·重大新药创制专项巡礼·

非人灵长类动物胚胎-胎仔毒性实验阳性药物的选择

崔艳君[1],田义超[1],周　莉[2,3],孙祖越[2,3]

(1 湖北天勤生物科技有限公司武汉分公司,武汉 430075;2 上海市计划生育科学研究所药理毒理研究室,中国生育调节药物毒理检测中心,上海 200032;3 复旦大学生殖与发育研究院,上海 200032)

[摘要] 生物技术药物研发的蓬勃发展促使越来越多的生物制品需要进行非人灵长类动物生殖与发育毒性研究,而国内开展该实验项目的机构和案例均较少,如何成功建立该实验体系,阳性药物的选择至关重要。对于大小鼠、家兔可引起胚胎畸形的药物积累了很多案例和经验,而非人灵长类动物的实验及案例报道较少,本文针对可引起非人灵长类动物胚胎发育畸形的药物展开综述。

[关键词] 非人灵长类;生殖与发育毒性;模型;阳性药物

[中图分类号] R965.3　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003-3734(2021)14-1266-08

Selection of teratogenic drugs for reproductive and developmental toxicity test in non-human primates

CUI Yan-jun[1], TIAN Yi-chao[1], ZHOU Li[2,3], SUN Zu-yue[2,3]

(1 *Hubei Topgene Biotechnology Co., Ltd., Wuhan Branch, Wuhan* 430075, *China*; 2 *Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, National Evaluation Center for Toxicology of Fertility Regulating Drugs, Shanghai* 200032, *China*; 3 *Reproductive and Developmental Research Institute of Fudan University, Shanghai* 200032, *China*)

[**Abstract**] The reproductive and developmental toxicity evaluation on non-human primates is required urgently as the booming of biotechnological drugs. The selection of positive drugs is vital for establishment of the test system when there is less experience in domestic safety evaluation centers. There are different kinds of teratogens reported to both human and animals such as rodents, rabbits, but less on non-human primates. In this paper the potential teratogens to non-human primates were reviewed according to the literature.

[**Key words**] non-human primate; reproductive and developmental toxicity; model; teratogenic drugs

1961年“反应停”事件为人类安全用药敲响了警钟,也使得生殖与发育毒性实验成为非临床安全性评价关注的重点。近年来,我国生物制药产业发展环境日渐改善,生物技术药物研发迈向创新升级的新台阶,除常规的单次给药毒性实验、重复给药毒性实验、安全药理学实验等评价外,越来越多的生物制品也需要进行生殖发育毒性的相关评价,非人灵长类动物生殖与发育毒性实验成为很多药物安全性评价机构准备开展的实验。目前,国内开展非人灵长类动物的生殖与发育毒性实验的报道很少,如何成功建立该实验体系,阳性药物的选择至关重要。

目前,已知的人类发育毒物有辐射、感染、母体创伤、代谢失调及药物和化学品。其中药物有沙利度胺(thalidomide)、抗肿瘤药物[白消安、环磷酰胺(cyclophosphamide,CPA)、氨基蝶呤、甲氨蝶呤]、维A酸类(异维A酸、依曲替酯、阿维A酸)、氨基糖苷类、雄性激素、血管转化酶抑制剂、血管紧张素受体拮抗剂、抗惊厥药物、可卡因、香豆素、阿糖胞苷、己烯雌酚、达那唑、麦角胺、氟康唑、甲巯咪唑、奎宁(高剂量)、丙戊酸、四环素等[1-3]。

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目(2018ZX09201017-002)

[作者简介] 崔艳君,女,硕士研究生,助理研究员,主要从事药物非临床安全性评价。E-mail:cuiyanjun1981@163.com。

[通讯作者] 孙祖越,男,研究员,博士生导师,主要从事药物生殖与发育毒理学研究。E-mail:sunzy64@163.com。

对于可引起大小鼠和家兔胚胎畸形的药物积累了很多案例和经验,而非人灵长类动物的实验及案例报道较少,本文针对可引起非人灵长类动物胚胎发育畸形的药物展开综述。

1 常用药物类型、剂量、给药途径及致畸表现

1.1 沙利度胺 沙利度胺是一个众所周知可导致胎儿畸形的药物。该药 20 世纪 50 年代最先在德国上市,作为镇静剂和止吐药,主要用于治疗妊娠恶心、呕吐,因其疗效显著、不良反应轻且少而迅速在全球广泛使用。但在短短的几年里,全球发生了以往极其罕见的上万例海豹肢畸形儿,调查研究发现,导致这些畸形儿的罪魁祸首就是当时风靡全球的沙利度胺。沙利度胺引起的畸形包括肢体缺陷、面部血管瘤、食道和十二指肠闭锁、法式四联症、肾小球/肾发育不全、异常外耳和颅神经异常,人类致畸敏感期为妊娠天数 (gestational days, GD)21 ~ 36[4-5]。

