

微核试验

WEIHE SHIYAN

原理、方法及其在人群监测和毒性评价中的应用

曹 佳
林 真(日本) 等编著
余争平

军事医学科学出版社

微核试验——原理、方法 及其在人群监测和毒性 评价中的应用

曹 佳 林 真(日本) 余争平等 编著

事医学科学出版社
·北 京·

内 容 提 要

微核试验是检测外来化合物对染色体损伤作用的重要方法,也是监测职业暴露人群遗传损害的重要指标,已在国内外普遍应用。本书共十一章,详细介绍了微核试验的原理、微核形成的动力学,以及在小鼠红细胞、人外周血淋巴细胞、人上皮脱落细胞、大鼠肝细胞、植物紫露草等检测材料中的应用,并提供了详尽的试验方案。最后3章介绍了微核对非整倍体的检测,微核的流式仪和图像的自动化检测研究进展。附录中收录了化学诱变剂中、英文(拉丁文)目录、标准微核试验方案等。

本书由中、日、德、瑞典等国数名长期从事微核研究的专家共同撰写,可供卫生毒理、卫生防疫、环境科学、预防医学、生物学等领域的科研、教学与技术人员作为理论和实际结合的工具书使用。

* * *

图书在版编目(CIP)数据

微核试验:原理、方法及其在人群监测和毒性评价中的应用/曹佳等编著.

—北京:军事医学科学出版社,2000.4

ISBN 7-80121-208-8

I.微… II.曹… III.细胞诊断 IV.R446.8

中国版本图书馆 CIP 数据核字(1999)第 67258 号

* *

军事医学科学出版社出版

(北京市太平路 27 号 邮政编码:100850)

新华书店总店北京发行所发行

北京四环科技印刷厂印刷

*

开本:850mm×1168mm 1/32 插页:2 印张:9.5 字数:244 千字

2000 年 4 月第 1 版 2000 年 4 月第 1 次印刷

印数:1-3000 册 定价:15.00 元

(购买本社图书,凡有缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换)

序 言

随着社会的发展和科技的进步,环境问题的重要性和迫切性越来越得到人们的认识 and 关注。环境因素成为很多疾病发生和影响人群健康的重要原因,如有报道称 80% 左右癌症的发生与环境因素密切相关。为防治疾病,增进健康,必须在“源头”上下功夫,也就是要以“预防为主”。通过一系列试验方法,以发现诱发疾病的各种有害环境因素,并设法与之脱离接触或将剂量控制在安全范围内,即能降低疾病的发病率。

环境污染产生的一个严重问题,是可能损害生物体的遗传物质,产生诸如“癌变、畸变、突变”的严重后果,因而需要重点评估环境损害的遗传毒性。可喜的是,近年来人们建立了从原核、真核细胞到整体动物在内的一系列试验方法,用以评估化合物的遗传毒性,其中,微核试验就是广泛使用的一种重要方法。

微核试验的最大优点是经济、简便、快速,这正好符合众多环境化合物需要快速初筛和大量职业暴露人群需要动态检测的目的,因而尤其得到广大医务工作者的钟爱。微核试验从建立到现在已经有二十多年了,国内外大量的研究表明,它在敏感性、特异性和准确性上与染色体畸变分析基本相当,而实验方法却简单得多。这也是为什么微核试验得到越来越广泛应用的原因。

我校分子毒理学教授曹佳博士长期从事微核研究,在微核形成机理、自动化检测及方法学研究方面,都有自己的研究成果。他在德国工作的二年多时间里,又结识了国际上一批从事微核研究的专家,如 Adler 博士、Nusse 博士和 Hayashi 博士等。他们今天携起手来,共同撰写了这本《微核试验——原理、方法及其在人群

监测和毒性评价中的应用》的专著,是一件十分可喜可贺的事。这是由中外专家合著,在我国出版的第一部有关微核的专著。这部专著着眼于微核试验,而又阐述有关理论基础,即在理论与实际的结合上,对微核问题作了有理论深度和可实际应用的全面的论述,既可作为工具书,又可从中学习相关理论知识。我相信这一专著的编写出版必将对环境科学和医学科学作出贡献。

