

国外致突变、致癌和致畸实验方法的进展

第二军医大学 印 木 泉

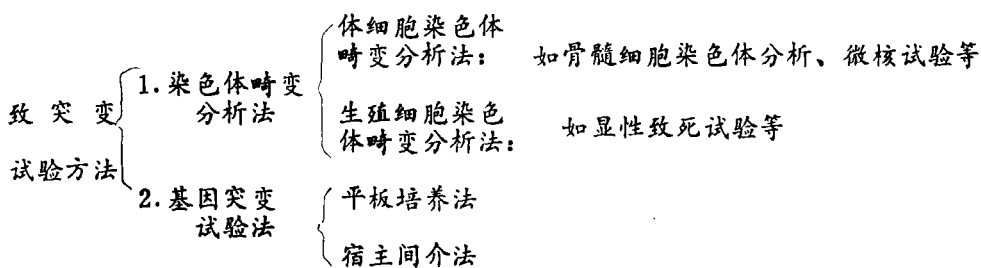
致突变、致癌和致畸（简称“三致”）实验是毒理学和药理学中新近崛起的领域。它的任务是：查明人类环境（包括生活环境和生产环境）中各种物理、化学和生物因子是否具有致突变性（mutagenicity）、致癌性（carcinogenicity）和致畸性（teratogenicity）；探讨“三致”作用与化学结构的关系；引起“三致”作用的机理；致突变与致癌的关系；以及实验资料外推到人的理论与实践等。

“三致”作用的研究，近十多年来在国外发展很快。因为1、重要性正在为人们进一步认识。表现在：日常生活中接触的大量化学物质如染发剂、日用化学品，食品添加剂和各种食品，以及药物等已经或正在被检测是否具有“三致”性而决定其能否继续使用；新药必须具有“三致”实验资料提出的安全保证，才能获准推广使用；生产环境中的大量化学物质，以及噪声、微波和高、低气压等也正在用各种测试方法被大量过筛；研究的课题不仅限于民用，而且正转向军用课题，如美国正在研究芥子气的致畸作用，为军方考虑女军人配置的位置提供科学依据。2、测试方法蓬勃发展。近年来大量发展了简单、快速、敏感和经济的短期测试系统，迄今国外已有100多种。

一、致突变和致癌试验的短期测试系统

基于体细胞突变理论，环境因子引起体细胞突变后，细胞的异常分裂，可能是癌发生的基础，因此致突性试验和致癌性试验的短期试验方法是一致的。

（一）分类：测试方法的分类，不尽相同。大多数的作用点（end-point）是基于突变，如下表所列：



此外，有的以致癌物依赖于核酸反应分为致突性实验、细胞转化研究、修复研究和标记物的大分子结合等试验方法。还有以不同的致突变指示物（indicator）分类的。无论何种分类法，在实验中选用方法时应注意以下七条技术标准。它们是：①重复性，②敏感性，③快速性，④复杂性，⑤基本机理，⑥试验程序的标准化程度，⑦人力和耗费。

（二）平板培养法：是最为广泛应用的方法之一。属于此类的实验方法虽各不相同，但有两个基本环节。1、突变指示物分为两大类，一是应用微生物为指示物，如鼠伤寒沙门氏菌，大肠杆菌和酵母菌等，二是用哺乳动物细胞如V79细胞株、CHO细胞株、小鼠淋巴瘤L5178Y和中国地鼠细胞等。2、代谢活化系统（Metabolic Activation System）。目

前国外常用的代谢活化系统有三类：①无细胞系统 (Cell-free Systems)。又分为三种，即 S-9 或 S-15，啮齿类动物肝微粒体组份和纯酶，如单氧化酶系统。②哺乳动物细胞如肝细胞等。③宿主 (Host)。它们各有优缺点，但 S-9 或 S-15 含有异体生物代谢酶的量最多，是理想的致癌物和致突变物的活化系统，是常规筛选中较好的系统。但对那些须相继进行复杂反应的化合物，用完整的肝细胞更好。如 2-乙酰氨基氟用 S-9 作活化系统时，对 TA100 为阴性，而用肝细胞时则为阳性。选择合适的活化系统可避免假阴性。

