

- ods. New York: Academic Press Inc. 1995, 465~481
- 8 Wilmarth KR. Carbon disulfide inhalation increases Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase phosphorylation of cytoskeletal proteins in the rat central nervous system. *Brain Res*, 1993, 628 (1-2): 293
- 9 Sayre LM. Pathogenesis of experimental giant neurofilamentous axonopathies: A unified hypothesis based on chemical modification of neurofilaments. *Brain Res Rev*, 1985; 10: 69~83
- 10 Valentine WM, et al. Covalent cross-linking of erythrocyte spectrin by carbon disulfide in vivo. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1993, 121 (1): 71
- 11 Endo H, et al. Acrylamide induces immediate-early gene expression in rat brain. *Brain Res*, 1993, 609: 231
- 12 Endo H, et al. Acrylamide alters neurofilament protein gene expression in rat brain. *Neurochem. Res*, 1994, 19: 815

(收稿: 1996-06-20 修回: 1996-08-05)

影响微核出现率的因素及其作用机理的研究

尹龙赞 尹春实

微核是由染色体断裂遗留下来的断片演化来的,也属于染色体异常。因此检测微核出现率(简称微核率)被列为短期试验筛选化学致突变物的常用方法,已由 OECD(经济协同开发机构)、ICPEMC(国际致癌致突变预防委员会)、EEC(欧州共同体)、TSCA(美国有害物质规范法)、GENE-TOX Program(美国)、日本厚生省等许多国家和地区提供了应用准则。我国学者目前也将微核率作为致突变的检测指标之一,但国内目前大量报道的是单一化学物质对微核率的影响,诱变物与诸因素联合作用对微核率的影响及其作用机理方面的研究尚少综述报道,本文现介绍这方面的研究动态。

1 红细胞生成与微核率

红细胞的生成主要是在骨髓内进行。红细胞成熟过程如下:造血多能干细胞→红系定向干细胞早期(BFU-E)→红系定向干细胞(CFU-E)→原红细胞→早幼红细胞→中幼红细胞→晚幼红细胞→网织红细胞→成熟红细胞。一个造血干细胞分化为原红细胞后最后可以生成20个网织细胞;据推算人的骨髓红系细胞周期分别为原红及早幼红20小时,中幼红25小时,晚幼红细胞不具有合成DNA的能力,属于非增殖性细胞。诱变物或放射线作用于红系造血的增殖期,因此可以推测一旦骨髓红系细胞的分化、增殖比正常时旺盛,诱变物质对染色体或纺垂体的作用机会将增加,出现微核的机会也就增多,因此凡是促进(或抑制)红系造血的因子或因素都可能影响微核率。

1.1 促红细胞生成素(Erythropoietin EPO)与微核

作者单位:110024 沈阳市劳动卫生职业病研究所(尹龙赞),沈阳市东陵区长白医院(尹春实)

率

到目前为止,人们所认识的促进红系造血的因子有Burst-促进因子和促红细胞生成素EPO^[1]。Burst-促进因子主要作用于BFU-E→CFU-E的初期分化,其后由EPO作用,促进CFU-E分化成原红细胞,原红细胞分裂成幼稚红细胞,并诱导细胞合成Hb。EPO可能作用于Hb合成中作为关键酶的mRNA生成的去阻遏。因此EPO是在细胞生成中起重要作用的一种体液调节因子,是一种糖蛋白质,其分子量为34000,主要产生于肾,业已证明肝或网状内皮系统中也能产生一些。当机体处于一氧化碳中毒、失血、贫血或缺氧等情况下,肾组织细胞受到刺激,产生EPO,通过血液循环到达骨髓,刺激相应细胞加速红细胞的产生,这些红细胞生成作用与微核的诱发有密切的关系,从而提高了微核率。

