

• 综述 •

# 水螅人工胚胎方法检测化学物致畸危害

江西医学院预防医学系 傅立杰\*

〔美〕 Thomas Jefferson University E. M. Johnson

检测化学物对人类的致畸危害，最常用的方法是首先用整体动物实验来预测其潜在危害。但由于现实生活中化学物的大量存在以及新的化学物不断出现，致使大约有80%的化学物无法进行动物实验，缺乏各种毒理学资料<sup>〔1〕</sup>。因此，寻找建立短期快速检测方法来筛选致畸化学物，已成为各国学者致力研究的目标，也是当前化学致畸研究的一个重要趋势<sup>〔2、3〕</sup>。

目前各种短期检测方法，基本上可以分为两大类<sup>〔3〕</sup>：第一类是用哺乳动物或人的细胞、组织器官体外培养，检测妊娠某一时期化学物对某一器官组织的影响或者致畸效应的某一方面，例如大、小鼠肢芽培养检测致畸物对软骨发生的影响等；第二类是利用某些非哺乳类动物的重聚再生 (Teaggregation; Regeneration) 特性和与哺乳动物胚胎发育的相似性，制作人工胚胎来检测化学物对胚胎发育多个过程的影响。目前一般认为前者主要适应致畸机制的研究，后者则更适用于大量化学物致畸危害的筛选<sup>〔4〕</sup>。水螅测试系统 (Hydra Assay)，又称人工胚胎方法，就是后一类检测系统的一个典型代表方法。

### 方法简介<sup>〔5〕</sup>

水螅 (Hydra attenuata) 是广泛存在于清洁水系中的肠腔门动物。在实验室以简单培养液饲养4~5天即可繁殖一倍 (培养液组成: 0.147克 CaCl<sub>2</sub>, TES 0.115 克, EDTA 0.004 克, 蒸馏水 1 升)。它是自然界唯一的具有复杂的器官和组织结构的低等动物，用于发育生物学研究已有200多年的历史并有数千篇论文在各国杂志上发表<sup>〔6〕</sup>。大量的研究结果证实，水螅在其重组再生过程中能呈现一系列与哺乳动物类似的、由受精卵发育成胚胎的过程。如细胞大小和形态学改变、空间定位、细胞迁移、细胞内基质形成、细胞分裂和分化、器官场和组织的形成等等。水螅这些与哺乳动物胚胎发育之间的类似性，提供了用其检测化学物致畸危害和生殖发育毒性的理论基础<sup>〔7〕</sup>。

该方法的设计思想是建立一个个体发生 (ontogenetic system) 检测系统，同时检测和比较化学物对水螅成体和人工胚胎的毒性并计算其毒性比，藉以筛选

那些选择性作用于胚胎的毒物——致畸原。WHO 专家委员会曾推荐这一方法<sup>〔8〕</sup>。用此系统对 126 种药物和环境化学物的测试结果与哺乳动物致畸试验结果比较，其准确度 (accuracy) >90%，假阳性率为 6.5%，没有出现假阴性结果<sup>〔9〕</sup>。

制作水螅人工胚胎时使用 70m Osm 胚胎培养基。培养基的制备如下：0.29克 KCl, 0.97克 CaCl<sub>2</sub>, 0.16 克 MgSO<sub>4</sub>, 1.94克柠檬酸钠, 0.73克丙酮酸钠, 3.00克 TES, 0.10克酚红, 溶于 1000ml 蒸馏水中，高压灭菌备用。制作时将经碘消毒的水螅成体移至含胚胎培养液的离心管中静置30分钟，用玻璃吸管反复解离成体 1~2 分钟，静置 6 分钟后吸取上清液移至另一 15ml 离心管中，重复 3 次解离过程，合并 3 次上清液并以 300xg 离心 5 分钟，弃除上清液，将沉淀的细胞吸入内径为 0.58mm 的聚乙烯塑料管中，200xg 离心 5 分钟后静置10分钟，将聚乙烯管中的细胞团块——重聚体注入到含胚胎培养液的玻璃平皿中，室温 (21°C ± 2 °C) 培养，4 小时和18小时后分别将胚胎培养基浓度降至 35mmol 和 17.5mmol，26小时后移至成体培养基中继续培养，大约一周左右这种胚胎即可发育成为水螅成体。

