

第十二章 体外试验与生物新技术在毒理学中的应用

第一节 体外试验

毒性试验的目的在于获取一定的数据，为社会需要的外源化学物的安全使用做出判断。过去利用整体实验动物模型或称体内试验(in vivo test)模型所提供的资料，判断外源化学物及其制品和混合物等对人类健康是否具有损害作用。体外试验模型(in vitro test)在上述过程中也起着重要的作用，尤其是机理研究方面。但是，在毒理学研究中整体试验研究的观点仍占主导地位。目前，此种观点已发生变化，因为：①全世界每年约有千种以上的新化合物作为商品进入人类的环境。而且在现有的化合物中，还有相当数量没有进行必要的毒理学评价。在此种情况下，利用经典的整体动物试验取得完整的毒理学资料极为困难。解决此种问题的重要方向是体外试验。②现有的整体动物毒性试验方法需消耗大量的时间和昂贵的经费，而体外试验则可节省时间和经费。③动物保护主义运动的兴起，要求尽量减少动物的使用，而且应当尽量减少痛苦地处理动物。④更重要的是由于生物技术的巨大进步，不仅表现在细胞组织及器官培养领域，而且在生物分子技术方面，也为毒性试验和研究提供了新的方法和工具。所以体外试验在毒理学研究中所占的地位日趋重要，甚至有占主导地位的趋势。但也需指出，体外试验的发展，并不排斥体内试验本身的重要性，两者必须相互补充、相互验证才能为毒理学研究提供坚实的科学基础。

一、概述

(一) 分类

毒性试验的目的是提供一些适当的资料，以便确定有关化学物的毒理学性质。在有些情况下，是要决定一种化学物在所预期的条件下使用是否安全，如新药物开发即需要这一评价。在有些情况下，例如新工业品或日用化学品的开发，必须决定一种新化学物的接触安全限量。了解体外毒性试验在上述毒理学决策过程中有何意义，对于评价体外毒性试验在毒理学中的地位极有帮助。可依据体外试验在决策过程中所起的作用将其分为3类：①筛选试验。它仅提供决策过程的最初的资料，还需要进行更权威的试验，无论是整体还是体外试验。②附加试验。它可为协作部门或法律部门的最终决策过程提供有用的资料，如机理的研究，但仅有它是不够充分的。③替代试验。它是在大量实验的基础上，使体外毒性试验能替代整体动物试验，以提供更多的信息。

(二) 基本原理

体外试验的基本原理是所观察到的毒理学效应均是毒物和 / 或反应活性代谢产物在敏感性细胞上或敏感细胞内某一分子靶部位作用的结果。如将敏感细胞或某分子靶部位例如酶，在体外条件下，维持其正常的生理功能，并观察外源化学物对其的影响，即将毒理学中毒物中毒的启动阶段，在体外条件下，观察其对外源化合物的反应和外源化学物对它的作用。基于上述原理，体外试验模型取材范围很宽，可取哺乳动物的离体脏器灌流、脏器切片温育、细胞培养、亚细胞器组份以及提纯的某些酶分子或 DNA 分子等等。

(三) 体外试验的优缺点

体外毒性试验的优点可归纳在表 12—1。

表 12-1 体外毒性试验系统的优点

能控制环境因素
可排除相互作用的系统如免疫系统、神经内分泌系统的影响
每一剂量水平可利用大量的生物样品，如细胞，细胞器等
试验间的误差较少

可同时和 / 或反复多次取样
可做成复杂的互相作用的试验系统, 如复合细胞培养等
较为快速和经济
需要较小量的受试化合物
产生较小量的有毒废物
可以利用人体细胞
减少整体动物的使用

其中特别值得一提的优点是体外试验的简便和易于利用人体细胞。体外毒性试验结果可迅速得出, 将减少了解新化学物毒理学资料所需的时间, 最终可以缩短从新化学物的合成到产品进入市场的时间过程。此外, 对鉴定毒理学资料有问题的新化学物, 可及时终止开发, 减少由资源到产品的投入。在毒理学整体试验中禁止直接进行人体试验。但毒理学试验的目的是关心人类健康, 目前主要是将动物试验结果外推至人类, 物种间差异为其不确定因素之一。在体外试验中, 利用人体细胞组织进行试验, 可较好地解决物种差异的问题。

体外毒性试验系统的利用在目前尚有不足之处: ①体外到体内外推的问题。体外试验是依据毒性作用的始发阶段及继续发生的分子与细胞反应, 其与整体系统有差异, 如何将产生体外毒性的体外浓度与相应体内剂量联系的问题是最终未解决的难题。它需要更好的工具——预测性毒物代谢动力学来解决, 其关键在于发展有生理学基础的毒物代谢动力学模型。另一方面, 体外毒性试验中缺乏毒理学反应的调控因素, 如细胞与组织的修复过程和免疫系统的不同类型细胞间的相互影响等。假如有了更全面的毒理学过程的基础知识, 可设计更符合整体动物模型的体外系统。但现阶段毒理学作为一个学科的发展尚缺少许多重要的资料。②体外毒性试验难以预测慢性毒性。因为, 慢性毒性病理过程的机理所知甚少, 缺乏发展体外试验的理论依据, 再者, 某些体外系统仍难以达到长期维持生理状态的要求。

二、体外试验系统

(一) 脏器灌流

1. 肝脏灌流 是毒理学中研究外源化合物对肝脏损伤及代谢的常见方法。在灌流液中加入外源化学物, 此外要维持灌流液的pH值、氧含量, 还要控制适宜的灌流液流速。一般是以下腔静脉和门静脉为插管灌流通路, 为此应结扎肝动脉、上腔静脉, 在恒温条件下灌流。有报道用肝灌流方法研究四氯化碳及其氢取代衍生物三氯甲烷与二氯甲烷对肝脏毒性, 结果发现随着灌流时间延长(在 4h之内), 灌流液的上清液中 K^+ 、谷丙转氨酶(SCPT)、山梨醇脱氢酶(SDH)、谷氨酸脱氢酶(GDH)增加, 说明三种化合物对肝细胞均有损伤, 而以四氯化碳为最, 且依氯原子被氢取代肝毒减低。需指出肝灌流时间不能过久, 以 4h之内为宜, 否则肝细胞的功能与生存不能维持。

2. 肠灌流 利用某一部分小肠体外灌流可以研究一些化合物的吸收及动力学过程。如用大鼠, 则在麻醉下切腹分离一段小肠, 在保持原有血液循环体系下, 将肠两端插管, 清洗净肠中内容物, 在恒温环境中灌入灌流液。例如有人研究锌的吸收及其影响因素, 以大鼠回肠段为标本, 证实锌吸收呈二室模型(肠腔为 I 室、肠粘膜为 II 室), 苯丙氨酸能增加肠腔与肠粘膜之间锌的交换, 且加速向血流的清除过程。

3. 膈肌-膈神经标本 取完整的大鼠膈肌-膈神经置于恒温灌流液中, 在几小时之内可维持基本正常的神经肌肉传导。这种标本可用在研究神经毒物对神经传导功能的损伤及强度。

(二) 脏器切片

肝脏、肾脏、脑部及心均可以制备切片。例如, 脑片和心肌条等是将组织片置于恒温的孵育液中进行有关试验研究, 但需注意切片中的细胞需保持完好的细胞基质和细胞之间的交流。切片厚度一般在 $250\ \mu\text{m}$ 。不同研究期间有别, 如肝切片研究 CytP-450 不应超过 8h, 脑切片一般在 6h 左右。此系统的优点是保持了细胞之间的结构, 其操作也比脏器灌流容易。

不足之处是切片内的细胞易于缺氧，且受试物也不易均匀到达细胞内。

(三) 原代细胞培养

1. 肝细胞原代培养 肝细胞尚未建成传代的细胞株系，多用原代培养。肝细胞原代培养期间细胞不分裂、不增殖，但发现基因转录是存在的(培养初期 24h 在 1%或以上)。细胞原代培养维持生存期 1~2 周，但是 CytP-450 却在 24~28h 活性减少 50%左右。据报道人肝细胞中 CytP-450 活性稳定性比大鼠强。

利用原代培养的肝细胞可以进行多种毒理学研究。如研究化学物的肝脏毒性，一般认为，用原代肝细胞培养筛选与鉴定是否化学物具有肝脏毒性较为可靠，与体内试验相符合。有报道以肝细胞损伤后某些酶释放为指征，研究 30 个化学物，结果除少数化学物在肝细胞培养中表现毒性比体内试验低之外，多数化学物内外毒性符合一致。在体外试验表现毒性较低的化学物有环己酰胺(cycloheximide)、溴苯(bromobenzene)和长春新碱(vincristine)等。

2. 巨噬细胞 豚鼠或大鼠都可以肺灌洗方法获取肺巨噬细胞，小鼠可用腹腔灌洗获得腹腔巨噬细胞，甚至人也可通过肺灌洗得到。巨噬细胞可以用于多种体外试验，例如利用巨噬细胞的免疫功能检测外源化学物的免疫毒性，又如利用巨噬细胞检测以肺脏为毒理学终点的外源化学物的中毒毒性和机理。关于后者，有人利用豚鼠肺巨噬细胞原代培养纯化后，研究二氧化硅(silica, SiO₂)致矽肺的机理。

3. 淋巴细胞 多用小动脉脾脏分离淋巴细胞或进一步分离 T、B 淋巴细胞进行免疫毒理研究。例如研究镉的免疫毒性，证明镉可以抑制淋巴细胞转化和抑制白细胞介素-2 的产生，且在一定条件下使淋巴细胞内游离钙浓度增加及钙调素(CaM)活性降低，此为镉的免疫毒性机理研究提供了线索。

4. 脑细胞 分离的新鲜脑细胞有助于研究外源化学物对神经系统损伤的评价与探讨其机理如用小鼠大脑皮质分离、温育后，研究二价阳离子钙、镁、锌、镉等对皮层神经细胞的损伤，发现这些离子随着浓度的增加，脑神经细胞的电泳迁移率逐渐减慢。

随着脑细胞技术的发展，还可在温育体系中存在外源化学物情况下，用微电极插入脑细胞，通过电信号的变化，更深入地研究外源化学物对神经细胞的功能损伤。

5. 心肌细胞 心肌细胞用于毒理学研究的报道目前还较少。用新生 1~2 日龄大鼠心室肌分离心肌细胞，原代培养 4 天后，将微电极(直径<0.5um)插入细胞内，研究镉对心机的影响。经记录、分析各心肌细胞动作电位参数，结果镉在 5~20 μmol / L 浓度下，可使心肌细胞动作电位及最大除极速率显著降低，表明镉对心肌有直接的毒性效应。

此外，将分离的心肌细胞于培养的 24~48h 期间，利用膜片钳的连细胞电压钳法，描记心肌细胞上的 B 型、L 型及 T 型 3 种 Ca²⁺通道的单通道活动。当在培养液中加入 10 μmol / L 氯化镉之后，B 型通道开放时间缩短 1 / 3、关闭时间延长 45.1%、通道开放概率下降 55%，L 型通道开放时间缩短 40.7%、关闭时间延长 23.1%、通道开放概率下降 50%，而对 T 型通道无影响。进一步证实镉对心肌有毒性效应。

(四) 细胞培养

有些脏器细胞建立了传代培养技术，建成有稳定遗传特征的细胞株系。有的利用细胞培养技术建立了特殊的试验方法。

1. 肾细胞 由于肾小管，尤其是肾近曲管是肾脏重要的功能单位，目前已经建立了几种肾近曲管细胞株系用于毒理学研究。例如 1926 年 Hull 等人选育传代培养的 LLC-PK1 细胞是来源于 Hampshire 猪。据报道此株系细胞的各种生物学特征已进行了相当深入的研究(包括激素应答反应、物质转运特征、细胞的代谢功能和标志等)。此后又建立了从鼯(opossum)获得的 OK 株系、从兔获得的 RC-SVI 株系。

近年国内利用 300 次传代培养的 LLC-PK1 细胞系对铅的肾毒进行了研究，包括铅对细胞的损伤、对细胞膜脂流动性的影响、对细胞膜相变温度的影响、脂质过氧化效应、胞内钙

浓度变化及形态学改变等, 这对铅的肾脏毒性机理提供了依据。

2. 胚胎细胞 利用胚胎细胞体外培养, 筛选和研究外源化学物的毒性效应。例如我国用人胚肺纤维母细胞传代培养人胚肺二倍体细胞, 已建立了以 2BS 为代表的株系。此株系在用于筛选致癌物方面做了一些工作。如人胚肺二倍体细胞在 $10^{-7} \sim 10^{-8} \text{ mol/L}$ 苯并(a)芘长达 28~38 代传代培养下, 电镜镜检发现细胞核外形不规则、核膜深陷、出现细桥(tiny bridge)伴分叶核形成、核内胞浆包涵体、核仁巨大或多核等细胞癌变特征。

此外, 人胚主动脉平滑肌细胞也可作为标本传代培养研究金属的毒理。

近十年来, 毒理学相继引入啮齿类动物的着床前全胚胎培养技术(pre-implantation whole embryo culture)、着床后全胚胎培养技术(post-implantation whole embryo culture), 以及器官培养如膀胱培养、胚胎枝芽体外培养等筛选致畸化学物均取得一些成果。

(五) 组织匀浆

取脏器除血污制备组织匀浆, 是用物理学方法使细胞壁破坏, 细胞组成成分与细胞间质混合形成混悬液。利用匀浆为标本主要是研究外源化学物对细胞酶系统的毒理作用。最常使用的是脑匀浆、肝匀浆, 虽然肺、肾、肠等脏器也可制备匀浆, 但是因纤维结缔组织或肌细胞不易破碎影响匀浆的质量。

文献中有机磷化合物对神经系统 Ache 抑制的强度及特征, 大量工作是通过以脑匀浆为标本, 主要是以哺乳动物、啮齿类和昆虫的脑完成的。不少外源化学物的代谢和以肝脏为靶器官的外源化学物的毒性效应特征与机理是通过肝匀浆进行的。现虽然不少工作已为其它技术所取代, 但是应用匀浆作为过筛与初步研究还是有用的, 主要因其制备方法简单、制备周期很短, 且不需复杂的设备。

(六) 亚细胞组分

将细胞中各亚细胞组分分离和纯化, 对于深入研究外源化学物的靶位点、探讨化学物毒性效应的机理均十分重要。它较组织匀浆优越, 排除了匀浆中其它因素的影响。现代毒理学中使用最多的亚细胞组分是细胞膜、微粒体及线粒体。

1. 细胞膜 人与动物红细胞分离后低渗溶血, 高速低温离心可制得红细胞膜(或称血影, ghost)。血影为常用的细胞膜标本。此外肺巨噬细胞、肺细胞、突触小体等均可制备膜标本(先将细胞匀浆破膜, 低温差速离心、梯度离心制备)。使用细胞膜可以进行很多的毒理试验, 尤其是在探讨化学物中毒机理方面。

以红细胞膜为例, 用人工细胞为标本与 0.1 mmol/L 铅作用仅 5min, 红细胞膜远紫外光谱就出现改变, 表明膜蛋白的构象发生了变化。

神经末梢断裂脱落的突触体(synaptosome)具有类似完整细胞的功能, 除可利用突触体作为标本外, 还可进一步制备突触体膜(synaptosome membrane)。实验表明对硫磷在 $5 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 水平即可抑制突触体的摄钙功能, 并引起突触体膜脂流动性下降。

近年来为纯化实验条件, 以利于从分子水平研究外源化学物的毒效应机理, 已将人工膜引入毒理学研究。所谓人工膜, 即是以正常细胞膜的膜脂组分, 人工合成后用之在一定介质中形成人工膜。

2. 微粒体(microsome) 尤其是肝细胞制备的微粒体常作为毒理学研究的标本, 这是由于肝脏代谢酶系主要存在于肝细胞内质网, 即肝细胞的亚细胞组分分离后的微粒体中。

有报道 TNT 在无氧而加入 NADPH 环境下与微粒体温育, 用 ESR 波谱仪检测出硝基阴离子自由基(Ar-NO_2^-); 而在有氧环境中能迅速与分子氧反应生成硝基化合物与超氧阴离子(O_2^-)。

3. 线粒体(mitochondria) 它是细胞中进行呼吸作用的主要场所。据报道溴氰菊酯(decamethin)在体外试验中, 对线粒体呼吸功能有明显抑制作用。又据报道镉对大鼠肝细胞线粒体 Ca^{2+} -ATPase 有抑制作用, 且使线粒体膜脂流动性下降。