Suzuki等人^[2]根据上述作用机理选择BALB/C小鼠,授予小鼠3u(单位)EPO,24小时后给予诱变物(1,1-二甲基肼,DMH)20mg/kg,30小时后取骨髓制片,结果提示EPO+DMH组的微核率比单独授予EPO或DMH组明显提高,并表明EPO授予量与微核率间存在着剂量-反应关系。上述现象除DMH外,其他诱变剂如3,4-苯并芘、2-萘胺、丝裂霉素、长春新碱(VCR)中也能观察到类似现象。

1.2 前列腺素E₂(prostaglandin E₂, PGE₂)与微核率

1971年Schooley和Mahlmann首次观察了PGE₁和PGE₂增加输血多血症小鼠的红细胞数。输血多血症的模型,可以抑制小鼠自身红系造血能力,于是EPO或PG等外来造血物质的反应敏感性得到提高,

便于观察药效。有人报告肾不仅产生 EPO 也可能产生 PG。狗的肾灌流液中随 PGE_2 浓度的提高 EPO 量也增加, 同样 cAMP 和磷脂的分解产物花生四烯酸 (Arachidonate) 也能促进 EPO 的产生。综合这些因素有人提出如下设想, 即低氧等条件刺激了肾, 促进了 PG 的产生, PG 又活化了肾腺苷酸环化酶 (Adenylate Cyclase), 从而增加了 cAMP, cAMP 又促进了 EPO 的产生^[2]。基于这些作用机理, 铃木等人^[3]观察了 PGE_2 对致突变物诱发微核的影响。给 BALB/C 小鼠腹腔注射 30mg/kgPGE_2 1 次, 25 小时后腹腔注射 $\text{MMC}0.3\text{mg/kg}$, 给 $\text{MMC}30$ 小时后制作骨髓涂片, 观察微核率, 结果微核率明显提高。

1.3 吲哚美辛 (Indomethacin) 与微核率

红系细胞的分化增生受 PG 的调节, 因此给予 PG 抑制剂吲哚美辛则应抑制 EPO 的生成, 结果导致抑制红细胞的造血作用。铃木等人^[4]给 BALB/C 小鼠腹腔注射吲哚美辛 (2、5、 10mg/kg) 1 次, 1 小时或 18 小时后再给丝裂霉素 (MMC) 0.7mg/kg 1 次, 结果 MMC + 吲哚美辛组的微核率明显低于单独给予 MMC 组 ($P < 0.05$), 吲哚美辛自身则无诱发微核的能力。

1.4 钴和锂对微核率的影响

Goldwasser^[5]报告大鼠摄入钴, 血中 CAMP 和 REF (Renal Erythropoietic Factor) 达到高峰后, 血浆中 EPO 的含量出现增高现象。Rodgers^[6]综合实验结果提出了钴的造血作用机理即钴刺激了肾腺苷酸环化酶, 促进了 cAMP 的产生, cAMP 又刺激了肾蛋白激酶 (Protein kinase), 使无活性的 EPO 转变成具有活性的 EPO, EPO 随血流到达骨髓, 刺激相应细胞, 导致骨髓红系造血系统的分化增殖旺盛。清水英佑^[3]、Yin L Z 等人^[7]给 BALB/C 雄性小鼠腹腔注射 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 50mg/kg 1 次, 间隔一定时间后腹腔注射 20mg/kg DMH 1 次 (或 $\text{MMC}0.3\text{mg/kg}$), 结果钴 + 诱变物组微核率明显高于单独给予钴或诱变物组。

Chan 等人^[8]通过体外红系细胞培养法观察到添加 cAMP 时 CFU-E、BFU-E 的克隆数明显增加; 加入 PG 或 cAMP 时幼稚红细胞的克隆数明显增加, 但加入锂时受到抑制。Forrest 等人^[9]报道, 锂是腺苷酸环化酶/cAMP 轴心 (Adenyl Cyclase/cAMP Axis) 的抑制剂, 从而抑制了红系细胞集落的生成。基于这些试验推测, 锂可能通过抑制 EPO 的产生而影响红细胞的造血作用。关于锂的存在下诱变物对体内微核率的影响, 国内外尚未见报道, 为了探讨锂的作用, 尹龙赞等人给

