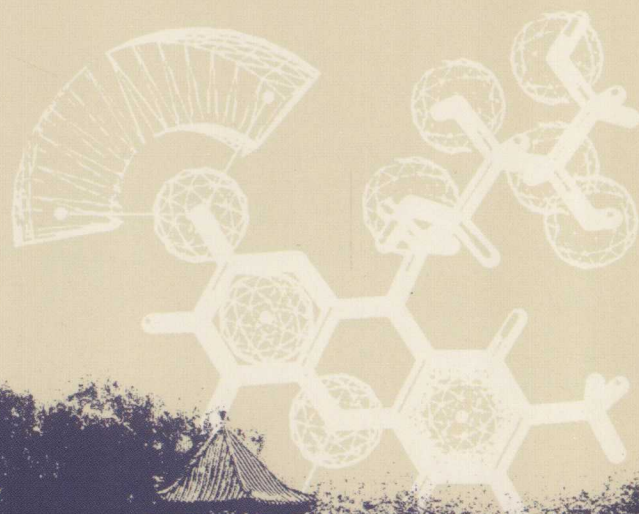


药物分子毒理学

PHARMACEUTICAL MOLECULAR TOXICOLOGY

孙晗笑 李秀英 主编



暨南大学出版社
JINAN UNIVERSITY PRESS

R99
12

· 013922695



药物分子毒理学

PHARMACEUTICAL MOLECULAR TOXICOLOGY

孙晗笑 李秀英 主编



R99 / 12



北航 C1631419

 暨南大学出版社
JINAN UNIVERSITY PRESS

中国·广州

01335800

图书在版编目 (CIP) 数据

药物分子毒理学/孙晗笑, 李秀英主编. —广州: 暨南大学出版社, 2012. 11
(暨南大学研究生教材)

ISBN 978 - 7 - 5668 - 0094 - 7

I. ①药… II. ①孙… ②李… III. ①药理学: 毒理学: 分子生物学 IV. ①R99

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2012) 第 008522 号

出版发行: 暨南大学出版社

地 址: 中国广州暨南大学
电 话: 总编室 (8620) 85221601
营销部 (8620) 85225284 85228291 85228292 (邮购)
传 真: (8620) 85221583 (办公室) 85223774 (营销部)
邮 编: 510630
网 址: <http://www.jnupress.com> <http://press.jnu.edu.cn>

排 版: 广州市天河星辰文化发展部照排中心
印 刷: 佛山市浩文彩色印刷有限公司

开 本: 787mm × 1092mm 1/16
印 张: 13
字 数: 313 千
版 次: 2012 年 11 月第 1 版
印 次: 2012 年 11 月第 1 次

定 价: 28.00 元

(暨大版图书如有印装质量问题, 请与出版社总编室联系调换)

总序

百年沧桑，弦歌不辍；巍巍暨南，展焕新颜。暨南大学自1906年创办以来，始终秉承“宏教泽而系侨情”的办学宗旨，注重以中华民族优秀的传统道德文化培养造就人才。学校积极贯彻“面向海外，面向港澳台”的办学方针，建校至今，共培养了来自世界五大洲127个国家和地区的各类人才20余万人，堪称桃李满天下。

暨南大学的研究生教育始于1978年，是改革开放后全国首批研究生招生培养单位。1984年，学校率先招收海外及港澳台研究生，是全国当时唯一的试点单位。1987年开始，创建了与境外知名大学合作培养研究生的教育模式，目前已与中国香港、美国、加拿大、德国、英国等地区和国家的众多知名大学联合培养研究生；1989年开创内地高校招收境外“兼读制”研究生及境外研究生面授点的先河。经过30多年的建设与发展，暨南大学已经成为推动港澳台合作办学及国际办学的探索者和实践者，联结内地与港澳台同胞、海外侨胞的桥梁和纽带，被誉为“中国境外研究生教育的试验田和窗口”。

目前，学校已拥有博士学位授权一级学科6个，博士学位授权二级学科39个，硕士学位授权一级学科18个，硕士学位授权二级学科135个，6种硕士专业学位及临床医学博士专业学位；学位授权点覆盖了哲学、经济学、法学、教育学、文学、历史学、理学、工学、医学和管理学10个学科门类；设有博士后科研流动站9个，博士后工作站1个。学校师资力量雄厚，有专任教师1677人，其中中国科学院院士1人，中国工程院院士4人，博士生导师297人，教授390人，副教授590人。

教材建设是课程体系和教学内容改革的核心，是进一步加强研究生教学工作，深化教学改革，提高研究生教育教学质量的重要措施。为此，学校启动了“暨南大学研究生教材建设”项目，将系统出版一批具有学科特色和水平的研究生教材。在研究生部的精心组织下，通过专家组评审，分批立项，每批二三十种，覆盖了公共学位课、专业学位课和专业选修课等课程。这些教材符合研究生教育改革发展趋势，反映了学科建设的新理论、新技术、新方法，在国内同类教材中较为先进。我们希望通过几年的努力，打造出一系列特色鲜明的研究生精品教材。

暨南大学副校长 纪宗安

2010年10月

目 录

总 序	1
第一章 绪 论	1
第一节 药物分子毒理学概述	1
第二节 药物分子毒理学发展简史	2
第三节 药物分子毒理学发展趋势	5
第二章 药物分子毒理学的基本概念	12
第一节 基本概念	12
第二节 剂量—反应关系	14
第三节 毒性常用指标	15
第三章 药物的代谢转化	18
第一节 药物的 I 相代谢	19
第二节 药物的 II 相代谢	25
第四章 药物的致癌作用	29
第一节 致癌物的分类	30
第二节 致癌的作用机制	32
第三节 癌基因与抑癌基因	36
第四节 DNA 加合物	42
第五节 致癌作用评价	46
第五章 生殖系统的分子毒理学	51
第一节 对配子发生的影响	51
第二节 对生殖细胞 DNA 的损伤及评价	56
第六章 发育的分子毒理学	59
第一节 基本概念及意义	59
第二节 发育的阶段和过程	61
第三节 发育毒性作用机制	63
第四节 发育毒性的检测与评价	66