(七) 酶

外源化学物对机体的毒性效应，往往表现某种或某些酶的活性变化上，即可以利用标志酶活性的变化反映化学物所损伤的靶器官。

在体外毒理学中则主要是定量研究外源化学物对靶酶作用的特征、性质和机理。此类研究的基础工作是纯化酶，如获得纯化酶，可在体外精确地控制各种因素，对纯化酶作用的特征、性质和机理进行研究，如细胞色素 P-450 重组系统。由于酶的提纯技术复杂，故而在一般毒理学研究中多用脏器匀浆和亚细胞组份作为酶源。虽然这些酶源标本含有多酶成分，但是只要测定酶活性的条件适宜，完全可以得到良好的结果。

有报道金属离子 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Pb^{2+} 对一些钙调素依赖酶就具有双向效应，即在低浓度时可以激活这些酶，而高浓度时又可抑制酶的活性。

文献中早已证明有机磷化合物的主要靶酶是 AChE。经酶动力学分析，有机磷化合物与 AChE 底物 ACh 呈竞争性；即有机磷化合物对 AChE 为竞争性的不可逆性抑制物。但是不同结构的有机磷化合物对 AChE 的亲合力可有很大差别。

第二节 哺乳动物细胞制备和培养

一、概述

到目前为止，分离的细胞是毒理学中使用最广泛和最深入的体外实验系统。体外系统分离的细胞包括悬浮液中的新鲜游离细胞、原代培养细胞、细胞株、细胞系及复合培养的细胞。在毒理学中以哺乳动物细胞作为实验动物的替代系统日渐广泛，造成这种趋势的原因有三：一是来自公众要求减少实验中使用动物数量的压力；二是非整体动物实验可显著地减少常规整体动物实验所需的高额费用；三是人们越来越不满意实验动物与人体结果之间相关性的缺乏。利用细胞，可更严格控制实验条件，有效地研究毒性作用的生化机理。表 12-2 详细列出细胞在毒理学中应用的优缺点。

表 12-2 体外系统——细胞在毒理学中应用的优、缺点

优点	改善效率，减少费用 使用实验动物较少 仅需少量的受试物 较大程度控制细胞族的性状 直接控制胞外基质、化学物浓度及接触时间 排除可能的混淆因素如激素；神经系统或免疫系统的影响 可从同一实验体系重复取样
缺点	缺少整个器官的形态学观察 选择性丧失整体器官特异性功能，如毒性代谢酶的丧失 缺乏可能的调节影响因素如激素，神经系统或免疫系统，一般为静态系统，将导致营养物质的逐渐减少和代谢终产物的逐渐累积。 多为短期试验，对亚慢性或慢性毒性的评估价值不大

表 12-3 毒理学研究中常用细胞

各种物种的成纤维细胞
淋巴母细胞
腹水瘤细胞
淋巴细胞
角质细胞
肝细胞
肝癌细胞

肾脏髓质和皮质细胞
肺的各种类型细胞
培养背根胶质细胞
培养的睾丸细胞
膀胱细胞
心脏细胞
脊髓微血管细胞
脂肪细胞

由于哺乳细胞作为体外实验系统的优越性,在毒理学中,已有许多不同类型细胞应用于毒理学实验。表 12-3 为毒理学实验中常用的细胞类型,其中有些细胞可来源于人体组织。

利用哺乳动物细胞进行毒理学体外实验有两种方法:一是建立正在迅速生长的细胞株,用以观察受试物对整体细胞的一般毒作用和正在分裂组织的毒作用;二是利用已高度分化的细胞,无论是原代培养或是特定的细胞株,研究受试物对已分化成熟的细胞或其功能的特殊毒作用;

二、基本技术

(一) 仪器与设备

1. 培养箱 一般来说,在 5%CO₂, 95%空气和 99%的相对湿度的条件下,许多细胞可存活。故细胞培养的关键设备是CO₂培养箱。其基本要求:①精确地温度控制调节,一般在±0.5℃,箱内温度的均衡可依赖风扇;②CO₂浓度调节,利用CO₂传感器监测箱内CO₂浓度;使箱内大气为 5%CO₂, 95%空气;③箱内湿度,可用水盘来维持。有的细胞培养可以不控制CO₂分压。例如,原代肝细胞培养,可用LeibovitzL-5 介质,不需CO₂,而要求敞开培养瓶,以供给较高的O₂分压。

2. 冰箱和冷柜 冰箱(4℃)用于存放培养介质,冷柜(-20℃)则存放酶,(如胰蛋白酶)和某些培养介质如谷氨酸和血清。

3. 显微镜 最基本的配置是一台简单的倒置显微镜,用作日常观察培养中的细胞,以便依据细胞生长状况,进行调整或对污染进行补救或处理。进行进一步的研究,则需要更高级的显微镜,例如,相差显微镜或荧光显微镜,并附有照相装置或摄影装置。

4. 超净工作台 在没有无菌操作室的条件下;可用超净工作台。它是一无菌操作装置,主要是利用鼓风机,驱动空气通过高效滤膜净化后,缓缓通过工作台面,使工作部位构成无菌环境。它具有占地面积小,操作方便等优点,但它尚难绝对除去病毒类微生物,而且灰尘过多对净化作用不利,故超净工作台最好安置在清洁无尘的房间。

5. 清洗和消毒设置:培养中所用玻璃器皿可用电热干燥箱消毒,要求温度 160℃以上,最好使用较大规格的干燥箱,如 650×500×500mm。

器皿的清洗可用超声波洗涤器。吸管的清洗采用虹吸原理制成的冲洗装置。金属器械如解剖刀、虹膜剪、镊子、尖镊、止血钳等可用高压蒸汽消毒。

6. 培养器皿 为了清洗的方便,塑料瓶皿正逐步取代玻璃瓶皿。特制的塑料瓶皿具有透明、平滑、无毒性、有利于细胞生长的优点。主要的塑料瓶皿有:①多孔培养板,其规格有 4 孔、6 孔、24 孔及 96 孔,它体积小,适于少量细胞或单个细胞克隆的生长;②培养皿,规格有直径 30mm、60mm及100mm,与玻璃培养皿相同,尤其有利于集落形成和细胞转化等试验;③培养瓶,带有螺旋盖塞,规格有 30ml、50ml、100ml及 500ml,适于在CO₂培养箱中使用;④其它:冻存细胞的塑料安瓿及微量加样器头,后者的规格有 200~1000 μl 和 1 μl~100 μl 二种。

玻璃器皿在实验室仍不能完全被塑料制品取代,除培养皿和培养瓶外,主要还有:①吸管,它包括刻度吸管和移液管,常用规格有 10ml, 5ml 和 1ml;②玻璃瓶,用于配制各种培养液的储贮存液和血清等,可用生理盐水瓶或血浆瓶代替,规格有 500ml、250ml 和 100ml;

③离心管，规格有 50ml、10ml 和 5ml，用于细胞洗涤。

7. 液氮贮存器 贮存细胞多用液氮，液氮温度在-196℃，具有经济、省力和能较好保持细胞生物学特性的优点。液氮贮存器有 25L 和 50L 两种规格，它与液氮运输瓶，或称杜瓦瓶不同，因液氮贮存器一般每两周需补充一次液氮。如有需要可配置贮存器和运输瓶。

8. 水纯化装置 细胞培养对水的要求较高，通常要求使用三次蒸馏水配制各种培养液。对玻璃器皿也应用纯水清洗。但是，在细胞培养中，不宜使用去离子纯水，因其不能有效地去除有机物。

实验室应配备自动加水石英玻璃管加热的蒸馏器，具有蒸馏速度快，使用安全等优点。外购蒸馏水或去离子，应在本实验室重蒸后使用。对水质应经常检测，如 pH 和电导系数。同一实验尽量使用同一水源，避免水质造成结果的差异。

9. 滤过消毒装置 培养介质不能经高压蒸汽消毒，而需通过孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤消毒。滤过消毒装置由抽气泵(水流玻璃抽气泵或真空泵)、安全瓶、抽滤瓶和滤器组成。

10. 一般设备

离心机，用于对细胞悬液离心处理，以达到细胞洗涤、调节细胞浓度等。

天平，包括普通台秤、扭力天平和分析天平，用于配制各种培养液、酶消化液及生理盐水等。

酸度计，用于准确调整各种介质及生理盐水的 pH。

电磁搅拌器，微量加样器等。

(二) 培养用液

指细胞培养中所使用的溶液，如培养液、消化液、pH 调整液、染液及细胞洗涤液等。培养液的选择取决于细胞生长的要求，故它是维持细胞生存和生长所需的基本溶液，它的主要成分为平衡盐溶液和适应细胞体外培养的各种溶液。

培养液在制备过程中应严格操作，避免混入杂质。应特别注意下列问题：①容器，应仔细认真清洗，必要时须消毒；②水，三次重蒸蒸馏水；③严格选择品质优良的药品；④制备好的培养介质要标明名称、配制日期及配制者；⑤贮存与消毒。

1. 平衡盐溶液 常用的有 Hanks 液、Eagle 液及磷酸盐缓冲液 (PBS) 等。它具有维持渗透压、控制酸碱度平衡的作用及供给细胞生存所需的能量和无机盐的成分。它是配制各种培养介质的基础溶液，也是洗涤细胞的溶液。

2. 小牛血清 是细胞培养中最常见的天然培养基，它具有丰富的营养物质，对细胞附着和保护也有明显的作用。但它有成分较为复杂、个体差异较大、来源也有一定的限制等不足。弥补个体差异的办法是对血清进行无菌检测和支持生长能力测定后，混合使用。天然培养基除小牛血清外，还有鸡血浆、鸡胚浸出液、水解乳蛋白和鼠尾胶原等。

3. 合成培养基 系依据天然培养基的成分，用化学物质模拟合成的。如最简单的 MEM Eagle 培养液，包括 12 种必需氨基酸、谷氨酰胺和 8 种维生素。根据需要可添加某些成分，如碳水化合物(葡萄糖、核糖、脱氧核糖及丙酮酸钠等)、核酸的前体物(嘌呤和嘧啶类化合物)及氧化还原剂，抗坏血酸、谷胱甘肽等。

如进行无血清培养，除上述营养成分外，还应加入纤维连结素、多聚赖氨酸和胶原等成分以促进细胞贴壁。有时，还需要加入酶的抑制剂，如大豆胰酶抑制剂。

为了防止由于操作不慎所致的污染，可加入抗生素。常用抗生素有青霉素、链霉素及庆大霉素等。

4. 消化液 进行传代细胞培养时，为了使细胞脱离生长表面和细胞离散成单个细胞，通常使用消化液。常用的消化液有胰蛋白溶液(0.25% 或 0.125%)和乙二胺四乙酸二钠(Na₂-EDTA)溶液(0.02%)。

5. 其它 pH 调整液，为了营养成分稳定和延长贮存时间，配制生理盐溶液，和培养液

时,均在临用前加入 NaHCO_3 溶液。常用浓度有 3.7%、5.6%和 7.4%。此外,还有HEPES溶液,是一种氢离子缓冲剂,能较长时间保持恒定的pH值范围。使用终浓度为 10~15mmol/L。

染色液:常用的有①苏木精-伊红染色液或称 H.E 染色;②Giemsa 染色液。

固定液:常用的有①中性缓冲福尔马林,相当于 10%的福尔马林;②Bouin 氏固定液;③醋酸甲醇,临用前配制,结合 Giemsa 染色效果较好;④FAA 固定液,由福尔马林、冰醋酸及 80%酒精组成,用于盖片单层培养的固定。

(三) 消毒技术

在细胞培养中,消毒是最基本的一项工作,它直接影响实验的结果。消毒措施应在细胞培养的每个环节严格执行。细胞培养的微生物污染,包括细菌、真菌及病毒,它们主要来源于:操作者的粗心;操作表面或周围的环境;培养液及培养器皿的灭菌不彻底或存放时间过久等。

对不同的细胞培养所用物品,可采用不同的消毒灭菌的方法。一般有两类:一是物理灭菌法,即利用紫外线、干热及微孔过滤等;二是化学灭菌法,即利用化学消毒剂。主要消毒方面法介绍如下:

1. 紫外线 适于消毒空气、操作表面及一些不宜用其它方法消毒的物品和培养板等,使用方便,效果较好。应注意其可产生臭氧,影响健康。
2. 高压蒸气消毒 它适于金属器械、胶塞、布类及某些培养液。一般要求 15 磅压力下 20min。或者更简单的,煮沸消毒,其不足是湿度大,不易久存。
3. 干热消毒 适于玻璃器皿,消毒后器皿保持干燥并便于使用贮存。加温应到 160°C ,保持 90-120min。
4. 滤过消毒 适于大多数培养用液。选择孔径为 $0.22\ \mu\text{m}$ 的微孔滤膜,过滤除菌效果较佳。
5. 消毒剂 适于操作者的皮肤、操作表面和台面、桌椅及墙壁等,常用的消毒剂有来苏儿、新洁尔灭、过氧乙酸及 70%酒精。

三、培养细胞的鉴定

对培养细胞的鉴定有两个目的:一是观察培养有无变化,以决定是否终止培养,并从冷冻贮存的样品重新建立新的培养细胞;二是培养条件(如培养液)变化,对培养细胞的影响。因为培养条件的一致性,对于实验结果的可信性有极为重要的影响。对于培养细胞的鉴定包括污染鉴定、生存指标及细胞性质(如细胞形态、生长特性、染色体数目及结构等)。

(一) 污染鉴定

细胞培养中常见的污染有真菌、细菌和支原体等,此外有化学物和非同一种细胞的污染。受到污染的细胞培养可明显地改变生长特性,引起 pH 变化和生长迟缓。污染常常表现为 pH 变化,培养液表面起泡或起膜,培养液中的絮状物及细胞生长表面的斑点,摇动培养器皿可消失。肉眼见不到的污染可影响细胞的代谢。

1. 鉴定方法 真菌或细菌的污染可用肉眼或低倍光学显微镜观察,支原体仅能用特别的荧光染料如 Hoechst 33258 染色后在光学显微镜下,或用扫描电子显微镜观察。由于肉眼无法发现支原体的污染,在细胞培养过程中应经常定期检查,例如每三个月。最简便和最可靠的检测支原体的方法是用荧光染料染色在显微镜下观察。

2. 处理 基本的良好消毒技术并不一定能防止污染,还应注意下列方面:消毒步骤(如高压锅和干热消毒柜)的效果;多层流防护罩的消毒效果;经常检查培养器皿;每个工作者有自己配制的培养用液,处理受污染的培养用具和环境。对于已污染或怀疑污染的培养用具均可用 2.5%高氯酸处理。用抗生素对预防或去除细菌污染较为有效。对支原体污染,消除方法较多,如抗生素、加温及动物体内接种等,但都较为繁琐,且效果不甚满意,最好的办

法是弃去，再重新培养。

(二) 生存指标

1. 台盼蓝排斥试验 是判定细胞损伤的快速试验，它还可很方便进行细胞计数。具体方法如下：

①取少量细胞混悬液，加入等量的 0.5% 台盼蓝溶液。

②放置 1-5min 后，将混合液滴入血细胞计数池内。

③显微镜下，细胞显蓝色的为死亡细胞，尤其是核深染，而未染的细胞为存活细胞。统计出细胞总数后，可计算出细胞存活率。

2. 酶漏出的检测 胞浆酶如乳酸脱氢酶(LDH)的漏出检测也与染料排斥试验有同样的灵敏度，同时，可更精确地进行定量，但操作时间较长。

(1) 仪器：分光光度计，最好配有温育(37℃)的装置。

(2) 试剂：

溶液 0.9%NaCl, 0.1% TritonX-100 和 0.1% 牛血清白蛋白。

底物 3.5g K_2HPO_4 , 0.45g KH_2PO_4 和 31.0mg 丙酮酸钠溶于 450ml 的蒸馏水。配好后，可贮存于-20℃的冰箱内。

NADH, 称 42mg, 溶于 4.5ml 的 1% $NaHCO_3$, 临用前配制。

(3) 操作步骤：离心，以适当速度使所有细胞沉淀而不引起细胞损伤。例如肝细胞用 50g × 2min。取出上清，放入干净试管，并保持 0℃ 以下备用，加入等量的溶液至细胞沉淀，用漩涡混合器混合。保持在 0℃ 以下，备用。

取一比色杯，加 3ml 底物，50 μ l 的 NADH 和 25~200 μ l 的样品(取决于培养细胞的种类)，迅速混合后，在 340nm 处进行比色。整个过程应在 37℃ 条件下完成。计算上清或沉淀(即溶液中细胞)的 LDH 活性，漏出率表示方法为培养液中 LDH 活性占总的 LDH 活性的百分率。

