



微核试验方法及应用研究进展

陈思^{1,3}, 鲁克庆², 马兴铭³

(1. 兰州大学第二医院检验中心; 2. 甘肃省泌尿系疾病临床医学中心; 3. 兰州大学基础医学院, 兰州 730030)

【摘要】 微核(micronucleus, MN)试验,作为一种常规的基因毒性检测方法,已经得到了广泛的应用。其检测的标本也从骨髓扩展到血液和组织。除常规的药物基因毒性检测外,在基因改变性疾病的诊断,疗效的评估和预防等方面具有重要的作用。另外,微核试验也是药品,保健品注册上市的安全检测的一项重要指标。本文就目前的微核试验的染色方法以及疾病和病毒学等领域的应用加以综述。

【关键词】 微核试验;基因毒;疾病

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0083-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 02. 017

Research progress of the methods and applications of micronucleus assay

CHEN Si, LU Ke-qing, MA Xing-ming

(1. Department of Medical laboratory, Second Hospital of Lanzhou University, 2. Gansu Urological Clinical Center, 3. School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730030, China)

【Abstract】 Micronucleus (MN) assay as a routine examination for genotoxicity has been widely used. The testing specimens were taken from bone marrow and extended from blood and tissues. In addition to testing genotoxicity of drugs, it is also applied in disease diagnosis for genetic mutation, evaluation of curative effectiveness and disease prevention. Moreover, MN assay is also an important safety indicator for drugs and health foods registration. This review will discuss the staining method of MN test and its application in the field of diseases and virology.

【Key words】 Micronucleus assay; Genotoxicity; Disease

微核(micronucleus, MN)是一种独立于主核之外的核小体,存在于细胞质中,体积大约为主核的1/16到1/3,其染色与主核相一致,通过染色可以在光学显微镜下观察到。微核的形成是由于基因组的不稳定性和染色体的损伤有关。因此,可用于辅助诊断某些基因改变导致的疾病或遗传病。肿瘤作为一种公认的基因突变性疾病,它的治疗、诊断和预防仍是医学界的一大挑战,MN可以作为一种生物标记用来预测早期的癌前病变,对高风险人群

进行普查,具有重要的应用价值^[1-3]。MN实验作为一种快速、简便、经济的基因毒性检测方法,已成为遗传毒性检测的常规检测手段。美国食品药品监督管理局(Food and Drug administration, FDA),欧洲药监局(European Medicines Agency, EMA)等部门均要求:基因毒性的检测应为药物安全性评估的必须一部分^[4]。微核试验也是我国药物遗传毒性研究技术指导原则和国际人用药品注册技术要求协调会(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of

[作者简介]陈思(1977-),女,在读研究生,主要从事医学检验。Email: lncsi@126.com。

[通讯作者]马兴铭,教授,博导,主要从事医学免疫学研究。Email: maxm@lzu.edu.cn。

Pharmaceuticals for Human Use, ICH) 新药遗传毒性评价指导原则共同推荐的遗传毒性检测方法之一。卫生部《保健食品检验与评价技术规范》(2003 年版)和《食品安全毒理学评价程序和检验方法规范》中均要求保健食品和具有保健作用的药品进行安全性评价时必须进行遗传毒性试验的毒理学研究。

在过去的几十年内,微核试验的应用不再局限于药物的遗传毒性的检测,已扩大到环境污染的检测、临床疾病的诊断和治疗后的评估、病毒学等相关领域,本文就目前微核试验的方法和微核试验的应用加以综述。

1 微核形成的机制

MN 的形成主要有两种机制,一种是染色体的断裂,另外一种是有丝分裂过程的紊乱^[5]。当正常的个体暴露于污染的环境,放射或服用致畸药物和有毒化学物等条件下,均可促进 MN 的形成。另外,慢性炎症^[6]、癌前病变^[7,8]、肿瘤^[9]和一些其它的基因遗传性疾病^[10]均可以引起 MN 的增加。此外,病毒的感染也是 MN 形成的一个重要的原因。另外,使用抗着丝粒抗体可以是细胞的有丝分裂过程紊乱,促进 MN 的形成^[11]。