第七章 药物对免疫系统的毒性作用	69
第一节 概 述	69
第二节 免疫系统毒性反应特点	74
第三节 免疫系统毒性作用机制	79
第八章 药物对神经系统的毒性作用	83
第一节 概述神经毒物、损害特点	83
第二节 神经毒性作用机制	89
第九章 药物对心血管系统的毒性作用	97
第一节 心血管毒理学概念	97
第二节 心血管系统生理	97
第三节 作用于心血管的毒性药物	98
第四节 心血管药物的毒性作用机制	101
第五节 心血管药物的毒理学实验方法和技术	104
第十章 药物对皮肤系统的毒性作用	107
第一节 概述皮肤的结构和功能	107
第二节 皮肤毒作用类型	111
第三节 毒作用机制	112
第四节 皮肤毒性评价方法	114
第十一章 药物对内分泌系统的毒性作用	118
第一节 概述内分泌系统的生理功能	118
第二节 药物对内分泌系统的毒性作用	118
第三节 内分泌毒性的检测方法	122
第十二章 药物对肝脏的毒性作用	124
第一节 概述肝脏的结构特点	124
第二节 药物对肝损伤类型及其作用机制	125
第三节 肝损伤的评价方法	127
第十三章 药物对肾脏的毒性作用	129
第一节 概述肾脏的结构特点及生物学基础	129
第二节 常见肾性毒物类型	129
第三节 肾脏毒性作用机制	131
第四节 肾脏损害的评价方法	132

第十四章 人类对药物的依赖及毒品	135
第一节 基本概念	135
第二节 药物依赖与毒品对人类的危害	136
第三节 药物依赖性的作用机制	138
第四节 药物依赖性的评价方法	139
第十五章 全身用药的毒性研究	143
第一节 急性毒性试验常用方法	146
第二节 新药长期毒性研究方法	148
第十六章 局部用药的毒性研究	157
第一节 皮肤用药的毒性评价	157
第二节 腔道用药的毒性评价	161
第三节 眼睛用药的毒性评价	163
第四节 肌肉注射用药的局部刺激性试验（家兔股四头肌法）	166
第十七章 分子生物学技术在毒理学中的应用	168
第一节 分子生物学基本技术与原理简介	168
第二节 荧光原位杂交技术	171
第三节 单细胞凝胶电泳技术	174
第四节 生物芯片技术	177
第五节 基因差异分析技术	180
第六节 蛋白质组学技术	181
第七节 转基因动物	184
第十八章 国际互联网的相关信息资源	191
第一节 专业文献的网上检索	191
第二节 简介网上的数据库及使用方法	194
第三节 毒理学相关网站介绍	199

第一章 绪 论

第一节 药物分子毒理学概述

药物毒理学 (drug toxicology) 是研究药物在一定条件下对生物体的损害作用, 并对药物毒性作用进行定性、定量评价以及对靶器官毒性作用机制进行研究的一门科学。药物毒理学作为一门应用学科, 在 20 世纪 90 年代兴起以后, 就一直受到人们的重视。药物毒理学研究的毒性数据是评价药物安全性的唯一依据, 同时也是新药评审的重点内容之一。药物毒理学是以分子生物学、遗传学、解剖学、动物学、病理学、统计学等为基础学科而发展起来的。它研究的内容包括对药物的一般毒性、特殊毒性以及对靶器官的毒性作用机制。这些研究为正确评价药物的安全性、危害性提供科学依据, 对临床的安全用药具有重要意义。从生物学的观点看, 一种药物的毒性是由许多可变因素决定的, 并受到多种因素的影响, 如药物的理化性质, 吸收途径, 进入生物体内的转运、转化过程及所产生的毒性反应是否可逆等。此外, 毒性反应并不限于一般的反应, 在剂量足够大时, 几乎所有的药物都产生特殊类型的毒性, 例如因某一特殊器官或某一特殊的酶活性受到影响而引起的中毒症状等。因此, 药物毒理学还要研究药物的这些特殊毒性作用。

随着分子生物学的迅猛发展, 分子毒理学成为近年来毒理学领域发展最快的分支学科。从人类基因组计划到环境基因组计划, 表明人们对分子水平探讨并最终阐明毒理学问题寄予希望。分子毒理学是在毒理学的发展过程中, 受到分子生物学理论和技术的影响而发展起来的, 它是从分子水平上研究外源化合物与生物机体相互作用的一门学科。分子生物学理论与技术的飞速发展给毒理学工作者提供了新的启迪和工具, 从而改变了传统毒理学研究的基本格局, 真正实现了从整体和器官水平向细胞和分子水平的飞跃, 在阐明毒物对机体损伤作用和致癌过程的分子机制方面取得了重要的突破, 形成了一些新的研究热点: 一方面, 是探讨众多的外源化合物对生物机体组织中的各种分子, 特别是生物大分子的作用机制, 从而阐明外源化合物的分子结构与其毒效应的相互关系; 另一方面, 则是要从分子水平上表述生物体对外源化合物所产生的效应。分子毒理学发展建立了许多新的分子生物标志物的检测方法, 成为沟通毒理学实验研究与人群流行病学调查的“共同语言”, 使宏观与微观研究有机地结合起来, 改变了化学物质危险度评价的模式, 为多种中毒性疾病的防治以及化合物危险度的评价提供重要的理论根据。

