

胚胎毒性与致畸性体外测试的方法

王爱平 编写 王治乔 审校

军事医学科学院毒物研究所 北京 100850

开展生殖毒性和致畸性试验的最终目的是识别能引起配子、胚胎、胎儿及新生儿结构和/或功能异常的化学物质。设计和选择适宜的体外测试方法对药物、食品添加剂、化妆品及其它环境化合物(例如杀虫剂)进行检测,是达此目的的关键环节之一。据估计,人类先天性缺陷中有10%是由环境因素引起,目前世界上已投放市场的未经检测的药物、工业产品或环境污染物达5~7万种,并且每年有700~1000种新产品问世⁽¹⁾。寻求准确有效的试验方法,筛选与评价这些物质对孕体潜在的危害性,成为众所关心的问题。

1. 体外试验的优缺点

体外试验具有经济、简便、实验周期短、可以控制实验条件、剂量反应关系容易观测、因果关系明确、试验结果可重复等优点。即可用于化合物体内试验前的预筛,发现可能有毒作用时进一步进行体内试验。也可与体内试验结果结合,提供评价化合物对某一具体发育过程作用的细节,以阐明根本的发病机理和作用机制。体外试验也有一定局限性,如除种属差异外又增加了体外体内差异且实验结果与人体观察结果不完全一致;实验模型有时不能完全反映人体真实情况,存在假阳性或假阴性结果等。体外试验发现下列情况之一时(按其重要性排列),应考虑进一步做体内致畸胎试验:

1. 生物学资料 疑有人类致畸性时;在家畜或野生动物中观察到有致畸作用证据时;短期致畸试验显示出潜在的发育危害性,成体毒剂量/胚胎——胎儿毒剂量的比率较大时;已证实低剂量对成体有毒性时。

2. 其它信息 受危育龄人数较多时;有体内累积的证据时;有随机接触环境中存留的物质的可能时。

上述信息可作为化合物需进行致畸试验的依据。然而,这仅适用于早已应用或已存在于环境中的物质。对新生产的化学物质,应建立适宜的毒理学测试程序,以便筛查它们的(发生)发育毒性。

2. 体外测试方法的种类

按实验对象的不同可分为:

1. 无脊椎动物测试系统 用不同的无脊椎动物已建立了许多不同的试验模型,但没有一种方法能单独检测出所有的致畸剂,所有方法都各有其优缺点(表1)

表1 检测致畸性的无脊椎动物测试系统⁽²⁾

系统	发育阶段	观察终点
水螅	成体和胚胎	聚集、再生、分离
果蝇	全过程	肌发生,神经附着
涡虫	成体再生	神经发生,眼发育
海胆	卵裂	细胞分裂和接触
网柱菌属	全过程	聚集,分化

腔肠动物门⁽³⁾、棘皮动物门⁽⁴⁾或昆虫⁽⁵⁾的试验系统已用于对发育过程有害物质的筛查。水螅(*Hydra attenuata*)已被用于发育毒性试验,这种淡水小腔肠动物被分离成单细胞后,经过一个“胚胎”阶段,可再生为成体水螅。应用这个系统,能确定引起人造胚胎及成体水螅不良反应的接触水平,根据成体与发育毒性危害的比率能评估和推断对哺乳类的毒性⁽⁶⁾。

2. 鱼类测试系统 有些研究者用不同的鱼进行筛查试验,例如:青鳉(*Oryzias*

latipes)⁽⁷⁾、鲮鱼(*Fundulus heteroclitus*)⁽⁸⁾、虹鳟(*Salmo gairdneri*)⁽⁹⁾、鲤鱼(*Cyprinus carpio*)⁽¹⁰⁾、蓑鮠(*Bracydanio rerio*)⁽¹¹⁾等。这些实验的主要目的不是对可疑的哺乳类致畸剂进行预筛,而是观察某些化合物对海生生物生殖的影响。

3. 两栖类测试系统 有研究表明,蛙(*Rana temporaria*)和蟾蜍(*Bufo malinostictus*)的幼体对真菌代谢产物很敏感⁽¹²⁾。也有人研究了甲基汞对豺纹蛙(*Rana pipiens*)的致畸性及胚胎致死作用⁽¹³⁾。然而,用两栖类开展的筛查试验绝大多数是用滑爪蟾(*Xenopus laevis*)进行的⁽¹⁴⁾。

4. 爬行类测试系统

尽管已有人用蜥蜴(*Calotes versicolor*)胚胎检测台盼蓝的致畸作用⁽¹⁵⁾,但爬行动物并未广泛用于或被推荐做为致畸原筛查系统。

5. 鸟类测试系统

大量文献证实卵内鸟胚胎对化学物有较高的敏感性⁽¹⁶⁾,因此用鸟胚胎已进行了大量致畸学研究,其中用鸡胚做实验材料的占很大部分。也有人用绿头鸭(*Anas platyrhynchos*)进行研究⁽¹⁷⁾。Karnofsky⁽¹⁸⁾和Jelinek⁽¹⁹⁾先后建立了详细的鸡胚胎毒性实验程序,可选择性地用于发育过程中各种物质的检测。

