



毒理学新技术与发展趋势

发布日期: 2005-01-08 来源: Internet 阅读: 269

作者: 吴浩 袁伯俊

毒理学是一门研究化学物质对生物体的毒性反应、严重程度、发生频率和毒性作用机制的科学,也是对毒性作用进行定性和定量评价的科学。毒理学与药理学密切相关,目前已发展成为具有一定基础理论和实验手段的独立学科,并逐渐形成了一些新的毒理学分支。本文就新技术在分子毒理学中的应用及毒理学的一些发展趋势作一简述。

1 基因引入技术在毒理学中的应用


分子毒理学研究是采用分子生物学技术和方法来研究毒理学问题。如体外采用细胞培养等检测基因毒性,整体动物试验采用转基因动物模型,这对于阐明外源性化学物的毒性及其机制均有重要意义。

基因引入技术是把一段DNA(可以是一个完整的基因,也可以是一个基因片段)引入到细胞或生物体内。引入的DNA可以改变毒物的作用强度,或改变毒物作用方式。因此,可以通过毒物作用程度或方式的改变来判断引入的DNA所起的毒性作用[1]。

1.1 在致突变检测中的应用[1] 基因毒物是指能损害遗传物质DNA的化学物,大多为致突变剂。常规的Ame's试验是由细菌介导的检测基因毒物的方法。但这种方法也有一定的局限性,有时可出现假阳性结果。如谷胱甘肽和半胱氨酸均为抗癌剂,但在Ame's试验中却显示较强的致突变能力。此外,细菌和动物细胞在其生物学方面有很大差异,因此体外动物细胞实验较细菌更能反映毒物在机体内的作用。有两类细胞常用于基因毒物的检测,一类为原代细胞,另一类为传代细胞。有多种指标用于检测化学物的基因毒性,如核苷酸同位素标记法,若一种化学物能损害DNA,细胞在用该化学物处理后,对损害的DNA要进行修复,修复过程需要核苷酸,如果在培养基中加入同位素标记的核苷酸,则修复的DNA即被同位素标记,在一定情况下,损害的DNA越多,修复的就越多,细胞DNA含的同位素就越多。因此,通过检测DNA中同位素的含量来决定该化学物的基因毒性。另一种判断方法是根据基因毒物能改变细胞的代谢。如正常的V79细胞具有次黄嘌呤磷酸转移酶,这种酶是正常替代途径中合成嘌呤核苷酸的必需酶。如果培养基中有嘌呤的同系物(如8-偶氮鸟嘌呤),这种酶能将其同系物转化成相应的嘌呤核苷酸而合成DNA,但嘌呤同系物没有正常嘌呤功能,因此会导致细胞死亡。相反,如果一种化学物能损害DNA而使次黄嘌呤磷酸转移酶的基因发生损害而不能合成正常的酶,其受损的细胞反而存活下来。存活的细胞越多,在一定情况下说明该化学物的致突变能力越强。

某些化学物本身并没有毒性,但其代谢物显示出较强的毒性作用。对于这些化学物,上述方法不能检测出它们的毒性。为了克服这一缺点,可在细胞或细菌培养液中加入肝细胞抽提液以帮助代谢毒物。有的实验室还用少量原代细胞与被检的传代细胞混合培养,由引入的原代细胞提供代谢酶。如硝基二甲基胺,用常规的细菌检测系统显示不出任何突变作用,但在细菌培养液中加入肝细胞抽提液后,显示出很强的基因毒性。这些实验也存在许多问题,如有些代谢物的半衰期很短,来不及进入检测细胞与其DNA作用就失活了,肝脏抽提液或原代细胞代谢酶活性随时间下降得很快;肝脏抽提液或原代细胞含多种酶,即使能代谢毒物并显示出毒性,也不知道是哪一种酶起主导作用。很显然,建立一种细胞株,能合成某种单一的酶,对研究毒物的毒性作用很重要。利用分子生物学技术,把转录某种代谢酶的DNA连接,再接到基因载体上(多为质粒或病毒),这段具有调控能力的DNA,能与体外培养细胞的转录因子作用,把含有编码某种代谢酶的DNA的基因载体引入到体外培养细胞,该细胞就能表达这种特异的酶。这方面较突出的例子是细胞多功能性单胺氧化酶(P450)。体外建立能表达P450的细胞株有两类,一类是能长期稳定表达的细胞株,一类是能短期表达的细胞株。人的多种P450,如1A1, 2A6, 2E1, 3A4等,已成功引入人的淋巴样细胞株、鼠的胎盘细胞株、苍鼠肝癌细胞株等,这些细胞株由于能表达毒物代谢酶,对需要代谢后才有毒性的化学物,其检测敏感度提高许多倍。如表达2A6的细胞比不表达2A6的同样细胞株,在检测硝基二甲基胺的毒性方面要敏感500倍;比表达2E1的细胞也要敏感大约500倍。说明硝基二甲基胺要代谢以后才能显示毒性,也说明2A6是能将硝基二甲基胺转化为毒性代谢物的代谢酶,而2E1则不是。