(三) 鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物——微粒体法：该法又称 Ames 法，是国际上公认的一种快速而敏感的测试系统，目前世界上已有 2000 多个实验室在应用此法。该方法公开发表于 1975 年，经过国际上几年的应用后，Ames 教授等作了某些修正，重新发表于 1983 年 5 月。此外，各国为提高敏感性和消除假性结果进行了多方面的改进。

1、发展新菌种：标准平板掺入法所用的原菌株为 TA98 和 TA100 等，它们的回变位置在 DNA 结构的 G·C (鸟嘌呤·胞嘧啶) 硷基对。应用这些菌株，测试化学物质的致突性和致癌性间的相关约 83%。现在，某些不能检出的致癌物经用新菌株——TA102 测试后，可获得阳性结果，因为 TA102 的回变位置在 A·T (腺嘌呤·胸腺嘧啶) 硷基对。

表 1 颠倒平板法和预培养方法的比较

致突试验的敏感性		化 合 物
颠倒平板法	预培养	
-	+	Dimethylnitrosamine 二甲基亚硝酸胺 Diethylnitrosamine 二乙基亚硝酸胺 Dimethylaminoazobenzene 二甲基氨基苯 Pyrrolizidine alkaloids 吡咯联胺生物碱
+	++	Aflatoxin B1 黄曲霉毒素 B1 Benzidine 联苯胺 O-Tolidine O-联甲苯胺 Dianisidine MNNG 亚硝基胍 Methylnitrosourea 甲基亚硝基脲 Ethylmethanesulfonate 乙基甲磺酸盐
+	+	Benzo (a) pyrene 苯(并)芘 O-Aminoazotoluene O-氨基甲苯 β -Nophthylamine β -萘胺 2-Nitrofluorene 2-亚硝基芴胺 4-Nitro-o-phenylenediamine 4-亚硝-o-间苯二胺

2、测试物的预培养：应用预培养可提高敏感性，增加检测致突物的范围。此法系在平板掺入法前，将测试物、S—9和试验菌株一起，在37℃下振荡培养5~20分钟。常用20分钟，亦可在30℃下培养30分钟。某些化合物如N—亚硝酸胺可有效地被检测为致突物。上表1所列结果，亦说明应用预培养可增强其敏感性。

3、应用联合致突物 (Comutagen)：这种化合物本身无致突变性，但可加强致突物的活性，因而可检测某些可疑致癌物或弱致突物。如加200微克Norharman与苯胺一起培养时，可获阳性结果。Norharman的作用机理尚不完全清楚，但已发现其可插入双股DNA的硷基对中，这种插入可增加DNA对致突物或致癌物的活性代谢产物的敏感性。它也可修正致突物的代谢，抑制灭活性或加强致突物的活性。

4、加入酶的联合因子 (Cofactor)。除还原型辅酶Ⅱ (NADPH) 外，现在还加入其它联合因子如ATP、核黄素和flavin mononucleotide (FMN) 等，以加强某些需要代谢活化的化合物的致突性。

5、建立新方法根据Ames试验的基本原理，发展了一些新方法，如细菌徬徨试验 (fluctuation assay)。经用该方法测试某些化合物，其敏感性高于平板掺入法直至100倍。后又用微量滴定盘取代原试管试验法，其敏感性又得到了一定的提高。为消除假阳性结果，应同时进行活菌监测。该方法用于对含有致突物的生物体液的检测是有用的。如从服用细胞毒性药物病人或接触毒物者尿中检测致突物。不仅可以测定尿，还可用于对粪、血液或其它体液的检测。最近又将微量滴定盘试验法用于哺乳类细胞突变试验，不仅取代了60毫米的培养皿，而且大大地缩短了实验周期。

(四) 方法的评价：一个国际协作组用五种方法 (包括修复试验、细菌致突试验、酵母菌试验、体外哺乳动物细胞试验和体内试验) 对42个标号化合物进行双盲试验后指出，当前仍以Ames试验较好。它们在评价各种方法时，计算下列三个指标：