2 微核试验的方法

MN 实验的取材可以是骨髓、组织上皮细胞、血液中的淋巴细胞。骨髓的取材一般适用于小鼠的微核试验,染毒方式一般有两种:一是单剂量给药后 24~48 h 内取材;二是多次染毒,在最后一次给药后 18~24 h 内取材。给药的方案应超过 1 d,计数大约 2 000 个嗜多染红细胞(PCE),观察微核细胞的比例^[11]。血液中淋巴细胞 MN 的检测^[12],将采到的全血置于肝素抗凝管中,在培养箱中培养 44 h,然后加入细胞松弛素-B 后,对全血进行染毒,继续培养 72 h 后,离心去除上清液,然后加入 0.075 mmol/L 的 KCl 混匀后,加入 1.5 mL 固定液(甲醇和冰醋酸),离心去除上清液,再次加入 3 mL 的固定液,离心去除上清液,将 0.5 mL 的固定液吹散后滴片,10% 的 Giemsa 液染色 10~15 min,晾干待测。组织中的微核试验^[13],将所需组织取出后,使用蛋白溶解酶(胶原酶)分离细胞,进行染色,以小鼠的肝组织为例:将 1 g 左右的肝脏切碎,然后用 100 U/mL 的胶原酶分离肝细胞,分离后的肝细胞固定于 4% 的甲醛溶液固定液中,使用 500 μg/mL 吖

橙或 10% 的 4,6-二咪基-2-苯基吡啶进行染色。欧洲替代试验有效性验证中心(European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM)证实体外微核试验可以替代体外染色体畸变试验用于遗传毒性检测^[14]。近年来,自动化检测技术在体外微核试验中探索性应用取得了进步,已应用于微核自动化计数,流式细胞术^[15]、计算机图像分析系统^[16,17]、激光扫描细胞仪^[18]、高分辨率荧光细胞成像^[19]检测计数等,使体外微核试验操作更简单、快速,结果更准确、客观。

3 微核实验的方法评估

在细胞之中,胞质中核小体的出现并不一定是微核细胞,它应该与凋亡细胞和坏死细胞细胞核溶解造成的 MN 相区别。微核细胞的特征包括:核小体的位置靠近主核,一般为细胞膜和细胞核中间的细胞质内;大小约为主核的 1/16 到 1/3;染色与主核相一致或比主核染色更深;形态为圆形或椭圆形;MN 的数量一般少于 3 个。另外,MN 细胞的细胞膜完整,主核清晰。凋亡的细胞细胞膜完整,无明显的主核,核小体数量超过 3 个以上^[5]。坏死细胞细胞膜不完整,细胞核结构破坏,核小体出现于胞浆中,形态不规则。在进行微核试验时,微核细胞的计数应注意与坏死和凋亡的细胞相区别,以免造成实验结果的假阳性,影响实验结果的准确性。

4 微核实验的应用

微核试验主要应用于药物的遗传毒性检测和环境化学致畸物质的检测^[20]。Cigerci 等^[21]使用微核试验的方法评估了氯化钴(cobalt chloride, CoCl₂)在环境污染中的危害,发现 CoCl₂ 能够损伤 DNA,造成染色体的断裂。Valdiglesias 等^[22]比较了正常人与体弱人群之间外周血中微核细胞的比例差异,但结果没有统计学意义。Recio 等^[23]检测了乙基甲磺酸(ethylmethane sulfonate, EMS)、丙烯酰胺(acrylamide, ACM)、环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)、长春新碱(vincristine sulfate, VS)四中物质在遗传学中的作用,结果显示在 ACM、EMS、CP 给药之后微核细胞的比例升高,VS 结果阴性。另外,在评估放射性遗传物质的损伤方面也有重要的作用。随着基因组学研究的进展,发现许多疾病的发生与基因的突变,染色体的缺失或基因修复机制的受损有关,从基因水平上来寻找病因,诊断和监控疾病。

