

# 药物临床前安全性评价中脾脏的作用和意义

林志 李珊珊 张 頔 杨艳伟 李 波

脾脏是静脉给予药物后引流的部位。脾脏两个主要的功能区域是造血的骨髓和富含淋巴的白髓。白髓位于动脉周围,包括动脉周围淋巴鞘(T细胞)、比邻的滤泡(B细胞)和边缘区(B细胞)。边缘区位于红骨髓之间,但边缘区与红髓的连接处并不是很清晰。此外,边缘区包含一种特殊的巨噬细胞。不同种属动物的脾脏具有相似的结构,但是大鼠的边缘区比较突出。

根据STP指导性文章,免疫系统的常规病理学评价中淋巴器官每一分隔区域应该分别进行评估,并且推荐采用描述性的术语而不是解释性的术语<sup>[1]</sup>。因此,脾脏中动脉周围淋巴鞘(PALS)、淋巴滤泡、边缘区以及红髓应该分别就其大小和细胞构成的变化进行记录。此外,淋巴滤泡生发中心要注意其是否存在细胞增生或减少的改变。给与免疫调节剂后可以在PALS和(或)边缘区观察到其大小和细胞密度的变化,并且在生发中心看到淋巴滤泡数目的改变。有报道当存在潜在的免疫毒性时,滤泡细胞构成密度和生发中心发育的测量是最敏感的预测指标,而红髓中细微的变化通常很难观测到<sup>[2-4]</sup>。

## 一、脾脏的结构和功能

作为造血器官脾脏由丰富的纤维肌性血管组成,因而其复杂的血管系统成为血液中外来或感染物质的过滤场所。运动型动物,包括大多数的食肉动物、犬和猫类以及马,其脾脏的血管有明显的肌层,在奔跑时血管收缩将多余的血液注入循环血液中。相反,反刍动物和大多数实验动物脾脏含较多的结缔组织,其血管多数时间处于扩张状态,其体积不会出现明显和快速的变化。脾脏通过血液接触抗原,它没有输入的淋巴管但有输出的淋巴管。脾脏的大动脉分支成为肌性动脉,这些肌性小动脉周围是密集的淋巴细

胞,紧靠的是T淋巴细胞,外层为骨髓来源的淋巴细胞。这些淋巴细胞共同组成了动脉周围淋巴鞘(PALS)。从肌性动脉分枝的第3级动脉将抗原递呈给生发中心的树突状细胞。其他的动脉最终成为多排的小静脉或筛状静脉,将血液输送到静脉窦和滤过系统。通常大多数血液直接通过脾脏再回到血液循环系统中,只有3%的血液进入滤过系统的静脉窦,在这里外来物质和衰老的红细胞被清除。因此,所有血液每天至少1次通过脾脏的滤过系统1次。大的巨噬细胞黏附在具有孔隙的静脉窦,呈现为隆起、胞膜皱褶,这很适合巨噬细胞捕捉衰老的血细胞。脾脏红髓血流较慢的区域中血糖、pH值以及胆固醇都降低,而这对于经过此的血细胞是有损伤的,尤其是红细胞。脾脏滤过系统中静脉扩张时途经此处的血细胞停留时间延长,借此衰老的红细胞被巨噬细胞从血液中清除。

## 二、大体病理学改变

对脾脏为环境解剖结构的理解有助于帮助我们认识脾脏大体病理学的改变。比如在巴比妥麻醉下从新鲜死亡动物身上摘下的脾脏呈急性肿胀改变,但在大体检查中脾脏将持续收缩,血液将慢慢渗出。然而,慢性肿胀改变的脾脏往往静脉窦中细胞构成增加,呈现一个较干的切面。脾脏的生发中心在滤泡型B细胞淋巴瘤的动物中其大体观察非常明显,因为该病变为灶性并局限于脾脏的生发中心。同样,在淀粉样变的脾脏其生发中心大体观察也非常清晰,该病变也以局灶性的方式局限于生发中心,使得新鲜脾脏标本切面上肉眼可观察到蜡样灶,也称为“西米脾(sago spleen)”。在恶病质的动物中,脾脏体积小,相对血细胞较少,脾脏内比较干,切面呈纤维化的改变。

