环境化学物致突变致畸致癌试验方法

浙江科学技术出版社

89043

环境化学物致突变、致畸、致癌试验方法

黄幸纾　陈星若 主编

浙 江 科 学 技 术 出 版 社

责任编辑：励慧珍
封面设计：潘小忠

环境化学物致突变、致畸、致癌试验方法
黄幸纾　陈星若　主编
※
浙江科学技术出版社出版
浙江新华印刷厂印刷
浙江省新华书店发行
开本850×1168　1/32　印张11　字数267,000
1985年2月第一版
1985年2月第一次印刷
印数：1—3,230

统一书号：14221·73
定　价：2.10元

前　言

随着工业的发展，越来越多新的化学物进入人们生活和劳动的环境中。例如美国每年进入市场的新化学物超过500种（包括药物和其他环境化学物）。七十年代以来世界医学界对人类肿瘤和遗传病与环境污染关系的认识逐步深化，更加重视环境污染问题。环境问题已成为每一工业化国家必须解决的重大问题之一。

由于环境污染，我国目前每年有数拾万人死于肿瘤。浙江省1974～1976年人口死亡原因中，恶性肿瘤已上升到首位。在恶性肿瘤中，胃癌、肝癌、食管癌三者合计占肿瘤死亡数的57.95%。辽宁一个污水灌溉区和天津市一个居民区的资料表明，肿瘤患病率在逐年提高。环境化学致癌原存在于香烟、空气、水、工业毒物、工业三废、农药、药物以及食品中。要预防肿瘤，首先要确定环境中的致癌原。

人类的先天性畸形与环境污染有关。波兰在工业化过程中，由于环境污染，新生儿发育异常，1962年为0.62%，1969～1970年增加到2.2～2.4%。在苏联，新生儿有发育异常的，化学工业发达的城市，比机器制造工业城市多20～35%。在一些工业发达国家中，死于先天性畸形的儿童为死于传染病的2倍。北京市婴儿死亡原因中，1951年先天性心脏病只占倒数第二位，1974～1976年却跃升到第二位；0～15岁儿童死因中，先天性畸形占首位。所以预防先天性畸形，除了有遗传因素外，环境因素，环境中存在化学致畸原是很重要的。

随着人民文化知识水平和生活水平的提高，对环境卫生质量的要求也在不断提高。为了防止各种有毒物质污染环境和食品，

危害人民健康，我国政府颁布了“环境保护法”（1982）、“食品卫生法”（试行，1983）、“农药登记规定”（1982）以及“食品安全性毒理学评价程序”（试行，1983）等。它们规定了农药申请登记和申请正式生产用于食品及其容器、包装材料的化学物（包括食品添加剂）都要提交有关该化学物的毒性，特别是致突变性、致畸、致癌（简称“三致”）试验资料。在制订有关地面水、饮水、厂房空气、大气、食品等的卫生标准时，都要审核有关化学物的毒理学，特别是“三致”试验结果的资料。食品卫生监测、环境监测、劳动保护等工作中，常常要对环境化学物进行毒理学试验，和利用现有的资料对一些化学物作出安全性评价。对那些有“三致”性的化学物应按有关法规进行严格管制。这是为了防止有“三致”性的化学物，在投产和推广使用后污染环境，为害人民健康。

总之，有关环境化学物毒性的知识不但对卫生预防、环境保护、劳动保护工作人员有用，而且对农业生产、某些工业生产、交通运输、商业工作人员也有关系。

毒理学是研究化学物对机体的有害作用，并作出安全评价的一门较新的科学。“三致”毒性是毒理学中较新而又很重要的部分。由于“三致”毒性的提出，过去一向认为安全的某些化学物需要重新审查，例如饮料中的咖啡因的致畸和致突变问题。我国迄今尚无一本毒理学教科书，更没有“三致”试验的专著。《中国医学百科全书毒理学》偏重理论。我们参阅了国内外最新资料，吸取了1983年世界卫生组织派来我校主讲“三致试验方法讲习班”专家的讲学内容，并结合我们近年来的实践经验，写成本书。它的主要内容是介绍环境化学物“三致”试验方法，着重短期试验。考虑到我国当前实验条件，选择的都是比较成熟的、操作容易和费钱不多的方法。在每种方法中也简单介绍一些有关的理论知识。希望读者通过本书能了解每种试验方法及其原理、结果判断和评价，知道怎样的试验是合格的。只有按照一定的要

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

求，在严格控制的条件下进行的实验才能得出可靠的结果；才能有可比性。读者想对方法作进一步的了解，可查阅每种方法后面列出的参考文献。

限于时间和作者的经验与水平，书中缺点、错误，望同行和读者批评指正。

编者于浙江医科大学

一九八四年三月

01606.

