30 年的积累与发展, 已建立一整套服务于新药发现、临床前开发、临床实验及上市后监督再评价等完整研发链条的药物毒理学研究体系和学科群, 涵盖新药早期发现毒理学、非临床安全性评价以及药物毒性作用机制研究等内容, 通过与其他学科互动与协作, 为军事医学科学院乃至全国的新药研发提供了良好的非临床安全性评价的技术平台和保障。

关键词药物毒理学
发现毒理学
GLP

新药研发是一项时间跨度长、资金投入大、风险大、多学科协同和循序渐进地推进的系统工程。其中, 药物毒理学研究在确保新药的安全性方面发挥着重要的作用, 其主要目的在于评价新药潜在的毒副作用及其发生机制, 以指导临床合理用药, 降低药物的副作用, 减少因药物毒性导致的新药开发失败^[1]。

军事医学科学院的药物毒理学研究以毒物药物研究所国家北京药物安全评价研究中心为主, 以放射医学研究所药理毒理研究室及微生物流行病学研究所药理毒理室为辅。正式、系统的研究工作自改革开放初期颁布《中华人民共和国药品管理法》和《新药审批办法》, 规定新药报批要求申报毒理学实验资料开始。经过几代药物毒理学家近 30 年的积累与发展, 目前已建立一套完整的药物毒理学研究体系, 包括发现毒理学^[2]、一般毒理学、安全性药理学、生殖与发育毒理学、毒性病理学、遗传毒理学、毒代动力学、临床病理学等学科分支, 实现了在新药发现、临床前开发、临床实验及上市后监督再评价完整研发链条中提供全过程新药毒理学研究技术平台和对外服务。所涉及的研究领域涵盖新药早期发现毒理学、非临床安全性评价、毒性作用机制研究以及已上市药物的安

全性再评价研究等。近 30 年来, 我们对以蒿甲醚、本芴醇为代表的近百种不同类型创新药物进行了系统的非临床安全性评价, 全面研究了以马兜铃酸等为代表的 10 余种中药或化学药物的毒性作用机制, 为全面提高军事医学科学院以及国内创新药物研发的整体技术水平, 为确保研发药物的安全性做出了贡献。

1 集腋成裘, 药物毒理学研究历史源远流长

整体而言, 军事医学科学院的药物毒理学研究与国际上的药物毒理学研究实践以及中国新药研发的发展水平和重点相一致。国际上, 20 世纪 60 年代初因反应停导致新生儿海豹肢畸形惨剧后, 美国 FDA 颁布了新药临床前毒理学实验的指导原则, 以动物的体内毒理学实验为主体的药物毒理学研究在西方发达国家随之陆续展开。中国的药物毒理学研究自抗美援朝战争中研发抗疟药开始, 军事医学科学院微生物流行病学研究所药物毒理研究室通过对青蒿提取成分青蒿素的药理毒理实验, 开发出防疟片 1 号等防疟、抗疟药。1981 年 10 月, WHO 疟疾化疗科

引用格式: 吴纯启, 王全军, 关勇彪, 等. 军事医学科学院药物毒理学研究 30 年回顾. 中国科学: 生命科学, 2011, 41: 890-893, doi: 10.1360/052011-613

学工作组第 4 次会议在北京召开, 其中由军事医学科学院研究人员完成的青蒿素安全性评价结果获得与会的国内外专家肯定. 针对毒理学实验所存在的各种不端科研行为, 1978 年 12 月 22 日, 美国食品药品监督管理局制订颁布了 GLP(药物非临床研究质量管理规范)法规. 1983~1984 年, 军事医学科学院的滕翥和教授率先在国内推介 GLP 概念, 并制订出国内的首份标准操作规程(SOP)-临床生物化学分析. 1991 年 6 月在军事医学科学院召开了首次 GLP 研讨会, 其后由军事医学科学院毒物药物研究所的新药毒理研究室和微生物流行病学研究所药物毒理研究室联合组建国家北京药物安全评价研究中心(以下简称中心), 并于 1993 年被国家科技部列入“1035”工程的三大安评中心之一. 在 1993~2003 年的 10 年间, 军事医学科学院李培忠教授等主持了中国《药物非临床研究质量管理规范》的起草、完善和最终定稿工作. 21 世纪初, 国际上的药物毒理学研究开始向新药发现、临床前开发等阶段的全程式安全性评价转变, 国家北京药物安全评价研究中心率先在国内提出并建立新药毒性早期优化筛选系统, 并开展了毒理基因组学、替代毒理学等研究. 2005 年 2 月, 毕数十载之功于一役, 国家北京药物安全评价研究中心一次性通过 SFDA 的 GLP 认证. 目前, 国家北京药物安全评价研究中心已成为国内规模较大、发展较快、拥有较好软硬件设施的 GLP 中心之一, 有 6 名专题负责人通过考试获得中国毒理学家资格认证证书, 4 名毒性病理学家通过中国兽医病理学家资格认证考试, 1 名临床兽医获得执业兽医资格证书.

