

· 专家论坛 ·

缺血性卒中药物临床前研究的挑战及其对策

彭英^{1†}, 马飞^{1†}, 许婷婷¹, 王珊¹, 黄龙舰¹, 王晓英^{2*},
王拥军^{3*}, 王晓良^{1*}

(1. 中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所, 北京 100050; 2. 美国哈佛医学院附属麻省总医院, 波士顿 02129; 3. 首都医科大学附属北京天坛医院, 北京 100050)

摘要: 目前缺血性卒中临床前研究所面临的巨大挑战是临床转化困难, 造成转化困难的原因主要有: 动物模型无法复制人类所发生的缺血性卒中; 实验设计没有遵循盲法、随机原则; 没有预先设定纳入/排除标准; 样本量设置不合理; 终点指标的选择和评价方法不科学; 实验数据的统计缺陷、发表偏倚或不完全等。为此世界各卒中研究学会为临床前研究的实验设计和数据报道制订了相关的准则与指南, 包括: 改进动物模型和动物实验设计; 使用新技术方法对终点指标进行检测; 发表阴性结果; 建立临床前研究的事先注册与过程监督机制; 开展多中心的随机对照临床前实验; 采用 meta-分析的方法对临床前研究结果进行分析和评价; 除以神经保护为靶点外, 关注神经血管单元和卒中病理生理级联反应。

关键词: 缺血性卒中; 治疗药物; 临床前研究; 临床转化

中图分类号: R965

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2017) 03-0339-08

Advances and challenges in preclinical evaluation of therapeutic drugs for treating ischemic stroke

PENG Ying^{1†}, MA Fei^{1†}, XU Ting-ting¹, WANG Shan¹, HUANG Long-jian¹,
WANG Xiao-ying^{2*}, WANG Yong-jun^{3*}, WANG Xiao-liang^{1*}

(1. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China; 2. Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston 02129, USA; 3. Beijing Tian Tan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

Abstract: Translating of scientific advances into clinical practice is a major challenge in the stroke research field in the past decades. There were many reasons involved: animal models might not accurately capture all aspects of clinical stroke in humans, the blind and randomized design principle was not closely followed, the inclusion and exclusion criteria was not previously established, sample size was inadequate, endpoint was not scientific nor blindly assessed, inadequate reporting of data and statistical flaws. To bridge the gap between experimental and clinical research, international consortia have attempted to establish standardized guidelines for study design and data report, which include optimizing animal models as well as experimental design, using

收稿日期: 2016-10-19; 修回日期: 2016-11-25.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81473200); 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2012ZX09301002-004, 2014ZX09507003-001); 新药作用机制研究与药效评价北京市重点实验室 (BZ0150).

†共同第一作者.

*通讯作者 Tel: 1-617-7249513, Fax: 1-617-7267830, E-mail: wangxi@helix.mgh.harvard.edu;

Tel: 86-10-67098350, Fax: 86-10-67013383, E-mail: yongjunwang1962@gmail.com;

Tel: 86-10-63165330, Fax: 86-10-63165330, E-mail: wangxl@imm.ac.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2016-1018

innovative approaches to assess endpoint, making raw data and negative results available, establishing prior registration mechanism, conducting multicenter preclinical randomized controlled trials (pRCTs), systematic reviews and meta-analysis of preclinical studies, evolving the original focus on neuroprotection into a broader consideration of the role of neurovascular unit and ischemic cascade.

Key words: ischemic stroke; therapeutic drug; preclinical research; clinical translation

脑卒中是一种常见突发性疾病, 主要由脑血管血栓形成或血管破裂, 脑组织供血、供氧不足引起。按照其发病原因可分为缺血性卒中和出血性卒中, 其中缺血性卒中约占全部卒中类型的 80%~87%^[1]。脑卒中具有高发病率、高复发率、高致残率及经济负担重的特点。脑卒中已被世界卫生组织列为目前人类健康的最大挑战之一^[2]。《中国脑卒中防治报告 (2015)》显示, 脑卒中居我国死亡原因之首。随着人口老龄化加剧, 其发病率仍将继续增加^[3]。因此研究出切实可行、安全有效的药物防治措施是当代医药学面临的一项极其紧迫和最为重要的课题^[4]。

缺血性卒中发生后, 缺血脑区的中央部分称为缺血核心区, 几乎没有血液供应, 几分钟内神经组织发生不可逆性死亡。核心区周围部分是半暗带, 由于血管旁路代偿供血, 此区域内血流量降低, 神经组织保持在静止状态, 但如果半暗带不能及时恢复血液供应, 半暗带内的神经组织最终会死亡, 变成梗死灶的一部分^[5]。神经保护治疗的目的主要是抢救半暗带, 因而缺血性卒中的急性神经保护治疗方案都具有一定的时间窗限制。

