

联合作用特征的评价

顾 兵 (综述) 王心如 (审校)

(南京医科大学公共卫生学院, 江苏 南京 210029)

摘 要: 多年来, 毒理学界对机体内多种外来化合物产生的联合作用缺乏统一评价体系。本文就其已有的理论基础和相关的方法学成就作一概述, 旨在介绍各自的使用范围和优缺点, 提请应用者根据条件选用合适的评价方法。

关键词: 联合作用; 评价方法

中图分类号: R969.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X (2000) 01-0055-04

Assessment of the Nature of Combined Action

GU Bing, WANG Xin-ru

(School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract: Regarding assessment of the nature of combined action, resulted from the complex chemical mixture, there is no consistent evaluation system in the domain of toxicology and pharmacology for some decades. This author depicts profiles of the achieved theoretical fundamentals and related methodological accomplishment, aims to brief the readers on the respective operating scopes and properties for recommending the applicants to select suitable approach.

Key words: Combined Action; Assessment approach

工农业迅猛发展, 使得地球上化学物数量不断增加, 人类在生产条件或生活环境中同时接触或相继暴露两种及两种以上化学物已是相当普遍^[1]。为了能获得较好的治疗效果, 多药联用或序贯用药又是现代临床医学的主导趋势^[2]。多种外来化合物共存, 势必对接触的生物体产生联合作用 (joint action, combined action), 亦称交互作用 (interaction)。尽管在药理学和毒理学中联合作用分别发生在不同的剂量水平, 对联合作用特征的正确评价仍是两门学科工作者的当务之急。

在不同的时期和不同的学科领域, 如生物学、药理学、生物统计学, 联合作用具有不同的含义, 特征术语亟待统一和规范化, 对其评价方法也不尽相同^[3]。Bliss 在 1939 年最早提出独立、相似和协同三种联合作用模型^[4]。1975 年 Anderson 和 Weber 把 Bliss 建立模型应用于水生毒物联合作用研究^[5], 并引入了浓度相加和反应相加的概念。1981 年 WHO 把联合作用明确分为四类^[6]: 相加、协同、拮抗和独立作用, 这种分类方法已为多数学者所接受。1988 年 Rothman 等又提出四种不同的联合作用类型^[7]: 统计学、生物学、公共卫生学和个体判别的联合作用, 不过没有被普遍应用。

对同一组资料应用不同的分析方法会得出不同的结论^[2]。因而就某组特定的混合物而言, 很可能用一种方法计算的结论是相互协同, 但用另一种方法计算的结果却是相互拮抗。关于联合作用特征的评价, 国内外尚未形成统一的认识体系^[8,9]。

1 等效线图法

1870 年 Fraser 倡导, 1926 年 Loewe 加以发展的等效线图法^[10], 是先用加权直线回归法求出单独与混合后的 LD₅₀, 再求其毒性比例 TR 值, 以 TR 界值来反映结果性质。在试验条件和接触途径相同的情况下, 分别求出两个化学物的 LD₅₀ 及其 95% 可信限, 用纵、横坐标分别代表两种化学物的剂量并将取得的同一效应的剂量 (LD₅₀) 点相连即为等效线, 然后再将两化学物的 95% 可信限的上、下限值分别连接。依据混合物实测 LD₅₀ 在两种化学物可信限上、下连线之间位置判定联合作用的特征。该法简单, 结果直观, 适用于粗略观察。但是只能评价两个化学物的联合作用, 与其严密的设计相比信息利用度不够, 也不适用于非概率型效应指标资料。

Checkerboard titration 法就是基于等效线图法思想的一个延伸^[11], 可以从代数和几何两个角度加以判断, Berenbaum 同时又将此法推广到求任意数量药物的联合作用。等效剂量分析会受许多因素的影响, 且方法本身往往因为技术上的差错产生一些差异值, 可比性比较差, 重复步骤太多。