## 三、组织病理学评价

1. 骨髓的组织病理学改变:PALS区域细胞构成的减少通常存在于放射、病毒或药物导致的T细胞的坏死或凋亡。无胸腺动物同样可以在这些富含T细胞的区域出现细胞构成的减少。同样,富含B细胞的区域也可以出现特殊的细胞构成的减少<sup>[3]</sup>。尽管

基金项目:国家科技支撑计划:药物非临床安全性评价关键技术研究(2006BA114B06)

作者单位:100176 北京,中国药品生物制品检定所/国家药物安全评价监测中心

通讯作者:林志,电子邮箱:linzhi@niecbp.org.cn

这种处理因素导致的改变较少出现,但随着新免疫调节药物的研发这种改变也可能逐渐地增多。这种改变可能暗示 T 细胞非依赖的体液免疫应答的缺乏。N,N 二甲基 - p - 甲苯胺和叠氮胸苷/美沙酮 HLC 能够导致骨髓面积和细胞构成的全面减少。PALS 区域细胞构成的增加可以在某些特定的化学物质处理后观察到,例如柠檬醛和雄烯二酮等。但是,在胸腺 T 细胞性淋巴瘤的早期转移灶和其他淋巴瘤、白血病中也能观察到这些区域细胞构成的增加。

急性抗原诱导的免疫应答可以导致 B 细胞区域细胞构成增加,在次级淋巴滤泡中生发中心比较明显。抗原刺激将诱导不成熟的 B 细胞或免疫母细胞的增生。这些细胞比成熟的淋巴细胞体积要大一些、染色较浅、核膜明显呈圆形、边界清晰。他们将成熟为产生免疫球蛋白的浆细胞,然后进入骨髓。患单核细胞型白血病(MCL)的 F344 大鼠由于边缘区存在大颗粒淋巴细胞(白血病细胞)的浸润使得该区域细胞构成明显增加。骨髓细胞构成的显著增加有时很难与肿瘤病变区别<sup>[4]</sup>。

2. 骨髓的组织病理学改变:骨髓中淋巴细胞的改变也应该进行评价。在淋巴细胞破坏的情况下可能会见到反应性髓外造血。这种情况要注意与患 MCL 的 F344 大鼠骨髓中大颗粒淋巴细胞的浸润相区别。这种情况也有可能存在,在系统中淋巴细胞数目显著减少时骨髓中的淋巴细胞数目也减少。尽管骨髓中存在淋巴细胞和巨噬细胞,红细胞仍是骨髓中的主要细胞。因此,脾脏的大小和重量以及组织学差异较大,它与麻醉的方式和解剖时放血的情况相关。然而,脾脏重量由于放血造成的差异在犬和猴中明显,而不同于大鼠。有证据表明脾脏重量是免疫毒性一个不敏感的指标。脾脏重量当与剂量相关联以及存在组织病理学改变时才具有一定的毒理学意义<sup>[5]</sup>。

尽管骨髓在免疫刺激应答中可以发生变化,其他的影响因素也不能忽略。比如循环改变、髓外造血、巨噬细胞聚集、纤维组织增生以及色素沉着等。以上脾脏骨髓的病理改变可能都与药物或化合物有关,因而在进行药物安全性评价应该注意脾脏的病理形态改变。

3. 老年化病变:老年化的大鼠和小鼠中 B 细胞丰富的滤泡和边缘区细胞构成会增加而浆细胞不会有明显的增加。老年大鼠肿大的脾脏中可观察到淋巴细胞构成减少及髓细胞增加,尤其是 SD 大鼠,但其病因学不清楚。