1.2 转基因动物在毒理学中的应用 转基因动物是在其基因组中含有外来遗传物质的动



信息搜索


搜索内容:

填写内容:



热点推荐

- ⇨ 云南新药创新之基
- ⇨ 中药藜芦首次被证...
- ⇨ 我国民族药发展现...
- ⇨ 中草药的开发利用...
- ⇨ 三大症结影响中药...
- ⇨ 我国启动药用植物...
- ⇨ 国家公布首批中药...
- ⇨ 天然药物引发资本...
- ⇨ 青蒿素产业新突破
- ⇨ 专家为中药支招:...



阅读排行

- ⇨ 卵磷脂的功效
- ⇨ 云南中药资源...
- ⇨ 青蒿素产业新...
- ⇨ 药用植物重楼...
- ⇨ 云南天然药物...
- ⇨ 专家为中药支...
- ⇨ 国家公布首批...
- ⇨ 天然药物引发...
- ⇨ 云南成为我国...
- ⇨ 中泰合作抗艾...

物,它被广泛应用于科学研究的各个方面。由于转基因动物集整体、细胞和分子水平于一体,更能体现生命整体研究的效果,因此成为毒理学研究的热点之一 [2]。

1.2.1 一般毒性研究模型 C-fos-LacZ转基因小鼠用于神经毒性的研究。金属硫蛋白(MT)基因的转基因和基因删除小鼠用于金属和某些非金属的研究。如用MT转基因小鼠对镉等的抗性增加,而MT的基因删除小鼠对镉、银、汞、顺铂和四氯化碳的毒性敏感性增强。

1.2.2 致突变检测模型 转基因动物为解决遗传毒性研究中长期存在的一些问题提供了可能性。如体外试验和体内整体动物的定性、定量外推,整体动物基因突变需消耗大量动物和时间,如确定靶器官以及对诱发的遗传改变做精细分析等。自Gosen等1989年建立了第一个转基因突变检测模型以来,已有十多种模型。

1.2.3 致癌检测模型及其在致癌物质作用机制研究中的应用 转基因动物为快速检测致癌物、促癌物和研究化学致癌的机制提供了新的重要途径。目前已建立的检测模型或研究模型

有:①过量表达癌基因的转基因动物模型 如TG, AC小鼠, HK-fos转基因小鼠, ras-H2转基因小鼠,携带激活的H-ras原癌基因小鼠 [3]等。这些转基因动物对化学致癌剂的敏感性提高了许多倍。如带有激活Pim-1肿瘤基因的转基因动物,对乙基硝基脲的致癌作用,较相应的非转基因动物,其敏感性提高了25倍;②基因删除动物致癌检测模型 用同源重组的方法,将一段DNA整合到抗肿瘤基因,使该抗肿瘤基因不能表达具有正常功能的蛋白质,用这种方法培养的动物称基因删除动物。在这方面研究得最多的是肿瘤抑制基因P53。基因删除动物P53(+/-)和正常动物P53(+/+)一样,发育和生长均无异常,但用致癌剂(如二硝基二甲胺)处理后, P53(+/-)基因删除动物的平均寿命为29周,而P53(+/+)的平均寿命为42周,其肿瘤的发生与分布也有很大的差异 [1]。其他如芳香烃受体(AHR)小鼠、过氧化物酶体增殖剂诱导的受体 α (PPAR α)小鼠等

