

第七章 食品中化学物质的遗传毒理学

第一节 基本概念

遗传毒理学(Genetic Toxicology)是毒理学的一个分支,研究外源化学物及其他环境因素对生物体遗传机构的损害作用及其规律。其主要目的是检测那些能引起DNA损伤的环境因素,研究其遗传毒作用的特点及对人类的潜在危害。环境因素对生物体遗传机构损伤的研究起始于二十世纪二十年代。在1927年MuUer就发现x射线可引起果蝇性连锁显性致死性突变。又经过大约二十年的时间,到1942年Auer-back和Robson发现了第一个能引起基因突变的化学物——芥子气。之后有一系列有关外源化学物可引起基因突变或染色体损伤的报道。大量的研究成果已使人们相信,化学物及其他环境因素导致生物体遗传机构的改变,可以引起人类某些遗传性疾病并且与癌症的发生有关。

遗传物质发生变化引起遗传信息的改变,并产生新的表型效应称为突变(Mutation)。突变可在自然条件下发生,称为自发突变(spontaneous mutation);也可人为地或受各种因素诱发产生,称为诱发突变(induced mutation)。自发突变的发生率很低,它提供了生物进化的基础。

虽然人为的诱发突变也常用以培养和开发新种和良种,但是在毒理学中把突变作为一种损害作用。环境因素引起生物体突变发生的作用及过程称为致突变作用或诱变作用(mutagenesis)。环境中存在的可诱发突变发生的因素包括化学因素(各种化学物质)、物理因素(如电离辐射)和生物因素(如病毒)。其中化学因素存在最广泛,人们接触机会最多,在环境致突变作用中占有最重要的地位。凡能引起致突变作用的化学物称为化学诱变剂(chemical mutagen)。有些化学物质具有很高的化学活性,其原型或其化学水解产物就可以引起生物体的突变,称为直接诱变剂(direct-acting mutagen);有些化学物质其本身不能引起突变,必须在生物体内经过代谢活化才呈现致突变作用,称为间接诱变剂(indirect-acting mutagen)。

本章所用的遗传毒性和致突变性两个术语既有联系又有区别。致突变性和致癌性都是精确的概念,在一个实验群体中的突变率和癌发生率可以定量检测。遗传毒性是泛指对基因组的毒性,对基因组的毒作用可引起致突变性及其他各种不同的效应,如染色体畸变、噬菌体引起细菌死亡、DNA链断裂及细胞分裂抑制等。这些效应都可作为评价遗传毒性的终点。

第二节 遗传损伤的类型

根据DNA改变牵涉范围的大小,在遗传毒理学中可将遗传损伤分为三大类,即基因突变、染色体畸变及基因组突变。

一、基因突变

基因突变(gene mutation)指在基因中DNA序列的改变。基因突变是分子水平的变化,在光学显微镜下无法看见,一般是以表型(如生长、生化、形态等)的改变为基础进行检测,也可通过核酸杂交技术、DNA单链构象多态分析(SSCP)及DNA测序等方法检测DNA序列的改变来确定。基因突变可分为以下几种基本的类型:

1. 碱基置换 碱基置换(base-pair substitution)指DNA序列上的某个碱基被其他碱基所取代。碱基置换又可分为转换和颠换两种。转换(transition)指嘌呤与嘌呤碱基、嘧啶与嘧啶碱基之间的置换(包括G: C→A: T和A: T→G: C); 颠换(transversion)则指嘌呤与嘧啶碱基之间的置换(包括G: C→T: A, G: C→C: G, A: T→C: G及A: T→T: A)。转换和颠换发生后的后果取决于是否在蛋白质合成过程中引起编码氨基酸的错误。如果碱基置换导致了编码氨基酸信息的改变,在基因产物中,一个氨基酸被其它的氨基酸所取代,称为错义突变(missense mutation)。错义突变有可能使基因产物失活,也可能仅对基因产物的功能产生一定的影响或无影响,这取决于置换的氨基酸及其在蛋白质中的位置和作用。

遗传密码子具有兼并性(degeneracy),有时,虽然有碱基置换的发生,但密码子的意义可以没有改变,此时称为同义突变(samesense mutation)。如果碱基置换的结果使mRNA上的密码子由氨基酸编码密码子变成非编码的终止密码(UAG、UGA、UAA),称为无义突变(nonsense mutation)。无义突变可使蛋白质合成提前终止,导致基因产物不完全或无功能。

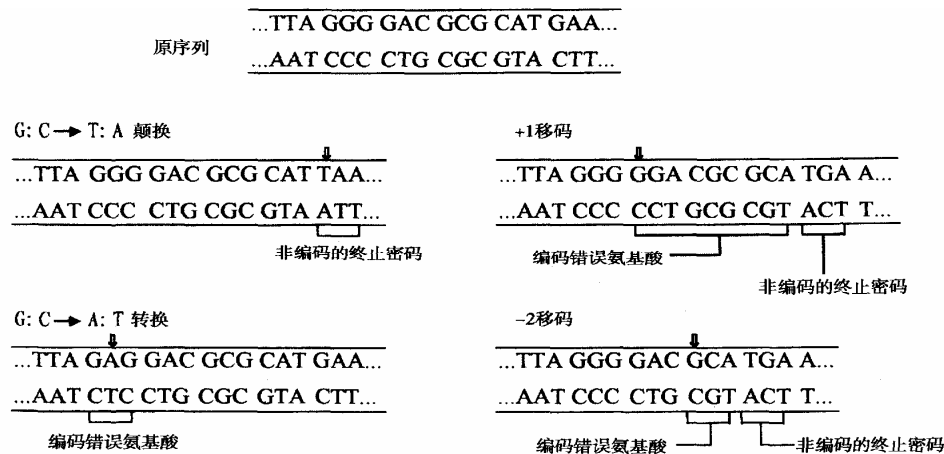


图7-1 碱基置换和移码突变

2. 移码突变 移码突变(frameshift mutation)指改变从mRNA到蛋白质翻译过程中遗传密码子读码顺序的突变,通常涉及在基因中增加或缺失一个或两个碱基对。DNA链碱基排列及密码的阅读是连续的,在基因中一处发生移码突变,会使其以后的三联密码子都发生改变,有时还会出现终止密码,所以,移码突变往往会使基因产物发生大的改变,引起明显的表型效应,常出现致死性突变。

3. 整码突变 整码突变(codon mutation)又称为密码子的插入或缺失,指在DNA链中增加或减少的碱基对为一个或几个密码子,此时基因产物多肽链中会增加或减少一个或几个氨基酸,此部位之后的氨基酸序列无改变。

4. 片断突变 指基因中某些小片段核苷酸序列发生改变,这种改变有时可跨越两个或数个基因,涉及数以千计的核苷酸。主要包括核苷酸片段的缺失、重复、重组及重排等。缺失指基因中某段核苷酸序列的丢失,缺失范围小,也称为小缺失。重复指基因中增加了某一段重复的核苷酸序列。缺失和重复都可能打乱基因的读码顺序,引起移码突变。重组指两个

不同基因的局部片段的相互拼接和融合。重排则指DNA链发生两处断裂，断片发生倒位后再重新接上。

根据突变后基因产物功能的改变，基因突变可分为正向突变及回复突变。正向突变(forward mutation)是导致基因产物正常功能丧失的突变，回复突变(reverse mutation)则指使基因产物的功能恢复的突变。

二、染色体畸变

染色体畸变(chromosome aberration)是指染色体结构的改变。染色体畸变牵涉的遗传物质改变的范围比较大，一般可通过在光学显微镜下观察细胞有丝分裂中期相来检测。染色体结构改变的基础是DNA链的断裂，所以把能引起染色体畸变的外源化学物称为断裂剂(clastogen)。

染色体畸变可分为染色单体型畸变(chromatid-type aberration)和染色体型畸变(chromosome-type aberration)。前者指组成染色体的两条染色单体中仅一条受损，后者指两条染色单体均受损。细胞在DNA复制前受电离辐射的作用，可引起染色体型畸变，在DNA复制后受电离辐射作用则引起染色单体型畸变。大多数化学断裂剂一般是诱发DNA单链断裂，经过S期进行复制后，在中期相细胞表现为染色单体型畸变。但也有少数断裂剂可引起DNA双链断裂，如果细胞在G₁期或G₀期受这些断裂剂作用，经S期复制到中期可表现染色体型畸变，若作用于S期复制后及C₂期，在中期相则出现染色单体型畸变，此类化学物称之为拟放射性断裂剂(radiomimetic clastogen)。染色单体型的畸变在经过一次细胞分裂后，会转变为染色体型畸变。

染色体或染色单体受损发生断裂后，可形成断片，断端也可重新连接或互换而表现出各种畸变类型。主要有以下几种：

1. 裂隙(gap)在一条染色单体或两条染色单体上出现无染色质的区域，但该区域的大小等于或小于染色单体的宽度。在制备染色体标本过程中，会因各种因素的影响形成裂隙，故认为裂隙并非染色质损伤，所以，在计算染色体畸变率时通常不考虑裂隙。

2. 断裂(break)同裂隙，但无染色质区域的大小大于染色单体的宽度。

3. 断片(fragment)和缺失(deletion)染色体或染色单体断裂后，无着丝粒的部分可与有着丝粒的部分分开，形成断片，有着丝粒的部分称为缺失。发生在染色体或染色单体末端的缺失称为末端缺失，发生在臂内任何部分的缺失称为中间缺失。

4. 微小体(minute body)中间缺失形成的断片有时很小，成圆点状，称为微小体。

5. 无着丝点环(acentric ring)无着丝粒的染色体或染色单体断片连在一起呈环状。

6. 环状染色体(ring chromosome)染色体两条臂均发生断裂后，带有着丝粒部分的两端连接起来形成环状。通常伴有一对无着丝点的断片。

7. 双着丝点染色体(dicentric chromome)两条染色体断裂后，两个有着丝粒的节段重接，形成双着丝点染色体。属于不平衡易位。

8. 倒位(inversion)在一条染色体或染色单体上发生两处断裂，其中间节段旋转180°后再重接。如果被颠倒的是有着丝点的节段，称为臂间倒位；如被颠倒的仅是长臂或短臂范围内的一节段，称为臂内倒位。

