

毒理学替代法

TOXICOLOGY ALTERNATIVES

■ 主编 彭双清 郝卫东 伍一军 ■



军事医学科学出版社

毒理学替代法

Toxicology Alternatives

主编 彭双清 郝卫东 伍一军

军事医学科学出版社

·北 京·

内 容 提 要

本书是作者在多年科研工作的基础上,收集归纳了国内外最新研究资料,并参考有关书籍,编著而成。全书共十八章,既全面介绍了已获验证并被广泛接受的毒理学替代法,也介绍了其发展研究的热点与前沿,构建了一个较为系统的毒理学替代法方法体系。内容主要包括:国内外毒理学替代法的研究现状与发展趋势;一般毒性、局部毒性和生物动力学评价的替代方法;主要靶器官和靶系统毒性评价的替代法;遗传毒性和致癌性评价的替代法;当前国际毒理学替代法研究的热点与前沿,涉及毒理基因组学、毒理蛋白质组学、毒理代谢组学和干细胞、转基因动物及体外细胞三维培养技术在毒性评价研究中的应用。可供新药研发、药物毒理学、卫生毒理学、环境科学等毒理学研究人员和相关管理部门人员阅读。

图书在版编目(CIP)数据

毒理学替代法/彭双清,郝卫东,伍一军主编. - 北京:军事医学科学出版社,2008.10
ISBN 978-7-80245-213-8

I. 毒… II. ①彭… ②郝… ③伍… III. 毒理学-研究 IV. R99

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 153472 号

出 版:军事医学科学出版社

地 址:北京市海淀区太平路 27 号

邮 编:100850

联系电话:发行部:(010)66931051,66931049,81858195

编辑部:(010)66931127,66931039,66931038

86702759,86703183

传 真:(010)63801284

网 址:<http://www.mmssp.cn>

印 装:京南印刷厂

发 行:新华书店

开 本:787mm×1092mm 1/16

印 张:37.25

字 数:921 千字

版 次:2009 年 1 月第 1 版

印 次:2009 年 1 月第 1 次

定 价:150.00 元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换

前言

毒理学是研究人类生产实践和生活中的各种化学性、物理性及生物性有害因素对生物体,特别是对人体产生危害与毒性作用机制的科学。其主要任务是评价外源性化学物质对接触者可能造成的健康危害,最终为控制化学物质的危害、加强化学物质的管理提供依据。通过对外源性化学物的危害评价和提出对外源性化学物的管理措施,毒理学在保障人类健康、维护生态平衡、改善环境和促进国民经济持续发展等方面发挥着重要的作用。随着科学技术的发展,新化学物质日益增多,传统的毒理学评价方法面临着新的挑战。近年来,随着实验动物使用 3R 原则(Reduction- 减少;Refinement- 优化;Replacement- 替代)的倡导与实施以及生物医学研究模式的转变,整体动物实验面临严峻挑战,替代动物实验的体外模型研究已成为毒理学发展的重要方向。替代法它包含了 3R 原则的全部内容,毒理学替代法就是 3R 原则在毒理学研究领域的应用,它不仅是动物权益保护的需要,也是科学进步、社会经济发展的需要。无论是从科学角度还是从经济角度考虑,毒理学替代法对外源性化学物的危害评价及管理均具有重要的意义,它可以减少体内实验影响因素、减少动物使用、缩短实验周期以及降低实验成本等多种优越性。

近年来,国外毒理学替代法研究发展十分迅速,体外替代试验已经涵盖一般毒性、遗传毒性、器官毒性等多种毒性终点,研究手段也从一般的细胞、组织培养延伸到基因组学、蛋白质组学与代谢组学,以及计算机模拟辅助评价系统。毒理学替代法已广泛应用于毒理学研究各个领域,欧盟和美国等发达国家已将毒理学替代法纳入法规管理范围。目前,许多毒理学替代法已通过有关权威机构的验证并被欧盟、美国和经济与合作发展组织(OECD)等推广应用。我国关于化妆品、化学品、食品接触材料以及药品和生物制品等化学物质的安全性评价检测方法,基本上仍使用整体实验动物,毒理学替代法的研究和应用相对滞后,尚没有专门的研究机构和验证体系。虽有实验室和研究人员在这方面进行了有益的尝试和积极的探索,但缺乏工作的系统性和严格的验证程序,只能说处于研究探索阶段。到目前为止,国内尚没有一本系统介绍毒理学替代法的专著。在国家科技支撑计划食品安全专项课题的资助下,近年来我们积极开展了毒理学替代法的研究工作。结合国内外研究发展趋势,我们以国际毒理学替代法权威机构,如欧洲替代方法验证中心(ECVAM)和 OECD 验证认可的各种毒理学替