关于沙利度胺致畸机制还在不断的探索中,但科学家已用该药物在非人灵长类体内模拟出与人类似的畸形。1972 年,Tanimura[6] 将沙利度胺 20 mg·kg^{-1},于 GD24 ~ 26 给予恒河猴、日本猕猴孕猴,均可引起 2 种品系所有新生仔猴出现典型的上肢畸形、骨骼畸形。1972,1973,1978 和 1985 年,Hendrickx 等[7-8] 和 Newman 等[9] 发表多篇文献,将 10 或 30 mg·kg^{-1} 沙利度胺于 GD24 ~ 30 或 GD25/28 单次 *po* 给予食蟹猴、非洲绿猴、顶冠猕猴,也可以引起上述畸形变化。国内也有相关文献报道,2012 年,袁芳等[10] 将沙利度胺 20 mg·kg^{-1},于 GD26 ~ 32 或 GD26 ~ 50 给予食蟹猴,成功获得阳性结果。

1.2 CPA CPA 是临床上常用的一种抗肿瘤药物和免疫抑制剂,也是研究最多的化学致畸剂之一,背景资料较多。临床零星病例报告和大病例系列病例均表明,产前早期暴露于 CPA 的婴儿经常患有环磷酰胺胚胎病(CPA embryopathy),具体表现为胎龄小、颅面畸形,包括眼部畸形、腭裂/唇裂、脑积水、小头畸形、低位小眼症,听力障碍、颅骨前突和面部不对称,还观察到肢体缺损,例如桡骨、尺骨和胫骨发育不全、手和足的指骨缺损以及椎骨融合等[11]。

CPA 经常用于致畸、致突变研究,是大鼠、家兔生殖毒性实验最常用的阳性致畸药物[12],而用于非人灵长类动物致畸模型的报道较少。

1979 年,Mcclure 等[13] 将 CPA 2.5,5,7,10,15,20 mg·kg^{-1} 于 GD25 ~ 43 的不同时间段肌内注射 53 只恒河猴孕猴。16 只胎仔正常,21 只宫内死胎或流产,16 只出现畸形,其中畸形主要为:唇裂/腭裂、颅面畸形、脑膜脑膨出、尾巴弯曲以及其他骨骼异常,汇总见表 1。实验结果表明 CPA 5 ~ 10 mg·kg^{-1} 给予恒河猴孕猴,早期(GD27 ~ 29)给予 CPA 动物较容易出现唇裂/腭裂、眼球发育异常;GD32 ~ 36 给药,较容易出现颅面畸形、前颅骨发育不良和脑膜脑膨出。

表 1 CPA 诱导恒河猴颅面发育异常的实验[13] $n = 53$

CPA 剂量 /mg·kg^{-1}	动物数量	畸形					尾巴弯曲	死胎	正常
		数量(畸形率/%)	唇/腭裂	颅面畸形	脑膜膨出	其他			
2.5	3	—	—	—	—	—	—	—	3
5	7	1(14)	1	—	—	—	—	4	2
7	12	3(25)	1	2	—	—	—	7	2
10	24	12(50)	4	4	3	1	2	5	5
15	3	—	—	—	—	—	—	1	2
20	4	—	—	—	—	—	—	4	—

1991 年,Hendrickx 等[14] 将 CPA 3.5,7 mg·kg^{-1} 于 GD16 ~ 18、CPA 7 mg·kg^{-1} 于 GD27 ~ 29 分别 *po* 给予 4 只食蟹猴,结果表明:GD16 ~ 18 给予 CPA (3.5,7 mg·kg^{-1}),可引起较高的死胎率达 75%(7 mg·kg^{-1}:1 只;3.5 mg·kg^{-1}:2 只),3 只(7 mg·kg^{-1}:2 只;3.5 mg·kg^{-1}:1 只)生长迟滞、发育异常,如脑发育不良、上肢畸形,2 只胎仔(7 mg·kg^{-1}:1 只;3.5 mg·kg^{-1}:1 只)正常;GD27 ~ 29 给予 CPA(7 mg·kg^{-1}),4 只动物均出现各种不同程度发育异常,包括:生长延缓(2 只)、主动脉瓣狭窄(1 只)、骨骼畸形(融合或半脊椎 3 只,肋骨融合 2 只,指缺失 1 只)、颅面畸形(腭裂/唇裂 1 只,颧骨和颞骨发育不良 1 只)。

2000 年,Wei 等[15] 选用该造模方式,将 CPA 7.5,10 mg·kg^{-1} 于 GD27 ~ 29 肌内注射恒河猴和食蟹猴孕猴,在 CPA 诱导唇裂、腭裂模型上成功探索了非

人灵长类上侧切牙和前颌的起源与发展。

1.3 维 A 酸类 维生素 A 和类视黄醇具有广泛的药理学作用,但同时也是典型的可引起多种动物种属畸形的药物[16-17]。第一代维 A 酸类药物包括全反式维 A 酸和 13 顺式维 A 酸。全反式维 A 酸是体内维生素 A 的代谢中间产物,主要影响骨的生长和促进上皮细胞增生、分化、角质溶解等代谢作用。13 顺式维 A 酸通常是通过异构化为全反式维 A 酸发挥作用。

口服维 A 酸对实验动物(包括小鼠、大鼠、兔、猴等)和人都有很强的致畸作用。一系列动物实验研究显示,维 A 酸在不同的孕期给予不同的剂量可引起各种各样的发育畸形,如在器官形成期早期给予该药物,可引起中枢神经系统和心血管系统异常;器官形成期稍晚期给药,常会引起肢体、泌尿生殖系统及上颚畸形,称为 RAS 信号通路相关综合征[18-19]。与实验动物相比,13 顺式维 A 酸对人类的致畸危害更严重。在人体内,13-顺式维 A 酸的无意暴露可引起颅面、心脏、胸腺、中枢神经结构异常,常见的畸形有小耳或先天缺失、小颌畸形、腭裂、外耳和听道缺损、面部畸形、心脏及主动脉弓畸形、胸腺发育不良、小头畸形、脑积水、视网膜/视神经等[20-21]。

