

## 在食品安全性毒理学评价中体外细胞短测试验的选择(综述)

冯继农 卫生部食品卫生监督检验所 (100021)

一般认为,人类肿瘤的80%—90%是由环境中的各种化学因素引起的<sup>(1)</sup>。当前直接应用于食品的化学物质如食品添加剂以及间接与食品接触的化学物质如农药及污染物日益增多,人类长期接触这些化学物质后可能引起的毒性及致癌作用已引起广泛的重视。长期以来,鉴定致癌物,特别是最终确定受试物的致癌性,进行安全性评价的依据主要是实验动物的长期致癌试验。这类试验不仅时间长,特别是一般用大鼠终生试验,历时两年多,且耗费大。近年来,随着对癌变机理及致癌与致突变关系的认识不断深入,对受试物的致癌性和致突变性的短期检测试验得到了迅速的发展。利用这些方法不仅可以检测食品成分加入物如添加剂或污染物的致癌性和致突变性,为安全评价提供依据,而且可以应用于食品中抗癌性、抗突变性物质的筛选及其机制的研究。

体外短期试验分别测试不同的遗传学终点,如基因突变, DNA 损伤, 染色体畸变等。所用测试系统有微生物系统, 体外哺乳动物细胞培养等。微生物系统以 Ames 试验为代表, 以细菌为受试对象。这类方法虽被广泛应用, 且与长期动物试验有一定的相关性, 但对化学物质的代谢与哺乳动物, 特别是在人体内的代谢, 有很大的差别。而利用体外哺乳动物细胞进行检测, 虽然是体外的, 但与人体的实际代谢情况比较接近, 这类试验与动物体内试验相比, 具有简单、快速、敏感、重复性强等优点, 目前已越来越广泛地受到重视和利用。现就其

中的几个方法做一简单评介。

### 1 哺乳类细胞基因正向突变试验

测试终点为基因突变。测试系统有中国仓鼠肺细胞系(V79), 中国仓鼠卵巢细胞系(CHO)及小鼠淋巴瘤细胞系L5187Y细胞等三个基因位点的突变。其次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT), 胸苷激酶(TK), Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>ATP酶(OUA)位点<sup>(2)</sup>。其中V79/HGPRT系统较为常用。其基本原理是: 细胞HGPRT基因位点的产物为HGPRT, 该酶是细胞中嘌呤核苷酸生物合成的一条补充途径中的酶。它除了产生酶促次黄嘌呤和鸟嘌呤与磷酸核糖焦磷酸PRPP间的转磷酸核糖作用而生成相应的核苷—5—单磷酸外, 也可以其它嘌呤类如6—巯基嘌呤(MP), 6—巯代鸟嘌呤(TG)及8—氮杂鸟嘌呤(AG)为底物, 生成相应的核苷—5—单磷酸, 后者掺入到细胞DNA中引起细胞死亡。当细胞HGPRT座位突变导致其基因产物发生改变, 细胞就表现出对MP、TG或AG的抗性; 利用此特性可以确认HGPRT座位基因突变。

由于V79、CHO细胞缺乏对前致癌物的代谢活化酶系统, 因此对未知物进行测试时应同时应用一定的活化酶系统。

### 2 程序外DNA合成(UDS)

测试终点为DNA损伤。选用大鼠原代培养肝细胞或叙利亚仓鼠胚胎细胞(SHE)等<sup>(3)</sup>。原理是用受试物处理培养的细胞, 如果受试物可引起DNA损伤并启动修复机制(程

(上接43页)

[2] 翟凤英等编写·基层营养现场工作指南·第一版·北京:人民卫生出版社,1990:64—69。

[3] 赵清占,等·滦源县山区农村221名3岁以下儿童维生素A营养状况调查·医学理论与实践1991;4(1):15—16。

序外 DNA 合成), 在培养液中的  $^3H$ —胸腺嘧啶核苷即可掺入 DNA, 利用放射自显影法计数细胞核内显影颗粒或用液闪法测定掺入 DNA 的放射活性。目前一般多主张用放射自显影的方法来测 UDS, 因为这种方法可以排除处于 S 期细胞的干扰。