代法为核心,并以近年来国内外热点研究的多种体外毒理学方法为基本内容,编写了这本《毒理学替代法》。为使读者对毒理学替代法有较全面的认识和了解,我们在编写中以毒理学替代法在外源性化学物危险性评价中的应用为主线,从理论和实践两方面对毒理学替代法的各个领域进行了较系统和全面的论述,力求既具有理论性又具有可操作性,既具有系统性又反映最新前沿发展动态。期待本专著的出版对于加快我国在该领域的研究发展、缩小与发达国家的差距将起到积极的促进作用。随着我国经济的快速发展,化妆品、化学品、药品和食品添加剂等各种新化学物质不断涌现,因此,采用国际上验证认可的毒理学替代法快速和准确地评价上述化学产品的安全性,对我国相关化学工业的快速发展以及与国际接轨将具有积极意义。另外,环境污染是我国当前在经济发展中遇到的一个棘手问题,采用毒理学替代法快速高效地检测环境污染物的潜在健康危害,为制定相应的环保政策提供依据,这在我国日益关注环保与经济增长协调发展的今天亦将具有重要的现实意义。

本书共十八章,构建了一个较为全面的毒理学替代方法体系。除了介绍已经获得验证的被广泛接受的毒理学替代法以外,对一些有实际应用价值的体外替代法以及毒理学替代法发展前沿也进行了全面介绍。第一章系统地总结了国内外毒理学替代法的研究现状与发展趋势;第二、三、四章分别介绍了一般毒性、局部毒性和生物动力学评价的替代方法;第五至十一章详尽介绍了主要靶器官毒性(肝脏、肾脏和心脏毒性)和靶系统毒性(神经、免疫、内分泌、生殖发育系统)的替代法;第十二章对特殊毒性(遗传毒性和致癌性评价)的替代方法进行详述;第十三至十八章分别论述了当前国际毒理学替代法研究的热点与前沿,涉及毒理基因组学、毒理蛋白质组学、毒理代谢组学和干细胞、转基因动物及体外细胞三维培养技术在毒理学研究中的应用。本书是编者集体劳动的成果,所有参编人员均是国内长期从事相关研究领域的科技骨干,书中除归纳总结了国内外最新进展外,也融入了作者的亲身实践经验与体会。本书主要面向毒理学科技工作者,可供新药研发人员、药物毒理学、卫生毒理学和环境科学以及其他毒理学研究人员参考学习;本书还可供相关管理部门制定相应政策时参考。尽管我们已赋予最大努力,但由于毒理学替代法涉及面广、发展十分迅速,加之笔者水平有限,书中疏漏和缺点所在,恳请读者批评指正。



2008年10月于北京

目 录

第一章 毒理学替代法概述	(1)
第一节 化学物质危险度评价概述	(3)
第二节 3R 理论的形成与发展	(4)
第三节 替代法的概念与内涵	(5)
一、替代法的概念	(5)
二、替代的基本方法	(6)
第四节 替代方法的验证	(8)
一、验证的目的与要求	(8)
二、替代方法的验证过程	(9)
第五节 替代法的研究现状与发展	(10)
一、研究机构与相关社团组织	(10)
二、主要学术刊物	(15)
三、主要毒理学替代法进展	(16)
四、我国毒理学替代法的研究	(22)
第二章 一般毒性评价	(27)
第一节 急性毒性试验概述	(29)
一、急性毒性试验概念	(29)
二、急性毒性试验目的	(30)
三、急性毒性评价实验设计	(30)
第二节 经典急性毒性试验	(39)
一、经典急性毒性试验的意义	(39)
二、国际上关于急性毒性试验的科学共识	(40)
第三节 急性毒性分级	(43)
第四节 急性毒性替代试验	(44)
一、固定剂量法	(45)
二、上下法	(46)
三、探针剂量法	(47)
四、累积剂量设计法	(48)