第二节 药物分子毒理学发展简史

一、古代与中世纪毒理学

毒理学的历史可能与人类历史一样悠久，它最早起源于人类对毒物和中毒的研究。我国古代医药文献以及古埃及、印度、希腊、罗马和阿拉伯等国家的相关文献中，都有关于动物、植物和矿物毒物及其解毒剂的记载。毒理学一词源于希腊文字“toxikon”，是指发射毒箭的弓或浸泡箭头的毒物（poison）。

我们的祖先常用动物的毒液和植物的提取液来涉猎、作战和暗杀。神农被认为是中医、草药和农业之父。我国古书籍《淮南子》的《修务训》篇中载有“神农尝百草之滋味，一日而遇七十毒”。约在公元前 2735 年，他编辑完成了 40 卷“本草”典籍，其中包括有毒植物目录、有药用价值的植物 365 种以及药物 265 种（例如碘、乌头或箭毒、鸦片、大麻、大黄、硫黄和汞等），同时还描述了这些植物和药物的作用以及相应的解毒剂。此外，公元前 2650 年，黄帝撰写了《内经》，并在后来成为大多数中医药著作的基础。

国外有关毒物和解毒剂的第一本著作出自古埃及人，完稿于公元前 1553 年至公元前 1500 年间，后被德国古埃及学家 Ebers 发现并以他的名字命名为 Ebers 文稿，其中记载了 700 多种毒物和药物（如毒芹、乌头、鸦片、大蒜、硫黄、明矾、苏打、铅、铜等）、875~900 个处方以及 47 例病史。古印度人对医学最重要的贡献是外科学，但他们也有自己的有关毒物和解毒剂的文献记载。公元前最后几个世纪，Susruta 出版了一本医学、外科学教科书，全书分为六章，介绍了 1 120 种疾病，列出了 760 种本地药用植物，描述了动物和矿物疗法。

古希腊人认为，他们对植物毒物、金属毒物和解毒剂有着深入广泛的了解。古希腊人对毒理学发展的贡献主要包括毒物和解毒剂的综合目录、植物和金属生物学效应的实验研究。在毒理学方面作出重要贡献的主要代表人物有：Pathagoras（公元前 580—公元前 489），他提出了疾病和中毒的因果关系理论、体液平衡理论，并对金属在机体内的生物学效应进行了研究；Hippocrates（公元前 460—公元前 355），他强调营养、饮食的重要性，并认为过多过少的饮食同样有害，健康是体液平衡的结果，空气、水、土壤、气候等环境因素均能影响健康；Theophrastus（公元前 370—公元前 286）是为生物学和毒理学作出重大贡献的 Aristotle 最著名的学生，被认为是食品毒理学的奠基人，他的《理论植物学》和《植物史》被视为现代植物学的开端和极好的医用植物学教材；Mithridates 六世（公元前 120—公元前 63）可能是系统研究人体毒物的第一人，因而被认为是临床毒理学的创始人；Dioscorides（40—90）最先尝试将毒物分成植物毒物、动物毒物和矿物毒物，他也是发现汞毒性的第一人。

在中世纪，有关毒物研究的新贡献很少，主要源于伊斯兰教国家的医生和炼金术士。他们首次发现氯化汞的作用特征，应用三氧化二砷代替三硫化二砷制备毒药在毒理学发展史上产生了深远的影响。文艺复兴前，Mainodides（1135—1204）在他的著作《毒物及

其解毒剂》中详细记载了有关昆虫、蚊和狂犬咬伤的抗毒疗法以及植物和矿物中毒的呕吐、导泻疗法。

一个世纪后, 医学教授 Petrus (1250—1316) 在阅读希腊和阿拉伯人著作的基础上, 撰写了一本《关于中毒》的书。书中将毒物分为植物源性、矿物源性和动物源性三大类, 并列出了所有已知毒物的中毒症状和治疗方法。中世纪末期和意大利文艺复兴时期, 中毒的艺术被推向了顶峰, 毒物常被用于谋杀和政治暗杀, 这可能就是此书广为流传的原因, 自 1472 年始共出版了 14 次。

二、启蒙时代的毒理学

中世纪后期科学和医学史上重要的人物是文艺复兴人 Paracelsus (1493—1541), 他被誉为弗洛伊德学说的先驱、化学解剖家、药物化学创始人和现代化学疗法的教父。他一生阐述了许多革命性的观点, 成为现代毒理学、药理学和治疗学中的重要组成部分。他认为: ①实验对于检测化学物的反应是重要的; ②必须区分化学物的治疗和毒作用特征; ③这些特征有时并非总是除了剂量外就不可区分; ④可以确定化学物的特异性程度及其治疗作用或毒性作用的程度。他提出, 哲学、天文学、化学和美德应当成为医学的四大支柱。他的著名格言: 所有物质都是毒物, 不存在任何非毒物质, 剂量决定了一种物质是毒物还是药物。

工业革命快速发展导致许多职业病发病率升高。卓越的意大利内科医生 Ramazini (1633—1714) 首先描述了岩石工硅沉着病、陶器工坐骨神经痛、镀金工眼炎和铅中毒, 他是职业、工业医学的创始人。1755 年英国著名职业医学、毒理学家和矫形医生 Pott (1714—1788) 描述了烟囱清扫工接触煤烟与其患阴囊癌之间的因果关系, 这是多环芳烃致癌作用的首例报道。意大利内科医生、生物学和博物学家 Fontana (1720—1805) 进一步发展了靶器官毒性概念, 提出中毒症状是毒物作用于特殊器官的结果, 被认为是第一位研究毒物的现代科学家。

