

第五章 食品毒理学实验基础

以科学研究为目的而进行科学饲养繁殖的动物称为实验动物。实验动物学作为在现代科学带动崛起的一门以生命科学为主体,以医学、生物为核心的综合性独立的新兴学科,正以崭新的面貌,异乎寻常的速度,影响着整个生命科学各领域,成为生命科学研究的奠基学科和重要支撑条件,因而受到世界各国政府和科学家的重视,甚至作为衡量一个国家生物科学水平高低的标志之一。

食品毒理学的很多研究工作需要通过动物实验来进行。使用实验动物进行科研的优点是花费人力、物力较少,时间短,易发现单因素与结果的关系,能提供大量有价值的可与人类生命活动现象相类比的资料。在毒理学实验研究中,健康的实验动物是保证工作顺利进行和获得正确可靠的研究结果的重要条件。

食品毒理学研究外源化学物对于机体(特别是人体)的有害作用及其机制。食品毒理学研究的主要手段是动物实验。体内试验是以实验动物为模型,最终目的是通过外源化学物对实验动物的毒性反应,向人(原型)外推,以期评估外源化学物对人的危害及危险性。体外实验主要用于筛选和预测急性毒性和机制研究;人体实验和流行病学调查则可进一步深化和证实动物实验中所得到的资料。实际上,食品毒理学作为一门实验科学是以动物实验为中心的,食品毒理学动物实验的设计、实施、结果观察和评价是毒理学研究的基本方法。

食品毒理学试验是对化学物安全性评价的主要手段,已为各国际组织或各国的行政部门所颁布的规程或指南列为常规试验,有称为法规毒理学试验(regulatory toxicology test),这类毒理学试验是以筛查和描述外来化学物的毒性为目的,属于描述毒理学范畴。

第一节 食品毒理学实验的原则和局限性

一、食品毒理学实验的原则

在毒理学的试验中,有三个基本的原则。

第一个原则,化学物在实验动物产生的作用,可以外推于人。基本假设为:①人是最敏感的动物物种;②人和实验动物的生物学过程包括化学物的代谢,与体重(或体表面积)相关。这两个假设也是全部实验生物学和医学的前提。以单位体表面积计算在人产生毒作用的剂量和实验动物通常相近似。而以体重计算则人通常比实验动物敏感,差别可能达10倍。因此可以利用安全系数来计算人的相对安全剂量。已知人致癌物都对某种实验动物具有致癌性;实验动物致癌物是否都对人有致癌性,还不清楚,但这已作为动物致癌试验的基础。一般认为,如果某一化学物对几个物种实验动物的毒性是相同的,则人的反应也可能是相似的。

第二个原则是实验动物必须暴露于高剂量,这是发现对人潜在危害的必需的和可靠的方法。此原则是根据质反应的概念,随剂量或暴露增加,群体中效应发生率增加。毒理学试验中,一般要设3个或3个以上剂量组,以观察剂量-反应(效应)关系,确定受试化学物引起毒效应及其毒性参数。毒性试验的设计并不是为了证明化学品的安全性,而是为了表征化学品可能产生的毒作用。仅仅检测受试化学物在人的暴露剂量是否引起毒效应是不够的。当引起毒效应的最低剂量(LOAEL)与人的暴露剂量接近时,说明该化学物不安全。当该剂量与人的暴露剂量有很大的距离(几十倍,几百倍或以上),才认为具有一定安全性,此距离越大,安全性越可靠。如果在研究中所用的一系列的剂量不能引起毒性效应,则认为所用剂量还不足够高,应增加剂量,以确定受试化学品的毒性。但如果在试验的最高剂量组的剂量与人可能的暴露剂量有足够的安全界限,则对于安全性评价来说未观察到毒效应的研究是可以接受的。在毒理学试验中实验模型所需的动物总是远少于处于危险中的人群。为了在少量动物得到有

统计学意义的可靠的结果,需要应用相对较高的剂量,以使效应发生的频率足以检测。例如,低达0.01%的癌症发生率,这意味着在100万人群中有100人发生癌症,此发生率太高,不能为公众接受。在实验动物直接检测如此低发生率将至少需要30000只动物。因此,别无选择,在毒理学试验中,对相对较少的实验动物必须以较高剂量进行试验,然后根据毒理学原则外推估计低剂量暴露的危险性。

第三个原则,成年的健康(雄性和雌性未孕)实验动物和人可能的暴露途径是基本的选择。选用成年的健康(雄性和雌性未孕)实验动物是为了使实验结果具有代表性和可重复性。以成年的健康(雄性和雌性未孕)实验动物作为一般人群的代表性实验模型,而将幼年和老年动物、妊娠的雌性动物、疾病状态作为特殊情况另作研究。这样可降低实验对象的多样性,减少实验误差。毒理学实验结果的敏感性取决于受试物处理引起毒效应强度和实验误差两个因素,处理引起的毒效应强,实验误差小,则实验结果的敏感性增加,反映受试物处理的真实效应,反之亦然。在下文所述的实验设计是要规定实验条件,严格控制可能影响毒效应的各种因素,实施质量保证,降低实验误差。只有这样,才能保证试验结果的准确性和可重复性,不能重复的实验结果是没有任何科学价值的。外源化学物以不同途径染毒,实验动物表现的毒性可有很大差异,这是由于因染毒部位解剖生理特点不同,外源化学物吸收进入血液的速度和量也不同,首先到达的器官和组织也不同。因此,毒理学试验中染毒途径的选择,应尽可能模拟人接触该受试物的方式。

二、食品毒理学实验的局限性

历史上,环境污染物及某些药物所引起的中毒和死亡多次发生,引起各国的重视,推动了毒理学的发展,各国政府主管部门制订和多次修订了有关药品和各种化学品安全性评价的规范或准则,希望在啮齿类和非啮齿类的毒理学研究能为有关候选新药和各种化学品提供安全性证据,但以动物的资料预测人的毒性的预测价值尚有待于研究。Lumley(1990)和Igarashi(1994)根据有限的临床资料报告,发现对人的毒性约一半不能由临床前(动物)毒性研究预测。Heywood(1983)报告27个化学物(大多为药品)的靶器官毒性在大鼠和狗(或猴)之间的相符率仅20%。Olson等(1998)报告131种化学物对动物的毒性与人的毒性相符率,啮齿类为6%,非啮齿类(狗和猴)为28%,合并达36%,所有的物种相符率可达69%。按照目前的规范,进行毒理学安全性评价,可以在一定程度上提高新药和各种化学品的使用安全性,但仍不能完全排除对人健康危害的风险。WHO在《临床前药物安全性实验原则》的文件中指出“虽然事先对生物活性物质进行了最仔细彻底的研究,但给人使用时总是不可避免地要冒一定的风险。”这就是利用动物实验的局限性,即动物实验的结果外推到人的不确定性。

用实验动物的毒理学实验资料外推到人群接触的安全性时,会有很大的不确定性。这是因为,外源化学物的毒性作用受到许多因素的影响。

首先,实验动物和人对外源化学物的反应敏感性不同,有时甚至存在着质的差别。虽然在毒理学实验中通过用两种或两种以上的动物,并尽可能选择与人对毒物反应相似的动物,但要完全避免物种差异是不可能的。而且,实验动物不能述说涉及主观感觉的毒效应,如疼痛、腹胀、疲乏、头晕、眼花、耳鸣等,这些毒效应就难以或不可能发现。在动物实验中,可观察到体征(sign),而没有症状(symptom)。

第二,在毒理学实验中,为了寻求毒作用的靶器官,并能在相对少量的动物上就能得到剂量-反应或剂量-效应关系,往往选用较大的染毒剂量,这一剂量通常要比人实际接触的剂量大得多。有些化学物在高剂量和低剂量的毒性作用规律并不一定一致,如大剂量下出现的反应有可能是由于化学物在体内超过了机体的代谢能力,这就存在高剂量向低剂量外推的不确定性。

第三,毒理学实验所用动物数量有限,那些发生率很低的毒性反应,在少量动物中难以发现。而化学物一旦进入市场,接触人群往往会很大。这就存在小数量实验动物到大量人群

外推的不确定性。

第四,实验动物一般都是实验室培育的品系,一般选用成年健康动物,反应较单一,而接触人群可以是不同的人种、种族,而且包括年老体弱及患病的个体,在对外源化学物毒性反应的易感性上存在很大差异。

以上这些都构成了从毒理学动物实验结果向人群安全性评价外推时的不确定因素。

第二节 毒理学毒性评价试验的基本目的

毒理学实验的常规部分是毒性评价或安全性评价试验。为了对受试物的毒性进行全面的测试,增强测试结果的可靠性,权威机构规定了评价程序,以保证毒性评价研究可以达到普遍能接受的最低要求和原则。毒理学家认为毒理学试验程序应该有一定的灵活性。对毒理学试验的原理和设计思路的深入理解,有助于研究者对评价程序的实施,在发现新的现象或线索时,可进行一些补充实验来证实,并可进一步研究其机制。