### 3 姐妹染色单体交换 (SCE) 试验

测试终点为 DNA 损伤。SCE 是染色体同源座位上 DNA 复制产物的相互交换, 可能与 DNA 的断裂和重接有关。尽管 SCE 的诱导机理还不十分清楚, 但一般认为这个方法对评价致癌物和致突变物对细胞的作用是很敏感的<sup>[4,5]</sup>。选用 V79, CHO, SHE 等。

### 4 染色体畸变 (CA)

染色体畸变是观察在受试物作用下细胞染色体发生结构或数目的改变。一般选用淋巴细胞, CHO, V79 等。SCE 与 CA 试验在制片和结果的判定上存在一定困难, 操作者需有熟练的技术。

### 5 微核试验

微核是细胞遗传物质受到各种理化因素损伤后染色体或染色单体断裂而形成的无着丝粒断片。自 1975 年微核技术诞生以来, 一直作为监测细胞遗传损伤的重要指标。但由于微核只在已分裂的细胞中才能产生, 而通常的方法无法区分未分裂的细胞和已分裂的细胞, 所以其敏感性较低。1985 年, Fenech 利用人外周血淋巴细胞建立了细胞松弛素阻断微核检测方法<sup>[6]</sup>。细胞松弛素 B 是一种非特异性细胞周期阻断剂, 其作用与秋水仙素相似, 所不同的是细胞松弛素 B 只选择性破坏细胞骨架, 阻滞微丝组成的缢缩环的形成, 使胞浆不分裂, 但又不影响细胞核的有丝分裂过程, 其结果便产生双核及多核细胞<sup>[7,8]</sup>。由于方便、可靠地在形态学上区分了已分裂的和未分裂的细胞, 在微核检测上取得了突破性进展。这一方法提高微核检测敏感性主要原因是(1)实验中计数的细胞全部是经一个分裂后的细胞, 因受细胞松弛素 B 作用而呈双核。

(2)在此法中计数 1000 个双核细胞相当于传统方法计数约 2000 个细胞, 增加了最终统计结果的精确性<sup>[9]</sup>。

1987 年, Exersan 和 Wakatu 分别将这一方法应用于小鼠及中国仓鼠纤维母细胞系<sup>[10,11]</sup>, 均证实它是一种敏感性较高的微核检法。自 1988 年起, 国内一些实验室陆续报告了这方面的工作, 选用的细胞有淋巴细胞, 上皮细胞等<sup>[12-14]</sup>。

### 6 细胞转化试验

哺乳类细胞转化试验是快速检测致癌物的重要手段。与测定基因突变引起表型改变的其它试验相比, 体外细胞转化更直接与致癌过程有关。体外细胞转化是一个多阶段的过程, 具有体内致癌过程的某些特点。细胞转化最终产生在形态学、生长方式和生物化学上发生改变的细胞克隆<sup>[15]</sup>。判断细胞转化, 除根据形态学改变之外, 还有两个重要指标, 即转化细胞失去锚定依赖性生长特性, 可在软琼脂中形成克隆; 以及转化细胞接种于无胸腺小鼠或免疫抑制动物后一般可长出肿瘤。

体外细胞转化常用的系统有 (1) SHE 体外转化系统<sup>[16]</sup>, 该系统具有代谢活化能力; 自发转化率极低; 转化所需时间短, 一般为 10—14 天; 与动物致癌试验之间的符合率高达 90% 以上<sup>[17]</sup>。缺点是需要定期分离细胞。(2) C3H10T<sup>1/2</sup> 及 BALB/C3T3 系统<sup>[18,19]</sup>, 此两种细胞系主要优缺点相似, 具有代谢芳烃类化合物的酸活性, 自发转化率低, 试验易重复和比较, 转化灶易识别, 但转化时间较长, C3H10T<sup>1/2</sup> 为 6 周, BALB/C3T3 为 4 周。(3) 上皮细胞转化系统。迄今, 体外转化试验所用的靶细胞大部分是成纤维细胞, 而人类肿瘤 85% 起源于上皮组织<sup>[20]</sup>, 因此建立上皮细胞转化系统具有更为重要的意义。上皮细胞由于体外培养条件要求高, 诱发的细胞转化率低, 潜伏期长等因素, 影响了它的发展。近十几年来, 上皮细胞培养技术取得了很大进步, 特别是化学成分确定的无血清培养基

