

第八章 食品中化学物质的生殖和发育毒性

生殖是使种族延续的各种生理过程的总称。生殖过程一般是指从配子形成直到胎儿娩出的整个过程，因此具有广泛的含义，其中包括精子的发生、卵的形成、配子的释放、受精、卵裂和胚泡发育、着床、胚胎发生、胎儿发育、分娩。而胎儿的娩出也并不意味着胎儿发育成熟的终止，从广义上说还应包括胎儿娩出后的新生儿期、哺乳期、直到性成熟的整个过程。随着我国人民生活水平提高，医疗卫生条件改善，新生儿死亡率大幅度降低，死因顺位也发生了明显的变化。1953年先天畸形和先天性心脏病死亡占总死亡的9.77%，到1979年已占37.50%，其死因顺位也由第四位上升为第一位。1988年卫生部公布了自1986年10月至1987年9月在全国29个省、市和自治区同步进行的出生缺陷的监测资料，结果显示1243284例围产儿中，先天畸形有16172例，发生率为13.07%，其中神经管畸形占3404例。按此结果推算，我国每年有30~40万严重的先天缺陷儿出生。

1973年Wilson综合了5次国际会议的资料，将人类先天缺陷的成因归为三大类。即遗传因素(染色体畸变和基因突变，占25%)，环境因素(物理因素、宫内感染、母体疾病、药物与环境化学物质，占10%)，和原因不明的出生缺陷(可能是由于遗传因素与环境因素相互作用，占65%)。

人们对先天缺陷和环境关系的认识是经历了一系列重大人间悲剧后才得到的。1940年澳大利亚发生风疹大流行，次年婴儿中流行先天性白内障、耳聋、智力不全和先天性心脏病。1945年美国在日本广岛和长崎爆炸原子弹，受到核辐射的胎儿出生后患小头畸形和智力低下，婴儿一年内死亡率达25%。1953年日本水俣湾因氮肥厂排放含汞工业废水污染了水体，居民因食用污染鱼类引起甲基汞中毒，两年后发现先天水俣病。1960年前后，英、德、日本等国妇女以反应停(thalidomide)作镇静剂减轻早孕反应，出生了近万名短肢畸形儿(海豹畸形)，约占早孕期服药者新生儿的1/3。1968年秋，日本发生了因多氯联苯污染米糠油引起的中毒事故，中毒孕妇发生死产、早产和产下“油症儿”。1961-1970年间，美国在侵越战争中使用高于本国农用13倍浓度的落叶剂2、4、5-T[含有杂质四氯二苯二恶英TCDD(tetra-chlorodibenzo-p-dioxin)]污染了大面积耕地和森林，造成妇女流产和产下患有小头症和Down's综合征的畸形儿。另有报道工业发达的国家和地区先天缺陷的发生有增高的趋势。

我国是发展中国家，优生优育，提高人口素质是我国的基本国策，所以应将发达国家已出现的问题引为前车之鉴。从70年代起，我国已开始了对药品、农药、食品添加剂和环境污染物的致畸研究，并把致畸试验、生殖毒性试验列为新药、农药、食品及首次进口化学品的安全性毒理学评价的重要组成部分。

化学品对生殖发育的损害不仅与妊娠母体有关，带有致畸因子的雄性也会使胎仔发生畸形。例如给雄鼠经口染毒反应停，使之与未染毒的雌鼠交配，引起严重的胎仔畸形。接触二硫化碳男工的配偶发生流产，早产或分娩畸形胎增多。对生殖发育有害的化学品不仅能作用于妊娠器官形成期，造成形态畸形，对妊娠前期的影响还可发生不育，对胎期的毒效应，可在出生后观察到发育、行为、代谢功能的障碍或子代肿瘤发生率增高。所以综合考虑有害环境因素对母体和父体的影响，将形态致畸与行为致畸结合起来进行观察，将生殖毒性和发育毒性结合起来进行研究已是发展的趋势。

第一节 生殖毒性与发育毒性

环境有害因素造成对亲代的生殖功能及对子代发育过程的有害影响的作用称为生殖毒

性和发育毒性。两者关系密切,但不同研究者对其研究的侧重面有所不同,多数主张对生殖毒性和发育毒性应有所区分。

一、生殖毒性(reproductive toxicity)

生殖毒性指对雄性和雌性生殖功能或能力的损害和对后代的有害影响。生殖毒性既可发生于妊娠期,也可发生于妊前期和哺乳期。表现为外源化学物对生殖过程的影响,例如生殖器官及内分泌系统的变化,对性周期和性行为的影响,以及对生育力和妊娠结局的影响等。

二、发育毒性(developmental toxicity)

发育毒性指在到达成体之前诱发的任何有害影响,包括在胚期(embryonic period)和胎期(fetal period)诱发或显示的影响,以及在出生后诱发和显示的影响。发育毒性的主要表现为:

1. 发育生物体死亡(death of the developing organism): 指受精卵未发育即死亡,或胚泡未着床即死亡,或着床后生长发育到一定阶段死亡。早期死亡被吸收或自子宫排出(即自然流产),晚期死亡成为死胎。

2. 生长改变(altered growth): 即生长迟缓(growth retardation)。能引起胚胎死亡和畸形的毒物多数能引起生长迟缓。一般认为胎儿的生长发育指标比正常对照的均值低 2 个标准差时,即可定为生长迟缓。胎鼠胸骨及枕骨骨化迟缓及低出生体重等是生长迟缓的较敏感指标。生长迟缓造成的局部发育不全可视为畸形,如脑小畸形和眼小畸形等。

3. 功能缺陷(functional deficiency): 包括器官系统、生化、免疫等功能的变化。功能缺陷往往要在出生后经过相当时间才能诊断。如听力或视力异常、行为发育迟缓等。

4. 结构异常(structural abnormality): 指胎儿形态结构异常,即畸形。致畸性(teratogenicity)是指化学物在胚胎发育期间引起永久的结构与功能异常的性质。致畸物(teratogen)是指出生前接触,诱发永久的结构与功能异常的物质。

三、生殖与发育毒性的特点及靶器官

生殖与发育过程包括配子(精子与卵子)的发育与形成、交配、受精、合子形成与植入、胚胎形成与发育、分娩等阶段。生殖与发育过程的每个阶段所涉及的细胞或器官都可能成为外源化学物毒作用的靶。外源化学物对生殖与发育过程的损害主要有以下几个方面:

1. 亲性腺作用(性腺毒性) 某些化学物可作用于性腺,影响生殖器官的发育与性腺成熟,或造成性腺组织病理学改变。例如氯乙烯单体可使睾丸曲细精管萎缩,氯化镉可引起小鼠卵巢出血,排卵抑制。某些化学物可影响配子的发生、增殖和成熟,使生殖细胞数量减少,功能减退及突变。例如过量接触二硫化碳的男工多见性机能减退,表现为性欲下降、阳痿。铅作业工人,特别是铅中毒患者易发生生殖细胞受损,导致精子数目减少,精子活动力降低,精子畸变率增加。生殖细胞受损的结果是不育、流产、死胎、畸胎和其他先天缺陷。生殖细胞突变造成的畸胎与妊娠期内接触毒物的致畸作用不同,前者突变发生于父体或母体的性细胞中,突变诱发的畸形可传给后代。后者突变发生在胚胎的体细胞中,引起的畸形不具有遗传性。已知的亲性腺毒物有多种,包括固醇类药物,化疗药物,有机磷和有机氯农药,镉、铅、汞和二硫化碳等。

2. 亲胚体作用(胚体毒性 embryotoxicity) 某些化学物可作用于妊娠早期(即从受孕到胚体形成阶段),对胚体发育产生损害作用。某些化学物可以降低胚体对必需营养素的利用度,如 EDTA 降低胚体对微量元素的利用度,氨基蝶呤降低胚体对叶酸的利用度。当给予母体这些化学物时,可导致与缺乏这些必需营养素相似的胚体毒性。胚体毒性、胎体毒性(fetotoxicity)和胚胎毒性(embryo-fetal toxicity)是指由出生前接触引起对孕体的任何有害影响,包括结构和功能异常,或这种影响在出生后的表现。这些术语与有害作用诱发的瞬间/时期有关,而不考虑检测的时间。

3. 亲胎盘作用(胎盘毒性 placental toxicity) 某些化学物可对胎盘造成损伤,改变胎盘血流量,降低胎盘对营养物质的转运,特异地干扰胎盘功能(如内分泌和代谢功能)。例如 5-

羟色胺使小鼠动、静脉狭窄，胎盘血流量减少，胎盘转运功能障碍，引起死胎和先天畸形；甲基汞改变人胎盘滋养层微绒毛对不能代谢的氨基酸的摄取，而致功能致畸，即先天水俣病。患儿严重神经迟钝，共济失调，步行困难，语言、咀嚼，下咽困难和大发作性癫痫。

除上述外，化学物还可引起胎期毒性，哺乳期毒性(通过乳汁致婴儿中毒，如铅中毒)，和通过对中枢神经系统及全身机能状态的毒作用来影响生殖过程。某些化学物还能经胎盘致癌(transplacental carcinogenesis)即致癌物由母血经胎盘进入胚胎，造成胚胎期接触，引发后代肿瘤。己烯雌酚(diethylstilbestrol)是第一个被证明的人类经胎盘致癌物(transplacental carcinogen)。孕妇孕早期作为保胎药服用时，女性后代可发现阴道透明细胞腺癌(clear cell adenocarcinoma)、阴道腺癌(adenosis)及阴道和子宫颈隆起；男性后代可发生附睾囊肿、睾丸营养性衰竭、睾丸囊性硬结、小阴茎畸形及精子异常。经胎盘致癌的发育致癌物(developmental carcinogen)通过动物实验已发现了 40 多种。

化学物的生殖发育毒性有两个显著的特点：一是生殖过程较机体的其他系统或功能对某些化学物的毒作用更为敏感，在成体系统毒性的未观察到有害作用的水平(no observed adverse effect level, NOAEL)胎儿即可受到影响。例如妊娠期接触过不足以引起肿瘤的低剂量二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine)，仔鼠成年后再次接触，则肿瘤发生率增加。二是损害作用不仅表现在接触化学物质的机体本身，还可影响其后代。例如母鼠接触高浓度二硫化碳引起致畸作用，其子一代即使不再接触二硫化碳，交配后所生的子二代仔鼠也出现与子一代仔鼠几乎完全相同的畸变类型。

第二节 生殖与发育毒性试验的目的和实验设计的要点

评价化学物对生殖和发育的毒性需要三方面的资料，即环境流行病学，动物生殖与发育毒性试验和控制的临床研究。另外体外筛选试验还可为发育毒性提供初筛和补充。但是在一些新化学品和药品开发初期，显然不可能得到流行病学方面的资料，也不能直接对人体做临床研究，首先要靠动物试验来预测它们对人生殖与发育的危险。

生殖与发育毒性研究的目的是揭示化学品 / 药品对哺乳动物生殖发育的任何有害影响，并将研究的结果与所有可以得到的其他药理学和毒理学资料联系起来，以推测对人可能造成的生殖危险。研究应包括成年动物和从受孕到子代性成熟的各个发育阶段接触受试物。为检测接触所致的即发和迟发效应，应连续通过一个完整的生命周期，即从亲代受孕到子一代受孕。为清楚地阐述各试验方案的组合，现将完整的生殖发育过程细分为如下阶段。