Finney 根据 Loewe 法的剂量比例原则, 提出了以各成分 LD₅₀ 为基础, 评价相似联合作用的调和平均数模型, 来确定混合物的预期 LD₅₀。由于简便易行, 经多数学者证实能较好地预测和评价联合毒性。它是在先求出各化学物的各自 LD₅₀ 值, 以各化学物的联合作用是相加作用的假设出发, 按等效剂量预测混合化学物的 LD₅₀。用与计算预期 PLD₅₀ 时相同配比的混合物作动物实验, 求出实测半数致死量 OLD₅₀ 和混合物的 PLD₅₀ 与 OLD₅₀ 的比值, 即联合作用系数 Q。实测值小于预测值为协同作用, 反之为拮抗作用。

收稿日期: 1999-08-23; 修回日期: 1999-11-25

基金项目: 国家“九五”医学科技攻关项目 (96-906-04-11); 江苏省卫生厅科技发展项目 (H97-16)

作者简介: 顾兵 (1971—), 男, 江苏省启东市人, 硕士, 讲师, 主要从事毒物联合作用及其代谢动力学研究。

Keplinger 等用有机磷、有机氯和氨基甲酸酯等 15 种农

药^[12],按等毒性配比得100多种混合物,分别求得 PLD_{50}/OLD_{50} ,据此提出了0.57~1.75之间为相加作用的标准。Smyth将27种化学物^[13],同样按等毒性配比,配成350种混合物,进行小鼠联合毒性试验,建议按Finney数学模型计算的 Q 值在0.40~2.70之间属相加作用。河合正计、岩原滋利曾用此法对8种杀虫剂和4种杀菌剂配成28个混合物进行测定^[14],提出不同的 Q 值评价标准。

采用Finney的 Q 值评价联合作用特征^[15],因其毒物种类、实验条件和动物种属的差异,以及经验估计范围的不同而使之缺乏可比性。Abt等人提出以 OLD_{50}/PLD_{50} 作为 Q 值,其具体分界线用其建议的计算偏离‘1’的程度公式,然而计算太繁,应用不便。

Finney法又在生态毒理学中得到应用和扩展^[16],采用等毒性混合法比较预期 EC_{50} 和实测 EC_{50} 由毒性加强指数TEI来评价其特征。Kissin等提出的分数(代数)分析法^[17],基本思路与等效线图法类同,但允许A、B两药以任意比例合用,适用范围广,国内仍在采用。1977年Marking提出的相加指数法是在浓度相加模式基础上建立的,需要获得每个单一毒物的 LC_{50} 和在一定比例下几个毒物混合的 LC_{50} ;以及1981年荷兰学者Könemann的联合毒性指数法几乎是同一思想^[18]。

Moshkovsky曾提出将传统分类法中的相加作用域定义为完全相加^[19],而从拮抗域中划分出部分相加和掩盖作用区。导致部分相加作用的原因,一般认为是毒物在体内的代谢动力学不一致,以及一些用不同顺序染毒或时间间隔染毒。于鸣按Moshkovsky分类理论发展了Finney模型^[20],又提出一个新的 Q 值评价系统,杜绝了Keplinger、Smyth等标准的主观性和拮抗作用的假阳性。大致过程包括计算各组分及混合物 LD_{50} ,并由Finney相加作用理论公式求出预期 LD_{50} 求出 Q 值及其标准误和两倍误差的可信限范围。以此可信限与完全相加理论值1,掩盖作用理论值 $1/P_m$ 作比较,判定联合作用。于鸣应用 Q 值系统对乙醛和丁烯醛的联合毒性研究资料进行了分析,结论与采用Finney改良模型的处理结果相吻合。等效线图分析法在国外应用较多^[21],思路和求法与Loewe法类同,只是将它转换成平行线分析,增加了统计学处理^[21]。

2 Bliss法

Bliss提出根据剂量对数与死亡概率直线回归方程^[23,24],以及化学物之间联合作用模式,确定基本模型表达式:

$$Y_m = a + b \log(Q_1 + kQ_2 + KkQ_1Q_2) X_m$$

Y_m : 混合物的死亡概率,

k : 两种化学物的毒性比值,

Q_1, Q_2 : 两种化学物的百分比,

X_m : 混合物的剂量,

K : 共毒系数,

a, b : 方程的截距和斜率。

结果以相加联合作用的死亡概率为标准(理论值)与实测值比较计算共毒系数 K , $K > 0$ 表示协同作用, $K < 0$ 拮抗作用, $K = 0$ 相加作用。该法考虑了混合物毒作用机制的差