[2];③转基因动物用于生殖毒性研究 ZP3(编码)透明带硫酸糖蛋白基因删除小鼠、雌激素受体基因或孕酮受体基因删除小鼠、DNA甲基转移酶基因删除小鼠等。

1.2.4 用于特定组织毒性研究的转基因动物 典型的例子是用含乳糖操纵子的噬菌体培育一种转基因动物,具有乳糖操纵子的噬菌体在感染某些细菌后,菌落为蓝色。如果含有乳糖操纵子的噬菌体在体内由于受化学物的处理而受到损害,不能抄录正常的半乳糖苷水解酶,这种噬菌体在体外装配后,其感染细菌的菌落为无色。因此根据蓝色和无色菌落的多少,来判断某些化学物基因毒性的强弱。此外,用质粒作为载体也获成功,从而提高了检测的敏感性,更重要的是,化学物处理后的动物,基因载体可以从不同组织细胞分离出来,因此这种动物能显示化学物的组织细胞特异毒理学作用 [1]。

2 毒理学预测范畴的新进展

毒理学和流行病学,特别是与分子流行病学相结合应用于危险度的评价。经典方法中对安全系数作了许多附加修正,以提高种属之内与之间推导预测的精确性,但其后果使毒理学家面临来自各种行政规定而缺乏科学依据的一连串修正系数。近年来已提出了新的方法,以尽可能使实际数据而不是人为的假设来确定安全系数。如对致癌物质的评定将使用一种定量的模型,它所重视的是从高剂量到低剂量的推导,而不是从动物到人的种属间的推导。目前最常见的是线性多级LMS模型,它是将最大耐受量(MTD)的可信限上端延伸到原点,利用该直线的低剂量区域来估计外源性化学物的量效关系曲线或其毒性强度。这种模型使用一个对应于小生物学单位:即分子的剂量值,而不是将零作为剂量轴的原点 [4]。

外源性化学物安全性评价的策略新进展还包括用毒性等效因子或问答式的方法,构效关系的定量分析,以及药效和药代动力学模型来研究复杂化学物 [5]。

3 21世纪毒理学的发展趋势

3.1 传统和现代毒理学研究方法相结合将推动毒理学的发展过程 过去毒理学研究主要以整体动物试验和人体观察相结合,在相当一段时期内这仍然是重要和必要的手段。随着分子生物学的理论和方法应用于毒理学的研究,将使外源性化学物的毒性评价发展到体外细胞、分子水平的毒性测试与人体志愿者试验相结合的新模式,而传统以动物为基础的毒理学研究将减少。某些复杂的整体实验将逐步为体外试验或构效关系数学模式所代替。目前用于有害因素的毒性试验系统将被基因工程的动物和细胞所代替;传统的发病率和死亡率终点将被生化指标所替代;现在需要数月给药和评价的毒性研究将在几小时内完成。转基因动物对外源性化学物的毒性反应将与人体极为一致,例如取分裂中的人组织培养细胞到体外减数分裂,现行毒性试验的解释和外推方式将改变 [2]。

3.2 大量新技术和新方法的应用将使毒理学研究水平更加深入 上面提到的一些体外细胞检测和转基因动物或基因删除动物模型应用于毒理学研究外,其他新技术如系列分析法、DNA芯片或DNA微点阵 [6]等可同时测定数千个基因的表达,用于观察基因的上调和下调;基因诱捕、代表性差异分析等将为研究化学物致畸的分子机制提供可能;应用基因分布图能区别特异性或非特异性的细胞损伤;应用络合物形成作用介导的PCR研究DNA损伤和核苷酸水平上的修复;生物标记物在毒理学中的应用显得越来越重要,如特异的DNA和蛋白质加合物用于有效暴露的生物标记,用NMR分析尿中的代谢产物,可以确定作为毒性反应生物标记物的代谢变化模式 [7]。又如外周血(血小板、白细胞、红细胞)中的生化标记物可用于测定外源性化学物对神经系统损伤的替代标志物 [8]。