目前对于缺血性卒中的治疗策略主要包括: ①改善脑血循环 (如溶栓、抗血小板、抗凝、降纤和扩容等方法); ②神经保护剂。组织型纤溶酶原激活剂或重组组织型纤溶酶原激活剂 (tPA 或 rtPA) 是迄今为止唯一被美国食品和药物管理局 (FDA) 批准用于治疗急性缺血性脑卒中的溶栓药物, 但治疗的时间窗较短 (3~4.5 h), 仅 2%~5% 的卒中病例可以接受 rtPA 治疗^[6]。在我国接受 rtPA 的急性脑缺血卒中患者不到 1%^[7]。临床前研究已经发现了 1000 多种针对不同潜在靶点的有效神经保护剂^[8], 这些靶点包括兴奋性毒性、自由基损伤、免疫炎症、神经凋亡以及钙内流等^[9]。目前大约进行了超过 200 项神经保护剂治疗脑缺血卒中的临床试验, 然而统计结果显示它们都不能显著促进患者脑功能的改善^[5, 8]。换句话说, 虽然临床前动物模型研究发现了大量有效候选药物, 但除了 rtPA 之外, 临床上美国和欧洲尚缺乏针对脑卒中患者的有效神经保护药物。由此可见, 缺血性卒中的临床前研究与临床研究之间出现了严重的转化

障碍, 因此 2012 年美国国立神经病学与卒中研究所 (National Institutes of Neurological Disorders and Stroke, NINDS) 发布了卒中研究进展报告, 指出当前卒中研究最应该关注的 48 个方面, 并且将促进临床前活性候选药物的临床转化排在了首位^[10]。

但是, 在深入了解卒中发生的病理生理机制以及建立评估体系用以预测候选药物的可能临床疗效和不良反应方面, 以往的临床前卒中研究提供了极大的帮助^[11]。尽管挑战是艰巨的, 但必须承认, 研究者在面对临床转化的缓慢进展及障碍的同时也学到许多珍贵的经验教训。举例来说, 现代医学认识到脑卒中不仅是大脑中枢神经系统疾病, 而且也是全身系统性疾病; 脑卒中后存在许多动态变化和进展的病理生理机制和相互作用机制; 脑卒中的病理转归包括脑组织损伤和与之相拮抗的内源性神经保护或恢复机制; 单分子靶点或单一化合物难以获得理想的治疗效果; 单个化合物的多靶点或者多个化合物的联合应用是必要的, 从而有可能获得最佳疗效; 治疗靶点不应仅仅局限于抵抗损伤的因素, 而且更应该着眼于内源性的神经保护机制和长期的恢复过程; 需要建立用于脑卒中药物研发的新的临床前评价系统, 例如包含脑卒中发病危险因素在内的动物模型等^[4]。此外, 研究者也意识到在以往的脑卒中研究过程中, 从研究到理念甚至研究体系都限制了自身跨越临床转化障碍的能力; 脑卒中研究作为“走向世界议程的优先工作”, 需要进行超越“科学”、“观念”和“系统”的创新研究, 以及多学科和全球性的协作研究^[2, 4]。

事实上, 临床前研究向临床转化失败的原因十分复杂, 受很多方面因素的影响, 本文将根据文献报道对其可能的原因以及有望解决的方法进行分析和综述。

1 动物模型

通过动脉结扎法、线栓法、血凝块栓塞法、开颅电凝法、光化学诱导法和注入内皮素-1 等方法阻塞大脑中动脉, 是目前使用较多的缺血性卒中模型, 它们常被用于脑缺血生物机制和临床治疗原理的研究^[12]。不同的动物模型各有其优缺点 (表 1)。

Table 1 Advantages and limitations of the most used stroke animal models^[12, 13]

模型	开颅	死亡率	再灌注	稳定性	优点	缺点
二血管阻断缺血模型	否	低	是	高	操作简单	全身性低血压
四动脉阻断缺血模型	否	低	是	低	动物在清醒状态	操作复杂, 稳定性差
血凝块栓塞MCAO模型	否	高	是	低	最接近人类卒中, 可用于研究溶栓剂和神经保护药物联合疗法	脑出血风险大, 脑组织缺血程度不稳定
线栓法MCAO模型	否	高	是	高	目前应用最广, 适于对再灌注损伤的机制研究, 可对缺血及再通时间准确控制, 用于治疗时间窗的研究	操作复杂, 动物体重要求严格, 存在脑出血或蛛网膜下腔出血风险
光化学诱导MCAO模型	否	低	否	高	操作简单, 适用于抗血小板、抗血栓及内皮保护药物的研究, 可通过控制实验参数改变梗死灶的大小、位置 and 严重程度	永久性闭塞, 不利于扩血管及促进侧支循环作用的研究
开颅电凝MCAO模型	是	高	否	高	与人类缺血性卒中的病理改变较接近, 形成缺血半暗带, 可同时进行生理、生化、病理形态及行为学等指标的观察与测定	操作复杂, 脑积液、脑组织损伤、感染的风险大