19 世纪掀起了工业和政治革命的浪潮, 1800 年出现了有机化学, 1825 年合成了光气和芥子气, 后被用于第一次世界大战。到 1880 年, 合成的有机化合物超过了 10 000 种。随着有机化学的发展, Magendie (1783—1855)、Orfila (1787—1853) 和 Bernard (1813—1878) 等真正开始了实验毒理学的创新性研究工作, 为药理学、实验治疗学和职业毒理学奠定了基础。Orfila 是应用化学方法研究毒物的先驱, 长期以来被认为是现代毒理学的奠基人。他是一位服务于法国巴黎法院的医生, 是第一位利用尸检材料和系统化学分析作为中毒法律依据的毒理学家, 为法医学和法医毒理学作出了巨大贡献。Magendie 是 19 世纪第一位伟大的实验生理学家, 他研究了依米丁、土的宁和箭毒的作用机制; 他著名的学生之一 Bernard 不仅研究了箭毒对神经肌肉传导作用的本质, 还对 CO 中毒机制进行了研究, 提出了 CO 与血红蛋白的不可逆性结合导致机体组织缺氧是 CO 中毒的原因, 这些研究成果至今都被奉为毒理学和药理学的经典。生理学实验方法的成功和分析化学的显著进展大大促进了药理学的发展。19 世纪末 20 世纪初许多德国科学家为毒理学的发展作出了重大贡献。Schmiedeberg (1838—1921) 和 Lewin (1850—1929) 是其中的两位天才, Schmiedeberg 着重研究了不同种属动物肝脏马尿酸的合成和肝脏的解毒机制; Lewin 主要研究了尼古丁和其他生物碱的慢性毒性, 并开展了对甲醇、甘油、丙烯醛和氯仿毒性的

早期研究。上述研究充分体现了毒理学和药理学的相互联系、互为补充的鲜明特点，也正是这些研究为现代毒理学和药理学“三个时相”的发展奠定了科学基础。

三、现代毒理学

通常认为 20 世纪初叶是现代毒理学发展的开始，然而本学科的快速发展是在“二战”时期，这时期的药品、农药、军需品、合成纤维以及工业化学物生产急剧增加。毒理学作为一门集成和应用科学，在广泛应用合成化学、现代医学、药理学、物理学、生物学和统计学等理论与技术的同时，也让几乎所有的基础科学来检验其假设，从而使它在科学史中出类拔萃。

由于 19 世纪末期美国“专利”药品的使用非常流行并造成多起中毒事故的发生，在农业部负责人 Wiley (1844—1930) 的督促下，1906 年通过了第一个《美国食品与药品法》；1914 年建立了工业卫生部；1918 年 *Journal of Industrial Hygiene* 创刊。同时，主要化学品生产商开始建立企业内部的毒理学研究实验室。

20 世纪 20 年代，许多事件的发生形成了毒理学研究领域的雏形：砷化物治疗梅毒导致的急、慢性中毒，促进了第一次世界大战后毒理学研究的发展；美国的禁酒令使科学家们开始了早期神经毒理学的研究，发现了 TOCP、甲醇和铅都是神经毒物；Mueller 发现的 DDT、六氯苯和六六六等有机氯杀虫剂得到了广泛应用；在研究雌激素和雄激素结构与活性的科学家中，Dodds 等合成了 DES、己烯酚和其他二苯乙烯类物质，并发现了具有强雌激素活性的替代性二苯乙烯。

20 世纪 30 年代，美德制药工业致力于抗生素的大规模生产，1930 年实验毒理学杂志之一 *Archives of Toxicology* 创刊，同年在美国成立了 NIH (美国国家卫生研究院)。1937 年引起急性神经衰竭和死亡的“磺胺事件”，促使了 1938 年 Copeland 议案的通过，随后的第二个重要议案是成立美国 FDA (食品和药物管理局)。“磺胺事件”作为“二战”期间的第一个重要事件，在毒理学发展中起了重要作用，而致力于磺胺和乙烯乙二醇毒性机制研究的科学家 (以芝加哥大学的 Geiling 和 FDA 的 Lehman 为代表)，在随后 40 年中成了毒理学研究的领头人。

20 世纪 40 年代前后，机制毒理学的研究使人们加深了对许多化合物毒性作用的了解并研制出许多解毒剂。例如，用二巯基丙醇 (BAL) 治疗砷化物中毒，用硝酸盐和硫代硫酸盐治疗氰化物中毒，用解磷定 (2-PAM) 治疗有机磷农药中毒等。“二战”期间，芝加哥小组参与了三个主要研究领域的工作：有机磷农药、抗疟药和反射性核素的毒理学和药理学研究。其中，对有机磷胆碱酯酶抑制剂的发现被认为是“二战”期间的第二个重要事件，这类化学物是由 Lange 和 Schrader 发现的，并成为后来几十年中开展神经生理学和毒理学研究的主要驱动力。今天的毒理学家从 20 世纪 40 年代化学致癌研究者身上也获益匪浅。Miller 夫妇的开创性研究工作发现了活性中间体在致癌中的作用以及混合功能氧化酶在内质网中的作用。这些发现以及 1944 年的纸色谱法和 1984 年反射性标记二苯并蒽的使用，促进了对细胞色素 P450 蛋白家族的大量研究工作的开展。

20 世纪 50 年代，美国著名管理毒理学家 Lehman 与 Fitzhugh 还首次共同提出安全系数 (SF) 的概念，世界卫生组织 (WHO) 根据安全系数 (SF) 提出了每日允许摄入量 (ADI) 的概念，Coulston、Lehman 和 Hayes 共同创办了毒理学权威杂志 *Toxicology and*