2906531-85/5/30——2.102

目　录

1 概论 ……………………………………………………（ 1 ）
　短期试验 ………………………………………………（ 2 ）
　一组试验的必要性 ……………………………………（ 3 ）
　试验项目的选择 ………………………………………（ 5 ）
2 鼠伤寒沙门氏菌营养缺陷型回复突变试验
　（Ames 试验） …………………………………………（ 13 ）
　菌株的基因型及生物学特性的测试…………………（ 18 ）
　　操作 …………………………………………………（ 19 ）
　　组氨酸缺陷型（his^-） ……………………………（ 19 ）
　　深度粗糙突变（rfa）——结晶紫抑菌试验 ………（ 20 ）
　　R因子——抗氨苄青霉素试验 ……………………（ 21 ）
　　ΔuvrB突变——紫外线敏感试验 …………………（ 22 ）
　　回变特性——诊断性试验 …………………………（ 23 ）
　　自发回复突变（his^+） ……………………………（ 23 ）
　测试菌株的保藏和应用 ………………………………（ 24 ）
　常用试剂及培养基的配方 ……………………………（ 26 ）
　　常用试剂 ……………………………………………（ 26 ）
　　营养肉汤 ……………………………………………（ 29 ）
　　营养肉汤琼脂培养基 ………………………………（ 29 ）
　　改良 Vogel-Bonner（V-B）10E ……………………（ 29 ）
　　最低营养 V-B 培养基 ………………………………（ 30 ）
　　组氨酸/生物素平板…………………………………（ 30 ）
　　氨苄青霉素平板 ……………………………………（ 30 ）
　　氨苄青霉素/四环素平板……………………………（ 30 ）
　　顶层软琼脂 …………………………………………（ 30 ）
　　0.5mM L-组氨酸/0.5mM D-生物素溶液 …………（ 31 ）

0.2M 磷酸钠缓冲液 …………………………………………（31）
哺乳动物肝S9的制备及应用 ……………………………（31）
诱导方法和S9的制备 ……………………………………（32）
合并诱导方法 ………………………………………………（32）
S9混合液的配制 ……………………………………………（34）
诱变试验操作与结果判断 ………………………………（35）
溶剂 …………………………………………………………（35）
受试化学物 …………………………………………………（35）
斑点试验（Spot test）与阳性判断依据 ………………（36）
平板掺入试验与阳性判断标准 …………………………（37）
假阳性与假阴性 ……………………………………………（38）
平板掺入试验的发展……………………………………（40）
预培养法 ……………………………………………………（40）
干燥器内试验法 ……………………………………………（40）
其他辅助因子的补给 ………………………………………（41）
尿中诱变剂的检出 …………………………………………（41）
波动试验 …………………………………………………（42）
菌株 …………………………………………………………（42）
试剂、贮存液及培养液的配制 …………………………（42）
操作程序 ……………………………………………………（45）
试验结果的统计评价 ………………………………………（46）
安全预防措施 ……………………………………………（48）
附录 ………………………………………………………（48）
肝匀浆S9组分蛋白质含量测定 …………………………（48）
肝匀浆S9组分细胞色素P-450测定 ……………………（51）
细胞色素P-450芳烃羟化酶(AHH)活性测定 …………（52）
3 大肠杆菌营养缺陷型回复突变试验 ……………………（56）
菌株……………………………………………………………（57）
菌株基因型鉴定 …………………………………………（58）
色氨酸需要 …………………………………………………（58）
乳糖、硫胺素需要 …………………………………………（59）