4. 其他细胞及病变:这些细胞的存在、严重程度及定位也需要注意,即浆细胞、凋亡细胞、易染体巨噬细胞、含色素颗粒的巨噬细胞、粒细胞和造血细胞。尽管肉芽肿、巨噬细胞聚集、纤维化和坏死不是主要的组织病理学变化,但其在脾脏的评价中也需要注意。在致癌性研究以及致敏性试验中,对于脾脏细胞构成的改变也需要注意。有报道在过敏性研究中采用局部淋巴结分析(LLNA)可以更为客观地评价脾脏中淋巴细胞的增生<sup>[6]</sup>。

#### 四、展 望

目前,关于脾脏毒性研究随着新技术新方法的开展也逐渐进入了一个崭新的领域。脾脏毒性分子机制的研究成为各国学者研究的热点。研究发现,脾脏纤维化可能是脾脏的重要的瘤前病变。苯胺致脾脏纤维化以及瘤形成中上游信号 AP-1 和 NF- $\kappa$ B 的活化是其病变发生发展的重要步骤<sup>[9]</sup>。此外,转基因小鼠以及基因敲除小鼠的应用对于探讨药物导致的毒性机制研究具有重要意义。全氟辛酸的毒性研究发现小鼠胸腺和脾脏淋巴细胞数目减少,呈萎缩的改变。采用过氧化物酶体增生物激活受体(PPAR $\alpha$ )基因敲除小鼠中全氟辛酸所致的脾脏萎缩可以明显消减,因而考虑全氟辛酸所致的免疫调节是部分通过了过氧化物酶体增生物激活受体而起作用的<sup>[10]</sup>。总之,多种新方法新技术的应用促进了人们对于药物/化合物诱导的脾脏分子病理机制的研究和探讨。

脾脏是推荐进行组织病理学评价的主要淋巴器官,其在药物临床前安全性评价中具有重要的意义。外来物质或代谢产物的免疫毒性可以造成脾脏的损伤,影响脾脏中淋巴细胞的构成<sup>[11]</sup>。深入探讨脾脏组织病理学变化的特点有助于更清晰地认识药物诱导的免疫毒性损伤,为我国新药研发以及药物的临床前安全性评价提供更科学的依据。

#### 参考文献

- 1 Haley P, Perry R, Ennulat D, *et al.* STP position paper: best practice guideline for the routine pathology evaluation of the immune system. *Toxicol Pathol*, 2005, 33(3):404-407
- 2 Cesta MF. Normal structure, function and histology of the spleen. *Toxicol Pathol*, 2006, 34(5):455-465
- 3 De Jesus M, Nicola AM, Frases S, *et al.* Galactoxylomannan-mediated immunological paralysis results from specific B cell depletion in the context of widespread immune system damage. *J Immunol*, 2009, 183(6):3885-3894
- 4 Suttie AW. Histopathology of the spleen. *Toxicol Pathol*. 2006, 34(5):466-503

- 5 Sellers RS, Morton D, Michael B, *et al.* Evaluation of Organ Weights for Rodent and Non-rodent Toxicity Studies: A Review of Regulatory Guidelines and a Survey of Current Practices. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(5):751-755
- 6 Chipinda I, Anderson SE, Butterworth LF, *et al.* Increased cell proliferation in spleen and lymph nodes peripheral to contact allergen application site. *Toxicology*, 2009, 257(3):113-116
- 7 Activation of oxidative stress-responsive signaling pathways in early splenotoxic response of aniline. Wang J, Wang G, Ansari GA, Khan MF. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2008,230(2):227-234
- 8 Khan, MF, Kannan S, Wang JL. Activation of transcription factor AP-1 and mitogen-activated protein kinases in aniline-induced splenic toxicity. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006, 210(1-2):86-93
- 9 Wang J L. Cytokine gene expression and activation of NF- $\kappa$ B in aniline-induced splenic toxicity. *Toxicol Appl, Pharmacol*, 2005, 203(1):36-44
- 10 Qazi MR, Xia Z, Bogdanska J, *et al.* The atrophy and changes in the cellular compositions of the thymus and spleen observed in mice subjected to short-term exposure to perfluorooctanesulfonate are high-dose phenomena mediated in part by peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPARalpha). *Toxicology*, 2009, 260(1-3):68-76
- 11 Ruehl - Fehlert C, Bradley A, George C. *et al.* Harmonization of immunotoxicity guidelines in the ICH process - pathology considerations from the Guideline Committee of the European Society of Toxicological pathology. *Exp Toxicol Pathol*, 2005, 57(1):1-5

