研究报告

对胃粘膜损伤有辅助保护功能的评价试验中的病理学方法的探讨与建议

金　毅[1],甘玉玺[2],刘远平[1],陈润桦[1],谢天柱[1],黄泽愉[1]

(1. 深圳市药品检验所深圳药品质量标准研究重点实验室,广东 深圳　518057;
2. 中兴通讯股份有限公司,广东 深圳　518055)

【摘要】 目的　建立科学的大体病理学检查和组织病理学诊断的评分原则、更合理的评分标准以及合理的统计学方法,为保健食品对胃粘膜损伤有辅助保护作用提供更为科学、可行的评价方法。**方法**　通过对大鼠胃黏膜急性损伤酒精模型的全面分析,针对现行方法中评价方法的缺点,根据病变特点及病理学检查的原则和半定量分析方法,以及相应的统计学方法等信息化处理,进行方法学探讨。**结果**　大体病理学检查按照病变所占面积以及在整个胃粘膜所占的比例;组织病理学诊断根据病变累及粘膜层的深度作为判定粘膜受损严重程度的主要依据,其他各种病变作为参考因素。分别分为未见异常(0 分)、轻度病变(1 分)、中度病变(2 分)和重度病变(3 分)。统计学方法采用 Ridit 统计学方法分析病理学半定量的结果。**结论**　从大体病理学、组织病理学的评价方法以及数据处理方法和结果判定等方面,提出了对胃粘膜损伤有辅助保护功能的动物实验相对更为科学、可行的评价方法的建议。

【关键词】 病理学;评价方法;急性胃黏膜损伤酒精模型;信息化
【中图分类号】R-332　**【文献标识码】**A　**【文章编号】**1671-7856(2015) 10-0038-04
doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 010. 009

Pathologic study and suggestion on evaluation methods of auxiliary protective function on gastric mucosa injury

JIN Yi[1], GAN Yu-xi[2], LIU Yuan-ping[1], CHEN Run-hua[1], XIE Tian-zhu[1], HUANG Ze-yu[1]
(1. Shenzhen Key Laboratory of Drug Quality Standard Research, Shenzhen Institute for Drug Control, Guangdong Shenzhen 518057, China; 2. ZTE Corporation, Guangdong Shenzhen 518057, China)

【Abstract】 Objective　To establish a scientific and practical principle, grading standard and reasonable statistical method for evaluating the protective effect of health food to gastric mucosal injury, based on general pathology and histopathological diagnosis. **Methods**　A methodological study was conducted on rat model of acute gastric mucosa injury induced by alcoholic through comprehensive analysis and comparing shortcomings of the current standard evaluation method, and methods of semi-quantitative analysis and corresponding information statistic processing were based on characteristics of the lesion and principles of pathology. **Results**　Gross pathological evaluation of gastric mucosa lesion was based on the area occupied and proportion in the whole gastric mucosa. Histopathological diagnosis was based on the mucous layer depth of lesion as main determination point and other lesions as reference factors. Grades of lesion were

[作者简介]金毅(1971 -),女,副主任药师,医学博士,主要研究领域:病理,临床前安全性评价,医疗信息化等。

divided into no abnormality (0), mild lesions (1 point), moderate lesions (2 points), and severe lesions (3 points). Ridit statistical method was used for pathological analysis of semi-quantitative results. **Conclusion** A scientific and feasible evaluation method for the protective effect of health food to gastric mucosal injury was provided from the aspects of gross pathology, histopathological evaluation method, data processing method and result determination.

