

现代实验技术在中药遗传毒理学研究中的应用

胡建平^{1,2}, 刘春芳¹, 林 娜^{1*}

(1. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700; 2. 江西省中医药研究院, 江西 南昌 330077)

[摘要] 以常用的细菌回复突变试验、微核实验、单细胞凝胶电泳等实验方法以及近年来发展成熟的基因芯片技术和胚胎干细胞技术为代表, 概要论述了现代实验技术的特点及其在中药遗传毒性研究中的应用现状和优势。细胞回复突变试验、微核实验、单细胞凝胶电泳试验等已成为常规的新药毒理评价实验方法, 并广泛应用于中药的毒理研究中。而基因芯片技术和胚胎干细胞技术是近一、二十年发展起来并逐渐成熟的新技术, 具有高精度、高通量和低消耗的特点, 是其它技术所无法比拟的, 尽管目前在中药毒理研究中的应用尚属初步阶段, 但随着中药现代化的不断发展, 其在中药遗传毒性研究中的地位必将日显突出, 发挥越来越重要的作用。

[关键词] 实验技术; 遗传毒性; 中药

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2006)08-0066-05

Application of Modern Technology in Heredity Toxicity of Traditional Chinese Drugs

HU Jian-ping^{1,2}, LIU Chunfang¹, LIN Na¹

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Jiangxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330077, China)

[Abstract] Based on Ames test, micronuclei experiment, single cell gel electrophoresis (SCGE), gene array and embryonic stem cell (ESC) technology, the article summarized the feature of these modern technologies and their application in heredity toxicity of traditional Chinese medicine (TCM). Ames test, micronuclei experiment and SCGE have been used to assess toxicity of new drugs, and widely applied in the research of TCM toxicity. Meanwhile, gene array and ESC technology developed in recent years are incomparable for their high precision, high throughput and low expenditure. Although their application in TCM toxicity is still in initial stage, these modern technologies will become more and more important in the research of heredity toxicity of traditional Chinese drugs.

[Key words] modern technology; heredity toxicity; traditional Chinese drugs

随着现代科学技术的迅猛发展及其在医药研究中的应用, 现代毒理研究已不仅仅局限于简单的整体动物实验, 而是越来越深入到细胞和分子水平, 以期从蛋白质、酶、受体、分子通道及遗传因素等多方面更深层次地了解和分析药物与机体相互作用的机制。因此, 各种先进的实验技术应运而生并应用到

药物的研究开发中来。下面针对部分具有代表性的现代实验技术的特点及其在中药遗传毒性研究领域中的应用现状和优势进行概述。

1 细胞回复突变试验

细胞回复突变试验是以营养缺陷型的突变体菌株为指示生物, 检测基因突变的体外试验。化学药剂对细菌的诱变率与其对动物的致癌性成正比, 超过 95% 的致癌物质对微生物有诱变作用, 而 90% 以上的非致癌物质对微生物没有诱变作用, 这是诱变剂的共性原则之一。因此, 可以通过某待测物质对微生物的诱变能力间接判断其致癌能力。该方法由

[收稿日期] 2005-12-12

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (NO: 30371785)

[通讯作者] 林娜, Tel: (010) 64014411-2869; E-mail: linna888@163.com

美国加利福尼亚大学的 Ames 教授首先发明并完善, 因此又称 Ames 试验。

Ames 试验既可采用沙门氏菌, 也可采用大肠杆菌进行致突变性的检查, 国内主要是利用鼠伤寒沙门氏菌的组氨酸营养缺陷型菌株的回复突变性能来进行的。常用的几株鼠伤寒沙门氏菌命名为: TA1535、TA1537、TA1538、TA98、TA100、TA97 及 TA102 等。通过被检化合物与鼠伤寒沙门氏菌的组氨酸营养缺陷型菌株接触, 如果该化合物具有致突变性, 则可使突变型菌株发生回复突变, 重新成为野生型菌株, 野生型能合成组氨酸, 可在低营养的培养基上生长成肉眼可见的菌落, 而突变型不具备这种能力, 据此来检测受试物的致突变性。

