

四膜虫 :毒理学与生态毒理学研究中的 优良模式生物

傅诚杰^{①②} 俞 婷^{①②} 缪 炜^{①*} 沈韞芬^①

(① 中国科学院水生生物研究所 武汉 430072 ; ② 中国科学院研究生院 武汉教育基地 武汉 430072)

摘要 :四膜虫(*Tetrahymena*)是毒理学与生态毒理学研究的良好模式生物之一。本文回顾了近年来以四膜虫为实验生物开展的毒理学与生态毒理学研究进展,并针对目前产生严重环境压力的持久性有毒化学污染物,提出了以四膜虫为模式生物开展相应的生态毒理学研究的前景以及可行的方法。

关键词 :四膜虫 ;毒性评价 ;PTS ;SSH

中图分类号 :Q895 **文献标识码 :**A **文章编号 :**0250-3263(2005)01-108-06

Tetrahymena a Good Model Organism for Toxicology and Ecotoxicology

FU Cheng-Jie^{①②} YU Ting^{①②} MIAO Wei^① SHEN Yun-Fen^①

(① Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072 ;

② Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Wuhan Branch 430072, China)

Abstract : *Tetrahymena* is one of the most commonly studied protozoan model organism for toxicology and ecotoxicology. In this paper, we summarized the recent advances and present conditions of the investigations performed with *Tetrahymena* in this field. Furthermore, in consideration of the persistent toxic substances (PTS) that have caused severe environmental pressure, we put forward the assumption of using *Tetrahymena* as a model organism in the corresponding ecotoxicological studies and suggested the feasible methods.

Key words : *Tetrahymena* ; Toxicity estimate ; PTS ; SSH

每年,全世界有数以千计新合成的化学物质被投放到这个星球上,而人们对其可能存在的毒性的认识远比不上它们生成的速度。这些污染物进入环境后,不管其最初的分布所在,最后大部分都会经各种途径,如降雨、地表径流、土壤污染等方式进入水生态系统,与各种生物和非生物因子接触。其在水中的迁移和归宿是十分复杂的过程,同时也对水生态系统的生物多样性和人类自身健康造成了现实和潜在的危害。因此,正确评价各种污染物的生态毒理效应是改善环境质量、拯救生态危机的重要前提之一^[1]。

纤毛虫是一类大小在几十至几百微米之间的单细胞真核生物,因具有个体行为与所处生境中的污染物质紧密联系的特点,其作为毒理学研究的重要实验生物已有相当长的历史^[2-5]。这类原生动物适于环境风

险和健康影响评价的特征包括:作为单细胞真核生物,其在自然界广泛分布,在任何有水或是潮湿的自然地域都有可能存在;在水域食物链(网)系统中处于能量流动与物质循环的一个基础环节;直接暴露于水体,对水环境中有毒物质的毒性反应敏感,是早期预报所处水生态系统恶化的理想指示物种;个体小且繁殖周期

基金项目 中国科学院创新工程重要方向资助(No. KSCX2-SW-102),淡水生态与生物技术国家重点实验室开放基金项目(No. 0306);

* 通讯作者, E-mail: miaowei@ihb.ac.cn ;

第一作者介绍 傅诚杰,男,硕士研究生,研究方向:原生动物分子生态毒理学与分子进化。

收稿日期 2004-07-13,修回日期 2004-11-01

短,在实验室培养简单、经济、便捷,实验结果又相对准确^[6]。

其中四膜虫(*Tetrahymena*)是第一种进行实验室无菌纯培养并且实现细胞同步化的纤毛虫。关于四膜虫的各种培养条件及不同条件下其相应的生理生化指标在过去的数十年里已有详细的报道。同时,作为一种先进的分子遗传学工具,四膜虫在基础研究中一直处于前沿地位,尤其是在其他模式生物具有一定困难的某些体内试验的研究领域,如调节分泌、细胞动力学、噬菌作用、端粒酶、组蛋白和微管蛋白翻译后修饰功能以及发育中的 DNA 重整等。正是基于以上特点,其越来越受到毒理学与生态毒理学家的关注和重视。迄今为止,已对四膜虫中的 *T. pyriformis*、*T. thermophila*、*T. vorax*、*T. pigmentosa*、*T. shanghaiensis* 等诸多物种进行了多方面的研究^[7-12]。结果表明,开展以四膜虫为模型的毒理学与生态毒理学研究具有很大的科学价值和应用前景。