然而除了少数例外, 如血凝块栓塞模型可以很好地评价tPA治疗作用, 其他模型很少能成功地评估人类卒中治疗药物的作用效果^[13]。其最主要的原因可能是人类卒中在病因、病灶位置、缺血严重程度、持续时间和有无其他并发症等方面具有很大的异质性, 而每个动物模型仅能模拟卒中的部分特征性病理改变, 与人类卒中有显著的差异(表2)。因此, 选择缺血性卒中动物模型, 最重要的原则是与卒中临床表现的匹配度高, 能够模拟出临床卒中多个方面的病理生理改变。此外还应注意模型构建过程中实验操作应简单易行、对动物损伤性小, 病灶位置和梗死体积大小应重现性强、稳定性高^[12]。

临床前研究的卒中动物模型与临床研究卒中患者的差异性表现在很多方面, 包括大脑结构、群体类型、缺血区域、最佳治疗范围、梗塞持续时间和终点指标等^[5]。

1.1 大脑结构 啮齿动物大脑和人类大脑的结构具有显著差异, 主要表现在脑回和脑白质相对比例等方面。但是啮齿动物在脑血管解剖学和生理学方面与

人类相似, 容易进行手术操作和生理学指标监测, 来源广、费用低, 因此目前大多数临床前卒中研究初期都使用啮齿动物。使用多脑回的非人灵长类动物进行实验可能具有一定的优越性。与啮齿动物相比, 它们的神经元解剖路径走向, 比如皮质脊髓束的神经分布模式、行为活动和感觉运动整合方式与人类有密切的相似性^[14]。值得注意的是, 尽管使用高级物种进行研究有其必要性和优越性, 但是受实验动物数目的限制, 大大降低结果的说服力, 此外还面临着高成本以及伦理方面的问题。卒中治疗学术企业圆桌会议(STAIR)建议在2种以上的物种内进行组织学和行为学结果评价, 初期临床前实验中首选啮齿动物, 也可使用多脑回动物如灵长类和猫等^[4]。

1.2 群体类型 生物和疾病发生的多样性是临床脑卒中的最大特点, 也是临床前药理研究转化障碍的最主要因素。目前的现状是临床前实验在同质性卒中、年轻、健康的近交系动物上进行; 临床试验在异质性卒中、老年、伴有多种并发症的人体进行^[9]。与动物模型相比, 人类发生卒中疾病时机体所处的生

Table 2 Comparison of clinical and experimental stroke^[20]

临床患者	动物模型	改进建议	改进的限制因素
大多大于65岁	年轻动物	使用老年动物	实验经费、周期、死亡率增加
常伴有多种并发症	健康状态	使用有并发症的动物	实验经费、周期、死亡率增加; 并发症使结果分析更复杂
缺血程度、部位、持续时间差异显著	多以大脑中动脉作为阻塞位点, 缺血部位及时间高度一致	使用卒中易感的转基因动物或血栓栓塞模型, 例如卒中易感型自发性高血压大鼠(SHRsp)	现有模型已经广泛应用于卒中临床前研究领域, 更易被学术界认可; 阻断其他脑血管可能对实验动物造成更大的伤害, 增加死亡率
采用长期死亡率和功能损伤作为评价指标	采用短期内梗死体积和行为学转归作为终点指标	组织学和行为学研究持续至卒中造模后的2~3周	实验过程中造成的颈、头部损伤使行为学检测及结果分析变得复杂
很难对给药剂量和给药方式进行优化	可以对给药剂量和给药方式进行最大范围的优化	基于药物代谢和毒性数据分析优化临床给药方法	即便动物实验中的高剂量和预处理等手段无法应用于临床, 这些措施同样也可以使人们更加深入地理解脑卒中的病理过程, 从而发现更多潜在治疗靶点
一般不对患者进行预处理	对实验动物进行预处理	使用经典的动物模型确定候选药物的治疗时间窗	

理状态存在显著不同。其中最突出的差异是所有的缺血动物模型都是利用健康动物诱导构建而成的，而人类卒中通常是其他疾病或者危险因素自然进程的结果，通常发生于高龄、肥胖、高血脂、高血压、糖尿病、心脏疾病以及使用相关药物的背景下^[15]，所有这些因素都可以影响药物治疗的效果。例如，衰老是卒中的一个重要的危险因素，高龄患者卒中后脑功能损伤更加严重，恢复更加缓慢。目前越来越多的卒中研究实验室开始注意到这些问题，尝试使用老年、有并发症的动物，如遗传性高血压鼠或糖尿病鼠进行实验研究。研究者非常迫切地需要深入了解伴随不同危险因素的缺血性卒中病理反应及转归有何不同，及其对治疗药物应答差异性的分子病理机制。研究特别针对特定卒中人群的有效治疗药物应该是未来研发的一个重点方向^[13]。

1.3 缺血受损区域 人类缺血性卒中，大脑中动脉(MCA)阻塞造成的脑组织缺血梗死体积约占整个梗死区域的70%，而动物模型缺血区通常仅局限于大脑中动脉的血供区，仅有极少数的为后循环缺血性损伤模型，缺血部位高度一致，与人体真实情况不同^[13,16]。人类卒中时灰质损伤导致行为学障碍，白质损伤导致轻瘫，传统的鼠大脑中动脉阻塞模型主要是引起灰质损伤，可用于卒中治疗后行为能力恢复的评价，但是不能进行卒中后白质损伤相关轻瘫的研究^[17]，而且啮齿动物大脑白质所占比例较低，仅为人类的14%，因此对卒中后白质损伤的研究应选用猪或非人灵长类模型。