鼠伤寒沙门氏菌诱变性试验, 对化学致癌物来说, 不是决定性的试验。但是, 目前各地资料表明, Ames 试验阳性和致癌之间有十分明显的相关性。该检查方法非常灵敏, 检出率高, 与致癌物的相关性可达 90%, 不仅可以对单一的物质进行检测, 对多种物质的混合作用的检测同样有效。加之接种量大, 受试生物的个体数以千万、亿计, 且方法比较简便、易行, 不需特殊器材, 容易推广。

Ames 试验已被公认为是遗传毒性试验的“基石”, 是致突变试验的首选试验方法, 目前在中药新药遗传毒性研究中也已得到广泛应用。潘漪清等^[1] 为了评价复方胆宁片的遗传毒性, 采用组氨酸缺陷鼠伤寒沙门氏菌 TA97 TA98 TA100 和 TA102 菌株进行了微生物回复突变试验, 结果显示无论加肝微粒体酶 S9 活化系统与否, 所有测试剂量的胆宁片均无致突变作用。刘洋等^[2] 进行了合成冰片的鼠伤寒沙门氏菌诱变性试验, 以检测其致突变作用, 发现每皿 0.4~250 μ g 浓度的合成冰片无诱发多种伤寒沙门氏菌株回变菌落数增加的作用, 提示了冰片及含冰片制剂可能具有临床应用的安全性。梁坚等^[3] 也应用 Ames 试验研究百草胶囊的毒性, 结果显示百草胶囊对所测试的突变型微生物菌株无直接和间接的诱变作用, 为该药的合理安全应用提供了科学依据。

Ames 试验的标准化操作程序几经修订, 已发展为 Ames(II) 试验。新的 Ames(II) 试验不需要 DNA 序列分析技术和杂交分析技术便可鉴定基因突变类型, 且所获得的信息量比旧的 Ames 多^[4], 是一种有效(相对快速)、经济、易于掌握和推广的试验方法。

2 微核试验

通过观察细胞中微核的形成来检测遗传毒物的方法, 称为微核试验。微核是在细胞的有丝分裂后期染色体有规律地进入子细胞形成细胞核时, 仍然留在细胞质中的染色单体或染色体的无着丝粒断片或环。它在末期以后, 单独形成一个或几个规则的次核, 被包含在子细胞的胞质内而形成, 由于比核小得多, 故称微核。微核的形成是细胞受遗传毒物作用后的一种遗传学终点, 因此, 微核试验在对外来化合物遗传毒性检测方面, 得到了广泛应用。目前常用作微核试验的细胞来源主要有鼠骨髓、外周血红细胞和肝细胞, 人外周血淋巴细胞、口腔粘膜细胞和上皮脱落细胞等。

微核试验最大的优点是经济、简单、快速, 无需更多的专业知识就可得到体内相关代谢效应的信息。而国外大量对比试验研究的结果, 较一致的看法是其敏感性、特异性和准确性方面, 与经典的染色体畸变分析方法基本相当^[5]。目前, 微核试验已成为许多实验室的诱变剂预筛选试验, 许多国家和国际组织将其规定为新药、食品添加剂、农药、化妆品等毒理安全性评价的必做试验。鉴于各实验室操作方法不同、指示细胞各异, 没有统一实验标准的实际情况, Fenech 倡议“人类微核计划”, 通过收集世界各实验室的试验数据及方法, 来建立公共数据库。这样, 既可以通过比较微核自发率来评价年龄、性别、生活习惯、种族等因素的影响, 也可以比较不同试验数据及方法的差异, 明确微核试验应用范围和局限性。

