

# 发育毒理学 研究方法和实验技术

主编：李 勇 张天宝



北京医科大学出版社

发育毒理学研究方法和实验技术

李勇

9  
/a  
2

# 发育毒理学研究方法和实验技术

主编 李勇 张天宝

顾问 刘世杰 李竹

编写人员名单 (以姓氏笔划为序)

刘建蒙 (北京医科大学中国妇幼保健中心; 卫生部生育健康研究重点实验室)

刘虹 (北京医科大学中国妇幼保健中心; 卫生部生育健康研究重点实验室)

朱新安 (新疆医科大学解剖学教研室)

朱慧萍 (北京医科大学中国妇幼保健中心; 卫生部生育健康研究重点实验室)

张天宝 (第二军医大学卫生毒理学教研室)

李竹 (北京医科大学中国妇幼保健中心; 卫生部生育健康研究重点实验室)

李勇 (北京医科大学中国妇幼保健中心; 卫生部生育健康研究重点实验室)

屈卫东 (上海医科大学公共卫生学院)

赵如冰 (北京医科大学中国妇幼保健中心; 卫生部生育健康研究重点实验室)

郝玲 (北京医科大学中国妇幼保健中心; 卫生部生育健康研究重点实验室)

袁立懋 (广州市卫生防疫站)

郭新彪 (北京医科大学环境卫生学教研室)

黄建 (第二军医大学卫生毒理学教研室)

北京医科大学出版社

---

# FAYU DULIXUE YANJIU FANGFA HE SHIYAN JISHU

## 图书在版编目 (IP) 数据

发育毒理学研究方法和实验技术/李勇, 张天宝主编. 北京: 北京医科大学出版社, 2000.4

ISBN 7-81034-859-0

I. 发… II. ①李…②张… III. ①发育-毒理学-研究方法②发育-毒理学-实验-技术 IV. R99-3

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2000) 第 05670 号

北京医科大学出版社出版发行

(100083 北京学院路 38 号 北京医科大学院内)

责任编辑: 刘 群 谢 琳

责任校对: 何 力

责任印制: 张京生

山东省莱芜市印刷厂印刷 新华书店经销

\* \* \*

开本: 787mm × 1092mm 1/16 印张: 22.75 字数: 577 千字

2000 年 5 月第 1 版 2000 年 5 月山东第 1 次印刷 印数: 1 - 3000 册

定价: 40.00 元

本书由  
北京医科大学科学出版基金  
资助出版

## 内容简介

发育是一极为复杂的过程，发育异常研究涉及生命科学领域中的多种学科，需采用不同的手段，从不同层次和水平上进行综合性探索。鉴此，本书主要内容包括母体－胎盘－胚胎－组织器官－细胞－细胞器－蛋白质和酶－基因 8 个层面及与各层面相关的检测技术。根据“有所为和有所不为”的原则，本书以突出实用性为主要特色和己任，所选方法多、适用范围广，且部分主要方法是编者根据多年成功的经验和体会而著，因此在方法步骤方面具有较高的可靠性和重复性。

本书可供致力于发育研究的基础医学、预防医学、临床医学、生物学、药学和优生优育工作者们参阅。

## 序

控制人口数量,提高人口素质是我国的基本国策。在控制人口数量方面我国已取得举世公认的成就,但在提高人口素质方面还任重而道远。据我国出生缺陷监测资料,每年有30~40万严重的、肉眼可见的先天畸形儿出生。如果考虑到这仅是医院监测资料,而且很多发育异常在出生时并未表现出来,再加上非肉眼可见的各种生理机能和智力障碍,其实际发生数可能远大于出生缺陷监测的数字。先天畸形已成为影响婴儿死亡率和残疾人口的主要原因,给家庭和社会都带来了沉重的精神和经济负担。因此,预防和减少出生缺陷等发育异常,具有重大的社会效益和经济效益,是提高人口素质的一个重要内容,对降低婴儿死亡率也有重要作用,也是一项长期而艰巨的任务。

预防和降低出生缺陷等异常发生率,首先必须识别、鉴定导致各类出生前后发育异常的有害因素,阐明其作用机理,然后才能采取有效的防治措施。发育毒理学正是被赋予这一使命的一门学科。这是一门重要性日益增加、近年来非常活跃、发展迅速的交叉学科。目前正处于发展的重要时期,即在阐明化学物等诱发的出生缺陷的性质上正在经历一场变革,而变革的中心是方法学;由于方法学的进展,使人们能在整体、器官、细胞和分子不同水平上研究发育毒理效应。及时抓住这一时机,有可能使我国在发育毒理学上赶上国际发展的先进水平。

该书作者及时抓住这一发展契机,在参阅国内外研究资料的基础上,结合作者多年的研究实践,编写了《发育毒理学研究方法和实验技术》一书。该书从体内到体外、从整体、器官、细胞到分子不同水平,较系统地介绍了目前该领域的研究方法和技术,有较好的实用性和参考价值。作为国内第一本有关该领域实验技术方法方面的专著,我相信必将对进一步促进我国发育毒理学的研究和发展发挥积极的作用,对其他相关学科领域也有一定的借鉴作用。为此,我祝贺该书出版,并向广大的医学、人口和环境科学工作者推荐该书。