实验时同时将水螅成体和胚胎各 3 条分别放入含有不同受试物浓度的培养皿中，室温培养92小时。在实验开始后的 4、18、26、42和66小时更换培养液和受试化学物，用普通显微镜观察记录结果。水螅成体和胚胎对毒物的反应均呈现良好的剂量-反应关系。成体的毒性反应包括杵状触手、触手缩短以及毒性终点——“郁金香” (Tulip) 形；胚胎的毒性反应常表现为发育迟缓，毒性终点为胚胎死亡和重聚体解离 (Disintegrated) (见图)。为降低这一实验系统的假阴性结果，以成体 (adult) 和胚胎 (Development) 出现毒性终点——“郁金香”和胚胎死亡为最小作用浓度 (minimal effective Concentratcons, MEC)，

\* 现地址：美国杜邦 (E.I. Dupont) 公司毒理与工业医学研究所。

水螅成体毒性反应		人工胚胎体外发育		
图 示	定义 (缩写)	发育过程	发育时间 (h)	定义 (缩写)
	正 常 (N)		4	细胞团 (S)
	杵状触手 (C)		20	中空细胞团 (H)
	触手缩短 (S)		28	触手芽 (B)
	触手缩短 (S)		42	触手延长 (E)
	“郁金香” (T)		66	口腔形成 (Y)
	成体 (或胚胎) 死亡 (D)		90	息肉出现 (P)

图示 水螅人工胚胎发育过程及其毒性测试结果判断标准

并根据 A-MEC 和 D-MEC 计算母/仔毒性比值 (A/D ratio)。A/D ratio (又称相对致畸危害指数) > 3, 则提示该化学物具有潜在的致畸危害和选择性发育毒性。与此同时, 实验结果还可反映出化学物的作用时间, 即对胚胎发育不同阶段的影响<sup>[10]</sup>。

### 方法评价

按照 Karnofsky 定理, 任何化学物只要在胚胎发育敏感期给予足够的剂量, 都可能导子代畸形。因此, 从宏观和预防的角度看, 主要的致畸危害来自那些对母体毒性小而选择性作用于胚胎的毒物, 如反应停等。而大部分对母体和子代毒性相同或接近, 即对母体产生毒性的剂量才引起胚胎毒性的毒物 (如乙醇等), 则在保护母亲的同时也保护了子代。水螅测试系统根据上述畸胎学原理, 运用母/仔对化学物毒性反应的关系 (A/D ratio) 来筛选和发现化学物的致畸危害, 无疑对化学致畸的理论研究和预防实际都具有重要价值。同时, 由于一种毒物的母/仔比值是相对固定不变的, 动物的不同种属、化学物的脂溶性、给药途径、甚至种属间代谢速率方面的差异等都对母/仔毒性反应比值影响很小<sup>[10]</sup>。因此, 可以利用这一比值来进行种属外推、决定安全系数, 并可结合人群实际接触水平, 直接进行致畸危害的安全评价<sup>[11-15]</sup>。

根据目前评价短期测试系统的标准<sup>[3, 8]</sup>, 水螅人工胚胎方法具有能预见活体效应; 与哺乳动物胚胎发

育多个过程有类似性; 对化学物的反应呈现明显的剂量反应关系, 有较肯定的毒性终点; 假阳性率较低, 没有假阴性; 实验室之间重现性好<sup>[16]</sup>等优点。与此同时, 这一系统也存在着一定的局限性, 例如不能检测难溶于水的物质 (包括金属等) 和气体<sup>[9]</sup>; 水螅成体及人工胚胎本身不存在生物转化特别是微粒体酶系<sup>[17]</sup>; 实验中所获得的 MEC 值、NOEL 值与哺乳动物的 MEC 值和 NOEL 值有较大的差距等。

与目前的其它试验方法相比, 水螅测试系统还具有经济、快速和易行的特点。用这一系统测试一个化学物大约需要 3 千美元<sup>[10]</sup>, 半个月时间, 不需要严格的无菌和培养条件。而一个简单的整体动物致畸实验需要 1 万美元, 进行标准的 Segment I 实验则需 6 万美元<sup>[10]</sup>, 至少花费 1 个月的时间。因此, 推广和应用水螅人工胚胎方法筛选致畸化学物, 必将节约大量经费、实验动物和人力物力。

