

Rai & Van Ryzin 巢式模型在发育毒性研究中的应用

任宁¹ 王增珍^{2△}

(1 华中科技大学同济医学院计划生育研究所, 2 华中科技大学同济医学院公共卫生学院, △通讯作者)

(本文为国家科技部 973 项目支持的课题, 编号: 2002CB512910)

在过去的十年中, 化合物危险度评价有许多新的进展, 赵启宇等^[1]对此作了详细的论述。其中提到了基准剂量 (Benchmark dose, BMD) 法。许多人认为对于所有非致癌因素的分类资料应使用 BMD 法, 尤其是发育毒性和生殖毒性研究^[2], BMD 法的目的在于更好地设定一个计算安全剂量的起始值。正如美国环境保署 (EPA) 所定义的, 基准剂量是某种物质引起机体不良效应特定发生率 (相对于人群背景发生率) 变化水平的相应剂量^[3]。BMD 的计算是通过拟合数学模型来估计的。EPA 已经开发了一种较容易使用的基准剂量软件 (Benchmark dose software, BMDS)^[4], 它包括了定量、定性以及巢式实验资料三种不同的基准剂量计算模型以供模拟。巢式模型有 Rai & Van Ryzin^[5]、NCTR 和 Nlogistic 三种, 是专为观察母体暴露于有害物质对胎仔发育的影响而设计的。本文试图用实例介绍其中的 Rai & Van Ryzin 模型, 帮助非统计专业研究人员在有合适的剂量-反应资料时能方便地估计基准剂量, 为制定卫生标准提供参考。

1 Rai and Van Ryzin 巢式模型

由于许多有害化合物对暴露于该化合物的动物的仔代有毒性效应, 毒物学的标准协议要求进行两代的研究以调查这些化合物对实验室动物的毒性反应。在典型的发育毒性研究中, 一般采用如下方法: 给已妊娠的雌性动物一定剂量的某化合物, 或者让雄性动物暴露于该化合物, 然后与雌性动物交配, 经过一个固定时间观察它们的仔代是否有毒性反应。对这样两代毒理试验结果进行数据分析时必须考虑到同窝胎仔之间由于遗传因素、宫内发育环境等的相似性, 即所谓窝效应 (Litter Effects)。Rai and Van Ryzin 巢式模型考虑了窝效应问题^[5], 并应用统计学方法推算出基准剂量 (benchmark dose, BMD), 用以评价化合物对胎仔发育影响的危险度。

Rai and Van Ryzin 模型数学表达式如下:

$$P(d) = [1 - e^{-(\gamma + \beta d^\rho)}] e^{-s(\theta_1 + \theta_2 d)} \quad (1)$$

式中 d = 亲代暴露的剂量 s = 窝别协变量 θ_1 和 θ_2 = 窝别协变量参数
 γ = 背景参数 ρ = 权重参数 β = 剂量比率参数

约束条件: $\theta_1 + \theta_2(d - d_0) \geq 0$

剂量组内分布: β 二项分布

反应类型: 超额危险度

该模型由二个因子组成: 第一个因子为 $\lambda_1(d) = 1 - e^{-(\gamma + \beta d^\rho)}$, 即一次击中模型。假设剂量-反应关系符合一次击中原理, 在该动物直接或间接暴露剂量 d 时中毒概率即由上式给出。第二个因子 $e^{-s\theta(d)}$ 。即亲代暴露对仔代毒理效应和窝别协变量 s 的条件概率,

同一剂量组的不同母体由于基因或其它原因产生的仔代间的变异, 反应概率不同。因此, 剂量为 d 、窝大小为 s 的仔代反应概率 $P(d, s)$ 为

$$P(d, s) = [1 - e^{-(\gamma + \beta d^\rho)}] e^{-s\theta(d)} = \lambda_1(d) \cdot e^{-s\theta(d)} \quad (2)$$

这里 $d \geq 0$, $s \geq 0$, $\gamma > 0$, $\beta > 0$, $\theta(d) > 0$ 是 d 的函数, 注意公式 (2) 中, $e^{-s\theta(d)}$ 可看作胎仔数为 s 的母体受影响时其胎仔毒性反应的条件概率。当 $s=0$ 时, 这个因子为 1, 说明无仔代出生时, 胎仔受毒性影响的基线概率 $P(d,0) = \lambda_1(d)$ 。