王琳芳

1999年10月

## 前 言

自 60 年代的“反应停”众所周知的悲剧和 70 年代 Wilson 提出“发育毒理学”的观点之后,各国政府和科学家对发育毒性的危害逾甚重视,尤其是随着现代生产的飞速发展,日常生活接触各种环境有害物质的机会日益增多,无疑已对世界人口质量构成极为严重的威胁。鉴此,充分建立和应用各种体内/体外试验模型系统,研究常见化学物的发育毒性,探讨先天缺陷的病因和发生机理,预防各种缺陷的发生已成为目前国际上的最重要前沿领域之一。我国发育毒理学方法研究和国际同行相比处于相对滞后阶段,但这也是一种天赐机遇和面对挑战的时刻,因此,我们编著国内第一本《发育毒理学研究方法和实验技术》专著,以表我们对国家的忠孝之心。

本书的出版承蒙北京医科大学出版社的重视和大力支持,在北京医科大学科学出版基金资助下,使本书在短短半年时间就完成了出版工作;中国妇幼保健中心的王丽娜、陈星等老师在文献资料收集等方面给予全力协助;王琳芳院士为本书作序;在此本书作者对他们表示崇高的敬意和衷心的感谢!

由于本书涉及的专业较多且具有多学科交叉的特点,同时亦限于编者的学术水平和写作风格,书中错误和片面性肯定存在,欢迎读者批评指正。我们衷心地希望本书能推动我国发育毒理学研究的进展,还希望将来本书有再版机会时,会有更多的同行专家参与进来,不断完善和提高本书质量,使之成为一本行之有效和完整的工具书。

李 勇 张天宝  
一九九九年十月

# 目 录

|                                             |                                                      |
|---------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| <b>第一章 绪论</b> ..... (1)                     | <b>第三节 11.5 天龄 YSP 移植和培养</b> ..... (73)              |
| 第一节 发育毒理学的基本概念 ..... (1)                    | <b>第四节 17.5 天龄 YSP 移植和培养</b> ..... (74)              |
| 第二节 发育毒理学研究方法和实验技术的发展概况 ..... (3)           | <b>第五节 “巨大”YSP 移植和培养</b> ..... (74)                  |
| 第三节 展望..... (6)                             | <b>第六节 评价方法</b> ..... (75)                           |
| <b>第二章 着床后体外全胚胎培养</b> ..... (7)             | <b>第七节 啮齿类动物 VYS 体外培养技术在胚胎学和畸胎学研究中的应用</b> ..... (80) |
| 第一节 WEC 实验室基本要求 ..... (7)                   | <b>第六章 胚胎肢芽体外培养技术</b> ..... (84)                     |
| 第二节 培养基制备技术 ..... (10)                      | 第一节 肢芽转动培养方法 ..... (84)                              |
| 第三节 胚外膜剥离术和胚胎移植..... (12)                   | 第二节 肢芽悬浮培养 ..... (86)                                |
| 第四节 混合供气系统和胚胎培养 ..... (16)                  | 第三节 培养肢芽的组织学处理..... (87)                             |
| 第五节 胚胎发育终点和评分法..... (18)                    | 第四节 肢芽形态分化的评价方法..... (87)                            |
| <b>第三章 着床前和围着床期体外全胚胎培养</b> ..... (37)       | 第五节 宫外科技术 ..... (89)                                 |
| 第一节 着床前小鼠胚胎的培养(从胚泡期—体节早期) ..... (37)        | <b>第七章 胚胎器官和器官原基培养</b> ..... (96)                    |
| 第二节 着床前大鼠胚胎的培养..... (39)                    | 第一节 引言 ..... (96)                                    |
| 第三节 兔着床前胚胎培养方法..... (40)                    | 第二节 胚胎器官培养的一般方法..... (97)                            |
| 第四节 胎盘绒毛组织外植体的三维培养方法(围着床的体外研究模型) ..... (44) | 第三节 胚胎器官培养实例 ..... (103)                             |
| 第五节 着床前胚胎体外暴露于毒物后胚胎的移植试验..... (47)          | <b>第八章 细胞培养技术</b> ..... (112)                        |
| <b>第四章 非哺乳动物体外胚胎培养</b> ..... (52)           | 第一节 胚胎肢芽细胞培养 ..... (112)                             |
| 第一节 鸟胚培养技术 ..... (52)                       | 第二节 神经胶质细胞分离培养 ... (116)                             |
| 第二节 蛙胚胎培养技术 ..... (59)                      | 第三节 神经细胞培养 ..... (119)                               |
| 第三节 鱼胚胎培养技术 ..... (61)                      | 第四节 神经嵴细胞培养 ..... (122)                              |
| 第四节 果蝇培养技术 ..... (63)                       | 第五节 中脑细胞培养 ..... (125)                               |
| 第五节 水螅培养技术 ..... (64)                       | 第六节 软骨细胞培养 ..... (128)                               |
| 第六节 涡虫培养技术 ..... (67)                       | 第七节 胎盘滋养层细胞培养 ..... (129)                            |
| <b>第五章 胚胎卵黄囊胎盘(YSP)体外培养技术</b> ..... (70)    | 第八节 子宫蜕膜细胞培养 ..... (130)                             |
| 第一节 前言 ..... (70)                           | 第九节 心肌细胞培养 ..... (131)                               |
| 第二节 YSP 培养基和气体制备..... (71)                  | 第十节 视网膜细胞培养 ..... (132)                              |
|                                             | <b>第九章 哺乳动物整体发育毒性试验</b> ..... (135)                  |