另外,在病毒学中,微核试验也是检测病毒是否能够导致基因突变的一种重要方法,能够明确病毒是否具有基因毒性^[24],为某些病毒感染性疾病的预防提供指导。

4.1 疾病的诊断和预防

4.1.1 在肿瘤中的应用:与正常的细胞和良性病变相比,恶性肿瘤的基因组不稳定,基因修复机制受到损伤,突变率明显增加^[25]。将人子宫颈癌和正常的宫颈组织或炎性病变的组织相比,子宫颈癌组织中,微核细胞的比例明显增加,并且不同级别的子宫颈癌,MN 细胞的比例也有明显的不同^[26, 27]。另外,乳腺导管癌与乳腺的良性病变相比,MN 细胞的比例存在明显的差异,并且不同级别的乳腺导管癌,MN 细胞的数量也存在明显的不同^[28]。Arora 等^[29]的研究表明在非典型尿路上皮癌中,MN 的比例也明显的提高。为此,MN 可以作为尿路上皮癌的一种辅助性诊断方法。另外在癌前病变,MN 的比例也明显的增加^[8]。为此,它可以作为癌前病变的一个筛查指标。放疗后,早期的 MN 的比例明显的增加^[30],肿瘤进行 MN 检测时,应在放射治疗之前,以免造成数据的假阳性。

4.1.2 自身免疫性疾病:在自身免疫性疾病之中,自身抗体的产生扮演着重要的角色,它是检测、诊断、评估和分类自身免疫性疾病的重要标志,最新的研究表明:自身抗体可以诱发染色体的断裂^[26]。此外,在自身免疫性疾病中,慢性炎症和氧化还原平衡的失调也发挥着重要的作用,它们也是诱发染色体断裂,促进 MN 形成的重要原因之一^[31]。在器官组织特异性疾病之中,糖尿病(Diabetes mellitus, DM)是最为典型的一种,在 2007 年的研究发现:与正常人相比,DM 的病人血中淋巴细胞中 MN 比例的增加,与 1 型糖尿病相比,2 型糖尿病中 MN 细胞的比例更高,但是给予叶酸 30 天后,MN 的比例明显的降低了^[32]。在系统性组织特异性疾病中,系统性红斑狼疮(SLE)的病人,与正常人的口腔颊粘膜的细胞涂片分析中,MN 细胞的比例也是升高的^[33]。此外,Karaman 等的研究表明在风湿性关节炎病人的血中淋巴细胞 MN 的比例明显增加^[31]。因此,MN 有可能成为自身免疫性疾病的辅助诊断和复发监控和疗效评估的重要生物靶标之一^[34]。

4.2 在病毒学中的应用

MN 实验在病毒学中,也具有广泛的应用,在 EB 病毒的研究中发现,MN 细胞的比例明显的增

加^[35]。Cassel AP 等人的研究发现 HPV 感染的女性患者,在子宫颈涂片和外周血中的 MN 的比例也是明显增加的^[36],这可能与 HPV 产生的癌蛋白 E6 和 E7 的诱导相关^[37]。

5 展望

MN 的形成并不一定是受到外界环境的刺激引起的,在生理情况下,也可产生,在各种实验之中已被证实。MN 的形成也可能来源于细胞有丝分裂从 G0 到 G1 期过程之中,双链 DNA 断裂的生理性损伤,为此在正常的细胞之中,也可以出现 MN,会造成一定的假阳性率的出现,所以只有当 MN 的比例明显增加升高时,才能说明存在基因毒性,另外微核试验的检验标准没有准确的定义,无比较精确的范围,这是其重要的缺点之一。尽管如此,微核试验以其简单、快速、经济的优势广泛的应用于药品基因毒性的检测;多种自身疾病的辅助诊断、预防复发和疗效的评估;恶性肿瘤和癌前病变辅助性的诊断;另外在环境污染和病毒学引起的染色体的突变的研究中,也广泛应用。