以上诸多优点, 使微核试验在中药的遗传毒理学研究中的应用日益广泛。王小红等^[6] 采用微核试验探讨黄芩的致突变性, 结果发现黄芩对母鼠和胎鼠细胞均没有致突变作用, 提示黄芩作为一种安胎药在致突变作用方面是安全的。为了检测黄芪水提取物中所含的微量铅是否具有致突变作用, 谷鸣等^[7] 以 30g/kg 的黄芪水提取物(含铅量 2.71 μ g/g) 灌服小鼠, 24h 后处死动物并取双侧股骨, 进行骨髓嗜多染红细胞微核计数, 结果表明该剂量的黄芪水提取物无致突变作用, 为其临床安全用药提供了科学依据。刘冰等^[8] 也应用活体小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验观察了五加皮、茯苓、猪苓和山慈菇 4 味抗肿瘤中药的遗传毒性, 结果表明在一定剂量下, 五加皮、茯苓、猪苓对体细胞和生殖细胞均无潜在的致突变性,

其中五加皮尚可以有效抑制自发的微核和精子畸形。而山慈菇虽属抗癌中药,本身却可诱发体细胞的遗传损伤,提示在应用山慈菇治疗疾病的同时,不应忽视其潜在的致突变作用。在探讨抗癌药物南方大斑蝥用药的安全性研究中,周晖^[9]发现高、中剂量的斑蝥液能使小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率显著增加,且呈剂量依赖性,提示斑蝥对体细胞有一定的遗传毒性。因此,高剂量、长时间使用斑蝥对人体存在的潜在诱变性应予重视。

3 单细胞凝胶电泳试验

单细胞凝胶电泳技术(single cell gel electrophoresis, SCGE)又称彗星试验,是由 Ostling 和 Johanson 建立、并经 Singh 等改进而于 1988 年提出的一种检测 DNA 损伤的技术^[10]。其原理是:包埋在琼脂糖凝胶中的细胞经裂解与解旋, DNA 断裂的碎片进入凝胶中,带负电荷的 DNA 断片在电场作用下向阳极迁移形成拖尾,未损伤的 DNA 部分保持球形,两者共同形成“彗星”图像,通过对其“尾”的测量以评价 DNA 的损伤程度。

SCGE 试验检测单细胞水平 DNA 损伤,无需放射性示踪,无需要求细胞处于生长状态,适用于任何可制成单细胞悬液的真核细胞,且样品用量少,试验周期短,具有简便、快速、敏感性高等优点^[11]。迄今可应用于人类遗传毒性检测的细胞遗传学方法中, SCGE 试验所需细胞量最少, 10 μ L 血的细胞足够完成试验^[12]。因此,该技术已成为一种评定 DNA 损伤的标准方法,广泛应用于遗传毒性试验、人类生物检测和分子流行病学、生态毒理学以及 DNA 损伤修复的基础研究,并在精子质量检测方面尤其优势。众所周知,精子 DNA 的完整性对于精确传递遗传物质至关重要,由于精子 DNA 结构的特殊性使得它对于链断裂的修复能力很差,而不育男性的精子在体外比生育男性的更易产生 DNA 损伤,因此用 SCGE 试验检测精子 DNA 链断裂可评价精子的质量和损伤。

然而,由于组织细胞分离技术的限制,目前仍以体外培养细胞及体内淋巴细胞研究较为广泛,其它组织细胞应用较少,特别是以生殖细胞为靶细胞的报道则更少。此外,由于各实验室的操作方法差异极大,包括溶解液、电泳液的配方,溶解时间、电泳参数、DNA 结合荧光染料的选择均尚未标准化,评价各实验室结果也没有统一的标准,因此 SCGE 有待于进一步的改进和完善。

4 基因芯片技术

基因芯片又称 DNA 芯片或 DNA 微阵列,利用 DNA 分子可以变性、杂交的特性,通过 DNA 芯片上固定的探针或样品 DNA 与游离的样品 DNA 或探针杂交来推断未知的靶分子,杂交发生与否可采用荧光标记技术检测。