毒性评价或安全性评价方面的基本目的包括以下几点:

1. 受试物毒作用的表现和性质。在急性和慢性毒性试验中,观察受试物对机体的有害作用,对有害作用的观察应该是对每个实验动物进行全面的逐项的观察和记录。发现有害作用是进行剂量-反应(效应)研究的前提。

2. 剂量-反应(效应)研究。剂量-反应(效应)研究是毒性评价和安全性评价的基础。通过对不同有害作用的剂量-反应(效应)研究,可以得到该受试物的多种毒性参数。在急性(致死性)毒性试验中,应该得到LD₅₀,也可以得到LD₀₁和MTD。在急性非致死性毒性试验中,应该得到急性可观察到有害作用的最低剂量(LOAEL)和未观察到有害作用的剂量(NOAEL)。在亚急性、亚慢性及慢性毒性试验中,应该得到相应的LOAEL和NOAEL。在致突变、致癌和致畸等特殊毒性试验中,剂量-反应(效应)研究将为确定受试物是否具有这些特殊毒性提供依据。在致畸试验也可得到LOAEL和NOAEL;在致突变、致癌试验中,尽管认为是无阈值的,但也可得到表观的LOAEL和NOAEL。

3. 确定毒作用的靶器官。确定受试物有害作用的靶器官,是毒理学研究的重要目的,以阐明受试物毒作用的特点,并为进一步的机制研究和毒性防治提供线索。

4. 确定损害的可逆性。一旦确认有害作用存在,就应研究停止接触后该损害是否可逆和消失,器官和组织功能是否能恢复,还是像化学致癌作用那样停止接触后损害继续发展?毒性的可逆性关系到对人的危害评价,如果受损的器官组织能够修复并恢复正常功能,则可能接受较高危险性的接触水平。

当然,毒理学研究还可能有其他的目的和要求,例如毒作用的敏感检测指标和生物学标志、毒作用机制研究、受试物的毒物动力学和代谢研究、中毒的解救措施等。对这些要求,应扩展常规试验的设计以包括有关的项目,或者另外设计和进行靶器官毒理学研究及机制毒理学研究。

第三节 实验动物的选择和处理

毒理学的动物实验是以实验动物作为研究对象的,为获得可靠的研究结果,先决条件是正确地选用实验动物。

一、实验动物物种的选择

外源化学物的固有毒性往往在人和不同物种实验动物之间表现不同,物种差别可以表现在量方面,引起毒性的剂量差别,即毒性大小的差别,如有报道,对人138种化学物的敏感

性为大鼠的1.8~10.5倍。物种差别也可以表现在质方面(毒性效应的差别),如除草剂百草枯(对草快)对人引起肺损伤,而对狗则未见到。因此,需要对实验动物物种进行选择。物种间毒性反应差别的原因,可能归纳为解剖与生理学差异,遗传与代谢的差异等。

对实验动物物种选择的基本原则是:选择对受试物在代谢、生物化学和毒理学特征与人最接近的物种;自然寿命不太长的物种;易于饲养和实验操作的物种;经济并易于获得的物种。

在选择实验动物时存在固有的限制。可利用的物种不多,主要原因包括经济(购买和饲养的费用)、实验动物的寿命、行为和生活能力、处置,也许最重要的是对该物种“正常”生理和病理的资料,以及对所研究的毒性的敏感性。要利用对受试物在代谢、生物化学和毒理学特征与人最接近的物种,这就需要了解实验动物物种和人对受试化学物的吸收、生物转化等资料,但这往往并不切合实际,因为首先需要进行一系列的比较研究,而对人体的资料在动物试验之前是很难得到的。

在毒理学研究中常用的实验动物物种如下:大鼠、小鼠、豚鼠、兔、狗。其他可能用到的实验动物有地鼠、猕猴、小型猪、鸡等。其中,大鼠、小鼠、豚鼠和地鼠为啮齿目动物。常用实验动物生物学和生理学参数见表5-1。

以上所述毒理学实验常用的实验动物各物种中,实际上没有一种完全符合上述物种选择的原则,目前常规选择物种的方式是利用两个物种,一种是啮齿类,另一种是非啮齿类。系统毒性研究最常用的啮齿类是大鼠和小鼠,非啮齿类是狗。豚鼠常用于皮肤刺激试验和致敏试验,兔常用于皮肤刺激试验和眼刺激试验。遗传毒理学试验多用小鼠,致癌试验常用大鼠和小鼠,致畸试验常用大鼠、小鼠和兔。迟发性神经毒性试验常用母鸡。一般假设,如以与人相同的接触方式、大致相同的剂量水平,在两个物种有毒性反应,则人有可能以相同的方式发生毒性反应。当不同物种的毒性反应有很大的差异时,必须研究外源化学物在不同物种的代谢、动力学及毒作用机制,然后才可实验结果外推到人。

表5-1 常用实验动物生物学和生理学参数

参 数	猴	狗	猫	兔	大 鼠	小 鼠	豚 鼠	地 鼠
成体体重(kg)	3.5	14.0	3.3	3.7	0.45	0.035	0.43	0.12
寿命(a)	16	15	14	6	3	1.5	31	
水消耗(ml/d)	450	350	320	300	35	6	145	30
饲料消耗(成本g/d)	150	400	100	180	10	5	12	10
成体代谢(cal / kg d)	158	80	80	110	130	600	100	250
体温(°C)	38.8	38.9	38.6	39.4	38.2	37.4	38.6	38.0
呼吸频率 (次 / min)	50 (40~60)	20 (10~30)	25 (20~30)	53 (40~65)	85 (65~110)	160 (80~240)	90 (70~100)	83 (35~130)
心率(次 / min)	200	100	120	200	328	600	300	450
血压 mmHg (收缩 / 舒张)	159 / 127	148 / 100	155 / 100	110 / 80	130/90	120 / 75	77/50	108/77
出生体重(g)	500~700	1100~2200	125	100	5-6	1.5	75~100	2.0
断乳时体重(g)	4400	5800	3000	100~1500	40~50	10~12	250	35
开眼(d)	出生当天	8~12	8~12	10	10~12	11	出生当天	15
妊娠(d)	168	63	63	31	21	20	67	16
性周期(d)	28	22	15~28	15~16	4~5	4~5	16~19	4
动情期(d)	1~2	7~13	9~19	30	1	1	1	1
窝数量	1	3~6	1~6	1~13	6~9	1~12	1~5	1~12

断乳年龄(周)	16~24	6	6~9	8	3~4	3	2	3~4
生殖年龄(月)	54	9	10	6~7	2~3	2	3	2
生殖期(年)	10~15	5~10	4	1~3	1	1	3	1
生殖季节	任何时间	春, 秋	冬季2~3个月	任何时间	任何时间	任何时间	任何时间	任何时间
所需面积(ft ²)*	6	8	3	3	0.4	0.4	0.7	0.34
环境温度(°C)	18~28	18~28	18~28	18~28	19~25	19~25	19~25	19~25
血容量(ML/Kg)	75	79	60	53	65	80	75	85
凝血时间(s)	90	180	120	300	60	14	60	143
HCT(%红细胞)	42	45	40	42	46	41	42	50
Hb(g / bl)	12.5	16.0	11.8	13.6	14.8	16.0	12.4	12.0

*所需面积(ft²), 及为英尺, 1ft=30.48cm. 引自: 参考书7, P13

二、实验动物品系的选择

品系(strain)是实验动物学的专用名词, 指用计划交配的方法, 获得起源于共同祖先的一群动物。

实验动物按遗传学控制分类可分为:

①近交系: 指同胞兄妹或亲子之间连续交配20代以上而培育的纯品系动物。如小鼠有津白I、津白II、615, DBA / 1和DBA / 2, BALB/C, C3H, C57B / 6J, A和A / He等。

②杂交群动物(杂交1代, F1), 指两个不同的近交系之间有目的进行交配, 所产生的第一代动物。

③封闭群: 一个种群在五年以上不从外部引进新血缘, 仅由同一品系的动物在固定场所随机交配繁殖的动物群。

如昆明种小鼠、NIH小鼠、LACA小鼠、F344大鼠、Wistar大鼠、SD(Sprague-Dauley)大鼠等。

根据实验动物遗传的均一性排序, 近交系最高、杂交群次之、封闭群较低。不同品系实验动物对外源化学物毒性反应有差别, 所以毒理学研究要选择适宜的品系, 对某种外源化学物毒理学系列研究中应固定使用同一品系动物, 以求研究结果的稳定性。