1、敏感性 (Sensitivity)

$$\text{敏感性 (真阳性部分)} = \frac{\text{致癌物为阳性数}}{\text{测试致癌物数}}$$

2、特异性 (Specificity)

$$\text{特异性 (真阴性部分)} = \frac{\text{非致癌物为阴性数}}{\text{测试非致癌物数}}$$

$$\text{3、精确性 (Accuracy)} = \frac{\text{正确试验结果数}}{\text{测试化合物数}}$$

此外，他们推荐了另一项评价指标，即预测值 (Predictive value)。

$$\text{预测值} = \frac{\text{致癌物为阳性数}}{\text{得到的阳性结果数}}$$

尽管致癌性短期测试方法甚多，但没有一种方法是尽善尽美的，因此在一个“三致”实验室里须建立一整套测试系统，互相验证是十分必要的。

二、致畸实验

致畸学已发展为常规致畸学 (Conventional teratology) 和行为致畸学 (Behavioral teratology) 两部分，因此实验方法也有很大的发展。

(一) 常规致畸学实验

1、动物实验：仍是经典的实验方法，常用大鼠和家兔作为实验动物。但是在具体方法上有了发展，如内脏检查以staples法取代了wilson法，它可避免wilson法由于自溶、固定和切片造成的改变；骨骼的染色采用一种快速的双染色法。各国对实验设计的原则均有明确而统一的规定。这些规定主要包括①选用实验动物的种系；②各组动物数；③剂量组的设立；④给药期；⑤给药途径；⑦检查项目。此外，有的国家和实验室还编有标准操作程序(standard Operating procedures, SOPs)，使实验操作标准化、规范化。如美国编有完整的对各种动物进行致畸实验的标准操作程序。

根据Karnofsky定律，任何一种制剂，在某些动物胚胎发育的一定阶段，给予适当的剂量，都将引起胚胎或胎仔的发育障碍。因此，在实验期间，应严格控制动物饲养环境因素对实验的影响。国外的动物室对气温、气湿、噪声、尘埃、饲料、饮水和照明的控制是非常严格的。

在畸形学检查中，应正确鉴别畸形(malformation)与变异(Variation)，如大鼠应有13对肋骨，如第一腰椎上出现了肋骨，其长度短于第十三肋的一半，则为游离肋，属正常变异。如大于1/2，称为多肋，则为畸形，并为致畸原引起骨骼畸形的重要标志。还要正确记录畸形的术语。各种畸形术语都有一定的描述或定义。

应用家兔进行致畸实验时，基本程序与大鼠一致，但为提高受孕率，国外多采用人工受精法。

2、体外胚胎培养：将孕期第9或10天的胚胎从动物体内取出，在体外试管中培养，然后加入不同浓度的测试物，逐日观察形态学上的异常，以判断测试物是否有致畸作用。为了精确地测量形态学上的变化，有人提出按照17种形态特征的表现，分别予以记分，试验组所得总分与对照组相比。此外，还测量体节数、胚胎蛋白质含量、卵黄囊直径、身长(头顶部到臀部)和头长，并进行组间比较。近来已有人将小鼠第3.5天的胚芽取出，在体外试管中培养到第12天。

在实际运用中，考虑到某些化合物的致畸性，可能要依赖于一种或多种母体P450单氧化酶系统，因此，在体外培养时，还加入S-9和联合因子。

但是，体外胚胎培养作为致畸学研究的短期测试系统尚未完全成熟。因为胚胎在体外只能培养到第12天，而在12天前所见的异常，是否会形成畸胎，尚不得而知，因此，该方法在国外也属于探索阶段。

3、多代致畸学研究：由于人类接触食品添加剂、农药和所有环境污染物的方式是慢性的，而接触药物可能是急性的或慢性的，因此实验动物的接触方式应与人平行。为此，有三种研究方式分别称为：①定时研究(timed study)即上述常规致畸学中的动物实验；②单代研究(Singlegeneration study)和③多代研究(multigeneration study)。

多代致畸学研究是单代研究的扩展和完善。双亲动物在交配前、孕期和哺乳期连续地接触测试化合物。仔代也从交配前连续接触化合物，然后断奶，允许成熟，在它们中间交配。其试验程序的基本模式如图1所示：

