

## 知识介绍

## 环境化学污染物致突变和致癌作用的哺乳类 动物细胞学实验方法和意义

杜 应 秀

(广州医学院卫生学教研室)

环境化学污染物对人类健康影响的重要问题之一就是能否引起生物遗传物质的突变,以及能否导致畸胎或诱发肿瘤。

许多实验证明细胞的突变对畸胎或肿瘤的发生有密切的关系。正常细胞转化为肿瘤细胞,起始变化是发生于细胞的基因突变或染色体畸变。因此许多致突变实验,常被用于致癌作用的探讨。判断一种化学污染物有无致突、致畸和致癌作用,要求有流行病学和实验室两方面的数据互相印证。

在实验室方面,现已广泛采用哺乳类动物细胞学的实验方法。其优点是:(1)快速,可期望在短期内获得初步结果;(2)实验条件较易控制;(3)只需微量的被测样本;(4)便于进行机制的探讨;(5)用真核细胞作实验比用原核细胞有许多明显的优点。

但是细胞学的方法也有缺点,例如:(1)操作技术比较复杂;(2)细胞长期体外培养,有“自发”发生转化的可能;(3)体外染毒需复杂的激活处理;(4)用细胞学方法所得结果,最后仍需在动物身上进行鉴定;(5)多数细胞学方法尚未标准化,其评价标准有待统一。现将有关问题分述于下:

### 一、细胞的选择、染毒方法及剂量

#### 1. 细胞的选择

根据实验目的,选用各种细胞。血细胞和骨髓细胞多用于染色体分析。各种成纤维

细胞和上皮细胞除作核型研究外,还用于细胞恶性转化研究。虽然大多数人类肿瘤起源于上皮细胞的癌变,但多数试管内细胞转化系统都使用成纤维细胞。一方面这是由于上皮细胞在培养基中繁殖相当困难,同时也因为鉴定培养基中恶性转化了的上皮细胞,目前尚缺乏明确的形态指征。

此外,对所用细胞要考虑纯系化和取材动物的检疫,以保证实验结果的稳定可靠。

#### 2. 染毒方法

有体外染毒或称试管内染毒和体内染毒或称活体染毒两种。

体外染毒是将被测化学物直接加入到细胞培养基中。近来发现,大多数化学致癌物均需经过体内混合功能氧化酶(MFO)的激活才能成为终末致癌物,因此体外染毒常需进行激活处理。常用的体外激活系统有:S-9组分加入法<sup>[1]</sup>,细胞喂饲技术法<sup>[2]</sup>,细胞培养基动物腹腔接种法<sup>[3]</sup>和染毒细胞与大鼠肝细胞共同培养法<sup>[4]</sup>等。

体内染毒,是将化学污染物通过灌胃、注射、吸入或皮肤涂擦等途径给予动物,然后取血细胞或各种体细胞作分析。将毒物给予怀孕动物,或给予雌鼠(雄鼠)后使之交配,然后观察胎鼠细胞的突变情况,也是一种活体染毒方法。

#### 3. 染毒剂量

体外染毒,常按被测化学物的克分子量

计算,例如取  $1 \times 10^{-5}$ — $1 \times 10^{-8}$  摩尔. 体内染毒常按  $LD_{50}$  剂量计算,例如取  $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{20}$   $LD_{50}$ . 由于大多数毒物在体内可因降解作用而使毒性降低,因此体内染毒时剂量要加大.

#### 4. 对照组

在染毒时有的化学物难溶于水,常需将其溶解于某种溶剂中.因此对照组的设计,除了空白对照外,还应有溶剂对照.最常用的溶剂是二甲基亚砜(DMSO).为了对实验条件本身进行控制,还应有阳性对照化学物(如 MNNG)及阴性对照化学物(如生理盐水).

## 二、细胞学实验方法

细胞学的各种实验方法,归纳起来可分为染色体畸变实验(CA)、微核实验(MNT)、姐妹染色单体互换实验(SCE)、DNA损伤修复实验(DNA-DR)和细胞转化实验(CT)等.现分述于下:

### 1. 染色体畸变实验<sup>[5]</sup>

正常人和动物的细胞染色体数目和形态结构是一定的,如果因为接触化学物而造成染色体数目的增减或形态的改变(如断裂、裂隙、易位、双着丝点等),则表明此种化学物有造成遗传物质损伤的作用.常用的方法有:

(1) 体外染毒 在血细胞培养基中加入 PHA,以促使淋巴细胞分裂,然后加入被测化学物,培养一段时间后,加入秋水仙素使细胞分裂终止以获得中期分裂相,最后用 Giemsa 染色或各种区带染色,以观察染色体畸变情况.

(2) 体内染毒法 在活体中给予毒物及秋水仙素,以后制备染色体标本.

(3) 体外染毒合并代谢激活处理法.

(4) 染色体提前浓集技术<sup>[6]</sup>使有丝分裂细胞与间期细胞融合,此时间期细胞核的染色质可提前浓集成染色体.此种染色体的长度较长,便于作微细分析,也便于对不同时期

的间期细胞进行动态的研究.