A 阶段 交配前到受孕：检查成年雄性和雌性生殖功能，配子的发育与成熟，交配行为，受精。

B 阶段 受孕到着床：检查成年雌性生殖功能，胚胎着床前发育、着床。

C 阶段 着床到硬腭闭合：检查成年雌性生殖功能，胎体发育，主要器官形成。

D 阶段 硬腭闭合到妊娠结束：检查成年雌性生殖功能、胎体的发育与生长，器官的发育与生长。

E 阶段 出生到断乳：检查成年雌性生殖功能，新生仔对宫外生活的适应，断乳前的发育与生长。

F 阶段 断乳到性成熟：检查断乳后的发育与生长，对独立生活的适应，达到完全的性功能。

以上不同阶段的组合可以构成许多可能的测试方案，各个国家和国际机构均发布了不同的试验准则和研究设计细则。本章介绍 ICH 准则和我国新药评价、农药及健康相关产品安全性评价中推荐的三段生殖毒性试验，一代和二代(多代)生殖毒性试验。

本章将用如下术语来描述整个生殖与发育过程：孕体[conceptus，包括胚体(embryo)和胎

体(fetus)、幼体(仔体 pup)、成体(adult)、母体(maternal)、父体(paternal)、亲代(parental generation)和子代(offspring)。

实验设计的一般考虑如下:

一、动物选择

必须以哺乳动物为实验对象。一般要求使用与其他毒理学研究中相同的物种与品系,以免必须进行另外的预试验。原则上实验动物对受试物的动力学、毒效学及其他有关参数应与人最接近,如代谢过程与生物转化应与人相近、胎盘结构与人相似、健康、生育力强、多产、孕期短、自发畸形率低、价廉、易得和操作方便。实际上没有一个固定物种可通用于精确模拟人类生殖毒性研究。在毒理学评价程序中,如果借助毒物动力学、药理学和毒理学的资料,能显示所选物种是人的生殖毒性实验的恰当模型,则用一种动物就够了。首选啮齿类中的大鼠,因用大鼠获得的其他实验结果有可比性并积累了大量的背景资料。在胚体——胎体毒性研究中,传统上要求用第二种哺乳动物进行试验。家兔因其也有较广泛的背景资料和比大鼠更接近人的代谢类型而作为“非啮齿类”优选使用。在测试多巴胺类兴奋剂或降低催乳激素水平的化合物时,大鼠不是一个好的动物模型,因为大鼠需要催乳素来维持早孕,在这种情况下使用家兔可能更好。但家兔孕期长短不定(32~36天),有时缺乏毒性资料,对某些抗生素和消化道紊乱有易感性,在其他生殖毒性研究中较少用。

二、接触选择

1. 剂量 剂量选择应依据从所有已进行的药理学、急性和慢性毒性、以及动力学研究中得到的资料。高剂量应该在母体中产生轻度的毒性,如体重增长减少,体重增长速度改变(与扰乱了内环境稳定的机理有关)、特异的靶器官毒性、药理学反应增强(如镇静、惊厥)、阴道出血、流产等。在研究中,要对所观察到的效应进行剂量—反应关系分析时,推荐至少用三个剂量水平和适当的对照组。低剂量不应有任何可归因于受试物的有害作用。中剂量组应在高、低剂量之间按等比级差定位,应引起最小的毒作用。如果对结果有怀疑,应增加第四个剂量组,以免剂量间隔过大。实验结果应提供最高未观察到有害作用水平的剂量,否则应对该受试物进行进一步深入的研究。

在大多数情况下,最高限量剂量为 $1\text{g}(\text{kg} \cdot \text{d})$ 假如仍未引起血浆和组织浓度增加时,可略微增加染毒剂量。在测试低毒物质时,假如剂量达到 $1\text{g}(\text{kg} \cdot \text{d})$ 仍不产生胚胎毒性或致畸,则没有必要进行其他剂量水平的研究。假如在高剂量进行的初步研究中,有明显的母体毒性的证据而未显示对胚胎的有害作用,也没有必要进行其他剂量水平的研究。

2. 接触途径与频率 应与人的接触途径相同,如果采用其他接触途径,必须依据动力学的资料。接触频率一般是一日一次,每日在相同时间染毒,并按体重调整染毒剂量。

3. 对照组 用与试验组相同的最大容量的赋形剂。当赋形剂可能有不良影响(如减少食物的摄取和利用)或影响受试物的作用时,应再设未处理对照组。

第三节 三段生殖毒性试验

用一组试验研究全部生殖毒性的终点是不可能的,所以在决定适当的策略和选择研究设计时,应考虑该受试物和其类似物质所有可能得到的药理学、动力学和毒理学资料。对大多数医药产品来说,三段生殖毒性试验设计通常是适当的。关键因素是各个生殖阶段之间不得有间隔,即在三个有关联的阶段接触受试物的时期至少有一天的重叠,并能直接或间接地评价生殖过程的所有阶段。三段生殖毒性试验由生育力和早期胚胎发育毒性试验,胚体——胎体毒性试验(致畸试验)和出生前后发育毒性试验(围产期毒性试验)三部分组成(图 8-1)。三段的划分是按有害作用诱发的时期,而不考虑检测的时间。

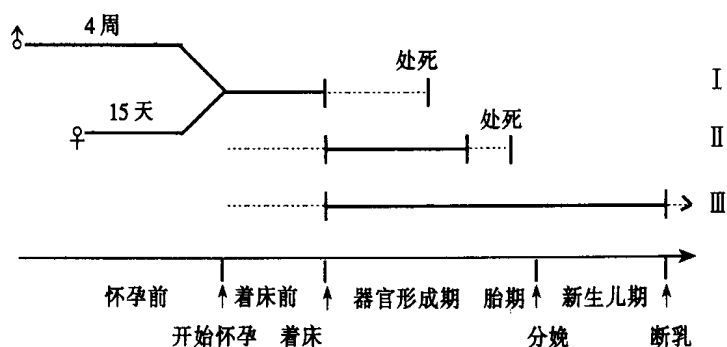


图 8-1 三段生殖试验图解

I 生育力和早期胚胎发育毒性试验 II 胚体—胎体毒性试验(致畸试验) III 出生前后发育毒性试验

一、生育力和早期胚胎发育毒性试验

1. 研究目的 评价化学物对配子成熟、交配行为、生育力、胚胎着床前和着床的影响(包括前述生殖发育过程 A 和 B 阶段的评价)。雌性包括对动情期、输卵管运输、着床和胚胎着床前阶段发育的影响。雄性包括检测对功能的影响(例如性欲、附睾的精子成熟等)。

2. 动物 至少一种, 首选大鼠。每性别、每组的动物数应足以对数据进行有意义的解释。建议每性别、每组 16~20 窝。

3. 给药期 应说明交配前染毒时间的长度并提供依据。一般采用雄性交配前四周开始重复染毒, 直至交配成功。若要保证雌性受孕成功, 雄性也可继续染毒, 仍同笼至处死。雌性交配前两周开始染毒(可覆盖至少两个完整的动情期)直至着床。

交配前雄性染毒期限较以往的规范变动较大, 1981 年 OECD 规定大鼠至少 10 周, 小鼠 8 周。然而与雌鼠交配不是检测对精子发生影响的敏感的方法。实际上没有一个实例表明受试物对雄性生殖毒性的结论是仅靠雄鼠连续给药 8~10 周后与雌性交配得出的。精子存活率和形态学检查等进一步研究可为在生殖毒性研究观察到的毒作用提供更敏感的终点。另外, 已知影响精子发生的外源化学物几乎总是影响减数分裂后阶段(精子成熟前 3~5 周)。对雄性性腺组织和器官进行仔细的组织病理学检查(Bouin's 液固定, 石蜡包埋, 睾丸作横切片, 附睾作纵切片, PAS 和苏木精染色)可对雄性生育力和精子发生影响提供有价值的补充信息。所以 ICH 准则将雄性染毒期缩短为 4 周, 并结合组织病理学检测。

4. 交配及受孕检查 雄大鼠给药 4 周, 雌大鼠给药 2 周后开始同笼。交配期 2~3 周, 交配比例 1:1。实验程序应能识别出各窝的 2 个亲本, 以避免不正确结果的分析 and 解释。

雌性受孕检查一般靠查阴道涂片(大鼠)或阴栓(小鼠)。阴道涂片上有较多白色分泌物, 镜检可见有较多有核上皮细胞, 则提示雌鼠处于动情前期。大鼠性周期一般为 4~5 天, 小鼠性周期为 4 天, 动情前期向动情期移行多在夜间。人和几种常用实验动物早期发育时间表 8-1。阴栓是雄鼠精囊与凝固腺在雌鼠阴道凝结而成的白色块状物, 形似米粒, 大鼠阴栓很易脱落。观察到阴道涂片上的精子或阴栓即提示受孕, 检出日为孕 0 天, 次日为孕 1 天, 以此推算孕龄。

表 8-1 某些哺乳动物早期发育的时间

物种	早期发育的时间(由排卵起的天数)			
	胚胞形成	着床	器官形成期	妊娠长度
小鼠	3~4	4~5	6~15	19
大鼠	3~4	5~6	6~15	22

家兔	3~4	7~8	6~18	~33
猴(恒河猴)	5~7	9~11	20~45	164
人	5~8	8~13	21~56	267

5. 终末处死 雌性一般在孕中期第 13-15 天终止妊娠。雄性在证实交配并受孕成功后处死检查。

6. 观察项目 染毒期间观察雌、雄亲代(P₀)体征和死亡(至少 1 次 / 日), 体重和体重改变(至少 2 次 / 周), 摄食量(1 次 / 周), 镜检雌性阴道涂片(交配期间 1 次 / 天)和其他毒性研究中见到的靶效应。

处死时所有成体均作尸体解剖和肉眼观察, 进行所有动物的睾丸、附睾、卵巢和子宫的组织学检查, 附睾或睾丸中的精子计数以及精子存活力测定。检查计数雌性的黄体数, 着床数, 吸收胎, 死胎和活胎数。保存肉眼发现改变的脏器, 以便进行可能的组织学评价, 并保存足够的对照组的相应脏器, 以供比较。对明显未孕的大鼠或小鼠(而不是对家兔), 可用硫化铵子宫染色鉴别胚胎着床前死亡。

7. 结果评定 综合对F₀代观察的各项指标和参数, 用合适的统计方法分析和评价。在分析对胎体(子一代, F₁)的影响时, 应考虑下述参数: 各组受影响的窝数比; 每窝受影响的胎体的组平均百分率; 受影响胎体总数比。

在对生殖与发育毒性的试验结果进行推理统计(显著性检验)时, 应以窝(litter)[在两种性别均被处理时, 以交配的双方(mating pair)]; 在两代生殖毒性试验中, 以亲代交配的双方, 而不是以胎体或新生仔为比较的试验单位。

二、胚体—胎体毒性试验(致畸试验)

1. 研究目的 评价母体自胚泡着床到硬腭闭合期间接触受试物对妊娠雌性和对胚体—胎体发育的有害影响, 即前述生殖发育过程中的 C 和 D 阶段, 主要包括增强了与非妊娠雌性有关的毒性, 胚体—胎体死亡、生长改变与结构异常。

2. 动物 通常用两种, 一种是啮齿类, 首选大鼠, 另一种是非啮齿类, 最好是兔。若仅用一种动物, 需提出正当理由。每组动物数应足以对数据进行有意义的解释。建议每组 16~20 窝。雌性宜用性成熟的, 未交配过的动物。

3. 给药期 从着床期到硬腭闭合, 即器官形成期, 大、小鼠孕期的第 6~15 天, 兔孕期的 6~18 天。致畸实验日程见表 8-2。

表 8-2 致畸试验日程

	大 鼠	小 鼠	兔
交 配	90~120 日龄	60~90 日龄	成年未交配过的
染毒时间	孕第 6~15 日	孕第 6~15 日	孕期 6~18 日龄
处死取胎	孕第 20 日	孕第 18 日	孕第 29 日