1.4 最佳治疗时间和剂量范围 临床上永久缺血性卒中患者在发病3 h后对治疗的反应性急剧下降，治疗时间窗较窄。临床前大脑中动脉永久性闭塞模型造模后脑梗死核心区不断向半暗带扩张，3 h后核心区梗死体积趋于稳定，在此之前给药可以减缓梗死区域的扩张^[18]。而暂时性阻塞模型由于再灌注恢复供血供氧，需6~12 h缺血再灌注区组织细胞才发生死亡^[18]，其治疗时间窗相对较长。目前临床前动物实验一般在缺血前或缺血发生后立即给予药物，而大多数临床试验往往在缺血发生6 h或更长的时间后才给予药物^[9]，给药时间的不一致是许多候选药物在动物实验有效而临床试验无效的一个重要原因。因此，STAIR建议使用经典的动物模型确定候选药物的治疗时间窗，并同时在永久性和暂时性两种动物模型上进行实验^[4]。治疗剂量方面，目前临床试验剂量远低于动物实验的有效剂量。STAIR建议临床前动物实验应明确最小有效剂量和最大耐受剂量，以及药物

在靶组织的预期浓度^[4]。

1.5 梗塞持续时间 动物研究中梗塞的持续时间可控而在临床研究中不可控。例如，线栓法MCAO模型可以通过改变实验参数对缺血及再灌注时间准确控制。但是，与此同时血管阻断又被限制在较短的时间窗内(一般为60~120 min)，否则模型动物就容易出现致命的水肿和出血^[19]。STAIR建议，在造模手术过程中对实验动物基本的生理学参数如血压、体温、血气和血糖等进行常规监测，以降低术后并发症和死亡率。使用多普勒超声对脑血流量进行监测确保足够程度的持续性阻塞，以及在短暂缺血模型中监测再灌注情况^[4]。

1.6 终点指标 卒中临床前动物研究中常以短期内的梗死体积和行为学转归作为终点指标，而临床研究中常采用长期(通常大于90天)死亡率和功能损伤作为评价指标^[20]。STAIR建议，结果评估既应包括组织学评估也应包括行为学评估。组织学和行为学研究必须持续至卒中造模后的2~3周或者更长时间，以证明在长时间生存中能够持续获益^[4]。如果可能，也应尽量使用在临床试验中可检验的指标用来作为部分评价指标，比如脑影像、血生化特异指标、药物作用机制性指标和神经功能测定以增强临床转化性。另外脑卒中中存在性别差异，例如女性的缺血性卒中发病率低于男性。与之相反，在许多临床研究中女性卒中患者的愈后较差。这种性别差异的生物基础依然所知甚少，存在激素依赖和非依赖因素。进一步理解性别差异对脑卒中分子病理机制的影响将极大促进个性化药物的研发^[21]。临床前药理学研究应当包括雄性和雌性动物，这种对比研究可以帮助了解不同性别对实验药物反应性，以及设计临床试验的纳入人群^[4]。

总之，如何优化动物模型使之能够复制人类所发生的缺血性卒中，是临床前卒中研究所面临的一大挑战，同时也是促进临床前卒中研究成果转变为临床治疗方法的关键之一。

2 实验设计

通过对13个潜在的神经保护剂实验数据的系统评价和meta-分析，已证明对卒中临床前实验结果具有决定性影响的实验设计因素主要包括：是否随机分组、是否盲法给药以及是否盲法对结果进行评估等^[22]。例如，对NXY-059的研究发现，在随机分组以及用盲法进行脑缺血诱导和结果评价时，与不采用此类方法的实验相比，得到的有效率显著降低^[23]。然而相关分析表明仅有36%的卒中临床前研究对实验动物采取了随机分组，11%采取了盲法给药，29%采取

了盲法对实验结果进行评估^[5]。由此可见, 实验设计的不合理可能是卒中临床前研究结果重复性差、转化率低的另一重要原因。为了确保获得高质量的客观数据, 卒中临床前研究的实验设计应该符合以下标准^[4]。

2.1 样本量计算 由于时间、费用、伦理和实验操作等方面的限制, 临床前研究使用的动物数目往往较少, 造成许多动物实验研究的统计功效不足或不明确。一个包含 730 项独立研究的 meta-分析表明, 仅 21% 研究的样本量的统计功效达到了标准^[24]。确定合适的样本量在实验中尤为重要, 样本量太小无法有力证明实验结果, 样本量太大会增加人力和物力成本。因此卒中临床前研究实验应预先说明样本量是如何确定的, 包括预期的组间差异、拟采取的分析方法、预期的统计功效以及据此计算出的样本量。

2.2 包含/排除标准 由于实验动物个体差异较大, 同一批实验动物造模后脑缺血程度、脑梗死体积不一, 因此在造模之后, 分组之前需要按照一定的标准对实验动物进行选择^[4]。例如, 使用多普勒血流仪对脑血流量进行监测, 只有脑血流灌注量降低至某一特定阈值的实验动物才能入选, 然后才能进行候选化合物的药效评价实验。