参考文献:

- [1] Nersisyan AK. Possible role of the micronucleus assay in diagnostics and secondary prevention of cervix cancer: a minireview [J]. *Tsitolog Genet*, 2007, 41(5): 64-66.
- [2] Varga D, Hoegel J, Maier C, et al. On the difference of micronucleus frequencies in peripheral blood lymphocytes between breast cancer patients and controls [J]. *Mutagenesis*, 2006, 21(5): 313-320.
- [3] Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28(3): 625-631.
- [4] Snyder RD, Green JW. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals [J]. *Mutat Res*, 2001, 488(2): 151-169.
- [5] Samanta S, Dey P. Micronucleus and its applications [J]. *Diagn Cytopathol*, 2012, 40(1): 84-90.
- [6] Holland N, Harmatz P, Golden D. Cytogenetic damage in blood lymphocytes and exfoliated epithelial cells of children with inflammatory bowel disease [J]. *Pediatr Res*, 2007, 61(2): 209-214.
- [7] Ribeiro DA. Risk assessment of oral cancer in patients with precancerous states of the oral cavity using micromicronucleus test and challenge assay [J]. *Oral Oncol*, 2008, *Oral Oncol*, 2008, 44(7): 716-717.
- [8] Samanta S, Dey P, Gupta N, et al. Micronucleus in atypical squamous cell of undetermined significance [J]. *Diagn Cytopathol*, 2011, 39(4): 242-244.