ΔuvrA/B——紫外线敏感试验……（59）
R因子——氨苄青霉素敏感试验……（60）
回变特性……（60）
自发回变……（61）
菌种保藏……（62）
定期移植……（63）
悬液深低温……（63）
主要培养基和溶液的配制……（63）
营养肉汤培养基、营养肉汤琼脂培养基、
半固体培养基、Davis-Mingioli 盐液的配制……（63）
20%葡萄糖水溶液……（63）
20%乳糖水溶液……（63）
5mg% 硫胺素水溶液……（63）
0.1%L—色氨酸水溶液……（63）
10%酪蛋白水解物水溶液……（63）
选择培养基底层……（64）
选择培养基顶层……（64）
4 倍稀释 D-M 盐溶液……（65）
生长培养液……（65）
肝微粒体的应用……（65）
检品的配制和预试……（65）
试验方法……（66）
点试及操作步骤……（66）
平板掺入法及操作步骤……（67）
数据处理与结果分析……（69）
点试法……（69）
平板掺入法……（69）
对本试验的评价……（69）
4 大肠杆菌 DNA 聚合酶缺陷型修复试验……（73）
菌株的性状鉴定和菌种保藏……（75）

培养基和溶液的配制 …………………………………………（ 76 ）
HA+T 琼脂培养基 ……………………………………………（ 76 ）
HA+T 软琼脂培养基 …………………………………………（ 77 ）
HA+T 液体培养基 ……………………………………………（ 77 ）
贮存盐溶液 ………………………………………………………（ 77 ）
肝微粒体的应用 …………………………………………………（ 77 ）
受试物的配制和对照试剂 ………………………………………（ 78 ）
试验方法 …………………………………………………………（ 78 ）
标准纸片扩散法及其操作步骤 …………………………………（ 78 ）
平板掺入法及其操作步骤 ………………………………………（ 80 ）
液体法及其操作步骤 ……………………………………………（ 80 ）
结果判断和数据处理 ……………………………………………（ 82 ）
对本试验的评价 …………………………………………………（ 83 ）
5 枯草杆菌重组缺陷型重组试验 ……………………………（ 87 ）
菌株的性状鉴定和菌种保藏 ……………………………………（ 88 ）
特性鉴定 …………………………………………………………（ 89 ）
菌种保藏 …………………………………………………………（ 89 ）
培养基和溶液的配制 ……………………………………………（ 90 ）
B-2肉汁培养基 …………………………………………………（ 90 ）
B-2肉汁琼脂培养基 ……………………………………………（ 90 ）
"干燥"平板制备 ………………………………………………（ 90 ）
改良的 Schaeffer 培养基 ………………………………………（ 90 ）
B-2 肉汁软琼脂培养基 …………………………………………（ 91 ）
50%(W/V) 甘油水溶液 …………………………………………（ 91 ）
M/15 磷酸盐缓冲液 ……………………………………………（ 91 ）
缓冲盐溶液 ………………………………………………………（ 91 ）
肝微粒体在试验中的应用 ………………………………………（ 92 ）
受试物的配制和对照试剂的选择 ………………………………（ 92 ）
试验方法 …………………………………………………………（ 93 ）
划线法 ……………………………………………………………（ 93 ）

芽胞法 ……………………………………………………（ 95 ）
液体法 ……………………………………………………（ 96 ）
结果判断和数据处理 ……………………………………（ 98 ）
对本试验的评价 …………………………………………（101）
6 哺乳类细胞 DNA 损伤的检测 ………………………（105）
碱性蔗糖梯度沉降试验 …………………………………（110）
原理 ……………………………………………………（110）
操作步骤 ………………………………………………（112）
碱性洗脱试验 ……………………………………………（116）
原理 ……………………………………………………（116）
操作步骤 ………………………………………………（117）
7 哺乳类细胞 DNA 修复反应的检测 …………………（125）
DNA 损伤的切除修复及其检测 …………………………（125）
等密度梯度沉降试验 ……………………………………（128）
原理 ……………………………………………………（128）
操作步骤 ………………………………………………（129）
溴尿嘧啶光解试验 ………………………………………（133）
原理 ……………………………………………………（133）
操作步骤 ………………………………………………（135）
程序外 DNA 合成（UDS）试验 …………………………（138）
原理 ……………………………………………………（138）
UDS 放射自显影显示法的操作步骤 ……………………（140）
UDS 液体闪烁计数显示法的操作步骤 …………………（143）
DNA 合成抑制试验 ………………………………………（148）
原理 ……………………………………………………（148）
实验步骤 ………………………………………………（148）
8 哺乳类细胞诱变试验 ………………………………（153）
野生型细胞的选择 ………………………………………（154）
CHO 细胞系 ……………………………………………（155）
V79 细胞系 ……………………………………………（155）