|                                            |              |                                       |              |
|--------------------------------------------|--------------|---------------------------------------|--------------|
| 第一节 各国发育毒性试验方案的比较 .....                    | (135)        | 第四节 发育相关酶活性检测 .....                   | (240)        |
| 第二节 大、小鼠致畸试验 .....                         | (143)        | 第五节 发育必需营养素检测 .....                   | (245)        |
| 第三节 兔致畸试验 .....                            | (150)        | 第六节 先天性代谢异常物质测定 .....                 | (252)        |
| 第四节 体内发育毒性的初筛试验——CK 试验 .....               | (154)        | <b>第十四章 胚胎分子(基因)行为研究方法 .....</b>      | <b>(259)</b> |
| <b>第十章 化学物经胎盘转运和经胎盘致癌、致突变作用的试验方法 .....</b> | <b>(158)</b> | 第一节 胚胎总 DNA 和 RNA 检测技术 .....          | (259)        |
| 第一节 化学物经胎盘转运研究方法概述 .....                   | (158)        | 第二节 胚胎整体安装原位杂交技术 .....                | (265)        |
| 第二节 发育毒性评价的毒代动力学研究 .....                   | (159)        | 第三节 胚胎组织切片原位杂交方法 .....                | (274)        |
| 第三节 胎盘灌流技术 .....                           | (163)        | 第四节 原位 PCR 技术 .....                   | (280)        |
| 第四节 经胎盘的致癌性试验 .....                        | (168)        | 第五节 胚胎染色体原位杂交 .....                   | (286)        |
| 第五节 经胎盘的致突变试验 .....                        | (170)        | 第六节 Northern 杂交、斑点或狭线印迹 .....         | (294)        |
| 第六节 着床前胚胎的致突变性检测方法 .....                   | (180)        | 第七节 聚合酶链式反应(PCR) .....                | (298)        |
| <b>第十一章 发育神经行为毒性测试方法 .....</b>             | <b>(183)</b> | 第八节 胚胎 DNA 甲基化分析 .....                | (307)        |
| 第一节 发育神经行为毒性研究的试验设计 .....                  | (183)        | 第九节 胚胎组织的核酸酶 S1 保护实验 .....            | (310)        |
| 第二节 生理发育指标的观察 .....                        | (186)        | 第十节 基因及其表达的差异分析方法 .....               | (312)        |
| 第三节 运动和协调功能的测试 .....                       | (187)        | 第十一节 基因诱捕法 .....                      | (319)        |
| 第四节 反射和感觉功能试验 .....                        | (190)        | 第十二节 胚胎干细胞基因打靶技术 .....                | (322)        |
| 第五节 认知能力的测试 .....                          | (192)        | 第十三节 体外全胚胎培养与反义技术结合试验 .....           | (328)        |
| 第六节 生殖行为试验 .....                           | (194)        | <b>第十五章 流行病学研究方法和公共卫生监测 .....</b>     | <b>(336)</b> |
| <b>第十二章 胚胎细胞行为学研究方法 .....</b>              | <b>(196)</b> | 第一节 流行病学研究中的基本概念 .....                | (336)        |
| 第一节 细胞粘着试验 .....                           | (196)        | 第二节 流行病学研究常用的指标 .....                 | (337)        |
| 第二节 细胞增殖试验 .....                           | (199)        | 第三节 常用的流行病学研究方法 .....                 | (340)        |
| 第三节 细胞间隙连接通讯的检测 .....                      | (201)        | 第四节 疾病病因和预防措施研究实例——神经管畸形:从研究到预防 ..... | (342)        |
| 第四节 细胞死亡检测 .....                           | (205)        | 第五节 公共卫生监测 .....                      | (346)        |
| 第五节 免疫组织(细胞)化学定位检测 .....                   | (220)        |                                       |              |
| <b>第十三章 胚胎生化功能检测 .....</b>                 | <b>(229)</b> |                                       |              |
| 第一节 胚胎总蛋白质定量分析 .....                       | (229)        |                                       |              |
| 第二节 胚胎蛋白质电泳技术 .....                        | (233)        |                                       |              |
| 第三节 胚胎活性氧分析 .....                          | (237)        |                                       |              |