2 与时俱进, GLP 规范体系及分支学科逐步与国际接轨

经过近 10 余年的努力, 国家北京药物安全评价研究中心 GLP 规范体系及分支学科建设逐步实现与国际规范的全面接轨. 第一, 动物背景数据是药物安全性评价的基础数据, 直接关系到药物毒性评价的结果. 中心所建立的动物背景数据库既包括多种动物(大小鼠、犬、猴和小型猪等), 又涵盖了多个专业领域(血液生化、组织病理学、生殖发育毒性、遗传毒性、致癌性等), 大大提高 GLP 安全性评价实验的水平. 第二, 供试品分析是保障给药浓度、稳定性和体内暴露量的重要技术手段. 目前, 中心已设立供试

品分析管理部, 建立了一套行之有效的标准化、规范化的供试品分析测试管理制度, 确定了针对不同类别供试品的分析测试方法. 第三, 毒性病理诊断检查是判定药物造成病理性损伤的部位、程度、性质和预后等的重要依据. 在大部分毒理学研究中, 病变的发现、部位的确定、病因的探索都离不开毒性病理学的检查和诊断. 目前, 中心拥有先进、配套的病理专业仪器设备, 建立了符合国际规范的病理诊断术语与诊断标准体系, 并逐步实行病理同行评议制度, 毒性病理报告的质量得到稳步提高. 建立了基于数字化切片与互联网技术的远程病理会诊平台, 与国内外同行的交流日益活跃与频繁. 在确保常规石蜡切片、HE 染色制片质量的前提下, 在特殊脏器如眼球、皮肤与睾丸等脏器的制片方面也形成了自己的特色^[3]. 第四, 实验数据的计算机采集及处理系统是提高安全性评价实验质量和数据准确可靠性的重要保证. 中心通过与国内相关的软件公司合作, 按照美国 FDA 1997 年颁布的《电子记录、电子签名法》的要求, 开展 GLP 实验室计算机软件的认证和试运行研究, 建立了计算机采集及处理实验数据的软件系统 Easy GLP. 第五, 为了提高动物实验的质量和保障动物的福利, 中心于 2006 年建立“动物管理与使用委员会 IACUC”, 施行动物实验的伦理审查制度, 并于 2010 年 6 月通过国际实验动物评估和认可管理委员会(AAALAC)的完全认证.

毒代动力学研究方面, 中心建立了生物样品处理、分析检测、动力学模型的分析与拟合等技术, 对依替米星等多种新药进行了伴随毒代动力学研究. 安全性药理学研究方面, 中心建立了清醒大鼠、犬和猴心血管药理学的植入式芯片遥测系统, 可实时检测各种生理指标, 保证真实地反应机体状态; 同时引进了 hERG 钾通道电流的膜片钳检测系统. 在生殖与发育毒理学研究中, 中心建立了生殖器官生精小管分期等组织病理学检查程序和计算机辅助精子分析方法; 并在国内率先开展了小儿运脾止泻颗粒对幼龄大鼠的毒性研究.