全反式维 A 酸和 13 顺式维 A 酸的生物活性存在很大差异。13 顺式维 A 酸不与细胞内维 A 酸结合蛋白及维 A 酸受体结合,而全反式维 A 酸与前两者结合。全反式维 A 酸和 13 顺式维 A 酸都可以发生异构化。全反式维 A 酸与细胞核结合受限制,组织分布广泛,胎盘转运活跃,人体内半衰期约 1 h。13 顺式维 A 酸可广泛与细胞核结合,但组织分布和胎盘转运受限,人体内半衰期可长达 16 h[22-25]。13 顺式维 A 酸致畸性在人与动物存在较大种属差异剂量[16,19-20],敏感程度上人类 > 猴 > 兔 > 大鼠和小鼠,人体致畸剂量为 1 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$,猴为 5 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$,大鼠为 75 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$。人类的高敏感性的可能原因是该药物较慢的清除速率、低水平的葡萄糖醛酸化(解毒过程),缺乏与细胞内维 A 酸结合蛋白和维 A 酸受体的结合,但易与细胞核结合,并连续不断地异构成为全反式维 A 酸等。2 种不同形式的维 A 酸在非人灵长类动物胚胎胎仔发育毒性实验总结见表 2 和表 3[26-34]。

表 2 13 顺式维 A 酸致畸剂量、给药时间、动物及相关实验结果汇总

给药剂量 /$mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$	给药时间及给药频率	动物	母体毒性	胚胎/胎儿死亡率/%	畸形率/%							
					颅面				胸腺发育	心脏	小脑蚓部发育不良	泌尿生殖系统发育不良
					外耳	颞骨	下颌骨	上腭				
2.5	GD12 ~ 27,*qd*	食蟹猴	无	45(5/11)	50(3/6)	50(3/6)	33(2/6)	0	0	17(1/6)	33(2/6)	0
	GD20 ~ 27,*qd*; GD28 ~ 30,*bid*	食蟹猴	无	20(1/5)	50(2/4)	0	0	0	0	0	50(2/4)	0
	GD26 ~ 27,*bid*	食蟹猴	无	0(0/5)	0	0	0	0	0	0	0	0
	GD16 ~ 25,*qd*; GD26 ~ 27,*bid*	食蟹猴	无	31(4/13)	67(6/9)	11(1/9)	0	0	0	0	22(2/9)	0
	GD10 ~ 20,*qd*; GD21 ~ 24,*bid*	食蟹猴	无	18(2/11)	56(5/9)	67(6/9)	11(1/9)	0	0	22(2/9)	0	0
2	GD18 ~ 28,*qd*	食蟹猴	体重及摄食量下降、腹泻	40(4/10)	0	0	0	0	0	0	0	0
10				100(3/3)								
25				100(5/5)								
2.5	GD21 ~ 24,*bid*	食蟹猴	无	60(3/5)	0	0	0	0	0	0	0	0
	GD25 ~ 27,*bid*	食蟹猴	无	20(1/5)	0	0	0	0	0	0	0	0
	GD10 ~ 25,*qd* GD26 ~ 27,*bid*	食蟹猴	无	22(2/9)	71(5/7)	59(4/7)	57(4/7)	0	57(4/7)	29(2/7)	29(2/7)	0
10	GD22 ~ 44,*qd*	卷尾猴	无	39(7/18)	66.3 (7/11)	18.1 (2/11)	81.8 (9/11)	66.3 (7/11)	0	9.1(1/11)	0	9.1(1/11)

表 3 全反式维 A 酸致畸剂量、给药时间、动物及相关实验结果汇总

给药剂量 /mg·kg^{-1}·d^{-1}	给药时间及给药频率	动物	母体毒性	胚胎/胎儿死亡率/%	畸形率/%						
					颅面				胸腺发育不良	心脏畸形	小脑蚓部发育不良
					外耳	颞骨	下颌骨	上腭			
5	GD10～20,*qd*; GD21～24,*bid*	食蟹猴	无	22(2/9)	0	0	0	0	0	0	0
10			体重下降、胃肠道毒性、面部病变	50(3/6)	67(2/3)	33(1/3)	67(2/3)	33(1/3)			
20				100(1/1)	0	0	0	0			
20～40	GD17～45 (4～8 d)	恒河猴	面部病变	未见报道	存在	0	存在	存在	存在	0	存在
7.5～10	GD18-44	卷尾猴	未见报道	存在	存在	0	存在	存在	0	存在	0
10～80	GD20-46	恒河猴	未见报道	存在	存在	0	0	存在	存在	0	存在