# 第一章 绪 论

## 第一节 发育毒理学的基本概念

发育毒理学 (developmental toxicology) 是研究发育生物体从受精卵、妊娠期以及出生后直到性成熟期间, 由于暴露于外源性理化因素而产生的各种发育异常及其机理, 为理化因素的危险度或安全性评价和预防措施提供依据的一门科学。发育毒理学是在畸胎学 (主要是实验畸胎学)、生殖毒理学 (主要是化学致畸作用) 基础上发展起来的一门毒理学的分支学科。从毒理学角度而言, 发育毒性作为生殖毒性研究的内容, 直到 80 年代末才从生殖毒理学中分化出来。因此, 发育毒理学是一门年轻的综合性的边缘学科。它涉及的基础学科有发育生物学、发育遗传学、胚胎学、细胞生物学、行为学等, 其他应用学科有实验畸胎学、临床畸胎学、畸胎流行病学、发育药理学、生殖毒理学、遗传毒理学、毒代动力学等。由于发育毒理学是一门综合性交叉学科, 因此, 它与一些学科在研究内容及方法上都有不同程度的重叠。为此, 此处扼要介绍发育毒理学中某些常用的概念, 并试图对某些相关概念加以对比。

### 一、发育毒理学与生殖毒理学

生殖毒理学是研究由于暴露于外源性因素而对生殖系统产生的有害效应。因此, 广义地说, 生殖毒理学可以包括发育毒理学, 生殖毒性包括生殖器官、相关的内分泌系统和妊娠后果的改变三方面。就亲代动物而言, 从配子生成、受精到胎儿分娩是一生殖过程。但另一方面, 就子代动物来说, 从受精卵到性成熟的青春期甚至一直到衰老都属于发育过程。即使是配子发生、成熟也可被认为是一个发育过程。因此, 也有人认为发育毒理学可涵盖生殖毒理学。目前, 比较一致的概念, 生殖毒理学研究对生殖系统主要是受精能力或生殖过程的毒性作用, 包括配子发生、成熟、释放及生殖内分泌、性周期和性行为、排卵和受精等。发育毒理学则主要研究从受精卵到性成熟这一发育期间对发育体的毒性作用, 也可包括对生殖细胞的毒性, 如雄性或雌性介导的发育毒性。狭义的概念则主要指孕期暴露对发育体的毒性作用。

生殖毒性的表现主要包括对性成熟、配子生成和转移、性周期、性行为、受精的有害作用, 广义的还包括对妊娠、分娩、哺乳等的有害作用。发育毒性的表现主要包括形态异常、生长发育改变、发育生物体死亡、行为功能缺陷或异常。

### 二、发育毒理学与畸胎学、畸形学

畸胎学 (teratology) 是一门研究人类异常发育和先天畸形的科学, 特别是研究环境中致畸因子作用的科学。狭义地讲, 就是研究致畸因子本身的性质、作用和它们对胎儿造成畸形发育的各种有关知识的科学。所以传统的畸胎学强调由于遗传损伤、环境条件、化学暴露或这些因素的任何联合而产生的持久的 (不变的) 和临床上可见的显著异常。畸胎学家和发育毒理学家工作的一个主要区别是集中在对机理和细胞功能急性、常是剧烈改变的认识上。发

毒理学家认为这些出现在发育期间由于细胞毒性而产生的改变，可以通过损害功能改变和生长迟缓而使发育体长期存活，认为化学物、环境或物理损伤而产生的大体解剖学缺陷是发生在梯度毒性之后，这可能导致取决于暴露期限和暴露程度的不同表现。在这个意义上讲，从次要的变异致大体畸形和死亡的所有效应只是沿着相同的连续体上的不同点。畸形学（dysmorphology）是研究遗传和环境对人体异常发育和各种类型形态功能异常，特别是畸形发生发展的科学，而畸胎学的重点是环境致畸。

### 三、先天畸形、先天变形和出生缺陷

先天畸形（congenital malformation）是指胎儿出生后，整个身体或某一部分的外形或内脏具有解剖上形态结构的异常。通常不包括显微镜下细微结构的异常；不包括生化代谢性缺陷；不包括单纯功能上的异常（如精神缺陷、智力缺陷）；也不包括出生时分娩过程中各种因素造成的缺陷。先天畸形是器官发生（organogenesis）的缺陷，而发育不良或组织发生障碍（dyshistogenesis）是组织发生的缺陷。

先天变形（congenital deformation）是指器官发生和表型发生时，由于内部因素和外部压力作用致使生长和发育的结构发生变形而影响到功能，如下颌、膈肌、指掌屈等的改变，这些均属“部位”（region）变形，而非器官畸形。

出生缺陷（birth defect）是指任何解剖学的和功能上的异常，包括的范围比先天畸形广，既包括形态的异常（大体的和细微的），也包括功能、代谢和行为的异常，但不包括结构和功能上的变异（variation）。所谓变异是指同一种属的子代与亲代之间或子代的个体之间，有时出现不完全相同的现象，例如肋骨或椎骨数目多于或少于正常，甚至某些内脏易位也属于变异。一般认为变异不影响正常生理功能，更不危及生命。

### 四、胚胎毒性、胎儿毒性和发育毒性

胚胎毒性（embryotoxicity）通常是指外源性环境因素对胚胎的选择性毒作用，表现为妊娠着床前早期阶段或着床后阶段胚胎的丢失。

胎儿毒性（fetotoxicity）指出生前引发的在胎儿中观察到的任何毒性表现（包括死亡、体重降低、骨化迟缓、功能缺陷），这可能与母体的毒性效应有关，也可能无关，虽然是在宫内引发的，但表现在出生前或出生后发育期间。