遗传毒理学一般利用啮齿类动物, 主要是小鼠或大鼠。如果有合适的理由, 其他物种也可接受。有的文献报告在小鼠骨髓微核试验MS / Ae品系比ddy, CD-1或BDF品系更敏感。但一般认为还没能证明某一品系对所有的遗传毒性物质比其他品系都敏感。在致癌试验中对实验动物的品系有一定的要求, 特别重视有关病理损害的自发发生率。例如, 某些大鼠品系垂体肿瘤发生率高, 则不适用于靶器官为内分泌系统的毒性研究。又如B6C3F1雄小鼠肝肿瘤高发率可能有碍于肝致癌反应的检测。

三、对实验动物微生物控制的选择

按微生物控制分类, 实验动物分为四级, 见表5-2。对于毒性试验及毒理学研究应尽可能使用二级(或二级以上)的动物, 以保证实验结果的可靠性。

表5-2 实验动物微生物等级

级别	要 求
I 级	普通动物, 应没有传染给人的疾病
II 级	清洁动物, 除I级标准外, 种系清楚, 没有该动物特有的疾病
III 级	无特定病原体动物(SPF), 除II级标准外, 动物为剖腹产或子宫切除产、按纯系要求繁殖, 在隔离器内或层流室内饲养, 可有不致病细菌丛, 没有致病病原体
IV 级	无菌动物, 在全封闭无菌条件下饲养的纯系动物, 动物体外不带有任何微生物和寄生虫(包括绝大部分病毒)

四、个体选择

实验动物对外来化学物的毒性反应还存在个体差异，应注意实验动物的个体选择。

1. 性别 同一物种、同一品系的实验动物雌雄两性通常对相同外源化学物毒性反应类似但雌雄两性对化学物的毒性敏感性上存在着差别。有文献报道在149种外源化学物中雌雄敏感性比值小鼠平均为0.92，大鼠为0.88，这种差别表现在实验动物性发育成熟开始，直至老年期。可见雌雄两性动物的性激素性质和水平是关键因素，一般讲雄性动物体内微粒体细胞色素P-450酶系活性大于雌性动物，所以经该酶系降解解毒的外源化学物对雌性动物表现的毒性大，然而经该酶活化增毒的外源化学物却相反。

如果已知不同性别的动物对受试物敏感性不同，应选择敏感的性别。如对性别差异不清楚，则应选用雌雄两种性别。如实验中发现存在性别差异，则应将不同性别动物的实验结果分别统计分析。

在遗传毒理学体内试验中，对性别的选择有几种意见：

(1) 对单个物种应用两种性别。

(2) 对单个物种应用两种性别，除非已在一个性别得到阳性反应，就不必对另一种性别进行试验。

(3) 对单个物种应用两种性别，除非经毒代动力学研究证明受试物(和其代谢产物)在雄性和雌性无差别和 / 或如果在确定剂量的预试验证明有相等毒性。此假定在非遗传毒性与遗传毒性之间有相关。

(4) 对单个物种常规用一种性别(雄性或雌性)，除非预期 / 证明存在性别差异。由于历史的原因UDS体内 / 体外试验常规用雄性大鼠。

一般来说，对于初次试验的受试物，应该采用两种性别。对大鼠和小鼠各一种性别进行试验可能比单个物种两种性别提供更好的危害鉴定，但这需要更多的资料来证明。

2. 年龄和体重 实验动物同人类一样，生命全程大体上可区分三个阶段，即幼年期(从出生到性成熟之前)、成年期和老年期。在成年期，各种激素(包括性激素)、代谢酶都处于高峰稳定期，并对外源化学物的毒性反应差异较小，且有代表性。在幼年期和老年期，对外源化学物的生物转运和生物转化，靶器官和受体的敏感性均与成年期不同。如有报道外源化学物对成年动物的致死剂量(或LD₅₀)与新生动物比较，其比值在0.002~16之间，表明有的外源化学物对新生动物毒性低，也有的毒性反应强。毒理学试验选用实验动物的年龄取决于试验的类型。急性试验一般选用成年动物;慢性试验因实验周期长，应选用较年幼的或初断乳的动物，以使实验周期能复盖成年期。实验动物的年龄应由其出生日期来定，但实际工作中常以动物的体重粗略地判断动物的年龄，作为挑选适龄动物的依据。同一试验中，组内个体间体重差异应小于10%，各组间平均体重差异不应超过5%。

3. 生理状态 在毒理学试验中动物如出现妊娠，则影响体重及其他指标的检测结果，并且，性激素对外源化学物代谢转化有影响，故应选用未产未孕的雌性动物。雌雄动物应分笼饲养。但在某些试验如显性致死试验、致畸试验及繁殖试验等，则需有计划地合笼交配。

4. 健康状况 实验动物的健康状况对毒理学试验结果有很大的影响，因此应选用健康动物。对于实验动物微生物控制的选择实际上是选择健康状况的一个重要指标，健康个体的选择还包括了其他方面。健康动物应发育正常、体形健壮，无外观畸形，被毛浓密、有光泽、顺贴而不蓬乱，行动灵活、反应敏捷，眼睛明亮有神，表皮无溃疡和结痂，天然孔道干净无分泌物等。

为确保选择健康动物，一般在实验前观察5~7天。对于大鼠和狗的亚慢性和慢性试验，可在实验前采血进行血液学和血液生化学检查，异常的动物应剔除；对狗应常规驱除肠道寄生虫。

合理的全营养饲料对维持实验动物健康和正常的生理活动是至关重要的。高温与低温时

外源化学物的毒性一般比常温为高。气温升高而毒性增大,这种毒性变化可能是由于温度影响了毒物动力学所致。高温、高湿环境共存时皮肤更易于外源化学物经皮肤吸收。

人工昼夜周期,即使动物处于人工调控的12小时白昼(早6点至晚6点)及12小时黑夜(晚6点至次日早6点),以稳定其生物时间节律。在正常、健康的动物每天24小时的生理规律不尽相同,即存在着生物时间节律,对外源化学物的毒性反应也有昼夜性时间变化,因此出现毒理学新的分支学科,称为时间毒理学(Chronotoxicology)。由于动物存在时间节律,外源化学物在不同时间表现的毒性反应有差别,所以在毒理学实际工作中,尤其是进行亚慢性和慢性染毒时,每日的染毒时间应固定一致,以防止出现时间毒性的影响。而且采取动物生物样品(如血、尿等)进行各种指标的化验或一些生理功能的检查(如血压、体温等)也应固定时间。

根据我国的法规和有关规定,国家实行实验动物的质量监督和质量合格证制度。实验动物的保种、饲养、供应和应用单位,由各级医学动物管理委员会进行定期监督、监测,并颁发实验动物和实验设施的合格证书(有效期5年)。应用的实验动物必须有完整的资料。进行动物实验的人员应经培训,取得资格认可(上岗证)。实验动物的饲养设施、环境条件及饲料等必须符合有关的国家标准。

第四节 食品毒理学试验设计要点

一、体内毒理学试验设计

1. 剂量分组 在毒理学试验中,最重要的就是研究剂量-反应(效应)关系,也就是当外源化学物染毒剂量增加,实验动物的毒性反应(效应)随之而增强。剂量-反应(效应)关系的存在是确定外源化学物与有害作用的因果关系的重要依据,也可证明实验结果的可靠性。因此,在毒理学试验中,一般至少要设3个剂量组(即高剂量组、中剂量组、低剂量组),希望能得到满意的剂量-反应(效应)关系。

一般要求,高剂量组应出现明确的有害作用,或者高剂量组剂量已达到染毒的极限剂量(如大鼠或小鼠灌胃或注射的最大容量)。低剂量组应不出现任何可观察到的有害作用(即相当于NOAEL),但低剂量组剂量应当高于人可能的接触剂量,至少等于人可能的接触剂量。中剂量组的剂量介于高剂量组和低剂量组之间,应出现轻微的毒性效应(即相当于LOAEL)。高、中、低剂量组剂量一般按等比例计算,剂量间距应为2或 $\sqrt{10}$,低剂量组剂量一般为高剂量组剂量的1/10~1/20。

急性毒性试验分组和剂量选择见下一章。亚慢性毒性试验的高剂量应该用急性毒性的LD₅₀的某个分数或LD₀₁。在长期或致癌试验,最高剂量选择为由亚慢性毒性试验确定的最大耐受剂量(MTD),毒动学或代谢资料可能有助于决定剂量,特别是有受试物或其代谢产物的蓄积或有剂量依赖性解毒改变的证据。有人认为,在新药安全性评价中,试验期限等于或小于14天,限度剂量为2g/(kg·d);如大于14天限度剂量为1g/(kg·d)。在无毒性情况下,对限度剂量的例外是基于该途径的最大染毒容量。

毒理学试验常用的对照有4种:

(1) 未处理对照组(以前有称为空白对照组):即对照组不施加任何处理因素,不给受试物也不给以相应的操作。未处理对照组往往用于遗传毒理学试验中,确定指示生物的生物学特征的本底值,进行质量控制。