本文在对以四膜虫为实验生物开展的旨在建立外源性化学物质毒性评价方法和所评估化学毒物种类等进展加以回顾的基础上,针对目前造成重要环境压力的持久性有毒化学污染物(persistent toxic substances, PTS)提出了以四膜虫为模式生物开展相应的生态毒理学研究的方法和内容。

1 外源性化学物质毒性效应的评估

传统生物急性毒理实验通常利用在不同浓度梯度下对应的生物致死量来测度外源性化学物质的毒性作用。发展至今,评估方法主要建立在亚致死条件下生物所产生的细胞毒性反应的基础上。以梨形四膜虫(*T. pyriformis*)为例,已有的各种详细的分析参数和指标,包括分析胞内结合与定位、化学吸力、摄氧率、生长抑制率等等,并不断得以标准化。而针对不同种系的四膜虫之间的毒性反应、实验终点、生长基质的平行比较实验也见有报道,结果反映四膜虫的不同种系间虽有明显的遗传学和生理学差异,但对于化学物质的毒性反应并无显著的不同^[13]。叶赛青等对四膜虫在各种环境化学毒物胁迫下的毒理效应的研究进展已有报道^[14]。在此,本文将目前四膜虫应用于毒性效应评估中所用的主要参数和指标做一简单说明。

1.1 细胞生长率与死亡率 在适宜条件下,四膜虫的生长符合典型的微生物生长曲线模型。当外源性有毒物质存在时,其种群传代时间趋于延长,据此可通过分析动态生长曲线来指示其所处生长环境中的毒性物质的反应情况。目前普遍采用普通光镜下密度计数和

流式细胞计数仪两种方式进行数目统计,结果以半抑制浓度(IC₅₀-values)表示。这两种方法所得到的结果被认为基本等价^[15],但是前一种方法对所测试的毒性底物种类有更多限制,也更易受人为干扰。目前,已发展双色荧光染料标记的方法,其灵敏度和精确性更高^[16]。

1.2 生化标记物 环境中存在的外源性化学物质会引起四膜虫的代谢合成反应产生相应变化,因此其体内代谢产物和指标的变化可作为毒性效应指示的特殊标志。在此类实验中,已有如核 DNA^[17]、碳水化合物、蛋白质等生物大分子与关键代谢酶,及胞内 pH 值、ATP 含量、抗氧化系统、氧气摄入量以及呼吸代谢反应的变化等作为生化标记物用于检测不同化学物质的毒性作用^[18]。同时,对更多的有效生化指标的探索也在不断开展,已有一些特殊的蛋白(如钙调素、热激蛋白)与酶(羟化酶、细胞色素 b)活性在以四膜虫为材料的试验中被报道^[18]。Christensen 等通过四膜虫与哺乳动物细胞的代谢活性与行为的平行实验比较了它们的某些生化指标,结果显示四膜虫在绝大部分指标上都有相似或更高的敏感度^[19]。

1.3 行为变化 四膜虫在正常情况下具有很强的移动能力,而当处于不利的环境中时,就会调整(减缓)自身的行为活动,所以可以用移动能力与泳速的变化指示其健康状况^[20,21]。有研究表明四膜虫的泳速与膜流体性具有相关性,可通过录像的方式来根据其移动能力、泳速及细胞膜稳定性评估某些亲脂性药物如氟霉素、洛非帕明的毒性作用^[22,23]。这种结合了自动化摄像并建立相应的数学统计模型的分析方法,被认为是一种有效的辅助分析手段^[24]。

1.4 超微结构变化 许多研究人员也结合了超微结构分析的研究,提供和丰富诸如毒性物质的作用部位、生理变化的相关数据。如 Nilsson(2003)在关于锌离子浓度对四膜虫的毒性作用实验中,利用电镜照片准确地显示了锌离子浓度梯度下四膜虫胞质内的小型折射颗粒的数目、结合位点以及与食物泡相融合等一系列结果^[25]。

2 外源性化学物种类

在过去的几十年里,四膜虫被广泛地应用于外源性化学物质的潜在毒性研究,被认为是一种非常有效的检测工具^[26]。根据所属类别的不同,可以将这些外源性化学物质分为有机物和无机物两大类。