致畸试验除阴性对照外、应设阳性对照组。阳性对照大、小鼠可用乙酰水杨酸或浓缩鱼肝油, 家兔可用 6-氨基烟酰胺。阴性与阳性对照组的作用分别是为自发畸形的发生和该批实验动物在试验条件下的敏感性提供资料。已经进行过致畸试验并确知所用试验动物有阳性结果的实验室, 可略去阳性对照。

4. 终末处死与标本制作 在分娩前一天处死怀孕母体, 以防止自然分娩后, 母体吞食畸形子。剖腹检查亲代受孕情况和胎体发育。除逐个检查所有胎体的存活和畸形外, 尚需分别检查软组织和骨骼的异常。将每窝 50%胎仔经茜素红染色后, 作骨骼检查。另外 50%胎仔经 Bouin's 固定后, 作内脏检查。当使用新鲜标本的显微解剖技术(microdissection techniques)检查软组织改变时(对家兔胎体检查的最好方法), 100%的家兔胎体均作软组织和骨骼检

查。

5. 观察项目 染毒期观察妊娠动物的体征和死亡(1次/日), 体重和体重改变(2次/周), 摄食量(1次/周)和在其他毒性研究中已证实的重要靶效应。有流产和早产征兆者处死并进行肉眼检查。

处死时对所有妊娠动物进行尸体解剖和肉眼检查任何结构异常或病理改变。保存肉眼发现有改变的脏器, 以便进行组织学评价, 亦保存足够的对照组的相应脏器, 以供比较。取出子宫, 称带有胎体的子宫重, 以得出妊娠雌性动物的净增重。计数黄体数, 吸收胎数, 活胎数与死胎数及着床点, 称胎盘重并作肉眼评价, 必要时可作组织学检查。称活胎体重, 检查胎体性别, 以及外观、内脏和骨骼畸形。

6. 结果评定 致畸研究的发现应根据观察到的效应和产生效应的剂量水平进行评价。有必要考虑所用试验动物的物种/品系的历史的致畸性资料。致畸研究进行适当, 应提供一个符合要求的 NOAEL(未观察到有害作用水平)的估计。虽然将实验结果外推到人的可靠性有限, 然而 NOAEL 的建立, 使得能以采取适当的安全系数。

对母体的终点评价指标包括: 体重、体重变化、食物消耗量和母体毒性体征及母体畸胎出现率等。对胎体影响的评价应包括: 受影响的窝数比、每窝受影响胎体数的组间均数、受影响的胎体总数比、畸胎率和某单项畸胎率等。

7. 影响致畸作用的因素 致畸作用受多种因素影响, 主要包括敏感期、遗传类型、剂量和母体毒性等。

(1) 致畸敏感期 实验证明器官形成期(organogenesis period)是发生形态结构畸形(malformation)的关键期(critical period)。迅速改变细胞分裂速度对畸形发生是极为重要的, 因为增加复制速度即增强了突变的可能性。器官形成期正是细胞分裂极旺盛的时期。例如发育中的大鼠在妊娠第 8~10 天之间, 有 10 次细胞有丝分裂, 产生 $N \times 2^{10}$ 新细胞(N表示器官形成期开始时的细胞数)。人的器官形成期在人妊娠的第 3~8 周。60 年代反应停药物致畸事件就在人怀孕后的 20~35 天内, 在无一般毒性的“安全剂量”[1mg / (1g · d)]下发生的, 有人甚至在这阶段内只服过一次药。大多数器官又都有其对致畸作用的特殊敏感期, 即“靶窗(target windows)”。形态畸形和功能缺陷的敏感期也不同。致畸实验的染毒时间, 必须安排在器官形成期, 才有可能观察到形态畸形的致畸效应。由于各物种妊娠期长短不同, 敏感期的长短也不同, 致畸试验的染毒时间需随动物种属而易。图 8-2 表示人、大鼠和家兔的致畸作用关键期的比较, 并图解狭窄的“靶窗”概念。

(2) 遗传类型 致畸作用存在明显的物种差异, 这种差异是因代谢变化、胎盘种类、胚胎发育的速度和方式引起的。致畸物各有其易感物种和品系, 易感性取决于机体的基因型。推测化学物生物转化成活性中间产物的速度和途径与遗传因子有关, 而畸形仅发生在那些形成恰当代谢物的物种中。反应停是其中一例。反应停 4000mg / kg 对大鼠和小鼠尚不致畸, 而对人 0.5~1.0mg / kg 就有极强的致畸作用, 这是由于人、猴和兔能将其代谢产生一个中间产物(可能是一个极性的代谢物, 或一个 anene 氧化物), 而其他物种不产生。所以一个化学物在某些物种中是致畸的, 在其他物种中产生很小或不产生影响, 或是一个物种产生的畸形, 可完全不同于在另一个物种中诱发的畸形。所以在筛选致畸物时, 强调采用包括非啮齿类在内的两种动物中进行试验, 可以减少因动物不敏感而出现的假阴性。

(3) 化学物的剂量 各种致畸物都有其引发致畸作用的阈剂量。不同致畸物又有不同类型的剂量-效应关系, 反映了不同外源化学物胚胎毒性作用的特点。一般地说, 所用的剂量高于该化学物致畸作用的阈剂量时, 可使致畸范围扩大、程度加重、靶窗延长, 再增大则出现胚胎死亡。而由于有缺陷的胚胎死亡, 畸形率反而会降低。剂量再进一步增大, 则可造成母体的死亡。

典型的致畸作用的剂量-反应曲线的斜率很大, 从最大未观察到有害作用剂量到胚胎 100% 死亡的剂量只差 2~4 倍。如给孕小鼠腹腔注射环磷酰胺 5~10mg, 未见畸形发生, 而 40mg

/kg 即可引起胚胎 100% 死亡。从最大未观察到有害作用剂量到胚胎死亡剂量间的剂量带，称为致畸带。致畸带越宽的致畸物，致畸危险性越大。掌握致畸作用中剂量—反应关系的规律，对致畸实验中适当剂量的确定具有重要意义。剂量过低，不足以显示确实存在的致畸作用。剂量过高，引起大量胚胎死亡，畸胎数减少，或对母体毒作用过强，不能辨明是致畸物的作用，还是母体毒性的继发作用，均影响结果的正确判断。

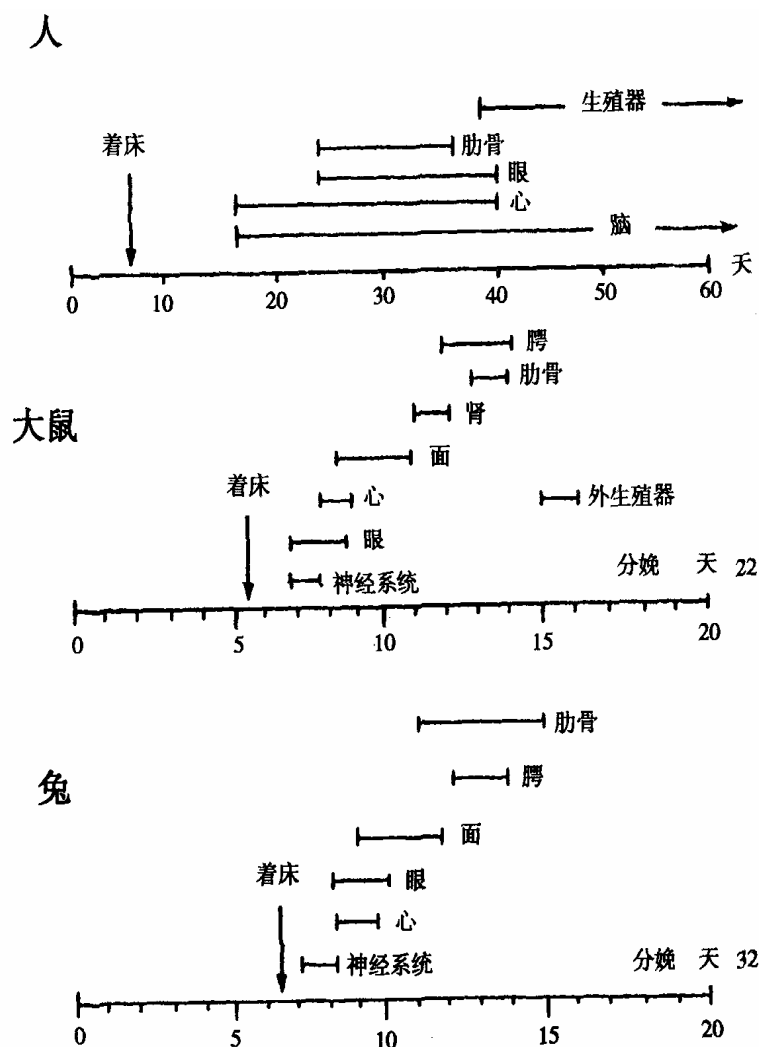


图 8-2 人、大鼠和家兔的致畸作用关键期的比较，短线表示“靶窗”

(4)其他因素 化学物的理化性质与致畸作用有关。若外来化学物或其代谢产物的分子量小、极性小、高脂溶性、未与母体血浆蛋白结合，则易穿透胚盘屏障，到达胚胎体内。染毒途径也影响致畸试验结果，大鼠受孕第 7~14 天经口给以 EDTA，引起 70% 胎鼠畸形，但以同样剂量皮下注射，对母体毒性增加，却未见明显的胎鼠畸形。同样是经口染毒，灌胃和经饲料、饮水染毒在动力学也有差别。如苯菌灵(Benomyl)灌胃染毒致畸，而经饲料染毒则否。反应停对大鼠灌胃结果为阴性，而经饲料染毒几乎全部胚胎致死。母体状况也是影响致畸作用的重要因素，见下。

8. 母体毒性与致畸的关系 母体毒性是指对怀孕母体的特异的(直接的作用)或非特异的(间接的作用)的有害影响。

在致畸试验中，剂量选择应避免用诱发母体毒性的剂量，因为若怀孕母体中毒，而不能

正常进食,由营养缺乏对胎儿产生的影响可能比化学物本身的影响还大。例如羟基脲染毒引起怀孕家兔子宫血流量降低,出现胚胎毒性。二氟尼柳(Diflunisal)引起孕兔溶血性贫血,严重时伴发孕体中轴骨骼畸形。己酰唑胺诱导小鼠胎体畸形明显地与母体血内碳酸过多和血钾过少有关。苯妥因对小鼠的致畸性可能继发于母体心率降低,组织内氧分压降低。但胚胎毒性并不是任何时候都是继发的、与母体毒性同时发生的,通常二者间很难建立因果关系。为证明胚胎毒性是继发于母体毒性的一个特殊的参数,必须显示所有胚胎毒性的母体也有母体毒性,以及对此发育影响的严重性和发生率与母体毒性相关。一般认为胚胎死亡和生长迟缓是母体中毒剂量水平引起的胚胎毒性表现,但先天畸形是否继发于母体毒性还有争论,1984年 Khera 提出各种化学物质的母体毒性和致畸作用之间有三种关系:①母体毒性不伴致畸作用;②母体毒性伴有包括腭裂在内的多种畸形谱;③母体毒性伴有特征性的畸形谱。判断第二类化学物质的致畸性是很困难的。腭裂是小鼠在妊娠期禁食和禁水诱发的最主要的畸形。但也是多种致畸物如糖皮质类固醇在不引起母体毒性的剂量水平特异性诱发的畸形。为了区别腭裂是由于化学物质对胚胎的致畸作用还是继发于母体毒性的非特异毒性作用,就需要观察饲料和饮水消耗量,母体体重及母体内稳态改变(即组织病理学,肾和肝功能异常,血液学改变,药理作用及其他可能的毒作用)。第三类化学物质引起的特征性畸形包括露脑,开眼,融合肋,缺肋,多肋及胸骨节融合或杂乱。这些缺陷的严重性和发生率与母体毒性直接相关,无母体毒性的剂量水平则无或罕见。Khera 认为这些缺陷是由于母体毒性,并不反映化学物质的致畸性。但大多数学者认为母体毒性可能引起肋骨和胸骨的微小变异,但不会引起露脑及开眼等重要畸形。