【**Key words**】 Pathology; Evaluation methods; Animal model of acute gastric mucosa injury induced by alcohol; Information

《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)[1](以下简称为 2003 版规范)为我国保健食品检验和监督的主要依据。2012 年 4 月,国家食品药品监督管理局(CFDA)组织对其中的 9 个保健食品功能评价方法进行了修订[2](以下简称新方法),并于 2014 年 5 月 1 日正式颁布实施。其中,对胃粘膜损伤有辅助保护功能评价的新方法与 2003 版规范相比,动物实验的方法有改进、表述更细致,有利于获得更准确的实验结果。另外,新方法对动物实验的结果判定,在原有的胃黏膜损伤大体观察的基础上,增加了组织病理学检查,并且要求大体病理学检查和组织病理学检查结果均为阳性,即"动物实验:实验组与模型对照组比较,大体观察评分与病理组织学检查评分结果均标明胃粘膜损伤明显改善,可判定该受试样品动物实验结果为阳性。"因此,如何在大体病理学以及组织病理学上运用科学的方法评价动物实验结果至关重要。

为了分析新方法在评价原则、评分标准和相应的数据处理方法的科学性和可行性,本文着眼于急性胃粘膜损伤酒精模型的动物实验,探讨评价方法,提出更趋合理、可行的建议。

1 新方法中动物实验方法的改进有利于进行准确的病理学评价

1.1 相对于 2003 版规范要求的"禁食不禁水 24 h",新方法强调"严格"禁食。这一点非常重要,如果未做到严格禁食,动物在没有饲料供应的情况下,会吃其周围能获得的任何物品,如自身的粪便、脱落的体毛等,直接干扰无水乙醇对胃粘膜损伤的程度。

1.2 相对于 2003 版规范要求的给受试物第 30 天灌胃受试物 1 h 后造模的方法,新方法修改为各剂量组灌胃 30 d 后,严格禁食 24 d,第 31 天造模。这样的改变,更着重于评价受试物连续 30 d 灌胃的功效,消除造模前 1 小时的灌胃受试物减轻胃损伤程度的可能性。

1.3 相对于 2003 版规范"取胃于 10% 甲醛溶液中固定 20 min"的粗略说法,新方法细化为"暴露完整胃,结扎幽门,灌注适量 10% 甲醛溶液,固定 20 min"。这一做法使胃腔充盈,粘膜面平整舒展,有利于观察,见彩插 4 图 1A;如果不做幽门结扎灌注适量固定液或灌注失败,

皱缩,不利于大体病理观察、测量以及组织病理学评价,见彩插 4 图 1B。

2 急性胃粘膜损伤酒精模型的大体病理学评价方法分析

2.1 评分原则

2.1.1 新方法评分原则分析

新方法中"因宽度所代表损伤的严重性远较长度大,故双倍积分。"的原则,实际上肉眼所见的病变宽度不能代表组织病理学损伤严重程度。如彩插 4 图 2 A 和 B 所示,肉眼观察胃粘膜宽度为 1.1 mm,其组织病理学可观察到的损伤约为粘膜全层的 1/3,属于轻度胃粘膜损伤;彩插 4 图 2 C 和 D 所示,肉眼观察胃粘膜宽度为 0.6 mm,远小于彩插 4 图 2 A 和 B 中的病变,而其组织病理学损伤约为粘膜全层的 2/3,属于中度胃粘膜损伤;彩插 4 图 2 E 和 F 所示,肉眼观察胃粘膜宽度同彩插 4 图 2 C 和 D 为 0.6 mm,其组织病理学可观察到的损伤约为粘膜全层,属于重度胃粘膜损伤。大体病理学检查只能通过肉眼观察到病变的表象,如病变累及的面积、性状、色泽等,而无法代表使用光学显微镜观察才能确定的组织深层的病变及其程度。

2.1.2 建议

遵循病理学观察的基本原则,如实记录肉眼可观察到的损伤性状、面积以及损伤占胃粘膜比例的大小等,做出大体病理学检查的评价。

2.2 评分标准

2.2.1 新方法的评分标准分析 (见表 1)

表 1 急性胃粘膜损伤酒精模型的肉眼观察评分标准

Tab. 1 Scoring criteria of gross pathologic findings in acute gastric mucosa injury induced by alcohol

损伤程度 Severity of injury	1 分	2 分	3 分	4 分
出血点 Bleeding spot	1 个	–	–	–
出血带长度 Length of bleeding cord	1 – 5mm	6 – 10mm	10 – 15mm	>15mm
出血带宽度 Width of bleeding cord	1 – 2mm	>2mm		