五、近似致死剂量法	(48)
六、限量试验	(48)
第五节 亚慢性和慢性毒性试验	(49)
一、亚慢性毒性试验	(49)
二、慢性毒性试验	(54)
第六节 体外方法在急性毒性评价中的应用	(56)
一、体外细胞毒性数据预测体内急性毒性	(56)
二、QSAR 模型预测体内急性毒性	(57)
三、生物动力学参数的体外检测	(58)
第三章 局部毒性评价	(61)
第一节 概述	(63)
第二节 皮肤解剖生理学特点与皮肤毒作用	(64)
一、皮肤的生理学特点	(64)
二、皮肤毒作用类型与机制	(66)
第三节 皮肤腐蚀性体外试验	(68)
一、人重组皮肤模型 EPIKIN™	(68)
二、人重组皮肤模型 EpiDerm™	(69)
三、大鼠经皮电阻测定分析	(70)
四、CORROSITEX™ 皮肤腐蚀性试验	(73)
第四节 皮肤刺激性体外试验	(73)
一、人重组皮肤模型 EPIKIN™	(73)
二、人重组皮肤模型 EpiDerm™	(74)
三、小鼠皮肤功能完整性试验	(75)
四、非灌流猪耳试验	(76)
五、皮肤刺激性的定量构效关系	(76)
第五节 皮肤光毒性体外试验	(77)
一、光毒性效应的机制	(77)
二、光毒性试验体外替代方法	(77)
第六节 皮肤过敏性评价	(80)
一、过敏性接触性皮炎的机制	(80)
二、皮肤过敏性体外试验	(80)
第七节 眼毒性评价	(85)
一、眼睛的生理学特点	(85)

二、眼刺激机制	(87)
三、眼刺激体外替代试验	(87)
第四章 生物动力学评价	(97)
第一节 概述	(99)
第二节 外源性化合物的吸收与屏障功能分析	(99)
一、吸收与转运机制	(99)
二、QSAR 法评价外源性化合物的膜通透性	(101)
三、外源性化合物的透皮吸收评价	(102)
四、外源性化合物经胃肠道吸收评价	(105)
五、外源性化合物经血脑屏障吸收评价	(106)
第三节 外源性化合物代谢性质评价	(107)
一、以肝脏为基础的体外代谢模型	(107)
二、胃肠道体外代谢模型	(109)
三、计算机虚拟筛选	(109)
第四节 生物动力学模型	(110)
一、经典房室模型(隔室模型)	(110)
二、PBTK 模型	(110)
第五章 肝脏毒性评价	(113)
第一节 概述	(115)
第二节 肝脏的解剖生理学特点	(115)
一、肝脏的组织结构与功能	(115)
二、肝脏对毒物损伤的易感性	(117)
第三节 肝脏毒性损伤的类型及主要发生机制	(118)
一、肝脏毒性损伤的类型	(118)
二、肝脏毒性损伤的发生机制	(121)
第四节 整体动物的肝脏毒性损伤评价	(122)
一、肝脏生理和生化指标检测	(123)
二、肝组织化学组成检测	(124)
三、肝脏组织病理学检查	(125)
第五节 肝脏毒性体外评价模型	(125)
一、离体肝脏灌流模型	(126)
二、精密肝切片模型	(128)
三、原代肝细胞模型	(131)