9. 致畸物及发育毒物的危险度评定 由于致畸作用的机理尚未充分阐明,所以致畸物危险度评定方法也没有完全统一。本章只介绍三种方法,供实际工作中参考。

(1) 致畸指数判断

致畸指数: 母体LD₅₀ / 胎体最小致畸剂量

通过致畸指数可以判断致畸带的宽窄和致畸性的强弱。致畸指数小于 10 为一般不致畸,致畸指数 10~100 为致畸,大于 100 为强致畸。

(2) 化学物致畸潜力分类和安全系数确定

根据动物试验中发育毒性效应的类型、严重性和发生率将化学物分为四类,并规定各类型的不同的安全系数范围(表 8-3),用以评定待测物发育毒性的危险度。

表 8-3 致畸化学物的分类

基 准	A 类	B 类	C 类	D 类
1. 最小母体中毒剂量与最小致畸剂量之比	远大于 1	大于 1 或两剂量间有很大重叠	小于 1	母体中毒时无致畸
2. 畸胎率	高,与剂量有关	高,与剂量有关	低,但与剂量有关	----
3. 较低剂量时畸形的类型	有特定的器官系统	一般为多发性,也可能有特定的特点	无特异性,广泛多发	----
4. 靶细胞	特定细胞	特定细胞	泛化、非特定细胞	不 详
5. 安全系数范围	~400	~300	~250	~100

国际生命科学院(International Life Sciences Institute, ILSI) 1989 年提出

(3) ICH 人类用药危险度分类 研究设计中规定,一旦一种新药被批准,就要根据动物发育毒性的研究结果和从人类使用经验得到的信息(但通常得不到),将该药品在妊娠用药类别中定位(共 5 类),并要求医生在开处方时遵守,以使怀孕妇女按规定使用这些药品。妊娠用药类别见表 8-4。

表 8-4 妊娠期用药类型

人群研究结果	动物实验结果		
	+	-	无可用资料
+	X 或 D	X 或 D	X 或 D
-	B	A	A 或 B
无可用资料	C ₁	B	C ₂

A、B、C₂: 仅在如果明显地需要时, 在怀孕期间可使用。

C₁: 仅在如果证明可能的效益与对胎儿的可能的危险比较是可取时, 在怀孕期间可使用。

D: 如果在怀孕期间使用, 应通知病人对胎儿可能的危害。X: 在怀孕或可能怀孕的妇女中禁止使用。

(4) 根据动物试验人群调查资料对致畸物分级, 这是由欧共体 (EEC) 和经济与发展组织 (OECD) 所建议。

表 8-5 致畸物的参考分级标准

级 别	分 级 依 据	对 人 类 危 险 性
1	已确定人类母体接触后可引起子代先天性缺陷子	已证实对人致畸
2A	对动物肯定致畸, 但对人类致畸作用尚未确定因果关系	对人可能致畸
2B	动物试验结果肯定致畸, 但无人类致畸资料	对人可能致畸
3	尚无结论性肯定致畸证据或资料不足	可以认为对人无致畸作用, 但应继续研究,
4	动物试验阴性, 人群调查结果未发现致畸	对人无致畸作用

10. 确认人类致畸物的标准 尽管外源化学物在动物试验中阳性致畸物的比率很高, 但确认的人类致畸物还比较少。由于没有完全适合的动物模型, 在确认人类新的致畸物时, 不能把动物实验的结果轻易外推到人, 还必须结合环境流行病学和有控制的临床研究的结果进行评价。Wilson 提出的确认人类新的致畸物的标准如下:

- (1) 一种特殊的缺陷或几种缺陷并发(综合征)的频率突然增加。
- (2) 缺陷的增加与某种已知的环境改变, 如一种新药的广泛使用巧合。
- (3) 已知在妊娠的特殊阶段接触环境的改变, 产生有特征性缺陷的综合征。
- (4) 缺少妊娠时引起特征性缺陷婴儿产生的其他普通因子。

确认的人类致畸物见表 8-6。

表 8-6 已知的人类致畸物

电 离 辐 射	药 物 和 化 学 品	
放射治疗	反 应 停	异 维 A 酸
放射性碘	Abameetin	锂
原子武器	酒 精	甲 巯 咪 唑
感 染	氨 基 蝶 呤	有 机 汞 化 合 物
风 疹	雄 性 激 素	有 机 溶 剂 类
巨细胞病毒感染	麻 醉 剂	苯 妥 因
单纯性疱疹	抗 甲 状 腺 药 物	腐 霉 利
梅 毒	白 消 安	四 环 素

弓形体病	咖啡 因	三甲恶唑烷二酮
代谢失调	氯代联苯类	丙(基)戊酸
克汀病	香豆素抗凝剂	
糖 尿 病	环磷酸胺	
苯丙酮酸尿	二己基乙烯雌酚	
男性化肿瘤	敌 螨 普	
高 温	三氟氯溴乙烷	

三、出生前和出生后发育毒性试验(围生期毒性试验)

1. 研究目的 评价母体自着床至断乳期间接触化学物对妊娠 / 哺乳母体和对孕体及代发育直至成熟的有害影响(前述生殖过程的C-F阶段)。在此期间引起的毒性反应会延迟发生,故观察应继续到性成熟。有害影响主要包括增加与未妊娠雌性有关的毒性,子代出生前和出生后死亡,生长与发育的改变,子代中的功能缺陷(包括行为,青春期性成熟)和生殖(F₁代)。

2. 动物 至少一种,首选大鼠。每性别、每组动物数应足以对数据进行有意义的解释。建议每组 16-20 窝。

3. 染毒期 雌性从着床至哺乳期终止。

4. 实验程序及终末处死 允许分娩和抚养子代到断乳。子代出生当天被定为出生后 0 天。在断乳时,每窝可选出部分雄性和雌性子代抚育到成熟并交配。有些实验室将亲代(F₀)动物分组,分别或联合进行行为试验和生殖功能评价。

亲代于F₁代断乳时处死。F₁代动物处死日龄以及窝大小尚未标准化,因实验室而异。有些实验室在F₁代出生 0, 3 或 4 天调整窝大小,剔除多余仔鼠(每窝 8 只,尽可能雌雄各半),并在出生第 21 天或断乳时陆续处死。评价生殖能力的F₁代要在雄 / 雌同笼,子二代(F₂)出生后处死。

5. 观察项目 染毒期间观察亲代体征和死亡(至少 1 次 / 日)、体重、体重增长(至少 2 次 / 周)和在以前毒性研究中见到的有评价价值的靶效应、妊娠的长度、分娩。

处死时对所有亲代和F₁代成体进行尸解,肉眼检查任何存在的结构异常或病理改变,特别要注意生殖系统的器官,保存发现改变的脏器和进行可能的组织学评价,并保存足够对照组的相应脏器,以供比较。检查着床数,对明显未孕大鼠或小鼠(但不是家兔)可用硫化铵染色以证实胚胎着床前死亡。

子代需检查每窝出生时活仔数、死仔数、畸形数、出生时和断乳前后存活率、体重、身长、身体发育、性成熟和生育力、感觉功能、反射和行为等。身体发育和最好指标是体重。断奶前还包括张耳、开眼、出毛、出牙。断乳后包括表明性成熟开始的雌性阴道张开和雄性龟头包皮分开。建议在达标时记录体重,以辨别与对照的任何差异是特异的,还是与一般生长有关。功能试验目前未规定专门的试验方法,鼓励对感觉功能、反射、运动能力、学习和记忆的检测方法进行探索。现将部分常用的神经行为功能试验介绍如下(表 8-7),以供参考。

表 8-7 哺乳动物神经功能试验项目

参 数	研 究 方 法
平面翻正 (出生后 4 和 7 天)	翻正反射,将子鼠背贴在平滑的面板上,记录翻身,四脚着面板所需的时间
负向地性 (出生后 4 和 7 天)	将子鼠头朝下放在一个 30°倾斜的面板上,测它们调转自身,成为头朝上位置所需的时间。
悬崖躲避 (出生后 7 天)	将子鼠放置和定位于高于桌面 10cm 的平台上,使其前肢和口鼻部均处于平台边缘一条假想线的某一点上,记录其向后退所需的时间。

游泳行为 (出生后 4 和 14 天)	将子鼠放在水温 23℃ 的水槽中, 游泳行为是对方向(直线, 环形, 漂浮), 头出水面的角度(耳露出水面, 半个耳出水面, 鼻和头顶出水面, 不能保持头向上)肢的运动(四肢, 后肢)的评定。
嗅觉定向 (出生后 14 天)	将仔鼠放在两个相连盒的连接臂中, 一间盒中放有未用过的木屑, 另一个放于鼠用过的木屑(家), 测动物发现“家”所需的时间。

6. 结果评定 综合亲代(F_0)和子代(F_1)各项指标观察的结果, 对围产期给药的毒性及影响程度做出综合评价。

第四节 一代和多代生殖试验

一些外源性化学物如食品添加剂、农药以及环境污染物等人类反复接触, 与仅在患病期间使用的药品不同, 欲查明其对生殖有关的影响, 仅做三段生殖毒性试验是不够的, 应进行多代生殖试验。

除了家兔的胚体-胎体发育试验外, 上述各段试验均可联合成一代或多代研究以代替分开进行的每段试验。一、二或三代研究的定义是按直接与受试物接触的成年动物的代数规定的。

一、一代生殖毒性试验

一代生殖毒性试验是指仅亲代(F_0 代)动物直接接触受试物, 仔一代(F_1)将在母体子宫内及经哺乳接触受试物。例如将生育力研究和出生前后研究的染毒期合并, 雄性在交配前 4 周, 雌性在交配前 15 天直至断乳接触受试物, 就构成了一个典型的一代生殖毒性研究(即 A-E 阶段的评价)(图 8-3)。假如在这种研究中包括胚体-胎体期检查, 部分孕鼠在分娩前一天处死, 进行胎鼠形态与结构检查, 另一部分正常分娩和继续接触毒物至断乳和对子代进行生化, 生理或行为的评价, 并在足够高的接触剂量得到清楚的阴性结果, 则没有必要在啮齿类中, 进行进一步研究, 但希望提供另一种动物进行胚体-胎体发育毒性的结果。

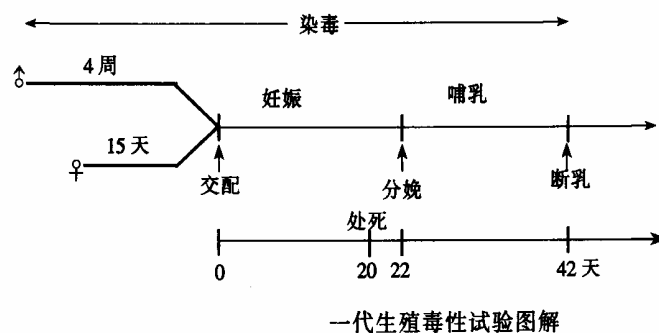


图 8-3 一代生殖毒性试验图解

二、两代(多代)生殖毒性试验

两代生殖毒性试验是指仅对两代动物成体进行染毒, 即 F_0 代直接接触受试物, F_1 代既有直接接触, 也有通过母体的间接接触, 第三代动物(子二代, F_2)将在子宫和经哺乳接触受试物。三代及多代的研究也照此规定类推。