### 2. 微核试验<sup>[7]</sup>

微核是染色体碎裂后的产物,因此染色体受损的程度愈明显,微核细胞数也就愈多.与 CA 比较, MNT 的优点是: (1) 微核容易辨认; (2) 微核的自然发生率较低; (3) 微核可出现于白细胞也可出现于红细胞,而红细胞比白细胞多得多,有更多的细胞数供观察; (4) 不同动物的染色体差异很大,而微核则不然,都是染色体碎片,因此不同动物的实验结果可直接对比.但微核也有缺点: (1) 微核细胞数与细胞分裂有关,有抑制细胞分裂作用的毒物,反能使微核细胞数减少; (2) 微核仅是染色体碎片,未能表明某一号染色体受损.

常用的 MNT 方法有以下几种:

(1) 活体染毒,动物染毒后取骨髓细胞制片检查.

(2) 体外染毒,或体外染毒合并激活处理法.以末梢血细胞或骨髓细胞为实验材料.

### 3. 姐妹染色单体互换实验<sup>[8]</sup>

每一条细胞染色体都是由两条染色单体所组成,染色单体又由双链 DNA 构成,在 DNA 复制过程中,同源的姐妹染色单体存在着对称性互相交换的作用,称为 SCE,其机制迄今未明.在细胞培养基中,如果加入 BrdU,由于 BrdU 的结构与胸腺嘧啶(T)相似,能取代 DNA 中的 T,并也能进行互换.但 BrdU 取代 T 后, DNA 的螺旋化程度降低,用 Giemsa 染色时着色较浅,因此两条染色单体颜色深浅明显不同,极易区分.如果某化学物有损伤 DNA 的作用,则 SCE 的频率会明显增加.

常用的 SCE 实验方法如下:

(1) 体外染毒 方法与 CA 实验基本相同,只是在细胞培养基中需加入 BrdU.

(2) 体内染毒法.

(3) 体外染毒合并激活处理法.

(4) SCE 与 MNT 实验结合法<sup>[1]</sup>这种方法的优点是可在同一玻片中观察到 SCE 及 MNC.

#### 4. 受损 DNA 的检测

化学致癌作用就是指终末致癌物(强亲电子化学物)与 DNA 的亲核性基团的相互作用,并造成 DNA 损伤.故可根据受损 DNA 的变化,以判断化学物的致癌性.

常用方法如下:

(1) DNA 损伤修复实验<sup>[10]</sup>生物体是处在外环境许多理化因子不断地作用下,这些作用可造成 DNA 的损伤,但是生物体仍能维持其遗传特征的相对稳定性,这就是因为生物细胞内存在着精巧的 DNA 损伤修复机制的缘故.

DNA 损伤的修复,一方面显示了生物有维持其遗传特征的能力,另一方面又显示 DNA 遭受损伤的程度.当有更多的 DNA 遭受损伤,便会有更多的 DNA 损伤修复过程发生.

DNA 损伤修复的研究,可用  $^3\text{H-TdR}$  掺入法.在染毒的细胞培养基中加入  $^3\text{H-TdR}$ ,如果化学物对 DNA 的损伤愈益明显,则在 DNA 修复过程中会有更多的  $^3\text{H-TdR}$  掺入于 DNA 链中.  $^3\text{H-TdR}$  的掺入量可用液体闪烁计数仪检测,或用放射自显影显示.

(2) DNA 合成抑制实验<sup>[11]</sup> DNA 受损较明显时,能导致 DNA 合成抑制.一些非致癌物虽也能导致 DNA 合成抑制,可是当它与细胞脱离接触,则 DNA 合成能力很快恢复正常,而致癌物则使 DNA 合成能力持续低下.

DNA 合成能力的检测,可用放射性标记碱基的方法.例如以  $^{14}\text{C-TdR}$  掺入量代表染毒前的 DNA 合成能力,  $^3\text{H-TdR}$  掺入量代表染毒后的 DNA 合成能力,然后根据  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$  的比值以推算 DNA 合成抑制.

(3) DNA 碎片检查,化学物质引起 DNA 的损伤,可导致 DNA 碎片的形成. DNA 碎

片可用碱性蔗糖梯度离心法<sup>[12]</sup>,或微孔滤膜-碱性液洗脱法<sup>[13]</sup>检测.

#### 5. 细胞转化实验

在细胞培养中,如果用化学致癌物处理正常成纤维细胞,经过一段时间之后,细胞形态和生长特征可发生显著变化,如细胞互相重叠、交叉、排列紊乱、方向性消失、接触抑制功能消失、成堆生长等.这种变化称为“形态转化”.形态转化的细胞,在体外继续培养一段时间之后接种于敏感动物,则可诱发肿瘤,此时称为“恶性转化”.鉴定一个细胞是否发生恶性转化,需与相应的正常细胞,最好是恶变前的同一起源细胞相比较,并在恶性转化过程中的每一个阶段进行形态和核型分析.