Applied Pharmacology (《毒理学与应用药理学》)。

20 世纪 60 年代, 震惊世界的“反应停事件”(1961) 和 Carson 的著作《寂静的春天》的出版(1962), 极大地推动了毒理学科学的发展。其后, 通过了许多新的法规, 创办了许多新的杂志, 成立了国际毒理学协会(1965), 扩展了毒理学教育, 吸纳了包括环境科学、水生生物学、鸟类生物学、细胞生物学、分子遗传学和分析化学等多个学科的知识。20 世纪 60 年代后 5 年, 由于发展了化学物的超痕量(10^{-9}) 分析和快速检测突变的技术以及在研究 TCDD 的毒性机制后发现芳烃受体(AhR) 是一种高亲和力的细胞结合蛋白, 毒理学迅速发展并逐步形成了细胞毒理学、分子毒理学、受体毒理学等新的分支学科, 同时危险度评价成为毒理学研究的主要工作。

20 世纪七八十年代, 涉及毒理学的相关法规、杂志和新的协会呈指数扩展。20 世纪 70 年代中期, 核酸测序方法的出现使机制毒理学研究有了新的发展和突破, 基因在代谢激活和解毒方面的作用成为现代毒理学研究的前沿领域。1975 年问世的 *Casarett&Doull's Toxicology* 至今已出了 6 版, 1982 年出版的由 Hayes 主编的 *Principles and Methods of Toxicology* 至今已再版 4 次, 1997 年出版的由 Sipes 等主编的毒理学参考书 *Comprehensive Toxicology* 共有 13 卷。

四、分子毒理学发展史

分子生物学的发展经历了启蒙、奠基和高速发展(1970 年到现在) 三个阶段。有人将第三阶段称为分子生物学的第二次革命, 在此期间, 大量的新概念和新技术不断涌现, 并迅速地向其他学科渗透, 毒理学也随之向分子水平进发。

1975 年, Ames 试验问世。使用的组氨酸合成缺陷型鼠伤寒沙门氏菌株, 就是通过基因工程而制备的, 可算是分子生物学方法用于毒理学研究的典型事例。

1973—1978 年, 通过多年的研究终于弄清楚了苯并(a) 芘经过代谢活化形成的最终致癌物是 (+) 苯并芘 7, 8 二醇-9, 10-环氧化物-2, 它能与 DNA 结合并具有致突变性。

1982 年, 发现小鼠肝脏内含有芳烃受体(Ah receptor)。

1982 年, 测出了细菌(*Pseudomonas putida*) P450cam 的氨基酸序列, 它的立体分子结构随后于 1985 年也得到阐明。

20 世纪 70 年代以来的 20 余年, 学术界关于致癌基因与抑癌基因的研究, 为环境致癌作用提供了理论基础, 并逐渐促成多阶段致癌学说的形成。近年来, 基因的多态性成为研究的热门课题, 对阐明诱发肿瘤的个体特异性提供了理论依据。

由于基因克隆技术的飞速发展, 近年来, 有关分子毒理学的基因克隆也进展神速。例如, 细胞色素 P450 酶系, 甚至每周竟有 2~3 个新 P450 酶被发现, 目前已有大约 1 000 个 P450 酶被克隆和测序。从这一窗口可见分子毒理学已日趋成熟, 并正在迅速地向发展。

第三节 药物分子毒理学发展趋势

近 20 年来, 细胞与分子生物学理论和技术的飞速发展赋予毒理学工作者新的启迪和

工具,从而改变了传统毒理学研究的基本格局,真正实现了从整体和器官水平向细胞和分子水平的飞跃,在阐明毒物对机体损伤作用和致癌过程的分子机制方面取得了重要的突破,形成了一些新的研究热点,建立了许多新的分子生物标志物的检测方法,成为沟通毒理学实验研究与人群流行病学调查的共同语言,使宏观与微观研究有机地结合起来,改变了化学物质危险度评价的模式,大大促进了药学和其他生物科学的发展。

一、分子毒理学研究的几个热点

1. 机体对环境应激的反应和应激蛋白的形成

生物体无论是处于高温或非高温应激条件下(如缺血、缺氧、氧化应激、感染及接触某些化学物和药物等)都会产生一系列普遍而保守的应答,诱导细胞中基因表达谱的改变,合成一组保守的热休克(应激)蛋白(heat shock/stress proteins, HSPs),其他参与细胞正常功能的基因表达则暂时受到抑制。HSPs具有重要的生物学作用,如保护细胞或生物度过暂时的危险状态;再次面对应激时,其耐受性增高;在机体生长、发育、分化等生理过程中起重要作用;作为分子伴侣,参与蛋白质的折叠、装配、降解、转移和修复;与一些重要的生物活性物质,如某些激素、干扰素、白细胞介素、癌基因等有密切联系,与肿瘤的发生有关。因此,HSPs基因表达及其调控机制日益为人们关注,成为当今国际研究的热点。另一类重要的应激蛋白是金属硫蛋白(metallothionein, MT),它是一种低分子量、富含半胱氨酸、具有热稳定性的金属结合蛋白,可被有毒金属如镉、汞、砷等所诱导。近年来发现,接触其他的化学物(如 CCl_4 、甲萘酚)和某些人体必需的元素如铜、锌及氧化应激等,也能诱导组织产生MT。MT除结合重金属外,本身也有清除氧自由基的作用。最近,国外用转基因技术研制出MT高表达和删除MT的转基因动物,用于研究MT的功能(如抗氧化应激、对肝和肾毒性的拮抗作用等)。我国已有许多单位对MT的诱导、生物学特性、分离鉴定及其与靶器官(肝、肾等)毒性的关系开展了广泛的研究。