中国工程院院士 程天民
第三军医大学教授

1999年9月1日于重庆

前 言

随着工业的飞速发展,成千上万新的化学物质和“三废”(废气、废水、废渣)不断地进入我们的生活 and 环境中。同时在生活中还要接触到许多物理因子(如射线、微波、电磁辐射等)和生物因子(如细菌、霉菌及其生物毒素等)。这些化学、物理、生物因素中有许多可能对人类的遗传物质(染色体、基因、DNA)产生损害,造成“致癌、致畸、致突变”(简称“三致”)等遗传毒理效应,从而对人类健康和人类基因库构成严重危害。

目前,世界各国和国际组织对化合物的遗传毒性都有规范的、统一的评价程序规定。由于突变是癌变、畸变的基础,因此在化合物遗传毒性的快速初筛试验中,致突变检测更受重视。在国际防止环境致突变物和致癌物委员会(ICPEMC)划分的 5 个遗传学终点中,涉及染色体损伤的有 2 个,它们是染色体分离障碍以及染色体数目和结构异常。而检测染色体损伤的常用方法有染色体畸变分析和微核试验。染色体畸变分析虽然精确,但费时费力;而微核试验具有经济、简便、快速的优点,近年来几乎成为检测染色体损害的快速初筛试验。这是因为微核来源于染色体断片或丢失的整条染色体,染色体畸变中不伴有断片形成的只有易位、倒位等少数的几种。大量的对比研究也证明微核试验与染色体畸变分析敏感性、特异性、准确性都几乎相当,正因为如此,微核试验已在各个领域得到了广泛的应用。仅美国环保局截止 1990 年就已用微核试验检测了 414 种化合物,我国迄今发表的微核试验文献也已达上千篇。

微核试验虽然得到如此广泛的应用,但至今国内仍无一本有关微核试验的专著。微核试验现已发展至大鼠、小鼠、人、植物等多种类别、材料的检测,近几年又发展了荧光原位杂交、自动化检测等新技术。许多科研人员在应用这些方法时,案头缺乏一本可

供从实验原理到操作方法的详尽参考书。

1996年,作者邀请日本环境诱变剂学会秘书长、微核专家 Makoto Hayashi(林真)来我室访问时,双方谈到合著一本有关微核的专著,并决定邀请国内外部分微核专家共同撰写。Hayashi 博士主动承担了微核试验简介、微核形成的动力学问题和小鼠骨髓红细胞微核试验等三章的撰写,德国 Nüsse 博士撰写了流式细胞仪对微核的自动化检测一章,国内微核专家薛开先教授撰写了人微量外周血淋巴细胞微核直接测试法一章,蔡亚娜教授撰写了植物紫露草及蚕豆根尖微核试验一章,其余章节由我的同事易东博士、杨录军硕士及我完成。我校余争平博士在百忙中挤出时间翻译了 Hayashi 博士的书稿。在书稿的撰写过程中,我室杨明杰、刘胜学、刘勇、周紫垣、钱频、孙华明等均给予了全力支持和配合,周利军女士完成了繁重的打印和校对全部书稿的工作,尤其需要提到的是我的导师程天民院士,亲自为本书撰写了序言,对我们的工作给予了热情的肯定和鼓励,在此向为本书付梓做出了贡献的所有人员表示深深的感谢。