2.1 有机物 针对工业生产中成千上万种化学物质,要进行逐一的毒性评估困难重重。Schultz 的研究组以四膜虫为生物模型,通过定量构效关系(quantitative

structure activity relationship (QSAR) 这一方法来评估各类有机物的毒性作用的线性关系,旨在通过已知的化学物质毒性来预测其它类似化学物的潜在毒性,并已建立了一系列的化学物质数据库^[27]。国内 Xu 等也开展了类似的实验,用于推断在松花江水域的硝基苯类有机物的相对毒性^[28]。由于 QSAR 在分析预测多元化合物的复杂毒性作用上存在不足,已有基于机率神经网络方法以及多种非线性模型的方法在四膜虫的毒理学研究中得到应用^[29,30]。目前,已经针对许多不同种类的有机化合物,包括芳香醇、不饱和醇、不饱和酮、苯酚衍生物、含氮芳香化合物、嘧啶、酯类化合物、硫氟异构化合物等开展了毒性作用的研究。此外,杀虫剂也是一大类具有明显毒性作用的有机物质,已经进行相关实验的包括有机磷和有机氯类的多种杀虫剂,如磷胺、对硫磷、敌敌畏、林丹及艾氏剂等^[18]。

Slabbert 和 Morgan 建立了测定氧气吸收率的方法分析四膜虫暴露于金属离子、杀虫剂以及其它有机物中的相应毒性作用,但同时也指出该方法在检测饮用水中所含的污染物时,即使是对饮用标准所允许的最大浓度也依然存在着敏感度不足的问题^[31]。Slabbert 和 Maree 进一步提出,当在实验中混合加入多种水中常见的化学物质以进行毒效评估时,会产生拮抗、协同、叠加或中性作用等一系列有别于将这些化学物质各自单独添加时的结果,其毒性效应更趋复杂^[32]。

Larsen 等通过以四膜虫为材料进行的针对 6 种具有典型代表性的工业化学物质,旨在建立毒性检测标准化步骤的小规模联合实验结果显示,由不同实验室提供的数据之间并无显著差异,并且所得到半抑制浓度 (IC_{50} -values) 数值与经济合作与开发组织 (OECD) 颁布的急性水体毒性测试标准有很好的 consistency^[15]。

2.2 无机物 已有许多的实验报道了利用对四膜虫的生长抑制的影响来测试重金属 (Cu、Cd、Fe、Hg、Zn、Pb 等) 以及其他多种无机物的毒性作用的评价方法^[33],基于 QSAR 预测无机物的相对毒性实验也已经开展,对比发光细菌 (Microtox) 毒性测验法其相关性更显著,敏感度也更高^[34]。Liu 等的一项实验结果表明,尽管已有的大量工作是基于对四膜虫的生长抑制这一点来评定无机物的(相对)毒性,但在一定条件下这些具有一定浓度的无机物也同样可以促进四膜虫的生长^[35]。

此外,许多学者将四膜虫作为一个毒性筛选的模型进行研究。其中,Huber 与 Savant 两个研究小组的实验结果均显示了四膜虫对于某些无机物具有比哺乳细胞更强的敏感性特征^[36,37]。四膜虫也被用作研究亲金属蛋白合成机理的良好材料,对其亲金属蛋白的序列

分析结果认为其与哺乳细胞的对应序列的相似性较低^[38]。Sauvant 等比较了四膜虫与纤维原细胞对于 5 种经典的体外试验的结果,用以评价经 PVC、PET 和玻璃 3 种不同材料储存的水的细胞毒理学影响^[39,40]。尽管用化学检测结果显示与正常条件下的水源并无明显的区别,但是四膜虫与纤维原细胞在生理上均表现出了对某些储存水的毒性反应,这也多少反应了灵敏度的大小在不同程度上限制了运用类似方法进行研究的局限性。

3 在持久性有毒化学污染物 (PTS) 生态毒理学研究中的应用

过去的几十年中,对各类化学污染物的毒性研究以急性实验为主,而针对长期暴露于环境毒物下的慢性作用,因方法的繁琐与技术的局限以及对致毒机理本质的认识不足,进展相对缓慢。有学者指出,目前毒理学与生态毒理学研究的主要难题在于如何将各类化学污染物对动植物造成的个体毒害作用与其对整个生态环境的影响相统一。而今后数十年内将面临 4 个方面的挑战:揭示分子的代谢机制及在亚细胞水平与化学污染物的交互作用,包括对基因组和蛋白质组的影响;发展作用于复杂细胞与生理过程的毒性效应的模型;阐明分子、细胞与药理生理实验“终点”与更高层次的生态效应间的联系;实现对包括生物技术与纳米技术在内的工业生产的进步所可能带来的危害预警^[41]。