(二) 行为致畸学实验

该研究的主要目的是通过过筛试验，预防或降低人们对于可能引起行为功能紊乱的毒性物质的接触。

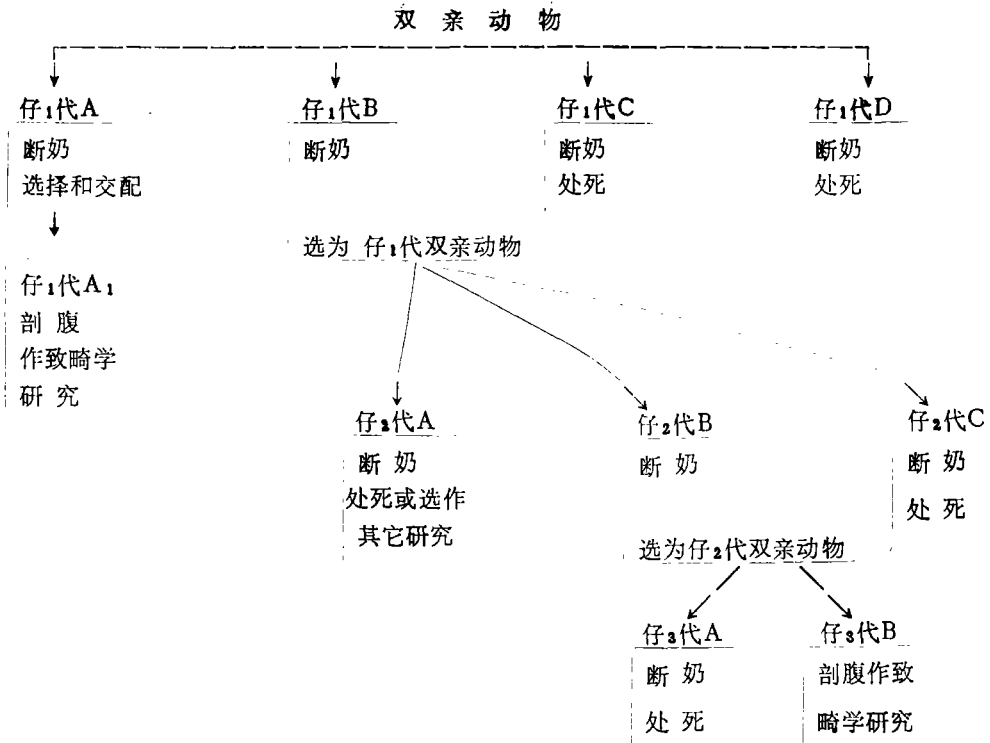


图1 三代致畸学研究程序

当前，为了评价任何一种化学物质的行为致畸作用，正在建立和发展一整套的试验和评价方法。有人提出，一套理想的评价方法应由6个系统组成：①体力增长和成熟度，②反射和运动的发育，③感觉功能，④活动性和反应水平，⑤阅读和记忆能力，和⑥神经传递系统功能。并且，应该在动物的整个生命期进行观察评价。当前还不可能有一个简单的“工具”去检测行为功能紊乱，因为我们对“正常”行为和它的机理还不完全了解。

在考虑试验程序时，有人提出应包括下列四个问题：①选择测试对象，②建立测试对象群体的“正常”行为概貌。③利用阳性对照物，④方法和程序标准化。

通过试验，已经发现某些制剂对动物和人有行为致畸作用。这些致畸原是：

对动物有行为致畸作用的物质：

- | | | | |
|--------|--------------|----------|------------|
| 1、酒精 | 6、巴比妥酸盐 | 10、滴滴涕 | 15、多氯联苯 |
| 2、麻剂醉 | 7、镇静剂 | 11、抗抑郁药 | 16、镉 |
| 3、雄激素 | 8、氟烷(吸入性麻醉药) | 12、阿司匹林 | 17、甲状腺机能减退 |
| 4、雌激素 | 9、铅 | 13、尼古丁 | 18、双氮嗪 |
| 5、营养不良 | | 14、皮质类甾醇 | |

对人有行为致畸作用的物质：

- 1、酒精 2、麻醉剂 3、吸烟 4、甲基汞 5、营养不良 6、铅

从方法学上来讲，纵然在“三致”实验方面已发展了大量的短期测试系统，但动物实验仍是确认是否具有“三致”作用的重要手段。并且，由于动物实验资料外推到人，以估价对人的危害问题尚未解决，因此，“三致”实验仍将在短期测试作过筛——动物实验作确认——人群流行病学调查作证实三者间进行，从而获得可靠的结论。本文仅从一个侧面介绍某些近况。

(参考文献43篇，略)