由于作者水平有限,书中存在的错误和缺点在所难免,竭诚欢迎批评指正。

曹 佳

于重庆第三军医大学

1999年8月

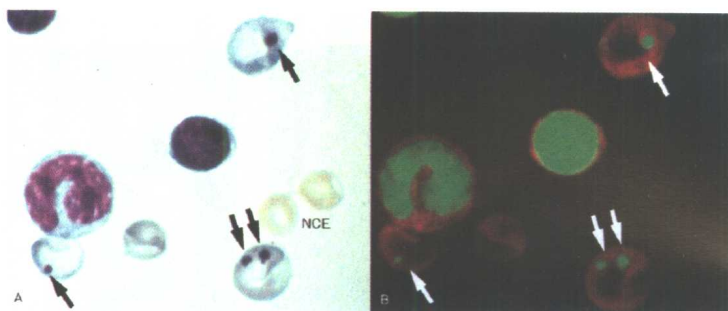


图 1

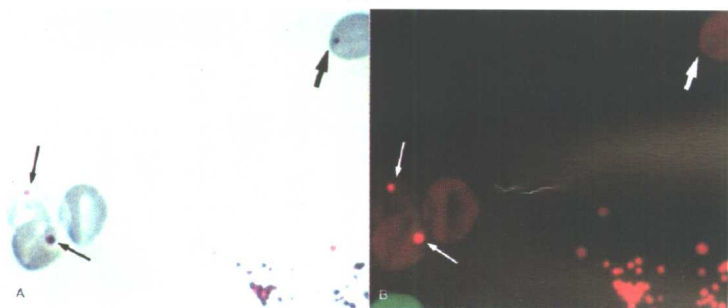


图 2

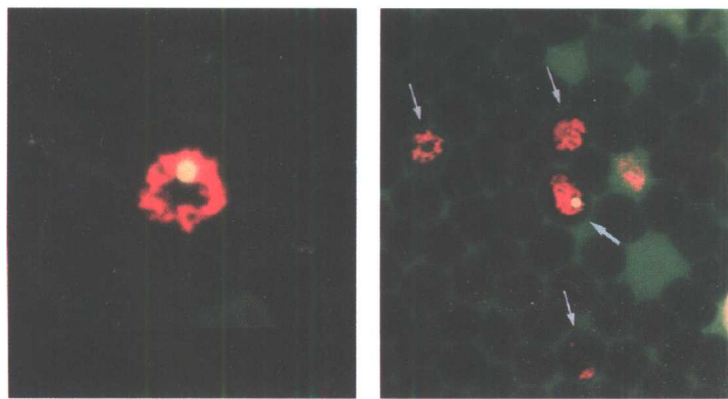


图 3

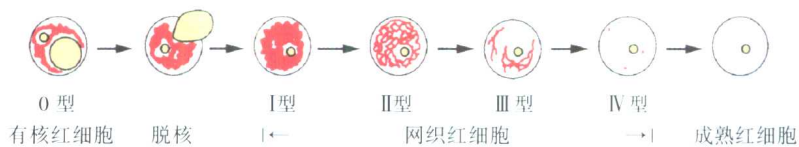


图 4

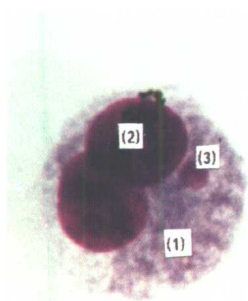


图 5

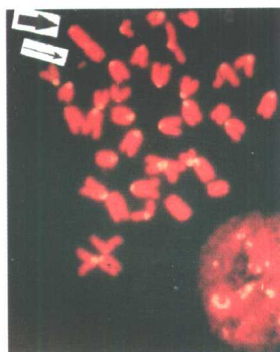


图 6

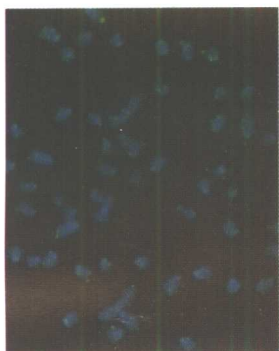


图 7

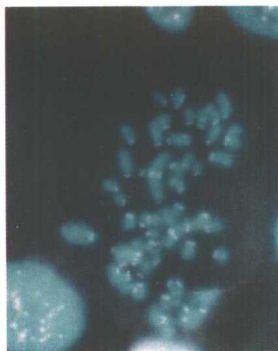


图 8

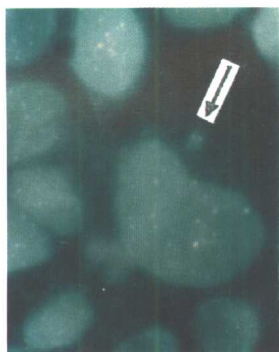


图 9



图 10

目 录

第一章 微核试验简介[林真(日本)]	(1)
第一节 微核试验的目的与意义	(1)
第二节 微核试验发展的历史	(3)
第三节 微核试验的特征	(5)
第二章 微核形成的动力学问题[林真(日本)]	(12)
一、微核与染色体异常的关系	(12)
二、微核形成的概念图	(13)
三、观察染色体异常与微核形成时相变化过程的实验	(15)
四、染色体异常与微核形成的经时变化差别的模型	(18)
五、建立染色体异常与微核经时变化的数学模型	(24)
六、模型的验证	(33)
七、微核的 DNA 含量与染色体断片的关系	(37)
八、分裂阻断剂与微核形成	(38)
第三章 小鼠骨髓红细胞微核试验[林真(日本)]	(42)
第一节 小鼠体内实验	(42)
一、实验条件	(42)
二、预试验	(48)
第二节 制片和染色	(51)
一、动物分组与标本编号	(51)
二、标本制作法	(54)
三、染色方法	(56)
第三节 显微镜观察	(58)
一、姬姆萨染色标本的观察	(58)
二、AO 荧光染色标本	(61)

三、姬姆萨染色与 AO 荧光染色的比较	(61)
第四章 人培养淋巴细胞微核试验(曹佳)	(68)
第一节 人外周血淋巴细胞微核试验的意义	(68)