四、肝细胞系模型	(135)
五、亚细胞模型	(135)
六、基因工程细胞模型	(136)
第六章 肾脏毒性评价	(139)
第一节 概述	(141)
第二节 肾脏的解剖生理学特点	(141)
一、肾脏结构与功能的复杂性	(141)
二、肾脏对毒物的易感性	(142)
第三节 肾脏毒性损伤机制	(142)
一、肾脏毒性损伤概述	(142)
二、肾细胞毒性损伤的主要机制	(143)
第四节 肾毒性评价体外替代法的应用	(144)
一、肾毒性体外优化筛选	(144)
二、肾毒性的比较研究	(144)
三、肾毒性机制研究	(144)
第五节 肾毒性主要体外评价法	(145)
一、体外替代模型概况	(145)
二、常用体外替代模型	(145)
三、肾毒性评价体外替代法常用检测终点	(151)
四、新技术在肾毒性体外替代法中的应用	(157)
第七章 心脏毒性评价	(161)
第一节 概述	(163)
第二节 心脏生理结构与功能	(163)
一、正常的解剖结构	(163)
二、心脏的传导系统	(164)
三、心脏的离子流与离子通道	(165)
四、心脏电生理	(167)
第三节 心脏毒性作用的一般机制	(168)
一、心脏毒性作用的表现	(168)
二、心脏毒性作用的一般机制	(170)
第四节 典型毒物对心脏的毒性作用	(172)
一、工业毒物	(172)
二、环境毒物	(173)

三、天然毒物	(173)
四、药物	(174)
第五节 心脏毒性评价的整体动物模型	(176)
一、心脏毒性评价动物模型概述	(176)
二、心脏毒性评价指标	(177)
第六节 心脏毒性评价的体外替代模型	(180)
一、离体心脏灌流模型	(181)
二、全胚胎培养模型	(184)
三、心肌细胞培养模型	(186)
四、清醒动物无线遥测技术	(191)
五、计算机模拟替代法	(191)
第七节 hERG 钾通道与 QT 间期延长的评价	(192)
一、hERG 钾通道	(192)
二、QT 间期延长与心脏毒性评价	(194)
三、评价 QT 间期延长的体内试验	(198)
第八节 基于 hERG 通道的心脏毒性评价替代法	(199)
一、hERG 通道的膜片钳记录与评价	(199)
二、计算机结构模拟预测	(205)
第八章 神经毒性评价	(211)
第一节 概述	(213)
第二节 神经系统的结构与功能与毒性反应	(214)
一、神经系统的一般结构与功能	(214)
二、神经系统的特殊结构与功能	(215)
三、神经系统对毒物的毒性反应	(217)
第三节 神经毒性评价的整体动物替代模型	(219)
一、应用于神经性退行疾病中的大、小鼠模型	(219)
二、有机磷引起的迟发性神经毒性评价的鸡替代模型	(220)
三、果蝇模式生物系统	(221)
四、斑马鱼模式生物系统	(223)
第四节 神经毒性评价的体外试验替代模型	(225)
一、全胚胎培养	(226)
二、胚胎脑组织块培养	(230)
三、脑片培养	(231)

四、全脑再聚集培养	(233)
五、大鼠腹膜肥大细胞体外培养	(234)
六、原代神经细胞培养	(235)
七、细胞系培养	(239)
八、几种特殊神经病的体外替代模型	(240)
第五节 神经毒性相关生化物质的检测方法	(242)
一、神经递质的测定	(243)
二、神经递质受体的测定(放射配体受体结合试验)	(245)
三、酶活性的测定	(246)
第六节 膜片钳技术在神经毒性评价中的应用	(248)
一、全细胞膜片钳记录技术	(248)
二、脑片膜片钳记录	(249)
第九章 免疫毒性评价	(253)
第一节 概述	(255)
第二节 免疫系统的结构与功能	(256)
一、免疫系统的组成	(256)
二、免疫系统的功能	(256)
第三节 超敏反应检测	(257)
一、局部淋巴结试验(LLNA)	(257)
二、巨噬细胞体外培养试验	(258)
第四节 自身免疫检测——腮腺淋巴结试验	(258)
一、原理	(258)
二、直接法	(259)
三、间接法	(259)
四、过继转移法	(260)
第五节 免疫抑制检测	(261)
一、NK 细胞杀伤活性测定	(261)
二、T 淋巴细胞增殖试验	(263)
三、B 淋巴细胞增殖试验	(265)
四、巨噬细胞吞噬活性测定	(265)
五、细胞因子测定	(267)
第十章 内分泌干扰物毒性评价	(269)
第一节 概述	(271)