别,能较好地对外来化合物的联合作用进行定量评价,然而计算太复杂,不便推广。

3 Bürgi法

合并用药在临床上是普遍使用的治疗手段,以往均延用Bürgi氏规律公式来判断合并用药后的最终效应: $q = E[A/2 + B/2] / EA$ (或 EB),式中 $E[A/2 + B/2]$ 指A、B两药各取半量合用之效应, EA, EB 分别为A、B单用之效应,且 $EA = EB$ 。Savini即用此法求5HT及肾上腺素的合并作用。

然而,金正均指出上述方程中,分子应采用原始效应之半,分母应考虑两药联合作用时的新情况,并提出金氏修正式: $q = E(A+B) / (EA + EB - EA \cdot EB)$ 。式中分子代表实测合并效应,分母是期望合并效应,其意义同Bürgi式。修正式的优点是不必取半量或半效,可以直接利用原始效应水平,两药效应也不必相同。但只适用于定性试验。

周元晏等提出两个新公式: $q' = [E(A+B) - EB] / EA$ (合并用药用,要求 $EA = EB$), $q'' = E'C/EC$ (序贯用药用, EC 为A药的对照效应, $E'C$ 为在B药基础上的A药效应),并认为金氏修正式把概率论中衡量两个独立事件概率相加的公式来衡量合并用药效应期望值,缺乏理论基础,且没有考虑A、B两药在合并前后的内在活性,混淆了效应和概率两个不同的概念。

Mansour等报道了按等毒法评价二元混合物的联合毒性^[25]。方法是按各化学物预期死亡25%的剂量混合染毒,预期死亡率应为50%,由实测混合物死亡率和预期死亡率计算共毒系数,评价混合物的联合毒性。Harris等采用按 LD_{50} 配制二元等毒混合物来评价联合毒性的方法^[26]。测定两种化合物的 LD_{50} 及其可信限,按混合比例和各自的 LD_{50} 值推算预测 LD_{50} 及其可信限,预测 LD_{50} 与实测 LD_{50} 之比。同时根据实测值与预测值的可信区间是否相覆盖进行分析,相覆盖者联合作用较弱,反之则强。

4 等概率和曲线法

有时,合并用药可利用独立事件相加概率公式,张效文、金正均提出按效应相加的等概率和曲线法。根据混合物中各化学物的剂量—死亡概率回归曲线求出预期死亡概率,再对概率求和推算死亡率。 $Q = \text{实际合并效果} / \text{理论单纯相加预期效果}$ 。在实验室中多采用 LD_{50} 或 ED_{50} 作为指标,统计量 Q_{50} 计算: $Q_{50} = 0.5 / (P_A + P_B - P_A P_B)$ 。两个以上药物可先从两个主药着手,然后将合并效果作为单一效果,再与其他药物合并估算。既适合基础理论研究,又适合联合用药临床疗效和副作用的估计。等概率和曲线法能给出合并用药的全貌,省却运算时间,有一定理论基础。以等概率和曲线法求得的 LD_{50} 值一般比等效线图法求得的TR值要大^[27],即所判断的联合毒性普遍要大于后者。

5 方差分析法

近年来,许多毒理学科研人员在研究中采用析因设计的方差分析来判断外来化合物联合作用特征。将单因素的剂量—效应曲线和联合作用的剂量—效应曲线进行重复设计的方差分

析,以确定各因素之间有无交互作用^[8,29]。如 2×2 析因试验是用于两个因素(两个药物或两种处理方法)^[30],每个因素有两个水平(用与不用或剂量的不同)的情况。如交互作用不显著,两条量效曲线互相平行,则说明两因素之间具有相加作用。如交互作用显著,两曲线随剂量增大而远离,两因素之间具有协同作用。反之,如两曲线随剂量增大而靠近或交叉,两因素之间具有拮抗作用。该方法是一种比较经典的统计方法^[31],它可以直接利用连续的测定结果进行计算,从而充分利用了实验数据中所含的信息。