第二节 胞质分裂阻滞法微核试验(CB-MNT)	(69)
一、试验原理	(69)
二、CB-MNT 试验方法	(71)
三、对人群遗传损害监测的应用	(73)
第三节 CB-MNT 法的优缺点	(79)
一、CB-MNT 法的优点	(79)
二、CB-MNT 法的缺点	(84)
三、展望	(85)
第五章 人微量外周血淋巴细胞微核直接测试法(薛开先)	(91)
第一节 人微量外周血淋巴细胞微核体内测试法	(91)
一、简史	(91)
二、测试和分析程序	(92)
三、健康人群外周血淋巴细胞	(95)
四、MNT 的影响因素及其质量控制	(97)
第二节 人微量外周血淋巴细胞微核(核异常)体外测试 法	(99)
一、G ₀ 期淋巴细胞的微核形成	(99)
二、人淋巴细胞微核(核异常)体外测试法的研究及 程序	(101)
三、未经培养淋巴细胞 MNF 与培养淋巴细胞 MNF 和 ACF 的关系	(103)
第三节 微量人外周血淋巴细胞微核直接测试法的应用	(104)
一、化工厂矿接触人群	(104)
二、射线工作人员与过量照射	(106)

三、生活方式和环境污染	(107)
四、在肿瘤和抗突变研究中的应用	(108)
第六章 人上皮脱落细胞微核试验(杨录军 曹佳)	(112)
第一节 简介	(112)
第二节 正常上皮组织及其脱落细胞形态	(113)
一、正常上皮组织	(114)
二、复层鳞状上皮细胞	(115)
三、柱状上皮细胞	(117)
四、变移上皮细胞	(118)
第三节 人上皮脱落细胞微核试验的技术方案	(119)
一、细胞收集、制片	(120)
二、固定	(121)
三、染色	(121)
四、镜检及微核判断标准	(124)
五、统计分析	(124)
第四节 人上皮脱落细胞微核的非整倍体毒性检测—— 荧光原位杂交(FISH)	(124)
一、细胞的收集、处理、制片	(125)
二、FISH 步骤	(126)
三、结果	(126)
第五节 人上皮脱落细胞微核试验中的其他指标	(126)
一、口腔粘膜细胞中的异性细胞	(126)
二、尿液脱落细胞的异形细胞	(128)
第六节 人上皮脱落细胞微核试验的应用	(129)
一、人上皮脱落细胞微核率的本底值及个体差异	(129)
二、人上皮脱落细胞微核试验中个体需计数的细胞总数	(131)
三、人上皮脱落细胞微核试验的灵敏度	(131)
四、人上皮脱落细胞微核试验的一些应用实例	(132)

