

实验技术与方法

啮齿类动物 28 天重复剂量经口毒性改良试验简介与进展

王恒娟, 刘兆平

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021)

摘要: 经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)推荐的啮齿类动物 28 天重复剂量经口毒性试验(OECD TG 407)是一种广泛用于评价化学物一般毒性的毒理学试验方案。OECD 在 1998 年对其进行改良后,建立 TG 407 改良试验并经世界多国实验室验证,用于检测化学物的内分泌干扰作用。本文简要介绍了 OECD TG 407 改良试验指南,并对其进展情况以及优缺点进行综述,以期为我国的内分泌干扰物的评价体系提供参考。

关键词: OECD TG 407 改良试验;内分泌干扰物;化学物

中图分类号: Q954.55 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-8456(2012)02-0136-04

Introduction and progress on the enhancement of repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents

Wang Hengjuan, Liu Zhaoping

(National Institute for Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents (OECD Test Guidelines 407) is widely used to evaluate the general toxicity of chemicals. In 1998, the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD) enhanced existing TG 407 to develop new Test Guidelines for screening and testing potential endocrine disruptors. This procedure has been verified by an extensive international validation program. To provide reference for developing endocrine disruptor evaluation system in China, the enhanced TG 407, its progress and its advantages and disadvantages were summarized in this paper.

Key words: OECD enhanced TG 407; endocrine disruptors; chemicals

啮齿类动物 28 天重复剂量经口毒性试验(TG 407)是经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)建立的用于检测受试物一般毒性的毒理学评价试验方案。目前,世界上很多国家已经将 TG 407 用于新化学物质的申报,OECD 也将其用于高通量生产的化学物质(HPV)的危害识别和危害特征描述。另外,根据欧盟 REACH 法规,大多数的化学物质都要经 TG 407 测试^[1]。

鉴于 TG 407 在 OECD 整个毒理学试验指南中的重要地位,以及国际社会对内分泌干扰物的日益担忧,1998 年,OECD 启动了一项高度优先项目,即对已有的 TG407 试验方案进行改良,通过增加内分泌相关的试验指标(如附属性器官的重量及其组织病理学检测、动情周期、精子学以及血液 T3、T4、TSH 等激素水平),使其能够筛选和检测潜在的内分泌干扰物质(endocrine disruptors, EDs)。这种改良的方案即是现

在的“TG 407 改良试验”(OECD enhanced TG 407)^[2]。该试验位于“OECD 内分泌干扰物检测与评估基本框架(2002)”的第 4 水平,即可检测基于多种作用机制的多种内分泌干扰效应^[3]。

1 TG 407 改良试验指南

1.1 试验方案

选用年轻健康的成年大鼠,其中雌性动物应符合未交配和未生育条件。动物初始体重变异以不超过平均体重±20%为宜。试验前让动物至少适应 5 d 后,随机分组,一般至少设 1 个对照组和 3 个处理组,每组至少 10 只动物,雌雄各半。另外,在对照组和最高剂量组各设卫星组,即每组为 20 只动物(雌雄各 10 只)。停止给药后,卫星组动物继续喂养 14 d 或更久,观察毒性效应的恢复情况、持续时间或延迟发生的毒性效应。如果其他相关资料显示,受试物在 1 000 mg/(kg BW·d)剂量下未产生任何效应,那么可

收稿日期:2011-08-22

基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08011-005)

作者简介:王恒娟 女 硕士生 研究方向为内分泌干扰作用评价 E-mail:wanghengjuaner@163.com

通信作者:刘兆平 男 研究员

以进行有限的试验,不必设置 3 个剂量组。

大鼠于 7 周龄时开始给药(最晚不要超过 9 周龄),连续给药 28 d。给药方法取决于研究目的以及受试物的物理/化学/毒物代谢动力学性质,可为灌胃、掺入饲料或饮水。最后一次给药后 24 h 处死解剖^[4]。

1.2 检测指标

主要包括两部分,一部分是用于检测受试物一般毒性的指标,包括体重、进食、一般状况、血液学、生化学、病理学指标等;另一部分是用于检测内分泌干扰作用的指标,具体见表 1。

表 1 TG 407 改良试验中推荐用于检测内分泌干扰作用的指标

分类指标	强制性测量指标	选择性测量指标
脏器重量	睾丸	卵巢
	附睾	子宫,含宫颈
	肾上腺	甲状腺
	前列腺+精囊腺和凝固腺	
组织病理学检查	性腺:	阴道涂片
	睾丸和卵巢	雌性乳腺
	附属性器官:	垂体
	附睾	
	前列腺+精囊腺和凝固腺	
	子宫,含宫颈	
	肾上腺	
激素水平测定	甲状腺	外周血 T3、T4
	阴道	外周血 TSH