实验程序: F_0 代雄性于交配前 4 周接触受试物, 雌性于交配前两周接触受试物并延续至哺乳期, 以便 F_1 代经胎盘转运和经乳汁接触受试物, F_1 代在断乳时处死, 尸体解剖并检查出现的异常与畸形。断乳后的两周, 仍然接触受试物的 F_0 代雌鼠再繁殖产生第 2 窝 F_1 B 代。 F_1 B 代断乳后, 随机选出部分 F_1 B 进行进一步生殖毒性研究。即 F_1 B 代在同一周龄接受同一剂量受试物, 繁殖并开始下一个周期, 产生 F_2 A 代。 F_2 A 代断乳时处死, 检查。 F_1 B 代再繁殖, 产生第二窝 F_2 B 代。如此提供了不断接触受试物的子代来源和开始下一代 F_3 A 和 F_3 B。图 8—4

表示三代生殖试验(图 8—4)。

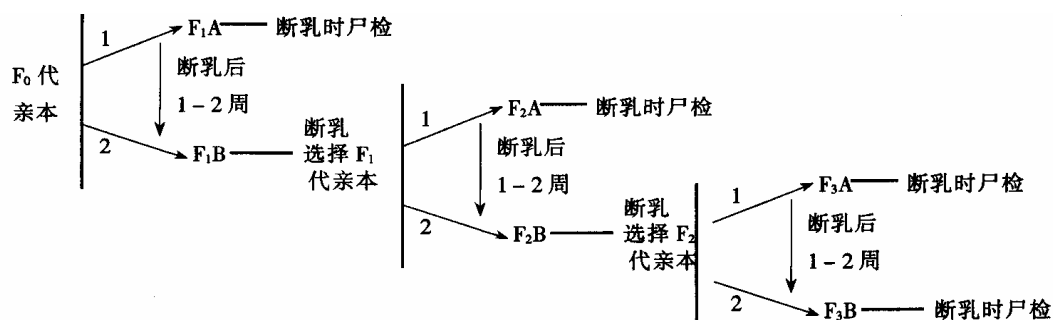


图 8-4 多代(含三代)生殖毒性试验图解

结果评定:应依据观察到的毒效应,尸检和镜检的结果对生殖毒性研究的发现进行评价。评价应包括受试物的剂量与包括生育力、体征、体重改变、死亡数和其他毒效应在内的异常是否存在及其严重性之间的关系。生殖毒性试验进行适当,应提供 NOAEL 的良好估计和对生殖、分娩、哺乳和出生后生长等的了解。

多代生殖毒性试验可看作对处于繁殖期动物的毒性筛选试验,虽然它强调的是检测针对生殖的影响,但对检测作为与生殖和发育有关的生理变化的结果而发生的一般毒效的增强也是有用的。

多代生殖毒性试验的主要优点是能检测对生殖的间接或直接的范围广泛的毒作用。这种能力是由于生殖过程的复杂性,以致于孤立看时难以确认的微小毒作用可联合或级联(cascade),以在更远的终点(如窝重)产生一个更显著的偏移。交配前期间的观察为评价随后的观察提供了背景资料;在交配期间初期的观察可确定性欲缺乏或激素(动情)周期的紊乱;在这以后得到的资料表明繁殖力、生育力、出生前的毒性、分娩、哺乳、断乳和子代出生后的生长和发育、青春期末至性成熟的毒效应。

在生殖毒性试验中交叉交配(即未处理的雄性与处理的雌性交配,或反之)可能也是需要的,以查明不育配偶的性别。一旦确定不育性别后,生殖系统的组织病理学检查可以提供表明毒效应种类的报告。还可以进行血液中激素水平的测定。

出生后仔鼠的生长速度和存活率受多种因素的影响,包括母体一般饲养、宫内开始的效应、母体哺乳减少、乳汁中存在毒物。当出现仔鼠死亡或体重增长降低时,首先应对死亡仔鼠进行组织病理学检查。如果哺乳受到影响,应进行交叉抚养研究,即处理母鼠的仔鼠由未处理的母鼠抚养,或反之。

第五节 生殖和毒性的检测方法

一、雄性生殖毒性实验

雄性生殖器官产生精子,精子是一种高度分化的细胞,它不仅把父亲的遗传信息传递给卵子,它又可决定新生后代的性别。

精子的发生是指精原细胞发育成为成熟精子的过程。自胎儿期以来,精原细胞在曲细精管中是休止着的,到了青春期数量开始增多。曲细精管基底膜上的精原细胞在性成熟期间不断分裂,同时产生初级精母细胞,经过减数分裂,形成两个单倍体的次级精母细胞,再经等数分裂,形成四个单倍体的精子细胞,精子细胞再进一步分化成为具有特殊形态的成熟精子。从一个精原细胞分化成为成熟的精子,各种动物所需要的天数是不同的。例如,小鼠为 34.5 天,大鼠为 48 天。

调节精子发生的激素主要有垂体前叶分泌的 FSH, LH 以及睾丸间质细胞产生的雄激素。进入曲细精管的精子没有活动能力,在副睾丸中经过成熟过程才逐步获得了运动能力和受精能力,也就变成了具有活泼运动能力的成熟精子。精子的发生是周期性变化的。对于同一种动物而言,精子发生所需要的时间相对恒定。所以了解生精上皮的周期性变化,对确定食品中化学物质对精子发育各阶段的影响有着重要意义。化学物质作用时间与精子发育阶段的关系见表 8-8。

表 8-8 化学物质作用时间与精子发育阶段的关系

受作用时精子发育阶段	从给药到精子成熟经历的时间(W)	
	小 鼠	大 鼠
输精管和附睾内的精子	1	1~2
后期精细胞	2	3
前期精细胞	3	4~5
次级精母细胞	4	6~8
初级精母细胞	5	6~8
精原细胞	6	9

雄性生殖毒性实验

(一) 精子分析 精子分析是生殖毒性较为敏感的指标,主要包括精子计数、精子运动能力以及精子形态的检查。实验常用小鼠或大鼠。收集精子的方法可采用交配射精后冲洗阴道的方式获取精子,但大多采用处死动物收集睾丸尾部和输卵管中的精子。

(二) 精子穿透实验 精子穿透实验实际上就是精子体外授精的实验。精子在体外成功地穿透卵子的能力是常规精子分析所不能显示的。其实验原理是哺乳动物受精过程中物种专一性主要表现在卵子的透明带上。获能及顶体反应是所有哺乳动物精子进行的先决条件。因此,以受试动物的精子使去透明带的金黄地鼠的卵子受精,以综合评价外来化学物质对精子授精能力的影响。

(三) 大鼠睾丸支持细胞与间质细胞分离培养 虽然整体动物实验是评价化学物质性腺毒性的主要途径,但其耗时、费力,而且在中毒机制的研究中也受到诸多限制。应用睾丸体外培养的手段检测化学物质对睾丸功能的影响,不失为一种简便、可靠的方法。

1. 睾丸支持细胞的分离与培养: 支持细胞是曲细精管上皮除各级生精细胞外,与精子生成有关的细胞之一。虽然它是睾丸生精上皮中唯一的非生殖细胞,但它对精子的发生发育具有十分重要的意义。支持细胞能分泌多种生物活性物质,对生精细胞起到支持和营养作用。因为生精细胞本身不能利用葡萄糖,它所必须的能量是由支持细胞糖酵解所产生的乳酸和丙酮酸来提供。支持细胞具有较强的糖酵解能力,可将葡萄糖转化为乳酸和丙酮酸。支持细胞的乳酸含量和乳酸脱氢酶活性的变化常被作为反映支持细胞功能以及对生精细胞能量代谢的影响和对生精过程干扰的指标。

2. 睾丸间质细胞的分离和培养: 间质细胞分布在睾丸曲细精管的结缔组织中,细胞呈圆形、梭形或多角形,体积较大,胞核有 1—2 个核仁,胞浆丰富,呈嗜酸性,含有大量滑面内质网。间质细胞的主要功能是分泌雄激素(睾丸酮)。

(四) 睾丸中标志酶活性检测 睾丸中酶含量和活性的改变是生殖毒性的敏感指标之一,可以简便且可靠地反映出外来化学物质对睾丸功能的损害。已知睾丸中的酶大致可分为两类,一类酶其含量和活性随着精子的形成、成熟而增高,如乳酸脱氢酶同工酶、山梨醇脱氢酶、透明质酸酶、 α -磷酸甘油脱氢酶等;另一类则是随着精子的形成、成熟,其活性下降,如 6-磷酸葡萄糖脱氢酶、苹果酸脱氢酶、三磷酸甘油醛脱氢酶以及异柠檬酸脱氢酶等。下面对常用的三项睾丸酶活性检测方法加以介绍。

1. 乳酸脱氢酶x (LDHx) 检测: LDHx是睾丸组织和精子中的一种LDH同工酶,是精子的一种特异酶,存在于精子中段线粒体和尾段浆膜内,其活性与精子的发育、成熟有关,在精母细胞的减数分裂、分化和成熟精子的能量代谢过程中起重要作用。因此,LDHx活性测定可以作为评价精子质量的指标。其基本原理是LDHx催化乳酸脱氢生成丙酮酸,使辅酶I(NAD^+)还原为NADH,酚嗪二甲酯硫酸盐(PMS)将NADH的氢传给硝基四唑氮蓝(NBT),使其还原成紫蓝色化合物而显示出酶的有色区带。

2. 山梨醇脱氢酶检测: 山梨醇脱氢酶(SDH)是一种精子特异酶,在睾丸主要分布在曲细精管和精细胞的线粒体内,在精子能量代谢中起重要作用。精子主要以果糖为供能原料,SDH把果糖转化为山梨醇,进而转化为葡萄糖,才开始通常的代谢途径。SDH在睾丸成熟期内随着睾丸的重量增加其活性亦增加,因而常被视为睾丸成熟、精子功能和形态完善的标志酶。其基本原理是SDH催化山梨醇氧化成果糖,与此同时氧化型辅酶I(NAD^+)被还原为NADH。在340nm处测定NADH的生成量,计算SDH的活力。

3. 6-磷酸葡萄糖脱氢酶检测: 睾丸内的6-磷酸葡萄糖脱氢酶(G-6PD)主要存在于曲细精管的间质细胞、支持细胞和精细胞内,尤其是间质细胞内G-6PD活性最强。在合成睾酮过程中需要NADPH为辅助因子。氧化旁路即戊糖途径,是间质细胞中NADPH的主要来源。因G-6PD是氧化旁路开始时的重要酶,从而G-6PD可由供应NADPH的情况为反应间质细胞功能的一个指标。其基本原理是G-6PD催化6-磷酸葡萄糖(G6P)氧化成6-磷酸葡萄糖- δ 内酯,之后很快氧化为6-磷酸葡萄糖酸(6-PGA),与此同时氧化型辅酶II(NADP^+)被还原为NADPH。通过测定NADPH的生成量计算G-6PD的活性。

(五) 雄性激素检测 睾丸生成精子的同时还具有分泌性激素的功能。雄性激素是睾丸中产生的主要性激素,睾丸的功能主要靠卵泡刺激素、促黄体生成素和睾酮来维持和调节。卵泡刺激素主要作用于曲细精管的支持细胞,使其合成与分泌雄性激素结合蛋白。后者的作用是使雄性激素浓聚,维持曲细精管中的雄性激素达到一定水平。促黄体生成素主要作用于间质细胞,使其合成和分泌睾酮。雄性生殖系统无论生精过程、精子成熟过程,还是附属性腺的分泌活动,都需要有足够的睾酮。检测上述三种性激素含量有助于生殖毒性的评价以及生殖毒作用机制的探讨。下面介绍血清睾酮含量测定方法。