五、人脱落细胞微核试验亟待完成的工作	(133)
六、动物脱落细胞微核试验	(134)
第七章 大鼠肝细胞微核试验(曹佳).....	(139)
第一节 肝细胞微核试验简介.....	(139)
第二节 大鼠原代培养肝细胞微核试验.....	(141)
第三节 试验方案述评.....	(142)
第四节 肝原代细胞 MNT 使用中的几个问题	(143)
第八章 植物紫露草及蚕豆根尖微核试验(蔡亚娜 曹佳)	(156)
第一节 概况.....	(156)
第二节 紫露草微核试验方案.....	(158)
一、试验材料的栽培与管理	(158)
二、仪器和试剂	(158)
三、试验步骤	(159)
四、结果表达及污染程度判断	(161)
第三节 蚕豆(<i>Vicia faba</i>)根尖微核试验方案	(164)
一、试验材料——松滋青皮豆	(164)
二、仪器用品	(164)
三、试剂配制	(164)
四、试验步骤	(165)
五、试验数据的统计处理和污染程度的划分	(167)
六、注意事项	(168)
第四节 紫露草生物监测在我国的研究与应用.....	(170)
第九章 微核试验对非整倍体毒剂的检测(曹佳).....	(174)
第一节 非整倍体的概念及与癌变的关系.....	(174)
第二节 染色体着丝点的结构和功能.....	(177)
第三节 抗着丝粒抗体染色对非整倍体的检测.....	(180)
一、检测原理及应用	(180)
二、CREST 染色的实验方案.....	(183)

第四节 荧光原位杂交对非整倍体毒剂的检测·····	(184)
一、染色体着丝粒 DNA 探针·····	(185)
二、染色体端粒 DNA 探针·····	(189)
三、MNT 中 FISH 技术的一些新发展·····	(190)
四、MN 的 FISH 实验方案·····	(193)
第五节 微核试验中检测非整倍体的其他方法·····	(199)
一、通过测定微核面积和 DNA 含量来检出非整倍体 毒剂·····	(199)
二、C-带染色法用于 MNT 中非整倍体的检测·····	(202)
第十章 图像分析系统对微核的自动化检测(易东)·····	(208)
第一节 研究状况·····	(208)
一、红细胞 MN 图像识别研究概况·····	(208)
二、有核细胞 MN 图像识别研究概况·····	(211)
第二节 双核淋巴细胞微核图像自动化检测的研究·····	(215)
一、硬件系统及图像采集·····	(215)
二、研究工作的基本框架·····	(217)
三、识别过程中使用的几个重要方法·····	(217)
四、对系统的测试结果·····	(225)
五、展望·····	(227)
第十一章 流式细胞仪对微核的自动化检测[Nusse M(德国). Grawe J(瑞典) 曹佳]·····	(230)
第一节 研究概况·····	(230)
第二节 流式仪对红细胞微核的自动化检测·····	(233)
一、研究概况·····	(233)
二、实验方法·····	(238)
三、部分实验结果介绍·····	(239)
第三节 流式仪对有核细胞微核的自动化检测·····	(243)
一、研究概况·····	(243)
二、实验方法·····	(245)

三、部分结果分析	(249)
第四节 问题与展望	(257)
附录	(264)
一、欧洲经济合作组织化学物质毒性实验指南—— 哺乳动物红细胞微核试验(1995 年 9 月)	(264)
二、化学诱变剂检索目录	(273)
三、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核自发频率(MPCE/1 000PCE)	(285)
四、最常用品系小鼠微核的有关参数	(288)

