

Up and Down 法与寇氏法测定破伤风毒素 LD₅₀ 的比较

潘若文, 马 力, 张勇朝, 张鹏飞, 董 洁, 王 魁

(华兰生物工程股份有限公司, 新乡 453003)

【摘要】 目的 比较研究 Up and Down 法与寇氏法测定破伤风毒素 LD₅₀ 值。**方法** NIH 小鼠皮下注射破伤风毒素, 分别使用寇氏法和 Up and Down 法计算 LD₅₀ 值。**结果** 同一破伤风毒素经寇氏法计算得 LD₅₀ 值为 4.97 ng/Kg 体重, Up and Down 法计算 LD₅₀ 值为 4.93 ng/Kg 体重, 95% 置信区间为 (4.71 ~ 5.13) ng/Kg 体重。**结论** 应用 Up and Down 法可测出与寇氏法相同结果的 LD₅₀ 值, 且动物使用数量仅用 8 只。

【关键词】 寇氏法; Up and Down 法; 破伤风毒素; LD₅₀

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)12-0028-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.012.008

Comparison between Up-and-Down Procedure and Karber Test in Determining Tetanus Toxin LD₅₀ in Mice

PAN Ruo-wen, MA Li, ZHANG Yong-chao, ZHANG Peng-fei, DONG Jie, WANG Kui

(Hulan Biological Engineering, Inc., Xinxiang 453003, China)

【Abstract】 Objective To compare the efficacy of Dixon and Mood up-and-down method and Karber method in determining tetanus toxin LD₅₀ in mice. **Methods** Tetanus toxin in a dose of 0.5 mL at concentration of 0.329, 0.311, 0.295, 0.280, 0.267 or 0.256 ng/mL was subcutaneously injected into NIH mice. The LD₅₀ of tetanus toxin was determined by Dixon and Mood up-and-down procedure and Karber test. **Results** The LD₅₀ of tetanus toxin was 4.97 ng/kg body weight measured by Karber method, and 4.93 ng/Kg body weight by the up-and-down procedure. **Conclusions** Both Dixon and Mood up-and-down procedure and Karber test can achieve the same LD₅₀ of tetanus toxin, but the up-and-down procedure is more simple and convenient, and 8 animals are enough for this test.

【Key words】 Karber; Up-and-down procedure, Dixon and Mood; Tetanus toxin; LD₅₀; Mouse

半数致死量 (median lethal dose, LD₅₀) 表示在规定时间内, 通过指定感染途径, 使一定体重或年龄的某种动物半数死亡所需最小细菌数或毒素量。在毒理学中, 半数致死量, 简称 LD₅₀ (即 lethal dose, 50%), 是描述有毒物质或辐射的毒性的常用指标。传统的测定方法有寇氏法、改良寇氏法、Horn's 法等方法使用动物较多, 造成人力物力的浪费^[1]。由 Dixon 和 Mood 提出上下增减剂量法 (up-and-down procedure, UDP) 经济合作与发展组织 (OECD) 经多

次修订^[2], 于 2001 年正式采纳 UDP 法 (ATO425) 以评价受试物的急性经口毒性。

在破伤风疫苗检验检定实验中有一项是用小鼠进行的体内效价实验, 需测定破伤风毒素的 LD₅₀。现行的体内效价测定方法使用小鼠数量较多, 本实验依据“3R”原则, 采用 UDP 法测定破伤风毒素 LD₅₀, 与传统寇氏法进行比较研究, 优化实验条件, 减少实验动物使用数量, 提高在生物医药领域内实验动物福利。

表 1 破伤风毒素稀释浓度及单只小鼠注射剂量
Tab. 1 The dilution concentration and dose of tetanus toxin injection per mouse

剂量分组 Dosages	1 组 Group 1	2 组 Group 2	3 组 Group 3	4 组 Group 4	5 组 Group 5	6 组 Group 6
稀释浓度 Concentration(ng/ml)	0.329	0.311	0.295	0.280	0.267	0.256
注射体积 Volum(ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
注射剂量 Dose(ng)	0.165	0.156	0.148	0.140	0.134	0.128

1 材料和方法

1.1 实验动物

NIH 小鼠 46 只,雌性,体重 30 g,来源于华兰生物实验动物中心,生产许可证号:SCXK(豫)2010-0001,质量合格证编号:0004872。实验动物使用许可证号:SYXK(豫)2012-0002。