胚胎-胎儿（embryo-fetus）这一术语用于出生前发育阶段而引发损伤时间是未知的情况，也可用胎体（conceptus）表示。胎体是指从受精直到出生的整个产物，包括胚胎或胎儿和胚外膜。

发育毒性（developmental toxicity）是指由出生前引发和在子代的寿命期内出现的任何对发育有害的表现（形态的、生理的或功能的）。

### 五、畸形、异常和变异

畸形（malformation）是指出生前引起的严重的解剖学上的缺陷，可以存活也可能不存活。但对发育、生长、形态、生理功能、生育力和/或寿命将产生有害影响。

异常（abnormality）是指结构、外观、功能或行为的异常变化，与畸形不同，异常不影响出生后发育。

畸变（aberration）或变异（variation）是指小的或次要的结构改变，它可以是发育迟缓

(形态发生中的暂时延迟)、变异(由遗传和遗传外因素控制的外观变化),或由于分化改变而引起的中途歧异(deviation)。

## 六、行为畸胎学与功能发育毒理学

行为畸胎学(behavioral teratology)是指生物体在出生前暴露于外源性因素而对出生后行为产生不良影响的一门学科。

功能发育毒理学(functional developmental toxicity)是指研究出生前和/或出生后(直到青春期)发育关键期间由于接触某物质后该生物体或器官功能运用能力改变或延迟的原因、机理和表现的一门学科。

除此之外还有精神畸胎学(psychoteratology)、发育神经毒理学(developmental neurotoxicology)、功能畸胎学(function teratology)等名词也在使用。造成上述多种名词混乱的原因,主要是对研究内容和研究范围存在不同看法,如是否包括除神经行为以外的其他功能,外源性因素的暴露期限是否超出妊娠期等。另外有人认为畸胎是一误称,它用于代表结构异常,而行为功能异常不应称为畸胎。

## 七、致畸物和发育毒物

致畸物(teratogen)是指在出生前的发育期间暴露能诱发胎儿永久性的结构或功能异常的物质。如果诱发的畸形是在无明显母体毒性剂量下出现的,那么该物质就是一种真正的或选择性致畸物。

发育毒物(developmental toxicant)是指在出生前或出生后发育期间暴露能造成发育生物体发育毒性的物质。妊娠期间的发育毒物应是在未诱发母体毒性的剂量下产生发育毒性的物质。

# 第二节 发育毒理学研究方法和实验技术的发展概况

发育毒理学研究方法和实验技术是伴随着畸胎学和发育毒理学的发展而发展起来的,并已形成了特有的研究方法体系。从整个发展来看,可大致分以下三个阶段。

## 一、建立和完善整体动物试验阶段

最早记载试验诱发哺乳动物的发育毒性是在1905年,尽管试验不完整,但报告了母体暴露于X射线后胎儿致死的结果。1921年首次报告给予脂肪缺乏饮食在哺乳动物中诱发先天畸形的试验结果。

非官方的第一个整体动物测试方案是1963年由药物公司的毒理学家Peck提出的,他指出药物的致畸研究应在每日给予非毒性剂量下进行。第二个方案是由临床畸胎学家Brent于1964年提出,首次建议观察所有已知胚胎/胎儿毒性终点—改变生长、畸形和死亡率。第三个方案是由法国药理学家Cahen提出,他在总结大量文献的基础上提出了方案的某些建议。第四个方案是由胚胎学家Tuchmann-Duplessis(1965)提出。另外,Wilson建立了胎儿Bouin液固定的徒手切片法等技术。特别是1965年Wilson和Warkang联合出版了专著《Teratology; Principles and Techniques》(畸胎学的原理和技术),促进了试验畸胎学的发展,包括理论和方法上。此时,从科学界来说整体动物致畸性试验已基本完整建立。但由于受当时反应停事件

的影响，过于关注于致畸作用上，而忽略了其他毒性。

但从官方的管理机构来说，到本世纪 60 年代中期之前，广义上相关的唯一测试生殖的试验是在美国食品和药品管理局（FDA）发表的《化学物安全性评价》的半官方文件中指出的。该文发表于 1949 年，以后再印时做了几次修订。该试验采用啮齿类动物，每组 8 只雄鼠和 16 只雌鼠，三个试验组和一个对照组，在断乳后到 100 天龄期间给予受试物，然后雌雄交配，每只雄鼠交配两窝，共繁殖三代，每一代的第二窝用于交配。观察妊娠率、窝的大小、窝的生长作为评价的参数。反应停事件和此时科学家的关注，研究结果促使官方尽快制定测试方案。1966 年美国 FDA 提出了三段生殖毒性试验指南，特别是阶段 II 主要针对致畸等发育毒性的，这也可作为第一发展阶段达到高潮的标志。

此后世界各国效仿 FDA 制定了药物或其他化学物的测试指南，从方法学角度都比较接近，变化不大。但 80 年代后期美国环境保护局（EPA）提出的可疑发育毒物危险度评价指南，第一次明确提出发育毒性的评价，尽管早就提出发育毒性的四类表现，但实际研究中仍将注意力放在致畸作用上，而忽略其他发育毒性的评价。

