



# 药理实验设计与临床毒理学方法

安徽医科大学临床药理研究所



# 药理实验设计及统计分析



# 药理实验设计的基本要求

- **重复原则**：包括重现性、重复数  
药理实验应尽量减少干扰因素对实验的影响，严格按照GLP、GCP相关要求开展研究工作。
- **随机原则**  
完全随机  
均衡随机
- **对照原则**  
阴性（空白）对照、安慰剂对照  
阳性（标准）对照  
自体对照与组间对照等
- **客观性原则**  
实验设计时要力戒主观偏性干扰，选择观察指标时，不用或尽量少用带主观成分的指标。

# 实验设计方法

- **单组比较设计**：在同一个体上观察实验处理前后某种观测指标的变化。
- **配对比较设计**：实验前将性别、体重或其他相关因素加以配对，以基本相同的两个个体为一对，配成若干对，然后分别将每对个体随机分配于两组中。
- **随机区组设计**：为配对设计的扩大
- **完全随机设计**：用随机数字表等方法完全随机化分组。
- **交差实验设计**：
- **正交实验设计**：研究多因素试验的一种设计方法，适用于多因素、多水平、试验误差大、周期长的一类试验的设计。
- **拉丁方设计**

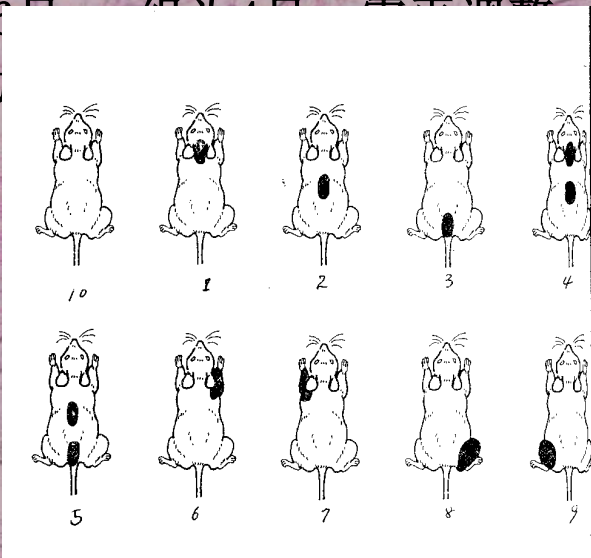


# 随机数字法分组

## 动物编号

随机编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
随机数字	8	6	4	7	10	13	7	7	6	2	11	4	2	12	9
除以3的余数	2	0	1	1	1	2	1	1	0	2	2	2	1	2	0
初步分组	c	a	b	b	b	c	b	b	a	c	c	b	c	a	a

表中b组为6只，组内4只，需进行调整，再抄写下一数字，将其数字除以6得余数为



# 正交设计方法（举例）

$L_4(2^3)$  正交

设计表

组别	实验组合的安排			实验次数及结果			
	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{K}^+$	$\text{Mg}^{2+}$	1	2	3	合计
1	1（高）	1（高）	1（高）	2.9	2.8	2.9	8.6
2	1（高）	2（低）	2（低）	2.0	2.1	2.1	6.2
3	2（低）	1（高）	2（低）	3.2	3.3	3.2	9.7
4	2（低）	2（低）	1（高）	3.0	2.9	3.1	9
1水平之和（ $Z_1$ ）	14.8	18.3	17.6				
2水平之和（ $Z_2$ ）	18.7	15.2	15.9				
差值（ $z_1-Z_2$ ）	-3.9	3.1	1.7				



# 预试与筛选

- 预试

充分重视预试的重要性，目的在于检查各项准备工作是否完善，实验方法和步骤是否切实可行，测试指标是否可靠，初步了解实验结果与预期结果的距离，从而为正式实验提供补充、修正的意见和经验，提高实验的重复稳定性和灵敏度。但是，**预试验的结果不能归入正式试验的最后结果一同分析。**

- 筛选

筛选是在预试或既往经验的基础上，用少量动物对多数药物进行实验。包括保护实验和概率判别实验。

# 药理实验设计中的样本问题（一）

## 实验动物的基本例数

- 小动物（小鼠、大鼠、鱼、蛙等）每组10~30例：计量资料每组不少于10例，计数资料每组不少于30例；
- 中等动物（豚鼠、家兔）每组8~20例：计量资料每组不少于8例，计数资料每组不少于20例；
- 大动物（犬、猫、猪、羊）每组6~20例：每组不少于6例，计数资料每组不少于20例；