分组:寇氏法实验组 36 只,UDP 法实验组 10 只。

1.2 破伤风毒素

破伤风毒素来源于中国药品生物制品检定所,批号:15,规格:115 mg/支。

1.3 实验方法

1.3.1 寇氏法:将 36 只小鼠分为 6 个剂量组,每组 6 只。根据中国药品生物制品检定所给出的指导意见将破伤风毒素稀释为 0.329、0.311、0.295、0.280、0.267 和 0.256 ng/mL 共 6 个稀释度,每只小鼠皮下注射 0.5 mL,注射后观察 5 d,分别记录小鼠死亡数和存活数,将实验数据输入统计软件计算 LD₅₀ 值。破伤风毒素稀释浓度及注射剂量见表 1。

1.3.2 UDP 法:破伤风毒素稀释浓度及注射剂量与寇氏法中相同(表 1)。选择一只小鼠注射一个剂量后观察,根据其死亡或者存活情况选择下一只小鼠的注射剂量,经多次增加或降低注射剂量后得到动物存活和死亡的结果,将结果输入 AOT 425 程序,计算出 LD₅₀ 值。

2 结果

2.1 寇氏法实验组破伤风毒素 LD₅₀ 结果

寇氏法实验组小鼠存活和死亡结果见表 2,将表 2 中数据输入统计软件后计算得出破伤风毒素在 NIH 小鼠实验 LD₅₀ 值为 4.97 ng/Kg 体重。

2.2 UDP 法实验组破伤风毒素 LD₅₀ 结果

UDP 法实验组小鼠存活和死亡结果见表 3,将表 3 中数据输入 AOT 425 程序,得出破伤风毒素在 NIH 小鼠实验 LD₅₀ 值为 4.93 ng/Kg 体重,95% 置信区间为 4.71 ~ 5.13 ng/Kg 体重。

表 2 寇氏法实验组小鼠存活和死亡结果

Tab. 2 The survival and death of the mice in the Karber test group

剂量分组 Groups	稀释浓度 Concentration (ng/ml)	注射剂量 Injected dose(ng)	存活数(只) Survived	死亡数(只) Dead
1	0.329	0.165	2	4
2	0.311	0.156	3	3
3	0.295	0.148	3	3
4	0.280	0.140	4	2
5	0.267	0.134	4	2
6	0.256	0.128	6	0

表 3 UDP 法实验组小鼠存活和死亡结果

Tab. 3 The survival and death of the mice in the up and down procedure group

小鼠编号 Animal ID	注射剂量(ng) Dose (ng)	存活/死亡(○/△) Short-team outcome	存活/死亡(○/△) Long-team outcome
1	0.165	△	△
2	0.156	△	△
3	0.148	○	△
4	0.140	○	○
5	0.148	○	○
6	0.156	△	△
7	0.148	○	○
8	0.156	△	△

3 讨论

Dixon 和 Mood 提出的 UDP 法,毒理学家一直在探讨其最佳的实验条件和实验程序。Lipnick 等^[1]曾通过实验比较得出 UDP 法应用最少的动物就能得到与传统方法相似的 LD₅₀ 值和一致的毒性分级。本实验基于上述实验理论,比较研究了 UDP 法与寇氏法检测生物制剂破伤风毒素 LD₅₀ 值,实验结果与 Lipnick 等的结论一致。

UDP 法^[3]的最大优点是应用最少的动物得出相同结果。本实验研究中寇氏法共使用 36 只小鼠,而 UDP 法则使用 8 只小鼠即作出与寇氏法相同的实验结果,减少使用近 80% 的实验动物,可有效地实现 3R 原则中减少实验动物使用数量的要求,提高实验动物福利。

生物制品生产企业,尤其是生产破伤风疫苗和

破伤风免疫球蛋白的企业,其检测破伤风毒素 LD_{50} 实验贯穿始终,根据本实验结果可以看出 UDP 法检测破伤风毒素 LD_{50} 可以最大限度的减少实验动物使用数量。因本实验使用破伤风毒素注射剂量是根据中国药品生物制品检定所给出参考值而定,所以并未做预实验和限度试验。OECD 推荐使用 UDP 法是检测经口急性毒性试验法,且多用于化学制剂。对于生物制剂及注射给药的 LD_{50} 值测定报道较少。本实验研究也是基于此做出的探索性实验,因实验用标准品主要用于疫苗制品的检验检定,未做重复实验和不同剂量实验,实为不足,但此法不失为一种有效的替代方法。然而能够应用在生产

实践中仍需进一步的研究和摸索优化实验条件。

参考文献:

- [1] 张林媛. 上下增减剂量法与 Horn'S 法测定 LD 的研究 [J]. 卫生毒理学杂志, 2003, 17(4):234-236.
- [2] OECD/OCDE. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. 425. Adopted: 17 Dec, 2001, 1. 11.
- [3] OECD/CDE. OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure. 425. Adopted: 21 Sept, 1998, 1-6.

[修回日期]2012-10-26