6 Logistic 模型评价法

黄炳荣等提出的用 Logistic 模型评价和确定毒物联合作用的剂量-反应关系^[32], ED_{50} 集合及其置信区域等,具有客观和适用范围广的特点,为深入研究毒物联合作用提供了一种新的方法。其描述毒物联合作用的 Logistic 模型的基本形式为: $\ln [P/(1-P)] = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_1 x_2$, P 为反应概率。 x_i 为各毒物的剂量, β_i 为模型参数, β_3 是交互作用参数。 $\beta_3 > 0$ 表示协同作用, $\beta_3 < 0$ 拮抗作用, $\beta_3 = 0$ (即 β_3 无显著性) 表示相加作用。 β_i 的极大似然估计值通常是用 Newton Raphson 迭代法求出, Logistic 模型 ED_{50} 及其渐近置信区域可用 Carter 等的方法估计。根据 Hauck 的结论 $S_{50}(B)$ 的 $1-\alpha$ 保守置信区域可近似地由下式确定: $\{\xi \in R^2 | P_L(x) \leq [1 + \exp(1 - \xi B)]^{-1} \leq P_U(x) \mid x^* \in S_{50}(B)\}$

黄炳荣等以硝酸铅与无水乙醇为例,在计算机上用 WLOGIT 软件解出各参数极大似然估计值,结果 $\beta_3 > 0$, 模型的似然比检验说明整个模型有显著性。拟合适度检验 $P > 0.50$ 可认为模型对数据拟合情况良好。联合作用剂量-反应关系和 LD_{50} 集合及其 95% 置信区域的结果最终可在二维、三维空间中拟合。

选用概率效应指标对联合作用评价在实际应用中有一定局限性,如对外来化合物长期低剂量暴露,或是在细胞、亚细胞水平观察的联合作用进行评价时,就不宜使用 LD_{50} 或 ED_{50} 指标。改用非概率指标以后,化学物单独作用的剂量-效应关系有可能需用非单调型曲线描述,同时效应指标观察值也无 ≤ 1 的限制。张侠提出对联合作用剂量反应关系采用广义三阶多项式回归模型评价方法^[33]:

$$R(x, y) = R_0 + \alpha_1 x + \alpha_2 x^2 + \alpha_3 x^3 + \beta_1 y + \beta_2 y^2 + \beta_3 y^3 + \gamma_1 xy + \gamma_2 x^2 y + \gamma_3 xy^2$$

交互项之和 $\gamma_1 xy + \gamma_2 x^2 y + \gamma_3 xy^2$ 记为 $I(x, y)$ 。 x, y 表示两种受试物各自的剂量, $R(x, y)$ 表示效应指标的观察值 $R(x, y)$ 的模拟预测值, $R_0, \alpha_i, \beta_i, \gamma_i (i=1, 2, 3)$ 是回归方程的参数。交互项之和及其置信区间估计为: $\hat{R}(x, y) - R_0 - [(R(x, 0) - R_0) + (\hat{R}(x, y) - R_0)] = I(x, y)$

从理论上讲, $I(x, y) = 0$ 即两种化学物的联合作用是简单相加。 $I(x, y) > 0$ 或 < 0 分别表示协同或拮抗。 $I(x, y)$ 的符号是否具有统计学意义可由 $I(x, y)$ 的 $1-\alpha$ 置信区间加以判定。以氯化镉与氯化镍对豚鼠肺巨噬细胞膜的联

合毒性为例进行了演示,判定结果与采用 Logistic 模型评价结果相一致。

研究固定剂量或固定比例设计下的联合作用资料时,其单独或联合的量-效曲线散点图是三次抛物线型,其资料符合三阶多项式模型的重要特征。已有文献报道不同效应水平(如 ED_{50}, ED_{60} 等)所对应的联合作用特征可能不一致^[34, 22],而该模型却能成功地解决这一问题。这是三阶以下模型所不具备的。使用本法简单有效,客观而适用范围宽。