# 药理实验设计中的样本问题（二）

## 临床药效比较的基本例数

- 公认难以治愈的疾病（cancer、狂犬病等）：5~10例；
- 危急严重的疾病（休克、心力衰竭、流行性脑脊膜炎等）：30~50例即可
- 一般慢性疾病（哮喘、冠心病、流行性感胃等）：计数资料需100~500例

临床实验基本例数意见不一，不同疾病不同药物有时出入很大，出具结论应慎重。

# 药理实验设计中的样本问题（三）

## 按统计学方法测算样本数

### （1）配对试验样本数的确定

$$n=[(t_{0.05} \cdot s_d)^2]/d^2$$

其中：  $s_d$  为前人试验或经验所得各组间差异的方差

$d$  为要求达到所预期的差异显著时的均数差值

$t_{0.05}$  为一定的  $df$  下，  $\alpha=0.05$  的  $T$  值

首次估计将用  $n \geq 30$ ，  $t=2$  代入

### （2）非配对试验动物样本数的确定

$$n=[(t_{0.05}^2 \cdot (s_1+s_2)]/ (x_1-x_2)^2$$

其中：  $s_1$ 、  $s_2$  为试验或经验所得的两组的样本标准差

$x_1-x_2$  为要求达到所预期的差异显著时的均数差值

$t_{0.05}$  为一定的  $df$  下，  $\alpha=0.05$  的  $T$  值

首次估计将用  $n \geq 30$ ，  $t=2$  代入



# 药理毒理学研究中的剂量问题

## 最适剂量的探索

- 进行药效对比时一般选用中效剂量，进行解毒或拮抗实验时剂量可略高一些，协同实验宜略低一些；
- 探索最适剂量时，应由小量开始。一般而言，离体器官上按3倍或10倍递增，整体实验按2倍或3.16倍递增；
- 已知高低剂量时，中剂量可选用其算术平均值

# 药理毒理学研究中的剂量问题

## 安全剂量的探索

- 由动物实验中该药与已知药物的效价比值推算；
- 应用不同动物间的剂量换算公式计算等效剂量，一般取**最大耐受量的1/3**作为较安全的试用量；

## 剂量递增方案

应用“开始试用量（ds）”后，如未出现疗效，也未出现不良反应，可按下述方案递增：

- 动物实验：按ds、2ds、3.3ds，2~4次可达到预期量，以后每次递增30~40%；
- 人体实验：用预试量的1/5~1/10为开始试用量，按ds、2ds、3.3ds、5ds、7ds、9ds递增，4-6次可达预期量，以后每次递增25~30%。



# 同种动物间等效剂量的换算

- 一般动物的用药剂量均以mg/kg表示，另一些实验用mg/m<sup>2</sup>表示更为合理，实验误差可以明显减小。

- 体表面积近似计算方法： $\lg S = 0.8762 + 0.698 \lg W$

W为动物体重（克），S为体表面积（厘米<sup>2</sup>）

$$A = R \times W^{2/3}$$

A为体表面积（m<sup>2</sup>），W是体重（kg），R是体型系数

不同动物的体型系数（R）

动物	小鼠	大鼠	豚鼠	兔	猫		
体型系数	0.06	0.09	0.099	0.093	0.082	0.104	
体型系数(新)	0.0899	0.086	0.092	0.1014	0.1086	0.1077	0.118

同种动物间剂量折算方法： $D1:D2 = A1:A2 = (W1:W2)^{2/3}$

# 标准动物间的等效剂量折算

$$D_A = k \times D_B$$

$D_A$ 为A种动物的剂量（mg/只）， $D_B$ 为B种动物的剂量（mg/只）

不同动物等效剂量（mg/只）的折算系数（k）

	B种动物	小鼠 20g	大鼠 200g	豚鼠 400g	兔 1.5kg	猫 2.0kg	猴 4.0kg	犬 12kg	人 70kg
A 种 动物	小鼠20g	1.0	7.0	12.25	27.8	29.7	64	124	388
	大鼠200g	0.14	1.0	1.74	3.9	4.2	9.2	17.8	56
	豚鼠400g	0.08	0.57	1.0	2.25	2.4	5.2	9.2	31.5
	兔1.5kg	0.04	0.25	0.44	1	1.08	2.4	4.5	14.2
	猫2.0kg	0.03	0.23	0.41	0.92	1	2.2	4.1	13.0
	猴4.0kg	0.016	0.11	0.19	0.42	0.45	1	1.9	6.1
	犬12kg	0.008	0.06	0.10	0.22	0.23	0.52	1.0	3.1
	人70kg	0.0025	0.018	0.031	0.07	0.078	0.16	0.32	1