文献来源:31－34

另有研究表明,较小剂量 13 顺式维 A 酸 2.5 mg·kg^{-1}·d^{-1},*qd*,在器官形成敏感期(如 GD12～27)给药也可引起胚胎-胎仔畸形[31],实验结果显示食蟹猴后脑神经嵴迁移发生于 GD26/27 之前。维 A 酸引起的特征性外耳畸形,药物在器官形成期之前早期暴露(GD18 或 GD20 之后暴露未见此种畸形)及长时间暴露(如 GD12～27)至关重要;药物的早期暴露(GD16 之前)同样对内耳畸形的形成有重要作用,与 GD10 给予维 A 酸相比,GD16 开始给予此药,内耳畸形未见或发生率很低(59%～67% vs 11%);小脑蚓部发育障碍需要从 GD24 之后开始给药;GD20～30 为前肢发育期。Korte 等[27]发现食蟹猴器官发育敏感期分别为:颅面骨骼及心脏,GD10～24;胸腺及大脑,GD24 以后;外耳,GD16～24。此外,外耳畸形似乎是 13 顺式维 A 酸致畸性的特征性表现及胚胎毒性严重程度的标志物。

有临床病例报告指出,相对于全身,怀孕后局部维 A 酸暴露会导致畸形,但是,全身吸收程度低和可用的对照研究(仅包括 400 多次暴露的妊娠)均不能支持局部应用维 A 酸治疗会增加畸形风险的结论[35]。

1.4 丙戊酸 丙戊酸类药物自 1967 年起进入法国市场,广泛用于治疗成人和儿童癫痫及躁郁症,代表药物有“德巴金”、丙戊酸钠缓释片等。法国国家药品与健康产品安全局等机构分析数据后发现,孕妇服用丙戊酸类药物治疗癫痫或躁郁症,生下婴儿出现先天畸形的风险分别比正常人高出 4 和 2 倍[36]。

动物实验研究表明,丙戊酸 600 mg·kg^{-1}皮下注射给予小鼠,可引起 60% 存活胎仔神经管发育畸形,该畸形仅在小鼠可见[37]。1986 年,Terryl 等[38]将丙戊酸 20,200 mg·kg^{-1} GD21～50 和 600 mg·kg^{-1} GD21～30 给予 11 只恒河猴,600 mg·kg^{-1}组引起所有动物(3/3)死胎,并均可见到颅面和骨骼畸形;200 mg·kg^{-1}组引起动物死胎(3/5),胎仔可见畸形(2/5);20 mg·kg^{-1}组引起胎仔未见异常(2/3),胎仔可见畸形(1/3)。1988 年,Hendrickx 等[39-40]将丙戊酸 20,75,100,150,200 mg·kg^{-1}于 GD21～50 和 450,600 mg·kg^{-1}于 GD20～23 给予 33 只恒河猴孕猴,出现跟剂量相关的发育毒性,如胚胎及胎儿死亡率、宫内发育迟缓、颅面及骨骼畸形,其中 20,75 mg·kg^{-1}剂量组畸形率少见,仅有个别动物(1/3)可见颅面异常形状或伴有耳低位;200 mg·kg^{-1}剂量组畸形发生率最多,最常见的畸形为指骨发育不良(9/9)、下颌骨发育不良(4/9)、长骨畸形(3/9)、椎骨融合或只见一半(3/9);450,600 mg·kg^{-1}于 GD20～23 未见长骨、指骨畸形,较多见颅面畸形(1/1,1/2)和椎骨、肋骨发育不良(1/1,2/2)。

1.5 皮质类固醇类激素 皮质类固醇类激素的应用广泛,所以很早就有此类药物的致畸性研究。Walker 等[41]检测了 6 种激素类药物,致畸程度不一,其中氟羟氢化泼尼松致畸性最强。Hendrickx 等[41]利用 3 种不同的非人灵长类品系:冠毛狨猴、恒河猴、狒狒检测了该药物(15～20,3～28,1～14,3～19 mg·kg^{-1}于 GD 41～44,37～48,37～44,50～133,*im* 给药)的致畸作用。研究表明,氟羟氢化泼尼松可引起口腔颅面畸形(前额突出、囟门增宽、腭裂等)、胸腺发育不良、肌肉畸形、肾上腺发育不良、肾脏发育畸形,其中口腔颅面发育畸形和胸腺发育不良发

生率最高。此外,3 种动物均可见较严重的生长发育迟缓,体重和身长降低约 30% ~40%。

曲安奈德(triamcinolone acetonide,TAC)属曲安西龙的衍生物,为一种强效的糖皮质激素。其具有明显的抗过敏作用,可明显减轻过敏性鼻炎的鼻腔症状,该药物在鼠、家兔及猴体内均有致畸性,研究者将由该种药物引起的畸形称为 TAC 综合征[42-48]。Hendrickx 等[42]研究发现,TAC 10 ~20,10 ~15,5 ~10 $mg\cdot kg^{-1}$ GD21 ~43(1,3 或 5 d)给予恒河猴、冠毛猕猴、狒狒,3 种种属均可见中枢神经系统畸形和头骨畸形,畸形程度和发生率随着给药剂量和给药天数增多而加重,研究中发现 GD23 ~31 为神经管闭合、中脑吻端分界、原始丘板和 2 个中脑神经节的发育关键期。10 $mg\cdot kg^{-1}$ GD23 ~31 肌内注射给予孕猴(单次给药或多次给药,最多连续 5 d),可引起恒河猴脑脊髓膜突出、脑水肿等中枢神经系统畸形。