(收稿:2009-10-09)

## HPV 疫苗的现状和问题

雷曼殊 张蔚 陈娇

宫颈癌(cervical cancer)是导致全球妇女病死率占第2位的恶性肿瘤,每年新发病例超过50万,每年新发宫颈癌病例中,超过80%的宫颈癌发生在发展中国家<sup>[1]</sup>。近年来宫颈癌发病出现年轻化趋势,这主要与人类乳头瘤病毒(HPV)感染增多有关。因此,研发安全、有效、经济的宫颈癌疫苗迫在眉睫,具有重大的经济学价值和社会意义。

### 一、HPV 简介

HPV 是一种嗜黏膜和皮肤上皮的 DNA 病毒。20 世纪 70 年代发现宫颈癌的发生与 HPV 有关,20 世纪 80 年代宫颈癌活组织检查发现 HPV16。HPV 感染是一种常见的性传播疾病,大多数由低危型的如 HPV-6 和 HPV-11 感染,造成良性生殖器疣;而高危型 HPV 与肛门及生殖器区域的癌前病变及恶性病变有关。对多数患者来说,生殖道 HPV 存留可达 1 年,直到出现另一新型别的 HPV 感染才自然消退。研究显示,HPV16 和 HPV18 会存留更长时间周期。持续 HPV 感染是宫颈上皮,癌变的重要危险因素,与宫颈癌及泌尿生殖道其他癌症的发生关系密切,对大量的宫颈癌组织标本经研究发现,99% 的属于 HPV 高危型,分别是 HPV16 型、18 型、31 型和 45 型,而 HPV16 和 18 型感染率最高,HPV16 约 60%,HPV-18 约 10%~20%<sup>[2-4]</sup>。而且不同地区感染的 HPV

类型不同。在欧洲最常见 HPV31、33 型;非洲西部常见 HPV45 型,而 HPV39、59 型仅在美洲的中部和南部出现;45、58 型在亚洲多见,HPV52、58 型则在中国女性中检出率较高<sup>[5-7]</sup>。

### 二、宫颈癌筛查的开展情况

随着宫颈细胞学检查的开展,让宫颈癌不再是女性致命杀手。但是一些国家因为资源问题和必需的筛选程序,在世界上的最贫穷的地区不得不忍受疾病的重击。很多低收入国家的女性没有机会去进行常规的宫颈癌筛查:在最近 5 年里仅 5% 的女性能够负担起宫颈细胞学检查<sup>[8]</sup>。在拉丁美洲的部分地区和加勒比地区,死于宫颈癌的女性远多于死于分娩时的并发症。2006 年,包括中国、哥斯达黎加和印度在内的一些国家,开始重视宫颈癌的筛查工作。一些国家投资 HPV 血液检测技术,以鉴别导致宫颈癌发生的高危型 HPV。自规范的宫颈细胞学筛查在美国开展 40 多年以来,美国女性宫颈癌患病率下降了 75%<sup>[9]</sup>。仅仅对育龄女性进行宫颈癌筛查是不够的,因为宫颈癌高峰年龄在 45~55 岁间。在有些国家,进行妇科检查仍要被责难,如在南非,骨盆检查被看做向别人屈服。

在欧洲,每年大约有 51000 例患者被诊断为宫颈癌<sup>[10]</sup>。在印度,高达 98% 宫颈癌患者能检测出 HPV 感染,而 HPV16 检出率达 80%~90%。不同于西方