# 不同动物间的剂量换算公式

- 动物的种属不同、年龄不同其给药剂量不同。

$$d_B = d_A \times R_B / R_A \times (W_A / W_B)^{1/3}$$

$d_A$ 、 $d_B$ 是A、B两种动物的每kg体重剂量（mg/kg）

$R_A$ 、 $R_B$ 是动物体型系数。 $R$ 与表面积（ $m^2$ ）/体重的1/3次方成正比。

## 不同种属的动物体型指数（R）

动物种类	小鼠	大鼠	豚鼠	兔	猫	猴	犬	人
体型系数（R）	59	90	99	93	82	111	104	100

## 不同动物与人的等效剂量比值

动 物	小鼠	大鼠	豚鼠	兔	猫	猴	犬
剂量比值	9.1	6.3	5.42	3.27	2.66	2.85	1.87

剂量按mg/kg算，人体重以70kg计



# 不同给药途径间的剂量换算

- 不同给药途径之间的剂量换算与药物的绝对生物利用度有关。
- 以口服量为100时，皮下注射量为30~50，肌肉注射量为20~30，静脉注射量为25。
- 给药剂量可参照经验，但最好亲自实验。因为每种药物的生物利用度是不一样的。简表中所示只是一种多数情况下的估计，可能与实际会有较大出入。
- 能够不改给药途径时，尽量不改。尤其是口服和静注之间有时按上述折算给药时，血药浓度相差太大，主要是口服影响因素多。
- 有时实验操作熟悉程度影响很大，尤其是静注。

不同给药途径间的剂量换算估值简表

给药途径	静脉注射	口服	皮下注射	肌肉注射	腹腔注射
生物利用度估计	全部入血循环，无吸收	25~30%	40~50%	80%左右	80~85%
与静注的剂量比	1倍	3.3~3.4倍	2~2.5倍	1.25倍	1.18~1.25倍
与口服的剂量比	0.25~0.33	1	0.5~0.6	0.32~0.4	0.3~0.35

# 临床前毒理学实验方法

## 药物毒理学的研究目的：

- ①认识并发现药物的毒性作用，为临床安全用药提供科学依据；
- ②确定药物毒作用的靶器官；
- ③确定毒作用的剂量范围；
- ④了解药物的毒作用是否具有可逆性；
- ⑤ 研究药物中毒后的解毒及其解救措施；
- ⑥阐明药物的毒作用机制，为申报新药提供毒理学资料。



# 临床前药物毒理学研究的内容

- 一般毒理学实验：包括急性毒性试验、长期毒性试验、毒代动力学试验和生物技术产品的安全性评价试验研究。
- 特殊毒性实验：包括遗传试验、生殖毒性试验和致癌性实验等。
- 其它毒性实验：包括局部毒性试验、安全药理学试验、药物依赖性试验和免疫毒性试验研究等。

# 毒理学试验的基本要求

- **GLP—good laboratory practice**

- **受试物的化学特性与杂质**

充分了解受试物的理化特性，有利于正确选择给药途径、确定储存条件、进行实验设计，慎重选择合适的溶剂、助溶剂或赋形剂

**水溶液**——蒸馏水或生理盐水

**混悬液**——研钵中研细，逐步加入少量助悬剂反复研磨最后形成一定比例，搅拌均匀，多用0.5%CMC-Na

**油剂**——植物油或有关矿物油

**稀盐酸溶液**——1-10%稀盐酸

**有机溶剂**——先用有机溶剂溶解，再用水稀释，如稀释后溶解度降低，可加少量助溶剂如吐温、司本（span）等

**乳剂**——油脂类或树脂类物质，借乳化剂的作用或机械研磨、搅拌成乳化水制剂

- **实验动物及实验条件**

- **观察指标**：饮食、饮水情况、体重、异常反应（包括死亡）、生理生化指标、脏器解剖、病理改变等

- **结果的分析和评价**



# 急性毒性试验

- 经口给药的急性毒性试验

- (1) 多采用大鼠、小鼠

- (2) LD<sub>50</sub>

- (3) MTD

- (4) 限度实验 (limit tests)