剂量-反应模型 (1) 说明: 胎仔数为 s 和胎仔数为 0 的两类母体的仔代在给定剂量 d 时毒性反应的相对危险度为 $R(s,0)$ 。其表达式如下: $R(s,0) = \frac{P(d,s)}{P(d,0)} = e^{-s\theta(d)}$ 。

由于 $R(s,0)$ 取决于 s , 因而在剂量 d 固定时, $R(s,0)$ 随 s 增加而下降, 雌性动物如产出越多的幼仔说明该动物越健康, 且越少受毒物的影响, 她的窝仔有越小的毒性反应的概率, 对给定剂量 d 时, 窝仔数 $s+1$ 和 $s(s \geq 0)$ 的仔代反应的相对危险度 $R(s+1,s)$ 表达式如下:

$$R(s+1,s) = \frac{P(d,s+1)}{P(d,s)} = e^{-\theta(d)} \quad (3)$$

这意味着从亲代到仔代反应的相对危险度对给定剂量 d 是一个常数, 并随剂量 d 的不同而改变。

就函数 $\theta(d)$ 而言, 假设对任意 d , $\theta(d) = \theta_1 + \theta_2 d$, $\theta_1 > 0$, $\theta_1 + \theta_2 d > 0$, 这个假设包含着胎仔的对数相对危险度, 当窝仔数较大时是线性的。对多数化合物, 对数相对危险度是剂量的非减函数, 因此 $\theta_2 \leq 0$ 。即得到公式 (1)。

2 用 Rai & Van Ryzin 巢式模型推算 BMD 的方法和实例

2.1 实验数据

以 Luning 等^[6] 的实验数据为例。Luning 在这个实验中给予 CBA 品系雄鼠 0、300 和 600 rads (R) 三种剂量的放射线照射, 在照射后第一个 7 天内与同样品系的 1773 只母鼠交配, 观察胎仔的死亡情况。结果: 剂量为 0 rads、着床数为 5、每窝胎仔死亡数是 0 的母鼠为 30 只, 剂量为 0 rads、着床数为 5、每窝胎仔死亡数是 1 的 27 只母鼠, …… , …… , 这样按剂量 (d) 和每窝着床数 (Litter) 和每窝胎仔死亡数将母鼠分组, 整理归纳后得表 1。表 1 显示每个剂量中每窝着床数和死胎数的频数分布。

表 1. 照射 300R 和 600R 条件下妊娠胎仔数和死亡胎仔数的频数分布

剂量 (dose) ($R \times 10^{-3}$)	每窝着床数 (Litter)	每窝死亡数							窝数 合计	
		0	1	2	3	4	5	6		7
0. 0	5	30	27	9	5					71
	6	86	51	14	4	1				156
	7	111	73	31	8	1				224
	8	79	44	23	3	-	1			150
	9	32	29	8	1					70
	10	5	5	2						12
0. 3	5	27	41	32	17	4				121
	6	28	47	59	28	6	1	1		170
	7	31	61	54	20	19	1			186
	8	12	32	24	22	8	1			99
	9	1	6	9	6	1	1			24
	10	1	2	1						4
0. 6	5	16	32	48	19	15				160
	6	7	35	45	37	20	9			153
	7	5	22	27	36	17	9	3	1	120
	8	1	4	12	11	8	7	-	2	45
	9	-	-	2	2	2	-	1		7
	10	-	-	-	-	-	-	-	1	1