1.6 作用于肾素血管紧张系统的药物 Mehndiratta 等[49]的一项临床研究中,孕妇在使用雷米普利、替米沙坦和华法林等心血管系统药物后,可导致胎儿/产后死亡。研究指出作用于肾素-血管紧张素系统的药物可能会由于胎儿肾功能下降导致羊水过少,从而引起肺发育不全、骨骼畸形和颅骨发育不良。

胎儿华法林综合征(华法林胚胎病)是孕妇在怀孕期间摄入华法林的结果。华法林的胚胎毒性包括新生儿的畸形,如典型的鼻发育不全和骨骺斑点,出生后新生幼鼠给予华法林可建立鼻发育不全和骨骼发育不良的大鼠模型,该模型通过补充维生素 K_1 保证幼鼠存活[50]。

血管紧张素转化酶抑制剂可降低胎儿血压并降低肾功能,会引起羊水过少、宫内发育生长受限、肾发育不良、无尿、肾衰竭、颅底出血和死亡[51]。

上述药物非人灵长类动物的致畸性研究未见相关报道。

1.7 性激素类药物 醋酸甲羟孕酮(medroxyprogesterone acetate,MPA)20 或 100 $mg\cdot kg^{-1}$ GD(27 ±2)单次给予食蟹猴,均可引起仔猴外生殖器发育畸形,雌性仔猴表现为局部或完全阴唇融合、阴蒂肥大,雄性仔猴表现为阴茎短小、阴囊肿胀或可见尿道下裂[52]。

己酸羟孕酮(hydroxyprogesterone caproate,HPC)单独或联合戊酸雌二醇以人用剂量 0.1 ~10 倍人等效剂量 GD20 ~146 期间每 7 d 为一个给药周期,*im* 给予食蟹猴和恒河猴,可引起胚胎死亡,但未见致畸作用[53]。

非那雄胺(finasteride)2 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ 于 GD20 ~100 *po* 给予 12 只孕猴,可引起雄性仔猴出现尿道下裂、粘连龟头、小阴囊、小阴茎等畸形,雌性仔猴未见发育畸形;非那雄胺 8,80,800 $ng\cdot d^{-1}$ 于 GD20 ~100 *iv* 注射给予 32 只孕猴,未见雌性和雄性仔猴发育畸形[54]。

2 阳性药物的选择依据

非人灵长类动物在药物和化学品的致畸评估中发挥了独特的作用,早在 20 世纪 60 年代就发现它们在妊娠早期暴露于止吐药沙利度胺后,与人类的致畸结果有着非常相似的反应。随着生物技术产品的开发和随后的安全性评估,非人灵长类动物的角色已经从替代实验物种转变为首选或必要的实验对象,因为很多生物制剂只在系统发育和生理学上接近人类的物种中具有生物活性[55]。猕猴和人类在生理上有着密切的相似性,包括月经周期的时间长短、激素控制、类似的着床过程中细胞分化和内分泌过程以及相似的胚胎宫内发育时程表,因此,在评价生物制剂的发育毒理学研究中为高度相关的动物种属。

目前,国内开展非人灵长类动物的生殖与发育毒性实验的报道很少,为摸索非人灵长类动物的生殖毒性实验的条件,如动物交配、孕猴的饲养、护理、受孕成功判断、给药周期、阳性药物选择等,均需要进一步的摸索和验证。可引起非人灵长类胚胎及胎仔发育畸形的药物种类很多,在实际实验设计中,应根据具体情况选择合适的药物。

沙利度胺[56]是最典型的致畸药物代表,但需要注意的是,沙利度胺是典型的手性药物,其右旋异构体具有镇静作用,而左旋异构体正是引发致畸性的罪魁祸首。故在选择沙利度胺作为阳性对照时,需注意到左旋和右旋的差异。

在选择药物剂型时需考虑给药途径。上述药物中,沙利度胺、维 A 酸类、丙戊酸等多为口服制剂,类固醇皮质激素和性激素多为肌内注射,故选择药物需要考虑不同的给药操作可能引起动物的应激反应,严重可引起孕猴流产或早产等。

此外,当侧重于考察某种结构的药物或某种生殖毒性特点时,根据该药物与已知阳性药物的结构或者其他特征相似性,决定选择上述某种药物作为阳性药物。

另外,由于相关文献发表时间较早,药物的剂

量及孕期给药时间的确定也需要进行预实验进行摸索。应选择合适药物剂量,防止剂量过高,引起母体毒性、胎仔流产或死胎,从而影响到畸形的观察。

生物技术药物的蓬勃发展是非人灵长类动物生殖与发育毒性实验需求增加的原因,其中生物技术药物的免疫原性和免疫毒性是临床前实验关注的重点。胸腺是胎儿免疫系统发育的关键器官。3 种致畸剂(TAC、13-顺式维 A 酸及锌缺乏)均可导致猕猴胸腺的异常发育,在胸腺发育的关键时期,胚胎暴露于 TAC 会导致明显的发育不良,胸腺淋巴细胞减少;13-顺式维 A 酸暴露于恒河猴早期妊娠、神经嵴迁移时间,胸腺上皮成分减少、再生障碍和发育不良是其维 A 酸综合征的显著特征;实验性缺锌后,从受孕到 1 岁可引起免疫能力的严重改变[57]。