小鼠急性毒性实验口服剂量大于5g/kg，注射剂量大于2g/kg，未产生明显毒性，可考虑只做一个高于临床拟用剂量50倍（犬用30倍）的剂量组。

- 急性皮肤毒性试验

- (1) 多采用大鼠、兔、豚鼠等

- (2) 要求使用制剂

- (3) 应保证受试物与皮肤局部的良好接触

- 急性吸入性毒性试验

- (1) 多采用成年大鼠

- (2) 暴露浓度的设计应足以反应量效关系，至少3组

- (3) 暴露时间应在受试空间浓度达到平衡后至少4h

- (4) 若一次暴露浓度为5mg/L（实际吸入的浓度）达到4h，或受试物的最高浓度未致使动物死亡，则无需设置3个浓度。

# LD<sub>50</sub>的测定试验的剂量设置

一般采用两种给药途径给药，其中一种必须是临床给药途径。

给药剂量和分组：预试验测出死亡率接近0%和100%的剂量范围，在此范围内一般设4~6个剂量组，相邻组间剂量比通常取1:0.7~1:0.85，尽可能使一半组数的动物死亡率大于50%，另一半小于50%。

结果处理

改进寇氏法： $m = X_m - I(\sum p - 0.5)$   $S_m = I[(\sum p - \sum p^2)/n - 1]^{1/2}$

$m$ 的95%可信限= $m \pm 1.96S_m$

$m$ 为LD<sub>50</sub>的对数值， $X_m$ 为最高剂量的对数， $I$ 为相邻两剂量组对数剂量之差， $p$ 为各组动物死亡率， $\sum p$ 为各组死亡率的总和， $S_m$ 为标准误， $n$ 为每组动物数

Bliss软件法：



# 最大耐受量（MTD）试验的剂量设置

- 药物以最大允许浓度和动物能耐受的最大容积一次或24小时内多次给药，观察7~14d，如动物不出现死亡，则认为该药对某种动物某种给药途径的MTD为某一数值，如有个别动物死亡，则认为该药的MTD大于某一数值（剂量一般不超过5g/kg 体重）。
- 一般说来最大给药浓度和容积与药物的理化性质、给药途径、动物品种及饥饿状态有关。静脉给药时，除考虑药物溶解度、给药容积等因素外，还应注意药物的PH值及渗透压的影响，并注意控制注射速度。

## 急性毒性实验常用动物最大给药容积

受试动物	单位	ig	ip	iv	im	Sc
小鼠	ml/10g	0.5	0.5	0.3	0.1	0.2
大鼠	ml/100g	2.0	1.5	1.0	0.2	0.5
犬	ml/kg	20	1.5	5.0	0.5	1.0

# 全身主动过敏试验（ASA）及剂量设置

- **首选豚鼠**，进行何种过敏性研究应根据药物自身特点（如化学结构等）、其他药理毒理的实验结果，特别是长期毒性试验的结果、临床适应症及给药方式等确定。
- 设立阴性、阳性对照组和受试物不同剂量组。阴性对照组应给予同体积的溶媒，阳性对照组给予1-5mg/只**牛血清白蛋白或卵白蛋白**或已知致敏阳性物质，受试物低剂量组给予临床最大剂量（/kg或 $m^2$ ），受试物高剂量组给予低剂量的数倍量。每组动物数至少6只。
- 剂量设计应合理，建议选择多个剂量以①进行剂量与过敏反应的量效关系研究，争取找出无过敏反应的剂量；②避免因剂量过低而导致假阴性结果的出现；③帮助判断阳性结果是否因强刺激反应引起。应设立阳性和阴性对照组。



# 皮肤刺激性试验及剂量设置

- 首选家兔，每组动物数4~8只，一般雌、雄各半，采用自体左右侧自身对比法，取受试物0.5 ml 直接涂布贴敷时间至少4小时，贴敷结束后，除去受试物并用温水或无刺激性溶剂清洁给药部位。多次给药皮肤刺激性试验应连续在同一部位给药，每次给药时间相同，贴敷期限一般不超过4周。观察并记录涂敷部位有无红斑和水肿等情况。
- 在给药面积不变的情况下，不应通过增加厚度来满足增加给药量的目的。