的建立<sup>[21]</sup>,为研究上皮细胞生长、增殖、分化及体外转化提供了有力的工具。目前已有的人和多种动物的上皮组织如肝、食道、皮肤气管等在体外诱发转化获得成功<sup>[22-25]</sup>。由于费用昂贵等原因,上皮细胞体外转化尚未能广泛应用于致癌物的快速检测。

以上介绍的几种试验都有其检测范围,也都可能出现假阳性和假阴性。因此一般主张选用一组短测试验来评价化学物的致突变、致癌性。如何进行选择,目前有许多不同的方案,如美国食品安全科学委员会于1980年发表“食品安全性评价系统建议”修订稿中,对致癌和致突变性评价,提出一组核心试验,包括下列各项。(1)通过微生物系统,结合体外活化系统进行诱发点突变的测试;(2)用培养的哺乳动物细胞,结合哺乳动物的活化系统,进行诱发点突变的测试;(3)用培养的哺乳动物细胞,进行体外染色体诱发畸变的测试;(4)利用细胞分裂中期的细胞遗传学分析和微核试验,进行体内染色体畸变的测试;(5)用适当的哺乳动物或人细胞系,进行细胞转化体外试验等。环境致突变物和致癌物国际防护委员会(ICPEMC)认为,应根据人对致癌物的反应来选择各种试验,但目前还做不到这一点,所以一个试验组应包括多种试验。该委员会认为,利用一组遗传毒理学试验和细胞恶性转化试验,来预测化学物质致癌性的成功率,高于任何单个试验的成功率<sup>[26]</sup>。

根据以上的分析和介绍,结合食品毒理一般实验室条件,在缺乏成熟的测试系统情况下,是否可以考虑选用以下三个试验:(1)V79细胞正向突变;(2)V79细胞周期阻断法微核试验;(3)BALB/C3T3细胞转化试验。它们反映了不同的遗传学终点。简便、快速、相对比较经济。在对受试物作初步安全性评价上有一定的实用性。进一步的研究有待于广泛的验证。

#### 参 考 文 献

[1] Tomatis, L. et al. • Evaluation of the

*Carcinogenicity of Chemicals: a Review of the Monograph Program of the International Agency for Research on Cancer* • *Cancer Res* 1979; 38: 877.

[2] 徐厚恩主编·卫生毒理学基础·第一版·北京:北京医科大学出版社,1987:97—98。

[3] 程元恺主编·环境致癌物—多环芳烃研究·第一版·北京:中国科学技术出版社,1990:246—257。

[4] Perry, P and Evans, H.J. • *Cytological Detection of Mutagen-Carcinogen Exposure by Sister Chromatid Exchange* • *Nature* 1975:258:121.

[5] 程书钧·N-甲基-N-亚硝基诱导V79细胞姊妹染色单体交换和突变·第一版·北京:中国医学科学院学报 1983; 5:57。

[6] Fenech, M. et al. • *Measurement of Micronuclei in Human Lymphocytes* • *Mutat Res* 1985; 147:29.

[7] Carter, S. B. et al. • *Effects of Cytochalacin on Mammalian Cells* • *Nature* 1976;213:261.

[8] 连慕兰,王永潮·细胞松弛素B对人胚肺二倍体细胞SL7和肿瘤细胞CNE/LTEP—78增殖周期的不同影响·实验生物学报 1985;18(3): 283。

[9] 杨彦平·小鼠淋巴细胞周期阻断微核检测法的建立及其应用研究·中国协和医科大学硕士研究生毕业论文 1988。

[10] Wakata, A, et al. • *Measurement of Micronuclei by Cytokinesis-Block Method in Cultured Chinese Hamster Cells: Comparison with Types and Rates of Chromosome Aberrations* • *Mutat Res* 1987; 190: 51.

[11] Gregoxy, L. et al. • *Diaziquone-Induced Micronuclei in Cytochalacin B Blocked Mouse Peripheral Blood Lymphocytes* • *Mutat Res* 1987; 111: 185.