总积分 = 出血点分值 + 长度分值 + (宽度分值 x2)

Total score = score of bleeding spots + score of length (score of the width x2)

如彩插 5 图 3 中的两例,图 A 病例的病变累及面积和范围明显多于图 B 病例,从病理学对病变进行半定量的角度分级,前者病变为中度,后者为高度,很客观地反应了肉眼观察的结果。同样是这两例,按照新方法的评分标准计算,由于图 A 的胃粘膜上可以查到 29 个出血点,和许多大小不等的出血、充血节段,总积分为 65 分;而图 B 的总积分为 39 分,明显低于前者。

按照新方法的评分标准,总长 20 mm 的病变,随着存在形式的不同而使积分从 5 分至 20 分不等,出现很大差距。例如图 4 中所示,图 A 有 20 个≤1 mm 的点状病变,为 20 分;图 B 为一条长度 20 mm、宽度≤2 mm 的病变,则仅为 5 分;图 C 是两条长度 10 mm、宽度≤2 mm 的病变,为 6 分;图 D 是两条长度分别为 9 mm 和 11 mm,宽度均≤2 mm 的病变,为 7 分;图 E 是 5 条长度 4 mm、宽度≤2 mm 的病变,则为 10 分。从病理学的角度,对于相同的病变,其所占面积以及在总体中所占比重是判断病变程度的依据,以上假设的几种情况基本属于同一程度的改变,不会出现如此巨大的差距。

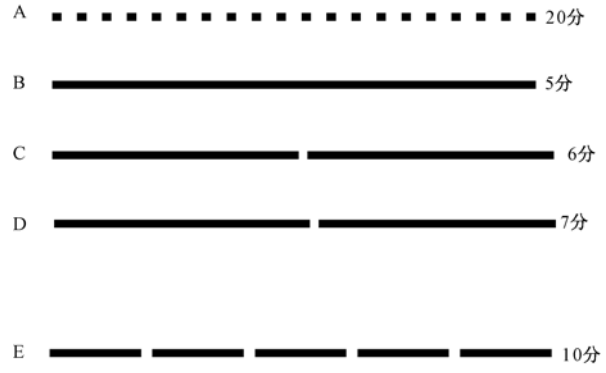

图 4 新方法评分示意图

Fig. 4 Diagram of scores in new version of the 9 functions of health food

上述可见,按照新方法的记分方法,无论从实际还是理论上都可能引起较大偏差,根据病变形态的不同而引起不均等的积分。

从大体病理学和临床角度出发,胃粘膜的总面积是一定的,粘膜发生病变是在这个面积之内的一个有限的改变。由于整个试验的核心是评价受试物对胃黏膜损伤的辅助保护功能,因此,着眼点和评价的关键是胃黏膜损伤的程度,即病变在胃粘膜整体中的比例(例如,胃粘膜无异常所见,或为轻、中、重度等),而不是新方法的计分方法导致的可以无限增加、没有上限的分值。

2.2.2 建议

根据大体病理学检查的半定量分析方法,建议按照病变所占面积以及在整个胃粘膜所占的比重,分为未见异常(0 分)、轻度病变(1 分)、中度病变(2 分)和重度病变(3 分)。

3 急性胃粘膜损伤酒精模型的组织病理学评价方法分析

3.1 评分方法

在胃粘膜损伤最严重的部位取材,观察胃粘膜全层。以充血、出血、黏膜细胞变性坏死在整个粘膜上皮层的累及程度分为 5 级。充血权重为 1,出血权重为 2,上皮细胞变性坏死权重为 3。

首先,在实际镜检工作中,对病变五等分的方法很难实行。如彩插 5 图 5 所示,由于粘膜组织本身不是均一、等高的厚度,加之发生病变的组织充血、水肿以及细胞变性、坏死等引起病变部位的粘膜层厚度发生改变。因此,对病变累及的粘膜层按照三等分进行诊断合理可行。

