



综述与专论

遗传毒理学研究方法的进展

黄 念 君

(卫生部药品生物制品检定所)

在过去的 20 多年中,世界上发生了多起触目惊心的事件。50 年代末由于水俣港汞的排放而导致水俣病;60 年代初发生了震惊世界的反应停(thalidomide)致畸胎事件;70 年代初发现孕妇服保胎药二乙基己烯雌酚(diethylstilbestrol)导致女性子代患宫颈或阴道透明细胞癌;70 年代中期流行病学调查发现氯乙烯引起职业性肝血管肉瘤。在 20 多年惨痛的历史教训面前,人们才逐渐关切化学物质对人类体细胞和生殖细胞遗传结构的潜在影响,才开始对化学物质的应用进行控制。据估计,目前世界上应用的化学物质达 20 万种以上,而且每年投入环境中的新化学物质还有 1000 种以上,如此之多的化学物质对人的近期和远期作用究竟如何,这迫切需要现代科学予以回答的。

过去的慢性毒性和致癌性试验过程缓慢并耗费极大的财力物力。而且全世界每年有能力进行动物试验的化学物质也只有几百种,按照现有的能力检定所有化学物质需要长达 100 多年的时间和花费几十亿美元的代价,显然是行不通的,因此一定要采用短期试验。

遗传学和细胞学的基本原则结合在一起,成为遗传毒理学的根据。遗传毒理学是发展很快的探索性领域。它的发展使人们认识到致癌源造成 DNA 分子的损伤和肿瘤的发

生有关。突变剂多数为致癌剂,所以一种物质的致癌作用首先可以从致突变效果上表现出来,短期测试方法都是根据受检物质对靶细胞致变性的原理而设计的。检验化学物质诱发的致变,致癌,致畸的研究已成为世界各国医药界新的研究课题,成为本世纪 70 年代发展起来的一门新兴边缘学科。随着遗传毒理学的发展,为满足现实需要,世界各有关实验室均作了大规模改组,并成立相应环境保护和毒理或生物学安全机构。近年来,为了组织和协调世界各国的遗传毒理工作还成立了不少相应国际组织。主要有环境诱变物和致癌物国际防务委员会。

自 70 年代开始,美、日、法、英、加拿大等国所建立的短期致变检测方法多达 100 多种,但每一方法都有一定的局限性,任何一种方法所发现的基因或染色体损害都是受限制的,因此需要几种方法互相验证。从 70 年代的单一测试方法,发展成 80 年代的成套(或一组)测试系统^[1,2]。包括用于检测基因突变和染色体畸变的各种测试方法。目前世界各国所采用的测试系统可归纳为体外,体内和其他测试系统三大类。在体外测试系统中有用于测定基因点突变的鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变法(Salmonella Typhimurium Reverse Mutation Assay),简称 Ames 法,大肠杆菌法(Escherichia Coli Reverse Mutation Assay),酵

母菌法 (saccharomyces Assay) 和哺乳动物细胞基因突变试验 (In Vitro Mammalian Cells Mutation Assay), 以及体外细胞遗传试验 (In Vitro Mammalian Cytogenetic Test)。在体内测试系统中有哺乳动物骨髓细胞遗传学试验 (In Vivo Mammalian Bone Marrow Cells Cytogenetic Test), 啮齿动物微核试验 (Micronucleus Test), 小鼠点试验 (Mouse Spot Test), 啮齿动物显性致死试验 (Dominant Lethal Assay) 和果蝇隐性伴性致死试验 (The Sex-linked Recessive Lethal Test in *Drosophila Melanogaster*)。此外, 在其他测试系统中还有 DNA-repair 试验, 体外 UDS 法, 体外 SCE 法和精子异常试验 (Sperm Abnormality Tests), 一般选择 2—3 种有代表性的, 分别测定基因点突变和染色体畸变的测试系统, 用于检测和评定化学物质的遗传毒性和潜在致癌性。各国所采用的测试系统并不完全相同, 但基本原则和方针是一致的。即所选择的测试方法应是相对容易实行, 财力、物力合理, 重复性好, 对各类化学物质敏感, 并且在过筛化学物质中确实有效。因此, 主要采用体外测试系统再适当结合体内测试系统的方针, 下面就遗传毒理学中, 世界各国普遍采用的几大致变测试方法及其发展动向进行介绍。

一、Ames 法^[3,4]

自 1975 年 Ames 等首创用鼠伤寒沙门氏杆菌回复突变试验检测化学物质的致变/致癌以来受到各国的重视。1977 和 1979 年分别在西德和瑞士召开了第一和第二 Ames 测试法专题会议, 重点对 Ames 试验的可变性及其意义进行了讨论。会后, 一方面对过去认为不重要的一些问题, 如培养条件, 组氨酸, 溶媒等问题引起重视, 并对标准菌株 TA₁₅₃₈ 和点试法认为可以取消, 以节省工作量, 在现有的短期试验中, Ames 法虽较敏感, 但毕竟还有约 10% 的假阴性结果, 致变/致癌剂丝裂霉素 C, 用过去的五株标准菌株检测不能获得阳性结果。因此近年 Ames 法又