- [9] Kaur J, Dey P. Micronucleus to distinguish adenocarcinoma from reactive mesothelial cell in effusion fluid [J]. *Diagn Cytopathol*, 2010, 38(3): 177–179.
- [10] Thomas P, Harvey S, Gruner T, et al. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls [J]. *Mutat Res*, 2008, 638(1–2): 37–47.
- [11] Krishna G, Hayashi M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation [J]. *Mutat Res*, 2000, 455(1–2): 155–166.
- [12] 潘丽波, 张金良, 刘玲, 等. 人外周血淋巴细胞微核试验在局部流域水环境遗传毒性检测中的应用 [J]. *环境与健康杂志*, 2013, 5(30): 399–402.
- [13] Takayanagi T, Takashima R, Wako Y, et al. Repeated dose liver micronucleus assay using clofibrate in young adult rats [J]. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutag*, 2015, 780–781: 117–122.
- [14] Corvi R, Albertini S, Hartung T, et al. ECVAM retrospective validation of in vitro micronucleus test (MNT) [J]. *Mutagenesis*, 2008, 23(4): 271–283.
- [15] 欧红梅, 周长慧, 涂宏刚, 等. 流式细胞术检测体外微核方法的建立 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2015, 27(1): 39–43.
- [16] Friauff W, Martus HJ, Suter W, et al. Automatic analysis of the micronucleus test in primary human lymphocytes using image analysis [J]. *Mutagenesis*, 2013, 28(1): 15–23.
- [17] Lyulko OV, Garty G, Randers-Pehrson G, et al. Fast image analysis for the micronucleus assay in a fully automated high-throughput biodosimetry system [J]. *Radiat Res*, 2014, 181(2): 146–161.
- [18] Pozarowski P, Holden E, Darzynkiewicz Z. Laser scanning cytometry: principles and applications-an update [J]. *Methods Mol Biol (Clifton, NJ)*, 2013, 931: 187–212.
- [19] Shibai-Ogata A, Kakinuma C, Hioki T et al. Evaluation of high-throughput screening for in vitro micronucleus test using fluorescence-based cell imaging [J]. *Mutagenesis*, 2011, 26(6): 709–719.
- [20] Massey ED, Hinchliffe S. 2-Aminoanthracene, diethylstilboestrol and vinblastine tested in the in vitro mammalian cell micronucleus test at British American Tobacco UK in support of the OECD draft Test Guideline 487 [J]. *Mutat Res*, 2010, 702(2): 208–211.
- [21] Cigerci IH, Ali MM, Kaygisiz SY, et al. Genotoxicity assessment of cobalt chloride in *Eisenia hortensis* earthworms coelomocytes by comet assay and micronucleus test [J]. *Chemosphere*, 2016, 144: 754–757.
- [22] Valdiglesias V, Bonassi S, Dell'Armi V, et al. Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and frailty status in elderly. A lack of association with clinical features [J]. *Mutat Res*, 2015, 780: 47–54.
- [23] Recio L, Hobbs C, Caspary W, et al. Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and comet assay protocol [J]. *J Toxicol Sci*, 2010, 35(2): 149–162.
- [24] Cortes-Gutierrez EI, Davila-Rodriguez MI, Vargas-Villarreal J, et al. Association between human papilloma virus-type infections with micronuclei frequencies [J]. *Prague Med Report*, 2010, 111(1): 35–41.
- [25] Terradas M, Martin M, Tusell L, et al. Genetic activities in micronuclei: is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? [J]. *Mutat Res*, 2010, 705(1): 60–67.
- [26] Gayathri B, Kalyani R, Hemalatha A, et al. Significance of micronucleus in cervical intraepithelial lesions and carcinoma [J]. *J Cytol*, 2012, 29(4): 236–240.
- [27] Samanta S, Dey P, Nijhawan R. Micronucleus in cervical intraepithelial lesions and carcinoma [J]. *Acta cytologica*, 2011, 55(1): 42–47.
- [28] Samanta S, Dey P, Nijhawan R. The role of micronucleus scoring in fine needle aspirates of ductal carcinoma of the breast [J]. *Cytopathology*, 2011, 22(2): 111–114.
- [29] Arora SK, Dey P, Saikia UN. Micronucleus in atypical urothelial cells [J]. *Diagn Cytopathol*, 2010, 38(11): 811–813.
- [30] Cao J, Liu Y, Sun H, et al. Chromosomal aberrations, DNA strand breaks and gene mutations in nasopharyngeal cancer patients undergoing radiation therapy [J]. *Mutat Res*, 2002, 504(1–2): 85–90.
- [31] Karaman A, Binici DN, Melikoglu MA. Comet assay and analysis of micronucleus formation in patients with rheumatoid arthritis [J]. *Mutat Res*, 2011, 721(1): 1–5.
- [32] Zuniga-Gonzalez GM, Batista-Gonzalez CM, Gomez-Meda BC, et al. Micronuclei in diabetes: folate supplementation diminishes micronuclei in diabetic patients but not in an animal model [J]. *Mut Res*, 2007, 634(1–2): 126–134.
- [33] Al-Rawi ZS, Gorial FI, Tawfiq RF, et al. Brief report: a novel application of buccal micronucleus cytome assay in systemic lupus erythematosus; a case-control study [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2014, 66(10): 2837–2841.
- [34] Torres-Bugarin O, Macriz Romero N, Ramos Ibarra ML, et al. Genotoxic effect in autoimmune diseases evaluated by the micronucleus test assay: our experience and literature review [J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015: 194031.
- [35] Ilyinskikh NN, Isaeva TM, Ivanchuk, II, et al. Frequencies of micronucleated lymphocytes and Epstein-Barr virus contamination in Altai region residents living near the Semipalatinsk atomic testing ground [J]. *Environ Mol Mutag*, 1998, 31(1): 11–17.
- [36] Cassel AP, Barcellos RB, da Silva CM, et al. Association between human papillomavirus (HPV) DNA and micronuclei in normal cervical cytology [J]. *Genet Mol Biol*, 2014, 37(2): 360–363.
- [37] Duensing S, Munger K. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins independently induce numerical and structural chromosome instability [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(23): 7075–7082.