# 注射给药部位刺激性试验及剂量设置

- 首选家兔，每组动物数不少于3只。应设生理盐水对照，可采用同体左右侧自身对比法。用药部位根据药物的给药途径确定，可选用耳缘静脉，耳中心动脉（其它动物可选用前、后肢静脉及股动脉等），股和背部肌肉，侧胸壁皮下组织，静脉旁组织等。
- 剂量设计主要应该考虑受试物浓度和总剂量。一般采用与临床制剂相同浓度，设一个剂量组，可以通过改变给药频率进行剂量的调整，必要时应该进行不同浓度的刺激性试验。





# 眼刺激性试验及剂量设置



- 首选 每组动物数不少于3 只。应设置生理盐水对照组，可采用同体左右侧自身对比法。
- 每只眼睛滴入0.05-0.1ml 或涂敷0.1g 受试物，然后轻合眼睑约10 秒。一般不需冲洗眼睛。给药期限应根据受试物拟用于临床的情况来决定，多次给药时每天给受试物的次数应与临床用药频率相同，连续给受试物2-4周，一般不超过4 周。

# 溶血性试验及剂量设置

- 除另有规定外，临床用于非血管内途径给药的注射剂，以各药品使用说明书规定的临床使用浓度，用0.9%氯化钠溶液1:3 稀释后作为供试品溶液；用于血管内给药的注射剂以使用说明书规定的临床使用浓度作为供试品溶液。

试管编号	1	2	3	4	5	6	7
2%红细胞悬液(ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
生理盐水(ml)	2.0	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	
蒸馏水 (ml)							2.5
受试物 (ml)	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1		



# 非临床药代动力学试验及剂量设置

- 首选动物尽可能与药效学和毒理学研究一致，尽量在清醒状态下试验。
- 创新性的药物应选用两种或两种以上的动物，其中一种为啮齿类动物，另一种为非啮齿类动物（如犬、小型猪或猴等）。
- 给药途径和方式，应尽可能与临床用药一致。
- 应设置至少三个剂量组，其高剂量最好接近最大耐受剂量，中、小剂量根据动物有效剂量的上下限范围选取。主要考察在所试剂量范围内，药物的体内动力学过程是属于线性还是非线性，以利于解释药效学和毒理学研究中的发现，并为新药的进一步开发和研究提供信息。

# 一般药理学试验及剂量设置

- 研究药物在治疗范围内或治疗范围以上的剂量时，潜在的不期望出现的对生理功能的不良影响，观察药物对中枢神经系统、心血管系统和呼吸系统的影响。原则上须执行GLP。
- 体内安全药理学试验的剂量应包括或超过主要药效学的有效剂量或治疗范围。如果安全药理学研究中缺乏不良反应的结果，试验的最高剂量应设定为相似给药途径和给药时间的其它毒理试验中产生中等强度不良反应的剂量。
- 在实际工作中，在毒性剂量范围内产生的毒性作用可能会影响和混淆对安全药理学不良反应的观察，限制了剂量水平的升高。



# 长期毒性试验

长期毒性试验的目的是通过重复给药的动物试验表征受试物的毒性作用，预测其可能对人体产生的不良反应，降低临床试验受试者和药品上市后使用人群的用药风险。

- ①预测受试物可能引起的临床不良反应，包括不良反应的性质、程度、剂量—反应关系和时间—反应关系、可逆性等；
- ②判断受试物反复给药的毒性靶器官或靶组织；
- ③推测临床试验的起始剂量和重复用药的安全剂量范围；
- ④提示临床试验中需重点监测的指标；
- ⑤还可以为临床试验中的解毒或解救措施提供参考。

长期毒性试验的最终目的是为临床试验和临床用药服务。

# 长期毒性试验的基本要求

- 实验动物

一般要求使用2种动物，即啮齿类和非啮齿类动物

- 实验条件

创新药物的长期毒性实验应在GLP实验室进行

- 给药途径和方法

应与推荐的临床给药途径相同

- 实验期限

为拟临床给药周期的4倍

- 观察指标

一般观察

血液、尿液检查

脏器指数、器官或组织病理学检查

心电图检查



# 长期毒性试验剂量设置

- **低剂量组**：高于整体动物最佳有效剂量或预计每天人用量，此剂量不应出现毒性反应；
- **中剂量组**：应使动物产生轻微的或中等程度的毒性反应；
- **高剂量组**：应使动物产生明显的或严重的毒性反应，或个别动物死亡，但死亡数不超过20%；
- **空白对照组**：给予溶媒或赋形剂，若溶媒或赋形剂有毒性时则增加正常对照组；
- **正常对照组**：口服等容量饮水，注射给药则给予等容量生理盐水。
- **限度实验**：若小鼠急性毒性的口服给药剂量大于5g/kg，注射给药剂量大于2g/kg，可考虑只作一个高于临床剂量50倍（犬用30倍）的剂量组。