### 最近研究与展望

围绕水螅测试方法的完善和应用, 又有一些最近进展。Staples 等<sup>[18]</sup>报道, 用 25ml 玻璃瓶并配以 Teflon 衬里的螺旋瓶盖, 可在室温条件下成功地测试挥发度很高的液体和气体化学物。笔者与美国学者合作, 在水螅测试方法中建立了大鼠肝微粒体酶体外代谢活化系统。在体外活化系统参与下环磷酰胺对水螅成体和胚胎的毒性均增加了两个数量级, 其 MEC 值分别由 4000 μg/ml 和 1000 μg/ml 降低到 20 μg/ml

和  $4\mu\text{g}/\text{ml}$ <sup>[19]</sup>。此外,用这一系统预测化妆品、饮用水氯化消毒后产物所致发育毒性和致畸危害的研究论文亦即将发表<sup>[20、21]</sup>。

混合化学物 (Chemical mixtures) 的联合毒性是90年代及今后毒理学研究的主要方向和重要任务,但目前还缺乏相应的方法或程序<sup>[22]</sup>。90年代毒理学研究的另一个重要趋势,是在继续关注化学物对人类健康影响的同时,注重强调化学物对环境以及生态的影响<sup>[23]</sup>。水螅人工胚胎方法可能在上述两方面研究中显示出它的优越性。这是因为一方面这一检测系统具有检测未知毒物毒性、联合毒性的潜在能力,另一方面水螅作为清洁水系的一种生物,可使其用于预测化学物或者混合化学物对环境,尤其是水生动植物的毒性影响。笔者目前进行的研究显示,经改进后的水螅测试方法,可用于评价地面水,甚至上百种化学物混合污染的工业废水的发育毒性评价<sup>[24、25]</sup>。总之,有理由相信,随着研究工作的不断深入,水螅人工胚胎测试系统将会更加完善并被进一步广泛地应用。

### 参 考 文 献

1. Nelson N. Perspectives on testing for toxic action. *Environ. Health. Perspect* 1987; 75:97~103.
2. 付立杰. 化学物致畸. *科学* 1988; 40 (3):179.
3. Faustmann EM. Short term tests for teratogen. *Mutation. Reseach* 1988; 205:355~384.
4. Johnson EM. A review of advances in prescreening for teratogenic hazard. *Progress in Drug Research* 1985; 29:121.
5. Johnson EM. The hydra assay manual: a practical guide to the supplies, techniques and mechanics of the assay (unpublished) 1989.
6. Lenhoff HM and Lenhoff SG. Trembley's polyps. *Scientific American* 1988; 258: 108~113.
7. Johnson EM. Screening for teratogenic hazard; nature of the problem. *Ann Rev Pharmacol* 1981; 21:417~429.
8. WHO. Principles for evaluating health risks to pregnancy associated with exposure to chemicals during pregnancy. *Environ. Health. Criteria* 30. WHO. Geneva. 1984.
9. Johnson EM, et al. An analysis of the hydra assay's applicability and reliability as a developmental toxicity prescreen. *J Am Coll Toxicol* 1988; 7:111~126.
10. Johnson EM, et al. Use of the adult developmental relationship in prescreening for developmental hazard. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen* 1987; 7:273~283.
11. Johnson EM. Perspectives on reproductive an developmental toxicity. *Toxicol Industr. Health* 1987.
12. Johnson EM. A tier system for developmental toxicity evaluations based on considerations of exposures and effect relationship. *Teratology* 1987; 35:405~427.
13. Johnson EM. Cross-species extrapolation and the biologic basis for safety factor determination in developmental toxicology 1988.
14. Johnson EM. Recognition of teratogens in occupational settings. *Adv Mod Enrin Toxicol* 1987; 10:181~189.
15. Johnson EM, et al. Application of the hydra assay and its attendant concepts to considerations of maternal toxicity in developmental toxicology (to be published). 1990.
16. Johnson EM, et al. The developmental toxicity of xylene and isomers in the hydra assay. *Toxic appl pharmacol* 1986; 82: 323~328.
17. Kaji H, et al. Protein distribution and endogenous P-450 in intact and dissociated hydra. *Teratology* 1983; 27:54.
18. Staples RE, et al. Hydra test modification to identify developmental hazards among volatile liquids and gases. *Teratology* 1989; 40:483.
19. Johnson EM, et al. The in vitro activation of cyclophosphamide in the hydra developmental toxicity assay. *Foundm Appl Toxicol*. (in press) 1990.
20. Newman LM, et al. Developmental toxicity evaluation of several cosmetic ingredients in the hydra assay. *Amer Col Toxicol* (in press) 1990.
21. Fu L-J, et al. Prediction of the developmental toxicity hazard potential of halogenated drinking water disinfection by-products tested by the in vitro hydra assay. *Regul Toxicol Pharmacol* 1990; 11:213~219.