2. 毒物对细胞周期监控关卡机制的影响

细胞增殖是生命过程的基本特征,与机体的生长发育、创伤的愈合、组织器官分化、细胞程序性死亡都有密切联系。但是,细胞的异常增殖在肿瘤的发展过程中起重要作用。近年来,对于细胞增殖与致癌的关系的研究已逐渐深入到化学致癌物如何影响细胞周期的调控方面。细胞周期是一个程序性的、周而复始的级联过程,有赖于一种称之为细胞周期关卡(checkpoints)的监视控制机制来完成。这种关卡在接触毒物后维持细胞周期中DNA的稳定性方面起重要作用,能暂时中止或推迟细胞周期的进程,给细胞提供足够的时间在下一个周期到来之前修复DNA损害。现已明确,这个体系是由真核细胞中专门控制细胞周期的一系列基因的表达产物组成,其中,以周期素(cyclin)和周期素依赖性蛋白激酶(cyclin-dependent kinase, Cdk, 又称Cdc)最为重要。当细胞接触遗传毒物时,引发出各种细胞反应来诱导Cdk的抑制蛋白,在细胞周期的不同控制点(如G1和G2期)与Cdk结合或与cyclin/Cdk复合物结合,形成不同的屏障,从而抑制cyclin/Cdk活性,发挥关卡作用。例如,P53是一种生长性抑制蛋白,当DNA受损时,刺激P53蛋白短暂地蓄积,细胞周期停止在G1期中,DNA合成复制,使之有足够时间修复损害的DNA,保证细胞基因组的稳定。目前已知的抑制蛋白质还有P15、P16、P18、P21和

P27 等。

3. 环境毒物对细胞信息传递过程的影响

细胞信息传递是 20 世纪 80 年代以来生物学研究领域中最活跃的一部分。细胞内信息传递系统的基本结构主要由特异性的膜受体、G 蛋白、一系列第二信使蛋白 [如 cAMP、cGMP、二酰基甘油 (DAG)、IP₃、Ca²⁺] 及蛋白激酶、靶向功能蛋白和多种控制蛋白组成。近年来,两种气态第二信使 NO 和 CO 的传递系统也基本明了。此外,某些细胞外信息(如甾体激素类)可直接进入细胞内与细胞内受体结合,然后进入细胞核,改变基因的表达。各种毒物可在细胞信息传递途径的各个环节起作用。例如,一种非常重要的环境污染物——TCDD 可结合到 Ah 受体使其活化,与转录因子(Ah 受体转运蛋白)形成异二聚体,这种三元复合物结合到 DNA 的调控序列上,使某些蛋白(如 CYP1A1、CYP1A2)表达出现改变,其中有些蛋白与毒物的活性有关。过氧化小体增殖剂(PP)活化受体(PPAR)是一种配基活化的细胞内转录因子,通过修饰基因而导致过氧化小体内酶的表达增加。近年来,引起人们普遍关注的所谓环境激素(或称外源性内分泌干扰物质)就是通过模拟内源性激素(雄激素或雌激素)与这些激素的受体结合,造成内分泌失调,影响机体的生长发育和生殖机能甚至诱发肿瘤。多氯联苯、DDT 和 TCDD 就是这样的物质。许多重金属、农药和引起氧化应激的毒物,可通过与 cAMP、Ca²⁺、IP₃ 等第二信使作用而影响细胞信息传递。大量研究还表明,细胞的增殖和分化,癌基因和抑癌基因表达,肿瘤的启动、促进、进展以及转移,细胞凋亡乃至各种细胞的应激过程,细胞信息传递都在其中起重要的作用。

4. 氧化应激与细胞损伤、老化和肿瘤发生的关系

氧化应激是指机体或细胞中的促氧化和抗氧化之间作用失衡,倾向于氧化,而导致的机体可能出现的损害。一般由外源性或内源性自由基(最常见的是活性氧 ROS)的产生和机体抗氧化体系的缺陷引起的。目前已将研究重点从脂质过氧化向其他生物大分子如蛋白质和核酸的氧化损害深入。

蛋白质是自由基攻击的重要靶分子。几种与蛋白质功能相关的氨基酸成分,如组氨酸、半胱氨酸、蛋氨酸、酪氨酸等,对自由基特别敏感。已证实,自由基介导的蛋白质破坏甚至比脂质过氧化发生得更早。最近,Dean 的研究组提出这样的假设(并在以后的实验中得到了证实):在自由基攻击的蛋白质分子上,形成两种活性中间体:一种是氧化产物,蛋白氢过氧化物;另一种是还原产物,称为蛋白结合的还原基团,实际上是蛋白结合多巴。这两种产物,特别是后者可进一步发生氧化还原循环,产生新的自由基,攻击邻近的蛋白质或核酸。最近在镍化合物致癌、致突变机制研究中也观察到了这种现象。在动物实验和人类老化过程中,亦观察到一种蛋白质氧化产物——蛋白羰基含量的增高。蛋白质氧化修饰可引起酶活力的改变,这种改变主要是由于蛋白质降解和交联,特别是蛋白巯基的氧化所致。蛋白质的氧化使它们对酶促的和非酶促的蛋白质水解反应更为敏感,导致蛋白质的破坏和病理性组织降解。这一过程被认为与机体老化过程中的一些退行性变,如动脉粥样硬化的形成和神经系统的退行性变有关。

活性氧可对 DNA 产生许多不同类型的损害,归结起来,可分为链断裂与碱基修饰两大类。例如, —OH 可迅速与核酸反应,形成许多不同类型的碱基修饰产物。其中,以 82 羟基鸟嘌呤(82OHdG) 最常见且数量最多,故通常以 82OHdG 作为 DNA 氧化损害的