基因芯片技术是结合了计算机科学、物理学、数学以及核技术和聚合酶链式反应技术等多种学科和技术而发展起来的新的基因分析方法,由人类基因组计划实施带动分子生物学进步而来^[13]。具有高通量、集成化和自动化的特点,可用于 DNA 测序、转录情况分析、基因诊断与基因药物分析设计、突变及多态性检测遗传毒性等方面的研究。

在毒理学的研究中,基因芯片技术的应用目前尚属于初级阶段。美国环境卫生科学研究所的科学家开发了一种革命性的工具——毒理芯片,是从基因组水平上研究药物与基因表达的相互影响,可在分子水平上评价药物的毒性状况^[14]。毒理芯片的工作原理是根据 cDNA 微阵列可以测定基因表达,反过来特定的基因表达就可以作为被测试样品毒性信息的标记物。通过构建大量模型化合物的毒理效应数据库,分析大量某类化学物质,揭示遭受特定暴露时开放或关闭的基因模式^[15]。因此,只要建立毒物标记库及相应的基因表达数据库,将未知药物所引起的基因表达与库中的数据相对比,利用毒理芯片技术就能获得未知药物的毒理作用机制。

虽然基因芯片技术具有传统毒理学研究方法无可比拟的优势:早期、准确、快速高效、高通量、低消耗等,但由于发展时间相对较短,目前还不能完全替代传统的动物实验,尚存在一定局限性。比如,利用基因芯片进行遗传毒理学研究,必须要有遗传背景清楚的靶基因;毒理芯片技术仅能用于检测在 mRNA 水平上基因的变化,而对通过改变蛋白质等大分子的结构或作用途径而引起毒性的部分药物,则非其所宜;对于多机制作用药物的分析,利用基因表达图谱很难描绘出药物最初的毒性作用。因此,在进一步完善基因芯片技术、更好地应用于毒理研究的同时,尚需与其它技术联合应用,互取所长。

5 胚胎干细胞实验

胚胎干细胞是由哺乳动物胚胎期胚胎的内层细胞团分离出来的一种多能干细胞^[16,17]。Evans 和 Martin 等^[18]于 1981 年首次从鼠胚胎中获得胚胎干

细胞,并将该研究成果发表于美国《science》杂志上,引起生命科学界的轰动和研究热潮。人类胚胎干细胞则于 1998 年由 Thomson 等首次分离成功^[19],此后陆续进行研究^[20-23]。由于胚胎干细胞属于全能干细胞,在适宜条件下,具有分化为几乎机体全部组织细胞的能力,并可进一步形成机体的组织和器官,比成体干细胞的可塑性更强,因此在药理、药效、毒理等方面具有广泛、良好的应用价值和前景。目前,胚胎干细胞已被确认为是体外发育毒理学研究的可靠供试源^[24-26]。

胚胎干细胞试验借助胚胎干细胞系检测化学物的胚胎毒性,是目前唯一一个利用细胞系非怀孕动物、并可替代检测发育毒性哺乳动物试验的体外试验。胚胎干细胞首次运用于药理、毒理的研究是用鼠胚胎干细胞衍生的心肌症模型来检测心血管药物的变时性活性^[26],现在则更多地用来检测受试物的胚胎毒性和致畸性^[24,28,29]。

相对于体内实验,采用胚胎干细胞来评价受试物的胚胎毒性有着不可比拟的优势。主要表现在:(1)更准确地预测细胞毒性^[28]。利用胚胎干细胞建立发育毒物体外预测模型,可评价化学物的潜在胚胎毒性和致畸性;利用胚胎干细胞着床前的细胞特性及细胞毒性、增殖和分化的多终点评价,可明显提高胚胎干细胞测试模型筛选的有效性;(2)可较好地替代哺乳动物实验,定性、定量地反映毒物对细胞的生长、分化和生物学行为的影响,大大减少了毒物筛选的周期和经费,具有实验时间短、高精度、高通量检测和评价的特点;(3)胚胎干细胞具有类似于肿瘤细胞在体外几乎无限增殖的能力,故细胞来源丰富,即使是处于桑葚胚或内细胞团期为数很少的细胞,经体外培养后也能形成许多胚胎干细胞克隆以满足实验所需;(4)将动物实验资料外推到人一直是毒理学家面临的重大难题,而应用人体细胞进行研究是减少由种属差异所造成的不确定因素的有效途径。