2.3 随机化 卒中临床前研究中通常需要将动物分为假手术组、实验组、溶剂对照组和阳性药对照组等。分组应采取随机化的方法, 如掷硬币法、计算机随机表格生成法等^[4]。

2.4 盲法 为了避免产生人为偏差, 卒中临床前研究应遵循盲法原则。施加干预因素时需要采用盲法原则, 由一名了解分组情况的独立研究人员按照动物编号准备好相应的溶剂、受试药物或对照阳性药并贴上编号标签, 由另一名不知道分组情况的研究员按照编号对应给药。结果评价也需要采用盲法原则, 负责测量梗死灶体积、评价行为学结果的研究人员不能知道动物的分组信息^[4]。

2.5 说明分析时被排除在外的动物 理论上所有随机分组的动物均应列入统计数据。但因疾病造模后动物死亡、梗死体积不达标、术后并发症影响行为学评价等原因, 一些动物可以被排除在分析之外。但应预先制定排除标准, 而且任何一个动物的排除都应在不知道其归属于哪个实验组的情况下进行。研究结果发表时应说明排除的标准和数量^[4]。

3 系统评价和 meta-分析

系统评价是指全面收集世界领域内所有相关研究, 并对纳入的研究逐个进行严格的审核, 采用适当的统计学方法, 联合所有研究结果进行综合分析评

价。Meta-分析是将纳入到系统评价中的多个同类研究的结果合并成为一个量化指标的统计学方法^[25]。Meta-分析方法是对多个同类独立研究的结果进行汇总分析, 以达到增大样本量, 提高结果可信度的目的。因此, 当各项同类独立研究结果不一致或者都无统计学差异时, 利用 meta-分析方法可以得到相对科学的结论^[26]。

临床试验研究强制性实施药物临床试验质量管理规范 (good clinical practice, GCP), 各项同类研究都采用明确且统一的操作标准, 同质性强, 因此目前系统评价和 meta-分析已经常规用于临床试验研究结果的分析以及循证医学研究。与此同时, 越来越多的研究者开始尝试将系统评价、meta-分析的方法用于对临床前研究结果的分析评价, 但一个重要的前提是要对这一方法的优势与局限有清醒的认识。

临床前卒中动物实验大多都是在单个研究中心进行的, 且每组的动物数目较少, 因此其可重复性较差, 经常会出现相互矛盾的实验结果。基于大量的动物实验数据以及候选药品的临床测试结果, 可以借助系统评价和 meta-分析的方法来分析判断某一种药物是否在临床前研究中有效, 以及是否有必要进入临床试验阶段^[27]。此外系统评价和 meta-分析还可以帮助考察临床前动物研究结果向临床转化的影响因素, 分析临床试验失败的原因^[27]。

不同独立中心进行的临床前研究, 在动物模型、手术操作方法、给药途径、剂量和时间等方面均可能不同, 实验数据往往具有一定的异质性。而按照统计学原理, 只有同质的资料才能进行合并或比较, meta-分析过程中对多个研究结果的异质性进行分析, 尽可能消除异质性原因, 使结果可以合并, 这是其优势所在。然而要想通过 meta-分析获得高质量的数据和科学的结论, 就必须确保纳入到 meta-分析的相关研究的异质性在一个很小的范围内^[27]。此外, 选择性发表阳性结果也会使 meta-分析结果不准确, 高估候选化合物的作用效果^[28]。增加 meta-分析可行性的措施包括: ① 制定卒中临床前动物实验的标准操作规程 (standard operating procedure, SOP), 动物手术和行为学评价等对实验结果影响较大的关键步骤应有统一的执行标准; ② 建立卒中临床前动物实验的预先注册和过程监督机制^[5], 应在注册文件中对研究目的、给药时间剂量、疾病模型种类、行为学评价方法和终点指标选择等预先进行说明。并在实验过程中严格遵守, 接受监督, 只有经过登记的临床前研究成果才能公开发表; ③ 尽可能全面地公开研究数据, 包括详

尽的操作步骤、完整的原始记录; ④ 建立阴性结果数据库等。这些措施同时也可以有效解决卒中临床前研究中存在的结果不可重复这一严重问题。

4 多中心随机对照临床前研究

另一个从临床研究借鉴而来的方法是多中心的随机对照研究。如上所述, 由于不同中心的卒中临床前研究异质性显著, 大大限制了系统评价和 meta-分析的可行性以及结论的可靠性。多中心随机对照临床前实验 (multicenter preclinical randomized controlled trials, pRCTs) 是指在多个不同的研究中心遵循相同的操作标准规程进行临床前研究, 并由独立的中心对研究数据进行汇总分析, 以评价候选药物临床前药效的一种协作研究形式^[29]。多中心随机对照临床前实验在不同的中心尽量保证实验各个方面完全相同, 保证多个中心的研究具有同质性, 样本量可进行加和统计, 其研究结果是判断候选化合物临床前药效的金标准。多中心随机对照临床前实验对实验设备和实验技术要求较高, 其人力、物力和时间成本大, 因此在决定进行临床前随机对照实验之前应该做好充分的调研评估工作。可以利用 meta-分析对目前的独立研究结果进行汇总分析, 以评价此候选化合物是否有进行多中心随机对照临床前实验的必要^[30]。另一方面, 临床试验成本很高, 开展多中心随机对照临床前实验可以降低临床试验失败的风险, 从这一角度来说, 多中心的随机对照临床前实验的投资收益比是很高的。总之 meta-分析和多中心随机对照临床前研究是促进动物实验结果向临床转化的重要措施 (图 1)。