在毒理学的研究中,重要的问题是如何把从动物所获得的资料用于人,把体外资料用于体内,把复杂的整体系统化简单的并能人为控制的系统,以及如何提高检测的敏感性等。转基因技术为解决这些问题提供了崭新的手段。在代谢途径上,通过基因转移能人为控制某一化学物的代谢;在整体水平上,可以人为控制某一基因的表达水平,从而阐明该基因在化学物致毒过程中的作用。可以预言,各种不同的转基因动物或基因删除动物的建立,将对阐明化学物的毒性作用机制,起到重大的作用。

3.3 采用多种方法结合起来评价化学物的毒性将是一个重要趋势 过去20多年应用常规的毒理学方法研究外源性化学物,对于大多数化学物是否获得足够的毒理学信息值得怀疑。考虑到化学物质的暴露对人类健康的影响,这一问题就显得更为突出。由于毒理学试验要消耗大量动物,因此在毒理学研究中尽量减少动物用量是每一个负责任的毒理学家应该考虑的问题。显然,如果想对如此众多的外源性化学物有一个合理的改变,就应该建立新的、可供选择的、耗费动物少、试验周期较短、花费较少的毒理学研究方法。这些方法应该根据以下标准来衡量:①动物用量减少;②试验周期缩短;③研究化学物在环境中的实际浓度;④利用统计或数学模型;⑤预先进行有效的实验设计;⑥发展管理毒理学 [9]等。例如,制药工业将采用啮齿类动物(主要是大鼠)的微核试验与2~4周的毒代动力学研究结合起来的方法来评价药物 [10]。

3.4 毒理学分支学科形成发展迅速,“二极”分化现象更为突出 近30年来毒理学由于发展迅

速及与相关学科的交叉而形成了许多分支。如根据工作任务可分为临床毒理学、环境毒理学、工业毒理学、管理毒理学、生态毒理学与法医毒理学等；根据研究手段与终点不同可分为免疫毒理学、分子毒理学、膜毒理学、遗传毒理学、分析毒理学等；根据研究对象可分为昆虫毒理学、兽医毒理学、人体毒理学与植物毒理学；根据不同外源性化学物可分为金属毒理学、农药毒理学、食品毒理学、放射毒理学、药物毒理学与燃烧毒理学；根据研究工作性质可分为描述毒理学(指常规毒性试验和安全评价)、机理毒理学和管理毒理学等。近年来还出现更多的毒理学分支,如比较毒理学、地理毒理学、急症毒理学等。可以预见,下世纪还将出现一些新的分支[11]。

此外,毒理学分化将更为明显。一方面毒理学的软件部分——管理毒理学仍将是毒理学的研究热点之一,这将从宏观上为化学毒物的管理提供科学依据;另一方面,研究水平越来越精细,从细胞、分子和基因水平研究毒理学问题将是普通的科学工作。上述二方面既分化,又相互渗透和结合,使毒理学的软、硬件结合更为突出[11]。

总之,毒理学与人类日常生活和生产劳动关系日益密切,如环境污染、生态环境的恶化、药物的不良反应、食品的安全性、兽药及农药的危害,以及作业环境的有毒物质是世界范围内的严重问题。可以预见,在21世纪毒理学将会获得更大的发展,为人类作出更大的贡献。虽然近年来细胞、分子水平的研究取得了很大的进展,但仅从基因分子水平研究外源性化学物的毒性及其机制是不够的,因为机体还有宏观的一面,必须把微观研究与宏观研究紧密结合起来,也就是将整体试验与体外细胞、分子水平的研究结合起来才能得出正确结果。

【版权所有】云南省药物研究所

ICP备案电子证书 备案号:滇ICP备05003804号

电话:(0871)8417776 6226009-6307、6308 传真:0871-8417776

网址:www.yimm.com.cn 电子邮件:yimm2003@etang.com

地址:云南省昆明市西山区高峣

申请连接 本网站连接图标地址:<http://www.yimm.com.cn/logo.gif>