2 TG 407 改良试验的优缺点

2.1 优点

在评估一种化学物质的毒性特征时,通常会在急性毒性试验后,进行经口重复毒性研究,这是对化学物质进行危害识别和危害特征描述的关键。TG 407 改良试验不仅可以提供重复暴露的一般毒性效应(如肝、肾等系统毒性)、靶器官、未观察到不良作用剂量水平(NOEL)、最大可耐受剂量(MTD)、剂量-反应关系等信息,更重要的是,它可以提供有关内分泌毒性的信息。由于 TG 407 改良试验包含广泛的毒性效应谱和观察终点,所以通常可为风险管理提供所需的数据。

与检测单种内分泌干扰效应和机制的试验相比,如子宫增重(筛选雌激素和抗雌激素物质)和 Hershberger 试验(筛选雄激素和抗雄激素)等, TG 407 改良试验不仅可同时检测多种不同的内分泌干扰作用和机制,如(抗)雌激素作用、(抗)雄激素作用和甲状腺毒性物质,它还具有更高的检测效率。因此, TG 407 改良试验是一种优化的试验方案。对

于那些大批量生产的化学物质, TG 407 改良试验通常是评估它们危害特征的关键试验。

TG 407 改良试验对甲状腺毒性物质、作用中等的(抗)雌激素和(抗)雄激素物质,具有良好的适用性和敏感性,可以较好地检测其内分泌干扰效应。另外,与雌性或雄性大鼠青春期试验相比, TG 407 改良试验对甲状腺毒性物质、芳香酶抑制剂和类固醇合成干扰物质的识别能力更高^[5-6]。虽然理论上 TG 407 改良试验是内分泌干扰物筛选试验,但是对于活性较弱的内分泌干扰物、少量的中间产物、人体暴露量极少或环境释放量很少的物质,它可用作确证性试验^[5]。

2.2 缺点

对于(抗)雌激素、(抗)雄激素作用较弱的物质, TG 407 改良试验的检测敏感性低于子宫增重试验、Hershberger 试验和雌性或雄性大鼠青春期试验等。这是因为子宫增重试验、Hershberger 试验和青春期试验均采用未成年或性腺切除的动物模型,其下丘脑-垂体-性腺轴未成熟或不完整,所以其内分泌相关器官对受试物的反应更为敏感;与之不同的是, TG 407 改良试验采用完整、健康的成年动物,其下丘脑-垂体-性腺轴的反馈机制趋于正常,可对受试物的内分泌干扰作用作出部分补偿,从而导致相关器官不会出现明显变化^[7]。另外,其他相关因素也可能影响 TG 407 改良试验的敏感性,如动物品系的选择[对于 2,2-双(4-氯苯基)-1,1,1-三氯乙烷的抗雄激素作用, SD 大鼠无法检出,而 Long Evans 大鼠可以]、小的内分泌器官的分离技术、病理学家对内分泌器官(如子宫、阴道、卵巢等)细微病理变化的鉴别能力以及动物数量等。

3 TG 407 改良试验的技术问题

目前,全球 13 个不同地区和国家的试验室以 10 种不同作用机制的内分泌干扰物为受试物,对 TG 407 改良试验指标的相关性、实用性、灵敏性、重复性以及原 TG 407 试验中检测指标的影响进行了广泛的研究和验证。验证结果显示, TG 407 改良试验具有良好的敏感性、适用性和实验室间的重复性。下面简要介绍 TG 407 改良试验中需要注意的技术问题。

3.1 甲状腺的检查

甲状腺应固定后,再称重。为了准确地测量甲状腺重量,必须剔净其周围组织,在此过程中,切割、牵拉和挤压等操作容易损伤甲状腺外层。此外,在进行 TG 407 改良试验时,也可只分离称重一侧的甲状腺,另一侧用于组织病理学检查。

3.2 指标的敏感性

对 TG 407 改良试验进行多次验证后发现,新增

的内分泌相关组织病理学检测是最敏感的指标,其次是器官重量。Andrews等^[9-12]的验证性研究也发现,器官重量和组织病理学检查是敏感指标。

雌雄动物的生殖器官重量和组织病理学、乳腺的组织病理学是检测作用较弱或作用中等的(抗)雌激素或(抗)雄激素物质的敏感指标。通过组织病理学检查明确识别雌性动物生殖系统(子宫、宫颈、卵巢、阴道、乳腺)每个组织所处的动情阶段及其一致性,对于鉴别作用较弱的雌激素物质可能较敏感,但是考虑到费用和动物福利等问题,目前的TG 407改良试验和验证试验都未包括该指标。