在丰富多样的化学污染物中,持久性有机污染物 (persistent organic pollutants, POPs) 以其对环境和人体造成的巨大影响逐渐为人们所认识并受到国际上的高度重视。这些污染物不仅大多具有致癌、致畸、致突变性,而且化学结构稳定,具半挥发性,能够远距离大规模地在全球迁移。2002 年联合国环境规划署 (UNEP) 进一步提出持久性有毒化学污染物 (PTS) 的概念,将无机物在内的一切微量或痕量的持久性毒物也包括在内。由于 PTS 可通过食物链途径传递,产生生物累积和生物放大效应,因此会对水生生态系统的生物多样性以及人类的健康造成严重危害。更令人担心的是,当其中的一些物质因具有环境内分泌干扰物作用而被发现时,其对自然生态系统的破坏已经相当严重^[42]。

目前,化学方法对 PTS 的检测费用昂贵,分析过程冗长费时,无法满足大量环境样品快速筛选的需要。而且由于亚致死效应,一般的细胞计数等方法也不适用。近年来,利用类激素污染物和激素受体基因相互作用的机理,将相关的核基因或激素受体基因作为生物标志物 (biomarker),其表达的变化与污染物浓度间的

剂效关系反映了类激素污染物的毒性,从而开展了对大量样品进行快速筛选及其致毒机理的研究工作。例如,目前国内外已广泛开展通过鱼肝细胞体外培养,分析其细胞色素 P450CYP1A1 和 Ah 受体基因对多环芳烃、氯代芳烃等环境污染物的响应,进而建立相应的标准检测评估体系和技术等研究工作;同时,如二恶英(TCDD)等危害严重的类激素污染物对于 P450 的诱导和调控机制也正逐步地得以揭示^[43]。

体细胞检测的这一方法具有耗时短、毒性低、灵敏度高及无需同位素标记等优点,但体细胞培养的要求相对较严格,同时,常用的高等动物体细胞也存在如下问题:一是这些高等动物均已处于食物链的高层;二是这些体细胞在自然情况下并不直接暴露于环境类激素中,因此它们对环境类激素毒性的敏感度和早期评价的准确性都有待优化。以四膜虫作为研究工具对 PTS 进行毒性试验和致毒机理的研究,则具有以下独到优点:其以自由游泳方式生活在淡水环境中,处于水生态系统食物链的底层,对 PTS 毒性高度敏感,作为毒理学研究的重要实验生物,具有数十年的深入基础研究;在比较基因组学上具有关键的系统发育地位,且其细胞核结构功能复杂程度与多细胞动物相似,与其它真核微生物模式生物相比(如真菌),人类和四膜虫具有较程度的功能保守性^[44,45]。因此在 2003 年由美国国家自然科学基金会(NSF)和国家卫生研究所(NIH)启动了四膜虫大核基因组测序计划,来积极推动对未知功能基因的研究。

针对 PTS 中的此类环境内分泌干扰物,虽然在四膜虫体内并不存在甾醇及甾醇类性激素,但外源性的甾醇类性激素却可以诱导其产生相关的与高等动物相同的激素受体,并且在体内完成甚至是与人类相似的激素代谢和信号传导过程^[46]。据此推测其会对环境类激素产生与高等动物类似的响应机制。Csaba 等在研究 3 种外源性类固醇化合物对四膜虫的激素印记诱导作用时,发现其可能同时具有将睾酮转化为雌甾二醇的代谢途径,这也提示了四膜虫在外源性激素的刺激下,体内有相应的细胞色素 P450 基因发挥着一系列的调节作用^[47]。

生物体的发育分化及对环境因子刺激所产生的应答反应等生命活动过程均受到基因调控,是基因差异表达的结果。从表达序列水平进行研究,是研究功能基因的快捷方式,因此可根据由外源性刺激引起的表达变化来获取与之对应的与特定代谢相关的那些只有数个拷贝但却在功能上起关键作用的基因。其中,抑制差减杂交(suppression subtractive hybridization,SSH)的