BALB/C 小鼠先腹腔注射 LiCl, 间隔一定时间后腹腔注射钴和诱变物 MMC, 通过 Li+Co+MMC 组与 Co+MMC 组间微核率的比较确定锂的抑制效应。实验结果表明 Li+Co+MMC 组微核率为 1.30% , Co+MMC 组为 2.24% , 表明了 Li 对微核率的抑制效应。而单独给予生理盐水或锂、钴、MMC 组微核率分别为 0.35% 、 0.46% 、 0.78% 、 0.86% 。

1.5 一氧化碳中毒、失血、缺氧对微核的影响

一氧化碳中毒导致机体缺氧, 于是刺激肾组织释放 EPO, 促进了红系造血功能。有人^[10]给小鼠吸入低氧压的空气 24 小时后, 给予 MMC, 给 $\text{MMC}30$ 小时后制骨髓涂片, 查微核率明显提高。

平井等人^[11]报告, 从 BDF 系雄性小鼠眼窝静脉丛抽血 0.5ml , 24 小时后腹腔内注射 0.1mg/kg MMC , 24 小时后微核率明显提高 ($P < 0.05$)。Suzuki 等人^[12]将 BALB/C 小鼠暴露于含有一氧化碳的环境中, 24 小时后给予诱变物 3, 4-苯并芘 100mg/kg , 结果微核率明显增加。

1.6 温度对微核率的影响

Chrisman 等人^[13]报道, 将两组动物的饲养温度分别控制在 21°C 和 35°C 时, 35°C 组的微核率比 21°C 组高 3~10 倍, 其机理可能也与造血功能有关。

1.7 饮食、水对微核率的影响

Gollapudi 等人^[14]研究饮食和水对小鼠微核的影响, 结果不给 24~72 小时饲料和水时可能影响了造血功能, 提高了微核率。

1.8 代谢活化因子对微核的影响

化学物质在肝经代谢可变成具有诱变性的代谢产物, 因此往往会提高微核率。多氯联苯 (PCB) 在肝具有活化药物代谢酶的作用, PCB 本身不诱发微核。铃木等人^[15]观察发现, 在 PCB 的参与下, 3, 4-苯并芘或 2-氨基蒽的微核率明显提高。

1.9 器官敏感性

Tates 等人^[16]报道, 二乙基亚硝胺和二甲基亚硝胺对骨髓细胞几乎不诱发微核, 但对再生肝则具有诱发微核的能力。Goldber 等人^[17]报道 1, 2-二甲基肼对骨髓几乎没有诱发微核的能力, 但对结肠上皮具有高度诱发微核的能力。可见机体对特定物质的脏器敏感性是不同的。

1.10 钙离子浓度与微核率的关系

一般认为骨髓内红系细胞的分化、增殖与 Ca 离子有关。Ca⁺⁺ 浓度提高时细胞的分化、增殖作用得到加强。清水英佑等人^[3]通过体内试验及骨髓细胞培养

方法授予或添加 Ca^{++} 络合剂-EGTA 后观察了诱变物引起的染色体异常诱发率。体内外试验结果表明, Ca^{++} 络合剂-EGTA 浓度提高时, 由于 Ca 离子浓度降低, 微核率也随之下降。

1. 11 膜通透性与微核率

化学物质到达骨髓后必须有一定量的致突变物进入具有分裂能力的幼稚红细胞内才能发挥诱变作用。清水英佑等人⁽³⁾利用膜作用物维拉帕米 (Verapamil) 和诱变物长春新碱的联合作用, 观察了小鼠的微核率。结果单独授予一定量的长春新碱则不会诱发微核, 但与维拉帕米并用时微核率明显提高。