1944 年报告了出生前大鼠给予化合物溴化钠导致出生后功能改变的试验结果。这一事件通常作为畸胎学的诞生，因为这是该领域的第一个试验。1974~1975 年英国和日本先后公布了出生行为测试指南，分别要求进行听觉、视觉和行为损害或运动、学习、感觉功能和情感性测试。虽然在指南中要求进行行为功能测试。但至今未提出为大家所公认的有关行为功能异常的测试方案。比较有影响的有 1975 年 Spyker 结合分析了行为形态和功能方面的研究资料后，提出一个较完整的行为测试系统应包括形态和生理学特征；生长和生长速率；特殊反应，如反射和感觉-运动能力；活动性；神经肌肉运动能力；学习能力；情感；动机因素；性发育；与中枢神经系统有关的心理病理行为。1979 年 Buelke-Sam 和 Kimmel 对世界各国采用的行为测试程序进行调查，总结了神经毒理学家和实验心理学家等为达到管理的要求而使用的实验方法。此外，国际上还组织了数次协作研究，对某些试验方法进行验证、评价。目前采用较多的是 1977 年美国出生后评价委员会提出的方案、1985 年提出的精神致畸性测试组合方案和 1985 年提出的国际协作研究方案。另外美国环保局（EPA）1986 年和世界卫生组织（WHO）1984 提出了发育功能毒理学或行为致畸学的评价原则、设计方案。但应指出，尽管行为功能异常的测试经过众多科学家的努力，已取得很大进展，但应当说迄今仍未完善，有待进一步发展。

此外，近二十年来还先后建立了经胎盘致癌试验、经胎盘的遗传毒性试验、雄性或雌性介导的发育毒性试验、发育毒性筛选试验（CK 试验）、毒代动力学研究技术等比较完整的整体动物发育毒性试验系统。这些方法和技术为检测发育毒性、研究作用机理奠定了基础。

## 二、体外试验方法的兴起和发展阶段

70 年代后期由于组织、细胞培养技术的进展，化学致癌和致突变体外测试方法的发展及阶段 II 试验耗时、费力，不能满足化学物增长速度的要求；于是体外测试方法很快兴起；其中可以 New 等建立大鼠着床后全胚胎培养方法，并在其他科学家的共同努力下成为较完善的发育毒性体外测试系统，作为这一阶段兴起的标志，并由此带动了一系列试验方法的出现。经过二十多年的发展，现已有 30 余种不同培养系统作为发育毒性的测试方法，可归为四类：建立的细胞系、原代细胞培养、非哺乳动物胚胎培养和哺乳动物胚胎或原基（器官）的培养。

1. 细胞系和胚胎干细胞：已建立的用于发育毒性测试试验的细胞系主要有人胚间质细胞（HEPM 细胞）、小鼠卵巢肿瘤（MOT）细胞和神经瘤细胞。这类 80 年代建立起来的体外细胞试验方法存在的主要问题是假阳性率太高。1994 年建立的用于胚胎毒性测试的小鼠胚胎干（ES）细胞系为体外筛选胚胎毒性提供了新的途径。该方法以细胞毒性和对分化的效应作为测试终点，从现有研究结果看显示了良好的应用前景。

2. 原代细胞的微团培养：从 80 年代以来，根据化学物是否有抑制集落形成（与细胞分化、迁移、粘附、通讯等有关）从而检测有无致畸作用这一原理，先后建立了鸡、小鼠或大鼠肢芽细胞和中脑细胞微团培养方法。从目前验证结果看，大鼠胚胎肢芽和中脑细胞微团培养可能是这类方法中有前途的方法，可用于潜在致畸物的研究，并被推荐为发育毒性研究可选择的试验。

3. 非哺乳动物胚胎体外培养：目前已广泛用于作为研究发育的模型或生态毒理学监测以及检测化学物潜在致畸性的亚哺乳脊椎动物有水螅、鱼、蛙、蟋蟀、果蝇、蓝水褐虾、粘菌等。其中爪蛙胚胎致畸试验（FETAX）由于成本低、快速，易于饲养，验证结果显示预测价值相对较高，因而被推荐为发育毒性研究可选择的试验。另外鸟类胚胎也被广泛用于作为发育生物学的模型，但很少用于胚胎毒性的测试。由 Jelink 等建立的鸡胚胎毒性筛选试验（CHEST）可测试生长迟缓、畸形和死亡等终点，可观察剂量-反应和阶段-反应关系、畸形谱，并已测试了 130 余种化合物，效果较好。但该试验目前仅在 Jelink 自己的试验室开展，另外该试验不能区别一般毒性和特异的发育效应。

4. 哺乳动物全胚胎培养：已先后建立了从受精卵到器官形成期结束，不同阶段的体外哺乳动物胚胎的培养方法。其中小鼠的着床前阶段培养效果较好，大鼠还未获取理想的培养效果。而着床后全胚胎培养在小鼠、大鼠和兔均已获得成功，并已用于致畸等发育毒性的研究。全胚胎培养方法在机理方面显示了独特的作用。目前这类方法已被推荐为发育毒性的可选择方法。