目前由于生物技术药物的用药周期、给药频率及药物特性,可引起发育生殖毒性阳性结果的药物报道较少,故上述所列均为小分子药物,在具体实验中,生物药的给药频率和周期可能和小分子药物完全不同,阳性药物的选择应结合本中心以往经验的积累、药物的作用机理及预期可能引起的畸形等多方面综合考虑。针对不同类型的生物制剂,需遵循逐案原则(case by case),以充分评估这些生物制剂的安全性。

3 研究展望

目前国外毒理研究更多的是遵循“3Rs”原则,减少动物使用。随着“3Rs”原则的实施,药物非临床生殖发育毒性研究中的整体动物实验面临严重挑战,体外替代研究逐步成为研究热点。在此基础上,一系列生殖发育毒理学替代方法,包括体外全胚胎培养实验、胚胎细胞微团培养实验、胚胎干细胞实验、雌性生殖系统细胞和组织培养、胚胎细胞和组织培养、乳腺细胞培养等体外培养技术在生殖发育毒性评估中能尽可能替代动物实验、减少所需动物数量或使动物实验程序得以优化而减少动物的痛苦,特别是在外源毒性物质的毒性初步评价上,可以作为整体动物实验的补充[58-59];生殖发育毒性周期长、涵盖面广,现有的任何一种体外方法无法全面模拟药物在体内作用的全过程,无法全面反映其对于生殖发育周期中性成熟、受精、配子发生、合子发育、出生后发育及性功能等方面的影响[59]。

在药物开发前期,可整合体外替代研究,根据受试物特性、分布、用途、适用范围、其他毒理学实验及毒理学资料、技术水平、管理部门的要求等特点进行实验设计,通过一系列反映不同实验终点的组合实验综合评定药物体外生殖发育毒性[60]。随着新药研发进程,充分遵循“3Rs”原则,在保障动物福利的情况下,评估风险与收益原则可分阶段、逐步开展大鼠、家兔乃至非人灵长类的生殖与发育毒性实验。

综上,非人灵长类动物作为与人同源性最高的动物之一,在生物技术药物研发中一直扮演着重要的角色。但由于实验动物伦理的普及、动物资源的匮乏及较高的商业价格,使得非人灵长类生殖毒性实验的展开受到众多制约,但不可否认其在生物技术药物毒性评价中的重要作用和指导意义。随着国家十三五“重大新药创制”科技项目对国内药物安全性评价事业的支持,国内将会有越来越多的企业需要进行非人灵长类动物生殖与发育毒性评价,而随着项目的开展和经验积累,非人灵长类动物也会在生殖与发育毒性评价中发挥更大的作用。

[参 考 文 献]

[1] OBIČAN S, SCIALLI AR. Teratogenic exposures[J]. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 2011, 157C(3): 150-169.

[2] 周宗灿, 付立杰. 现代毒理学简明教程[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2012.

[3] SCHARDEIN JL, KELLER KA. Potential human developmental toxicants and the role of animal testing in their identification and characterization[J]. *Crit Rev Toxicol*, 1989, 19(3): 251-339.

[4] NO AUTHORS LISTED. Thalidomide Teratogenic Effects Linked to Degradation of SALL4: After 60 years, researchers have now shed light on the mechanism underlying thalidomide's devastating teratogenic effects[J]. *Am J Med Genet Part A*, 2018, 176(12): 2538-2539.

[5] WELLS PG. A new target for thalidomide[J]. *Nat Chem Biol*, 2018, 14(10): 904-905.

[6] TANIMURA T. Effects on macaque embryos of drugs reported or suspected to be teratogenic to humans[J]. *Acta Endocrinol Suppl*, 1972, 166: 293-308.

[7] HENDRICKX AG. The sensitive period and malformation syndrome produced by thalidomide in crab-eating monkey (Macaca fascicularis)[J]. *J Med Primatol*, 1973, 2(5): 267-276.

[8] HENDRICKX AG, SAWYER RH. Developmental staging and thalidomide teratogenicity in the green monkey (Cercopithecus aethiops)[J]. *Teratology*, 1978, 18(3): 393-404.

[9] NEWMAN LM, HENDRICKX AG. Temporomandibular malformations in the bonnet monkey (Macaca radiata) fetus following maternal ingestion of thalidomide[J]. *J Craniofac Genet Dev Biol*, 1985, 5(2): 147-157.

[10] 袁芳,潘晓靓,陆亮,等. 食蟹猴胚胎-胎仔发育毒性评价模型的建立及母体暴露沙利度胺对胎仔基因表达的影响[C]. 第二届中国药物毒理学年会,2012.

[11] RENGASAMY P. Congenital malformations attributed to prenatal exposure to cyclophosphamide[J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2017, 17(9): 1211 - 1227.

[12] MIRKES PE. Cyclophosphamide teratogenesis: a review [J]. *Teratog Carcinog Mutagen*, 1985, 5(2): 75 - 88.

[13] MCCLURE HM, WILK AL, HORIGAN EA, *et al*. Induction of craniofacial malformations in rhesus monkeys (Macaca mulatta) with cyclophosphamide [J]. *Cleft Palate J*, 1979, 16(3): 248 - 256.