(下转第27页)

## 拟除虫菊酯杀虫剂中毒41例临床分析

湖北汉阳县人民医院 张启焯 殷玲 刘义南

1983年8月~1990年7月我们共收治41例急性拟除虫菊酯杀虫剂中毒患者,其中7例混合有机磷中毒。现报告如下。

## 临床资料

本组男8例,女33例;18~57岁36例,61~74岁4例;除1例4岁儿童外,余系农民。中毒到就诊时距0.5~11小时。喷洒农药中毒4例,误服37例,服药量10~200ml。溴氰菊酯(敌杀死)24例,杀灭菊酯(速灭杀丁)8例,灭扫利2例,混合有机磷中毒7例(其中增效速灭杀丁5例,服药量为50~200ml;“强化敌杀死”40ml、4049与速灭杀丁混合中毒各1例)。

本组34例单纯拟菊酯杀虫剂中毒表现为头晕20例,头痛12例,乏力14例,食欲不振10例,恶心22例,呕吐17例,心悸8例,腹痛5例,口腔灼热感13例,上腹部灼热感9例,抽搐3例,皮肤烧灼、瘙痒9例,蚁走感5例,手足麻木5例,眼畏光流泪3例,心率增快10例,血压降低3例。分别检查血常规、肝功能、血胆碱酯酶、空腹血糖、BUN、CO<sub>2</sub>CP,其结果未见异常。心电图检查6例,仅1例窦性心动过缓、左室高电压。经对症支持疗法均痊愈出院。

7例混合中毒者临床表现与单纯有机磷中毒症状相类似,且伴有拟菊酯中毒的口周及手足麻木。上腹部灼热感及蚁走感。血胆碱酯酶测定降低。其中死亡两例,余按有机磷中毒处理而痊愈出院。

## 讨论

一、拟菊酯类:生产性中毒起病时暴露部位皮肤瘙痒、烧灼感、蚁走感或头昏等。

口服中毒者可出现唇麻、口腔及上腹部灼热感、恶心、呕吐等消化道症状较为突出。1例误服溴氰菊酯中毒者,于第二天出现上消化道出血,用甲氧咪呱治疗效果较好。

本组误诊为有机磷中毒2例,其中1例口服2.5%溴氰菊酯乳油50ml后7小时内应用阿托品16mg、解磷定1g,致病情加重,出现阿托品中毒征,于停药后恢复。拟菊酯杀虫剂对胆碱酯酶活性无抑制作用,故对阿托品耐受性低。单纯拟菊酯杀虫剂中毒目前尚无特殊解毒剂,主要为对症支持疗法,不主张大剂量阿托品做解毒剂,以免造成中毒。阿托品只用于对症治疗,也不宜使用胆碱酯酶复能剂。

二、拟菊酯与有机磷混合中毒:临床表现除有单纯有机磷中毒症状外,且伴有拟菊酯中毒的表现,重者可发生抽搐、意识障碍、呼吸困难、血压下降,可致死亡。混合中毒时,因有机磷能抑制拟除虫菊酯的水解而增强其毒性,宜先用足量阿托品及胆碱酯酶复能剂抢救有机磷中毒为主,及综合治疗。其中两例未敢“阿托品化”,分别于24、32小时死亡,应引以为教训。文献报告有1例合并肺水肿,抢救3小时无效死亡,可能与此有关。其余混合中毒者分别用阿托品63~235mg,均痊愈出院。

(上接第30页)

22. Yang RSH, et al. Toxicology of chemical mixtures: Experimental approaches, underlying concepts, and some results. *Toxicol Lett* 1989; 49:183~197.
23. Miya TS, et al. Contemporary issues in toxicology preparing for the twenty-first century: report of the TOX-90's Commission. *Toxicol appl Pharmacol* 1988; 96:1~6.

24. Fu L-j, et al. The applicability of hydra assay in evaluating developmental toxicity of fresh waters and wastewaters. *Ecotoxic Environ Safe* (in press) 1990.
25. Fu L-j, et al. Assessing acute and developmental toxicity of effluents by means of hydra attenuata, a comparative study on acute toxicity with fathead minnow. *Environ Toxicol Chem* (to be published) 1990.