进行卒中多中心随机对照临床前实验的设想多年前就已经提出, 然而直到 2015 年第一次多中心随机对照卒中临床前研究才宣告完成, 并证实了其可行性。该项目共有欧洲 4 个国家的 6 个研究中心参与, 并设有独立的协调中心。分别采用线栓模型和血栓栓塞模型观察了 CD49d 抗体对急性缺血性卒中的治疗效果^[31]。这项研究是临床前药物评价进入新阶段的关键节点, 为神经保护药物临床前研究带来了全新的概念。多中心随机对照临床前研究最重要的一点就是保证不同中心所进行研究的同质性^[11]。实验动物方面, 不同研究中心所用的动物种系、遗传背景、性别

比例、年龄组成、来源和饲养条件应该完全相同; 疾病模型方面, 不同研究中心应严格遵循事先确定的操作标准采用相同的方法建立疾病模型。动物手术操作人员需要经过统一的培训。因伦理要求不同, 不同国家研究中心在动物麻醉、术后动物护理等方面可以做调整, 但需要有书面方案, 并经项目各方讨论同意。此外需预先确立入选排除标准, 通过影像学鉴定, 只有脑缺血程度在某一合适范围内时才能继续进行实验; 行为学测试方面, 预先建立行为学测试的评价标准, 并对测试人员进行培训。行为学测试应采用盲法评估原则, 由一个独立的研究中心进行^[11, 31, 32]。

5 新研究技术和策略

5.1 影像学方法的应用

在卒中临床前动物实验中梗死体积是判断疾病模型是否成功建立的金标准, 同时也是卒中治疗后转归的初级终点指标^[4]。但组织学检测方法需要在卒中后某一特定的时间将实验动物处死, 这就不可避免地造成以下问题: 不能用于检测疾病造模是否成功; 不能对梗死体积的变化进行连续的监测; 与临床上采用的检测方法不一致, 增加了转化障碍; 不能进行模型动物脑梗死体积给药前后的自身对照比较。近年来, 神经影像技术发展迅速, 已成功地用于实时监控和检测各种治疗手段。核磁共振成像 (MRI) 是一种广泛应用于卒中临床研究的非侵入性成像方法。卒中临床前研究中, 弥散加权成像和灌注加权成像可在缺血性卒中早期分别诊断到水弥散或血流灌注的变化, 从而在缺血性脑卒中疾病模型建立的过程中确定脑缺血程度和部位, 或者在后续的实验中检测梗死体积这一重要转归指标。T₂ 加权成像对于脑缺血急性改变不敏感, 只能用于转归评价时检测梗死体积变化^[33]。Milidonis 等^[33]的系统评价表明, 在卒中发生 2 周内, T₂ 加权核磁共振成像可以取代组织学方法对实验动物脑梗死体积进行活体的非侵袭性检测。一些更为专业的技术, 如用于代谢研究的磁共振波谱, 用于评估白质损伤的扩散张量成像技术, 可以帮助研究者进一步了解缺血性损伤, 在体内评估神经保护作用^[34]。此外, 多普勒流量计也可用于动物造模过程中脑缺血程度的监测。NINDS 卒中研究进展小组建议, 在临床前动物研究



Figure 1 Meta-analysis and pRCTs as links in stroke translational research pipeline

中使用多种影像学方法检测卒中从发生至恢复的整个病理生理过程中脑血流、脑供氧、脑代谢和突触活动的变化,从而更加深入了解其发病机制^[35]。

5.2 组学技术的应用 转录组学、蛋白质组学、代谢组学用于鉴别卒中特异性的生物标记物或与疾病诊断、治疗和预后相关的分子靶标。组学的研究可以以人血清为样本,避免种属差异造成的研究结果无法转化。并且有研究认为不同的卒中亚型患者的基因表达不同,因此有望通过血液中卒中相关蛋白表达的不同,对卒中中进行分型和分类研究^[35]。