3. 其它方法 铬的释放，利用 $^{51}Cr^{3+}$ 可被活细胞吸收，并还原成 $^{51}Cr^{2+}$ ，留在胞内，而死亡细胞则释放 $^{51}Cr^{3+}$ 。用 γ -计数器检测无细胞上清液中 $^{51}Cr^{3+}$ 的量，即可判断培养细胞的存活情况。还有贴壁效率和 ATP 含量等指标可鉴定培养细胞的存活情况。

(三) 细胞特性鉴定

在连续培养期间，细胞可能发生某些变化，如细胞与原始细胞的差异逐渐加大。但每一细胞株具有一系列细胞特性“正常”的参数，可供鉴定评价。例如，形态学参数、生长特性及染色体分析等皆为细胞特性鉴定的指标，其中形态学与生长特性的测定相对容易进行。

1. 形态学检查 评价细胞正常与否的最简单方法是形态学检查；应在每次传代时用倒置显微镜进行观察，最好拍照记录细胞的形态。要详细地描述每一细胞系的形态。若因限于篇幅，不能详述，可掌握两个术语，即“成纤维样”和“上皮样”细胞，即可描述所观察的细胞。成纤维样细胞系指在单层细胞培养时，细胞的长度要大于其宽度的两倍的细胞，而上皮样细胞系指呈多角形的细胞。

2. 生长特性的检查 在培养细胞时，其生长特性的检查较易进行，主要通过测定更换培养液的时间和传代的时间来完成。虽然不同的细胞其传代时间和更换培养液的时间不同，但对于每一细胞系应该较为固定，因为主要取决于细胞生长速率。

每个细胞系均有其自己的生长循环周期，这取决于接种进行培养的细胞数目。一般认为，在培养中的细胞，是处于不同的生长阶段。进行生长分析，应观察单个细胞的生长速率。在实际工作中，是测定克隆效率或者接种效率。克隆效率是测定由单个细胞生长的克隆。接种效率是测定植入小量细胞(2~50 个 / cm^2)后，等生长至可分辨的小克隆时，经用生理盐水洗涤，甲醇固定，吉姆沙染色(2ml / $25cm^2$)和清水冲洗后，计算克隆数。

$$\text{接种效率} = \frac{\text{克隆数目}}{\text{植入细胞数目}} \times 100\%$$

一般认为，传代效率小于 30 表示生长不正常。此项指标可用于正常细胞生长的监测，贮存细胞的复苏及鉴定每一批血清等。

在细胞培养试验中，一般监测指标可采用形态学、生长模式及接种效率即可。

3. 其它检查 除上述指标外，在细胞培养时，可进行染色体分析，包括染色体的数目和结构以及 DNA、RNA 和蛋白质的含量测定，来判断培养细胞的特性。

七、细胞培养在食品毒理学中应用

利用培养的细胞，可进行多方面的毒理学研究，如表 12-4 中所列。

表 12-4 培养细胞用于毒理学体外实验的实例

一般毒性：主要为急性细胞毒性
器官特异性毒性：利用有代表性细胞类型如肝细胞、肾近曲小管细胞、神经细胞及心肌细胞等；
毒作用机理
生物转化、毒性代谢产物的形成
遗传毒性，如程序外 DNA 合成测定
繁殖毒性
联合毒性
不同物种间的比较毒性
光敏毒性

以下重点讨论毒理学中应用细胞培养技术时应注意的几个问题。

1. 细胞类型的选择 细胞类型的选择取决于实验的目的。一般性筛选系列化合物的一般毒性时，应选择生长迅速且易于处理的细胞系。机理研究多不用细胞系，因为培养的细胞会逐渐丧失许多功能，如细胞色素 P-450 的活性。

细胞培养的优点之一是可选择来源于人体的组织细胞，可减少试验结果的物种差异。成纤维样细胞和上皮样细胞均可选用。常用的细胞系有 CHO、V79、Hela、BHR 及 L929 等。

2. 代谢活化 细胞经 8-24h 培养后，细胞色素 P-450 活性将迅速下降。而在 CHO 细胞系中，涉及代谢活化的酶活性下降。所以，培养细胞对需代谢活化的化学物不能够敏感。

解决这个问题有两个方法，一是加 S9，二是与原代肝细胞复合培养。S9 需要 NADPH 才具有代谢活化作用，故在培养液中应加有 NADPH 生成系统(葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡萄糖-6-磷酸和 NADP)。与原代肝细胞进行复合培养时也可采用其它不同的细胞系，如 V79、中国地鼠肺成纤维细胞和人成纤维细胞。

3. 受试物的给予许多 受试物由于水溶性较低，在加入培养液前，常需溶于有机溶剂有机溶剂对细胞有损害作用，故应限制有机溶剂浓度在 1% 以下。在试验中可设立适当的有机溶剂对照和培养液对照。例如，需用 S9 混合液；有机溶剂的浓度应限制在 0.1%，因为许多有机溶剂可抑制酶的活性。不溶性的受试物如，颗粒和油剂在给予培养液时仍存在问题。一般是混悬于培养液或者先溶于溶剂，再加入培养液，但有时会产生不同的毒性结果。例如，黄樟醚和降脂乙醚等油性受试物，假如使用高剂量时将有某些塑料培养皿成分的溶出，则所观察到的毒性作用可能部分地是由于某些塑料成分所致。

4. 设立阳性对照组 实验系统的重现性应该用阳性对照物来检查。阳性对照物指采用经过研究或公认有特定作用的化学物。例如在代谢活化研究中常选择环磷酰胺为阳性对照物，在细胞毒性筛检时可选二甲基环己基羟乙基戊二酰亚胺和二硝基苯酚为阳性对照物。

5. 毒性指标的选择 依据不同的试验目的和试验条件，可选择不同的观察指标。下列指标在毒理学中经常采用：

(1) IC₅₀：即经 3 天培养后，引起生长速率减至对照组一半时所需受试物的浓度生长速

率可用蛋白总浓度来表示,可用于细胞毒性的常规筛检。此外,前述评价细胞特性的指标,如形态学和接种效率等,均可采用。

(2) 细胞膜损伤:可选择台盼蓝摄取、胞浆酶漏出、 Ca^{2+} 的释放以及钙泵的变化等指标来评价细胞膜的损伤。

(3) 大分子物质合成与降解的改变:可选用 ^{14}C 亮氨酸蛋白试验和 ^3H 尿嘧啶参入RNA试验等指标,以判断受试物对培养细胞的大分子合成与降解的有无作用。

(4) 代谢能力:除可选择ATP浓度、NADP / NADPH比、谷胱甘肽含量、氧消耗量等指标外,还有毒物代谢酶的活性、细胞膜脂质过氧化作用及 ^{14}C -葡萄糖氧化代谢成 $^{14}\text{CO}_2$ 的速率,均可反映出细胞的代谢能力。

(5) 形态学观察:通过光学显微镜和电子显微镜观察,可了解受试物对培养细胞的形态改变情况。

第三节 亚细胞组分制备及其检测方法

细胞由许多亚细胞组分组成,如核、线粒体、内质网膜、溶酶体及高尔基氏体等,它们在维持细胞正常生理功能方面起着重要的作用。故许多外源化学物引起机体的损害作用,有可能与亚细胞组分的结构与功能损伤有关。在毒理学中,亚细胞组分作为遗传毒性测定中的代谢活化系统,如S9已普遍运用。此外,亚细胞组分主要用于中毒机理的分子水平研究,因为它们是从整体细胞上在自然环境下分离出来的,使毒理学家在体外条件下,有可能更深入了解外源化学物在毒作用部位的作用机理。但它离开于整体细胞,也有其局限性;即它仅提供有关一些特殊作用能力的特定信息。对外源化学物毒作用机理研究,还应结合其它研究如整体试验、细胞试验等,综合作出评价。现就微粒体和线粒体的制备及其检测方法加以介绍。

一、基本技术

(一) 设备

1. 匀浆器(homogenizer) 常用匀浆器为Potter型,由一聚四氟乙烯杵和玻璃套管组成。它是利用两者的间隙将细胞破碎,其间隙一般在0.15~0.25mm。杵是由马达传动,其速度在2000rpm以内,且可调节。它较适合肝细胞、肾细胞及脑细胞的破碎,而对肺、甲状腺等结缔组织较多的组织效果不佳。匀浆器可从5ml至50ml大小不等,依实验需要加以选择。使用本法破碎细胞应注意:①在低温下操作避免匀浆磨擦生热和室温影响实验结果;②马达速度不宜过快,慢速可获更大的扭力矩;③匀浆上下次数,即杵由玻璃套管上部到底部,再回到上部,一般肝细胞匀浆上下8~10次即可达到破碎目的。

2. 离心机 是亚细胞组分制备的关键设备,一般需要低温高速离心机,最大转速为18000~24000rpm,和超速离心机,最大转速为50000~75000rpm。离心机应配备各种类型的转头,以供亚细胞组分制备时差速离心选用。离心管最好为聚丙烯的,因其透明性较好。

(二) 匀浆介质和缓冲液

最常用的匀浆介质为等渗的蔗糖(0.25mol / L)和氯化钾(0.154mol / L)。蔗糖为经典亚细胞组分分离研究所选用,而氯化钾更适合外源化学物代谢酶的研究,如它可更有效除去微粒体制备物中的血红蛋白,减少光谱测定的干扰。匀浆介质在使用前应将pH调至7.4左右。匀浆缓冲液可含有5~50mmol / L的Tris或Hepes。

大多数研究中常用的匀浆缓冲液为含0.154mol / L KCl的50mmol / L Tris · HCl缓冲液,pH7.4。此缓冲液在4℃条件下,至少贮存12周不变质。

(三) 生物样品

实验动物如大鼠、小鼠、金黄地鼠应迅速处死,常用的方法是断头处死。应避免使用麻醉剂,如乙醚、巴比妥类药物,它们将影响毒物代谢酶的活力。对于大实验动物,如狗等,

应在适当的麻醉条件下，放血处死。尽快取出所需脏器，如肝、肾、肺及脑等，置入冰的匀浆介质中。为了减少实验误差，应参考动物的年龄、性别、品系、健康状况、饮食类型和饲养环境等因素。此外，为避免昼夜节律影响，每次实验应在相同时间处死动物。为避免肝糖原影响，大鼠应禁食过夜。

(四) 微粒体酶的诱导方法

1. 苯巴比妥钠 它是常用的诱导剂之一。其方法是以小鼠 $80\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ，大鼠 $100\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ，经腹腔注射或与生理盐水混合灌胃，连续 3~5 天即可诱导细胞色素 P-450 的活力。还可以将药溶于饮水， $1\text{ng}/\text{ml}$ ，大约 7 天后，可达到诱导效果。主要诱导细胞色素 P-450。

2. p-萘黄酮(β -naphthoflavone) 它是多环芳烃类的诱导物，可诱导细胞色素 P448，同类诱导物还有 3-甲基胆蒎(3-methylcholanthrene)。β-萘黄酮的使用方法是小鼠 $40\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ，大鼠 $80\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$ ，经腹腔注射，连续 3~4 天，即可达到诱导作用。主要诱导细胞色素 P448。

3. 多氯联苯 常用多氯联苯诱导物是 Arochlor1254，它是混合型的诱导物，即同时诱导细胞色素 P-450 和细胞色素 P-448，剂量依多氯联苯种类不同而异，需做预试验来确定。

二、微粒体的制备

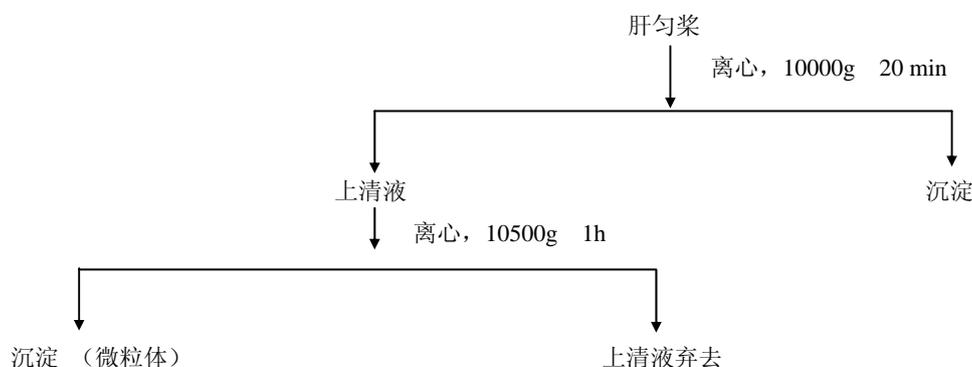
微粒体(microsome)是内质网在细胞匀浆过程中形成的碎片，并非独立的细胞器。由于微粒体含有混合功能氧化酶，其在毒理学研究中有着重要地位，故微粒体是毒理学中较常用的体外系统。

(一) 肝微粒体制备

1. 以断头方法处死动物，迅速取出肝脏，用预冷生理盐水或匀浆介质洗净血污，剪去粘连的组织，用滤纸轻轻吸干表面水分，称重。

2. 将肝转入小烧杯，用剪刀剪碎肝脏，加入适当匀浆介质，一般为 $3\text{ml}/\text{g}$ 肝脏。放入 Potter 匀浆器中，上、下 8 次，制成肝匀浆。

3. 按示意图操作离心。



在第一次离心去除线粒体、核等物质时，离心管上层漂浮有脂质层，应用吸管将其除去，再收集上清液。在第二次超速离心后，如为了减少血红蛋白的影响，可加匀浆介质将沉淀重新悬浮，将所制备的微粒体再洗涤一次。沉淀即微粒体，悬浮于 $10\text{mmol}/\text{L}$ HEPES·HCl 缓冲液， $\text{pH}7.6$ ，内含 $0.154\text{mol}/\text{L}$ KCl， $1\text{mmol}/\text{L}$ EDTA 和 20% 甘油，贮存于 $-20\sim-70^\circ\text{C}$ 或液氮中。应强调的是贮存方式和时间对微粒体酶的活性或特征会有不同程度的影响。

4. 其它方法 除超速离心法制备微粒体外，还有凝胶过滤、钙沉淀法和等电点沉淀法也可以制得微粒体。凝胶过滤法不适于做多个样品。钙沉淀法适于没有超速离心机的实验室使用。其方法是在去线粒体的上清液中加入钙离子，使其终浓度为 $8\text{mmol}/\text{L}$ CaCl_2 ，此时，内质网部分产生钙依赖性聚集，在较低的离心条件， $2000\sim 25\ 000\text{g}$ ， 20min 即可将其沉淀。不足之处是钙离子可影响某些酶的活性以及造成核糖体的丢失。等电点沉淀法是利用 pH 改变，使微粒体沉淀出来，弃去线粒体的上清液用醋酸缓冲液把 pH 调至 5.5 时，在较低离心条

件下, 10000g 10min, 即可制得微粒体。其优点也是不需超速离心机, 不足之处是酸性条件下, 可使某些酶和CytP-450失活。

(二) 肝外组织微粒体的制备

肝微粒体制备过程中的一般性规则对于肝外组织同样适用。对于较软的脏器, 如肾脏、睾丸和脑与肝微粒体制备的操作变动不大。对于结缔组织较多的肺、皮肤等脏器和对于小肠微粒体的制备较为麻烦。因为, 小肠仅上皮细胞含有外源化学物的代谢酶, 在小肠的不同区域其酶活性也不一样, 以及肠内的蛋白酶可迅速降解代谢酶。其解决的办法有: ①小肠上皮细胞可由打开的小肠内面刮取或用机械振荡来与小肠结缔组织分离; ②加入胰蛋白酶的抑制剂使蛋白酶活性降低或加入甘油或二巯苏糖醇(dithiothreitol, DTT)保护酶活性; ③加肝素防止凝集和蛋白聚集。

肝外组织的细胞色素 P-450 的含量和有关酶活性远较肝组织低。应注意所有操作应在 0~4℃ 下进行, 对于组织应尽量除去血红蛋白, 较好的方法是脏器的原位灌流。

三、混合功能氧化酶系的测定方法

MFO 催化的反应类型繁多, 且底物特异性不强, 故有多种方法用于 MFO 测定, 可分为直接法和代谢法。直接法是直接测定 MFO 的各组成成分, 如细胞色素 P-450 含量等。代谢法是通过测定 MFO 催化反应中的底物消耗量或产物生成量, 间接了解 MFO 活力。由于 MFO 作用的复杂性以及成分的多样性, 通常认为使用单一方法进行 MFO 的评价不够全面和可靠, 因此, 在毒理学中是采用多种检测分析方法, 从不同角度进行 MFO 作用的评定。