重要指标。近年来已证实,许多能诱导活性氧生成的外源或内源化学物和物理因素均可致 82OHdG 生成增加。已经发现某些致癌物所引起的 82OHdG 形成与肿瘤发生相关。另一方面, —OH 攻击 DNA 分子中的核糖也造成 DNA 链断裂,其位点可能在核糖的 C3 和 C4 上。自由基攻击胸腺嘧啶碱基造成的损害,经修复酶切除也产生类似的单链断裂。修复 DNA 断裂的酶也因受自由基攻击而减少其保真度,因此,链断裂与碱基修饰均可导致基因突变。链断裂可能造成部分碱基的缺失,也可能引起癌基因的活化。

ROS 与 DNA 相互作用似乎也影响某些基因的调节,可能是通过改变调节基因表达的转录因子或酶而起作用,参与化学致癌过程。最近的研究还发现, DNA 受损后诱导一类蛋白激酶——DNA2PK 的活化,这类激酶在识别 DNA 损害、转导 DNA 损害信号以及通过改变细胞代谢来促进 DNA 修复方面都起着必不可少的作用。DNA2PK 对许多转录因子磷酸化的能力在调节转录方面也起着十分重要的作用。

5. 毒物引起的钙稳态失调与细胞毒性

Ca^{2+} 是一种重要的第二信使,对维持细胞的稳态和信息传递起重要作用。由各种毒物引起的生物膜损害、 Ca^{2+} 转运酶损害及离子通道改变均可造成细胞内特别是胞浆游离 Ca^{2+} 的过度负荷(超载)。近年的研究热点在于细胞内钙升高如何导致细胞死亡, Ca^{2+} 超载除通过细胞信息传递途径的紊乱对细胞造成损害外,还与下述机制有关:

(1) 钙依赖的降解酶活化:包括蛋白酶(如 calpains)、磷脂酶(如磷脂酶 C、磷酸酶 A2)和核酸内切酶的活化。这些酶活力的异常增高势必造成一些与细胞功能相关的蛋白质、磷脂和 DNA 的降解。

(2) 细胞骨架的变化:胞浆 Ca^{2+} 增高对于细胞骨架的成分包括肌动蛋白、微管蛋白和中等纤维产生一系列不稳定效应,导致质膜大疱形成。

(3) 线粒体损害:线粒体中存在着不同的 Ca^{2+} 摄取和释放途径,形成线粒体 Ca^{2+} 循环,这一过程持续不断地利用膜电位提供的能量。 Ca^{2+} 摄取时,膜电位下降,当大量 Ca^{2+} 蓄积于线粒体上,就可能造成膜电位崩溃,从而造成线粒体呼吸和氧化磷酸化等能量代谢障碍。

(4) 基因激活作用:如 c-jun 和 c-myc 等的表达是 Ca^{2+} 依赖性的,并涉及蛋白激酶 C 和钙调蛋白激酶。

6. 毒物与细胞凋亡

国外对细胞凋亡的机制和基因调控做了大量研究,已知有几类基因参与凋亡:一类基因促进细胞凋亡的发生发展,包括野生型 p53、白细胞介素 1B 转换酶基因(1CE)、fas 基因、c-fos 癌基因、腺病毒 E1A 基因、nur77 基因等;另一类基因抑制细胞凋亡发生,如突变型 p53 基因、ras 癌基因、bcl22 基因等。细胞凋亡过程中的主要生化改变除了 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 依赖的核酸内切酶的活化而引起的 DNA 片断化外,一系列蛋白水解酶起着重要作用,其中,ICE 样半胱氨酸蛋白酶(现称 caspase)在凋亡信号转导中起重要的作用。

近年来,凋亡的毒理学意义受到关注。当细胞受到毒物损害时,是否产生凋亡,要视毒物剂量而定,大剂量毒物往往直接导致细胞坏死而无法观察到凋亡产生。许多环境物理、化学因素在一定条件下确可造成细胞凋亡,如无机铬、锰、镉、汞和有机锰、苯巴比妥、 α -六氯环己烷、三氯乙烯、TCDD、常见的致癌剂以及 X 射线、C 射线等。由

于许多研究报告都是在离体条件下进行的, 所得资料尚难以代表环境接触下机体组织或细胞的变化实况。

7. 毒物代谢酶遗传多态性

过去研究代谢酶多态性多以特定的模型药物代谢速率或通过电泳酶谱所出现的变异来反映其表型。20 世纪 80 年代以来, 由于 DNA 重组和克隆技术的广泛应用, 一系列重要的人类外源化学物代谢酶基因相继被克隆, 相应的变异等位基因接连被发现, 并推测其与表型上代谢多态性及可能的环境风险程度相关联。

近年来, 研究最为深入的有以下三类:

(1) 细胞色素 P450 (CYPs): 截至 1997 年底, 据报道, 15 种人类细胞色素 P450 基因, 包含亚型 150 种以上, 其中有 8 种已证明存在表型或基因型多态性, 研究较多的有 1A1、2D6 和 2E1, 这些亚型均可能与环境中毒物和致癌物的代谢有关。某些 CYP 亚型与肺癌敏感性的关系很早就引起注意。有研究表明, 人外周血淋巴细胞内 CYP1A1 水平与人群肺癌发病率呈正相关, 在小鼠实验中也得到证实。另一受到注意的 CYP 亚型是 CYP2D6, 早年文献中称之为异哇胍 (debrisoquine) 水化酶。根据个体对异哇胍的代谢能力将人群分为强代谢型 (EM) 和弱代谢型 (PM)。许多研究表明, EM 与肝、肠和肺部癌症易感性相关联, 尤其是与吸烟有关的肺癌, 但也有对立的结论。有人从与 PM 状态有关的基因型在白血病、膀胱癌和黑色素瘤高比率的现象出发, 认为 CYP2D6 对于与环境有关的、肺部以外的恶性肿瘤的发展可能有保护作用。国内一些单位曾对有机磷农药、肝毒物 (TNT、黄磷、氯乙醇、 CCl_4 等)、重金属和氯乙烯与 CYPs 的关系进行过系统的研究, 取得了一些重要成果。