(2) 阴性(溶剂/赋形剂)对照:不给处理因素但给以必须的实验因素(溶剂/赋形剂),以排除此实验因素(溶剂/赋形剂)的影响,阴性对照作为与染毒组比较的基础。没有阴性对照组就不能说明受试物染毒与有害作用之间的关系。例如,在实验中,染毒各剂量组实验动物出现某些异常、甚至死亡;如果阴性对照组没有发现异常,我们可以认为此种异常和死亡是由于受试物的毒作用;如果阴性对照组也出现同样的异常和死亡,则应考虑是由于实验动物

患某种传染病或其他非实验因素所致，必须重新进行实验。

(3) 阳性对照：用已知的阳性物(如致突变物)检测试验体系的有效性。阳性对照组最好与受试物用相同的溶剂、染毒途径及采样时间。在遗传毒理学试验、致畸试验和致癌试验中都使用了阳性对照组，阳性对照组是用已知的致突变物、致畸物或致癌物染毒，应该得到肯定的阳性结果(即致突变性、致畸性或致癌性)。这是由于这些试验，特别是遗传毒理学试验的变异较大，为了进行质量控制而设置阳性对照组。当同时进行的阴性(溶剂 / 赋形剂)对照组不能得到阴性结果，阳性对照组不能得到阳性结果，说明此次实验质量有问题，全部数据无效，必须重新实验。在遗传毒理学试验中，阳性对照与受试物应该用同样的途径和溶剂 / 赋形剂，但如有困难，则不同的染毒途径、不同溶剂 / 赋形剂也可以接受。

(4) 历史性对照：由本实验室过去多次实验的对照组数据组成，上述三种对照都可构成相应的历史对照。历史对照的最好用途是通过同质性检验检查试验体系的稳定性，即进行实验室质量控制和保证。由于实验毒理学的各种参数至今尚没有公认的参考值，因此历史性对照均值及其范围在评价研究结果时至关重要。

以上所述适用于大多数的毒理学体内试验。在急性毒性试验测定LD₅₀或LC₅₀时，剂量组数根据选用的设计和统计学方法而定，可以是4组，也可以是5~7组。根据预实验结果，希望所设计的中间剂量组的剂量与最后得到的LD₅₀(LC₅₀)接近。由于急性毒性试验的观察指标是死亡，并伴有严重的中毒症状，对于有经验的实验者可以不设阴性对照组。当然，如果使用了一种不常用的溶剂或者要测定某种其他的参数如MTD、急性LOAEL和NOAEL，则需要设置阴性对照组。

2. 各组动物数 毒理学安全性评价试验各组动物数取决于很多因素，如实验目的和设计，要求的敏感度、实验动物的寿命、生殖能力，经济的考虑及动物的可利用性。各组动物数的设计应考虑到统计学的要求。对各种常规毒性试验的动物数要求，见以后有关章节。

3. 试验期限 某些试验(如致畸试验和多代生殖试验)的试验期限是由受试实验动物物种或品系而决定的。而其他毒性试验的期限在某种程度上由定义所决定。如急性毒性是一次或1天内多次染毒观察14天，亚慢性毒性试验规定为染毒持续至实验动物寿命的10%，对大鼠和小鼠为90天，对狗应为1年。慢性毒性试验 / 致癌试验一般规定为持续至实验动物寿命的大部分。又可分为两类，即规定试验期限的试验，或直到最敏感的组死亡率达到某一水平(通常为80%)的试验。

二、体外毒理学试验设计

此处简要讨论在遗传毒理学体外试验共同考虑的几个问题。

1. 测定受试物溶解性 应该测定受试物在试验介质中的溶解性。已注意到在试验系统暴露期内，受试物的溶解性可能改变，因为存在细胞、S9、血清等。因此，在试验开始和结束时评价溶解性是有意义的。溶解性限度就是出现沉淀的最低浓度。

2. 试验最高剂量的推荐 对可溶性受试物浓度高于10mmol/L时可因高渗透压在哺乳动物细胞引起损伤或人工假象，对细菌则无此影响。由于受试物的分子量并不一定知道(如聚合物或混合物)，因此，在大多数情况下，可溶性受试物的试验上限应该是：(1)对哺乳动物细胞为10mmol/L或5mg/ml。(2)对细菌试验为5mg/平板。当受试物供应困难或非常昂贵(如生物药剂)，最高剂量低于10mmol/L或5mg/ml(或 / 平板)是可以接受的。

对不溶性受试物最高浓度的推荐有争论，日本学者的资料表明，有的受试物仅在沉淀剂量于细菌试验和染色体畸变试验中出现遗传毒性。哺乳动物细胞具有吞噬作用，细菌不具有吞噬作用。一般认为无毒性的可溶于适当的溶剂而不溶于实验培养液(介质)中的受试物，最高浓度应是溶解性限制(即产生沉淀的最低浓度)，但不应干扰终点的计数。

对于有毒性的受试物，最高浓度在细菌试验中应该是明显显示毒性的剂量，对哺乳动物细胞试验最高剂量，基因突变试验应达到10%~20%存活率，而染色体畸变和UBS试验应达

到50%存活率。

对于没有适当溶剂，完全不溶的受试物，则可以按5mg/平板或10mmol/L(5mg/ml)进行实验以检测杂质的致突变性。或者，采用生理盐水提取物进行实验。

3. 代谢活化 代谢活化常规使用Aroclor 1254（多氯联苯1254）预处理的雄性成年大鼠肝匀浆90000g离心上清液(S9)，及相应的辅因子(NADPH再生系统)。由于各国禁用限用多氯联苯，可用苯巴比妥和β-萘黄酮联合诱导制备S9(Elliott, 1992)。对体外哺乳动物细胞试验，还可利用大鼠肝原代培养细胞等作为代谢活化系统。

4. 阳性对照 阳性对照的剂量应选择其剂量-反应的直线部分，并且构成历史性资料(历史性对照)，并以其作为实验质量控制的措施之一

5. 重复 由质控良好的实验得到明确的阴性结果和阳性结果，不强调要求重复。可疑结果则应重复实验，最好改变剂量范围 / 剂量间隔、改变S9浓度或改变实验方法进行重复。

第五节 实验动物的染毒和处置

本节简要介绍在动物实验前的实验动物准备、受试物的准备、染毒途径和方法、动物处死和生物标本采集的基本内容，详细的方法和步骤请查阅有关的毒理学实验方法专著。

一、动物实验前的准备

实验动物在购进之后，应雌雄分开饲养。一般应进行5~7天的检疫，在此期间应多次观察动物，及时剔除不健康的动物。观察期结束，将实验动物按实验设计的要求进行标记和分组。

实验动物的标记方法对啮齿动物常用染色法，可用苦味酸(黄色)、品红(红色)的酒精饱和溶液在动物被毛上染色，不同的颜色和染色部位表示不同的编号，可标出1~99号。由于被毛上颜色会逐步消失，故需重复染色。对啮齿动物还可用剪耳法标记。对狗等大动物一般用挂牌法。

实验动物分组的原则要求所有的动物分配到各剂量组和对照组的机会均等，避免主观选择倾向，减少偏性，以保证结果的准确可靠。正确的分组方法是随机分组。实验动物按性别、体重顺序编号，然后利用统计学的随机数字表，按完全随机分组法或配伍组随机分组法，将实验动物分配到各剂量组和对照组。然后应计算各组实验动物体重的均值和标准差，必要时可将实验动物适当调组，以使各组实验动物体重的均值的差别不超过允许范围。

二、受试物和样品的准备

应了解受试物的纯度及杂质成分，了解受试物的化学结构和理化性质，特别是其挥发性和溶解性。查阅文献，检索与受试物化学结构和理化性质相似的化合物的毒性资料，以作参考。对各个毒理学试验应该用同一种、同一批号受试物。受试物成分和配方必须固定。如是异构体混合物，异构体比例必须固定。活性成分的百分含量和可检测的杂质的浓度也应固定。受试物在贮存期内稳定性和在饲料中的稳定性必须进行研究并报告。受试物应一次备齐全部实验的用量。

所需受试物总量=(A×B×C×D)×1.2

式中：A为每组动物数；B为各处理组的剂量和(如0.1+0.3+1.0mg/kg=1.4mg/kg)；C为染毒次数(通常为天)；D为动物的平均体重；1.2为安全因子，防止损耗。

染毒前根据染毒途径的不同，应将受试物制备成一定的剂型。常用的是制备成水溶液、油溶液或混悬液。对溶剂和助溶剂的要求是，所用的溶剂或助溶剂应该是无毒的，与受试物不起反应，受试物在溶液中应稳定。对水溶性受试物，体内试验适当的溶剂为水(经口染毒)和等渗盐水(胃肠道外染毒)。水不溶性受试物应溶于或悬浮于适当的有机溶剂中。天然植物油(如玉米油，橄榄油)可以用作为溶剂，有两个缺点，即不可能保证得到成分完全一致的植