### 三、分子生物学技术应用发展阶段

从 80 年代和 90 年代以来，分子生物学取得突飞猛进的发展，这为发育毒理学的研究和发展奠定了良好的基础，提供了有力的手段。分子发育毒理学正在形成。正如 Daston 指出，发育毒理学在阐明化学物诱发的出生缺陷的本质正在经历一场革命。这场革命的核心是方法学上的可利用性使得在细胞和分子水平上研究效应成为可能，而细胞和分子水平的改变是导致发育毒性发生的关键事件。

1. 原位杂交技术：胚胎整体原位杂交技术、胚胎组织切片原位杂交技术和染色体原位杂交技术为检测胚胎细胞凋亡、发育相关基因或蛋白产物的表达、基因的定位等提供了重要手段。通过基因表达模式的显示，可为发育毒性发生时基因的时空表达及调控作用提供关键信息。

2. 基因表达代表性差异显示技术：为揭示正常胚胎基因的时空表达，分析发育毒物作用后基因表达的改变提供了可能性。目前已用该技术观察了多种动物不同发育阶段的基因表达情况，发现了一些发育相关基因。

3. 转基因技术：利用转基因技术建立的转基因动物和基因敲除动物模型为研究发育相关基因的调控和功能，建立新的发育毒性检测系统提供了可能。如目前已建立的 LacZ 的转基因动物，利用该小鼠可观察标志酶在不同发育阶段的表达。

#### 4. 反义技术:

与大、小鼠全胚胎培养结合的反义寡核苷酸技术,为揭示器官形成期发育相关基因的功能提供了独特的手段,显示了明显的优越性。

另外,细胞标记技术、蛋白质鉴定技术、免疫组化技术等也在发育毒理上显示了良好的应用前景。

### 第三节 展 望

发育毒理学尽管有了较大的发展,但仍面临着严峻的挑战。首先,导致人和其他生物出生缺陷的大多数病因仍不清楚。第二,每年仍有大量的新化合物进入人类生活、生产中,这些物质有待发育毒性的测试、评价。第三,在已测试评价的化学物中约有 1/3 的化学物(约 1 000 种)至少在一种动物种属中有致畸等发育毒性,而已知的人体致畸化学物不到 30 种。因此,建立从动物到人的外推方法,建立鉴定人体致畸物的简便快速方法,建立快速简便评价化学物发育毒性的试验,建立筛选、鉴定出生缺陷病因学的有效方法等是发育毒理学试验技术和方法面临的课题。作为从事这一领域的工作者来说是任重而道远。但有挑战才有发展,这同样也是给我们提供了巨大的机遇。从发育毒理学研究方法和试验技术角度,展望未来以下几方面可能是发展的重点或预计有较快的发展。

1. 适于发育毒性快速筛检的转基因或基因敲除动物和细胞的建立。

2. 鉴于着床前胚胎暴露环境因素可导致畸形等发育毒性,评价着床前发育毒性的方法将有较快的发展。特别是作为与整体动物发育毒性试验匹配的大鼠着床前胚胎培养技术将是研究的重点之一。

3. 由于全胚胎培养与反义寡核苷酸技术具有其他方法难以达到的优越性,这将是今后揭示发育相关基因功能的重要手段。

4. 差异显示和蛋白质或基因芯片,这将成为筛检发育相关蛋白质或基因的重要手段,也将成为今后的一个研究热点,包括技术热点。

5. 发育毒性遗传易感动物和人群的研究方法和技术,人群中发育毒性生物标志物的研究及快速检测技术。

6. 人体和动物行为功能缺陷的试验方法(包括组合方案)。

(张天宝 李勇)

## 第二章 着床后体外全胚胎培养

是否能用体外整体活胚胎培养方法来揭示哺乳类动物胚胎在子宫内发育的奥秘呢？为此，不少学者穷尽 40 余年的探索，直到 20 世纪 70 年代中后期，随着显微镜下解剖移植技术、体外旋转培养方法和立刻离心血清制备等手段的建立，终于成功地建立着床后体外全胚胎培养（whole embryo culture，下简称 WEC）模型，这一模型的建立是动物实验胚胎学研究中的一项巨大成果。

啮齿类动物 WEC 的起源是在 30 年代由美国的 Nicholas 和 Rudnick 及法国的 Jolly 和 Lieure 提出并进行实验的。其主要结果是在同源血清中培养的原条期大鼠胚胎能发育到 10~12 个体节期，其中约 40% 的胚胎出现节律性心跳和约 10% 的脏层卵黄囊（visceral yolk sac）出现功能性的血液循环。与现在的实验结果相比，他们的试验可以说是失败的，但其重要价值是为后人开拓了一条新的研究途径。