9. 易位(tranlocation)当两条染色体同时发生断裂后，互相交换染色体片段。如果交换的片段大小相等，称为平衡易位(balanced translocation)。

10. 插入(insertion)和重复(duplication)一条染色体的断片插入到另一条染色体上称为插入。当插入片段使染色体具有两段完全相同的节段时,称为重复。

11. 辐射体 染色单体间的不平衡易位可形成三条臂构型或四条臂构型,分别称为三辐射体(triradial)及四辐射体(quadriradial)。在三个或多个染色体间的单体互换则可形成复合射体(complex radial)。

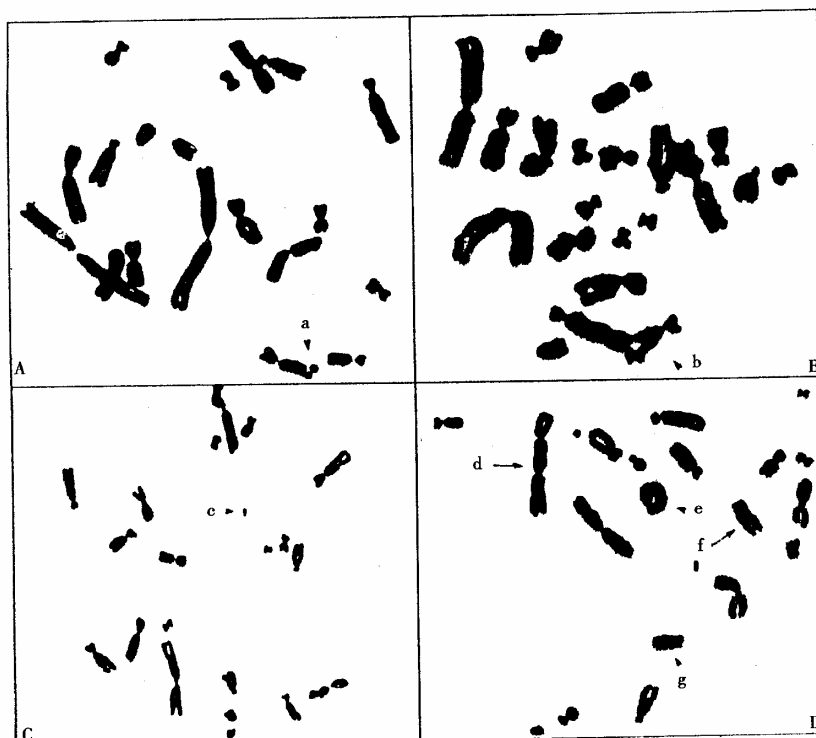


图7-2 染色体畸变的常见类型(CHO细胞)

a.染色单体断裂 b. 三辐射体 c. 染色体断片 d. 双着丝点染色体 e. 环状染色体 f. 无着丝点断片

以上的畸变类型中,有些是稳定的畸变,如小的缺失、重复、倒位、平衡易位等,它们可通过细胞分裂而传递下去,在细胞群中维持。而染色体断裂形成的无着丝点断片、无着丝点染色体环、双着丝点染色体及其他不平衡易位则是不稳定的,由于有遗传物质大范围的损失或对有丝分裂的妨碍,往往会造成细胞死亡。稳定的染色体重排,用常规的中期相染色体分析技术难以检测出,需要依靠染色体分带技术或荧光原位杂交(FISH)等技术来检测。但这些技术比较复杂,所以,在进行染色体畸变分析时,一般是通过不分带的常规染色体技术检测中期相染色体结构改变。在一般的Giemsa染色的染色体标本中可观察到的畸变类型主要有:裂隙、断裂、断片、缺失、微小体、着丝点环、无着丝点环及各种辐射体等。

三、基因组突变

基因组突变(genomic mutation)指基因组中染色体数目的改变,也称为染色体数目畸变(numerical aberration)。每一种属,其机体中各种体细胞所具有的染色体数目是一致的,具有两套完整的染色体组,称为二倍体(diploid)。生殖细胞在减数分裂后,染色体数目减半,仅

具有一套完整的染色体组，称为单倍体(haploid)(表7-1)。

表7-1 不同物种动物的染色体数目

物种	体细胞(2n)	性细胞(n)	物种	体细胞(2n)	性细胞(n)
人	46	23	猫	38	19
大鼠	42	21	兔	44	22
小鼠	40	20	狗	78	39

在细胞分裂过程中，如果染色体出现复制异常或分离障碍就会导致细胞染色体数目的异常。染色体数目异常包括非整倍体和整倍体。

1. 非整倍体 非整倍体(aneuploid)指细胞丢失或增加一条或几条染色体。缺失一条染色体时称为单体(monosome)，增加一条染色体时称为三体(trisome)。染色体数目的改变会导致基因平衡的失调，可能影响细胞的生存或造成形态及功能上的异常。如21三体导致先天愚型(Down氏综合征)。

2. 整倍体 整倍体(euploid)指染色体数目的异常是以染色体组为单位的增减，如形成三倍体(triploid)、四倍体(tetraploid)等。在人体，3n为69条染色体，4n为92条染色体。在肿瘤细胞及人类自然流产的胎儿细胞中可有三倍体细胞的存在。发生于生殖细胞的整倍体改变，几乎都是致死性的。

第三节 致突变作用机制

突变可分为基因突变、染色体畸变及基因组改变，外源化学物引起基因突变和染色体畸变的靶主要是DNA，而引起非整倍体及整倍体的靶主要是有丝分裂或减数分裂器，如纺锤丝等。

一. DNA损伤与突变

外源化学物引起DNA损伤、诱发突变的机理很复杂。到目前，仅对少数化学物对DNA损伤作用的机理比较清楚，现介绍主要的几种作用方式。

1. 碱基类似物的取代 有一些外源化学物与DNA分子中的四种天然碱基的结构相似，称之为碱基类似物(base analogue)。这些化学物可在DNA合成期(S期)，取代天然碱基，掺入DNA分子，引起碱基配对特性的改变，引发突变。如5-溴尿嘧啶(5-BrU)与胸腺嘧啶(T)的分子结构十分相似，唯一的区别是在C⁵位置上前者是Br原子，后者是甲基。在DNA合成期，5-BrU可与T竞争取代而掺入DNA链中，在下一次的DNA复制过程中，5-BrU与T一样可与腺

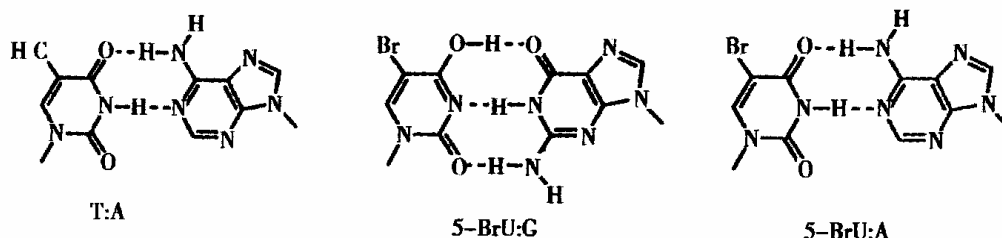


图7-3 5-BrU的碱基配对

嘌呤(A)配对。但是,由于Br原子带的负电荷要比甲基强得多,5-BrU可发生异构互变,由常见的酮式变为少见的稀醇式。这种情况下,在DNA复制时,5-BrU不是与A配对而是与鸟嘌呤(G)配对,导致T: A→C: G的转换。

2. 与DNA分子共价结合形成加合物 许多亲电子性化学物可与DNA作用形成共价结合物-加合物(adduct)。对于不同的诱变剂,其与DNA作用的碱基位置不同,引起DNA理化特性的改变也不同,因而会诱发不同类型的突变。一些芳香族化学物经代谢活化后形成亲电子基团,可与DNA碱基上的亲核中心形成加合物。如苯并(α)芘(B(α)P),经混合功能氧化酶催化加单氧,生成7,8-环氧B(α)P,经水化酶催化生成7,8-二氢二醇-B(α)P,再经混合功能氧化酶催化加单氧生成7,8-二氢二醇-9,10-环氧化物,后者为亲电子剂,可与DNA发生共价结合形成加合物,引起DNA构象改变,导致突变。还有一类化学物可提供甲基或乙基等烷基,而与DNA发生共价结合,这类化学物称为烷化剂(alkylating agent)。烷化剂可使DNA碱基发生烷化,引起配对特性的改变,导致碱基置换型突变;也可能导致碱基与脱氧核糖结合力下降,引起脱嘌呤、脱嘧啶作用,最终导致移码突变、DNA链断裂等。如鸟嘌呤O⁶发生烷化后,会出现与胸腺嘧啶的错配,引起G: C→A: T的转换。有的烷化剂具有同时授予两个或三个烷基的功能,相应地称为双功能或三功能烷化剂。它们除了可使碱基发生烷化外,还常引起DNA发生链内或链间的交联,或与蛋白质的交联,交联常可导致染色体或染色单体的断裂。