序 言

随着社会的发展和科技的进步,环境问题的重要性和迫切性越来越得到人们的认识 and 关注。环境因素成为很多疾病发生和影响人群健康的重要原因,如有报道称 80% 左右癌症的发生与环境因素密切相关。为防治疾病,增进健康,必须在“源头”上下功夫,也就是要以“预防为主”。通过一系列试验方法,以发现诱发疾病的各种有害环境因素,并设法与之脱离接触或将剂量控制在安全范围内,即能降低疾病的发病率。

环境污染产生的一个严重问题,是可能损害生物体的遗传物质,产生诸如“癌变、畸变、突变”的严重后果,因而需要重点评估环境损害的遗传毒性。可喜的是,近年来人们建立了从原核、真核细胞到整体动物在内的一系列试验方法,用以评估化合物的遗传毒性,其中,微核试验就是广泛使用的一种重要方法。

微核试验的最大优点是经济、简便、快速,这正好符合众多环境化合物需要快速初筛和大量职业暴露人群需要动态检测的目的,因而尤其得到广大医务工作者的钟爱。微核试验从建立到现在已经有二十多年了,国内外大量的研究表明,它在敏感性、特异性和准确性上与染色体畸变分析基本相当,而实验方法却简单得多。这也是为什么微核试验得到越来越广泛应用的原因。

我校分子毒理学教授曹佳博士长期从事微核研究,在微核形成机理、自动化检测及方法学研究方面,都有自己的研究成果。他在德国工作的二年多时间里,又结识了国际上一批从事微核研究的专家,如 Adler 博士、Nusse 博士和 Hayashi 博士等。他们今天携起手来,共同撰写了这本《微核试验——原理、方法及其在人群

接诱导 DNA 损伤,从而判定有无诱发染色体异常的毒理效应。但是,高浓度的化合物处理,并不符合体内的正常生理状态,是一种非正常生理条件下的实验,因而常常出现假阳性结果。在这种情况下,对被检化合物进行评价必须非常慎重。另一方面,用体内试验方法评价化合物的毒性时,给药剂量是低于引起死亡的剂量范围,因此是在动物能够耐受的状态下评价化合物的遗传毒性。但被检化合物是否能均匀地分布到靶器官,这些问题在化合物的安全性评价时应该周全地加以考虑。

如何评价小鼠骨髓 MNT 用于化合物的安全性评价呢?与人类实际暴露剂量比较,小鼠 MNT 所给药剂量常更高。经腹腔或经口给予的被检化合物,经门脉系统入血,进入肝脏,虽有未经转化状态的原型化合物到达靶器官,但已有部分化合物经肝代谢转化,部分可能是代谢活化,毒性变得更高。另外有些化合物经肝代谢降解,毒性更低。因此,小鼠最大给药剂量应参照人类实际暴露情况、机体各脏器分布浓度的具体数据,选择小鼠的最大耐受剂量来进行 MNT,这样所得的有关染色体异常的资料,才能作为被检化合物毒理安全性评价的依据。

MNT 的目的,是为药品、食物添加剂、农药、化妆品等人们日常生活密切接触的化合物的安全性评价提供实验论据。另外, MNT 在职业暴露人群遗传损害监测和生态环境检测方面也有广泛的应用,例如,工厂劳动者的职业微环境对健康的影响调查,接受化学疗法的患者的遗传损害调查等等,此外,常用两栖类和鱼类红细胞微核试验,对水生生态环境污染进行评价及监测,使用紫露草和蚕豆根尖微核试验对空气和水污染进行监测等等。

MNT 不仅可用于化合物安全性评价,而且在医学基础研究中的应用也越来越广泛。MN 本身的形成,可反映染色体的异常,目前在药理学与毒理学领域常作为量效反应指标。MNT 作为细胞遗传学损伤的生物标志物之一,在医学生物学各领域正得到越来越广泛的应用。