[14] HENDRICKX AG, PETERSON PE, ROWLAND JR, *et al*. Early embryonic sensitivity to cyclophosphamide in long-tailed monkeys (Macaca fascicularis)[J]. *Teratology*,1991,43:445.

[15] WEI X, SENDERS C, OWITI GO, *et al*. The origin and development of the upper lateral incisor and premaxilla in normal and cleft lip/palate monkeys induced with cyclophosphamide [J]. *Cleft Palate Craniofac J*, 2000, 37(6): 571 - 583.

[16] NAU H, BLANER WS. Retinoids: the biochemical and molecular basis of vitamin A and retinoid action[J]. *Handb Exp Pharmacol*, 1999.

[17] NAU H. Toxicokinetics and structure-activity relationships in retinoid teratogenesis[J]. *Ann Oncol*, 1994, 5(Suppl): S39 - S43.

[18] LAMMER EJ, CHEN DT, HOAR RM, *et al*. Retinoic acid embryopathy[J]. *N Engl J Med*, 1985, 313(14): 837 - 841.

[19] NAU H, CHAHOUD I, DENCKER L, *et al*. Teratogenicity of vitamin A and retinoids[M]. 1994.

[20] KOCHHAR DM, CHRISTIAN MS. Tretinoin: a review of the nonclinical developmental toxicology experience[J]. *J Am Acad Dermatol*, 1997, 36(3 Pt 2): S47 - S59.

[21] NAU H. Correlation of transplacental and maternal pharmacokinetics of retinoids during organogenesis with teratogenicity[J]. *Methods Enzymol*, 1990, 190: 437 - 448.

[22] NAU H. Teratogenesis, transplacental pharmacokinetics, and metabolism of some retinoids in the mouse, monkey, and human. In: Livrea M, Packer L, editors. Retinoids: progress in research and clinical applications[J]. *New York: Marcel Dekker*, 1993: 599 - 616.

[23] NAU H. Teratogenicity of isotretinoin revisited: species variation and the role of all-trans-retinoic acid[J]. *J Am Acad Dermatol*, 2001, 45(Suppl): S183 - S187.

[24] NAU H. Retinoid teratogenesis: toxicokinetics and structure-specificity[J]. *Arch Fur Toxikologie Suppl*, 1994, 16: 118 - 127.

[25] TZIMAS G, NAU H. Vitamin A teratogenicity and risk assessment in the macaque retinoid model[J]. *Reprod Toxicol*, 2001, 15(4): 445 - 447.

[26] HENDRICKX AG, TZIMAS G, KORTE R, *et al*. Retinoid teratogenicity in the macaque: verification of dosing regimen[J]. *J Med Primatol*, 1998, 27(6): 310 - 318.

[27] KORTE R, HUMMLER H, HENDRICKX AG. Importance of early exposure to 13-Cis retinoic acid to induce teratogenicity in the cynomolgus monkey[J]. *Teratology*, 1993, 47(1): 37 - 45.

[28] HUMMLER H, KORTE R, HENDRICKX AG. Induction of malformations in the cynomolgus monkey with 13-Cis retinoic acid [J]. *Teratology*, 1990, 42(3): 263 - 272.

[29] FANTEL AG, SHEPARD TH, NEWELL-MORRIS LL, *et al*. Teratogenic effects of retinoic acid in pigtail monkeys (Macaca nemestrina). I. General features [J]. *Teratology*, 1977, 15(1): 65 - 71.

[30] NEWELL-MORRIS L, SIRIANNI JE, SHEPARD TH, *et al*. Teratogenic effects of retinoic acid in pigtail monkeys (Macaca nemestrina). II. Craniofacial features[J]. *Teratology*,1980, 22(1):87 - 101.

[31] HENDRICKX AG, HUMMLER H. Teratogenicity of all-trans retinoic acid during early embryonic development in the cynomolgus monkey (Macaca fascicularis)[J]. *Teratology*, 1992, 45(1): 65 - 74.

[32] HENDRICKX AG, SILVERMAN S, PELLEGRINI M, *et al*. Teratological and radiocephalometric retinoic acid in rhesus monkeys (Macaca mulatta)[J]. *Teratology*, 1980,22(1):13 - 22.

[33] FANTEL AG, SHEPARD TH, NEWELL-MORRIS LL, *et al*. Teratogenic effects of retinoic acid in pigtail monkeys (Macaca nemestrina). I. General features [J]. *Teratology*, 1977, 15(1): 65 - 71.

[34] WILSON JE. Teratologic causation in man and its evaluation in non-human primate. In birth defects[C]. A. G. Motulsky, ed. Excerpta Medica, Amesterdam, 1947:191 - 203.

[35] NAU H. Embryotoxicity and teratogenicity of topical retinoic acid [J]. *Skin Pharmacol*, 1993, 6(Suppl): S35 - S44.

[36] ROBERT E, ROBERT JM, LAPRAS C. Is valproic acid teratogenic? [J]. *Rev Neurol*, 1983, 139(6 - 7): 445 - 447.

[37] NAU H, LÖSCHER W. Pharmacologic evaluation of various metabolites and analogs of valproic acid: teratogenic potencies in mice[J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1986, 6(4): 669 - 676.

[38] MAST TJ, CUKIERSKI MA, NAU H, *et al*. Predicting the human teratogenic potential of the anticonvulsant, valproic acid, from a non-human primate model [J]. *Toxicology*, 1986, 39(2): 111 - 119.