3 甘居人梯, 为创新药物研发提供药物毒理学评价支撑和服务

近 30 年来, 军事医学科学院的药物毒理学工作者一直甘居人梯, 为军事医学科学院乃至全国各地

的创新药物研发提供临床前安全性评价或再评价的支撑或外包服务。对以蒿甲醚、本芴醇为代表的百余种不同类型创新药物进行了系统的非临床安全性评价, 为全面提高中国创新药物研发的技术水平, 为确保创新药物的安全性做出了贡献。

在中国首创的青蒿素类抗疟药的研发过程中, 发现不同的给药途径(口服、肌肉、静脉、皮下和腹腔注射)、方式(每天 1 次、每天 3 次或持续静脉滴注)、剂量及时间, 其产生的神经毒性也各不相同。以肌肉注射的神经毒性最强, 口服给药远小于静脉注射的毒性; 水溶性药物青蒿琥酯只有在每天 3 次肌肉注射时才有明显的神经毒性; 溶于芝麻油中的蒿乙醚的毒性远大于溶于聚乙二醇中的毒性^[4], 为选择合适的临床给药方式和剂量提供了毒理学依据。高月等人^[5]系统研究了中药“十八反”与细胞色素 P450 系统的诱导与抑制作用的相关性。胡中慧等人^[6,7]针对穿心莲内酯引起急性肾损伤具有发病急、时程短的特点, 研究不同纯度的穿心莲制剂对大鼠尿液早期检查指标的动态变化规律, 并通过 NMR 代谢组学分析发现相关联的尿液代谢组学特征谱。同时采用各种组学技术和特异性的铜整合剂研究纳米铜的肝脏毒性, 发现其肝毒性特征与三羧酸循环、尿素循环及氨基酸代谢密切相关的基因、蛋白质和代谢物的改变密切相关。

4 防患未然, 在药物开发早期应用发现毒理学优化先导化合物

为了尽早淘汰因安全性因素而不适合开发的化合物, 提高新药早期毒性评价的科学预测性, 需要开展药物研发早期的发现毒理学研究, 建立具有较高的测试通量、特异性和敏感性、样品用量低等特点的筛选系统, 进行新化学实体的药理活性和毒性的同步筛选。中心先后建立了一整套药物早期毒性优化筛选系统, 引进了计算机毒性预测系统 Topkat。所涵盖的毒性终点和相应的检测方法包括: 检测基本细胞毒性的 MTT 比色法、长期蛋白合成抑制实验等; 检测遗传毒性的 Ames 波动实验、SOS 显色实验及染色体畸变实验、非 GLP 小鼠淋巴瘤实验等; 体外检测睾丸毒性的鼠种质细胞原代培养、支持细胞原代培养等; 检测发育毒性的大鼠着床后全胚胎培养实验、小鼠胚胎干细胞实验、中脑细胞微团培养实验等; 体外

检测致癌性的人永生化支持细胞株培养等模型, 以及基于 GFP 报告基因系统的 CYP450 诱导活性的检测模型。上述检测模型与方法的有效性和可靠性已在 Z24, SU5416, L1, L3, L4 等 Bcl-2 蛋白拮抗剂, ACT-711X 系列治疗老年血管硬化化合物, PHS10A 系列减肥药的研发实践中得到了证实^[8-10]。此外, 本中心还利用药物的肝毒性常与机体的炎症应激反应有关这一特征, 通过脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)致炎原预处理后继之以供试品染毒的方法, 建立了预测药物特异质肝毒性的评价模型^[11]。

5 追踪前沿, 建立基于机制毒理学的毒性评价模式

传统的药物毒性作用机制研究主要采用体内和体外实验方法, 近年利用毒理基因组学^[12]、蛋白质组学^[13]和代谢组学等技术^[14]分析生物的体液、组织中的基因表达谱、蛋白表达谱和内源性代谢产物谱的变化来探求机体的毒理作用方式, 提供毒性筛选、毒性靶器官、毒性标志物和毒作用机理等大量资料和信息, 有助于阐明化合物在药物毒性方面的种属特异性反应^[15]。