一、环境内分泌干扰物的定义	(271)
二、环境内分泌干扰物的种类与毒效应	(271)
三、环境内分泌干扰物筛查的研究现况	(272)
四、体外的快速筛查	(273)
五、内分泌干扰物筛查研究展望	(274)
第二节 体外试验评价方法	(274)
一、雌激素受体结合试验	(274)
二、雄激素受体结合试验	(278)
三、雌激素受体转录激活试验	(282)
四、雄激素受体转录激活试验	(288)
五、器官培养	(293)
六、原代细胞培养	(295)
七、表达类固醇激素代谢酶的细胞系与其应用	(296)
八、MCF-7 细胞增殖试验	(297)
九、芳香酶试验	(297)
第三节 非哺乳动物体内试验评价方法	(300)
一、两栖类变态发育试验	(300)
二、鱼筛选试验	(304)
三、一代和两代毒性试验	(309)
第四节 哺乳动物体内试验评价方法	(321)
一、3 d 子宫增重试验	(321)
二、5 d 和 7 d Hershberger 试验	(323)
三、雄性和雌性大鼠青春期试验	(325)
四、15 d 正常雄性大鼠试验	(326)
五、宫内发育-哺乳试验	(327)
第十一章 生殖发育毒性评价	(333)
第一节 概述	(335)
第二节 生殖生理	(336)
第三节 生殖发育毒性体内预筛试验	(337)
一、试验程序	(337)
二、观察项目	(337)
三、结果评定	(338)
第四节 生殖毒性体外评价试验	(338)

一、睾丸组织细胞体外培养	(339)
二、卵巢体细胞体外培养	(342)
三、精液分析	(344)
第五节 发育毒性细胞培养评价模型	(348)
一、胚胎肢芽细胞微团培养	(348)
二、神经嵴细胞分离培养	(351)
三、中脑细胞培养	(352)
四、视网膜细胞培养	(354)
五、心肌细胞培养	(354)
六、胚胎干细胞培养	(355)
第六节 发育毒性器官培养评价模型	(358)
一、肢芽培养	(358)
二、腭板培养	(361)
第七节 发育毒性胚胎培养评价模型	(362)
一、大、小鼠全胚胎培养	(362)
二、非哺乳动物胚胎体外培养模型	(368)
第十二章 遗传毒性和致癌性评价	(377)
第一节 概述	(379)
一、遗传毒性的概念	(379)
二、致癌性的概念	(382)
第二节 遗传危害与致癌作用的评价	(389)
一、遗传危害评价	(389)
二、致癌性评价	(391)
三、遗传毒性试验组合与替代方法	(393)
第三节 遗传毒性检测方法	(396)
一、细菌回复突变试验	(397)
二、微核试验	(404)
三、染色体畸变试验	(407)
四、单细胞凝胶电泳试验	(412)
五、小鼠淋巴瘤细胞 <i>tk</i> 基因突变试验	(414)
六、程序外 DNA 合成试验	(418)
七、果蝇伴性隐性致死试验	(420)
八、体外哺乳动物细胞姐妹染色单体交换试验	(422)

九、DNA 加合物检测	(424)
十、酿酒酵母基因突变试验	(426)
十一、酿酒酵母有丝分裂重组试验	(427)
十二、转基因动物致突变试验	(428)
第四节 非遗传毒性致癌检测方法	(430)
一、哺乳动物细胞体外恶性转化试验	(430)
二、体外缝隙连接细胞间通讯的测定	(432)
三、细胞增殖测定	(434)
四、细胞周期分析及相关细胞周期蛋白的表达	(435)
五、DNA 甲基化的检测	(438)
第十三章 毒理基因组学	(441)
第一节 概述	(443)
第二节 毒理基因组学的主要研究内容与方法	(444)
一、主要研究内容	(444)
二、主要研究方法	(445)
三、毒理基因组学的发展趋势	(447)
第三节 基本方法与技术流程	(448)
一、基因芯片的构建	(449)
二、样品的制备、标记与杂交	(452)
三、基因芯片图像采集与处理	(454)
四、基因芯片的数据处理	(456)
五、基因表达信息学	(459)
第四节 毒理基因组学的应用	(463)
一、毒物的分类与作用机制的研究	(464)
二、毒物作用的量效关系与时效关系研究	(465)
三、物种间外推	(465)
四、化学混合物联合效应研究	(466)
五、低剂量与早期的毒性研究	(466)
六、遗传多态性的检测	(466)
第五节 基因组学在其他相关领域的应用	(467)
一、药物研究中的应用	(467)
二、临床研究中的应用	(469)
三、肿瘤研究中的应用	(471)