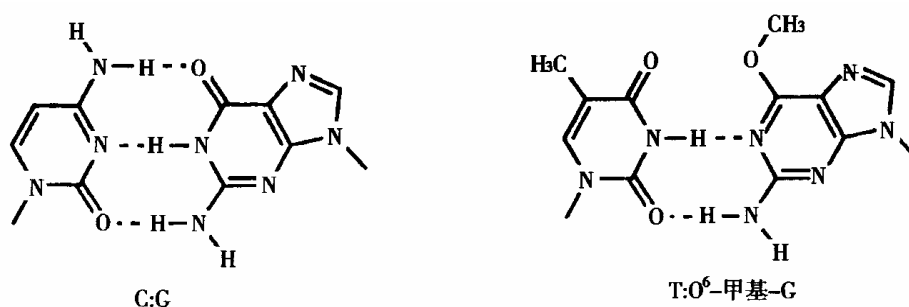


图 7-4 O⁶鸟嘌呤烷化后的碱基配对

3. 改变碱基的结构 某些诱变剂可与碱基发生相互作用,使碱基发生除形成加合物以外的化学结构改变,引起错误配对或DNA链断裂。如亚硝酸可使胞嘧啶、腺嘌呤氧化脱氨基,分别形成尿嘧啶和次黄嘌呤,新的碱基形成后,配对关系发生变化,尿嘧啶、次黄嘌呤分别可与腺嘌呤和胞嘧啶配对,导致C: G→T: A和A: T→G: C的转换。

4. 嵌入DNA链 一些具有平面环状结构的化学物可以非共价结合的方式嵌入核苷酸链之间或碱基之间,干扰DNA复制酶或修复酶,引起碱基对的增加或缺失,导致移码突变。

二、非整倍体及整倍体的诱发

非整倍体可由细胞在第一次减数分裂时同源染色体不分离(nondisjunction),或在第二次减数分裂或有丝分裂过程中,姐妹染色单体不分离而形成。不分离的结果导致在细胞的一极,纺锤体接受了两个同源染色体或姐妹染色单体,而另一极则没有。如果分离受影响的仅为一条或一对染色体,在分裂后的子细胞中,一个细胞会多一条染色体,而另一个细胞则少条染色体,分别形成三体 and 缺体。非整倍体剂(aneugen)有多种机制导致细胞分裂异常,诱发非整

倍体。其作用的靶可以为：①微管的合成和组装、纺锤体形成；②中心粒和极体的合成、分裂及其功能；③着丝粒蛋白的组装及其功能和着丝粒DNA。性细胞减数分裂与有丝分裂的机理不同，其非整倍体形成的机制也有所不同，所以，利用体细胞非整倍体试验不能检测对减数分裂特异的非整倍体剂。

多倍体涉及整个染色体组。在有丝分裂过程中，若染色体已正常复制，但由于纺锤体受损，染色单体不能分离到子细胞中，这时染色体数目就会加倍，形成四倍体。减数分裂的异常也可使配子形成二倍体，若二倍体的配子受精，可形成多倍体的受精卵。一个卵子被多个精子受精，也可形成多倍体。

三、DNA损伤修复与突变

1. 生物体对DNA损伤的修复及耐受

环境因素可引起各种类型的DNA损伤，并不是所有损伤都会表现为突变。细胞对于DNA损伤有修复及耐受机制。细胞内G₁/S交界处的关卡点(checkPoint)负责检查染色体DNA是否有损伤，如果DNA有损伤，则把细胞阻止于G₁期，要求细胞先进行修复，然后才能复制，以免遗传信息出错。DNA受损后，细胞利用其修复系统对损伤进行修复，如果DNA损伤能被正确无误地修复，那么，对生物体而言，这种损伤不会产生什么后果，亦即不引起突变。只有损伤不能被修复或在修复中出现了错误，一般需经过2次或多次细胞周期才有可能固定下来，并传递到后代的细胞或个体，引起突变。所以，环境致突变作用的模式应为遗传机构损伤-损伤修复-突变固定-突变。

DNA损伤修复机制可分为直接修复(direct repair)和切除修复(excision repair)。直接修复使损伤DNA回复正常，包括光修复及O⁶-甲基鸟嘌呤修复等。光修复是针对紫外线引起的嘧啶二聚体的修复功能，其修复机制比较简单，且很特异。在可见光存在的条件下，经酶的作用将二聚体打开，使相邻的嘧啶碱基回复原来的结构，一般为无误修复。生物进化程度越高，此种修复功能越弱。O⁶-甲基鸟嘌呤修复，修复在O⁶位上含有烷基的鸟嘌呤，靠O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶将O⁶-甲基鸟嘌呤的甲基转移至该酶的半胱氨酸残基上，而恢复鸟嘌呤正常的碱基配对特性，该酶在修复过程中被不可逆地失活。在大肠杆菌、酵母、啮齿类及人类细胞都发现有O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶。该酶具有可诱导性，如在大肠杆菌每个细胞含13~60个酶分子，诱导后可增加到每个细胞3000个酶分子。对于其他的烷化碱基也可能存在类似的特异修复系统。

切除修复指除去损伤碱基、含损伤的DNA片段或错配碱基的机制。与光修复及O⁶甲基鸟嘌呤修复不同，该修复机制适应于广泛的DNA损伤类型，是最主要的DNA损伤修复途径，一般为无误修复。依据其切除对象的不同可分为核苷酸切除修复、碱基切除修复及错配碱基修复三种类型。

核苷酸切除修复(nucleotide excision repair)是所有生物体内最常见的修复机制。它可修复几乎所有的DNA损伤类型，包括其他修复机制不能修复的加合物及DNA链间交联等。修复时，先靠内切酶把DNA链从损伤两端切断；在解螺旋酶(helicase)作用下，除去受损的寡核苷酸；再在修复多聚酶的作用下，以对应的链为模板，以正确的碱基填补空隙；最后，在DNA连接酶的作用下连接，恢复原来序列。核苷酸切除修复时，对于存在于活性转录链上的嘧啶二聚体和某些加合物等损伤比存在于互补的非转录链或无活性序列上的损伤可优先去除。对这种在修复时优先性的进一步深入研究有助于揭示转录、修复和突变的关系及这种关系在致

突变危险性评价中的意义。

碱基切除修复(base excision repair)通常修补的是单个被损伤的核苷酸。由DNA糖基化酶识别结构有改变的受损碱基,并通过水解其与脱氧核糖连接的键将损伤的碱基切除,形成脱嘌呤/脱嘧啶(AP)位点,然后,AP内切酶将DNA链切断,并去除原来与受损碱基连接的脱氧核糖,再在DNA聚合酶、连接酶的作用下填补失去碱基的部位,完成修复过程。DNA糖基化酶比核苷酸切除酶具有更大的特异性,但仍可切除紫外线引起的嘧啶二聚体,辐射、烷化剂、过氧化物等引起的不太大的损伤及诸如胞嘧啶脱氨基变为尿嘧啶的自发损伤等。

错配碱基修复(mismatch base repair)是一种特殊的切除修复形式,通过该机制可去除不正确的碱基配对,如G:T和A:C。错配碱基对可由复制时发生错误作为重组中间体出现,也可由碱基化学修饰形成。如果错配碱基对维持到下一个复制周期,将按正常的碱基配对关系配对,在两个新的DNA分子中,一个分子正常,另一个则会含有一对错误的碱基。细胞一般可以检查到错配碱基的存在,并进行修复。修复时针对那一条链上的碱基,关系到是否达到无误修复。如果错配是在复制过程中产生,一般是对新合成的链进行修复。对于老链和新链的识别,可根据DNA链的甲基化水平,新合成链处于低甲基化状态。除修复错配碱基外,该修复机制还可修复在DNA复制时形成的小的缺失及插入。错配修复的缺失将导致遗传的不稳定性,错配碱基修复与肿瘤发生的关系是近年来人们关注的热点,已发现错配修复的有关基因突变与遗传性非息肉性大肠癌的发生有关。

DNA损伤修复机制具有饱和性,另外,对于某些损伤也不能有效修复。没有被修复的损伤,维持到下一复制周期,有些会影响依赖DNA多聚酶的复制的精确性,引起突变的发生;另一些损伤可阻断DNA的复制,危及细胞的生存,此时,细胞可通过其耐受机制重新启动处于复制阻断状态模板的DNA合成。一种途径是通过复制后修复的机制,复制时新合成的互补链相应部位出现空隙,随后以重组作用及链延长作用填补。通过此机制,使DNA合成得以通过损伤部位,避免了致死性的后果,但存在的DNA损伤并未移除,仍有待通过其他的修复机制而修复。另外,在大肠杆菌,阻止DNA复制的损伤等可诱发SOS修复系统,即诱导细胞产生特殊的DNA聚合酶,以不严格的碱基配对使复制通过损伤部位。通过SOS修复,细胞得以存活,但在此过程中常导入错误的碱基,故常为易误修复。

2. DNA损伤修复与突变

突变的产生不仅与DNA受损的情况有关,DNA损伤修复也是决定突变发生与否的重要因素。DNA损伤修复功能的缺失或修复能力降低都会使突变的发生明显增加。如在有切除修复缺陷的人成纤维细胞,对于紫外线引起突变的敏感性大大高于正常的成纤维细胞。

表7-2 太阳光照射诱发M13mp2噬菌体基因突变在不同宿主中的表达

照射时间(min)	突变频率($\times 10^{-4}$)	
	未诱导SOS功能宿主菌	诱导SOS功能宿主菌
0	1.8	13.8
60	9.6	65.0
180	13.2	100.2

DNA受损后突变的发生还与DNA损伤修复的正确性密切相关。一般来讲,切除修复、

光修复及 O^6 -烷基鸟嘌呤修复倾向于无误修复；而SOS修复是易误修复，复制后修复使细胞避免死亡，但DNA损伤并未真正修复，常可增高突变率。表7-2为太阳光照射诱发M13mp2噬菌体的突变在不同宿主大肠菌中的表达情况。在SOS功能被诱导的大肠菌宿主中的突变率明显高于未诱导SOS功能宿主中的突变率。