因为失败，Nicholas 等所建方法没有被认可和继续深入研究。直到 60 年代，即 WEC 方法提出 30 年以后，英国剑桥大学的生理学家 New D.A.T 提出胚胎体外静式培养法，即将分离的大鼠或小鼠胚胎移植于含大鼠血清的培养皿中，充入 60%~70% 的  $O_2$  和 3%~5% 的  $CO_2$ ，在 37℃ 的温度条件下培养 36h 后，约 90% 的胚胎出现功能性的血液循环和部分胚胎呈现正常的组织器官形态分化，实验取得一定成功。到 70 年代，New 及其同事对此项培养技术进行了较大改进，并又相继设计出几种其他的 WEC 方法，其中主要的是间歇充气旋转瓶/管培养法和连续充气旋转管培养法。通过体内、体外大鼠培养生长发育和器官形态分化的对比实验研究，结果发现，9.5d 龄大鼠胚胎在体外用上述方法培养 48h 后，其生长发育和形态分化与体内同龄胚胎生长发育和形态分化之间差异无显著性。大鼠胚胎体外培养的成功，使得啮齿类动物胚胎能够在母体环境外生存，这无疑是动物实验胚胎学研究方面的重大突破。基于 WEC 模型的研究对象是正处于器官形成期的胚胎，而此期的胚胎对外源性化学物质极为敏感，因而这一模型引起了毒理/药理学家、畸胎学家和生理学家等的重视和兴趣。从 70 年代末起，大量学者将 WEC 模型引入上述领域并对其方法做了进一步改善和验证，基本共识是：WEC 为体外动态观察胚胎的正常生长发育和探索研究外源性化合物的致畸性、致突变性、胚胎毒性等提供了一种有效的和特殊的研究手段。

到目前为止，各国科学家公认 9.5d 龄大鼠胚胎和 8.5d 龄小鼠胚胎是最适于体外培养的实验对象，并把 New 建立的方法定为 WEC 的基本模型。WEC 模型尽管在胚胎移植、镜下显微解剖、混合供气和培养过程中的某些细节上有所差异，但在总体实验流程上各实验室之间基本类同。本章将介绍 WEC 模型的具体内容。

### 第一节 WEC 实验室基本要求

基于被体外培养的原条期胚胎无免疫力和抗感染能力，因此有效防止胚胎被污染是决定 WEC 实验成功与否的必须条件。即使使用设备良好的实验室，如果操作者的实验不规范和粗心大意等，也会造成污染而导致实验失败。鉴此，要求在所有操作流程中都要尽全力保证



无污染，各项工作都必须做到有条不紊和完全可靠。

## 一、WEC 前准备

WEC 实验前要根据实验目的拟定好计划和有关操作步骤。准备好各种器材和试剂，清点后准确无误地将其按操作者习惯放置于操作场所（无菌培养室或超净工作台）内，然后开始消毒。这就可以避免开始实验后，因缺少某一用品而往返拿取所造成的污染机会。此外，需新鲜配制的试剂浓度具体数据也要事先算好，以免届时因计算延误时间而造成不必要的忙乱。

## 二、常规清洗消毒和无菌操作

为清除 WEC 用具的杂质和消灭细菌，对其进行严格的清洗和消毒是十分必要的，以杜绝任何影响胚胎生长发育的可能性。

### （一）清洗

1. 玻璃器皿的清洗：一般包括浸泡（先用清水浸泡，使用前再用 5% 的稀盐酸浸泡。注意所有使用过的器皿不得待干后再除污，须用后立即泡入水中）→刷洗（用软毛刷和优质洗涤剂洗去器皿上的杂质）→酸泡（即泡在由重铬酸钾、浓硫酸和水按一定比例组成的清洁液里，以通过其强氧化作用而除掉极微量的杂质）→冲洗（就是用水充分冲洗）（表 2-1-1）。

表 2-1-1 常用的清洁液

| 种类  | 重铬酸钾  | 浓硫酸      | 水        |
|-----|-------|----------|----------|
| 强液  | 63 g  | 1 000 ml | 200 ml   |
| 次强液 | 120 g | 200 ml   | 1 000 ml |
| 弱液  | 100 g | 100 ml   | 1 000 ml |

冲洗必须严格按程序进行。一般冲洗过程是：自来水浸泡过夜（新培养瓶用 5% 稀盐酸）→洗涤剂（或毛刷）刷洗→自来水冲洗、倒立、晾干→培养专用去污剂浸泡过夜→自来水冲洗干净→蒸馏水漂洗 3 次→煮沸（至少 1h）→三蒸水清洗 3~5 次→分装入大饭盒→高压消毒→备用。

2. 塑料器皿的清洗：其过程是：自来水浸泡→冲洗→2% 氢氧化钠溶液浸泡 24h→冲洗→5% 稀盐酸浸泡 0.5h 左右→自来水冲洗→蒸馏水漂洗 3~4 次，晾干备用。

3. 滤器的清洗：玻璃滤器的清洗，基本上和玻璃器皿清洗相同，一般采用抽气过滤方法：注入清水抽气过滤 3~5 次→注入干净铬硫酸清洁液抽气过滤→清水抽气过滤 8~10 次→蒸馏水抽气过滤 3~4 次。

滤器清洗法是在用完以后将石棉板、金属部分充分刷洗干净，最后用蒸馏水漂洗 3~4 次。

4. 手术器械的清洗：先用汽油纱布擦去涂在上面的防锈油，再用自来水洗净，然后用酒精棉球擦净，晾干备用。

### （二）消毒

消毒的目的是杜绝微生物污染来源。消毒的方法，一般分为化学和物理两类。化学消毒有消毒剂、抗生素等。物理消毒有紫外线、湿热、干热、离心沉淀和过滤等方法。

1. 紫外线：在紫外灯有效消毒距离内，照射 30min 就可达到灭菌效果。但照射不到的部