(一) 直接法

1. 细胞色素 P-450 含量测定 细胞色素 P-450 是 MFO 的主要成分, 起到终末氧化酶的作用。其最大特点是还原型 CytP-450 与一氧化碳结合后, 在 450nm 处有最大吸收光谱, 因此被称为 CytP-450。利用其在 450nm 的最大吸收光谱, 可测得样品中 CytP-450 的含量。

(1) 仪器: 双光束可记录的分光光度计。因为微粒体样品是浊状样品, 需双光束分光光度计, 在 450nm 和 490nm 处进行差示光谱分析。

(2) 试剂: 0.2mol / L 磷酸缓冲液 pH7.4; 一氧化碳(气体); 连二亚硫酸钠

(3) 步骤:

①将微粒体制备物用 0.2mol / L 磷酸缓冲液 pH7.4 适当稀释;

②加少量固体的连二亚硫酸钠, (sodium dithionite, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$)迅速混匀;

③分装入两个比色杯中, 用一氧化碳气体向比色杯轻轻吹泡 1 min, 开始在 450nm 和 490nm 波长处测定其光密度值。

(4) 计算:

$$\text{CytP-450 含量}(\text{nmol} / \text{mgPr}) = \frac{\Delta A(450 - 490)\text{nm}}{C \times r} \times \frac{1000}{91} \times \text{稀释倍数}$$

式中: ΔA 为 450nm 处光密度值与 490nm 光密度值之差

91 为 CytP450 的消光系数, 单位: $\text{cm}^2 / \text{mmol}$

r 为比色杯光径长度, 单位: cm

C 为微粒体制备物的蛋白浓度, 单位: mg / ml

(5) 注意事项: 一氧化碳吹泡保持气泡单个放出为宜, 太快会将样品吹走。此法可快速测定样品的总细胞色素 P450 含量, 即各种细胞色素 P450 同工酶(或称亚型)的总和。本法对肝微粒体制备物较为适合, 而对肝外组织, 因影响因素如血红蛋白及本身含量不高, 不宜用本法测定。

2. NADHP-细胞色素 P-450 还原酶测定 NADHP-细胞色素 P-450 还原酶在 MFO 作用中起提供电子的作用。在实验工作中, 它的活力较难测定, 且需要特殊仪器。因此, 通用细胞色素 C 作为人工电子受体, 来测定这种微粒体黄素蛋白酶。其原理是氧化型细胞色素 C 被转变成还原型细胞色素 C 时, 在 550nm 处有典型的最大吸收峰。

如上所述,直接法可判断外源化学物对MFO催化是否具有诱导作用或抑制作用。它能评定CytP-450总含量,但不能确定某一CytP-450亚型的改变,也就是说不能测定MFO催化某一特定反应活动的影响。

(二) 代谢法

代谢法可分为NADPH消耗量测定、氧耗测定和MFO催化代谢产物生成量测定。

1. NADPH消耗量测定 NADPH参与MFO的催化作用过程,故通过测定NADPH的氧化,即NADPH消耗量,可间接了解MFO活力。本法是利用双光束分光光度计测定340nm处光密度的变化量。其反应体系多为0.05mol/L Tris-HCl缓冲液,其中含0.15mol/L KCl和10mmol/L MgCl₂, pH为7.4;微粒体蛋白含量为0.2~0.5mg/ml; NADPH含量为0.12~0.16mmol/L。本法是测定反应体系中NADPH总消耗量,但在微粒体制备物中,不仅MFO催化反应需要消耗NADPH;而且它不可能区分细胞色素P-450各种同工酶的作用,所以用该法来评价MFO活力,在准确性和专一性等方面均有不足。但在重组酶系中,即由各种纯化的MFO组分在体外条件下组成的反应体系,例如,由细胞色素P450的某亚型、NADPH—细胞色素P-450还原酶和磷脂组成的细胞色素P-450重组系统,可避免准确性和专一性不足的缺点。本法测定简便易行,不失为MFO重组体系中较好的测定方法。

2. 氧耗测定法 采用氧电极法测定反应体系中的氧耗量,通过化学计量法间接了解MFO活力的反应体系中,NADPH需要保持恒定的水平,故常用NADPH生成系统,如葡萄糖-6-磷酸/葡萄糖-6-磷酸脱氢酶或异柠檬酸/异柠檬酸脱氢酶等来满足需要。本法也有与NADPH消耗量测定类似的缺点,即微粒体制备物中有较多的酶系在催化过程中均有氧的消耗。例如,在微粒体制备过程中,难免有触酶(catalase)的污染,触酶催化过氧化氢产生水和氧。此外,也可能有脂质过氧化作用发生,所以,氧耗测定法对评价微粒体制备物MFO活力的应用受到一定的限制。

3. MFO催化代谢产物的测定 通过直接测定特定底物的消耗进行MFO活力评定存在一定的困难,因为其大多数底物的米氏常数(k_m)为0.5~5.0mmol/L,而MFO的比活性仅为1.0~15.0nmol产物生成量min⁻¹·mg⁻¹蛋白。可见两者差异较大,即其底物转变量小于1%,与测量方法本身的误差相近,难于进行统计学分析。故评定MFO活力时,多改用其代谢产物生成量的测定。由于其底物特异性不强,催化反应类型较多,目前已建立多种产物的检测方法。依据测定技术,代谢产物测定方法又可分为可见紫外分光光度法、荧光分光光度法、氚标记放射测定和色谱分析等。

(1) 可见紫外分光光度法:利用分光光度法评定MFO活力,应用最广泛的方法之一是甲醛生成量的测定,原理是依据MFO所催化的N-和O-脱烷基反应,许多底物如苄甲苯丙胺与氨基比林(N-脱甲基)和可待因(N-脱甲基和O-脱甲基)等经过脱甲基作用后,皆有甲醛生成。故可用甲醛的生成量表示MFO活力。甲醛的测定是利用Hantzsch反应,用乙酰丙酮和铵离子捕捉甲醛,形成有色的衍生物。本法简便,易于掌握,是测定MFO的N-和O-脱烷基作用常用的方法之一,广泛用于肝脏微粒体制备物MFO的活力评定。对于肝外组织,因甲醛生成速率为2~3nmol·min⁻¹·m⁻¹,即肝外组织MFO活力较低,其灵敏度有限。但可加入氨基脲(1mmol/L),增加对甲醛的捕捉能力,以提高其灵敏度,扩大本法的应用范围。

此外,放射测定法可使甲醛测定的灵敏度提高,但需要N-甲基-¹⁴C标记的底物。由于¹⁴C标记底物不易取得,且¹⁴C废弃的处理较为复杂和需特殊的设备及技术人员,故本法在一般实验室不易开展。

利用可见紫外分光光度法,还可测定MFO催化代谢的其他反应。例如,通过苯胺和环己巴比妥测定羟化作用;偶氮化合物和硝基化合物测定还原作用;对硝基茴香醚测定O-脱烷基作用等。这些方法简便易行,适合大多数实验室,但灵敏度不高,对于MFO活力较低的肝外组织不宜采用。

沉淀 (含有线粒体)

上清液 弃去

经 12500g 离心的沉淀, 从外观上可分为三个不同区带: 底层为白色或红色, 内有残留的细胞碎片和红细胞; 中层为深棕色, 是大量完整的线粒体和一些溶酶体; 上层为绒毛状, 有光泽, 带粉红色, 为一些破的线粒体和微粒体。小心去除上层沉淀, 收集含有线粒体的中层沉淀; 加适量的缓冲液, 再离心 12 500g 10min, 收集沉淀。加 2—3ml 缓冲液重新悬浮, 即为线粒体的制备物, 其蛋白浓度约为 30mg / ml。

操作要点是熟练, 整个制备过程应在 1h 内完成。

(二) 亚线粒体颗粒的制备

其原理是利用超声波作用, 破坏线粒体外膜, 再经超速离心获得仅有内膜的亚线粒颗粒。它含有全部氧化磷酸化的酶类, 对于观察呼吸链氧化反应、ATPase 活性及其它部分的反应是十分有用的。

1. 缓冲液为 0.25mol / L 蔗糖, 含有 1mmol / L EDTA, 10mmol / L Tris · HCl 缓冲液, pH7.5。

2. 操作步骤

①用 10000g×10min, 离心沉淀线粒体。

②用缓冲液重新悬浮沉淀, 其浓度约为 20mg / ml, 用超声波处理 15s, 间隙 15s, 共 1 min, 超声源为一台 60W 功率的超声发生器。

③经超声处理的线粒体制备物, 用缓冲液稀释 2 倍, 以 29 000g×15min, 以沉降完整的线粒体和较大部分的线粒体。

④将上清液移至另一离心管内, 以 100000g×30min 离心, 沉降亚线粒体颗粒, 其沉淀为红色, 外观与松香类似。用等体积的缓冲液再洗一次。

用缓冲液重新悬浮沉淀, 使终浓度为 20mg 蛋白 / ml, 即为亚线粒体制备物。

⑤注意事项: 在超声处理过程中, 保持线粒体制备物温度不要升高, 维持在 4℃ 以下。

五、线粒体功能的测定

制备线粒体的质量将受可能的其它亚细胞器如溶酶体和过氧化体的污染和 / 或线粒体功能完整性的影响。后者是主要因素, 它仅能通过测定各种代谢的功能来评定。

线粒体所执行的各种功能取决于氧化磷酸化过程。

(一) 线粒体呼吸功能的测定

线粒体的氧化磷酸化系统由两个不同但又紧密联系的多酶系统组成, 即呼吸链和 ATP 酶 / 合成酶的两个系统。呼吸功能通常是利用氧电极测定反应体系的氧分压变化来了解线粒体的呼吸状况。

1. 试剂

(1) 测定大鼠肝线粒体呼吸的缓冲液为 0.25mol / L 蔗糖, 5 mmol / L K_2HPO_4 , 10 mmol / L KCl, 5 mmol / L FeCl_2 溶于 10mmol / L Tris · HCl 缓冲液, pH7.4。

(2) 底物: 所有三羧酸循环(TEA)的中间产物, 如 3—羟基丁酸、谷氨酸、脯氨酸和脂肪酸均可以。推荐丙酮酸+苹果酸, 谷氨酸+苹果酸以及 3—羟基丁酸+琥珀酸, 其加入量为 10~20 μl , 终浓度高达 5~10 mmol / L。

2. 电极调试

(1) 打开电极、磁力搅拌器、纸记录仪和恒温水浴器的开关, 使它们平衡至少 30min。

(2) 按使用说明安装氧电极, 检查银和铂电极应有光泽, 以及聚四氟乙烯膜完好无损。

(3) 取 2ml 呼吸缓冲液, 在 30℃ 预热数分钟, 并完全用空气饱和后, 放入反应室, 开始搅拌并记录, 速度为 1cm / min。

(4) 稳定 1~2min 后, 将记录仪调至 95% 位置。此为“空气线”, 即是用空气完全饱和的缓冲液。再过 5min, 记录仪不应漂移, 如还在漂移, 说明电极有问题。

(5) 关掉搅拌器，记录笔瞬间向下偏移，再打开搅拌器，笔应回到“空气线”。说明电极有污染，可用浸水棉签清洗。

(6) 在确定电极反应正常后，加入少量连二亚硫酸钠固体，使记录笔迅速下移。数分钟后，记录笔稳定在较低的位置。此时，缓冲液为无氧状态，笔处的位置为“氮气线”。通常，氮气线是位于记录仪调试时的记录零点，此时电极电压为零“氮气线”与“空气线”位置之差表示缓冲液的氧浓度。

3. 线粒体呼吸的测定

(1) 加 1.9ml 呼吸缓冲液的 0.1ml 线粒体制备物，约含蛋白 4mg，进入电极室，注意排除空气，调正电极位置。封闭电极室后，使线粒体唯一的氧源是呼吸缓冲液中的溶解气体。

(2) 在不改变缓冲液氧浓度的情况下，向电极室加入不同的试剂，其理想办法是用微量注射器，并且每次加入量不超过 20 μ l。加试剂时，应小心缓慢，不要引起记录笔的“跳动”。

(3) 加入不同代谢物后，线粒体的代谢状况见表 12-5。表中所示，加入代谢物浓度不一，会引起呼吸速率的改变，其速率限制因素也不一。实验中主要观察状态 3、状态 4，以计算呼吸调控比(respiratory control ratio, RCR)。

(4) RCR 的计算：

记录内源性呼吸 2min，即状态 1；加底物 S 或 P+M，激发呼吸，使线粒体进入状态 4；

记录 2-3min 后，加入已知量的 ADP，激发线粒体呼吸进入状态 3。当 ADP 消耗完后，呼吸又回到状态 4。计算 RCR 的状态 4 应是加 ADP 后出现的状态 4，因为起始的状态 4 总是要比加 ADP 后出现的状态 4 慢。

状态 3 或 4 的呼吸速率计算：已知呼吸缓冲液的氧浓度为 420ng atom O / min，总氧含量为 840ng atom，记录范围即空气线至氮气线为 95%，故将总氧含量垂直分为 95 等分，每一垂直等分为 8.8ng atom O。通过记录笔的移动，纵轴为氧耗，横轴为时间，可求出呼吸速率。一般琥珀酸为底物，状态 3 的呼吸速率为 94ng atom O / (mg 蛋白 · min)，状态 4 为 23ng atom O / (mg 蛋白 · min)；而丙酮酸加苹果酸为底物，状态 3 的呼吸速率为 51ng atom O / (mg 蛋白 · min)，状态 4 为 10ng atom O / (mg 蛋白 · min)。故琥珀酸的 PCR 为 4，丙酮酸加苹果酸约为 RCR 为 5。如果 RCR < 3，可认为制备的线粒体失败。

4. ADP / O 比值测定 在生物化学上，P / O 比指磷酸化与呼吸之间的化学计算关系，常用 Warburg 压力计来测定。此外，依据 P / O 比也等于 ADP / O 比，利用线粒体呼吸测定试验可求出 ADP / O 比。ADP 的加入量是已知，加入后线粒体的氧耗量，可通过图 W-X 中的 X 求得。故可计算出 ADP / O 比。ADP / O 比值取决于线粒体的制备情况，ADP 加入量及 O₂ 浓度测定的精确性，它是判断线粒体功能是否完好的指标之一。

(二) 线粒体呼吸的抑制作用研究

研究线粒体呼吸的抑制作用，在了解线粒体氧化磷酸化作用中起着重要的作用。外源化学物抑制线粒体的氧化磷酸化过程，将它们的抑制作用研究与已知抑制剂作用比较，可探讨外源化学物作用线粒体氧化磷酸化的机理。

1. 分类 常见线粒体抑制剂的分类见表 12-6。

表 12-5 线粒体的代谢状况

状态	代谢物浓度			呼吸速率	速率限制因素
	O ₂	ADP	底物		
1	高	低	低	慢	ADP 水平
2	高	高	无	慢	底物水平
3	高	高	高	快	呼吸链

4	高	低	高	慢	ADP 水平
5	无	高	高	无	氧 水平

表 12-6 线粒体抑制剂的分类

类 型	代表性抑制剂
呼吸链抑制	
部位 I	鱼藤酮
部位 II	抗霉素 A
部位 III	氟化钾
解偶联剂	CCCP 或 DNP
ATP 酶 / 合成酶抑制	寡霉素
底物转运	丁基丙二酸(二羧酸转运)
离子转运	钙红(Ca ²⁺ 转运)

表 12-7 ATP 合成测定的加样方案

测定项目	缓冲液	糖激酶	线粒体制备物	H ₂ O	底 物
空 白	1ml	20 μ l	50 μ l	30 μ l	—
对 照	1ml	20 μ l	50 μ l	30 μ l	10 μ l
测 定	1ml	20 μ l	50 μ l		

2. 经典抑制作用 经典抑制作用见图 12-6。

对 A-E 模式的解释如下：

(A) 鱼藤酮(Rot)可抑制NADH连接底物的线粒体呼吸。加入底物琥珀酸(S)可刺激呼吸，是因为琥珀酸可绕过鱼藤酮的抑制阻碍进入呼吸链。再加抗霉素A(Anti—A)可阻断琥珀酸以后的呼吸链。加入四甲基—对苯胺二胺 / 抗坏血酸(TMPD / ascorb⁻)，它们是人工的电子供体，故可将电子输入抗霉素A，刺激线粒体呼吸，如加氰化钾(CN⁻)可阻断由TMPD / ascorb⁻刺激的呼吸。

(B) 曲线的上半部分是典型的状态 3 向状态 4 过渡的轨迹。当加入苍术苷(AF4)，不影响状态 4。ADP 作为阻断 ADP / ATP 易位子的抑制剂也无作用。然而，加入一解偶联剂，仍可像正常一样，刺激线粒体呼吸，表明假如有抑制剂已经作用于呼吸链，则解偶联剂不可能刺激线粒体的呼吸。