第六节 存在问题与发展前景	(473)
第十四章 毒理蛋白质组学	(477)
第一节 概述	(479)
第二节 蛋白质组学研究的基本技术手段	(480)
一、双向凝胶电泳技术	(480)
二、质谱分析	(482)
三、蛋白质组学数据库	(485)
四、蛋白质组学研究的其他技术手段	(485)
五、亚细胞蛋白质组学	(487)
第三节 蛋白质组学在毒理学研究中的应用	(489)
一、在重金属毒性机制方面的应用	(489)
二、在癌症相关研究方面的应用	(490)
三、在生殖毒理学方面的应用	(490)
四、在氧化应激损伤研究中的应用	(490)
五、用于生物标志物的发现	(491)
六、在药物毒理学研究中的应用	(491)
第十五章 毒理代谢组学	(497)
第一节 概述	(499)
一、基本概念	(499)
二、代谢组学研究对象与方法思路	(501)
三、代谢组学与其他组学的关系	(502)
第二节 基本方法与技术流程	(503)
一、样品采集与处理	(503)
二、代谢产物的检测分析与鉴定	(504)
三、数据的分析与处理	(508)
四、数据库与专家系统	(512)
第三节 生物标志物	(513)
一、生物标志物基本概念	(513)
二、生物标志物的分类	(514)
三、生物标志物在毒理学研究中的应用	(517)
第四节 毒理代谢组学的应用	(519)
一、毒性作用机制研究	(519)
二、确定毒物作用靶器官与特异性生物标志物	(521)

三、药物临床前毒性评价	(521)
第五节 代谢组学在其他相关研究领域中的应用	(524)
一、疾病诊断方面的应用	(524)
二、中药现代化研究中的应用	(526)
三、功能基因组学研究中的应用	(527)
第六节 存在问题与发展前景	(528)
第十六章 胚胎干细胞的应用	(533)
第一节 概述	(535)
第二节 胚胎干细胞的生物学特征与鉴定	(535)
一、ESC 基本形态结构	(535)
二、ESC 主要表面抗原	(536)
三、ESC 常用鉴定方法	(537)
第三节 胚胎干细胞在毒性评价中的意义	(538)
一、外源化合物安全性评价的需要	(538)
二、药物研发的需求	(538)
三、传统毒性评价模型的不足	(538)
第四节 胚胎干细胞在毒性评价中的应用	(539)
一、先导化合物的优化筛选	(539)
二、靶器官毒性研究	(539)
三、致畸致癌作用机制研究	(541)
四、发育毒性评价	(541)
第十七章 转基因动物的应用	(545)
第一节 转基因动物概况及其发展	(547)
第二节 转基因动物的制备技术	(547)
一、显微注射法	(548)
二、逆转录病毒介导基因转移法	(548)
三、胚胎干细胞介导转移法	(548)
四、精子介导基因转移法	(548)
五、核转移法	(549)
第三节 用于毒理学研究的转基因动物模型及其特点	(549)
一、一般毒性研究模型	(549)
二、致突变检测模型	(550)
三、致癌检测模型	(550)

四、生殖毒性检测模型	(552)
五、毒物代谢研究模型	(553)
六、转基因动物应用于毒理学研究的特点	(553)
第四节 展望	(554)
第十八章 体外细胞三维培养技术	(559)
第一节 概述	(561)
第二节 体外细胞三维培养的构成与特点	(562)
一、三维培养的构成	(562)
二、三维培养的特点	(562)
三、三维培养的方法	(562)
第三节 体外细胞三维培养技术基本要求	(563)
一、三维培养容器设计要求	(563)
二、培养条件要求	(563)
三、细胞三维培养评估	(563)
第四节 细胞三维培养技术实例	(564)
一、藻酸包被软骨细胞微球培养	(564)
二、心肌细胞三维固定化培养	(565)
三、原代小鼠肝实质细胞三维培养	(566)
第五节 细胞三维培养技术在毒理学研究中的应用	(568)
一、在一般毒性与遗传毒性研究中的应用	(568)
二、在皮肤毒理学研究中的应用	(570)
三、结语	(570)