物油, 植物油中的抗氧化剂成分等可影响受试物的毒性 / 遗传毒性。二甲基亚砜(DMSO)不适用于体内实验, 因其毒性较高, 并且溶于DMSO的受试物在染毒后出现沉淀。

新药安全性评价推荐混悬液赋形剂为0.5%羧甲基纤维素钠或10%阿拉伯树胶; 受试物溶液应新鲜配制, 除非已证明贮存稳定。其他的剂型见下文染毒途径的介绍。

外源化学物用溶剂稀释, 一般讲浓溶液比稀溶液毒性大, 但是也有的外源化学物稀释之后毒性反而增加, 即存在所谓“稀释毒性”, 其原因尚不清楚。

在准备染毒制剂时的要点: ①在准备制剂时加热受试物不应接近改变其化学性质或物理性质的温度。②如受试物为固体, 并且评价其对皮肤的毒性, 应保持其形状和颗粒大小。③多成分的受试物(混合物)应按配方配制, 以使染毒制剂准确地反映原混合物(即其成分不应被选择性地悬浮或溶解)。④制剂应保持化学稳定性和受试物的一致性。⑤制剂应减少总试验容积, 利用溶剂或赋形剂的量不应过多。⑥制剂应易于准确染毒。⑦如可能, 制剂pH应为5~9。⑧不应用酸或碱使受试物解离(基于保护动物的原因, 并避免改变肠道或肾小管内的PH)。⑨如果应用非胃肠道途径, 终溶液应尽可能接近等渗。

对于各种染毒途径的最大容积, 以受试的实验动物物种或制剂来确定。一般规定, 染毒最大容积为: ①经口20ml/kg(对空腹动物); ②经皮2ml/kg(根据体表面积计算, 限于染毒的准确性); ③静脉1ml/kg(5分钟以上); ④肌肉注射0.5ml/kg(一个部位); ⑤每眼0.01ml; ⑥直肠0.5ml/kg; ⑦阴道: 大鼠0.2ml, 兔1ml; ⑧吸入2mg/L; ⑨鼻: 猴或狗每鼻孔0.1ml。染毒的通常容积(最大容积): 大鼠灌胃为1.0(3.0)ml / 100g体重(BW), 静注为0.5(3.0)ml / 100g BW; 小鼠灌胃为0.2(1.0)ml/20g BW, 静注为0.2(0.5)ml/20g BW; 狗灌胃为50(100)ml/10 kg BW, 静注为30(50)ml / 10 kg BW。各种规范可能有不同的规定, 应按规定进行。

三、染毒途径

毒理学试验中染毒途径的选择, 应尽可能模拟人在接触该受试物的方式。最常用的染毒途径为经口、经呼吸道、经皮及注射途径。不同途径的吸收速率, 一般是: 静脉注射 > 吸入 > 肌肉注射 > 腹腔注射 > 皮下注射 > 经口 > 皮内注射 > 其他途径(如经皮等)。

1. 经口(胃肠道)染毒 常用有灌胃、喂饲和吞咽胶囊等方式。

(1) 灌胃: 将受试物配制成溶液或混悬液, 以注射器经导管注入胃内。一般灌胃深度从口至剑突下, 最好是利用等容量灌胃法, 即受试物配制成不同浓度, 实验动物单位体重的灌胃容量相同。大鼠隔夜禁食, 小鼠可禁食4小时(因小鼠消化吸收和代谢速度较快), 均不停饮水。灌胃后2~4小时提供饲料。经口多次染毒, 一般不禁食, 但应每日定时染毒。灌胃法优点是剂量准确, 缺点是工作量大, 并有伤及食道或误入气管的可能。

(2) 吞咽胶囊: 将一定剂量的受试物装入胶囊中, 放至狗的舌后部, 迫使动物咽下, 此法剂量准确, 适用于易挥发、易水解和有异味的受试物。

(3) 喂饲: 将受试物掺入动物饲料或饮水中供实验动物自行摄入。饲料中掺入受试物不应超过5%, 以免造成饲料营养成分改变而影响实验动物的生长发育。喂饲法符合人类接触受试物的实际情况, 但缺点多, 如适口性差的受试物, 实验动物拒食; 易挥发或易水解的受试物不适用。而且, 实验动物应单笼喂饲, 以食物消耗量计算其实际染毒剂量。

2. 经呼吸道染毒 经呼吸道染毒可分为吸入染毒和气管内注入。

(1) 静式吸入染毒: 将一定数量的啮齿类动物放在密闭的染毒柜中, 加入易挥发的液态受试物或气态受试物使成一定浓度。一般50升的染毒柜接触2小时, 可放小鼠6~10只或大鼠1只。静式吸入染毒简易, 但缺点较多, 主要是随试验进行氧分压降低(因此, 实验动物数量有限), 柜内受试物浓度也逐渐下降(由于动物吸入消耗、为被毛及染毒柜壁吸附所致), 而且实验动物有经皮吸收的可能。

静式吸入染毒多以计算方法得到染毒柜内受试物浓度, 以 mg/m^3 表示。

(2) 动式吸入染毒: 由染毒柜、机械通风系统和配气系统三部分构成。对设备的要求较

高, 优点是在染毒过程中染毒柜内氧分压及受试物浓度较稳定, 缺点是消耗受试物的量大, 并易于污染环境。动式吸入染毒又分为整体接触和口鼻接触两种。

动式吸入染毒柜中受试物的浓度应实际监测。

(3) 气管内注入: 实验动物在麻醉后, 将受试物注入气管, 使之分布至两肺。此法用于建立急性中毒模型及尘肺研究。

3. 经皮肤染毒 经皮肤染毒的目的有两种。一种是经皮染毒毒性试验, 如经皮LD₅₀测定常用大鼠, 皮肤致癌试验常用小鼠。另一种是皮肤刺激和致敏试验, 皮肤刺激试验常用兔和豚鼠, 皮肤致敏试验用豚鼠。

试验前用机械法(剃毛)或化学法(硫化钠或硫化钡)脱毛。要求是不应损伤脱毛区的表皮, 脱毛区面积不大于动物体表面积的10%~15%。于脱毛后24小时涂抹一定量受试物, 盖上一层塑料薄膜, 再用无刺激性的胶布固定, 接触规定的时间。

4. 注射染毒 注射用药品, 应以注射途径染毒, 对大小鼠可用静脉注射, 对非啮齿类可模拟临床用药途径, 如狗可用后肢隐静脉注射, 而啮齿类的尾静脉和肌肉注射难以多次染毒, 必要时可改为皮下注射。注射染毒, 应调整受试物的pH及渗透压, pH应5~8, 最好是等渗溶液, 动物对高渗的耐受力比低渗强。静脉注射应控制速度, 大鼠尾静脉注射最好控制在10秒以上。腹腔注射在遗传毒理学实验中有时也用, 但在致畸试验、肝UDS研究不应该用腹腔注射, 以避免可能的损伤和局部高浓度对靶器官的影响。

四、实验动物处死及生物标本采集

1. 实验动物处死方法 应尽量减少因处死方法不当而影响对病理及其他指标的检查。大小鼠可用颈椎脱臼法, 然后股动脉放血。兔、豚鼠、狗等一般用股动脉放血处死。应尽量采用适当的处死方法, 减少实验动物的痛苦。

2. 血液采集 大小鼠如需血量小可用鼠尾采血, 如需血量较多可用眼眶静脉丛采血或处死时股动脉放血采血。狗可用后肢隐静脉抽血。不影响动物生理功能的最大取血量为其总血量(50ml/kg体重)的10%。

3. 尿液采集 对大小鼠可用代谢笼, 下部有粪尿分离器。对狗可用接尿法或导尿法。

4. 病理解剖和标本留取 毒性病理学检查是毒理学试验重要的组成部分, 病理学研究有助于确定有害作用和靶器官。毒性病理学检查包括大体解剖和组织病理学检查两部分。急性毒性试验中在试验期中死亡或试验结束处死的动物都应进行尸体解剖, 因为急性毒性试验的目的是得到有关可能的靶器官信息以及进行重复染毒试验剂量设计的信息。在亚慢性、慢性、致癌试验, 病理学是一个重要的终点。

(1) 大体解剖: 在实验动物处死后半小时内进行, 解剖方法采用胸腔、腹腔脏器联出法。应观察有关脏器的外形和表面情况、颜色、边界和大小、质地、切面。对指定的脏器称重, 并计算脏器系数。推荐的实验动物病理解剖标准操作程序见图5-1。