(C) 用寡霉素(Oligo)可出现同 B 一样的轨迹，它的作用机理可能是对 ATP 酶 / 合成酶复合物起抑制作用，表明两种不同类型的抑制剂可产生对呼吸的相同作用。需用其它实验加以区别。

(O / E)这两种曲线，均表现Ca²⁺可刺激线粒体的呼吸，而钙组(R. R)可抑制Ca²⁺刺激的呼吸。因为它是一种Ca²⁺转运的特殊抑制剂。

由前述可知，用氧电极研究可获得许多有关外源化学物对线粒体作用的资料。本研究应注意的是：①加入多种抑制剂，应保证两次实验之间，彻底清洗电极室；②对于不溶于水的受试物，应设立溶剂对照，观察溶剂是否对线粒体有作用。在每次实验结束，均应用乙醇洗去受试物的任何轨迹，再进行下次实验。

(三) ATP 合成的测定

测定线粒体氧化磷酸化除氧化电极外，还有另一种方法，即测定 ATP 合成量。常用的

方法是用葡萄糖 / 己糖激酶捕捉系统, 其中由 ATP 不断产生 ADP, 使线粒体维持状态, 通过 Pi 的消失测定 ATP 的形成。本法简便易行, 又不需特殊的仪器。此外, 由于线粒体制备物可保持良好的偶联状态, 一般为 2~3h, 可进行许多测定, 尤其是抑制作用的研究。再者, ATP 合成的测定, 不同于偶联的氧消耗, 受线粒体制备的质量影响较小。

1. 试剂

(1) ATP合成缓冲液: 10mmol / L Tris · HCl缓冲液, pH7.5, 内含 0.25mol / L蔗糖, 22mmol / L葡萄糖, 5mmol / L磷酸二氢钾, 2mmol / L MgCl₂, 2mmol / L ADP等。

(2) 己糖激酶, 用 0.25mol / L蔗糖, 10mmol / L Tris · HCl 缓冲液, pH7.5 配成 20 单位 / 20 μl 的溶液。

(3) 磷酸测定: 10%三氯醋酸(TCA), Pi储备液, 3mmol / L KH₂PO₄, 用 0.1mol / L H₂SO₄ 为溶剂; ANSA试剂, 10.5g氨基萘磺酸和 30gNaHSO₃ · 7H₂O 溶于 250ml蒸馏水。避光, 冷藏保存。

2. 方法 关键是反应混合物要不断充气。一般用恒温水浴摇床即可满足要求, 其速度为 90 转 / min。用闪烁瓶或小的细颈瓶作反应容具。

(1) 如表所示步骤加入各试剂后, 在 30℃恒温水浴温育 5min, 加入琥珀酸或丙酮酸+苹果酸为底物, 继续温育。

表 12-8 AW 合成测定的加样方案

测定项目	缓冲液	糖激酶	线粒体制备物	H ₂ O	底物
空 白	1ml	20 μl	50 μl	30 μl	—
对 照	1ml	20 μl	50 μl	30 μl	10 μl
测 定	1ml	20 μl	50 μl		

(2) 10min 后终止反应, 取 20 μl 进一小塑料管, 再加 200 μl 10%TCA, 混匀, 离心 5min。

(3) 取 100 μl 上清液加入一试管中, 再加 3ml 蒸馏水, 0.3ml 钼酸铵, 充分混匀, 加 0.2ml ANSA 试剂, 混匀, 10min 后, 在 750nm 处测定其光密度, 通过标准曲线(0~0.8 μmol / LPi), 计算出 Pi 的含量。

在对照或测定管与空白管中 Pi 含量的差值, 即为 Pi 转变或 ATP 的量。结果表示: nmolATP / (mg 蛋白 · min)。对于肝脏线粒体底物琥珀酸或丙酮酸加苹果酸的正常值分别为 300 和 100nmolATP / (mg 蛋白 · min)。

第四节 生物膜的制备与其性质的研究方法

一、大鼠肝细胞膜的制备

其基本原理是将肝组织在含有Ca²⁺离子的低渗碳酸氢钠缓冲液中温和匀浆, 使细胞膜保持较大的膜片; 其次, 应用低速离心使细胞膜片与细胞核一起从匀浆中分离, 再利用细胞膜与细胞核之间的密度差异, 用密度梯度离心将细胞膜从低速离心获得的粗核部分中分离出来。

(一) 试剂

含有 1.0mmol / L NaHCO₃的缓冲液, pH7.5; 0.5mmol / L CaCl₂的 1.0mmol / L NaHCO₃缓冲液; 蔗糖溶液浓度分别为 70%, 45%, 41%和 37%, 0.85%NaCl溶液。

(二) 仪器设备

制备型超速离心机, Potter 匀浆器

(三) 操作步骤

将大鼠禁食 12-24h后, 断头处死, 尽量放干净血液, 迅速取出肝脏, 随即用预冷的生理盐水洗涤数次, 尽量除去残留的血液。称重、剪碎, 于 1.0mmol / L碳酸氢钠缓冲液pH7.5, 内含 0.5mmol / LCaCl₂(简称缓冲液A)内进行匀浆, 肝匀浆浓度为 10%。然后, 用缓冲液A将匀浆稀释 10 倍, 搅拌、静置。经双层尼龙布过滤后, 按图所示操作(0-4℃下进行)。

在差速离心分离所得的沉淀中, 加入 70%(W / W)的蔗糖溶液, 把比重调至 1.22, 转移至超速离心管中。在其上依次铺加 45%(W / W)、41%(W / W)和 37%(W / W)的蔗糖溶液, 形成不连续的蔗糖密度梯度。在超速离心 100000g, 120min。超速离心结束后, 收集 41%与 37%蔗糖溶液界面的致密沉淀。用 1.0mmol / L 碳酸氢钠缓冲液, pH7.5, 洗涤, 以除去蔗糖, 即获得肝细胞膜制备物。

(四) 鉴定

应用最广泛的是利用膜上酶的活力, 作为标志来鉴定膜的分离情况。肝细胞膜的标志酶有 5'-核苷酶、Na⁺、K⁺-ATPase等, 测定方便, 无需大型仪器。但它的不足之处是这些酶在质膜上并不总是均匀的, 据之作出判断有一定的局限性。还有膜上的其它蛋白如膜抗原、激素受体及外源凝集素受体等可供利用鉴定膜的分离情况。此外, 还可用放射性核素化学物、荧光试剂和顺磁试剂等对肝细胞进行共价标记, 以跟踪肝细胞膜在分离时的去向。但在使用时尚有一些问题, 如共价标记有时会改变膜的天然性质, 小分子标记物可进入细胞内或吞噬入细胞等。

二、红细胞膜的制备

红细胞取材方便, 结构简单, 均一性好。人红细胞去除血红蛋白后即得血影, 即红细胞膜。研究红细胞膜时有三种模式系统可供选择: 洗涤过的完整红细胞膜再封血影(resealed ghost)及封闭的红细胞膜囊泡。

(一) 红细胞膜

常用的制备方法是在低渗条件下胀破红细胞, 离心 20000g。洗涤去除血红蛋白, 即获红细胞膜。此种膜最接近整体系统(in vivo), 但它不能控制细胞质内的环境; 在应用上有一定的局限性。此外, 低渗制备的红细胞膜虽然去除了细胞内质, 但膜的封闭性差; 有许多泄漏的空穴。

(二) 再封血影

近年来发现在一定条件下, 胀破了的红细胞可以重新封闭, 对K⁺等离子不通透, 给研究红细胞膜提供了一模式。其制备的方法有:

1. 血影的低渗液中加入浓盐溶液, 成为等渗溶液, 置于 37℃温育 20min, 期间可缓慢地搅拌 3 次, 可得一定比例的再封血影。

2. 将低渗胀破的红细胞在 0℃条件下, 过 Bio-gdA 柱, 柱上的 1 / 3pH 为 7.6, 以利膜与血红蛋白分离, 下 2 / 3pH 为 6.0, 有利于随后红细胞空泡的重新封闭, 当膜从柱上流出后即用 3Mol / L KCl。调节为等渗液, 即 150mmol / L KCl 浓度。在 37℃温育 1 h, 即获得重新封闭血影。

(三) 封闭的红细胞膜囊泡

有时为了深入研究, 将膜的内、外层翻过来。

1. 正常定向囊泡的制备 在制备好的血影液混悬内加入 0.1mmol / LMgSO₄溶液, 使细胞产生胞吐作用(exocytosis), 用滴管轻轻吹打, 即获正常定向的囊泡, 即与红细胞膜内外侧相同的囊泡。

2. 内翻泡(inside-outvesicles) 在制备好的血影液混悬内, 加入 0.5nmol / L 磷酸钠缓冲液, pH8.0, 在低温条件下 1h。细胞在此条件下, 产生吞服作用(endocytosis), 膜上出现许多小囊泡, 用滴管吸或用注射器上下吸打, 即获内翻泡。它是双分子层结构; 其内、外层正好与血影膜相反。

三、脂质体的制备

脂质体(liposome)是双层脂质包围一些水溶液的小滴,呈球形。它是最常用的人工膜之一。现在有条件将脂质体制成单层,直径为 25-30nm 左右,它是较为理想的生物膜模拟系统。

(一) 大脂质体制备

将适量的磷脂溶于氯仿等有机溶剂,置于旋转蒸发仪上蒸发至干,使玻璃壁上附有一层极薄的磷脂膜,然后加水溶液,并振摇,即可形成直径 1nm 左右的多层大脂质体。

(二) 单层脂质体的制备

1. 最简单的方法是将上述大脂质体用超声波处理,可获直径为 20-50nm 的脂质体。其不足之处是超声波可影响有些分子的结构与功能。

2. 微量注射法 将磷脂的乙醇溶液在一定压力下经小号注射器针头,注入缓冲液中,得到各种大小的脂质体,此法简单、容易重复和大量制备。

3. 去垢剂法 卵磷脂经胆酸钠溶解后,过 SephadexG-50 柱,除去胆酸,可获直径为 30nm 的脂质体。

如需获得大小均一的脂质体,可用超速离心或 Sepharose 2B 凝胶过滤来处理,超速离心法比较节省时间,且可获浓度较高的脂质体溶液。凝胶过滤法较为简单,但会被稀释或因吸附而丢失。

四、大鼠脑突触体膜的制备

其基本原理是将脑组织在预冷的 0.32mol / L 蔗糖溶液中进行匀浆,再利用脑突触体膜的蛋白质与脂的比例、电荷性质、颗粒大小、形状等不同于其它的细胞器膜进行蔗糖密度梯度离心,将其分离出来。

(一) 试剂与仪器

不同浓度的蔗糖溶液, 0.32mol / L、0.8mol / L 及 1.2mol / L 等; 50moL / L Tris 醋酸缓冲液, pH7.2。

制备型超速离心机、低温高速离心机和 Potter 匀浆器。

(二) 操作步骤

选用健康成年大鼠,体重 200~250g,断头放血处死动物,迅速取出大脑,并立即在冰盘上剥离大脑皮层部分,投入冰冷的 0.32mol / L 蔗糖溶液中,冰浴中用 Potter 匀浆器制备匀浆(1 000rpm,上下 15 个冲程),所得匀浆按示意图操作。经上述操作,可获完整的突触体膜结构。此法需要超速离心机,有时需克服渗透压梯度的影响,常用葡聚糖作为替代蔗糖的离心介质。

五、对生物膜的生物化学性质的研究方法

(一) 生物膜上结合酶的测定方法

膜结合酶是膜蛋白质重要组成部分之一,研究较为深入的是 Na^+,K^+ -ATPase。本节仅介绍此酶的测定方法。

1. 比色法 其基本原理是三磷酸腺苷(ATP)经ATPase的催化水解,成为二磷酸腺苷(ADP)和无机磷酸。通过测定所生成的无机磷酸的量,可间接测定ATPase的活性。 Na^+,K^+ -ATPase可被G-毒毛旋花苷(ouabain)抑制,先测出总ATPase活性,再测出用毒毛旋花苷-G抑制的ATPase活性,两者之差即为 Na^+,K^+ -ATPase活性。

此法一般实验室均可进行,其灵敏度有时难以满足研究的需要。因为,无机磷酸是在酸性条件下,与钼酸试剂生成磷钼酸,磷钼酸经还原后可形成钼兰,按颜色有深浅,在 660nm 处比色测定,计算无机磷酸的量。

2. 生物发光法 其原理是利用ATP、虫荧光素和虫荧光素酶形成腺苷酸-虫荧光素酶复合物而发光,其生物发光强度与ATP浓度成正比。当反应液中,ATPase与ATP作用一定时间,

测定ATP的消耗量,即测出ATPase活性。同时测定经C—毒毛旋花苷抑制 Na^+ , K^+ -ATPase后的剩余ATPase活性,两者之差即是 Na^+ , K^+ -ATPase的活性。

生物发光法的灵敏性和准确性均高于比色法,它可测出ATP的 nmol/L 级浓度,但需要一定的仪器设备,如生物发光计或液体闪烁计数仪。

(二) 膜脂质过氧化的检测方法

膜脂质过氧化是指膜成分中多不饱和脂肪酸的过氧化,是机体损伤的形式之一。从膜脂质过氧化角度探讨外源化学物的毒性作用,是目前毒理学研究的热点之一。检测膜脂质过氧化的方法可分为三类:氧耗的测定;羟基过氧化物的检测;脂质过氧化产物的检测。本节仅对脂质过氧化产物的检测方法加以叙述。

1. 硫代巴比妥酸(TBA)法 TBA法的原理是脂质过氧化的降解产物之一—丙二醛(MDA),可以与硫代巴比妥酸成色。在520nm处进行比色测定,可检测丙二醛相对含量的变化,以了解生物膜脂质过氧化的情况。

TBA法是一种非常简便的方法,一般实验室均可进行。此法与荧光法、化学发光法等有良好的相关性,但不足之处是灵敏度较差,某些因素应加以控制,如线粒体污染,样品中的铁离子等。

2. 荧光法 原理是脂质过氧化的降解产物丙二醛可与体内蛋白质、氨基酸发生反应,形成Schiff碱。它因有 $\text{N}=\text{C}=\text{C}=\text{N}$ 结构面具有荧光,利用荧光分光光度计测定其荧光的相对强度,可间接反映生物膜的脂质过氧化水平。

此法灵敏度高,约比TBA灵敏10-100倍,且可反映脂质过氧化产物丙二醛与体内蛋白质的相互作用,其不足之处在于荧光没有适当的标准品,一般测定的是相对水平,应设立对照组。

3. 其他 整体水平上进行脂质过氧化研究的方法,即从动物的呼出气中检出不饱和脂质过氧化形成的挥发性烃类或乙烷或戊烷的浓度,计算出脂质过氧化的水平。此法的优点是非创伤性检测。

较为灵敏的检测方法是化学发光法,它是测定脂质过氧化产生的自由基,尤其是链锁反应终止阶段产生的激发态羰基,其灵敏度高。不足之处是需较特殊仪器的化学发光仪或液体闪烁计数仪。

六、对膜的生物物理性质研究方法

(一) 膜流动性

膜流动性指膜中脂质分子和蛋白分子的运动。生物膜的流动性是膜的生物学功能所必须的,膜流动性与细胞功能如细胞生长、分化、受体功能和酶功能、膜融合等有着一定的关系。许多外源化学物可通过改变膜的正常流动性而引起细胞损伤。

1. 膜脂流动性

(1) 荧光偏振法:原理是用荧光标记分子1,6-二苯基-1,3,5-己三烯(1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene,DPH)或8-苯氨基-1-萘磺酸盐(8-anilino-1-naphthalenesulfonate,ANS)先将膜标记。DPN是测定膜疏水区流动性的标记分子。ANS有流动性,也能和蛋白质成非共价结合,它是反映膜表面性质变化的标记分子。

DPH是一种扁平长形分子,在膜脂质双层中,因疏水环境,其荧光强度明显增长,如在膜表面亲水环境中几乎不发荧光。当DPH嵌入膜中,与磷脂分子平行排列。如磷脂分子烃链相对不活动,则DPH排列整齐,用偏振光激发后,其发射的荧光变是偏振;如烃链活动加大,使其荧光的偏振度下降。所以,依据偏振度的大小,可判断膜脂流动性。偏振度越小,说明膜流动性越大,局部微粘度亦越低;反之亦然。