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com

L5178Y 细胞系 …… (155)
人二倍体成纤维细胞 …… (155)
常用基因座位的特征 …… (155)
hgprt 座位 …… (156)
质膜 Na^+/K^+ ATP 酶座位（乌本苷耐受性） …… (157)
tk 座位 …… (158)
白喉毒素耐受座位（dip^r） …… (159)
实验设计模式和影响实验结果的因素 …… (159)
自发突变率 …… (160)
突变表现型的“表达时间” …… (161)
代谢协同作用与选择时的细胞密度 …… (161)
集落分裂 …… (162)
其他 …… (162)
几个哺乳类细胞诱变试验系统 …… (163)
V79(CHO)/hgprt 系统 …… (163)
V79/oua^r 系统 …… (166)
HF/dip^r 系统 …… (166)
L5178Y(tk^+/tk^-)/tk 系统 …… (168)
9 细胞转化试验 …… (173)
SHE 细胞转化试验 …… (175)
SHE 细胞的分离及冷冻贮存 …… (176)
检测步骤 …… (177)
C3H/10T1/2 及 BALB/C-3T3 细胞系系统 …… (183)
细胞系的培养和贮存 …… (184)
检测步骤 …… (184)
BHK-21/软琼脂系统 …… (187)
BHK-21/C1-13 的培养条件 …… (188)
检测步骤 …… (189)
·附录·细胞培养基本技术 …… (190)
10 体细胞染色体畸变试验 …… (195)
体外染色体畸变的试验 …… (199)

细胞株的测试 ……………………………………………………（199）
人外周血细胞染色体畸变试验 …………………………………（202）
体内骨髓细胞染色体畸变试验 ……………………………（203）
动物选择 …………………………………………………………（203）
给药次数、途径与剂量 ………………………………………（203）
取样时间 …………………………………………………………（203）
制片步骤 …………………………………………………………（204）
染色体畸变分析 …………………………………………………（206）
染色体数目的变化 ………………………………………………（206）
染色体结构的变化 ………………………………………………（207）
11 微核试验 ………………………………………………………（218）
哺乳动物骨髓嗜染红细胞（PCE）微核试验 ………（220）
细胞群的选择 ……………………………………………………（220）
动物选择 …………………………………………………………（220）
剂量及分组 ………………………………………………………（221）
给药方式及制片时间 ……………………………………………（222）
对照组 ……………………………………………………………（224）
制片方法 …………………………………………………………（224）
染色 ………………………………………………………………（225）
嗜多染红细胞及微核计数 ………………………………………（227）
数据处理 …………………………………………………………（228）
结果评价 …………………………………………………………（228）
哺乳动物骨髓嗜多染红细胞微核试验的优缺点 ……………（229）
胚胎转移微核试验 ………………………………………………（230）
原理 ………………………………………………………………（230）
试验方法 …………………………………………………………（231）
讨论 ………………………………………………………………（232）
其他细胞微核试验 ………………………………………………（233）
哺乳动物减数分裂细胞的微核试验 ……………………………（233）
肝细胞微核试验 …………………………………………………（234）
细胞培养微核试验 ………………………………………………（234）

小鼠脾脏微核试验 …………………………………………………（234）
外周血微核试验 ……………………………………………………（234）
与 SCE 同时进行微核试验………………………………………（235）
12 姊妹染色单体交换试验 ……………………………………（236）
原理 ……………………………………………………………………（237）
哺乳类细胞体外 SCE 试验 ………………………………………（238）
哺乳类动物体内 SCE 试验 ………………………………………（240）
实验设计 ………………………………………………………………（240）
BUdR 的预处理 ……………………………………………………（240）
操作步骤 ………………………………………………………………（242）
统计处理及结果评价 ………………………………………………（245）
SCE 的基线频率 ……………………………………………………（246）
SCE 方法的优缺点 …………………………………………………（246）
13 睾丸染色体畸变试验 ………………………………………（249）
精子发生过程 ………………………………………………………（250）
试验方法 ………………………………………………………………（252）
动物 ……………………………………………………………………（252）
给药剂量及途径 ……………………………………………………（252）
精原细胞畸变观察 …………………………………………………（253）
初级精母细胞畸变观察 ……………………………………………（255）
14 精子畸形试验 …………………………………………………（264）
精子畸形试验方法……………………………………………………（265）
动物 ……………………………………………………………………（265）
给药和剂量 …………………………………………………………（265）
对照 ……………………………………………………………………（265）
精子采样与检查 ……………………………………………………（265）
统计分析与评价 ……………………………………………………（266）
精子畸形与诱变性的关系 …………………………………………（267）
特异座位试验 ………………………………………………………（267）
可遗传易位试验 ……………………………………………………（267）