方法具有背景低、目的序列富集程度高、且丰度相对一致等突出优点,在差减杂交过程中使不同丰度 cDNA 的拷贝数差异趋于均衡,因此不同丰度的差异表达基因都能得到有效克隆^[48]。我们利用嗜热四膜虫为模式生物,构建了在 DDT 和三丁基锡(tributyltin, TBT)胁迫下的 cDNA 差减文库,得到了表达差异较大的表达序列标签(EST)近 200 个,经比对分析后发现了包括细胞色素 P450 酶系基因在内的一些与能量传递、解毒、信号传导相关和相应激素受体的基因的特征性序列。据此,希望通过这些特征序列的获取为下一步筛选与 DDT 和 TBT 有良好剂效关系的基因,建立相应的毒性评价方法并开展与重要的代谢、调控机制相关的功能性基因的研究,逐步解释某一类环境内分泌干扰物的致毒机理等工作奠定基础。此外,基于作为单细胞的四膜虫拥有与高等生物相类似的激素代谢过程,所参与的这类重要的代谢过程中可能更能反映出基本的或是相对较简单的基因网络调控作用。结合目前已有的基因组数据库中的大量信息,对四膜虫拥有的类似高等生物某些与激素调节代谢密切关联的基因家族的进化谱系加以研究,以获取在进化历史上具有特殊地位的这一种类的相关信息,不仅可以提供反映该基因家族的进化历史的可能,也是揭示特定基因功能演化背后的进化驱动力的有效手段。

参 考 文 献

- [1] 沈福芬.用 PFU 微型生物群落毒性试验研究污染物的生态毒理效应.见:周培疆,甘复兴,严国安编.第七届海峡两岸环境保护学术研讨会论文集(下卷).武汉:武汉大学出版社,2001:33~41.
- [2] Persoone G, Dive D. Toxicity tests on ciliates. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1978, 2(2):105~114.
- [3] Beaver J R, Crisman T L. The role of ciliated protozoa in pelagic freshwater ecosystems. *Microb Ecol*, 1989, 17:111~136.
- [4] Guettinger H. Combined interpretation of biological and chemical field data to evaluate ecotoxicity of chemical substances. *Sci Total Environ*, 1993 (Suppl):1539~1545.
- [5] 周可新,许木启,曹宏等.土壤原生动物在环境监测中的应用. *动物学杂志*, 2003, 38(1):80~84.
- [6] Twagilimana L, Bohatier J, Groliere C A, et al. A new low-cost microbiodtest with the Protozoan spirostomum teres: culture conditions and assessment of sensitivity of the ciliate to 14 pure chemicals. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1998, 41(3):231~244.
- [7] Lawrence S G, Holoka M H, Hamilton R D. Effects of cadmium on a microbial food chain, *Chlamydomonas reinhardtii* and