7 多药物联合作用计算机分析法

很多药物往往不能用较大剂量治疗疾病,但为了要达到较好的治疗效果常需合并用药。徐端正提出多药物合并指标 $Q_{(x)}$ 及 95% 可信限^[35],在计算机上对所有反应水平(1% ~ 99%)进行评价,多药物的合并公式:

$$(p_1/D_{1x} + p_2/D_{2x} + \dots + p_n/D_{nx}) D_{\alpha} = Q_{(x)}$$

$$d_1/D_{1x} + d_2/D_{2x} + \dots + d_n/D_{nx} = 1$$

应用 Bliss 法可求出几个药物在合并前后的任何反应水平 $x\%$ 的等效剂量 $D_{1x}, D_{2x}, \dots, D_{nx}$ 及 D_{α} , 利用计算机可绘出 $Q_{(x)}$ 曲线, $Q_{(x)}$ 的标准误公式可用函数方差原理导出。其中 S_{α}^2 为 D_{α} 的估计方差, S_{ix}^2 为 D_{ix} 的估计方差。利用 $Q_{(x)}$ 的 95% 可信限公式: $Q_{(x)} \pm 1.96SE[Q_{(x)}]$, 绘出以 $Q_{(x)}$ 曲线为中心的两条 95% 可信限曲线,在上、下限曲线范围内包含水平线 $Q_{(x)} = 1$ 为相加作用。

Finney 在 1962 年最先提出, Plummer 和 Short 后又加以改进的多药物联用的计算机分析模型^[36],区分相加作用中的协同还是拮抗,适用于质反应或量反应(经概率单位或对数转换)资料,不须预先掌握精确的等效剂量信息,对数剂量-反应曲线不再拘泥于平行关系,对单药或具有相同效应的多药合用同样适用,具体表达式为: $Y = \beta_0 + \beta_1 \lg [A + P \cdot B + \beta_4 (A \cdot P \cdot B)^{1/2}]$, Y 是反应, A, B 为两药的剂量, P 为相对效率,可由 $\lg(P) = \beta_2 + \beta_3 \lg(B')$ 求得, $B' = B - A/P = 0$ 。如两药曲线平行, $\beta_3 = 0$, P 为常数。 $\beta_4 > 0$ 判为协同, $\beta_4 < 0$ 拮抗。对 β_4 应作是否等于 0 的显著性检验。

8 参数法分析多药物联合作用

郑青山、孙瑞元根据靶体动力学原理^[37],引入药物等效性检验法,建立新的数学模型 $Q = (E_0 - E_e) / [E_e \cdot W - s_x \cdot T]$ 分析多药物联用效果,其中 E_0 为药物联用实测效应拟合值, E_e 为联用药效期望值, W 为专业等效标准,一般在临床试验和整体实验中为 0.1, 体内实验为 0.05, 生物利用度实验为 0.2, s_x 为 E_0 和 E_e 共同标准误, T 是单侧 $t_{0.05}$ 值,分析用的一组 Q 值来自于各种水平的剂量-效应关系。本法适用于能用 Hill 方程进行拟合,且质反应 $E_{\max}$ 固定为 1 (100%) 的数据。所得结论综合了专业标准和实验室误差的因素,有效地分析多种类型联用数据,不受联用药物数目和是否作用于受体的限制。

9 合并用药的定量分析法

戴俊俊(1998)建议采用如下公式评价合并用药的效果^[38]:

$$q_A = E_{A+B} / VSE_A \quad (1)$$

$$q_B = E_{A+B} / VSE_B \quad (2)$$

$$q_C = E_{A+B} / E_{A+Ab} (E_{B+Ba}) \quad (3)$$

V_S 表示用药前后的效应做显著性检验。(1) 式若 E_{A+B} 大于 (小于) E_A , 且 q_A 的 P 值 > 0.05 定义为 B 药对 A 药无关; $P < 0.05$ 认为 A 药被 B 药协同 (拮抗)。(2) 式亦然。(3) 是针对 A、B 两药而定的。按等效剂量合并法将 A、B 合并为一药 $A+Ab(B+Ba)$, 再将其实测效应 $E_{A+Ab}(E_{B+Ba})$ 进行比较。

以上罗列各法对联合作用进行定性或定量评价, 均有各自的使用范围和优缺点。联合作用特征又可随观察指标 (如 ED_{50} 、死亡率、麻醉以及生理、生化等指标) 不同而有差别, 实验结果不宜任意外延。具体应用时须严格根据条件选择合适方法。在基础理论研究中^[39~41], 更多的是从细胞分子水平或在药代动力学模型上进行评价。

参考文献:

- [1] WHO. Combination Effects in Chemical carcinogenesis. New York: VCH Publishers 1988, 5~20.
- [2] Berenbaum M C. Pharmacol. Rev. 1989, 41: 93~141.
- [3] Plackett R L, Hewlett P S. Journal of the Royal Statistical Society Series, 1952, B14: 143~163.
- [4] Bliss C I. Ann Appl Biol. 1939, 26: 585~615.
- [5] Anderson P D, et al. Proceedings international conference on heavy metals in the environment. Canada: Toronto, Ontario, 1975, 933~954.
- [6] WHO. Technic Report Series. 1981, 662: 8~9.
- [7] Rothman W. Present at the Environmental Risk Assessment Conference, Alexandria V A, September 21, 1988.
- [8] Gehhart G F. Pain. 1992, 51: 381.
- [9] Miaskowski C, Levine J. D Pain. 1992, 51: 383~387.
- [10] Loewe S. Die quantitativen probleme der pharmakologic ergebnisse der physiol. Physiol, 1928, 27: 47.
- [11] Berenbaum M C. J of Infectious Diseases. 1978, 137 (2): 122~130.
- [12] Keplinger M L et al. Toxicol Appl Pharmacol. 1967, 10: 586~595.
- [13] Smyth H F et al. Toxicol Appl Pharmacol. 1969, 14: 340~347.
- [14] 河谷正计, 岩原滋利. 日本卫生学杂志, 1972, 27: 112.
- [15] Finney D J. Probit Analysis. 3rd ed. London: Cambridge Univ. Press. 1987, 230~269.
- [16] Wame M S J, Hawker D W. Ecotoxic and Environ Safety. 1995, 31: 23.
- [17] Kissin I, et al. Anesthesiology, 1989, 70: 698~694.
- [18] Koenemann W K. Toxicology, 1981, 19 (2): 229~238.
- [19] Filov V A, et al. Quantitative Toxicol. John Wiley and Sons Inc. New York. 1979, 270.
- [20] 于鸣, 杨铭鼎, 陈秉衡. 新疆医学院学报, 1985, 8 (2): 169~173.
- [21] Smith N T. Anesth Analg. 1966, 45: 467~473.
- [22] Ronald J. Tallarida, et al. Life Sciences. 1989, 45 (11): 947~961.
- [23] Bliss C I. Quart J pharm. 1938, 11: 192.
- [24] Bliss C I. Ann Appl Biol. 1939, 26 (3): 585~615.
- [25] Mansour N A, et al. J Econ Entomol. 1966, 59: 307~311.
- [26] Harris F A, et al. J Econ Entomol. 1973, 66: 517~518.
- [27] 朱心强, 黄幸纾, 等. 卫生毒理学杂志, 1993, 7 (1): 60~61.
- [28] Deguchi K, Yokota N, Koguchi M, et al. Jpn J Antibiot. 1993, 46 (11): 946~952.
- [29] Plummer J L, Cmielewski P L, Gourlay G K, et al. Pain. 1992, 49: 145~152.
- [30] 孙平辉, 等. 白求恩医科大学学报. 1996, 22 (1): 25~26.
- [31] Miaskowski C, Sutters K A, Taiwo Y O, et al. Pain. 1992, 49: 137~144.
- [32] 黄炳荣, 宋世震, 等. 中国卫生统计, 1993, 10 (5): 10~13.
- [33] 张侠, 周晓, 等. 中国卫生统计, 1996, 13 (4): 55~57.
- [34] 徐端正. 生理科学进展, 1992, 23 (3): 248.
- [35] 徐端正, 上海医科大学学报, 1992, 19 (1): 28~31.
- [36] Plummer J L, Short T G. J Pharmacol Methods. 1990, 23: 297~309.
- [37] Zheng Q S, Sun R Y. Acta Pharmacologica Sinica, 1998, 19(3): 232~237.
- [38] 戴体均. 中国药理学通报, 1998, 14 (5): 479~480.
- [39] Krishnan K, Pelekis M. Toxicology, 1995, 105: 355~364.
- [40] Soni M G and Mehendale H M. Toxicol Appl Pharmacol. 1991, 108: 58~66.
- [41] Ariens E J, Simonis A M and Offemeier J. Introduction to General Toxicology. Revised printing Academic Press. London, 1976.