(六) 雄性生殖器毒性病理检验 从形态学角度评价外来化学物质对雄性生殖系统的毒性作用,是雄性生殖毒理学研究中不可缺少的较为敏感的指标和重要手段。

睾丸、附睾、前列腺以及精囊的重量和大小的改变常是接触有害化学物质的明显征兆。睾丸组织最易受到外来化学毒物的侵害,因此在亚慢性或慢性动物实验中,睾丸组织形态检验是一项重要的指标。

睾丸外观呈椭圆形,成年大鼠睾丸大小约为14mm×20mm,重2~3g。表面包有一层透明而致密的,有接缔组织构成的白膜。睾丸实质内有较疏松的接缔组织型筒直分割成睾丸小叶。小叶内是由大量曲细精管,小管管腔直径均匀一致。曲细精管的管壁主要由生精上皮构成。该上皮与基底膜相接,细胞核靠近基底膜。生精细胞处于不同发育阶段,从基底膜到管腔排列5~8层。靠基底膜近处为精原细胞,核比较大。在精原细胞里侧是初级精母细胞,胞体较精原细胞大。再往内侧是次级精母细胞,接着是精细胞,最内侧则为精子。小叶间质组织中存在具有突起、形状不整的间质细胞。

外来化学物质作用于雄性生殖系统,可引起睾丸及其附属器官、组织或细胞的病理性损伤。睾丸各种细胞,特别是各级生精细胞其生理、生化功能各异,因而毒作用引发的受损表现与程度亦有很大差异。动物实验证明,有些毒物对睾丸曲细精管生精上皮的发育有不同程度的影响,如生精细胞胞质、胞核的改变,或是细胞产生变性、坏死;有的毒物表现为致精子数目减少。

因为实验目的各不相同，形态学研究的实验动物染毒途径、处理剂量、取材时间、处死动物的方式以及观察的重点均不能划一。

解剖观察是生殖毒性病理检验的主要环节，对以后的光镜或电镜观察结果的可靠性以及结论的正确性都有很大的影响，必须认真做好大体解剖的操作，检视和记录，正确取材，选择合适的固定液保存病理检验材料。由于电镜技术和其他创新的检测手段的建立、发展，生殖毒性病理学研究深入到亚细胞和分子水平。对组织和细胞化学成分进行微量甚至超微量分析，亚细胞水平定位等方法的出现，使病理形态逐渐脱离单纯的形态微量甚至超微量分析，亚细胞水平定位等方法的出现，使病理形态逐渐脱离单纯的形态描述，而把形态结构变化与功能改变紧密地结合起来。

(七) 雄性生殖细胞遗传毒性检测 除传统的哺乳动物生殖细胞突变试验，如：小鼠睾丸染色体畸变分析、小鼠精子畸变分析、小鼠显性致死突变试验、黑腹染色体性隐性试验等外，这里再介绍一下小鼠精子慧星试验。

慧星试验 (comet assay)，又称单个细胞凝胶电泳试验 (single cell gel assay, SCG)，是1984年由 Ostling 和 Johanson 首先建立的，该方法的优点是测试完整细胞 DNA 链断裂，简便又快速。其原理和方法如下：

细胞在体内或体外试验中受化学物作用后，DNA 链发生断裂。将细胞制成单个细胞悬液。在载玻片上制备加有受检细胞混悬液的凝胶，在碱性条件下使细胞裂解，DNA 解旋后进行电泳。带负电荷的 DNA 断裂端由阴极向阳极迁移。DNA 经 EB 染色后在荧光显微镜下可观察到 DNA 受损的细胞核一条尾巴、呈慧星状，如 DNA 无损伤则见圆形的核。用图像自动分析仪可测定呈慧星状细胞的数量和比例及计算出受损的 DNA 量。手工操作可用目镜测微尺在荧光显微镜下测量细胞核的直径和慧星尾部的长度作为 DNA 损伤的评价指标。

二、雌性生殖性实验

卵巢的内分泌功能受垂体前叶促性腺激素 (FSH) 和黄体生成激素 (LH) 的控制。垂体分泌的 FSH 又受下丘脑某些神经细胞产生的促性腺释放激素 (GnRH) 的调节。由于垂体分泌的促性腺激素 FSH 和 LH 的作用，促使卵巢内发生周期性的变化 (卵泡的发育、排卵、黄体生成)。垂体分泌的 FSH 使卵泡生成，卵泡发育至次级卵泡时卵泡膜内层细胞分泌雌激素，雌激素作用于子宫内膜，使子宫内膜呈增生期改变。同时它们又反馈地抑制下丘脑和垂体停止分泌促性腺激素。于是，黄体退化、血中孕酮和雌激素含量下降。此时，下丘脑及垂体不再受抑制，促性腺激素又开始分泌。卵巢中又有卵泡的生长。如此生长反复循环，从而形成卵巢内周期性变化。

卵巢的周期性变化与动情周期密切相关。小鼠及大鼠的动情周期是 4~5 天节律性地重复一次。预定成熟的卵泡大约在动情期开始发育，下一个动情期末排卵。卵巢中可以看到不同发育阶段的黄体。黄体的发育决定于排出的卵是否受精，妊娠黄体比周期黄体大，如果未受精，周期黄体萎缩退化。同样在卵泡成熟过程中，有相当数量不同发育阶段的卵泡萎缩退化形成闭锁卵泡，大鼠各种卵泡的大小见表 8-9。

表 8-9 大鼠各种卵泡及黄体的平均大小

卵泡及黄体类型	大小 (μm)	卵母细胞大小 (μm)
初级卵泡	25~30	18~20
生长卵泡	30~400	40~60
成熟卵泡	650~700	80~90
周期黄体	约 700	—
妊娠黄体	约 100	—

雌性生殖系统的主要功能是保障生物繁衍传代。在哺乳类动物中，它包括卵巢及其附属器官，如输卵管、子宫及阴道。外来化学物质对雌性生殖系统的损伤主要表现在对雌性卵巢功能的干扰。卵巢功能包括生殖功能（卵细胞的发育、排卵、黄体形成）和内分泌功能（雌激素和孕激素等性激素的生成和分泌）。

（一）发情周期的观察

1. 基本原理：阴道上皮细胞，由于新陈代谢，不断地脱落和再生。随着卵巢激素的变化，脱落的阴道上皮细胞类型和形态也呈现周期性变化。逐日连续，了解卵巢功能状况是否正常。啮齿类动物的发情周期可分为发情前、发情后及间期等四个期。正常大鼠或小鼠每一发情周期 4~5 天。外来化学毒物及不良环境因素会影响卵巢功能，使发情周期紊乱。

2. 观察方法：在灭菌的平皿中倒入灭菌生理盐水，将小棉拭子插入灭菌盐水中使棉花蘸湿，抓牢受试动物，将棉拭子伸入其阴道，轻轻擦试阴道壁，拭取阴道分泌物，得其涂布于滴有一滴生理盐水的载玻片上，置显微镜下观察脱落细胞，详见表 8-10。

表 8-10 大鼠或小鼠发情周期阴道脱落细胞所见

阶段	持续天数	阴道涂片细胞所见
发情前期	0.5~1.5	较多的圆形有核上皮细胞，常见出现少量无核的角化上皮细胞，无白细胞
发情期	1	主要为角化上皮细胞，有时混有圆形有核上皮细胞，细胞分散不成堆
发情后期	1.2~2	大量的角化上皮细胞，常聚集成堆
发情间期	2~4	大量散在的白细胞，有时混有少量圆形有核上皮细胞

细胞的观察应在较暗的光线下进行。涂片经甲醇固定后可用伊红、美蓝或苏木素伊红染色。显微镜下见到的胞体最小且有多形核的是白细胞；涂片上大的、扁平多角形、没有核或有一个小核的是角化上皮细胞；圆形有核上皮细胞是标准的上皮细胞，呈圆或卵形，有清晰的细胞质，核深染位于细胞的中央部位。

正式实验前，对实验动物连续作阴道脱落红细胞观察 8~12 天，按每组 10 只选出发情周期正常的受试动物。实验处理开始后对阴道脱落细胞的观察至少 25 天。统计分析各组动物发情周期平均持续天数，将各处理组与对照组比较，如有周期异常表现（发情周期延长或缩短），应进一步明确主要是周期中哪一期的改变或发情周期停滞在哪一期。

（二）排卵的观察 染毒处理应在雌鼠处于发情间期进行，在染毒的第六天（发情前期）处死动物。取出卵巢。称量湿重，分离出黄体及非黄体再分别称重。计数黄体数。用 Hank's 液冲洗两侧输卵管，在实体显微镜或扩大镜下计数卵细胞数。整理分析卵巢重量，黄体数目及其总重量，卵细胞数等指标。黄体重量减轻，排卵数目减少是化学毒物对卵巢功能损害的常见表现。也有将卵巢固定，做连续切片，观察计数各期卵泡，判断排卵情况（见病理组织学检查）。

（三）雌性激素检测

包括雌激素活性测定（TTC 还原实验），血浆雌二醇放免分析法，血浆孕酮放免分析。

（四）病理组织学检查 雌性生殖系统包括阴道、子宫、输卵管、卵巢等以及肾上腺和脑垂体。对其进行毒性病理学检查应注意有关器官的重量，如脑垂体、卵巢重量。同时应在光学显微镜下对与生殖有关的器官进行病理组织学检查，其中卵巢因其具有形成卵细胞和内分泌双重作用而更加重要。

通常研究卵巢病理组织学改变的方法是：实验动物按计划染毒处理后处死，取出卵巢，用甲醛或 BouinH 氏液固定 24h 后，作连续切片，厚 5 μm，H-E 染色，光镜下检查，通过每隔五张片子数一张的方法进行卵母细胞计数，观察染毒动物及对照的未染毒动物闭锁卵泡的数量差别。这一方法可以提供以下评价指标：

- (1) 一张切片上的平均卵泡数;
 - (2) 闭锁卵泡的百分率;
 - (3) 进行卵泡分类(原始卵泡、生长卵泡、成熟的格氏卵泡)的相对百分比。
- 电镜检查有助于发现微细的更为早期的病变部位。

三、致畸实验方法

致畸实验是借助动物实验检测外来物致畸效应的方法。

(一) 基本原理 妊娠母体接触某些具有致畸作用的化学物质,对于处在器官形成期的胚胎发育可产生不良影响,使胎仔形态结构发生缺陷而呈现畸形。因此,可以通过观察妊娠母体在敏感期接触受试物后胚胎及胎仔的发育状况来评价某种化学物质有无致畸作用。

(二) 实验步骤

1. 动物选择:原则上应选择动物体内代谢途径与人类相似,胎盘结构也基本与人相近,妊娠期短而一致,产仔数多,而且自发畸形率较低实验动物,为此多选用大鼠或小鼠。

选择健康成年未曾孕产的大鼠,体重 200~250g,小鼠 20~25g。雌雄动物 2:1 比例于晚上合笼,次日早晨对雌鼠阴道涂片检查,查见精子或发现阴栓者揭示已交配过,定为孕鼠,以这一天作为妊娠第 0 天计算妊娠日数。将查出的孕鼠按随机区组法分组,每组 10~20 只。

2. 剂量分组:一般高剂量组可选雌鼠 LD_{50} 的 $1/3 \sim 1/5$,低剂量组取 $1/30 \sim 1/50LD_{50}$ 的剂量;也可以亚慢性毒性实验中的最大无作用剂量为高剂量,以其 $1/30$ 为低剂量;还有建议以人体实际接触量为低剂量,以此剂量的 3~5 倍为高剂量。在高、低剂量之间再插入一个中间剂量组。