- Tetrahymena vorax*. *Sci Total Environ* ,1989 (87-88) :381 ~ 395.
- [8] Pauli W ,Berger S ,Jaskulka L ,et al . A case for the inclusion of a protozoan test in aquatic assessment using *Tetrahymena* . *Sci Total Environ* ,1993 (Suppl) :779 ~ 786.
- [9] Soose M . Properties of silibinin and of antioxidants against adriamycin cytotoxicity in a unicellular eukaryote *Tetrahymena thermophila* . *Europ J Protistol* ,1994 **30** :394 ~ 403.
- [10] Soose M ,Zulauf J ,Bauer M ,et al . A comparative study on the response of two established cell lines to Adriamycin. Growth and biomass production in human mesangial cell cultures and in *Tetrahymena thermophila* . *Europ J Protistol* ,1994 **30** :75 ~ 84.
- [11] Boldrin F ,Santovito G ,Irato P ,et al . Metal interaction and regulation of *Tetrahymena pigmentosa* metallothionein genes. *Protist* ,2002 **153** (3) :283 ~ 291.
- [12] Wang Y ,Zhang M ,Wang X . Population growth responses of *Tetrahymena shanghaiensis* in exposure to rare earth elements. *Biol Trace Elem Res* ,2000 **75** (1-3) :265 ~ 275.
- [13] Pauli W ,Berger S . Toxicological comparisons of *Tetrahymena* species end points and growth media :supplementary investigations to the pilot ring test. *Chemosphere* ,1997 **35** (5) :1 043 ~ 1 052.
- [14] 叶寒青 杨祥良 ,徐辉碧 . 梨形四膜虫在环境毒理学研究中的应用 . 生物学杂志 ,2001 **18** (5) :31 ~ 33.
- [15] Larsen J ,Schultz T W ,Rasmussen L ,et al . Progress in an ecotoxicological standard protocol with protozoa :results from a pilot ring test with *Tetrahymena pyriformis* . *Chemosphere* ,1997 , **35** :1 023 ~ 1 041.
- [16] Nicolau A ,Nicolina D ,Manuel M ,et al . Trends in the use of protozoa in the assessment of wastewater treatment. *Res Microbiol* ,2001 **152** :621 ~ 630.
- [17] Wu Y ,Shen Y F . Genotoxic effects of linear alkyl benzene sulfonate , sodium pentachloro-phenate and dichromate on *Tetrahymena pyriformis* . *J Protozool* ,1992 **39** (4) :454 ~ 456.
- [18] Sauvant N P ,Pepin D ,Piccini E . *Tetrahymena pyriformis* :A tool for toxicological studies. *Chemosphere* ,1999 **38** :1 631 ~ 1 669.
- [19] Christensen S T ,Rasmussen L . Evidence for growth factors which control cell multiplication in *Tetrahymena thermophila* . *Acta Protozool* ,1992 **31** :215 ~ 219.
- [20] Larsen P H ,Lyhne I ,Andersen A P ,et al . Characteristics of dividing and non-dividing *Tetrahymena* cells at different physiological states. *Europ J Protistol* ,1993 **29** :182 ~ 190.
- [21] Saadi A D ,Sneader W E ,Baillie A J ,et al . Inhibition of mobility of *Tetrahymena pyriformis* by certain new local anaesthetics :an alternative *in vitro* approach to drug screening. *Pharmazie* ,1993 , **48** :627 ~ 628.
- [22] Wu C ,Clift P ,Fry C H ,et al . Membrane action of chloramphenicol measured by protozoan motility inhibition. *Arch Toxicol* ,1996 **70** :850 ~ 853.
- [23] Darcy P ,Kelly J P ,Leonard B E ,et al . The effect of lofepramine and other related agents on the motility of *Tetrahymena pyriformis* . *Toxicol Lett* ,2002 **128** (1 ~ 3) :207 ~ 214.
- [24] Dias N ,Amaral A L ,Ferreira E C ,et al . Automated image analysis to improve bead ingestion toxicity test counts in the protozoan *Tetrahymena pyriformis* . *Lett Appl Microbiol* ,2003 , **37** (3) :230 ~ 233.
- [25] Nilsson J R . How cytotoxic is zinc ? A study on effects of zinc on cell proliferation , endocytosis , and fine structure of the ciliate *Tetrahymena* . *Acta Protozool* ,2003 **42** (1) :19 ~ 29.
- [26] Chemosensory responses of ciliates :A sensitive end point in xenobiotic hazard assessment. In :Pauli W ,Berger S ,Schmitz S ,et al . eds . *Environ . Toxicol Water Qual* ,1994 **8** (4) :341 ~ 346.
- [27] Bearden A P ,Schultz T W . Structure - activity relationships for *Pimephales* and *Tetrahymena* :a mechanism of action approach. *Environ Toxicol Chem* ,1997 **16** (6) :1 311 ~ 1 317.
- [28] Xu J B ,Jing T S ,Berger P S . QSAR Studies on the toxicity of nitrobenzenes to population growth of *Tetrahymena pyriformis* . *Chem Res Chinese U* ,2002 **18** (3) :258 ~ 261.
- [29] Niculescu S P ,Kaiser K L ,Schultz T W . Modeling the toxicity of chemicals to *Tetrahymena pyriformis* using molecular fragment descriptors and probabilistic neural networks. *Arch Environ Contam Toxicol* ,2000 **39** (3) :289 ~ 298.
- [30] Ren S . Modeling the toxicity of aromatic compounds to *Tetrahymena pyriformis* :the response surface methodology with nonlinear methods. *J Chem Inf Comput Sci* ,2003 **43** (5) :1 679 ~ 1 687.
- [31] Slabbert J L ,Morgan W S G . A bioassay technique using *Tetrahymena pyriformis* for the rapid assessment of toxicants in water. *Water Res* ,1982 **16** :517 ~ 523.
- [32] Slabbert J L ,Maree J P . Evaluation of interactive toxic effects of chemicals in water using a *Tetrahymena pyriformis* toxicity screening test. *Water SA* ,1986 **12** :57 ~ 62.
- [33] Nilsson J R . *Tetrahymena* in cytotoxicity : with special reference to effects of heavy metals and selected drugs. *Eur J Protistol* ,1989 **25** :2 ~ 25.
- [34] Bogaerts P ,Bohatier J ,Bonnemoy F . Use of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis* for the assessment of toxicity and quantitative structure activity relationships of xenobiotics : comparison with the Microtox test. *Ecotoxicol Environ Saf* , 2001 **49** (3) :293 ~ 301.
- [35] Liu Y F ,Tang R H ,Zhang Q X ,et al . Stimulation of cell growth of *Tetrahymena pyriformis* and *Chlamydomonas*