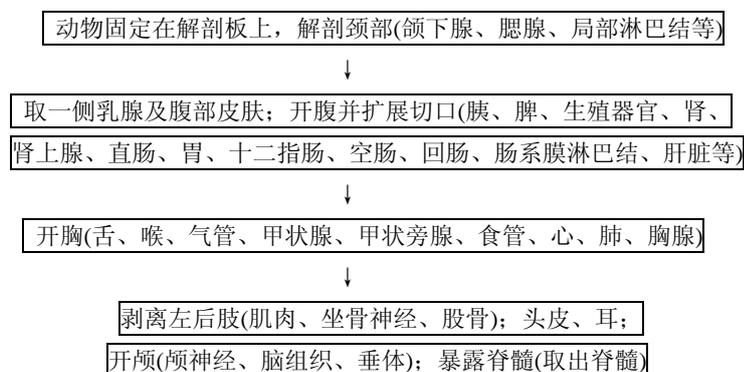


图5-1 实验动物病理解剖标准操作程序(中华预防医学会环境病理学组, 1989)

(2) 组织病理学检查:对指定的器官或组织用锋利的刀剪取材,应统一取材部位。组织块一般在10倍体积的10%福尔马林中固定,此后常规制片(组织石蜡包埋、切片、HE染色)。应详细记录显微镜下观察到的病变,并做出病理诊断。必要时,请其他的病理学家对有疑问的或有争论的发现进行复查。利用特殊染色、组织化学及电子显微镜技术可有助于毒作用机制的研究。

第六节 毒理学实验结果处理和分析

在毒理学试验的设计和实施中应贯彻实验设计的对照、随机和重复的原则,实验的各剂量组所得到的结果应与阴性对照组比较。根据实验结果(指标)的变量类型是数值变量(计量资料)还是分类变量(计数资料),选用不同的统计分析方法。近年来,随着毒理学的研究方法的发展,也对生物统计学提出了更高的要求。

在评价毒理学试验的结果时,应综合考虑生物学意义和统计学意义。统计检验的假设是关于总体特征的假设,检验方法是以统计量的抽样分布为根据的,得到的结论是概率性的,不是绝对的肯定或否定,不等同于有或无生物学意义。对实验结果作出科学的判断和解释,应该根据统计学分析的结果、生物学知识和经验。

一、毒理学试验的统计学

统计学观点及方法在毒理学试验的设计和结果评价中起关键的作用,毒理学试验的发展也促进了生物统计学的发展。毒理学试验统计学评价的主要进展是剂量—反应关系研究和对超离差数据的统计。

1. 毒理学试验设计的统计学要求 毒理学试验的设计应遵循随机、重复及对照三个原则,要求各观察值具有代表性,并且是相互独立的。毒理学试验的设计具体涉及到剂量水平数目及间隔,每个剂量点的实验单位数,每个实验单位接种及计数的细胞数,对照组的设置等。实验单位的确定对于样品的独立性是很重要的,实验单位(experimental unit)是进行处理时或观察时独立的最大采样单位。以动物和培养物作为实验单位要比以细胞作为实验单位更为可取。此外,如果同时评价几个不同因素的效应,应注意均衡的原则,实验设计应可以区分不同因素的贡献并分别估计。

样本的代表性要求具有同质性,即各处理组和对照组的非实验因素的条件均一致,为此,各实验单位(动物或培养物)的分组及整个实验的全部操作都应遵循随机化原则。在利用形态学指标的毒理学试验,必须采用盲法观察结果,以消除实验者观察结果的偏性。样本应有足够的大小和适当的重复次数,以估计处理之间、实验室内和实验室间的变异性。一般可根据显著性水准、检验把握度、容许误差、总体标准差等来估计样本的大小。

严格执行毒理学试验设计的上述要求,才可能得到可靠性和重复性良好的结果,也是进行正确的统计学评价的基础。良好的质量保证和实验设计可以监控系统误差,而统计处理则用来确定随机误差。

毒理学试验的数据通常是由剂量水平和相应观察值组成的二维关系型数据。毒理学试验处理组与阴性对照组观察值均数的比较,如果资料可拟合某种分布,则适用于参数检验,其敏感度和效率高于非参数检验;如资料不能拟合某些已知的分布,则应进行数据转换,以满足正态性和方差齐性。如果任何变换都不能改善数据的分布,可能存在个别可疑值,应予以识别和剔除。另一方面,可使用不依赖总体分布模型的非参数统计分析。

一种毒理学试验资料可以有若干种正确的统计学分析方法,但可能不存在唯一正确的方法。其原因主要是表面上不同的统计学分析方法常以相同的统计学概念和模型为基础。另一方面,利用不同的统计学方法来评价毒理学试验资料缺乏比较研究。

(1) 各处理组与阴性对照组两两比较和多个处理组与阴性对照组比较各处理组与阴性

对照组两两比较和多个处理组与阴性对照组比较常用的统计学方法见表5-3。

表5-3 各处理组与阴性对照组两两比较和多个比较的统计学方法

类 型	连续性数据, 正态分布		离散性数据		分布未知
	方差齐	方差不齐	二项分布	泊松分布	
处理组与阴性对照组两两比较	t 检验	t' 检验	卡方检验, Fisher确切概率法, u检验	u检验	非参数法, 如Wilcoxon秩和检验
多个处理组与阴性对照组比较	Dunnett检验(1955)	改进的DUNnett 检验(1980)	平方根反正弦转换, 再用dunnett检验, 或者Simes法(1986)	Suissa和Salmi法(1989)	非参数法, 如多重比较秩和检验(Steel, 1959)

(2) 剂量-效应关系和剂量-反应关系

剂量-效应关系和剂量-反应关系是毒理学研究的重要内容。在急性毒性(LD₅₀)研究中, 就是典型的剂量-反应关系研究, LD₅₀是统计学的点值估计和区间估计。在其他毒理学试验中的阳性剂量-效应关系和剂量-反应的确定也应通过统计学处理和判定, 尽管, 可以用各处理组与阴性对照组两两比较和各处理组间两两比较, 发现高剂量组与中、低剂量组及对照组间差别有显著性, 中剂量组与低剂量组和对照组间差别有显著性, 低剂量组与对照组间差别无显著性, 来证明有剂量-反应关系; 但这种方法的效率较低。剂量-效应关系和剂量-反应的判定可以分为定性和定量统计学两大类。剂量-效应关系和剂量-反应的统计学定性分析即为趋势检验, 而统计学定量分析则为模型拟合。趋势检验是检验对自变量“规定的水平, 反应的观察值增高或降低的趋势的显著性。当自变量s为定量数据时, 则可进行模型拟合, 即剂量-反应关系的定量研究。

趋势试验(trend testing), 剂量为 x_i ; 反应为 μ_i , 当有 $x_0 < x_1 < \dots < x_K$, 无效假设为

$H_0: \mu_i = \mu_0 = \dots = \mu_K$ 备择假设为 $H_a: \mu_i \leq \mu_0 \leq \dots \leq \mu_K$ 或 $\mu_i \geq \mu_0 \geq \dots \geq \mu_K$ 单调上升或单调下降趋势。如反应 μ_i 为连续资料服从正态分布, 当 x_i 为定量数据, 则可选用简单的线性回归或加权线性回归; 如反应 μ_i 为离散资料服从二项分布或泊松分布, 可选用Cochran-Armitage趋势检验; 如果样本所属的总体分布未知, 则可利用非参数法加Jonckheere-Terstra趋势检验(Jonckheere, 1954)。

在毒理学数据的统计学方法中最主要的发展是剂量-反应关系的统计学方法、超离差(overdispersion)计数资料的统计学方法及广义线性模型(generalized linear model)。这些方法, 可以利用统计程序包如SAS, Genstat等来实现。对趋势检验和模型拟合等统计学方法可参阅有关统计学专著。

2. 对常规毒理学试验资料推荐的统计学方法(Cad等, 1994)

(1) 体重和器官重量: 体重常是毒性效应最敏感的指标之一。如果每组样品量足够大(10或10个以上), 可用下述方法: ①器官重量计算为体重的百分比。②按体重或体重改变分析。如在试验开始, 动物随机化分组(各组体重均数差别无显著性, 各组所有的动物体重在总平均体重的2个SD之内), 利用体重改变分析比较好。③对各组资料利用Bartlett方差齐性试验, 检测方差齐性。根据方差齐性或不齐, 决定进一步的统计学检验。如果样本量较小, 可利用Kruskal-Wallis非参数检测。

(2) 临床化学: 过去一般用t检验或ANOVA, 但并非是最适当的方法。因为这些生化参数很少是彼此独立的。通常, 所研究的并不是单独某一个参数, 而是与靶器官毒作用有关的一组参数, 如CPK, HBDH和LDH同时增高强烈指示心肌损害。这时我们并不只是注意其中

一个参数的增高,而是全部3个参数。而血清电解质(如钠、钾、钙)常相互影响,一种降低常伴另一种增加。而且资料的性质,由于这些参数的生物学性质或测定的方法,常不服从正态分布(为偏态分布)或为非连续的,如肌苷、钠、钾、氯、钙和血尿素氮。临床化学资料适用的统计学方法:①ANOVA, Bartlett检验和 / 或F检验, t-检验, 适用于: 钙、葡萄糖、BUN、肌苷、胆碱脂酶、总蛋白、白蛋白、HBDH、ALP、CPK、LDH、ALT、AST及血红蛋白。②Kruskal-Wallis非参数ANOVA适用于: 总胆红素、GGT。