[39] HENDRICKX AG, NAU H, BINKERD P, *et al*. Valproic acid developmental toxicity and pharmacokinetics in the rhesus monkey: an interspecies comparison[J]. *Teratology*, 1988, 38(4): 329 - 345.

[40] SLIKKER W Jr, ALTHAUS ZR, ROWLAND JM, *et al*. Comparison of the metabolism of cortisol and triamcinolone acetonide in the early, mid, and late gestational age rhesus monkey (Macaca mulatta)[J]. *Dev Pharmacol Ther*, 1984, 7(5): 319 - 333.

[41] HENDRICKX AG, SAWYER RH, TERRELL TG, *et al*. Teratogenic effects of triamcinolone on the skeletal and lymphoid systems in nonhuman primates [J]. *Fed Proc*, 1975, 34(8): 1661 - 1667.

[42] HENDRICKX AG, TARARA RP. Triamcinolone acetonide-induced meningocele and meningoencephalocele in rhesus monkeys [J]. *Am J Pathol*, 1990, 136(3): 725 - 727.

[43] HENDRICKX AG, SAWYER RH, TERRELL TG, *et al*. Teratogenic effects of triamcinolone on the skeletal and lymphoid systems in nonhuman Primates [J]. *Fed Proc*, 1975, 34(8): 1661 - 1667.

[44] TARARA RP, CORDY DR, HENDRICKX AG. Central nervous system malformations induced by triamcinolone acetonide in nonhuman Primates: pathology [J]. *Teratology*, 1989, 39(1): 75 - 84.

[45] JEROME CP, HENDRICKX AG. Comparative teratogenicity of triamcinolone acetonide and dexamethasone in the rhesus monkey (Macaca mulatta)[J]. *J Med Primatol*, 1988, 17(4): 195 - 203.

[46] TARARA RP, WHEELDON EB, HENDRICKX AG. Central nervous system malformations induced by triamcinolone acetonide in nonhuman Primates: pathogenesis[J]. *Teratology*, 1988, 38

(3): 259 – 270.

[47] HENDRICKX AG, PELLEGRINI M, TARARA R, *et al*. Craniofacial and central nervous system malformations induced by triamcinolone acetonide in nonhuman Primates: I. General teratogenicity [J]. *Teratology*, 1980, 22(1): 103 – 114.

[48] PARKER RM, HENDRICKX AG. Craniofacial and central nervous system malformations induced by triamcinolone acetonide in nonhuman Primates: II. Craniofacial pathogenesis[J]. *Teratology*, 1983, 28(1): 35 – 44.

[49] MEHNDIRATTA S, SUNEJA A, GUPTA B, *et al*. Fetotoxicity of warfarin anticoagulation[J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2010, 282(3): 335 – 337.

[50] AYKAN DA, AYKAN AC, ERGVN Y. Evaluation of fetal safety of cardiovascular drug use in pregnancy with clinical pharmacology teratogenic risk analysis[J]. *Anatol J Cardiol*, 2018, 20(Suppl 1): S131.

[51] BARR M, COHEN MM. ACE inhibitor fetopathy and hypocalvaria: the kidney-skull connection[J]. *Teratology*, 1991, 44(5): 485 – 495.

[52] PRAHALADA S, CARROAD E, CUKIERSKI M, *et al*. Embryotoxicity of a single dose of medroxyprogesterone acetate (MPA) and maternal serum MPA concentrations in cynomolgus monkey (Macaca fascicularis)[J]. *Teratology*, 1985, 32(3): 421 – 432.

[53] HENDRICKX AG, KORTE R, LEUSCHNER F, *et al*. Embryotoxicity of sex steroidal hormones in nonhuman Primates: II. Hydroxyprogesterone caproate, estradiol valerate[J]. *Teratology*, 1987, 35(1): 129 – 136.

[54] PRAHALADA S, TARANTAL AF, HARRIS GS, *et al*. Effects of finasteride, a type 2 5-alpha reductase inhibitor, on fetal development in the rhesus monkey (Macaca mulatta)[J]. *Teratology*, 1997, 55(2): 119 – 131.

[55] HENCK JW, HILBISH KG, SERABIAN MA, *et al*. Reproductive toxicity testing of therapeutic biotechnology agents[J]. *Teratology*, 1996, 53(3): 185 – 195.

[56] 胡久丽,朱孝芹,肖旭,等. 沙利度胺致严重药品不良反应2例[J]. 中国现代应用药学,2019,36(18):2334 – 2335.

[57] HENDRIX AG, MAKORI N, PETERSON P. Nonhuman primates: their role in accessing developmental effects of immunomodulatory agents[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2000, 19(4): 219 – 225.

[58] 王雅楠,宋殿荣. 胚胎毒性体外试验的研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2010, 29(4): 277 – 280.

[59] 陆琴,周跃华,唐海飞,等. 基于动物福利的雌性生殖发育毒性体外培养技术研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(2): 155 – 162.

[60] 郭隽,耿兴超,汪巨峰. 药物发育毒性体外替代方法研究进展及组合策略[J]. 药物评价研究,2015,38(4): 345 – 349.

编辑:刘卓越/接受日期:2021 – 05 – 18