(2) 谷胱甘肽硫转移酶 (GSTs): 一组具有多种生物活性的蛋白质, 催化 GSH 与多种亲脂性化合物的亲电子中心结合, 成为 GSH 结合物, 多种致癌物就是通过这种代谢方式排出体外的, 减少了形成 DNA 加合物的机会。人类 GSTs 主要包括四大类: GSTA、GSTM、GSTT 和 GSTP, 每大类各有其亚型, 它们在各组织器官的分布有较大差异。国外曾进行过不同人种 GSTs 各亚型分布及其与系统癌症易感性关系的研究, 但结果不尽一致。国内进行了 GSTM1 缺陷型人群大肠癌易感性的研究, 虽尚未能证实两者有明确联系, 但 GSTM1 缺陷型人群对于肺癌, 特别是肺腺癌的易感性明显增高。

(3) 乙酰转移酶 (NATs): 人类有 NAT1 和 NAT2 两型。人群中乙酰化表型可分为纯合快型、杂合慢型。近年来, 多个流行病学调查结果表明, 乙酰化慢型是膀胱癌的敏感因素。有人提出乙酰化快型患者易患大肠癌。我国上海市和江苏省的调查表明, 乙酰化慢型者罹患膀胱癌和肝癌的危险性增大。

8. 化学致癌机制

近 20 年来, 肿瘤基础研究的最重要进展是癌基因和抑癌基因的发现及其作用机制的阐明。在化学致癌机制上, 统一了基因学派的体细胞突变学说和基因外学派的基因表达与调控学说。

最近对化学致癌的新认识如下:

(1) 化学致癌是多基因 (多种癌基因、抑癌基因、细胞凋亡相关基因和肿瘤易感基因) 共同参与的过程。

(2) P53 抑癌基因的作用是通过整合细胞对各种危急状况的反应, 控制细胞周期关

卡和启动细胞凋亡几个不同途径而维持基因组的稳定性,起抑制肿瘤的作用。

- (3) 多重肿瘤抑制基因——P16 基因的发现。
- (4) 确定端粒酶激活与肿瘤发生的关系。
- (5) DNA 甲基化/脱甲基化对癌基因、抑癌基因转录活化的影响。
- (6) 细胞间隙连接 (gap junction) 通信破坏与肿瘤形成的关系。

二、分子生物标志物及其应用的研究

分子生物标志物反映的是外来理化及生物因素与机体细胞,特别是生物大分子(核酸、蛋白质)相互作用引起的一切分子水平的改变。与其他生物监测指标相比,分子生物标志物在准确、敏感地评价早期、低水平的损害方面具有独特优势,因而在评估这些因素对人类的危险度和评价预防措施的效果方面具有广泛的应用前景,并成为分子流行病学调查的重要手段。目前,我国已开展了包括接触标志物、效应标志物和易感性标志物三大类数十种分子生物标志物的研究,如 DNA 加合物、蛋白质加合物、DNA-蛋白质交联、DNA 断裂与交联、癌基因和抑癌基因及其表达产物、体细胞和生殖细胞基因突变检测以及毒物代谢酶 GSTs、CYPs, N-乙酰基转移酶 (NATs) 多态性等。这些标志物都是以基因和蛋白质水平的改变为终点的,有些标志物已应用于人群。

三、细胞与分子生物学新技术在毒理学领域的应用

近年来,我国毒理学领域所取得的前所未有的巨大进展,很大程度上得益于分子生物学新技术的引进和应用。在常规的基因重组与克隆技术、核酸杂交技术、PCR 和 DNA 测序技术的基础上,我国一些科研单位和高校已将转基因动物和转基因细胞、穿梭质粒、荧光原位杂交、差减杂交以及差异显示技术、单细胞电泳技术和流式细胞仪技术应用于检测 DNA 损伤、已知或未知的基因突变、染色体畸变和筛选疾病相关基因等方面。这些技术具有终点明确、敏感性高等优点,大大提高了毒理学研究的整体水平。

四、环境基因组计划简介

继人类基因组计划 (Human Genome Project, HGP) 之后,1998 年 2 月 4 日,美国国家环境卫生科学咨询委员会 (NAEHSC) 批准了定名为环境应答基因及其对人类健康的影响的项目,即环境基因组计划 (Environmental Genome Project, EGP)。目前,有五大类 200 种以上的候选基因在核心研究的考虑之中,包括控制毒物分布和代谢的基因、DNA 修复途径的基因、细胞周期/细胞死亡控制系统(包括细胞凋亡)的基因、核酸前体代谢的基因以及控制其他类基因表达的信号传导系统的基因。其中大约有 100 种是调节细胞色素 P450、NATs、GSTs、葡萄糖醛酸转移酶、硫转移酶、甲基转移酶、金属硫蛋白和对氧磷酶的代谢及解毒基因的,约 50 种是 DNA 修复基因,还有 50 种是毒物受体基因。DNA 修复基因纠正发生于 DNA 配对、核苷酸剪切、碱基剪切和重组时的错误,不能有效修复这种错误,将引起皮肤和其他癌症。毒物受体基因包括 Ah 受体、雌激素受体、黄体激素受体和致内分泌紊乱物质受体等基因。在一些重要的毒理学领域,如神经毒理学、生殖毒理学和发育毒理学中,有关基因的变异也是重要的候选基因。涉及营养途径和营养物如维生素及矿物质代谢的基因约占 25 种,另外约 25 种是参与雌激素、孕激素和睾