另外应该注意的是,垂体和肾上腺重量及其组织病理学检查不能单独作为(抗)雌激素、(抗)雄激素或(抗)甲状腺物质内分泌干扰作用的指示性指标,但是这些指标可作为其他生殖器官变化的参考。

3.3 动情周期

为了不影响TG 407改良试验中功能观察系列试验(FOB)的时间、工作量和难度,建议在试验末期进行阴道涂片,并在动情间期处死雌性动物。但部分验证性试验并未发现(在动情间期)同步处死动物可提高试验的敏感性。

哺乳动物试验验证管理小组(VMG)认为,同步处死动物可能会降低其他指标的敏感性。对原TG 407试验方案进行改良时,前提条件是不影响原指标的测定和敏感性,所以OECD内分泌干扰物检测和评价任务小组(EDTA)不建议同步处死或同步采血。但是仍然将处死前4 d阴道涂片作为选择性指标,以确认动物被处死时的动情阶段^[13]。虽然4 d的阴道涂片并不能确定每个动情阶段所持续的时间,但是仍然能显示出某些变化,如没有观察到动情期,说明动物无循环的动情周期;而如果观察到动情期持续多天,则说明存在异常。

3.4 精子

验证过程中发现,通常只有最高剂量组才出现精子的异常变化。可见,与其他指标相比,精子指标并不敏感。另外,由于精子分析既费时又费力,建议用睾丸组织病理学检测代替,因为该项检查完全能够提供充足的信息。

3.5 血液激素水平

受采血时间、刺激、激素的生物周期等因素影响,血清性激素水平的敏感性较低,实验室间变异性也很大,因此不建议将该指标添加到TG 407改良试验中。但是,对于有潜在甲状腺毒性的物质而言,血液甲状腺激素水平可以提高试验的敏感性,同时也可能提示作用机制方面的信息。因此,在TG 407改良试验中,目前仅将其作为选择性指标。

3.6 动物数量

OECD建议,在TG 407改良试验中,每个剂量组至少有10只动物(雌雄各半)。对于是否需要通过增加每组的动物数量来增加试验的重复性、敏感性和统计学效力,尚需进一步验证和讨论。因为随动物数量的增加,统计学效力的增加并不显著。鉴于试验终点的变异系数(CV)是影响统计学效力的主要因素,因此,提高实验室操作技术和组织病理学检查水平,比增加动物数量更好。另外,基准剂量法利用所有剂量组的信息进行剂量-反应评估,优于NOAEL方法,建议采用基准剂量法来计算各试验终点的临界作用水平。

3.7 统计学检验

统计学检验可以使结果更加清晰,原则上应对试验结果进行统计学检验。然而,无论统计学检验是否有显著性差异,对毒理学结果的解释都应该以生理相关性和可信性为基础,这一点对于动物数量较少的TG 407改良试验尤为重要^[14]。

4 TG 407改良试验与长期试验或宫内暴露试验的比较

Gelbke等^[1]将验证试验结果与同一物质的长期或宫内暴露试验结果进行比较,结果发现:

(1)TG 407改良试验能够可靠地检测出中等以上活性的内分泌干扰物。另外,它还可以提示剂量-反应关系。

(2)只能长期在体内试验(如多代繁殖试验)中引起边缘效应的弱活性内分泌干扰物,可能在TG 407改良试验中不会引起明显的内分泌相关效应。在这种情况下所观察到的主要效应都是由其他机制引起的。

(3)将EDs暴露时间由28 d延长为90 d,并不会增加检测到内分泌相关效应的机会。

(4)在某些情况下,宫内暴露或青春期暴露试验对低活性的雌激素或抗雄激素物质的敏感性高于TG 407改良试验。

由此可见,TG 407改良试验检测内分泌干扰物的能力较强,将TG 407改良试验纳入毒理学试验方法,并用于风险管理是可行的。

5 展望

EDs可能改变人类和动物内分泌系统的正常功能,并导致发育、行为和生殖问题,甚至与人类某些肿瘤(如乳腺癌、卵巢癌等)的发生有关^[15]。EDs已成为全球关注的重大问题之一,当前各国政府和WHO等国际组织高度重视这类物质的筛选和评价。

我国在这方面起步较晚,尚没有建立完善、统一、有效的内分泌干扰物筛选和评价体系。TG 407 改良试验具有良好的敏感性、适用性和重复性,且操作方便,易于实施,可作为我国内分泌干扰物评价体系的重要参考,条件成熟时,可作为我国毒理学安全性评价程序的重要补充。