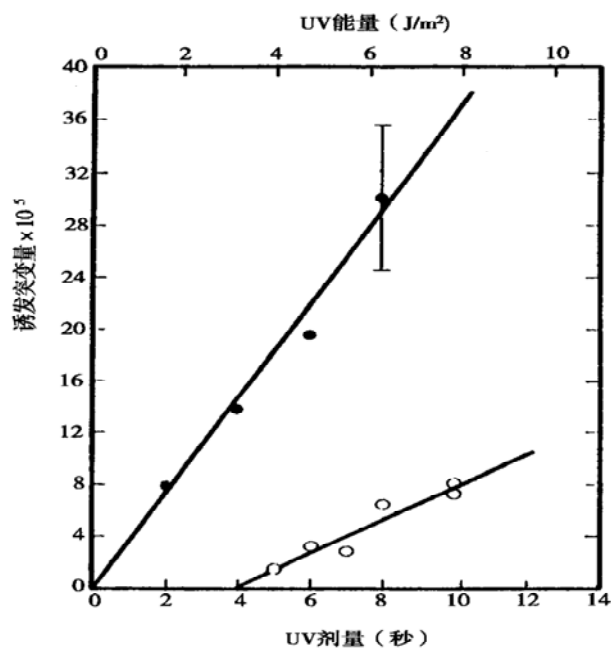


图7-5 DNA损伤修复缺陷对突变发生的影响

● 切除修复缺陷的人二倍体成纤维细胞 ○ 正常的人二倍体成纤维细胞

不同生物DNA损伤修复功能的类型及能力有所不同，在使用原核生物及动物等进行遗传毒理学试验，并用其结果外推到人时，要考虑到DNA损伤修复系统的差别。

DNA损伤修复过程涉及许多酶的参与。同代谢酶的多态性一样，DNA损伤修复酶也有多态性，即其基因型或表型存在着个体差异，如 O^6 甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶。DNA损伤修复酶的多态性在一定程度上影响着个体对遗传毒性因素的易感性，开展DNA损伤修复酶多态性的研究，对于遗传毒物易感人群的筛检和保护具有重要的意义。

第四节 突变的不良后果

诱变剂引起突变的有害作用，主要取决于作用的靶细胞类型，即作用于体细胞或性细胞。

一、体细胞突变的不良后果

1. 体细胞突变与癌变 体细胞突变是细胞癌变的重要基础，在许多肿瘤细胞中，都可同时观察到癌基因的活化和肿瘤抑制基因的失活，并存在有缺失、易位、倒位等染色体畸变。化学物的诱变作用与其致癌作用存在着较高的相关性，在DNA损伤修复缺陷的人群，癌症也明显高发。癌变的多阶段学说认为，癌变过程的引发阶段实质就是体细胞肿瘤相关基因的突变，诱变剂、染色体断裂剂可作为引发剂而引起癌变。

2. 体细胞突变与致畸 诱变剂可通过胎盘,引起胚胎体细胞的突变,干扰胚胎的正常发育过程,使胎儿出现形态结构的异常。诱变剂作用于胚胎体细胞引起的畸型与作用于生殖细胞引起的畸型不同,前者不可遗传,后者则为可遗传的改变。

3. 体细胞突变的其他不良后果 有人认为动脉粥样硬化的斑块是由单个突变了平滑肌细胞增生,为良性平滑肌瘤。并且,生物体的衰老与突变也有关,有衰老的体细胞突变学说。

二、生殖细胞突变的不良后果

1. 致死性突变 诱变物引起生殖细胞的突变可以是致死性的,造成配子死亡、死胎、自发流产等。

2. 可遗传的改变

生殖细胞发生非致死性突变会影响后代,表现为先天畸型等遗传性疾病,或导致遗传易感性改变等等。

发生于常染色体的基因突变可以是显性的,也可以是隐性的。显性非致死性的突变会在下一代表现出来,隐性突变当处于杂合子状态时不表达,只有形成纯合子时才表达,所以隐性突变有时要在隔代,甚至数代后形成纯合子时才表现出来。观察人群中显性突变的发生可直接反映亲代配子的突变,而隐性突变的发生率则反映在纯合子形成前的几代中突变的累积。

在新生儿中约有1%患有常染色体显性突变的疾病(如家族性息肉,多发性神经纤维瘤等),0.25%患有常染色体隐性突变的疾病(如着色性干皮病、苯丙酮尿症等),0.05%患有性连锁的疾病(如假肥大性肌营养不良、血友病等)。另外,约有0.4%的婴儿患有与易位及非整倍体等染色体异常有关的疾病,其中大部分(约80%)属于三体,如Down综合征(21三体)。

除引起表现为孟德尔式遗传的疾病外,基因突变在人类其他与遗传异常有关的多病因疾病中也起作用。约3%~6%的新生儿患先天畸形;如果包括那些通常要在晚些时候才发生的多病因疾病,如心脏病、高血压和糖尿病等,受影响的人群比例可达60%以上。

生物个体生殖细胞发生突变或染色体畸变后,有些可能会在世代传递、选择过程中在人群中固定下来,增加人类的遗传负荷。遗传负荷(genetic load)即人群中每个个体所携带的有害基因或致死基因的平均水平。

第五节 遗传毒理学试验

一、遗传毒理学试验的分类

遗传毒理学试验包括:用遗传学的方法,基于表型改变检测基因突变及小缺失;通过细胞学的方法观察大的染色体损伤;直接检测DNA损伤(如DNA加合物测定,DNA链断裂测定等)或间接反映DNA损伤(如DNA损伤修复发生的检测等)的试验方法。遗传毒理学试验旨在评定外源化学物对生殖细胞及体细胞的致突变性,对遗传危害性作出初步评价,并预测其致癌可能性,还可用于环境遗传毒物污染的监测及评价。

目前已建立了二百多种的遗传毒理学试验,所用的指示生物涉及到病毒、细菌、霉菌、昆虫、植物、培养的哺乳动物细胞和哺乳动物等。这些指示生物在对外源化学物的代谢、DNA损伤修复及其他影响突变发生的生理过程方面存在差异,但作为遗传物质的DNA其基

本特性具有普遍性，这是用非人类检测系统预测对人类的遗传危害性的基础。依据检测的遗传学终点不同，可将遗传毒理学试验分为四类，即基因突变试验(assays for gene mutation)、染色体损伤试验(assays for chromosome damage)、非整倍体试验(assays for aneuploidy)及反映DNA损伤的试验(assays for DNA damage)。精子畸形可由基因突变或染色体畸变引起，小鼠精子畸形试验也被列入遗传毒理学试验中，但将其作为生殖毒性检测试验似更为合理。表7-3列出了目前常用的遗传毒理学试验。

表7-3 主要的遗传毒理学试验

一、最常用的试验	培养中国仓鼠或人体细胞细胞遗传学分析
1. 基因突变试验	染色体畸变和微核试验
鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验(Ames试验)	非整倍体试验
2. 哺乳动物体内染色体损伤试验	3. 其他遗传学损伤终点
啮齿类骨髓染色体畸变试验或微核试验	酵母和果蝇有丝分裂重组试验
二、其他较常用的及在评价突变危害中有特殊重要意义的试验	培养肝细胞及啮齿类程序外DNA合成试验
1. 基因突变试验	4. 哺乳动物生殖细胞试验
大肠杆菌WP2色氨酸回复突变试验	小鼠形态及电泳特异座位试验
培养哺乳动物细胞TK或HPRT正向突变试验	骨骼或白内障突变试验
果蝇伴性隐性致死试验	细胞遗传学分析及可遗传易位试验
2. 染色体畸变试验	啮齿类生殖细胞DNA损伤和修复试验
	显性致死试验

二、常用的遗传毒理学试验

1. 细菌回复突变试验(bacterial reverse mutation assay)

细菌回复突变试验是以营养缺陷型的突变体菌株为指示生物检测基因突变的体外试验。常用的菌株有组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌和色氨酸营养缺陷型的大肠杆菌(如E.coli wp2)。

鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验是由美国加州大学的Ames教授在七十年代建立并完善的，所以又称Ames试验。鼠伤寒沙门氏菌的组氨酸营养缺陷型菌株在某个调控组氨酸合成的基因发生了点突变，丧失了合成组氨酸的能力。突变型菌株可被各种诱变因素诱导，回复突变为原养型，即恢复合成组氨酸的能力，在不含组氨酸的选择培养基上生长成可见的菌落。如果选择培养基上回变菌落数显著地超过了自发回变数，即可判定受试物为鼠伤寒沙门氏菌的致突变物(图7-6)。

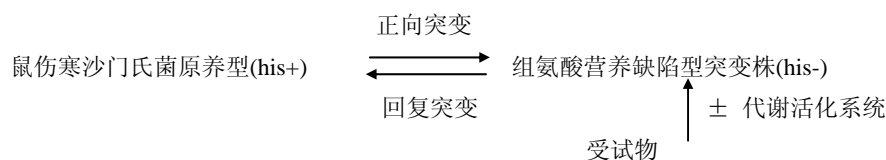


图7-6 Ames 试验原理

点突变可以发生于不同的组氨酸合成调控基因，另外，为增强对诱变物的敏感性还有一些附加突变，这样构成了多种的试验菌株。附加突变主要有：脂多糖(rfa)突变；切除修复突

变(Δ uvrB); 有些菌株带有R因子(pKM101)及PAQI质粒。表7-4列出了几个常用菌株的基因型和检测类型。

表7-4 Ames试验标准试验菌株的基因型和检测类型

菌株	组氨酸突变部位	突变类型	其他基因标志	检测类型
TA1537	hjc3076	C...C区域+1	rfa, Δ uvrB	移码突变
TA97	hisD6610	CCC区域+4	rfa, Δ uvrB, PKM 101	移码突变
TA98	hisD3052	CG区域-1	rfa, Δ uvrB, pKM 101	移码突变
TA1535	hisG46,	AT \rightarrow cc	rfa, Δ uvrB	碱基置换(主要检测攻击G: C碱基的化学物)
Tal00	hisC46	AT \rightarrow GC	rfa, Δ uvrB, PKM 101	碱基置换(主要检测攻击G: C碱基的化学物) 部分移码突变
TA102 (PAQI)	hisG428	CC \rightarrow AT	rfa, PKM 101	碱基置换(可检测攻击A: T碱基的化学物); 部分移码突变
TA104 (pAQI)	hisG428	GC \rightarrow AT	rfa, Δ uvrB PKM 101	碱基置换(可检测攻击A: T碱基的化学物); 部分移码突变