常用的细胞转化实验方法如下:

(1) 体外染毒单层培养<sup>[14]</sup>单层培养是指某些组织分散的单个细胞经过培养后在培养瓶表面上生长形成的单层细胞.受化学致癌物作用后,可能发生形态转化.在倒置显微镜下,一般容易观察.

(2) 琼脂悬液培养法,正常细胞的分裂增殖,需要贴在某种固体的底物上,并在底物上展开生长.细胞恶性转化时,在体外的自主性程度很高,无须贴在底物上也能生长,并且由于接触抑制消失,因而可在软琼脂糖中成堆生长,即所谓转化灶.转化灶的数目常与化学污染物的浓度成正比.

(3) 体内染毒细胞转化实验,将被测毒物注射于动物体内,例如肾囊区,然后取肾细胞进行培养,并进行各种观察.

(4) 敏感动物接种实验,形态转化细胞接种于敏感动物,如果长成肿瘤,且用此肿瘤块又能在培养基中重建与该转化株相同的细胞株,则所用的化学物可肯定为致癌物.

总的来说,用哺乳类动物细胞研究化学污染物的致突变和致癌作用,现已提出了许多实验方法.这些方法各有优缺点.例如现已广泛使用的 CA 实验,虽有利于判定那一号染色体发生畸变,但判断标准不易掌握,而

且试管中染色体畸变与化学致癌的作用，目前还存在着两种完全相反的理论见解。SCE 实验虽比 CA 实验灵敏，但其机制迄今未明。MNT 实验有快速、简易的优点，但只能作为一种预测、筛选的手段。DNA 损伤修复或合成抑制实验，是一种观察 DNA 损伤早期变化的方法，但目前资料积累不够丰富，仍有待于进一步探讨。CT 实验是一种能够更加直接地反映化学物的致癌性质，但实验需要较长的时间，且操作复杂。

以上这些方法都是从不同的方面来探讨化学污染物的致癌作用。由不同化学物所造成的 DNA 损伤及由之而引起的变化不尽相同，因此化学致癌作用的探讨，显然应该采用多指标的方法。

### 主要参考文献

[1] Garner, R. C. et al. *Cancer Res.*, **32** 2053

(1972).  
 [2] Popescu, N. C. et al., *J. Natl. Cancer Inst.*, **59** 289 (1977).  
 [3] Huang, N. C. et al., *Exp. Cell Res.*, **111**, 458 (1978).  
 [4] Kligerman, A. D., *Environ. Mutagenesis* **2**, 157 (1980).  
 [5] Evans, H. J. et al., in B. J. Kilbey (Eds), *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, p. 261, Elsevier Amsterdam, (1977).  
 [6] Johnson, R. T., *Nature, (London)*, **226**, 717, (1970).  
 [7] Schmid, W., in [5], p. 235, (1977).  
 [8] Latt, S. A. Ibid. p. 275, (1977).  
 [9] A Sudharsan RAJ et al., *Mutation Res.*, **78** 253, (1980).  
 [10] Margison. G. P. *DNA Damage and Repair in A. Canonico (eds) Medical Oncology Research and Education. 1 Carcinogenesis* p. 299, Pergamon Press (1977).  
 [11] Painter, R. B. *Nature*, **256**, 650, (1977).  
 [12] Brambilla, G., *Pharmacol. Res., Comm*, **10**, 683 (1978).  
 [13] Kohn, K. W., *Biochem.*, **15**, 21, (1976).  
 [14] Pienta, R. J., *In Vitro Transformation of Cultured Cell*, in [10], p. 255, (1977).

(上接第 62 页)

试。表 1 是空载共振操作条件。表 2 是针长  $L$  与最大共振频率  $f_{max}$  关系的操作条件。表 3 给出了共振频率与液滴大小的关系。表 4 给出了针长与液滴大小的关系。液滴直径是用 QX-1 型激光全息滴谱记录仪动态实时拍摄和记录的。

表 5 苯二甲酸二丁酯有关分散物性参数

比重 ( $g/cm^3$ )	粘度 (c. p.)	表面张力 ( $dyn/cm$ )	饱和蒸汽压 ( $mmHg$ )
1.045(20°C)	18.8(20°C)	34(20°C)	$4.677 \times 10^{-4}$ (50°C)

### 三、结 语

本文描述的振针式均匀液滴流单谱发生

器，是一种简单、实用、易于制作的动态均匀粒子发生器。它的构件和配用仪表都是经过实验筛选后确定的通用器件和仪表。读者可以根据需要，自行装制。如果希望液滴流具有更大的初始速度，可以用扬声器代替耳机。如若使液滴带电，可外加电场使粒子带以正、负电荷；也可以用电场使粒子偏转定向，以期进入预定轨道和地点。

### 参 考 文 献

[1] R. N. Berglund and Benjamin, Y. H. Liu, *Envirmental Sci. & Technology*, Vol. 7(2), p. 147 (1973).  
 [2] J. M. Schneider and C. C. Hendricks, *Rev. Sci. Instru.*, Vol. 35(10), p. 1349, (1964).  
 [3] D. J. Ryley and M. R. Wood, *J. Sci. Instru.*, Vol. 40, p. 303, (1963).