得到改进, 特别是增加新菌种后, 使该法的敏感性又有所提高。新菌种 TA₉₇ 为移码回变型菌株, 对移码回变剂的回变作用较 TA₁₅₃₇ 移码回变型菌株敏感, 并且用任何标准菌株不能检出的 PR 毒素和芳香烷基三氮烯 (aryl-alkyl triazenes), 可使 TA₉₇ 发生回变, 因此目前已用 TA₉₇ 代替 TA₁₅₃₇。TA₉₄, TA₉₂ 对硝基类, DNA 交联剂等敏感, 因此丝裂霉素 C 能获得阳性反应。近年又发现新菌种 TA₁₀₂ 对氧化剂和多种致变/致癌剂敏感。因此 Ames 实验室建议应用 TA₉₇, TA₉₈, TA₁₀₀ 和 TA₁₀₂ 作为四株标准测试菌株来代替原来的五株菌株用于过筛试验中。

Ames 法除了致力于菌种的改造以外, 近年日本国立肿瘤研究所和东京大学医学科学研究所的学者们又发展了预培养法, 使过去在直接平板试验中不呈现阳性反应的二甲基亚硝胺, 曲利本兰等化学物质获得阳性结果, 同时可以使化学物质在更低的浓度呈现更高的诱变活性。此外, 在体外活化系统中, 采用了多种动物来源的肝匀浆, 除常规应用大鼠肝匀浆外, 还增加了地鼠和小鼠肝匀浆, 从而提高了体外活化系统, 也就是 Ames 试验的敏感性。

二、哺乳动物细胞染色体畸变试验^[5,6]

染色体畸变试验的方法很多, 有体内和体外法两大类。体外法多数是在培养的哺乳动物细胞中进行, 可采用已建立的细胞系 (株) 或原代细胞培养物。组织培养细胞来源繁多, 在实验系统中如何选择简单、敏感、快速、重复性好的细胞系 (株) 是极为关键的问题。Ishidate 自 1977 年起用 CHL (中国地鼠肺细胞) 测试系统作为一种非常有用的工具, 检测环境中的致变/致癌剂, 历年来报道他们实验室用该法检测的化学品种在 1977 年为 134 种, 1980 年 400 种, 1981 年 500 种; 1982 年 700 种。这些化学物质包括已知致癌剂、食品添加剂、药物、农药和其他广泛用于实验室或工业上的化学物质。实验是和 Ames 试验

平行进行的,基本上用 Ames 法获得阳性的化学物质,在 CHL 系统中都获得阳性反应。特别是在 Ames 测试系统中获得阴性的某些已知致变/致癌剂,如乌拉坦 (Urethane)、二乙基己烯雌酚 (Diethylstilbestral)、巴比妥 (Barbital)、异菸酸肼 (Isoniazid)、过氧化氢 (Hydrogen Peroxide) 和非那西丁 (Phenacetine) 等在 CHL 系统中恰获得阳性反应。而且非那西丁 (1974 年)、巴比妥 (1975 年)、过氧化氢 (1976 年) 等是 Ishidate 用 CHL 细胞法首先发现的新的变异原,以后这些变异原经长期致癌试验又证实为致癌原。大量过筛资料证明: 在体外哺乳动物细胞染色体畸变试验中, CHL 细胞染色体畸变法是敏感的,行之有效的办法,值得推广应用。

三、微核试验^[7,8]

微核试验被 Matter 和 Schmid 提出后 10 年,直到近年才受到毒理学家重视。由于微核法简便,现已广泛用作化学致变试验。但微核试验也有它的局限性,即敏感性较差。近年来又致力于提高敏感性的国际性协作研究工作,主要课题集中于二方面: 一是寻找既敏感又容易繁殖的种和品系; 另一是寻找敏感的靶器官。Matter 等在六种动物中进行了微核试验敏感性的比较,发现中国地鼠和小鼠较为敏感,但地鼠来源较为困难。Aeschbacher 建立致变敏感的 MS 小鼠,但繁殖较困难。Hayashi 进一步肯定了 MS 小鼠的敏感性,并使甲基亚硝基胍在 MS 小鼠中获阳性结果。我们最近以环磷酰胺为对象比较了 NIH、615、C₅₇BL、C₃H、LACA 和昆明杂种 6 种小鼠在微核试验中的敏感性,发现不同品系小鼠的敏感性是不同的,在实验的 6 种不同品系中, NIH 小鼠是一敏感品系。国内外尚未见类似报道。

在敏感靶器官的寻查中,大量的工作集中于肝脏,主要是对胎鼠肝和再生肝的研究。因为肝脏是机体重要的代谢和解毒器官,如能以肝脏代替相对封闭的骨髓进行微核试

验,那将大大提高微核试验的敏感性。但是目前方法学尚存在不少困难。

此外,在染色方法上也有新的尝试,如用吖啶橙进行荧光染色,特异性强,观察简便、准确,缺点是只能观察嗜多染红细胞,若需观察正成红细胞,仍需采用 Giemsa 染色。

四、显性致死和果蝇隐性伴性致死试验^[9,10]