各种菌株组氨酸突变部位、方式不同, 附加的基因型改变也不同, 所以不同菌株对不同化学致突变物的检出能力不同。在用Ames试验进行致突变性检测时应使用一组菌株进行测试, 在我国, 普遍使用Maron和Ames于1983年推荐的TA97, TA98, TA100和TA102作为标准试验菌株。国际协调组织(International Conference on Harmonisation, ICH)建议, 在应用细菌回复突变试验进行常规检测时, 应使用以下的试验菌株: 1)TA98, 2)TA100, 3)TA1535, 4)TA1537或TA97或TA97a, 5)TA102或E. coli wp2uvrA或E. coli wp2uvrA(pKM101)。

鼠伤寒沙门氏菌缺乏哺乳动物的代谢酶, 为了检测直接及间接诱变剂, 在进行Ames试验时, 应分别进行不加及加代谢活化系统的检测, 最常用的活化系统是S9混合物。

Ames试验的方法可分为点试验法、平板掺入法及预培养平板掺入法。点试验法一般用于预试验, 平板掺入法是Ames试验的标准试验法, 对于某些受试物通过预培养可提高测试的灵敏度。

2. 哺乳动物细胞基因突变试验(mammalian cell gene mutation assay)

哺乳动物细胞基因突变试验是体外培养细胞的基因正向突变试验。常用的试验方法有小鼠淋巴瘤(L5178Y)细胞苷激酶位点(tk)突变检测、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞及中国仓鼠肺(V79)细胞次黄嘌呤鸟嘌呤转磷酸核糖基酶位点(hgprt)突变检测和中国仓鼠卵巢细胞的AS52细胞株黄嘌呤鸟嘌呤转磷酸核糖基酶位点(gpt)突变检测。

tk, hgprt及gpt编码的产物可催化相应核苷的磷酸化反应, 生成相应的核苷单磷酸。核苷类似物(如5-溴脱氧尿嘧啶核苷, 三氟胸苷及6-硫代鸟嘌呤等)也可作为其底物被磷酸化, 这些磷酸化产物也可掺入DNA中, 引起细胞死亡。可通过观察对核苷类似物的抗性, 即观

察在含核苷类似物的选择培养液中细胞集落形成的增加,检测受试物的致突变性。

tk基因位于常染色体上。tk基因位点的突变可反映包括基因突变、基因缺失、基因转变、易位及有丝分裂重组等遗传改变,它比其他位点的突变试验能检测更广泛的遗传毒物。美国EPA农药规划处及ICH都把L5178Y / tk试验作为哺乳动物细胞基因突变试验的优先选择。还有研究表明,tk试验可检测出诱发染色体结构和数目改变的化学物,对于在细菌回复突变试验中呈阴性的可疑的遗传毒性物质,在进行了体外染色体损伤试验和比试验后大多数得到了一致的结果。所以,ICH认为在药物的安全性评价中比试验作为体外染色体分析试验的替代是可接受的。

hprt基因位于X染色体上,为半合子状态,它可能与必需的基因相接,大范围的缺失、同源有丝分裂重组及染色体断裂、数目改变一般不能表现出突变克隆的增加。所以,hprt试验不能用于检测引起这些效应的化学物,但若与体外染色体试验结合使用,还是可以接受的。

CHO AS52 / gpt试验作为标准的CHO / hprt试验的改进,可检测出某些CHO / hprt试验不能检测出的诱变物。

3. 染色体畸变试验(chromosome aberration test)

制备细胞分裂中期相染色体标本,在光镜下可直接观察染色体的数目和形态的改变。染色体畸变试验也常称为细胞遗传学试验(cytogenetic assay)。染色体畸变试验可为体外试验,也可为体内试验,包括对体细胞和生殖细胞的分析。

体外染色体畸变试验(in vitro chromosome aberration test)常用的分析细胞为中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、中国仓鼠肺(CHL、V79)细胞及外周血淋巴细胞等。染色体结构异常主要可观察到裂隙、断裂、断片、缺失、微小体、着丝点环、无着丝点环及各种辐射体等。染色体数目异常包括多倍体及非整倍体。由于在染色体标本制备过程中,受各种因素影响可人为地导致少数中期分裂相出现染色体数目的变化,往往很难判断由受试物引起的非整倍体。但有丝分裂指数升高,多倍体细胞比例增加可提示有可能引起非整倍体,此时应进行进一步的研究。

体内染色体畸变试验(in vivo chromosome aberration test)主要有啮齿类动物骨髓细胞染色体畸变试验(chromosome aberration of bone marrow cells)和啮齿类动物睾丸细胞染色体畸变试验(chromosome aberration test of testicle cells)。在啮齿类动物睾丸细胞染色体畸变试验中,常用的有精原细胞及初级精母细胞染色体畸变试验。观察精原细胞的染色体畸变同骨髓细胞一样是在染毒后经过一次有丝分裂的细胞中进行,一般在末次染毒后一天取样测定。初级精母细胞的染色体畸变试验,一般是在染毒后12~14天取样,观察受试物作用于前细线期引起的损伤在终变期的表现。大多数外源化学物引起DNA的单链断裂,必须经过S期复制才能表现出染色单体畸变。精子发生从有丝分裂进入减数分裂过程中,DNA合成在前减数分裂期已完成,以后的减数分裂过程不再有DNA复制。所以,诱变物只有作用于仅占少数的处于前细线期的细胞才可能在初级精母细胞观察到畸变,因此该方法检测断裂剂的敏感性低于精原细胞试验。对于初级精母细胞的染色体畸变分析除了如前面体细胞染色体畸变试验中分析的内容外,还应分析染色体相互易位、X-Y和常染色体的单价体。

4. 微核试验(micronucleus assay)

微核(micronucleus)是染色体的断片或迟滞的染色体在细胞有丝分裂后期,不能进入子代

细胞细胞核中，而在间期的子代细胞胞浆内形成的游离团块物质，它与细胞主核着色一致，呈圆形或椭圆形。微核试验是通过观察有微核的细胞率(%)，用于检测断裂剂及非整倍体诱变剂。可用于微核检测的细胞很多，现已建立了植物细胞(如紫露草花粉母细胞、蚕豆根尖等)、哺乳类动物细胞(如骨髓细胞、肝细胞、脾细胞、肺细胞、淋巴细胞、红细胞、精子、鼻及胃粘膜上皮细胞、皮肤细胞等)、非哺乳类动物细胞(如鱼红细胞、蟾蜍红细胞等)的微核试验方法。

目前在常规检测中应用最多的是啮齿类动物骨髓多染红细胞微核试验(micronucleus assay in bone marrow polychromatic erythrocytes)。当成红细胞发展为红细胞时，主核排出，成为多染红细胞(polychromatic erythrocytes PCE)，这些细胞保持其嗜碱性约24小时，然后成为正染红细胞(nomochromatic erythrocytes, NCE)，并进入外周血。在主核排出时，微核可留在胞浆中(图7-7)。

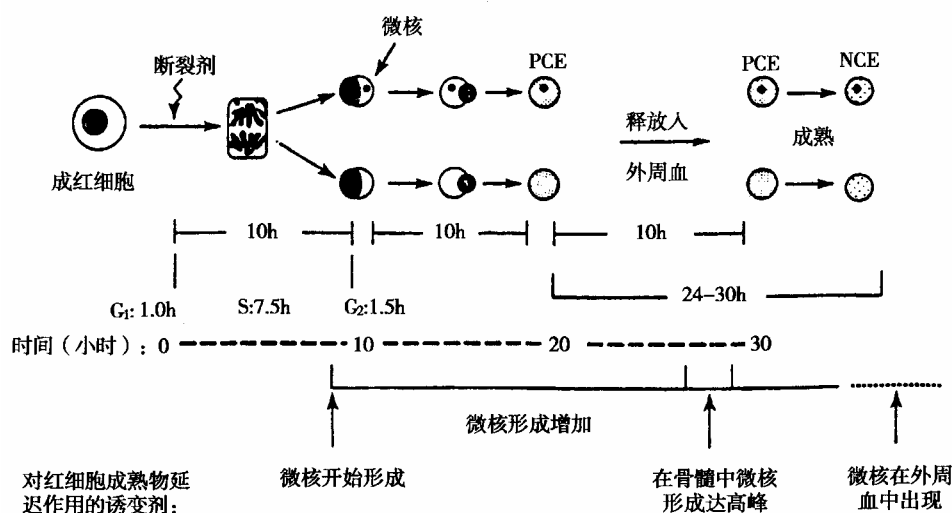


图 7-7 小鼠骨髓多染红细胞微核的形成

诱变物作用于靶细胞导致微核的形成需要经过一次细胞分裂，为了排除细胞分裂速率不同对微核形成的影响，提高灵敏度，发展了胞质分裂阻断法微核试验(cytokinesis-block micronucleus assay)，即在体细胞培养系统中加入细胞松弛素B(cytochalasin-B)，以使细胞胞质分裂受阻，但不影响核的分裂，形成双核细胞，仅选择双核细胞进行微核计数。最常用的是淋巴细胞，但也可用于其他哺乳动物细胞。

比较研究显示，在检测断裂剂方面微核试验和染色体畸变试验的结果有很好的相关，不仅在质(是否为断裂剂)上，而且在量上(可检测的最小致突变作用剂量)也是如此，所以，在断裂剂检测时二者都可使用。

5. 显性致死试验(dominant lethal assay)

显性致死(dominant lethal)指发育中的精子或卵子细胞发生遗传学损伤，此种损伤不影响受精，但导致受精卵或发育中的胚胎死亡。一般认为显性致死主要是由于染色体损伤(包括结构及数目改变)的结果。显性致死试验以胚胎死亡为观察终点，用于检测受试物对动物性细胞的染色体损伤作用。