虽然利用胚胎干细胞系检测化学物的毒性有许多优点,但要使该项技术在毒理学研究领域得到更好地运用仍需解决一些技术难题:第一,如何寻找确定干细胞的精确方法以及各种干细胞系的特征性标志物,从而对胚胎干细胞进行有效的分离和纯化。第二,胚胎干细胞极易分化为其它细胞,如何维持干细胞在体外进行扩增的同时不分化以及如何诱导干细胞定向分化是目前亟待解决的关键问题。细胞因

子相互作用能引起细胞一系列复杂的生理生化反应,因而要诱导产生某种特异类型的组织,需要了解各种因子在何时何地开始作用和停止作用。第三,目前在进行胚胎干细胞实验时使用的细胞系都来自于其它种属的细胞系,并不能真正代表正常的人体细胞对药物的反应。如果人类胚胎干细胞在药理学和胚胎毒理学中得到应用,短期内就能对医药行业产生直接的影响,但迄今为止,此类研究尚只局限于鼠胚胎干细胞。

6 展望

中医药是我国传统文化的瑰宝,在几千年的临床实践中积累了大量的经验,卓有成效,而毒理方面的研究相对薄弱。遗传毒性的研究是一个相对微观的研究,中药(尤其是复方)成分复杂,应用传统方法评价中药的遗传毒性十分困难,而借助现代实验技术,从基因表达水平上进行准确、快速、高效的安全性评价,使得我们能从微观角度更好地了解中药遗传毒性的作用靶点、方式及途径。

Ames 实验、微核试验、单细胞凝胶电泳试验以及小鼠精子畸形试验、细胞染色体畸变试验等常用试验技术已在中药遗传毒性研究中得到了较好的应用。基因芯片技术、干细胞试验是近年发展起来的高新技术,其中,基因芯片技术在中药研究领域的应用目前只是在中药鉴定、中药分子作用机制、中药复方的物质基础等方面,干细胞技术则主要局限于中药在干细胞移植技术中的免疫调节作用的研究,而在中药遗传毒性方面的研究尚属空白。基因芯片和干细胞试验等生物技术由于其高通量、高精度、快速以及平行性的特点,已成为生物医学研究领域一项先进的基础技术,它融合了先进的制造、探测和信息处理技术,使信息的获取达到了空前的水平,已在许多领域的研究中显示出独特的优势,具有很大的应用价值。有机利用这些实验技术,取其所长,对中药的现代化研究将有极大的促进作用,具必要性和时代性。

[参考文献]

- [1] 潘漪清,刘雄伟,陈鸿书.胆宁片对大鼠的毒性试验结果[J].上海实验动物科学,1998,18(2):100-102.
- [2] 刘洋,李怡岚,胡利民,等.合成冰片对沙门氏菌的诱变作用观察[J].天津中医药,2003,20(6):61-63.
- [3] 梁坚,赵鹏,王彦武,等.百草胶囊的毒性研究[J].中国基层医药,2004,11(6):674-676.