- reinhardtii* by trace elements. *Biol Trace Elem Res* ,1986 **9** 89 ~ 99.
- [36] Huber H C , Huber W , Ritter H. Simple bioassays for evaluating toxicity of environmental chemicals using microcultures of human peripheral blood lymphocytes and monoxenic cultures of the ciliate *Tetrahymena pyriformis*. *Zentralbp Hyg Umweltmed* ,1990 **189** 511 ~ 526.
- [37] Sauvaut M P , Pepin D , Groliere C A , *et al.* Comparison of protozoa and mammalian cells for *in vitro* toxicological study of inorganic and organic substances. In Jfremer ed. Proceeding of the European Workshop on ' Biology of protozoan , invertebrate and fish experimental models and applications ' (15th Edition ed.) , *Actes de Colloques* ,1995 **18** :11 ~ 16.
- [38] Boldrin F , Santovito G , Negrisolo E , *et al.* Cloning and sequencing of four new metallothionein genes from *Tetrahymena thermophila* and *T. pigmentosa* : evolutionary relationships in *Tetrahymena* MT family. *Protist* 2003 **154** (3-4) 431 ~ 442.
- [39] Sauvaut M P , Pepin D , Bohatier J , *et al.* Comparative study of two *in vitro* models (L-929 fibroblasts) and *Tetrahymena pyriformis* GL for the cytotoxicological evaluation of packaged water. *Sci Total Environ* ,1994 **156** :159 ~ 167.
- [40] Sauvaut M P , Pepin D , Bohatier J. Chemical and *in vitro* toxicological evaluations of waters ackaged in polyvinyl chloride (PVC) and polyethylene terephthalate (PET) bottles. *Food Add Contam* ,1995 **12** 567 ~ 584.
- [41] Moore M N. Biocomplexity : the post-genome challenge in ecotoxicology. *Aquatic Toxicology* 2002 **59** (1-2) :1 ~ 15.
- [42] Knobil E , Maczka C , Policansky D , *et al.* ed. *Hormonally Active Agents in the Environment*. Washington , D C : National Academy Press ,1999 274 ~ 295.
- [43] 冷欣夫 邱星辉. 细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景. 北京 科学出版社 2001 ,189 ~ 195 245.
- [44] Turkewitz A P , Orias E , Kapler G. Functional genomics : the coming of age for *Tetrahymena thermophila*. *Trends in Genetics* 2002 **18** 35 ~ 40.
- [45] Fillingham J S , Chilcoat N D , Turkewitz A P , *et al.* Analysis of expressed sequence tags (ESTs) in the ciliated protozoan *Tetrahymena thermophila*. *J Eukaryot Microbiol* 2002 **49** (2) : 99 ~ 107.
- [46] Csaba G , Kovacs P , Pallinger E. Presence and localization of epidermal growth factor (EGF)-and EGF-receptor-like immunoreactivity in *Tetrahymena*. *Cell Biol Int* 2004 **28** (7) 491 ~ 496.
- [47] Csaba G , Poteczin E , Feher T , *et al.* Steroid hormone (hydrocortisone , oestradiol and testosterone) uptake , storage or induced synthesis in tetrahymena. *Cell Biol Int* ,1998 **22** 11-12) 875 ~ 878.
- [48] Winstanley C. Spot the difference : applications of subtractive hybridisation to the study of bacterial pathogens. *J Med Microbiol* 2002 **51** (6) 459 ~ 467.