此法具简便、灵敏度高、重复性好的特点,可以反映膜的平均流动性。

用ANS可对膜表面性质有所了解:①通常是依据下列参数-ANS-膜复合物的荧光强度

变化反映外源化学物对膜表面性质影响；②膜上 ANS 的荧光量子产率可反映 ANS 分子周围环境的极性；③膜对 ANS 的结合量可反映膜表面电荷密度和膜表面分子的排列。

(2) 旋标记法及饱和转移自旋共振波谱法：原理是将能产生自旋共振的标记物结合在膜磷脂分子的不同部位，应用电子自旋共振波谱仪，测出磷脂分子不同部位的活动度，可分别探明脂极性头部，脂酰链中部及尾部的流动性。

此法可获得磷脂分子不同部位的更为细致的信息，不足之处是需较昂贵的电子自旋共振波谱仪和有经验的专业技术人员。

2. 膜蛋白质的运动 荧光漂白恢复法(fluorescence photobleaching recovery, FPR) 原理是假想细胞膜上某种组分结合着荧光染料，而这些组分又随机地分布在膜上。以适当的荧光标记分子如异硫氰荧光素标记膜蛋白质分子，在一个小的观察区中测量荧光强度 F。接着，用强功率的激光照射该部位，使原标记的蛋白分子上荧光染料产生不可逆的光化学反应—漂白。停止激光照射后，由于观察区以外的未被漂白的蛋白质分子向这一区域扩散，使之荧光强度逐渐升高。从荧光恢复曲线上，可算出蛋白质分子的扩散系统等。

运用 FPR 可获得膜蛋白的侧向扩散数据，并用以研究膜蛋白在膜上的状态、其运动性、脂质—蛋白质的相互作用、蛋白质—蛋白质的相互作用。该技术需要氩或氦离子激光发射器、荧光显微镜、荧光检测系统及数据处理等较为复杂的设备。

(二) 透性

生物膜是有高度选择性的通透屏障，对于水溶性小分子物质能迅速透过膜，对于大分子却不能通透。它在维持细胞的正常生理活动中起着重要作用。

1. 电特征参数的测定 生物膜的电特征参数包括导电性、电容及膜电位等。测定方法有瞬时和稳定的直流法，稳流稳压的交流法。

这些电特征参数与生物膜的成分，两侧环境和脂溶剂有关，电容测量的重复性好。

2. 荧光素释放法 原理是利用羧基荧光素的自猝灭性质。当包裹在脂质体内部，羧基荧光素的浓度较大，会产生猝灭而不显示荧光；当膜通透性改变，其从脂质体内向外渗漏，脂质体内因羧基荧光素稀释而出现荧光。依荧光强度的变化，反映脂质体膜的通透性改变。

(三) 结构的研究方法 生物膜主要由脂类与蛋白质通过非共价键结合形成，糖则通过共价键与某些膜的脂或蛋白质结合，其形态是呈薄片结构。用于研究膜结构的技术很多，X 射线衍射、顺磁标记、核磁共振、中子衍射、激光拉曼光谱、圆二色技术等，它们均需要仪器设备和受过专门训练的技术人员，再者，生物膜的组成与结构很复杂，目前这些技术仅能分析较为简单的膜。

第五节 分子生物学技术在毒理学中的应用

近十几年来，分子生物学理论和技术的发展，给毒理学研究提供了新的思维和研究工具，改变了毒理学研究的基本格局，使毒理学研究从经典的整体器官水平向细胞和分子水平飞跃。美国科学家 Marshall 于 1993 年在 Science 杂志上发表的题为“毒理学进入分子水平”的专题文章，标志着分子毒理学时代的到来。纵观近年来毒理学的发展历程，一些常用的分子生物学技术，如 PCR 技术、核酸杂交技术、DNA 测序技术以及一系列突变检测技术已广泛应用于外源化合物和环境致癌物引起的 DNA 损伤、基因突变、加合物形成及癌基因和抑癌基因研究等方面。特别是近年来基因差异分析技术、转基因技术、基因芯片技术等分子生物学新技术的建立和引入，大大提高了毒理学研究的整体水平。

一、PCR 技术

PCR(polymerase chain reaction)技术称聚合酶链反应技术，又称无细胞克隆技术(“free Bacteria” cloning technique)，是一种对特定的 DNA 片段在体外进行快速扩增的新方法。其

主要过程由变性、退火和延伸三个步骤反复的循环组成。首先,在高温下(95℃, 5min),待扩增的 DNA 双链受热变性,成为两条单链 DNA 模板;而后在较低温度条件下(37~55℃, 30s),两条人工合成的寡核苷酸引物与互补的单链 DNA 模板结合,形成部分双链;再在高温条件下(72℃, 2—5min),通过 DNA 聚合酶(Taq 酶)作用,以引物 3' 端为合成起点,单核苷酸为原料,沿模板以 5'—3' 方向延伸,合成 DNA 新链。这样,每一双链的 DNA 模板,经过一次解链、退火和延伸三个步骤的热循环后就形成两条双链 DNA 分子。

PCR技术的特点是可以合成特定的DNA片段和特定的DNA序列并以 2ⁿ倍数大量扩增。PCR技术的基本反应条件:①DNA模板,为特定的DNA片段;②耐热的DNA聚合酶,常用 Taq酶;③引物,系指两段与待扩增靶DNA序列互补的寡核苷酸片段,它是决定PCR扩增片段长度、位置和结果的关键;④4种核酸原料,即dNTP;⑤辅助因子,包括Mg²⁺、BSA、DMSO及缓冲液等,供酶促反应达最佳条件的各种因子。

PCR技术的应用特点:①操作简便,已有市售的PCR扩增仪可供选用,其操作较为简便。②省时,PCR每一次解链、退火和延伸循环,需数分钟。一般20-30个循环,可使靶DNA达数百万倍扩增,只需数小时。较常规方法快速。③灵敏度高。通常可从pS量级的DNA片段快速扩增到uS水平,以达到DNA序列分析、DNA克隆等方法的要求。④特异性强,PCR产物的特异性取决于引物的寡核苷酸与模板结合的正确性。⑤对原始材料的要求较低。由于PCR技术具有较高的特异性和灵敏度,因而有可能从很微量的靶DNA,获得满意的PCR产物。

由于PCR技术的上述优点,已广泛用于毒理学的各个研究领域。本节仅以某些方面为代表对PCR技术在毒理学中的应用加以叙述。

(一) PCR-单链构象多态性分析技术

PCR-单链构象多态性分析(PCR-single-strand conformation polymorphism, PCR-SSCP),是用于基因分析和检测的方法之一。原理是单链DNA分子在变性的聚丙烯酰胺电泳(PAGE)中电泳迁移率随其构象的变化而改变,而单链DNA分子的构象变化既可由DNA多态性引起,又可由基因突变引起,因而可根据电泳迁移率判断DNA的多态性或基因有无突变,亦即根据泳动率的差异而将变异DNA与“正常”DNA进行比较并加以区别。该技术不能确定基因变异的类型和部位。

PCR-SSCP分析包括PCR扩增和单链产物电泳两个步骤。

(二) 免疫PCR

免疫PCR(immune PCR)是利用抗体与DNA特异性结合来检测抗原,把抗原抗体反应与PCR联合应用而建立的一种抗原检测系统。它的原理是采用一个具有同时与DNA和抗体分子特异结合能力的中介分子,其一端与作为标记物的DNA连接,另一端与抗原-抗体复合物连接,形成一个特殊的抗原-抗体-DNA连接物。作为标记物的DNA分子可用PCR扩增,如存在特异的PCR产物即表明作为标记物的DNA分子已特异地与抗原-抗体复合物结合,也证明了抗原的存在。此法抗原检测的灵敏度大为提高,与采用碱性磷酸酶的ELISA法相比,约提高105倍;与放免分析相比较,也高出几个数量级。但此法不足之处是影响其灵敏度的因素较多,如连接物浓度、抗体的浓度、PCR循环周期数及PCR产物的检测方法等。

(三) 逆转录PCR

逆转录PCR(reverse transcription PCR, RT-PCR)是一种间接扩增的RNA并进行检测的方法。原理是先将RNA逆转录为cDNA链后,进行常规PCR扩增,通过对扩增产物的检定,来推测mRNA的量。RT-PCR技术可将RNA检测灵敏度提高几个数量级,使极微量的RNA样品分析成为可能。

在RT-PCR中关键步骤是RNA的逆转录,对RNA要求较为严格,作为模板的RNA,

分子必须完整,且不含 DNA、蛋白质和其它杂质。因为, RNA 如混有 DNA, 会出现非特异性扩增; 如蛋白质未除净, 将影响逆转录和 PCR。一般采用酸性硫氰酸胍-酚-氯仿法提取理想的 RNA。常用的逆转录酶有两种, 即禽类成髓细胞性白血病毒(Avian myeloblast leukosisvirus, AMV)的逆转录酶, 和莫洛尼鼠类白血病毒(Moloney murine leukemia virus, Mo-MLV)的逆转录酶。

该法的不足之处是因其灵敏度较高, 应注意非特异性扩增, 排除假阳性的结果。

二、细胞程序性死亡及其检测方法

细胞程序性死亡(programmed cell death, PCD)是一种与遗传机制有关的、主动的自发性死亡方式, 并在形态和生化上出现一系列特征表现。具有这些特征表现的细胞称为细胞凋亡(apoptosis)。细胞凋亡与细胞坏死(necrosis)的概念不同, 坏死是指体内、外致损伤因素作用达到一定强度、持续一定时间后, 所导致的细胞死亡, 它表现为细胞及细胞器肿胀、碎裂和溶解等。而细胞凋亡的特征表现是胞内水分丢失, 胞浆浓缩, 胞膜结构完好, 细胞核浓缩聚集于核膜边缘, 形成新月形。到晚期, 细胞核碎裂成小片, 胞浆分割, 形成由细胞膜所包绕的含有核碎片的小体, 称为凋亡小体(apoptotic body)。

细胞程序性死亡的深入研究, 在揭示细胞损伤的发生、发展的分子机制以及探索新的中毒防治方法等方面均有重要意义。在基因调控下, PCD 是一种重要的生理过程。例如, 在胚胎发育过程中, 正常形态和脏器的形成, 必然伴随着某些特定细胞群的死亡。这些细胞群的死亡是受基因控制, 且准时发生, 所以称为细胞程序性死亡。如果细胞 PCD 失常, 无论是增强(即不应该发生 PCD 的细胞发生)或被抑制(应该发生 PCD 的细胞未曾发生), 均可导致机体的损伤。例如: ①致畸作用, 在胚胎发育过程中, PCD 受到影响, 无论是增强或抑制均可导致畸形。目前认为对 PCD 的影响是导致畸形的机理之一。②肿瘤的发生有两种情况, 一是激素依赖性肿瘤, 如乳腺癌、前列腺癌的发生与 PCD 受抑制有关; 二是 p53 基因突变肿瘤, p53 为抑癌基因, 它对 PCD 有促进作用, 可抑制肿瘤的发生。而突变型 p53 基因则对 PCD 有抑制作用。③自身免疫性疾病, 它与淋巴细胞的阴性选择(negative selection)有关。正常情况下, T 淋巴细胞在胸腺分化发育过程中, 通过严格的选择机理, 使那些 T 细胞抗原识别受体基因发生错误重排的细胞, 以及识别自身抗原并导致自身免疫病的 T 细胞发生 PCD, 该过程涉及 95% 以上的 T 细胞, 而仅有不足 5% 的 T 细胞分化成熟并迁移至外周。如该过程的凋亡受到抑制, 则会引起自身免疫性疾病。④缺血性损伤, 如心肌梗死和再灌注损伤均与凋亡作用增加有关。

(一) PCD 的模型及建立

1. 培养细胞模型 可通过下列方法: 加入糖皮质激素; 撤除培养液中的细胞生长因子; 各种物理因素(如高热 43.5℃, 紫外线照射等); 各种化学物的加入, 如喜树碱。

2. 整体动物实验模型 常用缺血方法建立整体动物的细胞凋亡模型

(二) PCD 的检测方法

目前已建立的 PCD 检测方法有很多种, 且还在继续发展。但至今为止, 已建立的任何检测方法均只有相对特异性, 在判定一种未知细胞死亡的发生或类型时, 必须结合形态学、生物化学及其它检测方法进行综合分析, 才有可能获得较可靠的结果。

1. 形态学观察法 主要依靠光学显微镜或电子显微镜观察细胞凋亡的形态学特点。观察材料可以是石蜡切片、冰冻切片或细胞涂片。形态学观察可用 HE 染色或荧光染料 PI、DAPI 等染色。

凋亡细胞的形态学特点: 在早期核浓缩, 染色质浓集靠边形成新月形, 胞浆浓缩; 晚期细胞核断裂形成大小不等的核碎片, 胞浆胞膜亦发生断裂, 形成有膜包绕的含核碎片的凋亡小体。细胞凋亡的超微结构改变: ①核: 早期可见染色质浓集靠边, 在核膜边集形成新月形, 晚期则核发生断裂并形成有核膜包绕的浓集核碎片; ②胞浆: 水分丢失、浓缩, 线粒体等细

胞器结构完整；③细胞质膜：完整，逐渐形成许多芽状小沟，晚期小泡断裂，形成有包膜包裹的含有细胞器和 / 或浓缩核碎片的小体，即凋亡小体。

该法的优点为：简便、经济；可对典型的细胞凋亡进行定性观察；检测过程中可保持细胞与周围组织的结构关系；能对 PCD 的发生、发展有初步了解并进行定位。不足之处是特异性差；不能进行定量评价。

2. 电泳检测法，原理是在细胞发生凋亡时，由于内源性核酸酶的激活，DNA 被有规律地切割成约 180bp 或其倍体的双链 DNA 片段，在凝胶电泳上可形成梯带，即具有凋亡的特征 DNA 梯带(DNA ladder)。

对于小分子量 DNA 片段，约 180bp，可进行凝胶电泳。对于早期大分子量 DNA 片段，约 50~300bp，则需进行脉冲电泳。

本法的优点：定性准确，并可进行定量检测；操作简便易行。不足之处是无法对细胞形态学及其与周围组织结构的关系进行观察；需一定的样本量。

3. 免疫学方法(ELISA法) 免疫学方法的原理是在发生凋亡时，细胞DNA断裂主要发生在核小体间区。由于其中组蛋白H₂A、H₂B、H₃及 H₄的DNA组蛋白复合物结合极紧密，不易被切断，因而形成许多含组蛋白的DNA片段，可用抗H及抗DNA的混合物与之反应，形成夹心结构，再经过显色及比色判断凋亡。

此法可进行细胞凋亡的定性和定量的检测，但不能进行细胞凋亡的组织定位。

4. 末端转移标记法 末端转移标记技术是利用在发生凋亡时，DNA 链被激活的内源性核酸内切酶切割成许多 180bp 左右的双链 DNA 片段。这些片段均含有 3'-OH 末端，在末端转移酶或 DNA 多聚酶，(TdT 酶)作用下，加入已标记的核苷酸或核苷酸混合物，再经过酶显色或用荧光抗体使之显示出来。

该法的优点：可进行原位标记，保持细胞及组织结构；进行定性定位；特异性强；可进行定量检测。其不足之处是虽有市售的试剂盒，使操作简化，但价格昂贵；当混有较多的坏死物时，会造成假阳性。

5. 细胞分析仪检测法 常用的细胞分析仪有两类，一是流式细胞分析仪，可对单个细胞悬液中的单个细胞进行检测。二是细胞形态分析仪，可对载玻片上单个细胞进行检测。

流式细胞分析仪是借助细胞标记技术和计算机分析技术，可快速检出发生凋亡的细胞。其原理是在正常增殖状态的细胞，处于不同周期时相，即G₀ / G₁, S₁, G₂ / M期，其DNA含量分布在 2n~4n之间；。如细胞发生凋亡，由于核内DNA片段裂解成许多小片段，用细胞膜通透法使小分子量的DNA片段穿过细胞而丢失，仅剩下大片段的DNA。这些失去部分DNA的细胞可形成DNA含量<2n的分布区，通常称为亚G₁峰。流式细胞仪检测有亚C₁峰的细胞，判断细胞是否发生凋亡。该法的优点是检测速度快；定量分析准确；可结合细胞周期，间接判断凋亡细胞发生于哪一细胞周期时相。其不足之处是需要特定的仪器，且价格昂贵和需一定的操作技巧；不适于小样品量的分析；不典型的凋亡或混有大量坏死的细胞可影响分析结果。

细胞形态分析仪检测凋亡细胞的原理是利用末端转移酶标记，即对凋亡细胞中许多 180bp 的双链 DNA 片段的 3'-OH 末端，用末端转移酶或：DNA 多聚酶，加入已标记的核苷酸进行标记，再用 DNA 荧光染色，应用细胞形态分析仪：即可显示出不同周期时相细胞的凋亡情况。该法优点除同上述流式细胞仪外，还可同时进行形态学的观察。其不足之处是需一定条件和设备；难以区别不典型的凋亡和混有大量的坏死细胞。