- [4] Ames BN. An enthusiasm for metabolism[J]. Biol Chem, 2003, 278(7): 4369-4380.
- [5] 曹佳. 微核试验在中国的应用、发展与展望[J]. 遗传, 2003, 25(1): 77-80.
- [6] 王小红, 夏明珠, 龙文, 等. 黄芩的致突变性研究[J]. 新中医, 2000, 32(10): 30-31.
- [7] 谷鸣, 叶晓川, 吴巍, 等. 黄芪水提物中微量铅对小鼠急性毒性和骨髓嗜多染红细胞微核试验的影响[J]. 中国医院药学杂志, 2002, 22(9): 527-528.
- [8] 刘冰, 庞慧民, 武广恒, 等. 几味抗癌中药致突变性研究[J]. 白求恩医科大学学报, 1999, 25(1): 8-10.
- [9] 周晖. 南方大斑蝥煎煮液的体内和体外致突变作用研究[J]. 癌变畸变突变, 2002, 12(4): 221-222.
- [10] Singh NP, Mccov MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. Exp cell Res, 1988, 175(1): 184-191.
- [11] Fairbairn DW, Olive PL, O' Neill KL. The comet assay: a comprehensive review[J]. Mutat Res, 1995, 339(1): 37-59.
- [12] 衡正昌. 单细胞凝胶电泳试验与人群遗传毒性监测[J]. 环境与健康杂志, 2002, 19(3): 167-169.
- [13] Ling H, Yu L, Qi C. Application of DNA chip and nuclear technology to study on molecular mechanism of radiation carcinogenesis[J]. Foreign Medical Science radio medical and nuclear medicine Fascicle, 2001, 25(2): 78-81.
- [14] Medlin JF. Timely toxicology[J]. Environ Health Perspect, 1999, 107(5): A256-258.
- [15] Khan J, Simon R, Bittner M, et al. Gene expressing profiling of alveolar rhabdomyosarcoma with cDNA microarrays[J]. Cancer Res, 1998, 58(22): 5009-5013.
- [16] Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 78(12): 7634-7638.
- [17] Nagy A, Gocza E, Diaz EM, et al. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse[J]. Development, 1990, 110(3): 815-821.
- [18] Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cell from mouse embryo[J]. Nature, 1981, 292(5819): 154-156.
- [19] Thomson JA, Skovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. Science, 1998, 282(5391): 1145-1147.
- [20] Muller M, Fleischmann BK, Selbert S, et al. Selection of ventricular-like cardiomyocytes from ES cells *in vitro* [J]. FASEB J, 2000, 14(15): 2540-2548.
- [21] Reubinoff BE, Pera MF, Fong CY, et al. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation *in vitro*[J]. Nat Biotechnol, 2000, 18(4): 399-404.
- [22] Rambhatla L, Chiu CP, Kundu P, et al. Generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cells[J]. Cell Transplant, 2003, 12(1): 1-11.
- [23] Xu RH, Chen X, Li DS, et al. BMP4 initiates human embryonic stem cell differentiation to trophoblast[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20(12): 1261-1264.
- [24] Genschow E, Scholz G, Brown N, et al. Development of prediction models for three *in vitro* embryotoxicity tests in an ECVAM validation study[J]. In Vitro Mol Toxicol, 2000, 13(1): 51-66.
- [25] Rohwedel J, Guan K, Hegert C, et al. Embryonic stem cells as an *in vitro* model for mutagenicity, cytotoxicity and embryotoxicity studies: present state and future prospects [J]. Toxicol In Vitro, 2001, 15(6): 741-753.
- [26] Spielmann H, Genschow E, Scholz G, et al. Preliminary results of the ECVAM validation study on three *in vitro* embryotoxicity tests[J]. Altern Lab Anim, 2001, 29(3): 301-303.
- [27] Wobus AM, Wallukat G, Hescheler J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers [J]. Differentiation, 1991, 48(3): 173-182.
- [28] Scholz G, Genschow E, Pohl I, et al. Prevalidation of the embryonic stem cell test EST-A new *in vitro* embryotoxicity test[J]. Toxicol In Vitro, 1999, 13: 675-681.
- [29] Newall DR, Beedles KE. The stem cell test: an *in vitro* assay for teratogenic potential. Results of a blind trial with 25 compounds[J]. Toxcol in Vitro, 1996, 10: 229-240.