显性致死试验 ……………………………………………………（267）
小鼠精子畸形试验的灵敏度和特异性 ………………………（268）
精子畸形试验与致癌性的关系 ……………………………（268）
精子试验的优缺点 ……………………………………………（269）
有待进一步研究的问题 ……………………………………（270）
15 显性致死试验 ……………………………………………（272）
原理 ………………………………………………………………（272）
试验方法 …………………………………………………………（273）
动物选择 ……………………………………………………（273）
剂量、动物分组及给药方式 ……………………………（273）
交配方法 ……………………………………………………（275）
胎仔检查 ……………………………………………………（277）
结果统计分析 ………………………………………………（277）
结果判断 ……………………………………………………（278）
讨论 ………………………………………………………………（279）
16 果蝇伴性隐性致死试验 ………………………………（282）
试验方法 …………………………………………………………（282）
原理 …………………………………………………………（282）
果蝇 …………………………………………………………（284）
预试 …………………………………………………………（285）
样本的大小 …………………………………………………（286）
阳性和阴性对照 ……………………………………………（286）
给予受试物 …………………………………………………（287）
交配程序 ……………………………………………………（288）
结果的判断、统计处理及评价 ……………………………（289）
结果的判断标准 ……………………………………………（289）
统计处理及评价 ……………………………………………（289）
注意事项 …………………………………………………………（290）
对方法学的评价 …………………………………………………（290）
应用及发展概况 …………………………………………………（291）

17 致畸试验与生殖毒性试验 …………………………………… (294)
有关致畸的基本概念 …………………………………… (296)
致畸性 …………………………………… (296)
胚胎毒性 …………………………………… (296)
母体毒性 …………………………………… (296)
畸形和畸胎发生 …………………………………… (296)
致畸指数 …………………………………… (296)
影响畸胎发生的因素和致畸机理 …………………………………… (296)
发育阶段 …………………………………… (297)
遗传的感受性 …………………………………… (297)
化学物的理化性质 …………………………………… (298)
化学物的剂量 …………………………………… (298)
致畸机理 …………………………………… (299)
美国的生殖毒性试验规范 …………………………………… (299)
FDA 的两代生殖试验结合致畸试验 …………………………………… (300)
FDA 的三代生殖试验结合致畸试验 …………………………………… (302)
FDA 的致畸试验要点 …………………………………… (302)
FDA 的三段致畸试验 …………………………………… (305)
EPA 的禽类生殖试验 …………………………………… (307)
我国的生殖毒性试验方案 …………………………………… (308)
喂养生殖试验结合致畸试验 …………………………………… (308)
大鼠致畸试验 …………………………………… (308)
生殖毒性试验的发展 …………………………………… (310)
18 诱癌试验 …………………………………… (312)
实验动物 …………………………………… (312)
动物种属和品系的选择 …………………………………… (312)
动物的需要量 …………………………………… (313)
动物的饲养管理 …………………………………… (314)
给药途径 …………………………………… (316)
经口给药 …………………………………… (316)
经皮肤给药 …………………………………… (316)

腹腔内注入 ……………………………………………………（317）
静脉内注入 ……………………………………………………（317）
呼吸道给药 ……………………………………………………（317）
预备试验 ………………………………………………………（318）
急性试验 ………………………………………………………（318）
两周重复给药试验 ……………………………………………（318）
亚慢性试验 ……………………………………………………（318）
动物的自发性肿瘤 ……………………………………………（320）
诱癌试验实施方法 ……………………………………………（320）
动物随机分组 …………………………………………………（320）
给药剂量和实验时限 …………………………………………（323）
日常观察和处理 ………………………………………………（324）
病理学检查 ……………………………………………………（324）
诱癌试验结果的评价 …………………………………………（325）
肿瘤的发生率 …………………………………………………（325）
诱癌试验阳性的判断标准 ……………………………………（325）
提高诱癌试验敏感性的措施 …………………………………（326）
经胎盘诱癌试验 ………………………………………………（326）
新生动物中诱癌 ………………………………………………（327）

此为试读，需要完整PDF请访问：www.ertongbook.com