三、毒理学中的 mRNA 定性定量的测定方法

许多外源化学物和内源性活性物质皆可引起基因表达的改变，主要是基因转录水平的变化。对 mRNA 的测定在此类研究中尤为重要。常见的 mRNA 测定方法有四类：多聚腺苷酸的分析；分子量测定；mRNA 化学分析(如指纹图谱和核苷酸组成分析等)及分子杂交分析。

现就分子杂交分析中常用的方法重点加以介绍。

(一) Northern 印迹分析

Northern 印迹分析(Northern blot analysis)是广泛使用的 mRNA 测定方法之一,其基本原理是将 RNA 固定于带电荷的膜上,用特定的 RNA 探针与其杂交。探针是一种分子,它带有供反应后检测的合适标记物,并仅与特异靶分子反应。根据标记方法不同,探针可分为放射性探针和非放射性探针。根据核酸的性质可分为 DNA 探针、RNA 探针、cDNA 探针及寡核苷酸探针等。杂交系指特定的探针与特定的 DNA 或 RNA 单链的碱基有一定程度的互补顺序,形成杂交双链,使所需的 DNA 或 RNA 由众多的 DNA 或 RNA 分子中分离出来,再依据探针上标记物,对所需的 DNA 或 RNA 进行定性或定量的分析。

Northern印迹分析的主要步骤:分离总RNA或多聚(A)⁺RNA;按RNA分子大小进行分级分离;转移和与特定探针杂交;测定杂交分子。保证成功分离RNA的关键因素是无菌操作、无RNase条件的可靠性和RNA制备过程的敏捷程度。在失活条件下,RNA部分分离通常是在1%-1.5%琼脂糖凝胶上进行的。然而,采用尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,将待测的RNA转移到带电荷的尼龙膜或硝基纤维膜上的方法很多,如毛细管转移法、真空印迹法和电泳印迹法等。将待测的RNA转移到带电荷的膜上后,与用放射性标记或非放射性标记的cDNA寡聚核苷酸或抗RNA探针进行杂交。杂交的条件取决于RNA的大小、探针退火温度等。标准杂交条件可参见Sambrook在1989年所做的cDNA与高度同源RNA杂交的条件。为了增加特异性和灵敏度,可对标准条件进行某些调整。与寡核苷酸探针杂交时,需要小心选择杂交条件,以便既保持特异性又不降低检出极限。利用cDNA制备的反义RNA探针,插入有T₇、Sp₆或T₃病毒启动基因,可提供较高的灵敏度,对于表达水平相对较低的mRNA极为有用。但是,有时RNA探针可与28s或18s核糖体RNA杂交,造成假阳性。所以对于RNA探针应严格地选择杂交和洗涤条件。

(二) 液相杂交法

液相杂交法(solution hybridization method)的基本原理是在溶液中,mRNA与单链RNA或DNA探针杂交,然后将过量的探针消化,在尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳上按分子的大小分离RNA-DNA或RNA-RNA杂交体,对杂交分子进行定性或定量分析。液相杂交法的主要步骤:①将总RNA或多聚(A)RNA与一已标记的探针进行杂交。例如,均匀标记的DNA或由含有100-300bp的探针较为理想。②杂交结束后,可利用S₂核酸酶或RNaseA分别消化过量的DNA或RNA探针。RNA-DNA或RNA-RNA杂交体对于核酸酶较为稳定,故可被保留。然而,要求探针与待测mRNA之间应为100%同源。否则,由于探针与RNA之间的错配,会引起不完全杂交,其杂交体对核酸酶较为敏感,导致杂交体出现裂痕,引起杂交体被消化,产生多条带。③RNase保护性测定是液相杂交法中广为接受的方法,现已有商品化的试剂盒供应。该法需要严格的无RNase条件,拥有至少100bp对cDNA序列的质粒及100%的同源性。

(三) 反转录酶-多聚酶链反应法

反转录酶-多聚酶链反应法(reverse transcriptase-polymerase chain reaction method, RT-PCR)在前已述及,在此不重复。

此法对于检测单细胞或有限的组织中低表达水平的mRNA非常适用。然而,定量测定mRNA必须在相同条件下和线性扩增范围内设立适当的反转录扩增和标化或具有RNA特性不变的mRNA等各种对照。

(四) 原位杂交法(in situ hybridization)

前述各种方法均可用于细胞或组织中mRNA定性和定量的测定。然而,它们不能提供直观的基因表达是发生在整个组织中那些细胞或器官的那些区域。原位杂交法可鉴定在组织中少数细胞内基因表达发生的变化,它不仅可提供关于特定mRNA的相对表达情况,而且

可提供涉及基因表达调控的细胞定位。原位杂交可用于观察在某一特别细胞类型中基因表达的调控状况。

原位杂交的主要步骤为：在切片上将组织固定；溶解细胞；消化蛋白质和 DNA；与特定 DNA 或 RNA 探针的杂交；杂交分子的测定。原位杂交应注意下列问题：①仔细选择固定步骤，提供适当的形态结构，保证 RNA 不被抽出和发生位置的改变。②最好选用 30~300bp 的 RNA 探针，而不用双链 DNA 探针。因为，DNA 有自身退火作用，可使其与 RNA 杂交的有效量降低。使用 RNA 探针还有较低的本底。③实验最好重复一次，并设立阳性对照组，以保证实验结果的可信性。

(五) 结束语

mRNA 定性与定量方法有许多可供选择。利用商品化试剂有许多方便，但对所选用的方法可根据实际情况有所变动和改进。例如：mRNA 有中、高水平表达时，即可用 cDNA 探针，利用 Northern 印迹分析也可取得良好结果。在有些条件下，如 mRNA 序列是未知的，或 cDNA 几乎达不到 100% 同源，应对标准的 Northern 印迹分析方法加以改变。RNase 保护测定较 Northern 印迹分析更为灵敏，且有商品化的试剂盒供应，操作相对简便，但需要有 T₇、T₈ 或 SP₆ 启动基因的质粒和与 RNA 100% 同源，至少有 100bp 的 cDNA 顺序。RT-PCR 方法的建立可检测有限数目细胞中几个的 RNA 复制品，由于此法的简便和极为灵敏，因此很受重视。然而，它要求适当使用阳性和阴性对照以及反转录效率对照，测定中所用的 RNA 的量、扩增效率以及引物的效率与可信性等亦甚重要。

随着原位 RT-PCR、聚焦激光扫描显微镜和数字图像处理技术等现代技术的发展，可能利用这些强有力的工具研究基因表达和外源化学物对基因表达调整的影响。

四、转基因动物

(一) 转基因动物的产生

转基因动物(transgenic animal)是指体内基因组中稳定地整合有外源基因的动物，其外源基因可遗传给后代。用此种方法可建立转基因动物模型，以研究外源基因在整体动物中的表达调控规律；可改变动物基因型，使其表现型更符合人类需要；也可用转基因动物产生人类所需的生物活性物质。早在 1974 年 Jaenisch 等将病毒 SV40 的 DNA 注入小鼠的胚胎，发现 40% 子代鼠的器官中整合有外源基因，首次成功地培育了转基因动物，1982 年，Palmiter 等用显微注射法，将小鼠金属硫蛋白启动子和大鼠生长激素基因拼接转入小鼠受精卵的原核中，得到 7 只转基因小鼠，其中 6 只生长加快，体型明显增大，被称为“超级小鼠”，显示出了通过转基因技术改良生物性状的可能性。1980 年代转基因动物技术发展迅速，主要应用于基因表达调控的研究。转基因兔、猪、羊及牛的制备相继获得成功。现在转基因动物模型广泛应用于生物医学各个领域，其中应用最多的是转基因小鼠。

(二) 转基因动物模型的构建

1. 目的基因的构建 建立转基因动物首先要构建欲研究的目的基因，亦称为“转基因”(transgene)。因研究目的不同，目的基因的构建也不尽相同，一般认为一个标准的转基因应包括编码序列以及使之能有效表达的调控元件，如转录起始位点、5' 非翻译区、翻译起始密码子、编码区、终止密码子、3' 非翻译区和一个 PolyA 位点等。在这些成分中启动子至关重要，不同的启动子不但可以决定目的基因的表达效率，还可以决定表达的组织，如果利用组织特异性启动子，则转基因仅在特定的组织中表达，如果用一个普通表达的启动子，则转基因可以在多种组织中表达。

2. 目的基因的导入 根据导入基因的方式不同，建立转基因动物的方法主要有原核显微注射法、逆转录病毒感染法与胚胎干细胞植入法。

(1) 原核显微注射法：这是最常用的方法(Jaenisch, 1988)，此法大体可分为几个步骤：①准备假孕动物。以输精管结扎的雄性动物与可育雌性动物交配，交配后雌性动物不会受精，

但能产生一系列妊娠变化而成为假孕动物；②收集受精卵。用妊娠的马血清及绒毛膜促性腺激素(HCG)使雌性动物排卵并与可育雄性动物交配，次日从输卵管内收集受精卵以备显微注射，正常情况下小鼠每次排卵6~7个，用激素诱发每次可排卵30~50个；③用显微注射的方法将外源基因直接注入受精卵的雄性原核内。受精卵的直径一般是70 μm，用于注射的玻璃针的直径是0.75 μm，通常向每个受精卵注入的溶液中含100~200个DNA拷贝的外源基因；④将注入目的基因的受精卵植入假孕动物的输卵管内，使其生长发育。注射过的受精卵应稍加培养，确定其仍存活后方植入假孕母鼠的输卵管或子宫中。每只假孕母鼠一次可植入25~30个注射过的受精卵，孕19~20天后产仔。

显微注射法制备转基因小鼠的优点：①任何DNA序列(可大到50kb)都可以直接导入原核内；②整合效率高，约25%的新生小鼠带有一个或多个拷贝的外源性DNA；③由于整合通常发生于卵裂前，大部分转基因小鼠的所有细胞包括生殖细胞都带有外源基因。显微注射法的缺点：①装置昂贵，对操作人员技术要求较高；②外源基因通常是多拷贝以“头尾串联”的方式随机整合到宿主染色体的同一位点上，这种排列可能会妨碍基因表达的正常调节，使整合部位的染色体DNA发生大片的突变，造成转基因动物个体的发育障碍甚至死亡。

(2) 逆转录病毒感染法：这是近些年来发展起来的高效基因转移技术，转化率可达100%。重组逆转录病毒内含有目的基因、病毒LTR(长末端重复序列)和包装序列(ψ)，但没有病毒蛋白的基因。 ψ -2细胞是经辅助病毒感染后的NIH3T3细胞。辅助病毒内无 ψ 序列而有病毒蛋白基因。当重组逆转录病毒进入xlt-2细胞后，不仅其中含目的基因，而且两组缺陷的序列相互补充，此时的重组逆转录病毒具有完整序列，可以形成完整的病毒颗粒。用这样的病毒再去感染受体细胞就可以实现基因转移的目的。这种方法的主要优点是转移效率高，缺点是易激活宿主癌基因。

(3) 胚胎干细胞植入法：胚胎干细胞是指胚胎囊胚期的内细胞团中未分化的胚细胞，这种细胞具有高度分化的潜能。将携带外源基因的具有高度分化潜能的胚胎干细胞注入受体囊胚，所发育成的个体一部分组织中可整合外源基因并可在特异组织中表达。这一方法的优点是囊胚腔易于注射，整合率高，可达50%。其主要困难在于建立胚胎干细胞系。

3. 转基因动物筛选及繁育转基因品系 目前，最常使用的显微注射法转基因整合的效率仍不太高，一般15%~30%注射过的受精卵可发育成子代，在所生的子代中约有10%~20%在生殖细胞基因组中整合有转基因。检测转基因动物成功与否，即目的基因是否已整合入受体动物基因组中和有无表达，需进行基因表达检测。可检测生后动物基因组，或检测胚胎组织基因组，确定是否有外源DNA，以证明目的基因是否已整合入受体个体中，在此基础上，再进一步分析RNA及蛋白的水平。

转基因子1代称为“首建鼠”，首建鼠的确定要通过基因检测，一般用PCR或southern blot方法进行，检测组织一般用小鼠尾部。由于外源基因的注射和整合是在受精卵第一次分裂之前，首建鼠所有的细胞(包括生殖细胞)将是转基因的杂合子。转基因的表达水平受多种因素的影响，包括启动子的效率、整合的基因拷贝数以及基因的整合位点。如果转基因能有效表达，可通过繁育建立转基因纯合子小鼠。繁育的方法是先杂合子首建鼠与非转基因小鼠交配，产生的杂合子同胞兄妹进行互交即可获得转基因纯合子小鼠。用转基因纯合子小鼠交配、繁育可以建立一个转基因鼠系。

(三) 转基因动物模型在毒理学中的作用

1. 致突变检测模型 Lohman于1987年首次提出，转基因啮齿类动物突变测试系统在致突变机制研究中有潜在应用价值。1989年Gossen等报道了LacZ转基因小鼠突变测试系统。LacZ是一种细菌的酶，其活性可以用体外比色的方法测定。将LacZ转基因小鼠暴露于公认的突变剂，然后分析转基因小鼠LacZ转基因的突变率，方法是将从LacZ转基因小鼠组织中提取的LacZ基因克隆入质粒载体并在细菌中表达，无LacZ活性的细菌克隆数与LacZ

的突变率相对应,而 LacZ 基因的突变率与致突变化学物质的体内致突变作用相关。近年来,国外已陆续发展了多种用于突变检测的转基因动物,其中三种已投入商品化生产, MutarM 小鼠、BigBlueTM 小鼠和 Xenomouse 小鼠,它们分别采用大肠杆菌乳糖操纵子的 LacZ 和 / 或 LacI 作为诱变的靶基因。

利用转基因小鼠进行活体内致突变测试,需在给药后或染毒后从小鼠体内分离导入载体。其过程为先提取小鼠不同器官或组织中的基因组 DNA,然后利用体外包装提取物,分离得到导入的载体,包装完的噬菌体转化 LacZ—E. ColiC 株,再接种至含 X-gal 的培养基中,计数噬菌斑。突变率为无色噬菌斑数与蓝色噬菌斑数之比,而突变类型可通过测定 LacZ 的序列得知。

近几年采用对半乳糖敏感的 galE-E. Coli 宿主菌,建立起了仅能使突变 LacZ 噬菌体生长的选择体系,从而极大地减少了计数噬菌斑的工作量。此外,Gossen 等(1994)报道了用质粒载体制备的转基因小鼠,此方法首先从基因组 DNA 中用限制性内切酶切下含 LacZ 的质粒,再用和磁珠结合的 Lac 阻遏蛋白与质粒偶联,分离得到质粒。质粒载体基因长度仅为噬菌体的十分之一,且对 Lac 阻遏蛋白结合的磁珠具有高效吸附能力,有利于提高分离质粒的效率,可一步纯化大量质粒,减少工作量。

现在国内外已建立了十多种转基因突变检测模型。与经典的 Ames 试验比较,转基因动物突变测试体系有许多优点,它是在活体内测试,可动态观察突变率,且在小剂量范围内进行,结果可靠;可测定包括生殖细胞在内的器官或组织的突变率和突变类型。但由于用转基因动物进行突变测试研究的时间不长,积累的实验资料少,要成为常规的突变筛选方法尚需许多工作要做。需建立一套标准的操作规程,如确定给药至测试突变的时间、应计数的菌斑数、确定测试的器官和组织、每组的动物数等等。还需建立可测试大片段 DNA 损伤的测试体系,并尽可能降低费用以利于推广。为了降低靶基因的自发突变率,亟待设计更好的靶基因,从而提高转基因动物突变测试体系的敏感性。

2. 致癌检测的模型 利用该类模型可了解基因的改变与肿瘤的关系,进而了解外来物质的致癌作用机理。利用转基因动物将是此种研究的一个有力工具,且业已应用于实际的环境化学物的致癌物评价。

研究发现,药物和化学物质对 Lac I 转基因小鼠模型的致突变力和致癌力之间存在良好的相关性。通过定量分析一些已知致癌物的微核试验和染色体畸变试验与啮齿类动物长期致癌试验的资料,发现给予 50 倍 TD₅₀ 的总剂量可使 LacI 的突变率加倍,LacI 转基因小鼠暴露于致癌物 250 天,其检测的灵敏度与长期致癌试验近似。