6. 微生物测试系统

目前,细菌和其它一些非细胞生物已被用于检测化学物的致突变性,但没用于体外致畸性试验研究。因为致畸性涉及发育过程中的多种机理,而微生物只适于研究单一的作用机理⁽²⁾。

按观察层次的不同,可将体外试验方法分为:

1. 细胞培养 用分离细胞检测化合物潜在的胚胎毒性已有许多方法。测试系统主要有两种,一是建立细胞系,其优点是不需用妊娠动物,缺点是观察终点少,应用与

受到一定限制。利用人胚间质细胞系统可检测细胞增殖,测定细胞间代谢协同作用,评估细胞通讯状况⁽²⁰⁾。也有人用小鼠神经母细胞瘤细胞检测细胞分化⁽²¹⁾。另一种是原代细胞培养,在动物(主要是大鼠和小鼠)妊娠晚期取出胚胎,切下肢芽或脑等器官,分离成单个细胞,原代培养成高细胞密度的小岛,用作用特异性分化标记定量测定培养细胞的分化。Flint⁽²²⁾建立的胚胎神经上皮细胞培养与肢芽细胞系统相结合,现被公认为一种较好的体外致畸性试验方法。

2. 组织培养 利用组织培养可进行致畸原筛查及致畸机理研究(见表2),然而,观察到的作用机理是否与动物接触致畸剂后的实际情况相符,还有待进一步研究⁽²⁾。

表2 检测化合物胚胎毒性的组织培养方法

体外系统	发育阶段	观察终点
神经嵴(胚)	器官发生期	移行,黑色素形成,酶活性
鸡肢芽间质	器官发生期	生长和软骨形成
肺微块	器官发生期	模拟细胞识别和粘着
胚心	器官发生期	组织发生和收缩
骨骼肌	器官发生期	肌发生,细胞融合,组织发生
神经母细胞瘤	胎儿发生期	分化与去分化
畸胎瘤	器官发生期	组织发生

3. 器官培养 器官培养适用于研究各种发育机理的相互作用对器官发生的影响(表3)。器官培养的应用为筛查程序增加了

表3 用于致畸性研究的器官培养方法

体外系统	发育阶段	观察终点
肢芽	器官发生期晚期	结构、软骨肌肉形成
齿芽	器官发生期	细胞死亡,上皮融合
晶状体	器官发生期	组织发生
生殖器官	器官发生期晚期	组织发生,生殖腺发育,雌性腺
肾	器官发生期	晚期后肾组织发生
甲状腺	器官发生期晚期	组织发生和功能发育
胰腺	器官发生期	组织发生,生化发育

一种非常重要的手段。移植的器官原基通常

由异源组织成分组成,其器官发生各阶段与体内发育非常相似,通过各种可分析鉴定的终点能揭示许多发育现象⁽²³⁾。与细胞培养相比,器官培养的优点是,它不仅能研究发育过程的单一机制,而且还能研究器官发育过程中各种机制间复杂的相互作用。其主要缺点是工作量大,需用妊娠动物,尽管可在培养基中加入代谢活化系统,但被测物不能代谢或代谢不完全。该系统进一步发展的主要障碍是很难对异常的形态学发育进行定量分析,实验结果外推判断畸形时仍存在一些问題。

4. 全胚培养 (Whole embryo culture, WEC)

WEC按选用实验对象不同,可分为哺乳类WEC、其它脊椎类WEC、非脊椎类WEC。后两者已有较详细的综述⁽²⁴⁾。这里主要介绍哺乳类WEC。

4.1 着床前WEC(pre-implantation WEC) 主要用小鼠,也有人用兔和大鼠,人的着床前WEC已获成功。受精卵发育到2~3个细胞阶段时从输卵管冲洗出来,在体外培养至胚泡阶段,此时正处于细胞分裂分化阶段,对致畸作用不敏感,有一定代偿作用。致畸剂或胚胎毒物质对着床前胚胎的影响主要取决于损伤或杀死细胞的数量,有害因素达一定水平时引起胚胎死亡。观察终点包括致死性、形态变化、生长迟缓、姊妹染色单体互换和生化改变⁽²⁴⁾。该系统多用于性腺毒性物质的筛查,尚未列入常规致畸研究方法。

4.2 着床后WEC(post-implantation WEC) 该方法可连续观察同一胚胎的发育过程,尤其是器官发生期的发育过程。同一窝的胚胎可分成对照组和处理组,在提供适宜的培养基(通常是大鼠全血清)和合适的混合气体、控制良好的试验条件下,啮齿类胚胎在整个器官发生期都能正常生长发育,与在子宫内发育非常相似。在加或不加代谢

活化系统的情况下,在培养基中以一定方式加入被测物质,用定量的客观标准⁽²⁵⁾观察胚胎生长发育情况。也有人用给药后动物或病人的血清做培养基,筛查有害因子⁽²⁶⁾。用着床后WEC已检测了100多种化合物⁽²⁷⁾,从已获得的结果可以看出其具有良好的发展前景。