2 结语

为了预防职业癌, 首要的任务之一是检测化学物质的致癌可能性, 微核率试验是常用的检测致突变指标之一。目前国内的文献报告大多是限于单一化学物质的致突变检测上, 可是环中存在的物质往往是两种以上, 因此不得不考虑物质间的联合作用, 包括相加作用、相乘作用和拮抗作用。因此微核率检查时我们应该更多地考虑物质间的联合作用所引起的影响。

骨髓红系造血因子或因素提高了致突变物诱发微核的机会, 这一结果提醒我们诱变物与化学物质的联合作用可以提高诱变物的检出率, 这对劳动卫生或环境卫生的检测是有一定意义的。

微核率试验尚需做更多的研究工作, 如利尿药、乙酰唑胺、阿斯匹林等抑制 EPO 的产生; 镍与钴一样都有生血作用, 雄性激素、甲状腺素、肾上腺皮质激素和生长素等都有促进红细胞的生成作用, 这些因素与微核率之间的关系应需进一步探讨。

3 参考文献

- 高久史磨. 内科・血液・プロスタグランディンの新しい展開. 现代医療編集委員会编, 现代医療社, 1984, 222
- Suzuki Y, et al. Effect of erythropoietin on the micronucleus Test. Environ and Molecul Mutagen, 1989, 13: 314
- 清水英佑. 公衆衛生学教室研究成果報告書. 东京慈惠会医科大学. 昭和 63. 平成 1 年度学内共同研究費による研究成果報告書. 平成 2 年.
- 鈴木勇士, 等. Erythropoiesis からみた小核試験 (その 3) Indomethacin の小核誘発に与える影響. 第 16 回日本環境変異原学会. 昭和 62 年. Mutat. Res. 1988; 203;

389

- Goldwasser E, et al. Studies on erythropoiesis. Blood 1958, 13: 55
- Rodgers, et al. Increased kidney cyclic AMP levels and erythropoietin production following cobalt administration. Proc Soc Exp Biol Med, 1972, 140: 977
- Yin L Z, et al. Effect of lithium on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocyte in mice bone marrow. XIV ASIAN CoNFERENCE ON. Occupational health. China Beijing. 1994; To17: 52
- Chan, et al. Modulation of human hematopoiesis by Prostaglandins and lithium. J Lab Clin Med, 1980, 95: 125
- Forrest JNJY. Lithium inhibition of cAMP-mediated hormones: a Caution. N Engl J Med, 1975, 292: 423
- 鈴木勇士, 等. 環境中変異原性助長因子の検出. 産業医学, 1989, 31: 529
- 平井收, 等. 貧血マウスでの小核出現率. 藤沢薬品安全性研究所 社内報, 1989.
- Suzuki Y, et al. Effects of carbon monoxide on the micronucleus test. Occupational health in the chemical industry. World Health Organization Regional Office for Europe. Copenhagen, 1987, 156
- Chrisman, et al. Micronuclei in bone marrow cells of mice subjected to hyperthermia. Mutat Res, 1980, 77: 95
- Gollapudi BB, et al. Effect of food and water deprivation on the parameters of the mouse bone marrow micronucleus test. Mutat Res, 1986, 173: 121
- 鈴木勇士. 高感度小核試験の開発に関する研究 (第 1 報) Polychlorinated biphenyl による誘導ならびに代謝活性化による方法. 東京慈恵会医科大学雑誌 1985, 100: 695
- Tates AD, et al. A micronucleus technique for detecting clastogenic effects of mutagens/carcinogens (DEM. DMN) in hepatocytes of Rat Liver in vivo Mutat Res, 1980, 74: 11
- Goldberg MT, et al. Comparison of the effects of 1, 2-dimethylhydrazine and cyclophosphamide on micronucleus incidence in bone marrow and colon. Mutat Res, 1983, 109: 91

(收稿: 1996-01-20 修回: 1996-05-10)