阴性对照组为受试物的溶剂,阳性对照组可投与维生素 A (150000IU/kg)。此外,也可用敌枯双、五氯酚钠、脘基硫脲或乙酰水杨酸等做阳性对照物。

3. 染毒:在雌鼠妊娠的第 7~15 天染毒,每日 1 次。染毒途径采用灌胃。

4. 孕鼠状况观察:在受试期间内应密切观察孕鼠的一般状况,每 3 天称量体重 1 次,通过体重的增减反映出受试物对孕鼠及胚胎的毒性程度。如母体未明显中毒,胚胎发育正常,孕鼠体重应明显持续增加;反之,如母体中毒,胚胎死亡、吸收,则体重停止增长或下降。

5. 动物剖检:鼠类有食畸形胎仔的习性,应在预期分娩的前一天(见表 8-12)处死母鼠进行检查。剖检前要称量交记录母鼠最终体重。常采用颈椎脱臼法处死动物,从腹中线剖开,暴露子宫和卵巢,做大体观察并记录黄体数、活胎数及吸收胎数。

表 8-11 胎仔活产,死亡和吸收的特征

	颜色	器官外形	自然运动	对机械刺激的反应	胎 盘
活产胎仔	肉红色	完整成形	有	有运动反应	红色,较大
晚期死胎	灰红色	完整成形	无	无运动反应	色灰红,较小
早期死胎	乌紫色	未完整成形	无	---	暗紫
吸 收 胎	暗紫或浅色点块	不能辨认胚胎	---	---	不能辨认胎盘

注意观察有否子宫腺(或称蜕膜瘤)。子宫腺是受精卵着床子宫内壁局部受刺激,组织增生而形成的微小突起,其生长与着床后果无关,故胚胎着床后死亡,子宫腺则为惟一标志。摘出子宫连同宫内胎仔一起称重,称为“窝重”。剖开子宫及羊膜,逐个钳住,剪断脐带,取出胎仔,剥离下胎盘,称胎盘重量。

6. 胎仔检查:鉴别并记录每窝胎仔中活胎数、晚期死胎数、早期死胎数、吸收胎数及各种胎仔的特征。逐一记录胎仔外观所见,对活胎仔要测量其体重、体长和尾长。必要时记录活胎仔的性别(生殖突与肛门间距离,雌胎仔约 1mm,雄性约 2mm)。

表 8-12 常用实验动物妊娠期和致畸敏感期(平均)

动物	妊娠(天)	致畸敏感期(妊娠天数)
----	-------	-------------

金黄地鼠	16	4~14
小鼠	20	5~15
大鼠	21	6~15
兔	31	6~18
猫	63	5~12
狗	63	8~28
豚鼠	68	11~20

(1) 胎仔外观畸形检查：首先观察是否有水肿、皮下瘀血。然后从头颈、胸腹、脊背到前后肢仔细观察记录。可见的主要外观畸形见表 8-13，表 8-14。

表 8-13 致畸实验中可见的主要外观畸形

头 部	躯 干	四 肢	头 部	躯 干	四 肢
无 脑	脊柱裂	前或后肢形成不全	单鼻孔	卷 尾	短指(趾)
脑膨出	脊髓膨出	多指(趾)	无 耳	短 尾	
小 头	胸骨裂	少指(趾)	无颚或小颚	无 尾	
颜面裂	腹 裂	畸形指(趾)	兔 唇		
开 眼	锁 肛	并指(趾)	无颌或小颌		

表 8-14 常见的外观畸形

部位	畸 形 及 特 征
头颅	脑突出：皮肤完整，但部分脑组织与脑膜通过颅骨，向外突出，在皮下形成肿块 露脑：头颅骨及皮肤均缺损，部分脑组织外露，小脑畸形 颅脊柱裂：部分脑组织和脊髓露在外面
鼻	单纯性脑膜突出：皮肤完整、半透明，但充满液体、脑膜通过单孔鼻，鼻孔扩大眼小，无眼，
眼	开眼，眼异位
耳	无耳，小耳，耳异位
腭	腭裂(上腭中部裂开，腭腔与鼻道相通)
颌	颌小，无颌，无口，唇裂
肢	短肢，畸形足
趾	多趾，少趾，短趾，融合趾(并趾)
脊柱	脊柱裂，脊柱骨缺失(多发生于尾椎以上，躯干较正常短粗，脊柱侧凸)
脊髓	脊髓膜膨出(膨出处脊柱呈小泡状隆起)
腹部	脐疝，腹裂(腹腔中全部或部分内脏从裂开处露出体外)
尾	短尾，角形尾，；螺旋状尾，无尾
肛门	肛门闭锁

(2) 胎仔内脏畸形检查：将每窝胎仔总数的 1/3 左右放入 Bouin 氏液固定 2 周。用自来水冲去固定液，将胎仔放在蜡板上切掉四肢和尾巴，采用徒手切片法检查内脏。

切面 1：通过口经耳后作水平切面，检查颚与舌。

切面 2：将切下的头部沿眼球中央垂直通过眼球作额状切面，检查眼及嗅球。

切面 3：在切面 2 与鼻翼间作垂直额状切面，观察鼻道及鼻中隔。

切面 4：在切面 2 与后脑中间，即头部最大横上作垂直切面，检查脑、蛛网膜下腔及脑室。

然后再作胸腹部切面。首先沿肋下缘作水平切开，然后沿胸腹中线作垂直切开，检查心脏、主动脉、脉脏、肝脏及胃肠。然后将肝和胃肠摘出，检查肾脏、输尿管、膀胱以及睾丸、子宫等发育状况。致畸实验中可见的主要内脏畸形见表 8-15，表 8-16，表 8-17。

表 8-15 胎鼠徒手切片检查内脏畸形

切片顺序	下刀部位和方向	横断面所见
1	从鼻孔下通过眼球中部向上切	大脑、侧脑室、眼球、鼻中隔、鼻腔

2	把嘴打开, 从舌向口角下刀, 向枕部切大脑	大脑间脑、延脑、下横断面看腭裂
3	齐下颌向颈后切	舌、鼻喉腔、延髓
4	从双肩上沿向颈后切	气管、食管、脊髓
5	从前肢剪断面中央向后切	气管、食管、脊髓
6	从前肢剪断面下沿向后切	肺、纵隔、心房、脊髓
7	从剑突下向后切	肺、心室、心室中隔
8	从脐至剑突间 1/2 处后切	肺、横膈
9	从脐向后切	肝、胃(小部分)
10	从腹股沟至脐间 1/2 处向后切	胃(大部分)、肝、十二指肠、肾上腺
11	在相当于髂骨前棘处向后切	胃(小部分)肝、肾、脾、胰、肠
12	不必切, 用眼科剪解剖	生殖器、膀胱、肾

表 8-16 致畸实验中可见的主要内脏畸形或异常

头 部	胸 部	腹 部
嗅球发育不全	左位心	肝分叶异常
无 脑	右大动脉弓	无 肾
脑室扩张	心房(室)中隔缺损	肾积水
脑室积液	食管闭锁	马蹄肾
无眼球	肺发育不全	输尿管积水
小眼球	肺叶融合	无膀胱
鼻中隔缺损	膈 疝	无睾丸或无卵巢、子宫或子宫不全

表 8-17 常见的脏器畸形

部 位	畸 形 及 特 征
脑	脑积水, 并引起脑室扩大
腭	腭裂
舌	短舌, 分叉舌
眼	少眼, 小眼(两眼大小不等), 无眼
心	右位, 心室中隔缺损, 单房室心, 主动脉弓右位, 大动脉横位
肺	气管食管瘘, 肺倒位, 少叶
肝	异位, 少叶
膈	横膈缺损, 并引起腹内脏疝或内脏侧位
肠	肠疝
肾	马蹄肾, 肾积水, 肾缺失, 不对称异位, 输尿管积水
生殖器	子宫缺失, 睾丸缺失或隐睾, 睾丸发育不全(单侧或双侧), 两性畸形
膀胱	缺失

注: a. 除第一片仅有一个断面外, 其余每片靠头一端的切面朝上放, 表内横断面所见, 指各片靠头一端切面。

b. 取活胎时, 如果脐带未夹好而致流血过多, 肝和心切片面上可见缺血, 如果腹静脉血流进腹腔, 形成血块, 需与先天性血肿区别。

c. 胎仔骨骼畸形检查。将每窝胎仔其余的 2/3 置于标本瓶内, 用 80% 乙醇固定 2 天。取出以水冲洗后, 用眼科小剪刀及小镊子将后颈下和两肩胛间的脂肪除掉。然后剖开腹腔摘出肝脏和胃肠。注意剪除脂肪和去除腹腔脏器时操作要轻柔仔细, 以防人为的损伤骨骼。将处理好的胎仔放入 1% KOH 浸泡 2~3 天, 至肌肤透明, 通过皮肤可以看到骨骼为止。用镊子将剥脱表皮及从腹部切口中流出的腐蚀组织除掉, 移入茜素红 S 染液中作骨骼染色。经 2~4 天骨骼已全部红为止 (此间可更换染液 1~2 次)。将骨已染红的胎仔移入透明液中浸泡 2~3 天, 成为皮肤肌肉透明, 只见清晰的桃红色骨骼标本, 即可在实体显微镜下或扩大镜下进行检查。常见的骨骼异常见表 8-18, 表 8-19。欲长期保存骨骼标本, 可用甘油浸泡, 其中加少许麝香草酚蓝以防腐。

表 8-18 致畸实验中可见的主要骨骼畸形或异常

头 部	躯 干	
颅骨化骨迟缓 (颅缝宽, 边缘不清)	椎骨发育不全 (缺损)	肩胛骨发育不全
枕骨化骨迟缓 (呈点状或哑铃状)	椎骨融合	锁骨发育不全
颅骨化骨提前 (颅缝融合)	胸骨发育迟缓 (缺失)	股骨发育错位
	胸骨化骨提前	胫腓骨发育不全
	波状肋	肱骨发育不全
	融合肋	桡尺骨发育不全
	多肋或少肋	指趾骨化骨迟缓
	肋骨化骨提前	(无化骨点)

表 8-19 常见的骨骼畸形

部 位	畸 形 及 特 征
颅顶骨	缺损, 骨化迟缓(表现为凶门过大)
枕 骨	缺损, 缺失
颈椎骨	缺损, 椎弓不连续, 骨化迟缓
胸 骨	缺损或消失, 骨化迟缓, 点状或不到正常的 1/2
肋 骨	多肋(正常大鼠、小鼠有肋骨 13 对), 少肋, 短肋, 分叉肋, 波状肋, 融合肋
腰 椎	缺失, 分裂变形
四肢骨	多骨, 缺失
盘 骨	缺失
尾椎骨	缺失, 椎弓不连续, 融合

(三) 结果判定 各组统计以下指标:

1. 母鼠妊娠期体重变化。
2. 平均着床数。
3. 平均活胎率。

$$4. \text{着床后死亡率}(\%) = \frac{\text{吸收胎数} + \text{死胎数}}{\text{着床数}} \times 100$$

5. 活胎仔平均体重、体长、尾长。

6. 畸形 (外观、内脏及骨骼) 总数。畸形出现率, 不同类别畸形出现率。

$$7. \text{畸形出现率}(\%) = \frac{\text{出现畸形胎仔总数}}{\text{受检胎仔总数}} \times 100$$

$$8. \text{活胎仔畸形率}(\%) = \frac{\text{畸形总数(活胎)}}{\text{活胎仔总数}} \times 100$$

$$9. \text{母体畸胎率}(\%) = \frac{\text{出现畸胎的母体数}}{\text{妊娠母体总数}} \times 100$$

在计算畸胎总数时,每一活胎仔出现一种或一种以上畸形均作为一个畸胎。计算畸形总数时,同一胎仔出现一种畸形作为一个畸形计算,出现二种或二个畸形,则作为二个畸形计算,依此类推。