参考文献

- [1] GELBKE H P, HOFMANN A, OWENS J, et al. The enhancement of the subacute repeat dose toxicity test OECD TG 407 for the detection of endocrine active chemicals; comparison with toxicity tests of longer duration [J]. Arch Toxicol, 2007, 81: 227-250.
- [2] Organization for Economic Co-operation and Development. Report of the first meeting of the OECD Endocrine Disruptor Testing and Assessment (EDTA) Task Force [R]. Paris: OECD, 1998: 1-11.
- [3] OECD conceptual framework for testing and assessment of endocrine disrupting chemicals [R/OL]. [2011-08-26]. http://www.oecd.org/document/58/0,3343,fr_2649_37407_2348794_1_1_1_37407,00.html.
- [4] Organization for Economic Co-operation and Development. Guidelines for the testing of chemicals; repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents [R]. Paris: OECD, 2008: 1-13.
- [5] Organization for Economic Co-operation and Development. Workshop report on OECD countries activities regarding testing, assessment and management of endocrine disruptors [R]. Paris: OECD, 2010: 1-239.
- [6] YAMASAKI K, TAGO Y, NAGAI K, et al. Comparison of toxicity studies based on the draft protocol for the 'Enhanced OECD Test Guideline no. 407' and the research protocol of 'Pubertal Development and Thyroid Function in Immature Male Rats' with 6-n-propyl-2-thiouracil [J]. Arch Toxicol, 2002, 76(9): 495-501.
- [7] Organization for Economic Co-operation and Development. Report of the validation of the updated test guideline 407: repeated dose 28-day oral toxicity study in laboratory rats [R]. Paris: OECD, 2006: 1-229.
- [8] Organization for Economic Co-operation and Development. Annexes to the report on the validation of the updated test guideline 407: repeat 28-day oral toxicity study in laboratory rats [R]. Paris: OECD, 2006: 1-294.
- [9] ANDREWS P, FREYBERGER A, HARTMANN E, et al. Feasibility and potential gains of enhancing the subacute rat study protocol (OECD test guideline No. 407) by additional parameters selected to determine endocrine modulation. A pre-validation study to determine endocrine-mediated effects of the antiandrogenic drug flutamide [J]. Arch Toxicol, 2001, 75: 65-73.
- [10] OKAZAKI K, OKAZAKI S, NISHIMURA S, et al. A repeated dose (28 days) oral toxicity study of methoxychlor in rats, based on the 'Enhanced OECD test guideline 407' for screening for endocrine disrupting chemicals [J]. Arch Toxicol, 2001, 75: 513-521.
- [11] OKAZAKI K, IMAZAWA T, NAKAMURA H, et al. A repeated 28-day oral dose toxicity study of 17 α -methyltestosterone in rats, based on the 'enhanced OECD test guideline 407' for screening for endocrine-disrupting chemicals [J]. Arch Toxicol, 2002, 75: 635-642.
- [12] TOYODA K, SHIBUTANI M, TAMURA T, et al. Repeated dose (28 days) oral toxicity study of flutamide in rats, based on the draft protocol for the 'Enhanced OECD test guideline 407' for screening for endocrine-disrupting chemicals [J]. Arch Toxicol, 2000, 74: 127-132.
- [13] Organization for Economic Co-operation and Development. Summary report of the meeting of the validation management group for mammalian testing [R]. Verneuil en Halatte: OECD, 2007: 1-11.
- [14] Organization for Economic Co-operation and Development. Guidance document for histology evaluation of endocrine and reproductive tests in rodents [R]. Paris: OECD, 2009: 1-26.
- [15] GREIM H. The endocrine and reproductive system; adverse effects of hormonally active substances [J]. Pediatrics, 2004, 113(4 s): 1070-1075.

[上接第IV页]

举例 [10] 肖钰. 出版业信息化迈入快车道 [EB/OL]. (2001-12-19) [2002-04-15]. <http://www.creader.com/news/20011219/200112190019.html>.

专利文献: [序号] 专利申请者. 题名: 专利国别, 专利号 [P]. 公告或公开日期.

3 声明

本刊已进入中国所有主要期刊数据库, 本刊所付稿酬包括这些数据库的稿酬。编辑部对来稿将作文字性修改, 若涉及内容修改会与作者商榷。本刊概不退稿, 编辑部收到稿件后, 于 3 个月内通知处理意见。投稿 6 个月后如未收到修稿或录用通知, 作者可自行处理稿件。来稿一经刊登, 即按规定支付稿酬, 并赠送杂志。

4 投稿

投稿请登录《中国食品卫生杂志》网站 <http://www.zgspws.com>, 并同时邮寄稿件纸版 1 份和单位介绍信。

来稿中应有清楚完整的作者通信地址、联系电话和 E-mail 地址。

编辑部地址: 北京市宣武区南纬路 29 号 462 室 营养与食品安全所《中国食品卫生杂志》编辑部

邮政编码: 100050 电话和传真: 010-83132658 E-mail: spws462@163.com