# 生殖毒性试验剂量设置

三段生殖试验：一般生殖毒性试验（I）、致畸敏感期毒性试验（II）和围产期毒性试验（III）。

## 剂量设计

**高剂量组：**有母体毒性反应，一般为 $LD_{50}$ 的 $1/2 \sim 1/3$ ，人临床拟用剂量的 $80 \sim 100$ 倍，或为最大给药量；

**低剂量组：**无母体和胚胎毒性反应剂量，一般为 $LD_{50}$ 的 $1/30 \sim 1/50$ ，人临床拟用剂量的 $3 \sim 5$ 倍；

**中剂量组：**一般为高低剂量的平方根；

**阴性对照组：**

**空白对照组：**

**阳性对照组：**必要时设置



# 药效学试验剂量设置

- 测出药物或化合物的LD<sub>50</sub>以后，取其1/10，1/20，1/30的剂量作为药效学的高、中、低剂量。
- 对于中药和天然药物而言，可能很多时候测不到LD<sub>50</sub>，常常会以MTD的几分之一来定药效学剂量，1/2或1/3是常用的。
- 根据临床用量计算：凡有长期大量临床用药经验者，可根据人用量的数倍至几十倍用作动物试验剂量；
- 根据文献估算剂量：文献中相似药物的用量，若处方相似，提取工艺相似，可作为参考，估计出供试药的合理剂量范围；
- 一般情况下，药效试验的剂量不高于毒理试验剂量。药效学试验的高剂量应低于长期毒性试验的中剂量或低剂量。特殊情况下（如抗癌试验），药效学试验的试验剂量可适当调高，但不应超过长期毒性试验的高剂量。
- 通过预试验估计剂量：不论以何种方法选择的给药剂量均应通过预试验，进一步确定合理的剂量范围，并按等比级数分为两个以上剂量组。

# 药物依赖性试验

药物依赖性包括**身体依赖性和精神依赖性**，前者可出现戒断症状，后者则不出现戒断症状。

## 小鼠跳跃试验 (jumping test)

- 基本原理：短期内重复给动物大剂量受试药，然后注射阿片受体拮抗剂（纳洛酮），如受试药属于阿片类药物，纳洛酮可促使其发生跳跃反应，观察小鼠跳跃次数可反应该药的依赖性程度。
- 注意事项
  - （1）增大受试药物和拮抗剂的剂量可缩短给药时间和减少给药次数，但剂量过高使药物毒性增大，甚至可使动物死亡，最好以镇痛ED50的倍数确定给药的剂量和次数。
  - （2）纳洛酮的作用时间短，跳跃反应的观察应在注射后30min内进行，一般在前15min内跳跃反应较频繁。



# 药物依赖性试验

## 大鼠体重减轻实验 (weight loss test)

- 基本原理：吗啡戒断后体重急剧下降，以戒断后24~36h最为明显，是吗啡身体依赖性的较好指标。
- 选用雄性大鼠，每天早晚2次定时测定动物体重，按体重给药，连续7周。停药后每隔2h测量体重一次，比较停药后不同时间的动物体重变化。
- 注意事项

每天定时注射吗啡容易形成身体依赖性，戒断后体重减轻明显。

# 注意的问题

- 动物试验数据不能简单地套用到人身上，人的数据同样也不能简单地套到动物的身上的。因为不同的种属存在着较大的差异，但动物的数据可以在一定程度上为临床使用提供参考。这也正是临床前试验和临床试验的意义所在。
- 等效剂量即产生相同药效的人体剂量，从动物实验数据推算可能产生等价药效的人体剂量。实际上就是给剂量的转换，但这种剂量只能是一个参考的剂量，具体的剂量还要在实际的实验中继续摸索。
- 动物与人的相关性，这涉及多方面的因素。如口服，用兔子的话，由于其消化道较短，和人的相关性就可差。止吐的药效学试验就不能拿大鼠进行。





**Thanks !**