2.2 模型拟合

打开 U. S. EPA Benchmark Dose Software, 出现如图 1 所示的窗口。

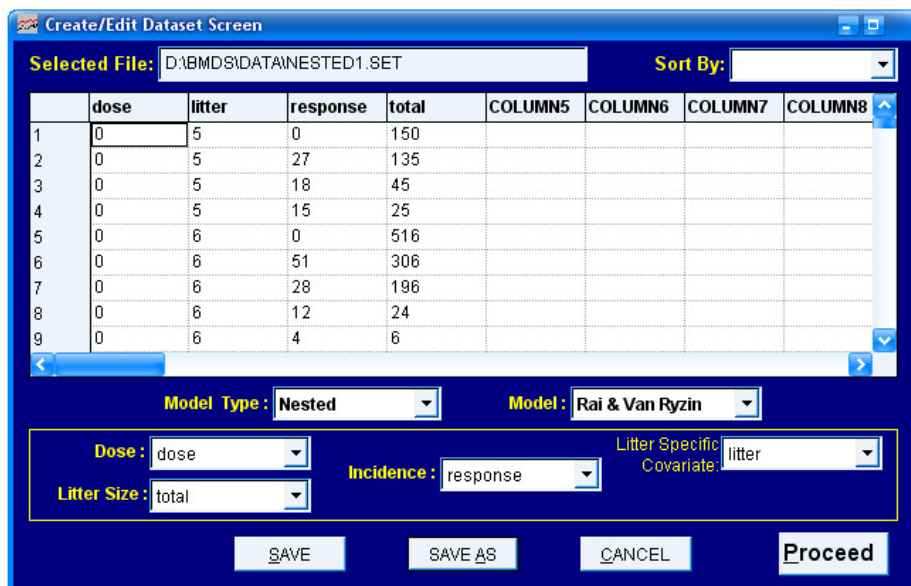


图 1. BMD 软件数据输入界面

其中：第 1 列填暴露剂量(dose)；第 2 列填每窝着床数(Litter)即 Litter Specific Covariate, 在公式(1)中用 s 表示；第 3 列填剂量和着床数相同各组中合计死亡数(response=每窝死亡数×同一剂量和着床数相同的母鼠数), 即 Incidence；第 4 列填剂量和着床数相同的母鼠合计着床数 (total=每窝着床数×剂量和着床数相同的母鼠数), 即 Litter Size。

选用 RaiVR Model。

模型运行后得表 2。

表 2. Rai & Van Ryzin 模型的系数及参数估计值

参数	估计值	标准误
γ	0.106515	0.000993295
β	0.601242	0.000435451
θ_1	0.00361583	1.92837×10^{-9}
θ_2	-0.00496761	3.21597×10^{-9}
ρ	1	0.00397239

将表 2 中的参数代入 Rai & Van Ryzin 模型得：

$$P(d) = [1 - e^{-(0.106515 + 0.601242 d)}] e^{-(0.00361583 - 0.00496761 d)s}$$

2.3 模型拟合优度检验

A. 拟合优度卡方检验

$$\chi^2 = 62.22 \quad \text{自由度为 } 12 \quad P = 0.0000$$

B. 似然比检验法：

表 3. 似然比检验法结果(方差分析)

模型	Log(似然值)	方差	检验自由度	P 值
Full 模型	-4605.45			
Fitted 模型	-5690.89	2170.89	85	<.0001
Reduced 模型	-6166.7	3122.51	89	<.0001