由于卵子对诱变物的敏感性相对较低，而且受试物可能作用于母体动物，产生不利于胚

胎发育的种种干扰因素，影响实验结果的准确性。因此，一般采用仅对雄性动物染毒，然后与未处理的雌性动物交配，观察胚胎死亡情况。但也有报道指出，有些化学物，如 adriamycin(阿霉素)、platinol、bleomycin(博莱霉素)、hycanthone(海甘宋)等在雄性显性致死实验中呈阴性，但在雌性生殖细胞可诱发显性致死。

常用动物为大、小鼠，应选用成年性成熟的动物。不同化学物可于精子发育的不同时期发挥其毒作用。为检测化学物对精子发育全过程的影响，并检出精子受遗传毒物作用时的发育阶段，在试验时，每周更换一批新的雌鼠与染毒雄鼠交配，小鼠持续6~8周，大鼠8~10周。表7-5列出了大、小鼠精子分化阶段与染毒后交配周次的关系。根据在不同周次交配的雌鼠发生胚胎显性致死可判断受试物遗传毒性作用于精子的发育阶段。

表7-5 小鼠、大鼠精子分化阶段与交配周次的关系

给与受试物时精子所处的分化阶段	交配周次	
	小 鼠	大 鼠
输精管及睾丸中的精子	第一周	第一、二周
精细胞（后期）	第二周	第三周
精细胞（前期）	第三周	第四、五周
精母细胞（第二次减数分裂）	第四周	第六~八周
精母细胞（第一次减数分裂）		
精原细胞	第六周	第九周

6. 程序外DNA合成试验(unscheduled DNA synthesis test, UDS)

正常细胞在有丝分裂过程中，仅在S期进行DNA复制合成。当DNA受损后，DNA的修复合成可发生在正常复制合成期(S期)以外的其他时期，称为程序外DNA合成。用同步培养将细胞阻断于G₁期，并将正常的DNA半保留复制阻断，然后用受试物处理细胞，并在加有³H-胸腺嘧啶核苷的培养液中进行培养。如果受试物引起DNA损伤，并启动DNA损伤修复机制，培养液中的³H-胸腺嘧啶核苷就会掺入到DNA链中。利用放射自显影法或液闪计数法测定掺入DNA的放射活性，检测DNA修复合成，从而间接反映DNA的损伤程度。许多哺乳动物及人类细胞可用于UDS的检测，常用的有：大鼠原代培养肝细胞，外周血淋巴细胞，人成纤维细胞，Hela细胞及人羊膜细胞FL株等。

7. 姐妹染色单体交换试验(sister chromatid exchange assay)

在DNA合成期，所有染色体均进行复制，复制后形成两条姐妹染色单体。姐妹染色单体交换(sister chromatid exchange, SCE)可能与DNA的断裂和重接有关，故可间接反映DNA损伤。

SCE的观察方法是采用姐妹染色单体的差别染色(图7-8)。在细胞培养液中加入5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-BrdU)，5-BrdU是嘧啶类似物，在DNA合成期可与胸苷竞争掺入DNA中。DNA复制是半保留复制，经过一次有丝分裂后，仅在新合成的互补链中有BrdU的掺入，这时，两条染色单体的掺入情况是一样的。再经过一次有丝分裂，两条染色单体就会出现BrdU掺入的不同，一条单体中两条DNA链均有BrdU的掺入，而另一条则仅一条DNA链中有BrdU的掺入。BrdU掺入后，对染料的亲合力下降，染色后会出现一深一浅两条姐妹染色单体。如果有交换发生就可在光镜下计数SCE。

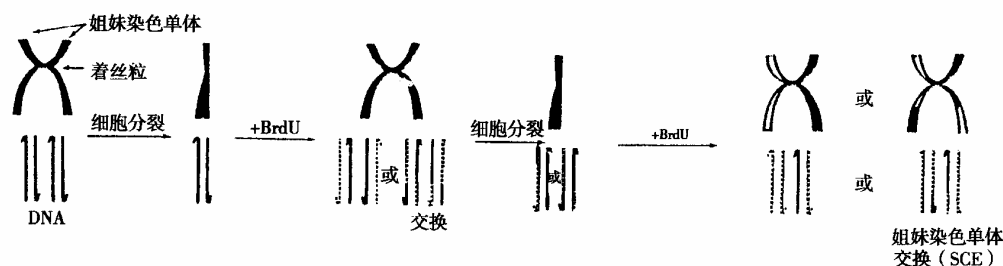


图7-8 姐妹染色单体区别染色原理

同染色体畸变试验一样，SCE试验可进行体外试验，也可进行体内试验。体外试验可用细胞株或人外周血淋巴细胞，体内试验可用骨髓细胞或睾丸生殖细胞进行。

8. 转基因动物致突变试验(transgenic animal mutagenicity assay)

为检测环境因素的致突变作用已建立了许多种的测试系统，然而，在这些检测方法中，离体的体外试验系统不能精确模拟化学物在活体内的生物转运和生物转化过程及其他与突变发生有关的生理过程；高等动物体内突变率很低，还缺乏高效识别和分离突变基因的技术，虽然已有少数基因位点的识别与分离取得了成功，但不适用于大规模的基因突变分析。

近年来建立的转基因动物致突变检测模型为研究哺乳动物体内基因突变提供了有效的手段，可以在动物个体水平研究突变的器官、组织特异性，包括生殖细胞。并可比较容易地从动物基因组中重新回收导入的基因，进行进一步的序列分析。

转基因动物指基因组中整合有用实验方法导入的DNA(可以是完整的基因，也可是不完整的DNA片段)，并能遗传给后代的一类动物。目前，用于致突变作用研究的转基因动物主要有商品化的BigBlue小鼠和MutaMouse小鼠。BigBlue以大肠杆菌LacI为靶基因，Muta-Mouse以大肠杆菌LacZ为靶基因。

在进行转基因动物致突变试验时，在染毒后先抽提不同器官或组织的基因组DNA，然后把纯化的基因组DNA与噬菌体体外包装抽提物混合，而将导入的基因载体包装进噬菌体中，用这些噬菌体感染大肠菌，可形成噬菌斑，通过噬菌斑颜色变化进行突变的判断并获得突变子。

虽然已有研究表明，外源靶基因的反应同内源基因一致，但仍需进一步证实；另外，方法的标准化及降低费用等也是将该方法应用于常规检测需要解决的问题。

9. 遗传毒理学试验中应注意的几个问题

(1) 在体外试验中细菌及细胞对外源化学物的代谢能力有限，为了检测直接及间接诱变剂，一般应分别在加及不加代谢活化系统的条件下进行试验。在试验中加入的代谢活化系统一般是S9混合液。S9即经多氯联苯诱导的大鼠肝匀浆，经9000g离心得到的上清液。在S9中再加入一些辅助因子，如辅酶II(NADP)、葡萄糖-6-磷酸， K^+ / Mg^{++} 及缓冲液等组成S9混合液(S9mix)，构成NADPH再生系统。图7-9显示的是2-氨基苄在加与不加代谢活化系统的情况下，对TA98菌株的致突变性结果。可见对于检测间接诱变剂，加入代谢活化系统是至关重要的。

肝S9的成分主要是混合功能氧化酶，可活化大多数的前致突变物。但是，也有少数化学物是通过其他的方式活化(如1, 2—二氯乙烷通过与谷胱甘肽结合而活化)或需经肠道菌丛活化，在肝微粒体酶作用下不能显示致突变活性。在这些情况下，应选择其他合适的活化系统。

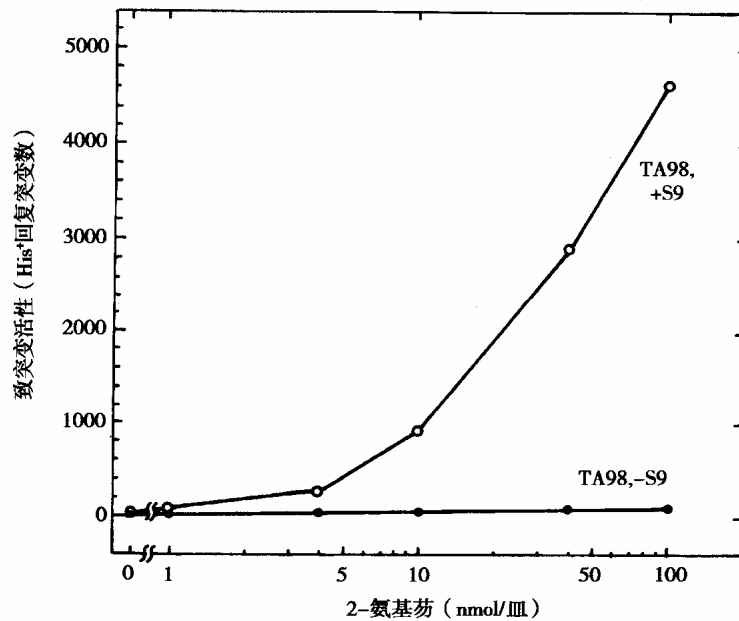


图7-9 2-氨基芴对TA98菌株的致突变性

(2) 在遗传毒理学试验的设计中一般要有阳性对照及阴性对照(包括空白对照和溶剂对照)。在体外试验时,阳性对照应在加及不加代谢活化系统的条件下进行;在体内试验中,除了可遗传易位试验、显性致死试验及小鼠点试验与它们近期的历史性对照可接受外,其他的试验都应同时有阳性对照组。