综上所述,各种体外试验方法的建立,为筛查环境致畸物及致畸机理的研究提供了重要手段,虽然目前大多数方法还未标准化,存在着不能把母体——胎盘——胎儿做为一个统一体观察等缺陷,但是根据化合物作用特点选用适宜的体外测试系统作初筛,再与体内试验方法相结合,将可更全面了解化合物对发育中孕体的作用范围,阐明发病机理和作用机制,进而对人可能遭受的危害做出更准确的判断。

参考文献

1. Wilson JG, Environment and birth defects. Academic Press, New York, 1973.
2. Peters PWJ and Piersma A H, *In vitro* embryotoxicity and teratogenicity studies. *Toxic in Vitro* 1990; 4(4~5): 570
3. Johnson EM, A subvertebrate system for rapid determination of potential teratogenic hazards. *J Environ Path Toxicol*. 1980; 4: 153
4. Hagstrom BE and Lonning S, The sea urchin eggs as a testing object in toxicology. *Acta Pharmac Tox* 1973; 32, Suppl. 1
5. Gilbert EF, et al. Teratogenic effects of 5-bromo-deoxy-uridine on the external morphology of *Drosophila melanogaster*. *Teratology* 1973; 7: 206
6. Johnson EM, A Priorization and biological decision tree for developmental toxicity safety valuations. *Am Coll Toxicol* 1984; 3: 141
7. Dial NA, Methylmercury: some effects on embryogenesis in the Japanese emedaka *Oryzias latipes*. *Teratology* 1978; 17: 83
8. Weis P and Weis JS, Methylmercury

- teratogenesis in the Killifish, *Fundulus heteroclitus*. *Teratology* 1977, 16: 317
9. Guiney PC, et al. Effects of egg and sperm maturation and spawning on the distribution and elimination of a polychlorinated biphenyl in Rainbow Trout (*Salmo gair- dneri*). *Toxic Appl Pharmac* 1979, 48: 261
 10. Hildebrand SG and Cushman RM, Of gallium and beryllium to developing oarps eggs (*Cyprinus Carpio*) utilizing copper as a reference. *Toxicology Lett* 1978, 2: 91
 11. Thomas RJ, The toxicology and teratology effects of tetrahydrocannabinol in the Zebrafish embryo. *Toxic Appl Pharmac* 1975, 32: 184
 12. Detroy RW, et al. Aflatoxin and related compounds, In *Microbial Toxins, Vol. VI*. Edited by Crigler et al. pp. 3-178. Academic Press, New York.
 13. Dial NA, Methylmercury: teratogenic and lethal effects in frog embryos. *Teratology* 1976, 13: 327
 14. Marchal-Segault D and Ramade F, The effects of lindane, an insectide, on hatching and postembryonic development of *Xenopus laevis* (Daudin) anuran amphibian. *Envir Res* 1981, 24: 250
 15. Mathur JK and Soel G, Effects of trypan blue on the development of the garden lizard, *Calotes versicolor*. *Teratology* 1976, 14: 99
 16. Hoffman DJ and Graf ML, Embryotoxic effects of benzo-(a)pyrene, chrysene and 1, 2-dimethylbenz(a)anthracene in petroleum hydrocarbon mixtures in mallard ducks. *J Toxicol Envir Hlth* 1981, 7: 775
 17. Hoffman DJ and Moore JM, Teratogenic effects of external egg applications of methylmercury in the mallard, *Anas platyrhynchos*. *Teratology* 1979, 20: 453
 18. Karnofsky DA, The use of developing chick embryo in pharmacological research. *Stanford Med Bull* 1955, 13: 247
 19. Jelinek R, The chick embryotoxicity screening test (CHEST). In *Methods in Prenatal Toxicity*. Edited by D. Neubert, H. J. Merker and T. E. Kwasigroch, George Thieme, Stuttgart, 1977.
 20. Welsch F and Stedman D B, Inhibition of metabolic cooperation between chinese hamster ovary V-29 cells by structurally diverse teratogens. *Teratogen Carcinogen Mutagen* 1984, 4: 285
 21. Mummery CL, et al. A short-term screening test for teratogens using differentiating neuroblastoma cells *in vitro*. *Teratology* 1984, 29: 271
 22. Flint OP, A micromass culture method for rat embryonic neural cells. *J Cell Sci* 1983, 61: 247
 23. Kochhar DM and Hickey TH, Goals and potential value of alternative teratogenicity tests. *Concepts Toxicol* 1985, 3: 6
 24. 廖明阳, 全胚胎培养在致畸试验中的应用, 解放军医学情报, 1990, 4(4): 181
 25. Brown NA and Fabro s, Quantitation of rat embryonic development *in vitro*: a morphological scoring system. *Teratology* 1981, 24: 65
 26. Lindhout D, et al. Effects of anticonvulsant combination therapy on *in vitro* embryogenesis. Thesis Lindhout 1985
 27. Faustman EM, Short-term tests for teratogens. *Mut Res* 1983, 205: 355

(上接第13页)

- Appl Nutr* 1984, 36: 125
10. Goldin BR, et al. Effect of Lactobacillus dietary supplements on 1, 2-

dimethylhydrazine dichloride-induced intestinal carcinogenesis. *J Nat Cancer Inst* 1980, 64: 263