近年来, 国家北京药物安全评价研究中心率先在国内建立了基于组学分析中的实验设计、样品采集和处理、数据收集、统计分析以及生物信息学分析等操作过程的标准程序, 并成功应用于军事医学科学院的新药研发进程中。如采用 NMR 分析技术研究抗乙肝病毒药物 Bay41-4109 的肝毒性, 发现 Bay41-4109 肝毒性与苯巴比妥相似, 通过 CAR 和 PXR 等核受体介导的信号途径发挥毒作用; 利用毒理基因组学技术、基于 NMR 分析的代谢组学技术和二维凝胶电泳及质谱分析研究在研新药 Z24 的肝毒性, 发现其肝毒性与 DR4 介导的细胞凋亡有关, 并通过 ¹HNMR 分析发现了特异性的代谢产物谱。在马兜铃酸肾毒性研究方面, 赵剑宇等人^[16]发现毒性的病理表现与乙酸、柠檬酸、肌酐、氧化三甲胺等内源性代谢物相关, 为进一步研究马兜铃酸肾毒性发生机制提供了有意义的提示。

6 结语

自中国加入 WTO 以来, 国内的创新药物研发随

着国外大型制药企业进入国内市场, 新技术、新方法、新理念的引进和运用而取得了巨大的进步. 随着“十一五”科技部“重大新药创制”重大专项的实施, 转化毒理学、毒性生物标志物、计算毒理学等逐步应用到新药研发进程中, 中国的药物毒理学也势必迎来

新的发展机遇与挑战. 军事医学科学院的药物毒理学工作者一定将秉承老一代毒理人的优良传统, 发扬职业军人令行禁止、埋头苦干的优良作风, 百尺竿头、更进一步, 开创军事医学科学院药物毒理学研究的新局面.

参考文献

- 1 袁伯俊, 廖明阳, 李波. 药物毒理学实验方法与技术. 北京: 化学工业出版社, 2007
- 2 王全军, 吴纯启, 廖明阳. 发现毒理学的研究进展. 中国新药杂志, 2005, 14: 958-961
- 3 瞿文生, 袁本利, 王和枚, 等. 提高 GLP 实验室石蜡制片质量的技术要点. 军事医学科学院院刊, 2010, 34: 560-562
- 4 赵艳红, 王京燕. 青蒿素类药物神经毒性及其作用机制. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2002, 20: 49-51
- 5 王宇光, 高月. 中药十八反药理毒理研究进展. 中国实验方剂学杂志, 2003, 9: 60-62
- 6 胡中慧, 吴纯启, 王全军, 等. 2 种莲必治注射液对大鼠的毒性作用. 药物不良反应杂志, 2010, 12: 10-16
- 7 胡中慧, 吴纯启, 王全军, 等. 莲必治注射液单次静脉给药对大鼠尿液内源性代谢物质的影响. 药物不良反应杂志, 2010, 12: 83-90
- 8 秦爱平, 袁素波, 王全军, 等. Z24 系列化合物遗传毒性的优化筛选. 中国新药杂志, 2006, 15: 773-776
- 9 王青秀, 吴纯启, 廖明阳. 细胞色素 P450 表达的诱导机制及其筛选方法的研究进展. 国外医学药学分册, 2003, 30: 43-46
- 10 秦爱平, 袁素波, 王全军, 等. Z24 系列化合物一般毒性的比较研究. 军事医学科学院院刊, 2007, 31: 50-53
- 11 李玉凤, 吴纯启, 廖明阳. 细菌脂多糖对氯丙嗪肝毒性作用的影响. 毒理学杂志, 2005, 19: 216
- 12 王全军, 廖明阳. 毒理芯片技术在药物毒理学中的应用. 国外医学药学分册, 2003, 30: 110-113
- 13 王全军, 廖明阳. 蛋白质组学在药物毒理中的应用. 国外医学药学分册, 2003, 30: 238-241
- 14 王全军, 吴纯启, 廖明阳, 等. 代谢组学研究进展. 中国新药杂志, 2004, 13: 5-9
- 15 王全军, 吴纯启, 丁日高, 等. 新药发现阶段药物毒理学研究的策略与方法. 中国新药杂志, 2010, 19: 20-23
- 16 赵剑宇, 颜贤忠, 彭双清. 关木通肾毒性的代谢组学研究. 中草药, 2006, 37: 725-730