(3) 对于遗传毒理学试验结果的判定,应综合分析试验组的效应比阴性对照组是否明显增加、是否具有剂量-反应关系、对于弱的或可疑的效应结果是否具有可重复性等。另外,还应对试验的条件进行分析。如对于体外试验阳性结果的判断还应考虑:阳性结果是否为体外特有的活性代谢物引起;效应是否由于在体内并不存在的某些因素引起,如过高或过低的pH、渗透压,严重的沉淀等;对于细胞的试验,阳性是否仅在细胞生存率很低的情况下发生等。对于体外试验的阴性结果则应特别注意提供的代谢活化系统对于受试物的活化是否适合和充足。体内试验中致突变作用的发生直接与受试物到达靶组织的剂量有关,在判定体内试验的阴性结果时,特别是当体外试验已显示有遗传毒性时,应考虑受试物是否未能到达靶部位,毒代动力学资料、靶组织的其他毒性反应情况等可提供这方面的有用信息。

第一节 遗传毒理学试验在预测致癌性及遗传危害性中的价值

遗传毒理学试验的主要目的是研究外源化学物引起人类生殖细胞的突变并传递给后代的可能性;另外基于体细胞突变与肿瘤有关的认识,也可用于外源化学物潜在致癌性的预测。

虽然遗传毒理学试验可用于外源化学物致癌性的筛选,但也存在不足。外源化学物按其致突变性和致癌性可分为遗传毒性致癌物、遗传毒性非致癌物、非遗传毒性致癌物及非遗传

毒性非致癌物四类。在致癌性预测时遗传毒理学试验适用于遗传毒性致癌物和非遗传毒性非致癌物。对于遗传毒性非致癌物会出现假阳性，对于非遗传毒性致癌物则会出现假阴性。Tennant等(1987)对73种化学物在Ames试验、CHO细胞染色体畸变试验、CHO细胞SCE试验及小鼠淋巴瘤细胞TK位点基因突变试验四个常用的遗传毒理学试验中的测试结果与其对大、小鼠的致癌试验结果进行了比较，发现符合率均在60%左右。

遗传毒理学预测试验应能灵敏地预测出受试物的致癌性，也能特异地预测出受试物的非致癌性，也即要有高的灵敏性、特异性。灵敏性(sensitivity)指受试致癌物中，在遗传毒理学试验中呈致突变性阳性结果的比例；特异性(specificity)则指受试非致癌物中，在遗传毒理学试验中呈阴性结果的比例。显然遗传毒理学试验在预测致癌性中的可靠性的不高不仅与试验本身的特点有关，而且也受所选用的致癌物和非致癌物的比例的影响。表7-6列出了美国环境保护局(EPA)遗传毒理学计划(GeneTox)及美国国立环境卫生研究所(NIEHS)国家毒理学规划(NTP)对几个常用遗传毒理学试验灵敏性及特异性的分析结果。

表7-6 几个遗传毒理学试验在致癌物筛检中灵敏性及特异性比较

试 验	灵敏性(%)		特异性(%)	
	GeneTox	NTP	GeneTox	NTP
Ames试验	175 / 223(78)	20 / 44(45)	29 / 47(62)	25 / 29(86)
小鼠淋巴瘤细胞基因突变试验	45 / 54(87)	66 / 119(54)	0 / 5(0)	51 / 73(70)
CHO细胞HGPRT位点基因突变试验	40 / 41(98)	-	1 / 1(100)	-
V79细胞基因突变试验	84 / 104(81)	-	3 / 3(100)	-
果蝇伴性隐性致死突变试验	77 / 106(73)	4 / 18(22)	9 / 16(60)	9 / 9(100)
体外染色体畸变试验	40/54(74)	24 / 44(55)	2 / 6(33)	20 / 29(69)
体内染色体畸变试验	8 / 9(89)	9 / 15(60)	—	11 / 12(92)
体外SCE试验	100 / 101(99)	31 / 44(70)	0 / 10(0)	13 / 29(45)
体内SCE试验	21 / 21(100)	10 / 15(67)	—	5 / 12(42)
肝细胞UDS试验	19 / 22(86)	6 / 30(20)	—	13 / 14(93)

(引自Brusick D. Genetic Toxicology in Hayes AW. Principles and Methods of Toxicology,3rd ed, Raven Press, 1994, 553)

预测遗传学危害也即预测对哺乳动物性细胞的致突变性。判断哺乳动物性细胞致突变物的标准体内试验是小鼠特异座位试验和小鼠可遗传易位试验。小鼠特异座位试验(mouse specific-locus test)用于检测哺乳动物性细胞的基因突变。形态学方法是将受试物染毒处理的C57BL(或3H1)小鼠与T系小鼠杂交，T系小鼠带有7个与毛色、眼色及耳形有关的隐性基因座(a、b、c、p、d、se和s)。C57BL(或3H1)小鼠则有相应的显性基因。杂交后所产子代为隐性标志基因与野生型等位基因的杂合子，隐性基因不能表达(如AA×aa→4Aa)。受试物若引起C57BL(3H1)小鼠生殖细胞等位基因的突变(如AA→Aa)，则在子代中就会出现隐性基因标志能表达的情况(如Aa×aa→2Aa+2aa)。生物化学方法(如蛋白电泳)用于检测由于遗传性改变所产生的变异蛋白质，称为生化法特异座位试验。小鼠可遗传易位试验(mouse heritable traslocation test)用于检测受试物引起雄性小鼠生殖细胞染色体相互易位的作用。给雄性小鼠染毒后，让其与雌鼠交配，当引起易位时，会产生易位复合体的子1代。由于易位导致平衡

性染色体改变,可引起胚胎早期死亡,或导致生精过程障碍,表现不育或半不育。在F1代雄鼠中发现不育或半不育者,再检查其精子染色体以证实易位的存在。已经标准体内试验证实的哺乳动物性细胞致突变物还不多,在小鼠特异座位试验及可遗传易位试验中均为阳性的有: Cyclophosphamide(环磷酰胺), Ethylene oxide(环氧乙烷), Methyl methanesulfonate(甲磺酸甲酯), Ethyl methanesulfonate(乙磺酸甲酯), Mitomycin C(丝裂霉素C), Ethylnitrosourea(乙基亚硝基脲), Methyl nitrosourea(甲基亚硝基脲), Acrylamide(丙烯酰胺), Triethylenemelamine(三胺三嗪), Procarbazine HCL(盐酸甲苄胍), Melphalan(左旋苯丙氨酸氮芥), Trophosohamide, chlorambucil(苯丁酸氮芥), Isopropyl methanesulfonate(异丙基甲磺酸甲酯); 小鼠特异座位试验阳性的有: Myleran(马利兰), Diethyl sulfate(二乙基硫酸酯), n-Propylnitrosourea(正丙基亚硝基脲), n-Propylmethanesulfonate(正丙基甲磺酸甲酯); 小鼠可遗传易位试验阳性的有: Thiotepa(噻替派), Triaziquone(三亚胺醌), Trimethyl phosphate(磷酸三甲酯), TePa(甲基涕巴)等。

哺乳动物性细胞致突变物的标准体内试验需较大的动物数量,且费时、费钱,不可能广泛使用。可利用短期遗传毒理学试验对哺乳动物性细胞致突变性及遗传危害性进行预测。生殖细胞的遗传毒理学试验在预测遗传危害性中具有重要的意义。但一般认为,体细胞遗传毒理学试验阴性的化学物,在生殖细胞试验中一般也为阴性。所以,一般都是先进行体细胞的诱变性检测,发现部分试验结果阳性或有生殖细胞接触证据时,再进行生殖细胞的诱变性检测。Shelby(1996)根据文献资料,分析了几种遗传毒理学试验在哺乳动物性细胞致突变物筛选中的可靠性。若把在小鼠特异座位试验和可遗传易位试验中呈现多项或一项阳性的化学物作为哺乳动物性细胞致突变物;把经这些试验中的多项或一项检测呈阴性的化学物作为可能的哺乳动物非致突变物,灵敏性、特异性及预测准确性的结果见表7-7。可见Ames试验和骨髓细胞染色体畸变试验或微核试验均可有效地筛检潜在的性细胞致突变物,但阳性预测价值有限。显性致死试验的预测准确性较高。

表7-7 几种遗传毒理学试验的哺乳动物性细胞致突变物筛检可靠性评价

试 验	灵敏性(%)	特异性(%)	准确性(%)
Ames试验	17 / 19(89%)	3 / 10(30%)	20 / 29(69%)
骨髓细胞染色体畸变试验或微核试验	18 / 18(100%)	2 / 10(20%)	20 / 28(71%)
显性致死试验	18 / 18(100%)	8 / 10(80%)	26/28(93%)

(自: Shelby, 1996, 有修改)

哺乳动物性细胞致突变性与对人的遗传危害性之间还缺乏直接相关的证据。为评价外源化学物对人类的遗传危害性,遗传流行病学研究是最直接、最可靠的方法。但由于遗传性疾病发生率低,缺乏适宜的检测指标,而且潜伏期长,有的要在隔代或隔数代才表现,化学物接触的水平又很难确定,所以流行病学调查的难度很大。目前,评价遗传危害主要还是依据遗传毒理学试验的结果,特别是体内生殖细胞的致突变试验结果。如果一种化学物在多项遗传毒理学试验中证明有致突变性,一般也假定其对人也可能具有遗传危害性。美国EPA在其制定的致突变作用危险性评价指导中,将对人类生殖细胞潜在诱变性的证据分为8级,按证据权重大小顺序分别为:①人类生殖细胞研究获得阳性资料;②哺乳类生殖细胞可遗传的突

变效应研究中得到肯定的阳性结果;③哺乳类生殖细胞染色体畸变研究中得到不涉及从一代传递到下一代的肯定的阳性结果;④有化学物与生殖细胞相互作用的充分证据,并且在两项致突变试验(其中至少一项为体内或体外的哺乳动物试验)中得到肯定的阳性结果。得到阳性结果的两项试验可以都是检测基因突变或是检测染色体畸变的试验,如果一项是基因突变试验,另一项是染色体畸变试验,则二者都须为哺乳动物系统;⑤有化学物与生殖细胞相互作用的提示证据,并且如以上第4级中一样在两项致突变试验中得到肯定的阳性结果。或者在两项致突变试验中得到的阳性结果不如以上第4级中的充分,但有化学物与生殖细胞相互作用的充分证据;⑥致突变试验中得到的阳性结果不如以上第4级中的充分,同时有化学物与生殖细胞相互作用的提示证据;⑦如果化学物在所有的终点都得到阴性结果,此时,虽然不能将其确定为不具有诱变活性,但在实际上,可将其作为人类生殖细胞的非诱变剂;⑧化学物致突变性及其与生殖细胞相互作用的证据都不足。