其次,新方法中对充血、出血以及上皮细胞变性坏死权重的划分也值得探讨。由于胃粘膜受损的组织病理学改变为多样性,如彩插 5 图 6 中所示,有些以充血为主(A、B、C),有些以出血为主(D),有些以细胞变性、坏死、脱落为主(E、F),多种病变混

合存在,很难说某一种病变的权重就一定大于其他病变,尤其是充血,往往是机体组织在遇到应激条件时的反应性表现,并不应该因为充血的存在,而给病变另外加分。

3.2 建议

组织病理学诊断应根据病变累及粘膜层的深度为判定粘膜受损严重程度的主要依据,各种病变形态等作为参考因素,分为未见异常(0 分)、轻度病变(1 分)、中度病变(2 分)和重度病变(3 分)。

4 急性胃粘膜损伤酒精模型的数据处理的统计学方法分析

4.1 2003 版规范和新方法的统计学方法及分析

对胃粘膜损伤进行了量化处理后采用了方差分析的统计学方法。但是,由于在大体检查和组织病理学检查中量化方法不合理,需要根据建议的病理学半定量的数字化结果,采用相应的统计学方法。

4.2 统计学方法建议

对病理学诊断的半定量结果进行组间统计学分析[3-7],建议采用 Ridit 统计学方法分析病理学半定量的结果。因为胃粘膜未见异常(0 分)、轻度损伤(1 分)、中度损伤(2 分)和重度损伤(3 分),属于单向有序分类资料或等级资料,Ridit 分析对等级资料进行组间比较的假设检验方法,可以通过 SPSS 实现,根据是否有显著性差异,判定病理结果的统计学意义。

4.3 信息处理方法建议

目前,云计算、大数据和移动互联网等信息通信技术发展较快。为了与国际接轨,建议借鉴临床前药物安全性评价的国际性指导方针 GAMP5(Good Automated Manufacturing Practice),向计算机化系统验证 CSV(computerized system validation)发展[8]。实行身份认证和依托大数据统计分析等信息化管理手段,真正实现实验过程和实验数据的在线监控及实时记录[9],做到有依可循、有据可查、有源可溯,从而使实验数据到评价结果能获得国际承认和相关机构互认。

5 结语

通过分析探讨国家食品药品监督管理局 2012 年发布的新方法对胃粘膜损伤有辅助保护作用的功能评价方法,从大体病理学、组织病理学的评价方法以及数据信息化处理方法和结果判定等方面提出建议,通过准确评判动物实验结果,实现更为科学、可行的对胃粘膜损伤有辅助保护作用的功能评价。

参考文献:

[1] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范(2003 年版)[S]. 133 - 135.

[2] 国家食品药品监督管理局. 关于印发抗氧化功能评价方法等 9 个保健功能评价方法的通知(国食药监保化[2012]107 号). http://wenku.baidu.com/view/e8efd3176c175f0e7cd1376d.html

[3] 罗明奎,蔡昌启,雷玉洁,等. 等级资料 Ridit 分析及正确使用[J]. 中国卫生统计. 2003, 20(4): 252 - 254.

[4] 李国春. SPSS 编程在 Ridit 分析中的应用[J]. 循证医学. 2004, 4 (1): 51 - 53.

[5] 刘嵘,白瑞华. Ridit 分析的 SPSS 实现[J]. 中国卫生统计. 2004, 21(4): 236,238.

[6] 武松,叶冬青. 多组单向有序资料的 Ridit 分析在 SPSS 中的实现[J]. 中国卫生统计. 2006, 23(6): 554.

[7] 金毅,徐峰,鲁艺. 关于四氯化碳肝损伤的组织病理学诊断方法的探讨及建议[J]. 中国新药杂志. 2014, 23(19): 2224 - 2227.

[8] 金志虎, 甘玉玺, 金毅, 等. GAMP5 的 IP 承载网建设研究[J]. 广东科技. 2013, 22(6): 117 - 118, 80.

[9] 甘玉玺, 胡龙斌, 龚超美, 等. 柔性重构的高性能超宽带综合业务网关平台[J]. 计算机应用与软件. 2015, 32(7): 133 - 136.

〔修回日期〕2015-08-28