5.3 关注神经血管单元和卒中级联反应的作用 卒中发生时,缺血脑区各种类型的组织和细胞同时受损,显然用单纯的神经保护治疗是不够的。因此越来越多的研究人员建议由单一神经保护转变为以神经血管单元(NVU)作为靶点。NVU主要由微血管、神经元、胶质细胞和胞外基质相互联系、相互作用而组成,是大脑结构和功能的基本单元^[36]。近年来NVU已经成为脑缺血、阿尔茨海默病等相关疾病研究中的一个关键概念,然而其在缺血性卒中的病理生理进展过程中发挥何种作用仍不清楚。NINDS卒中研究进展小组对于NVU的相关研究也提出了若干建议:例如进一步研究NVU微血管与血管床微血管有何不同;组成NVU的血管内皮细胞、神经细胞和胶质细胞之间以何种方式进行信息传递;老年、淀粉样蛋白沉积、缺血和炎症等因素对这种信息传递有何影响等^[35]。此外,临床前研究还应关注卒中级联反应的各个层面,包括溶栓恢复血供、神经元保护、抑制氧化应激损伤、降低兴奋性毒性和钙超载、促进缺血半暗带的恢复、血脑屏障修复,血管及神经损伤修复,到最终的功能康复等^[11,35,37,38]。

6 加强转化研究的建议

提高临床前卒中研究转化性的措施主要包括3方面:①增强疾病模型对人类疾病主要病理生理机制的复制能力。可采取的措施包括优化实验动物模型使之能够模拟临床卒中组织、细胞和分子等多个方面的改变,使用与临床相同的检测手段确证模型动物的疾病表型等;②排除无关变量干扰。在卒中临床前研究中,最理想的情况是终点指标转归完全是由药物处置引起,没有其他影响因素共同参与。可采取的措施包括随机分组、确定纳入/排除标准和盲法结果评价等;③提高实验结果的可重复性。可采取的措施包括在不同的疾病模型、不同的研究中心对关键的实验结果进行交叉验证。除了从研究方法、策略、原则层面进行改进之外,更为关键的是相关机制的建立,

例如实验数据和生物材料共享机制、临床前实验研究的注册和监督管理机制、多中心随机对照协作研究机制等。这需要药物研发企业、学术科研工作者、实验研究的资助单位和监管机构进行全方位的科学整合,原先各种无法依靠独立研究有效解决的问题,利用这种知识和技术的协作形式将有望取得新的突破。

此外,对卒中神经保护药物的研发可以按其功能更加细化,如分别针对急性期或恢复期;灰质损伤或白质损伤;运动/感觉功能障碍或卒中后精神症状等。这种靶向药物特点的临床前研究,将采用不同的动物模型和药效评价指标,对今后的临床使用更具有指导意义。也要特别指出,脑卒中分子病理的基础研究也是极其重要和需要加强的,是转化医学研究的理论基础,彼此不应排斥和舍弃,共同目标都是为了更好地预防和治疗疾病^[39]。

转化困难不仅仅存在于卒中研究这一个领域,上述卒中临床前研究转化的措施对于阿尔茨海默病、帕金森氏病等神经退行性疾病的临床前动物研究也具有很大的借鉴意义。

References

- [1] Mozaffarian D, Benjamin EJ, Go AS, et al. Heart disease and stroke statistics – 2015 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2015, 131: e29–e322.
- [2] Hachinski V, Donnan GA, Gorelick PB, et al. Stroke: working toward a prioritized world agenda [J]. *Stroke*, 2010, 41: 1084–1099.
- [3] Mensah GA, Norrving B, Feigin VL. The global burden of stroke [J]. *Neuroepidemiology*, 2015, 45: 143–145.
- [4] Fisher M, Feuerstein G, Howells DW, et al. Update of the stroke therapy academic industry roundtable preclinical recommendations [J]. *Stroke*, 2009, 40: 2244–2250.
- [5] Minnerup J, Sutherland BA, Buchan AM, et al. Neuroprotection for stroke: current status and future perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13: 11753–11772.
- [6] Hafez S, Coucha M, Bruno A, et al. Hyperglycemia, acute ischemic stroke, and thrombolytic therapy [J]. *Transl Stroke Res*, 2014, 5: 442–453.
- [7] Wang Y, Liao X, Zhao X, et al. Using recombinant tissue plasminogen activator to treat acute ischemic stroke in China: analysis of the results from the Chinese National Stroke Registry (CNSR) [J]. *Stroke*, 2011, 42: 1658–1664.
- [8] O'Collins VE, Macleod MR, Donnan GA, et al. 1 026 experimental treatments in acute stroke [J]. *Ann Neurol*, 2006, 59: 467–477.
- [9] Sutherland BA, Minnerup J, Balami JS, et al. Neuroprotec-