由此可见，模型拟合良好。

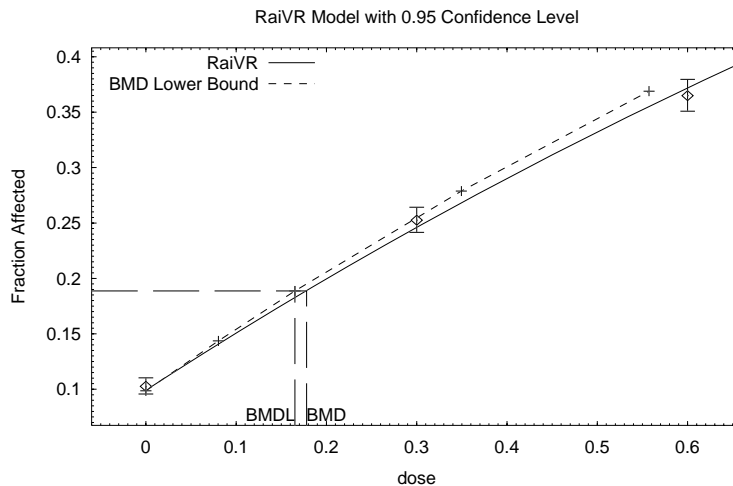
2.4 回代

将 d 和 s 用实验数据代入模型方程得 $P(d)$ 预测值，画曲线见图 2。

2.5 推算 BMD 及 BMDL

在应用基准剂量法时，需要作出一些决策，包括数学模型的选择，可信限大小的选定（90% 还是 95%）以及基准反应率的定义（1%，5%，还是 10% 发生率）。这些决策中，最主要的是为基准反应率设立一个特定的水平。在本例中，将窝别协方差固定在空白对照组的平均窝别协方差 6.929361（即对照组窝仔数的均数），可信限水平定为 0.95，基准反应率定为 0.1，危险度类别为超额危险度，得到：

$$BMD = 0.178026 \text{ (R)} \quad BMDL = 0.165048 \text{ (R)}$$



09:32 07/19 2005

图 2. 表 1 数据的拟合结果

图 2 中,横轴为放射线的剂量 (rads), 纵轴为反应概率, 实线为拟合的 RaiVR 模型曲线, 虚线为 BMDL 的计算曲线。

3 讨论

3.1 巢式模型是一种新的化合物对动物仔代影响的危险度评价方法。虽然这个方法大多用于发育毒性的研究, 它也可以用于生殖毒性和神经毒性等的研究, 在这方面 Faustman 等人作了大量的工作^[7]。他们认为 BMD 方法比传统的 NOAEL 方法有更多的优点。

3.2 用巢式模型估计 BMD, 需要有完整的数据报告 (如各剂量组的样本量、反应数), 所给资料存在合适的剂量-反应关系。如果具备上述条件, 就可对发育毒性危险度进行评价, 为制定标准提供参考。

3.3 BMD 软件包的使用使建模变得简单容易, 但要正确地解释模型, 还需要毒理学家和熟悉这一类统计分析方法的人共同协作。这一过程不能取代毒理学家和其他熟悉所研究的危险品特征的人的专业判断。

3.4 人类在 20 世纪经历了工业的迅速发展, 每年有约 500 种新化合物被推向市场, 而今已有大约 5-6 万种化合物进入我们的日常生活。越来越多的证据表明, 对其中许多化合物的职业性或环境性接触会影响人类的生殖功能, 其中包括铅、镉、汞、环氧乙烷、乙二醇醚、苯及抗癌化疗药物等^[8]。因此, 巢式模型在研究毒物、药物的参考剂量方面有广泛的应用价值。即使是已经有 LOAEL 和 NOAEL 资料的化合物也可以考虑再计算它的 BMD。例如, Kenny.SC^[9] 等也用 BMD 方法分析了伊拉克的 Ssychelles 儿童汞中毒的数据。

参考文献

1. 赵启宇, 阚海东, Lynne HABER, 陈秉衡 Michael DOURSON 危险度评价最新进展. 中国药理学与毒理学杂志 2004 Vol.18 No.2 P.152-160
2. 夏世钧, 张家放, 王增珍. 环境化学污染物危险度评价的“基准剂量法”. 环境与职业医学. 2005, 22(2)178-180
3. 田琳, 路小峰. 基准剂量在危险度评价中的应用及发展. 中华劳动卫生职业病杂志. 2004, 22(4):290-292.
4. USEPA. Benchmark dose software. United States Environmental Protection Agency, Office of Research and Development. <http://www.epa.gov/nceawww1/bmds.htm>
5. Rai.K., and van Ryzin.J.(1985). A dose-response model for teratological experiments involving quantal responses. Biometrics 41:1-9.
6. Luning,K.G., Sheridan.W., et al (1966) The relationship between the number of implantations and the rate of intrauterine death in mice. Mutation-Research 3:444-451.
7. Faustman EM, Allen BC et al.(1994) Dose-response assessment for developmental toxicity. I. Characterization of database and determination of NOAELs. Functio. Appl. Toxicol., 23:478-486
8. 钱玲. 环境化学物的生殖毒性研究进展. 环境与职业医学. 2005, 22(2): 167-171
9. Kenny.SC., Cynthia VL., et al (2000) Benchmark Concentration for methylmercury obtained from the Seychelles child development study. Environmental Health Perspectives 3:257-26