利用基因打靶技术制备转基因小鼠,已成为研究抑癌基因(如 p53 基因、Rb 基因)在肿瘤形成过程中所起作用的重要手段。人类的 p53 基因突变被认为是最常见的与癌症发生有关的遗传损害。用置换载体,正、负双向选择法制备的带无效 p53 等位基因的小鼠,其最显著的表型是肿瘤的高度易感性。实验发现,p53 基因缺陷小鼠暴露于低剂量的二甲基亚硝胺后,肝脏血管肉瘤的形成较野生型小鼠快,生存时间明显缩短。这类小鼠受射线照射后胸腺细胞程序化死亡减少,其成纤维细胞受射线照射后不能停顿于细胞周期的 G₁ 期,DNA 损伤不能修复,表明 p53 基因的作用是保护基因组的完整性。而 p53 基因缺陷的细胞在 DNA 损伤后发生突变积累和染色体重排,致使这些细胞具有某种生长优势,最终形成肿瘤。

DNA 损伤修复能力是肿瘤易感性的重要因素。为了阐明在自发性和化学致癌过程中 DNA 损伤修复的保护作用,国外已培育出了表达 DNA 损伤修复基因(如烷基转移酶)的转基因小鼠。烷基转移酶能把鸟嘌呤 06 位的烷基转移至烷基转移酶活性位点半胱氨酸残基上,从而去除了 DNA 加合物。Gerson 等(1994)研究发现,烷基转移酶转基因小鼠去除 06 甲基鸟嘌呤 DNA 加合物的速度快,暴露于 N-亚硝基类化合物后胸腺淋巴瘤和肝脏肿瘤的发病率均下降,说明烷基转移酶能阻断 N-亚硝基类化合物的致癌过程。

3. 其他毒理学机制研究模型 CYP3A7 为人胎儿肝脏细胞色素 P450 的主要形式,是导致化学物质具有致畸性和致癌性的催化酶之一。中国仓鼠肺细胞导入 CYP3A7 的 cDNA 后,对霉菌毒素的敏感性升高。把 CYP3A7 转基因小鼠与剔除了 p53 基因小鼠交配,培养出带有 CYP3A7 基因 / p53 缺陷的小鼠,其肝细胞具备不死性,且具有 CYP3A7 酶的催化活性,提示这些细胞不仅可用于化学物质的人胚胎毒性研究,同时还为研究生物转化酶在中毒过程中的作用提供了有效的工具。

一般认为氧自由基参与一些药物和辐射的中枢神经系统毒性反应,但尚缺乏直接的证据。Cadet 等(1995)报道,一次或多次给予亚甲基二氧基麻黄碱(MDMA)后,正常小鼠纹状体中多巴胺和二羟苯乙酸(DOPAC)均明显减少,而导入超氧化物歧化酶基因小鼠的多巴胺与 DOPAC 无明显变化。结果说明使用 MDMA 之类药物,会使机体内自由基水平升高,通过某种机制,造成多巴胺代谢中断,表现出神经系统的中毒症状。3-硝基丙酸(3-NP)是一种作用于线粒体、选择性地损害纹状体的毒素,利用上述转基因小鼠揭示了氧自由基在 3-NP 的神经毒病理变化中起着重要作用。

Sell 等(1995)用乙型肝炎病毒(HBV)转基因小鼠进行黄曲霉毒素 B1(AFB1)诱癌试验,结果表明 HBV 有与 AFB1 协同致肝癌作用。励雁峰等(1997)测定了 HBV 转基因小鼠肝脏中与 AFB1 代谢有关的细胞色素 P450 酶的含量和活性、GSH 和 GST 的含量和活性,并测定 HBV 转基因小鼠暴露于 AFB1 后血清 AFB1-白蛋白加合物的含量,结果显示加合物的含量在 HBV 转基因小鼠都较对照小鼠高,细胞色素 P450 酶含量明显降低,GSH 含量和 GST 酶活性都明显下降,说明 HBV 转基因小鼠解毒代谢能力下降,使小鼠对 AFB1 敏感。

4. 转基因动物应用于毒理学研究的特点

(1) 可根据需要导入目的基因:毒理学研究的目的之一就是要揭示毒物危害的本质,我们可以筛选对毒物敏感的目的基因,在分子水平上研究毒物的危害。

(2) 敏感性高:因为导入的外源基因对遗传损伤敏感性高,导入动物体内后其敏感性仍高,可在低剂量下检测,特别适宜于观察慢性低水平接触时的 DNA 损伤。

(3) 结果真实可靠:因为转基因动物是一完整生命体系,繁殖多代后仍能带有目的基因,某些特性与人类接近,这就从根本上优于以前的体外检测系统,所得到的结果具有很高的真实性。

(4) 可回收导入的基因:可从动物基因组中回收导入的基因以进行突变的精细研究,如测序、测定突变谱等。

(5) 节省实验开支:传统致癌试验一般需一年以上,以带有某种致癌基因的转基因动物致癌试验 3 个月左右就能完成,而且比较敏感,因此可节省人力物力。随着科研用途转基因动物的商品化,这一检测体系必将日益推广。

五、基因芯片技术

(一) 基因芯片技术基本原理及其制作

基因芯片技术是近年兴起的一项前沿生物技术,它可以将生物学中许多不连续的分析过程移植到固相的介质芯片上,并使其连续化和微型化,这是对传统生物技术如 DNA 杂交、分型和测序技术等的重大创新和飞跃。由于横跨生命信息、生物、物理等众多研究领域,涉及生命科学、化学、微电子技术、计算机科学、统计学和生物信息等诸多自然学科,故已成为当今多学科交叉、综合的前沿研究热点。基因芯片技术虽然仅有几年的发展历史,但在生命科学诸多领域已显示出巨大的潜力和诱人的前景,其应用也开始渗透到毒理学研究领域。

基因芯片(gene chip),又称 DNA 芯片,是指将许多特定的寡核苷酸片段或基因片段作为探针,有规律地排列固定于支持物上,然后与待测的标记样品的基因按碱基配对的原理进行杂交,再通过激光共聚焦荧光检测系统等对芯片进行扫描,并配以计算机系统对每一探针上的荧光信号作比较和检测,从而迅速得出所需要的信息,分析出待测样品 DNA 序列。生

物芯片(biochip)还包括正在研制的蛋白质或肽芯片、组织原位芯片等类型。

基因芯片利用核酸杂交原理检测未知分子。它是由核酸片段以预先设计的排列方式固定在载玻片或尼龙膜上而组成的密集分子排列。其技术制作主要有二种方式：一种方式是在固定面上按设计方式固定不同的靶分子(DNA 或 RNA)与游离的探针杂交。另一种方式是在固定面上化学合成一系列寡核苷酸探针与游离的靶分子杂交。杂交信号的检测是根据杂交分子或未杂交分子所发出的不同波长的光实现的。荧光信号是由激发探针或靶分子上的荧光素放出的荧光信号被检测器及处理器处理从而得知分子杂交情况。检测器及处理器由激光共聚焦显微镜及电脑组成。

第一种基因芯片的制作方式也称离片合成法(off-chipsynthesis)。首先制备出单个探针, 这些探针可以是克隆探针, 如DNA探针、cDNA探针等, 也可是化学合成的寡核苷酸探针。然后将这些探针按一定的顺序固定在经过衍生化处理的固相载体表面。所用的固相载体一般为载玻片或聚丙烯薄膜等。载玻片用多聚赖氨酸等包被, 经过分区然后用电脑控制的机械手点上靶DNA分子, 点样量很小约为 $0.005 \mu\text{l}$ 。靶分子的排列按设计顺序, 不同靶分子点在不同区域内。每块芯片约为 $1\sim 2\text{cm}^2$, 上样可达数千至一万个, 自动化程度的提高可使芯片上靶DNA密度更高, 即芯片密度更大。可将玻片上覆盖薄层聚丙烯酰胺凝胶作为支持将化学方法合成的探针点于各个区域内制成DNA芯片, 然后与荧光标记的靶DNA杂交, 区域大小为 $40\times 40 \mu\text{m}$ 和 $100\times 100 \mu\text{m}$, 间隔分别为 $80 \mu\text{m}$ 和 $100 \mu\text{m}$ 。

第二种基因芯片制作方式也称在片/原位合成法(on-chip/in situsynthesis)。即在固相支持物玻片上直接合成探针。采用这种方法时, 可以在常规DNA合成技术基础上, 采用特制的多通道自动加样系统, 直接在活化过的固相载体表面合成众多寡核苷酸探针。Fodor(1991)及Pease(1994)等采用了光刻技术, 在固相合成载体表面合成高密度的寡核苷酸探针阵列, 这种方法合成寡核苷酸芯片具有快速高效、芯片上的探针密度高等优点。合成反应是在光导下完成的。具体方法是在经过处理的玻片表面铺上一层连接分子(linker), 其羟基上加有光敏保护基因, 可因光照而除去。用特制的光刻掩膜(photolithographic mask)保护不需合成的部位, 而暴露合成部位, 在光作用下去除羟基上的保护基因, 游离羟基, 利用化学反应加上第一个核苷酸。所加何种核苷酸及部位经事先设定, 可一次多个部位引入同样核苷酸。所引入核苷酸带有光敏保护基因。然后按上述方法加上另外三种核苷酸则完成探针上第一位核苷酸的合成。探针上每一个核苷酸的延伸则需四步反应, 每一步反应均需新的特制的光刻掩膜, 以利暴露合成部位, 保护不合成部位。利用这种光导的合成反应, 几乎可得到全部可能序列组成的探针, 按预先设计好的顺序排列在玻片上。例如一个10mer的探针按此方法合成可达一百万种。每一种独特序列的寡核苷酸所占据的空间称为“feature”, 其中包含了百万个以上的同种寡核苷酸探针。一个 1.6cm^2 的芯片可有几十万至上百万“feature”, 间隔为 $20\text{t}\sim\text{m}$ 。随着技术的进步, 可有更大容量的芯片出现。

芯片上已知序列的核酸探针通过碱基互补配对来检测分析未知序列, 即杂交测序。制备好的芯片经过几步化学处理便可与目标分子或探针杂交。完全杂交则发出强的荧光信号或特殊波长的信号, 不完全杂交信号较弱, 若不能杂交则检测不到荧光信号或只测到芯片上原有荧光信号, 这取决于探针和目标分子的荧光标记情况。这些不同区域的荧光信号在芯片上组成荧光分布的谱型可被激光共聚焦显微镜激发和检测, 经电脑应用特制的软件处理而得出DNA的序列及其变化情况。

(二) 基因芯片的主要类型

基因芯片可分为下列类型:

1. 无机片基和有机合成物片基的基因芯片 按基因芯片的片基或支持物的不同可以分无机片基和有机合成物片基, 前者主要有半导体硅片和玻璃片等, 其上的探针主要以原位聚合的方法合成; 后者主要有特定孔径的硝酸纤维膜和尼龙膜, 将预先合成的探针通过特殊的

微量点样装置或仪器滴加到片基上。

2. 原位合成和预先合成然后点样的基因芯片 此种分类也即前述在片 / 原位合成法制作的芯片以及离片合成法制作的基因芯片。

3. 基因表达芯片和 DNA 测序芯片 根据芯片的功能可分为基因表达芯片或基因表达微阵列(gene expression microarray)和 DNA 测序芯片或重述 DNA 测序芯片(interactive DNA sequencing chip)两类。前者可以将克隆到的成千上万个基因特异的探针或其 cDNA 片段固定在一块 DNA 芯片上, 对来源于不同的个体(正常人或患者)、组织、细胞周期、发育阶段以及外界化学物质诱导下的细胞内 mRNA 或反转录的 cDNA 进行检测, 从而对这些基因表达的个体特异性、组织特异性、发育阶段特异性、化学物质诱导特异性进行综合的分析和判断, 迅速将某个或几个基因与疾病联系起来, 极大地加快这些基因功能的确定, 同时可进一步研究基因与基因间相互作用的关系。DNA 测序芯片则是基于杂交测序(sequencing by hybridization, SBH)发展起来的。

另外也可根据所用探针的类型不同分为 cDNA 微阵列芯片和寡核苷酸芯片, 根据应用领域不同而制备的专用芯片如毒理学芯片、病毒检测芯片、p53 基因检测芯片等。

(三) 基因芯片技术的应用

1998 年底美国科学促进会将基因芯片技术列为该年度自然科学领域十大进展之一, 足其在科学史上的意义。现在, 基因芯片已被迅速应用到生物科学众多的领域之中, 它以其可同时、快速、准确地分析数以千计基因组信息的本领而显示出极大的魅力。这些应用主要包括基因表达检测、突变检测、基因组多态性分析和基因文库作图以及杂交测序等方面。

基因芯片技术是一种高效准确的 DNA 序列分析技术, 将基因芯片应用于检测基因突变, 不仅可以准确地确定突变位点和突变类型, 更主要的是它的快速高效而为目前应用的直接测序法所无法比拟, 它可以同时检测多个基因乃至整个基因组的所有突变, 是对基因突变检测技术的一次重大突破。Hacia 等(1996)用含有 96 000 个寡核苷酸探针的基因芯片来检测遗传性乳腺癌基因 BRCA1 第 11 外显子 3.45kb 长度内的所有可能的杂合性突变, 包括碱基替换及小的插入、缺失等, 并借此确定发病风险。在所分析的 15 个病例标本中, 14 例为阳性, 而 20 例对照均未出现假阳性。研究时也同时检测出了 8 个单核苷酸多态。基因芯片也可用于肺癌、前列腺癌、结肠癌等多种肿瘤的研究, 为肿瘤基因组解剖计划的完成提供重要的技术支持。

在毒理学研究方面, Incyte 公司的微阵列技术结合 Zooseq 数据库中存在的小鼠和 Cyno-molgus 猴等的基因组序列, 能够在研究不同生物基因表达差异的同时, 对新药的药理学和毒理学进行研究, 于 1998 年推出一种大鼠毒理学微阵列, 使研究者能够定量研究外源性受试物对大鼠基因表达的影响, 从而节省大量科研经费和时间。Nuwaysir 等(1999)研制了包括涉及细胞凋亡、DNA 复制和修复、氧化应激 / 氧化还原内稳态、过氧化物酶体增殖反应、二噁英 / 多环芳烃反应、雌激素反应、癌基因和抑癌基因、细胞周期控制、转录因子、激酶、磷酸酶、热休克蛋白、受体、细胞色素 P450 等共 2090 个基因的毒理芯片(ToxChipVi0), 该芯片既可用于毒物的检测和遗传多态性的检测, 又可用于受检毒物的毒作用机制的研究。最近, Holden 等从人和小鼠文库中选择约 600 个与毒理学相关基因的 cDNA 克隆, 制备了种属特异的毒理基因组学芯片, 可研究肝脏毒性、内分泌干扰、致癌作用等毒性终点的作用机制, 也可用于确定以基因表达模式为基础的化合物的毒性。

Brown 等(1998)报道了用基因芯片杂交进行基因表达变异和环境有害因素的研究。它们就正常人和病人的 T 细胞标本对表达的变异与数千个遗传、遗传流行病和环境条件的图像进行比较, 以确定与二氧化物和汞接触的关系。这样用表达方法补充基因型的方法, 就是系统测试基因组中 10 万个基因的每一个表达变异。它们认为若干年后提高基因芯片技术, 最终能在几千个不同遗传、环境和疾病影响的人类大多数基因和在多种类型的细胞中获得表达

水平的确切信息。这种机体对有害环境因素的基因表达反应的系统研究将提供环境公害敏感的原位生物检测的策略路线。1998 年美国环保局组织专家研讨会，讨论了毒理学芯片的发展策略，组织力量进行毒理学相关芯片的研究和开发。目前，Affymetrix 公司已经开发出了商品化的 DNA 芯片，如用检测 HIV 反转录基因耐药性突变的 HIV 芯片，用于检测 p53 基因突变的 p53 芯片以及细胞色素 P450 芯片等。

尽管基因芯片发展时间不长，迄今在医学研究实际应用及毒理学研究领域的应用尚处起步阶段，但由于芯片技术与传统的杂交技术相比，有检测系统微型化、对样品的需要量非常少、效率高、能同时分析数千种作为遗传、基因组研究或诊断用的 DNA 序列，更好地解释基因之间表达的相互关系及检测基因表达变化的灵敏度高等优点，基因芯片在医学、毒理学上的应用前景无疑是非常广阔的。目前这一技术的研究与应用正处在一个不断发展，完善阶段，亟待进一步提高 DNA 芯片的探针密度以及检测系统的分辨率与灵敏度，同时基因芯片技术有待实现常规化与自动化。随着这一技术的逐步完善与广泛应用，直接测序法将可能成为检测基因突变的常规方法。

(王 枫 史永亮 高双斌 于 芳)