- tion for ischaemic stroke: translation from the bench to the bedside [J]. *Int J Stroke*, 2012, 7: 407–418.
- [10] Vickrey BG, Brott TG, Koroshetz WJ, et al. Research priority setting: a summary of the 2012 NINDS Stroke Planning Meeting Report [J]. *Stroke*, 2013, 44: 2338–2342.
- [11] Dirnagl U, Endres M. Found in translation: preclinical stroke research predicts human pathophysiology, clinical phenotypes, and therapeutic outcomes [J]. *Stroke*, 2014, 45: 1510–1518.
- [12] Kumar A, Aakriti, Gupta V. A review on animal models of stroke: an update [J]. *Brain Res Bull*, 2016, 122: 35–44.
- [13] Fluri F, Schuhmann MK, Kleinschnitz C. Animal models of ischemic stroke and their application in clinical research [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 3445–3454.
- [14] Courtine G, Bunge MB, Fawcett JW, et al. Can experiments in nonhuman primates expedite the translation of treatments for spinal cord injury in humans? [J]. *Nat Med*, 2007, 13: 561–566.
- [15] Shigematsu K, Watanabe Y, Nakano H, et al. Influences of hyperlipidemia history on stroke outcome; a retrospective cohort study based on the kyoto stroke registry [J]. *BMC Neurol*, 2015, 15: 44.
- [16] Bogousslavsky J, Van Melle G, Regli F. The lausanne stroke registry: analysis of 1,000 consecutive patients with first stroke [J]. *Stroke*, 1988, 19: 1083–1092.
- [17] Ahmad AS, Satriotomo I, Fazal J, et al. Considerations for the optimization of induced white matter injury preclinical models [J]. *Front Neurol*, 2015, 6: 172.
- [18] Hossmann KA. The two pathophysiologies of focal brain ischemia: implications for translational stroke research [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012, 32: 1310–1316.
- [19] Durukan A, Tatlisumak T. Acute ischemic stroke: overview of major experimental rodent models, pathophysiology, and therapy of focal cerebral ischemia [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2007, 87: 179–197.
- [20] Neuhaus AA, Rabie T, Sutherland BA, et al. Importance of preclinical research in the development of neuroprotective strategies for ischemic stroke [J]. *JAMA Neurol*, 2014, 71: 634–639.
- [21] Herson PS, Palmateer J, Hurn PD. Biological sex and mechanisms of ischemic brain injury [J]. *Transl Stroke Res*, 2013, 4: 413–419.
- [22] Crossley NA, Sena E, Goehler J, et al. Empirical evidence of bias in the design of experimental stroke studies: a meta-epidemiologic approach [J]. *Stroke*, 2008, 39: 929–934.
- [23] Macleod MR, van der Worp HB, Sena ES, et al. Evidence for the efficacy of NXY-059 in experimental focal cerebral ischaemia is confounded by study quality [J]. *Stroke*, 2008, 39: 2824–2829.
- [24] Button KS, Ioannidis JP, Mokrysz C, et al. Power failure: why small sample size undermines the reliability of neuroscience [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14: 365–376.
- [25] Glass GV. Primary, secondary, and meta-analysis of research [J]. *Educ Res*, 1976, 5: 3–8.
- [26] Cooper H. *Research Synthesis and Meta-analysis: A Step-by-step Approach* [M]. Sage publications, 2016.
- [27] Sena ES, Currie GL, McCann SK, et al. Systematic reviews and meta-analysis of preclinical studies: why perform them and how to appraise them critically [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2014, 34: 737–742.
- [28] Tsilidis KK, Panagiotou OA, Sena ES, et al. Evaluation of excess significance bias in animal studies of neurological diseases [J]. *PLoS Biol*, 2013, 11: e1001609.
- [29] Llovera G, Liesz A. The next step in translational research: lessons learned from the first preclinical randomized controlled trial [J]. *J Neurochem*, 2016, 139 Suppl 2: 271–279.
- [30] Maysami S, Wong R, Pradillo JM, et al. A cross-laboratory preclinical study on the effectiveness of interleukin-1 receptor antagonist in stroke [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015, 36: 596–605.
- [31] Llovera G, Hofmann K, Roth S, et al. Results of a preclinical randomized controlled multicenter trial (PRCT): anti-CD49d treatment for acute brain ischemia [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7: 299ra121.
- [32] Kellner CP, Awad AJ, Mocco J. Developing new stroke treatments using preclinical randomized controlled trials [J]. *World Neurosurg*, 2016, 86: 13–14.
- [33] Milidonis X, Marshall I, Macleod MR, et al. Magnetic resonance imaging in experimental stroke and comparison with histology: systematic review and meta-analysis [J]. *Stroke*, 2015, 46: 843–851.
- [34] Obenaus A, Ashwal S. Neuroimaging of stroke and ischemia in animal models [J]. *Transl Stroke Res*, 2012, 3: 4–7.
- [35] Moskowitz MA, Grotta JC, Koroshetz WJ, et al. The NINDS Stroke Progress Review Group final analysis and recommendations [J]. *Stroke*, 2013, 44: 2343–2350.
- [36] Xue Q, Liu Y, He R, et al. Lyophilized powder of catalpol and puerarin protects neurovascular unit from stroke [J]. *Int J Biol Sci*, 2016, 12: 367–380.
- [37] Zhang ZG, Chopp M. Neurorestorative therapies for stroke: underlying mechanisms and translation to the clinic [J]. *Lancet Neurol*, 2009, 8: 491–500.
- [38] Nag S, Kapadia A, Stewart DJ. Review: molecular pathogenesis of blood-brain barrier breakdown in acute brain injury [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2011, 37: 3–23.
- [39] Hommel M, Detante O, Favre I, et al. How to measure recovery? Revisiting concepts and methods for stroke studies [J]. *Transl Stroke Res*, 2016, 7: 388–394.