[12] 顾祖维·利用细胞松弛素B改进淋巴细胞微核检测方法·卫生毒理学 1990; 4(1):54。

[13] 安兵·大鼠气管上皮细胞转化的研究·中国协和医科大学硕士研究生毕业论文 1990。

[14] 田江·一组体外短测方法在茶叶防癌成分检测中的应用·中国预防医学科学院硕士研究毕业论文 1991。

- [15] 高凤鸣·辐射和其它因素诱发细胞转化研究概况·中华放射医学与防护杂志 1983;3(5):60。
- [16] Margison C. P. ed. *Carcinogenesis* · Vol.1 · 1979:255 — 272.
- [17] Pienta, R. J. et al. · *Morphological Transformation of Early Passage Golden Syrian Hamster Embryo Cells Derived Cryopreserved Primary Culture as a Reliable In Vitro Bioassay for Identifying Diverse Carcinogens Int.* · *J. Cancer* 1977, 19:642.
- [18] Mondal, S et al. · *Two-Stage Chemical Oncogenesis in cultures of C3H/10T 1/2 cells* · *Cancer Res* 1976, 36: 2254.
- [19] Dipaolo, J. A. et al. · *Quantitation of Chemically Induced Neoplastic Transformation of BALB 3T3 Cloned Cell Lines* · *Cancer Res* 1972, 32:2686.
- [20] Cairns, J. · *Mutation Selection and the Natural History of Cancer* · *Nature* 1975, 255: 187.
- [21] Barns, D and Sato, G. · *Methods for Growth of Cultured Cells in Serum-free Medium* · *Anal. Biochemistry* 1980; 102: 255.
- [22] Katsuta, H. and Takaika, T · *Carcinogenesis in Tissue culture XV · Malignant Transformation of Rat Liver Parenchymal Cells Treated with 4-Nitroquinoline-1-oxide in Tissue* · *J.Natl.Cancer Instn* 1972;49:563.
- [23] Stoner, G. P. et al. *In Vitro Transformation of Rat Esophageal Epithelial Cells with N-Nitrosobenzylamine Carcinogenesis* 1982; 3:629.
- [24] Pai, S. B. et al. · *P. Neoplastic Transformation of Primary Tracheal Epithelial Cell Culture Carcinogenesis* 1983;4:369.
- [25] Sun NC. et al. · *In Vitro Transformation of Syrian Hamster Epidermal Cells by N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidine* *Cancer Res.* 1981; 41: 1669.
- [26] 江泉观主编·基础毒理学·第一版·北京:化学工业出版社,1991: 223。

## 含锆食品的应用及问题(综述)

李贺成 北京有色金属研究总院 (100088)  
徐晋康 卫生部食品卫生监督检验所 (100021)

锆过去主要用于电子工业。最近十几年锆的生理活性被人们所重视。尤其在日本,自1981—1987年每年用于医疗卫生方面的锆占日本全部锆用量的25%(以 $GeO_2$ 计约3—5吨)。其中用于食品的占较大比重。我国近年来也正在开展锆的生物效应的研究,并已初步应用于饮料。近年来日本锆中毒的报道已引起各界的重视。欧共体据此提出今后要对添加锆的食品进行立法。为弄清中毒原因和锆的安全性。笔者着重就锆中毒问题收集了有关的文献资料,并进行分析,供有关研究和应用者参考。

### 1 锆应用于食品的理由

锆用于食品的原因大致有如下两个方面。

#### 1.1 锆广泛存在于食品中

50年代日本浅井一彦发现人参等一些食用或药用植物中含有大量锆。人们还发现人参品质优劣和作用强弱与锆含量有关。如有人测定野生人参含锆400ppm、高丽人参250—300ppm、而人工栽培参则<50ppm。幡山等分析了日本兵库县市售36种食品,其中31种含锆:谷类0.33、种籽类0.36、有色蔬菜0.064,平均0.21ug/100g。从食堂简便饭菜中锆含量推算,每人每天摄锆量为10ug<sup>[1]</sup>。因此正常人体器官中亦含锆。