(3) 血液学: 不同物种、品系的实验动物血液学检查的数据, 所服从的分布也可能是不同的。这些参数的大部分是相互有关的, 并依赖于所用的测定方法。RBC数、血小板数和MCV可用仪器测定, 数据适用于参数检验。红细胞压积(HCT)是由RBC和MCV得到的计算值, 故依赖于此两个参数; 但如直接测定, 也可用参数检验。

血红蛋白是直接测定的并是独立的连续数据。但如同时存在血红蛋白的多种形态(氧血红蛋白、脱氧血红蛋白、高铁血红蛋白等), 则可能不是典型的正态分布, 而呈多模型分布。此时可用wilcoxon检验或多重秩和检验。

WBC总数服从正态分布, 并适用于参数检验。而WBC的分类或报告为百分比或乘以WBC总数得“绝对”分类WBC数。这些资料, 特别是嗜酸性粒细胞不符合正态分布, 应该用非参数统计。

应注意, 单个参数的变化很少有生物学意义, 因为这些参数是相互有关的, 应注意发现并分析预期的参数变化谱。

(4) 组织病理学损害发生率: 在亚慢性和慢性毒性试验, 强调了组织病理学检查。统计学分析是评价处理组动物组织病理学损害发生率是否高于对照组动物。除了癌发生率外, 也应注重发现其他病理损害。在处理组和对照组动物病理损害发生率比较常用卡方检验或Fisher精确检验。利用双侧检验还是单侧检验取决于研究者的要求。对于多重比较可用Bonferroni法, 而且可利用趋势检验来评价剂量-反应关系。

(5) 生殖毒性: 对生殖毒性的统计学分析, 是以窝(或妊娠雌性动物)为实验单位, 而不是幼体。生殖毒性试验一般可得4个变量: 生育力指数(FI)、受孕指数(GI)、存活力指数(VI)和哺育指数(LI)。对这些变量, 如样本数为10或10以上可利用Wilcoxon-Mann-whitney U检验或Kruskal-Wallis非参数ANOVA。如样本数小于10, 则可用Wilcoxon秩和检验(用于2组比较)或Kruskal-Wallis非参数ANOVA(用于3组或3组以上的比较)。

(6) 致畸试验: 每组应有20只妊娠动物。并且, 实验单位为窝, 而不是胎体。如样本数为10或10以上, 可近似为正态, 利用参数检验(如卡方检验、t-检验或ANOVA)、来评价结果。当样本数小于10, 可用非参数检验(Wilcoxon秩和检验或Kruskal-Wallis非参数ANOVA)。此外, Wilcoxon-Mann-whitney U检验也广泛用于致畸试验。

(7) 饲料和染毒柜中受试物浓度分析: 当受试物掺入饲料进行喂饲试验, 或为气溶胶吸入试验, 应定期测定饲料中受试物浓度和染毒柜中受试物气溶胶的浓度。采样应随机并有代表性。一般要求饲料或空气中浓度应在预定浓度的 $\pm 10\%$ 之内; 显著增高的峰浓度可能超过代谢或修复系统能力, 出现急性毒作用。如果不了解饲料 / 空气中真实的暴露水平, 可能错误地解释该受试物的低水平慢性毒性。气溶胶颗粒直径分级采样可能得到分类资料(如 $> 100 \mu m$, $100 \sim 25 \mu m$, $25 \sim 10 \mu m$, $10 \sim 3 \mu m$ 等), 这种资料应该用几何均数及其标准差来描述。

(8) 致突变性试验: 绝大多数遗传毒理学短期试验(STT)的观察值为计数资料(如突变体数、畸变数、SCE数)或是相对数(如存活细胞的突变频率), 因此STT结果的统计学主要是对离散性资料的统计学推断。

从理论上来说, 突变是罕见事件, 服从泊松分布, 但实际上, STT数据分布模型很复杂, 也可服从二项分布、负二项分布等。样本分布的研究可用拟合优度卡方检验、似然比检验、精确检验、Kolmogorov-Smirnov检验及Fisher推荐的离差检验。STT资料通常比常规的统计

学分布模型具有更大的变异性，样本数据的均数与分布模型拟合较好，而方差显著大于模型的方差，即出现超离差(overdispersion)。超离差可假定分布的均数服从某一特定的分布来表达，即构成复合分布(compound distribution)。如负二项分布可记为泊松*伽马复合，其他还有多种复合分布，如泊松*反伽马复合、泊松*正态复合等。忽视超离差可使假设检验的第一类错误概率增加、参数估计的可信区间过窄。因此，超离差是STT资料统计学分析的重要问题。对超离差计数资料的统计学方法可参阅有关统计学专著，以下仅介绍最常用的遗传毒理学试验的统计学方法的进展。

1) Ames试验的统计学评价：Ames试验的结果每平板回变菌落数的分布不完全服从泊松分析，有超离差现象；并且，其剂量反应曲线呈先上升后下降的伞形。Ames等1975年提出2倍判断标准，在1983年改进的方法中已不再推荐。2倍判断标准有较大的缺点，此判断标准不是统计学判断，对自发回变率较高的菌株偏严，而对自发回变率较低的菌株偏松。已发展了几种统计学方法用于Ames试验的假设检验和剂量反应研究。Kim和Margolin等(1999)利用基于生物学的机制模型，发展了SALM程序，用于Ames试验结果的判断。

2) 遗传毒理学体内试验：(包括微核试验、染色体畸变试验和显性致死试验)的统计学评价：Adler等(1998)提出了3步法。①确定实验结果是否可接受。如果同时进行的阴性对照的均数在历史性对照的均数±3SD之内，则该实验结果可以接受。如果不接受，则应重新进行实验。②剂量-反应分析。利用同时进行的阴性对照资料进行剂量-反应趋势检验。有统计学显著性的阳性趋势表明受试物处理的效应。③评价各个处理组反应，然后将各个处理组的均数分别与历史性阴性对照比较，如各个处理组均未显示差别显著性，但趋势检验有显著性意义，此实验结果的解释需要生物学判断。如果趋势无显著性，但经多重比较校正后仅一个处理组与历史性阴性对照比较差别有显著性(Simes RJ. Biometrics 1986; 73: 751-754)，则此试验结果的解释也需要生物学判断。这时，可认为该实验的结果为可疑。

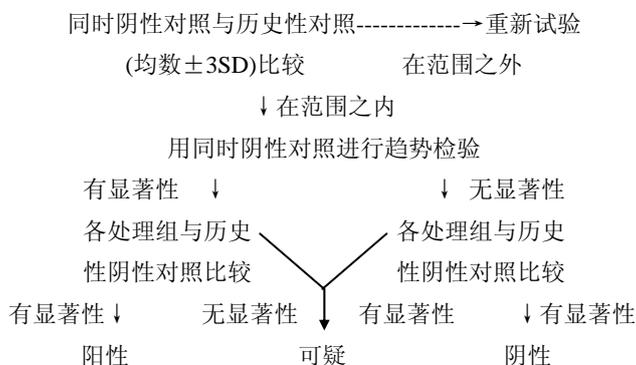


图5-2 遗传毒理学体内试验统计学评价的程序。

(9) 行为毒理学：行为毒理学试验一般得到4种类型的资料：①观察的记分值，来自开阔场试验等；②反应率，来自舔液，总活动或压杆；③错误率，来自学习-记忆试验④到达终点的时间。对这些数据常用的和推荐的统计学方法见表5-4。行为发育毒性和生殖毒性研究的统计学方法也见表5-4，在断乳前应以窝为实验单位进行统计。

表5-4 行为毒理学的统计学方法 (Gad等, 1994)

观察类型	常用的方法	推荐的方法
观察记分值	t检验或单例ANOVA	Kruskal-Wallis非参数ANOVA或Wilcoxon秩和检验
反应率	t检验或单侧ANOVA	Kruskal—wallisANOVA或一侧ANOVA
错误率	ANOVA检验，再进行Post hoc检验	Fisher精确检验或 R×C卡方, Mann—Whitney U 检验

到达终点时间	t检验或—侧ANOVA	ANOVA检验再进行Post hoc检验或 Kruskal-Wallis ANOVA
行为发育或生殖试验	ANOVA检验，再分别进行检验	Fisher精确检验或Kruskal-Wallis非参数 ANOVA 或Mann-Whitney U检验

(10) 质量控制图：毒理学试验中各种实验室检验可参照临床实验室制作质控图(control chart)，旨在直接观测误差趋势，便于及早采取措施，预防和杜绝不合格的实验报告。质控图的种类较多，最常用的是Levy-Jennings常规质控图。如果再辅以累加(Cusum)质控图更易发现系统误差。