显性致死和果蝇隐性伴性致死都是用于测定生殖细胞染色体损伤后引起子代死亡的方法。微核试验则是测定体细胞染色体损伤的方法,这是二者的不同点,因此在致变试验中各有其特殊的位置。显性致死突变是发生于生殖细胞的一种突变,但这种作用并不引起生殖细胞功能的紊乱,而它恰能杀死受孕的卵或发生中的胚胎。因此显性致死表明该种化学物质对受试动物生殖器官的影响可能是直接中毒作用的后果。

在果蝇的各种遗传试验中,以隐性伴性致死试验 (SLRL) 为优,黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 遗传试验是其中之一。果蝇属真核细胞生物,产卵量多,接触方法可以多种,能检测从分子水平到染色体水平等各种遗传损害。SLRL 用于测定发生于昆虫生殖细胞的二种突变: 点突变和小的缺失,该突变是一种前突变,用于过筛在 X-染色体大约 800 常位点突变的能力。目前法国,荷兰等国已将果蝇遗传试验列入筛选程序。

五、其他方法^[10]

自从 1973 年 Latt 设计了姐妹染色单体交换 (SCE) 法后,近年又得到了一定发展。观察 SCE 的基本方法是由 5-溴去氧尿嘧啶核苷取代细胞 DNA 合成中使用的尿嘧啶脱氧核苷,经过区别染色,不仅可以分清不同周期的丝裂细胞,还可以看到第二周期丝裂细胞染色单体间核苷酸节段上的互换结果。SCE 交换认为是 DNA 损伤和修复的指标。国内不少学者先后建立和报道了 SCE 法。SCE 法在我国应用十分广泛,就方法学本身

是满意的,但 SCE 法在致变试验中的地位值得商榷。国外有些学者认为 SCE 法的敏感性基本上和 Ames 法相同,就测试化合物的种类并不能互补,SCE 交换的机制尚未得到最后证实,此外影响单体交换的因素很多,因此到目前为止,还没有一个国家将 SCE 法列入该国的常规测试方法,用以评定化学物质对人的危害。

从短期致变试验发展方向看,近 10 年来是大量寻找、摸索和建立各种测试方法的过程。而今天,继续建立行之有效的新的测试手段虽然仍是一项任务,但当前各发达国家已先后制订测试程序和规程,并根据规范要求,保留几种确实经济、简单、敏感并行之有效的办法,在常规条件下过筛数以百计的化学物质,为监测环境中的有害化学物质提供资料

和依据,为控制环境污染和保障人群的健康作积极贡献。

参 考 文 献

- [1] Vogel et al., *Mutation Res.*, **64**(3), 155 (1979).
- [2] Ishidate, M., 日本香粧品科学会志, **6**(1), 31 (1982).
- [3] David, E. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**(10), 7445 (1982).
- [4] David, E. et al., *Mutation Res.*, **94**(2), 315 (1982).
- [5] Ishidate, M. and S. Odashimas, *ibid.*, **48**(2), 337 (1977).
- [6] Ishidate, M. et al., *GANN Monograph on Cancer Research*, **27**(1), 95 (1981).
- [7] Aeschbacher, H. et al., *Mutation Res.*, **59**(2), 301 (1979).
- [8] Hayashi, M. et al., *ibid.*, **105** (2), 253 (1982).
- [9] 大森義仁, OECD 化学物质毒性试验指针, 425 页, 化学工業日報社, 1981 年。
- [10] 田島弥太郎等, 環境変異実験法, 146 页, 講談社, 1980。

微生物对甲基汞的降解作用

李 志 超

(白求恩医科大学)

本世纪五十年代,日本水俣湾地区发生甲基汞中毒后,许多学者十分重视水体中无机汞甲基化的研究。六十年代末, Jensen 和 Jernlov 首先发现淡水水系沉积物中的无机汞可转化成甲基汞^[1]。经过进一步研究证实某些微生物具有使其周围存在的汞化合物甲基化的能力^[2]。在此期间报道了很多无机汞甲基化的资料^[3,4],但是有关微生物对甲基汞降解作用的报道却不多见。七十年代初, Landner 发现微生物能把剧毒的甲基汞转化成毒性较低的形态^[2],其后有些学者相继发表了微生物在体内、体外环境中降解甲基汞的文献资料,本文作扼要介绍。

体 外 实 验 研 究

Spangler^[5] 首先采用体外培养法,在密闭的含有 50 毫升培养基和 25 微克溴化甲基汞的容量瓶内接种四株假单孢菌,经过五天的培养,容量瓶内的甲基汞减少了 50%,在容量瓶上部空气中有甲烷和汞蒸气生成。在相同的培养条件下,当培养基中接种上述四株假单孢菌,而未加入甲基汞时,容量瓶内没有甲烷生成;当培养基中加入甲基汞,而未接种四株假单孢菌时,容量瓶内没有汞蒸气生成。这一结果表明假单孢菌具有降解甲基汞的能力。作者认为这种细菌在含汞的沉积物中亦