根据上述指标计算结果,最后作综合评定。将各项指标与对照组进行比较,经统计学处理后,实验组母体畸胎率高于对照组,且活胎仔出现的畸形率显著高于对照组,而且畸形的出现具有剂量效应关系,方能判定受试化学物对受试动物具有致畸作用。为了比较不同致畸物的致畸效应强度,可采用致畸指数这一指标,该数值愈大,表明致畸性愈强。按致畸指标一般把化学物致畸强度分为三级:10 以下为不致畸物,10—100 为致畸物,100 以上为强致畸物。

$$\text{致畸指数} = \frac{\text{母体LD}_{50}}{\text{最小致死剂量}}$$

(四) 注意事项

1. 雌雄鼠交配后并非全部怀孕,大鼠妊娠率约 70%—90%,小鼠妊娠率较大鼠低。
2. 不同季节,饲养条件不同,妊娠率亦不同。
3. 实验组怀孕率明显低于对照组时,对于“未受孕”的结论,应谨慎考虑并查明是否因受试物有较强胚胎毒作用而使胚胎流产、早期死亡所致。因为某些具有强烈胚胎毒性的化学物常可不留痕迹地终止妊娠,如使受精卵于着床前死亡,着床后早期胚胎死亡被吸收等。

四、繁殖实验

通过对实验动物繁殖过程的观察,来评价外源性化学物质对动物性腺功能、交配、受精能力、分娩、授乳以及后代发育等繁殖功能有无损害作用。

受试化学物质如能引起生殖功能障碍,干扰配子形成或直接损伤生殖细胞。其结果除可影响受精卵着床而导致不孕外,还可能影响胚胎的发生和胎仔的发育,如胚胎死亡流产、胎仔发育迟缓以及出现畸形胎仔等等。受试物对母体的毒作用则可能出现妊娠、分娩和乳汁分泌的异常以及胎仔生后发育的异常。

(一) 实验动物 选择健康刚断乳(4 周龄)大鼠,至少 2 个实验组和 1 个对照组。每组雌鼠 20 只,雄鼠 10 只(或 20 只)。

(二) 剂量分组 设对照组、低剂量组(可按最大无作用剂量的 1/30 或人类可能摄入量的 100 倍)、高剂量组(为最大耐受量或有胚胎毒性的剂量)。

(三) 染毒方式 一般采用将受试物加入饲料或饮水中,亲代和子代染毒方式和投予剂量应相同。

(四) 实验步骤 实验动物按设计剂量先摄入受试物 12 周,性发育成熟可开始交配。先将亲代(F₀)雌鼠和雄鼠按常规方式交配,所生仔鼠为第一代(F₁)。每代交配两次,故每代仔鼠共 a、b 两窝(一代繁殖实验除外),第一代为 F_{1a} 和 F_{1b},其余各代依此类推。观察代数因受检目的而异,可作一代、二代、三代或多代观察。

(五) 观察指标

1. 对亲代动物的子宫、卵巢、阴道、睾丸、精囊、前列腺作肉眼大体观察,必要时应作病理组织学检查。

2. 对每代的第一窝仔鼠 (F_{1a} 、 F_{2a} 、 F_{3a}) 断乳后观察 3 个月, 记录出生时和断乳时的存活率、体重、体长、尾长。在喂养期间观察一般健康情况、摄食量、体重、饲料效价、性成熟情况及死亡率等指标。

3. 对每代的第二窝仔鼠 (F_{1b} 、 F_{2b} 、 F_{3b}) 主要观察交配成功率、受孕率、正常妊娠率、幼仔出生成活率、幼仔哺乳成活率, 分别反映动物的交配、受孕、胚胎发育、分娩和哺育幼鼠成活情况。

4. 为了同时观察有无畸胎出现, 可在每代第二次交配 (即 b 窝鼠交配) 时, 选出部分受孕雌鼠 (5~10) 只, 在分娩前 2 天剖腹取出胎仔, 观察有无畸形, 具体方法参考致畸实验。

结果判定: 将实验组动物各项观察指标统计结果与对照组动物进行比较, 如实验组动物在交配、妊娠、幼仔存活、幼仔发育等方面受到影响, 说明受试化学物质对动物生育繁殖功能有损害作用。

注意事项:

1. 三代每殖实验约需一年半左右时间, 应注意环境因素及饲料条件对实验结果的影响, 特别是饲料中受试物浓度要均匀一致, 不得受到其他污染。

2. 亲代分娩仔鼠时应密切观察, 窝内及时加铺垫料, 防止胎仔意外死亡。另外需要注意是有的母鼠有食仔鼠, 特别是畸形鼠的癖好, 必须予以仔细观察记录。

第六节 发育毒物预筛试验

常规整体动物生殖与发育毒性试验费钱、费时, 很难满足对大量投放市场的化学品进行生殖与发育毒性评价的需要, 急需开发快速预筛系统。现将目前推荐的几种预筛试验介绍如下。

一、体内预筛试验

“生殖 / 发育毒性筛选试验” (Reproduction / developmental toxicology screening test) 是 1990 年在伦敦的一次专家会上讨论和取得一致意见的, 以后逐年完善, 1995 年正式在 OECD 化学品试验准则中确定下来。本法的依据是大多数出生前受到的损伤将在出生后表现为存活力下降和 / 或生长障碍。因此于仔鼠出生后, 观察其外观畸形, 胚胎致死, 生长迟缓等发育毒性表现, 而不进行传统常规试验中内脏和骨骼的检查, 就可达到筛选的目的。本法所用动物少, 检测终点少, 实验周期短, 但能提供有关化学物对生殖和 / 或发育可能发生影响的初步信息, 是一种比较满意的发育毒物体内预测试验, 并已有效地用于现有化学物的初筛。

实验程序: 动物用性成熟大鼠, 每性别每组至少 10 只, 以期提供 8 只孕鼠和足够的子代。一般至少用三个试验组和一个剂量组, 剂量间隔 2~4 倍。至少在交配前 2 周, 两性别同时开始染毒, 雄鼠持续染毒 4 周 (包括交配前、交配期、直至处死)。由于雄鼠在交配前染毒期限有限, 且生育力观察可能不是睾丸毒性的特别敏感的指标, 因此必须进行雄性生殖器官仔细的组织学检查, 以了解对雄性生育力和对精子发生的影响。雌鼠在整个研究期间染毒, 包括交配前期、受孕、孕期和到分娩后 4 天, 以交配期满 14 天计, 共 54 天。经口染毒。交配通常为 1:1, 雌、雄鼠固定搭配。雄鼠一般在染毒 4 周后处死, 母鼠和仔鼠在分娩后 4 天处死, 未孕雌鼠在最后一次交配后 24~26 天处死 (图 8-5)。

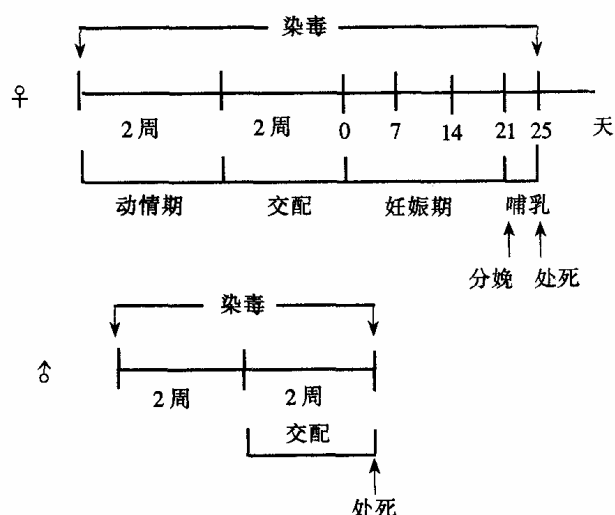


图 8-5 生殖/发育毒性筛选试验图解

观察项目：雌、雄亲代应于染毒第一天以后，每周一次和终末处死前称重，仔鼠在出生 0 天，出生后 1 天和 4 天称重。测定交配前至哺乳期间的食物消耗量，当受试物经饮水给予时，还应测定此期间的饮水量。在染毒期每天观察毒性体征，研究期间死亡或终末处死的成年动物，应肉眼检查、称重并保存卵巢、睾丸、附睾和其他附件以及所有显示肉眼可见损伤的器官，Bouin's 固定，作组织病理学检查。仔鼠出生后，记录窝重、仔鼠数、性别、活产、死产、小仔，观察外观显著异常，以及亲代和子代的任何行为异常。

结果评定：根据观察到的毒性效应，尸检、肉眼和组织病理学发现，评价受试物的剂量与异常的发生和严重性之间的关系。包括大的损伤、证实靶器官、不育、畸形、对生殖和仔鼠行为的影响、体重改变和死亡率等。由于本试验的动物少，终点选择少和周期短，只能用作初筛。筛选结果即使是阴性的，也不表示对生殖/发育的绝对安全，虽然当实际接触剂量明显低于 NOAEL 剂量时，能提供可能安全的信息。而当结果是阳性的而又缺乏其它的生殖/发育毒性资料时，则有助于决定是否有必要进一步试验。

二、体外预筛试验

近年来发展了一些发育毒物体外筛选试验。这些试验方法较简单，可严格控制实验条件，试验结果与没有母体毒性的整体动物致畸试验有较好的相关。因此可利用这些试验作发育毒物的初筛，预测对整体动物的致畸性，发现致畸作用的靶器官，或阐明致畸物的作用方式和致畸作用的机制等。常见的体外预筛试验有：

1. 大鼠全胚培养(whole embryo culture) 取 9.5 日龄大鼠胚胎，剥去 Reichert 膜，在培养液中接触受试物，在孵箱中通气旋转培养 48 小时后，观察心脏搏动和卵黄囊循环、轴向正常旋转在背凸位、尿囊和绒毛膜融合、眼囊和耳囊、前肢芽和三个腮弓、前后神经管闭合及体节数目等胚胎发育情况，记录胚胎存活。

2. 器官培养(organ culture) 利用胚胎肢芽，腭板、后肾、肺、肝、正常发育的牙齿和其他器官进行。以肢芽为例，取 12 日龄小鼠胚胎，在体视显微镜下选用 52~55 体节数的胚胎，取下前肢，置于含受试物的培养液中，连续通气浸没旋转培养 3 天，Bouin's 固定，阿利新兰染色，制作肢体压片，检查肢体中软骨原基的发育与分化。

3. 胚胎细胞微团培养(micmass culture) 从 11 日龄大鼠胚胎取得原代中脑细胞微团(CNS)，肢芽区或其他区细胞微团，置于含有不同浓度受试物的培养瓶中，培养 5 天，用中性红判断细胞存活，用苏木精判断 CNS 分化数量，用阿利新兰判断肢芽软骨细胞的分化数量。

4. 水螅培养(hydraattenuata culture) 将水螅匀浆、分离。水螅细胞在无细胞毒化学物的

生长液中孵化，由细胞发育成完整的成体水螅，而在细胞毒化学物存在时，产生罕见的无组织结构。水螅再生成一个完全的新的成体水螅期间，经过一个有序的个体发育顺序，包括细胞迁移、分化、感应等。对许多受试化学物的哺乳动物与水螅发育毒性指数进行了比较，显示出两者间有相当好的相关。

体外实验系统提供了宝贵的信息，使快速筛选致畸物成为可能。但它们缺乏发育过程的复杂性，也存在将这些实验结果外推到人的问题，这比常规动物试验对人的致畸危险的评估要困难得多。另外这些试验系统均有待标准化及进行可靠性研究，故目前仅用于机制研究和筛查，尚未真正用于化学物的发育毒性的危险性评价。

（史永亮 叶琳）