二、统计学意义和生物学意义

在评价毒理学试验结果时，要综合评价实验结果的统计学意义和生物学意义。

一般来说，具有统计学意义是具有生物学意义的必要条件之一。正确地利用统计学假设检验的结果有助于确定实验结果的生物学关联。在判断生物学意义(即生物学重要性)时，可考虑以下步骤。

(1) 纵向比较：此参数的改变有无剂量-反应关系。化学物毒作用的剂量-反应关系是毒理学研究的基本假设。当某参数的改变存在阳性剂量-反应关系，就可认为此参数的改变与受试物染毒有关，具有生物学意义。

(2) 横向比较：此参数的改变是否伴有其他相关参数的改变。例如，生化参数很少是彼此独立的，单个剂量组的一个参数有统计学显著性的改变一般不认为有生物学意义，除非此改变为其他参数改变所支持。如没有骨髓或脾组织学改变或没有高铁血红蛋白生成，则单有红细胞计数的改变是没有生物学意义的。同样，在免疫毒理学中，单有淋巴细胞计数的改变不伴有淋巴结组织学改变也可能是没有生物学意义的。

(3) 与历史性对照比较：由于目前尚无公认的实验动物参考“正常”值，应由本实验室利用相同品系的实验动物和相同的溶剂，进行至少10次独立实验的阴性(溶剂)对照的资料构成，以其均值±1.96×标准误作为参考值的范围。同时进行的阴性对照应在历史性对照的均数±3SD范围之内，否则应重新试验。另有认为，凡某种观察值与对照组比较，差别具有统计学显著性(P<0.05)，并符合下列情况之一者，即可认为已偏离正常参考值范围，属于有害作用。①其数值不在正常参考值范围之内；②其数值在正常参考值范围之内，但在停止接触后，此种差异仍持续一段时间；③其数值在正常参考值范围之内，但如机体处于功能或生化应激状态下，此种差异更加明显。应该指出，后两种情况需要附加的试验设计。

另外，还有一些其他的考虑。如处理组同时与对照组两组均数之差值应超过检测误差的两倍以上。某些血液生化指标(如AST、ALT等)的测定值升高才有生物学意义。

当处理组数据与阴性对照组比较差别有显著性，并且经分析认为是与处理有关的生物学效应，应进一步判断其为有害效应还是非有害效应。决定一种效应是否为有害作用需要专家的判断。不同指标或参数的生物学意义和重要性是不同的。

在分析和综合评价实验结果的统计学意义和生物学意义时，可能遇到四种情况，见表5-5。在此表中，第I和第IV种情况最为常见，第I种情况是无统计学意义也无生物学意义，第IV种情况是有统计学意义也有生物学意义。但是有时在实验结果中会出现第II和第III种情况。

表5-5 毒理学试验结果的统计学意义和生物学意义

生物学意义	统计学意义	
	无	有
无	I	III
有	II	IV

第Ⅲ种情况是有统计学意义但无生物学意义,例如在某个亚慢性毒性试验中,中剂量组动物血液白细胞计数低于阴性对照组,差别有显著性($P<0.05$),而高剂量组和低剂量组动物血白细胞计数与阴性对照组比较差别无显著性($P>0.05$)。由于在此实验结果中未出现剂量-反应关系,因此中剂量组血液白细胞计数降低可能是由于偶然因素造成的,没有生物学意义。但是,如果仅在高剂量组动物血液白细胞计数降低,与阴性对照组比较差别有显著性($P<0.05$)时,必须仔细地核实高剂量组的资料。如果资料无任何疑问,可认为此变化可能具有生物学意义。最好是重新进行一个亚慢性毒性试验,并加大受试物的剂量,如果能够观察到剂量-反应关系,则说明此剂量组血白细胞计数降低是有生物学意义的;如果加大受试物剂量没有观察到剂量-反应关系,才可以说此剂量组血白细胞计数降低没有生物学意义。因此,在判断实验结果的生物学意义时,有无剂量-反应关系是关键。有统计学意义但无生物学意义的情况,更常见的是因为实验设计和实施不良所致。

第Ⅱ种情况是具有生物学意义但无统计学意义,这可能是因为该事件的发生是极端罕见的,例如在哺乳动物致癌试验中,在染毒组中出现对照组中没有的肿瘤类型,尽管从统计学上此种肿瘤的发生率很低,与对照组比较差别无显著性($P>0.05$),但还应该认为是有生物学意义的。

利用一种以上的实验动物,当某种效应在一个物种出现而在另一物种不出现,或一个物种远比另一物种敏感时,则使结果的解释复杂化,难以确定以哪个物种的实验结果外推到人最为合适。除非有足够的资料(通常是比较毒理学或毒效学资料)可以表明最合适的物种,一般是以最敏感的物种来确定NOAEL和安全限值。

以上各节我们讨论了毒理学动物实验的基础,介绍了对外源化学物进行毒性评价的实验设计、实施、结果分析等各个环节。实验的质量控制是保证实验数据具有科学性、准确性和公正性的先决条件。没有质量保证,实验数据的可靠性是无法肯定的。美国食品药品监督管理局(FDA)于1978年就提出了“优良实验室规范(CLP)”,此后美国环保局(EPA),以及经济发展和合作组织(OECD)都提出了类似的CLP规定。我国1988年国家科委颁布《实验动物管理条例》,1993年国家科委颁布《药品非临床研究质量管理规定(试行)》,食品安全性毒理学评价程序(GB15193-94)中也规定了《食品毒理实验室操作规范》。这些法规和规范表明我国安全性毒理学评价的质量控制和质量保证也正与国际先进水平接轨。

我们在安全性毒理学试验设计、实施、总结报告的各个环节上,应该自觉、主动地遵循GLP原则,逐步从人员的组成和职责、设施、设备、质量保证部门(QAU)、标准操作规程(SOP)、受试品与对照品、实施方案、实验记录和总结报告等各个方面落实GLP。

第六节 食品毒理学试验方法和安全性毒理学评价展望

近十多年来,欧美在公众动物保护潮流冲击下和经济因素影响,毒理学界,提出了减少或部分取代使用实验动物的“替代试验方法”(alternative testing methods)。“替代方法”是使用微生物、细胞、组织、基因动物(也包括虚拟数据库)等来预测外来化学物对人的毒性。问题是“替代方法”如何外推到人。

随着全球经济一体化的趋势,要求有一套国际认可或统一的毒理学试验规范以利国际贸易进行。目前,欧洲和北美分别有政府组织在进行这方面的工作,如欧盟的“替代方法欧洲确认中心”(ECVAM)和美国的“替代方法指标确认国际协作委员会”(ICCVAM)。他们致力于国内和国际间的协调工作。这项改革涉及规范的科学性和政策性,即合理性和合法性。这是食品毒理学廿一世纪初的一件重要工作。共同认可的方法应是可靠的、成熟的、有机制依据的以及可以重复的。根本的问题是毒理实验室出具的毒理学试验报告在国际上被认可和接受。

1995 年欧盟成员国中已认可新的急性毒性分级方法, 包括眼与皮肤毒性的非动物试验方法规范, 不必求出LD₅₀。

“当我们将化学物引起毒性的分子与细胞水平机理有更多了解, 我们就有可能把这些知识转变为机理性测试方法。当我们开发出更好的测试方法, 我们就能更好地在化学物进入环境、食品或劳动场所之前和在它们损害人类健康之前预测它的毒性”(美国 ICCVAM 副主席 Stokes 语, 1996)。

美国 EPA 不久前提出: 确定外源化学物、致癌物应减少依赖动物试验, 更多地采用新的分子生物学技术, 更多地了解外源化学物如何损伤人的细胞和控制细胞增殖的遗传物质, 以便衡量外源化学物的致癌潜力 (potential)。

要得出接触很小剂量可能产生的细胞损伤, 而不是依靠传统的大剂量的动物致癌试验结果外推对人体的效应。这就要深入了解癌前期的分子生物学变化与毒作用机制; 进行外源化学物的安全性毒理学评价很需要这样的涉及机制的定性定量资料, 当然也包括毒代动力学资料。

所以, 当前的发展趋势是重视研究外源化学物更早发生的、在小剂量作用下、分子 / 基因方面必变的机制, 从机制出发来改进现代毒性试验方法(例如诱变性试验和致癌性试验)以及根据毒作用机制来进行安全性毒理学评价, 逐步建立起国际通用的“替代试验方法”与评价标准。

多种外源化学物的联合毒性评价对食品安全性也很重要。不仅研究同时摄入的多种外来化学物的联合作用, 而且要研究非同时摄入的联合作用。对毒性机制研究还有另外的积极意义, 即为设计新药品和新保健食品提供有价值的资料, 使之更安全和更有效。

(史永亮 王 枫)