在用遗传毒理学试验预测对人类的危害时,一般认为体内试验的权重大于体外试验、真核生物的试验大于原核生物、哺乳动物的试验大于非哺乳动物、对于预测可遗传的效应,生殖细胞大于体细胞。

环境因素对人类致癌性及遗传危害性的直接证据来自人群的流行病学资料,应加强这方面的研究。体内的外源化学物原型及其代谢产物含量、DNA加合物、蛋白质加合物等可作为诱变剂的接触标志;DNA损伤,染色体畸变、微核、SCE等细胞遗传学指标,细胞基因突变等遗传毒理学试验指标可作为致突变作用的效应标志;外源化学物代谢酶的多态性及DNA损伤修复酶的多态性则可作为易感性标志在人群流行病学研究中应用。

第七节 遗传毒理学试验的组合应用

环境致突变物的种类和结构多种多样,遗传毒理学试验利用不同的指示生物、遗传学终点,靶细胞也不同,具有遗传毒性的化学物不可能在所有的遗传毒理学试验中呈阳性。为了尽可能防止在预测外源化学物致癌性及遗传危害性中的假阴性结果,需要成组应用遗传毒理学试验。组合试验应用的越多,假阴性率会下降,但假阳性率会增加,方法过多也会使费用增加,时间拖延。另外,不加选择地增加试验项目并不一定对提高预测可靠性起多大作用。有研究表明,各种遗传毒理学试验之间的结果,有时可互相补充,但在通常情况下是一致的。

对于外源化学物致突变性的初步判断可通过检测其致基因突变及染色体损伤的能力。对于这些终点的检测需要分别的遗传毒理学试验,所以至少需要2个试验。通常是细菌回复突变试验和培养细胞的染色体畸变试验。细菌回复突变试验和体外染色体畸变试验结合可检出大多数的潜在致突变物和遗传毒性致癌物。也有学者及组织倾向于应用更多的试验来进行初筛,除细菌回复突变试验及体外染色体畸变试验外,可选用哺乳动物细胞基因突变试验,酵母基因突变试验,细菌、酵母或哺乳动物细胞的DNA损伤试验等,有时也包括体内染色体损伤试验(包括染色体畸变及微核试验)。根据初筛试验结果、化学物的种类及人体接触情况需进行进一步的试验,以确定在体外试验具有致突变作用的化学物是否在体内对体细胞和/或生殖细胞也具有活性。常用的体内试验有啮齿类骨髓细胞染色体损伤试验、小鼠斑点试验、啮齿类生殖细胞染色体损伤试验、显性致死试验等。体内UDS及体内SCE检测有时也是有用的。

有关在致癌性及遗传危害性评价时具体应选那些试验应根据受试物特性、分布、用途及使用范围，其他毒理学试验及毒代动力学资料，技术水平，管理部门的要求等来确定。尽管人们也试图对致突变性评价时最合适的试验选择进行协调，但尚无公认的最合理的组合方案。遗传毒理学试验成组应用试验组合的原则为：①应包括多个遗传学终点。现在还没有一种试验能同时测出基因突变、染色体畸变、非整倍体和DNA损伤等。②试验指示生物包括若干进化阶段的物种，包括原核生物和真核生物。③应包括体外试验和体内试验。一般认为，体外试验检测受试物本身是否具有遗传毒性，体内试验可确定受试物能否在体内显示其遗传毒性。④应充分利用预测可靠性研究的结果。

美国EPA毒物处(1986)提出了一个三阶段的试验方案(图7-10)，把遗传毒性检测和性细胞致突变性验证分阶段进行。第一阶段测试化学物的遗传毒性，包括Ames试验、体外哺乳动物细胞基因突变试验、体内骨髓染色体损伤试验(微核试验或染色体畸变试验)；第二阶段测试对生殖细胞的致突变作用；第三阶段为哺乳动物生殖细胞致突变性标准试验。在遗传危害性评价时，在体外基因突变试验中呈阳性的化学物应进行与哺乳类性腺DNA相互作用的试验，包括睾丸细胞的SCE、UDS、染色体畸变及碱性洗脱试验等，也可进行显性致死试验，在第二阶段中出现阳性反应，需进行小鼠特异座位试验，可观察形态改变或生化改变；在体内骨髓细胞染色体畸变试验或微核试验中呈阳性的化学物需进行显性致死试验，在第二阶段中出现阳性反应，再进行小鼠可遗传易位试验。

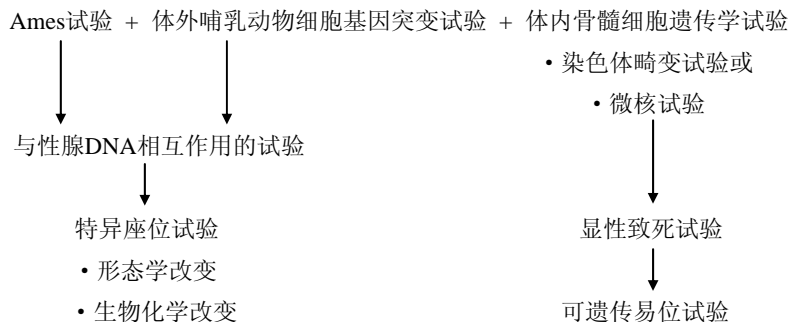


图7-10 US EPA毒物处提出的遗传危害性评价试验程序

以上程序安排把化学致突变物分为诱发基因突变及染色体损伤两类，但到目前为止，发现的所有的生殖细胞致突变物几乎均可同时诱发基因突变及染色体损伤，另外，在文献中报道的研究结果也显示，所有性细胞致突变物在骨髓细胞染色体损伤试验中几乎都呈现阳性，所有在特异座位试验及可遗传易位试验中呈阳性的化学物，在显性致死试验中也呈阳性(表7-7)。所以，Shelby等(1996)建议遗传危害性评价的程序可修改为第一阶段进行体内骨髓细胞遗传学试验，试验阴性不再需要进行生殖细胞的试验，阳性则进行第二阶段的显性致死试验，显性致死试验阴性可认为是非哺乳动物性细胞的致突变物，阳性可认为是哺乳动物性细胞的致突变物，如为了遗传危险性评价需要进一步了解其可遗传效应，则同时进行第三阶段的特异座位试验和可遗传易位试验。

大多数的遗传毒理学评价程序是选择进行若干遗传毒理学试验对受试物的遗传毒性及致突变性进行评价。国际协调组织(ICH)(1997)对于药品的遗传毒性评价建议的检测试验组合

为①细菌基因突变试验；②体外哺乳动物细胞染色体畸变试验或体外小鼠淋巴瘤细胞tk试验；③体内啮齿类造血细胞染色体损伤试验(骨髓细胞染色体畸变试验或骨髓或外周血多染红细胞微核试验)。在对经标准试验组合得到的致突变作用结果进行进一步研究时，其他试验如DNA加合物测定、DNA链断裂检测、DNA修复和重组试验等都可作为供选择的试验。对于在三项标准试验中为阴性的化学物，通常可认为其无遗传毒性作用。但对于构效关系显示有可能具致癌性或致突变性，但在三项标准试验中为阴性的化学物，还需要改进试验方法或再增加试验项目。对于在三项标准试验中为阴性，但致癌试验显示有致癌效应，又无明确的证据说明该化学物是通过非遗传毒性机制发挥作用时，为了了解其作用方式，可再进行改变代谢活化系统的体外试验或应用肿瘤发生的靶器官进行遗传损伤试验(如肝脏UDS试验、DNA加合物检测、转基因突变检测、肿瘤相关基因的遗传改变检测)。对于在标准组合试验中呈现阳性反应的化学物则需根据其临床用途再进行更多的试验。在不适宜以细菌回复突变试验进行遗传毒性评价时，如对细菌毒性太大(如某些抗菌素)或已知化学物可干扰哺乳动物细胞的复制功能(如拓扑异构酶的抑制剂、核苷类似物及DNA代谢抑制剂)时，通常应选用两种不同类型的哺乳动物细胞进行两种不同遗传学终点(基因突变或染色体损伤)的体外试验。对于毒代动力学及药代动力学资料提示不能被机体吸收或不易到达靶器官的化学物，如放射性造影剂、铝抗酸剂及某些皮肤用药等，可仅基于体外试验进行评价。

我国卫生部在《食品安全性毒理学评价程序》(1994)中对遗传毒理学试验的要求是：根据受试物的化学结构、理化性质以及对遗传物质作用终点的不同，并兼顾体外和体内试验以及体细胞和生殖细胞的原则，在Ames试验、小鼠骨髓微核试验或骨髓细胞染色体畸变试验、小鼠精子畸形试验和睾丸染色体畸变试验中选择四项，如其中一项试验为阳性，还应在其他备选试验(V79细胞HGPRT基因突变试验，显性致死试验，果蝇伴性隐性致死试验，UDS试验)中再选择两项试验进行。我国《农药安全性毒理学评价程序》(1991)中对遗传毒理学试验的要求则为：Ames试验和大肠杆菌回复突变试验，骨髓细胞微核试验或骨髓细胞染色体畸变试验，睾丸细胞染色体畸变试验或显性致死试验为必做项目，若有一项出现阳性，还需从精子畸形试验、体外培养细胞染色体畸变试验、UDS、果蝇伴性隐性致死试验等试验中再选择两项进行。

(史永亮 高双斌)