

全国高等医药教材建设研究会规划教材
卫生部规划教材·全国高等学校教材
供预防医学类专业用

毒理学基础

第 4 版

主 审 张 桥
主 编 王心如
副主编 周宗灿

 人民卫生出版社

责任编辑 王凤丽

杨 晋

封面设计 赵京津

版式设计 何美玲

责任校对 刘 桦

- 1. 流行病学 (第5版)
- 2. 卫生统计学 (第5版)
- 3. 卫生化学 (第5版)
- 4. 营养与食品卫生学 (第5版)
- 5. 职业卫生与职业医学 (第5版)
- 6. 儿童少年卫生学 (第5版)
- 7. 环境卫生学 (第5版)
- 8. 毒理学基础 (第4版)
- 9. 社会医学 (第2版)
- 10. 卫生微生物学 (第3版)



- 11. 卫生事业管理学
- ★ 12. 健康教育学
- 13. 卫生法规与监督学
- 14. 卫生经济学
- 15. 卫生信息管理学
- 16. 社会医疗保险学

● 为“面向21世纪课程教材”

★ 为“普通高等教育‘十五’国家级规划教材”

ISBN 7-117-05642-8



9 787117 056427 >

定 价: 26.00 元

284982

289-43
W217(4)
2003
C.1

全国高等学校教材
供预防医学类专业用

毒理学基础

第4版



主审 张桥

主编 王心如

副主编 周宗灿

编者 (以姓氏笔画为序)

王心如 (南京医科大学公共卫生学院)

石年 (华中科技大学公共卫生学院)

孙志伟 (吉林大学公共卫生学院)

庄志雄 (中山大学公共卫生学院)

朱心强 (浙江大学公共卫生学院)

李百祥 (哈尔滨医科大学公共卫生学院)

周宗灿 (北京大学公共卫生学院)

金泰虞 (复旦大学公共卫生学院)

周建伟 (南京医科大学公共卫生学院)

钟才高 (中南大学公共卫生学院)

胡渝华 (四川大学公共卫生学院)

谢克勤 (山东大学公共卫生学院)

蔡 (院)

裴 (院)

秘 中 (学院)



00130039

人民卫生出版社

图书在版编目(CIP)数据

毒理学基础/王心如主编. — 4版. — 北京:
人民卫生出版社, 2003.

ISBN 7-117-05642-8

I. 毒… II. 王… III. 毒理学 - 医学院校 - 教材
IV. R99

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2003)第 053191 号

毒理学基础 第 4 版

主 编: 王心如

出版发行: 人民卫生出版社(中继线 67616688)

地 址: (100078) 北京市丰台区方庄芳群园 3 区 3 号楼

网 址: [http://www. pmph. com](http://www.pmph.com)

E - mail: [pmph @ pmph. com](mailto:pmph@pmph.com)

印 刷: 北京市增富印刷有限责任公司(万通)

经 销: 新华书店

开 本: 850×1168 1/16 印张: 22.75

字 数: 541 千字

版 次: 1987 年 5 月第 1 版 2003 年 8 月第 4 版第 19 次印刷

标准书号: ISBN 7-117-05642-8/R·5643

定 价: 26.00 元

著作权所有, 请勿擅自用本书制作各类出版物, 违者必究

(凡属质量问题请与本社发行部联系退换)

全国高等学校预防医学专业 第五轮规划教材出版说明

人类与疾病、灾害的斗争史是永恒的,在与疾病、灾害的斗争过程中,预防医学与临床医学各自发挥了不可替代的作用。尤其在突发性公共卫生事件的监测、预警及应急处理中,公共卫生专家和医师们更是控制和消除突发公共卫生事件的危害、保护公众健康和人民安全的中坚力量。为此,我们预防医学专业的教材建设更要放眼未来,不仅要完善预防医学专业教材的优化配套,更要提高质量,出版一批精品教材,以适应 21 世纪社会与公众日益增长的公共卫生需求。

自 2001 年 11 月全国高等学校预防医学专业教材评审委员会换届以来,卫生部教材办公室根据“全国高等学校预防医学专业第五轮规划教材主编及编者遴选条件”,着手组织遴选主编的工作。2002 年 7 月召开了全国高等学校预防医学专业教材评审委员会三届二次会议暨预防医学专业第五轮规划教材主编人会议,会上确定了第五轮教材共有 16 个品种,其中较上轮新增加 6 个品种:《卫生事业管理学》,《健康教育学》,《卫生法规与监督学》,《卫生经济学》,《卫生信息管理学》,《社会医疗保险学》;上轮未修订的《卫生微生物学》也在本轮修订;《卫生统计学》,《社会医学》,《卫生事业管理学》,《健康教育学》,《卫生经济学》,《卫生信息管理学》为与卫生管理专业共用教材;《劳动卫生与职业病学》更名为《职业卫生与职业医学》。会议强调第五轮教材仍然必须坚持“三基、五性、三特定”的基本要求,并希望本轮教材内容要立足于反映培养新时代学生的需要,满足社会对人才培养的需要,以及预防医学专业学生学习的需要。同时提出要适当增加教材篇幅,以便为学生提供自我摄取知识的条件,为不同层次的学校在教学上提供选择的余地;适应教育和教学改革的需要,真正地体现预防医学专业在公共卫生与疾病预防中的重要作用。

本套教材中,《流行病学》与《卫生化学》获教育部 2002 年全国普通高等学校优秀教材一等奖,《社会医学》获教育部 2002 年全国普通高等学校优秀教材二等奖,《健康教育学》为普通高等教育“十五”国家级规划教材。全套教材于 2004 年春季前全部出齐。

第五轮规划教材的目录如下:

- | | |
|---------------------|-------------------------------|
| 1. 流行病学 (第 5 版) | 主 审:施侣元
主 编:李立明
副主编:叶冬青 |
| 2. 卫生统计学 (第 5 版) | 主 编:方积乾
副主编:孙振球 |
| 3. 卫生化学 (第 5 版) | 主 编:胡曼玲 |
| 4. 营养与食品卫生学 (第 5 版) | 主 编:吴坤
副主编:孙秀发 |

- | | |
|--------------------|-------------------------------|
| 5. 职业卫生与职业医学 (第5版) | 主 审:梁友信
主 编:金泰虞
副主编:孙贵范 |
| 6. 儿童少年卫生学 (第5版) | 主 编:季成叶
副主编:刘宝林 |
| 7. 环境卫生学 (第5版) | 主 审:陈学敏
主 编:杨克敌
副主编:衡正昌 |
| 8. 毒理学基础 (第4版) | 主 审:张桥
主 编:王心如
副主编:周宗灿 |
| 9. 社会医学 (第2版) | 主 审:龚幼龙
主 编:李鲁 |
| 10. 卫生微生物学 (第3版) | 主 编:张朝武 |
| 11. 卫生事业管理学 | 主 编:梁万年
副主编:郝模 |
| 12. 健康教育学 | 主 编:马骁 |
| 13. 卫生法规与监督学 | 主 编:樊立华 |
| 14. 卫生经济学 | 主 编:程晓明
副主编:罗五金 |
| 15. 卫生信息管理学 | 主 编:罗爱静
副主编:李康 |
| 16. 社会医疗保险学 | 主 编:卢祖洵
副主编:陈金华 汪凯 |

全国高等学校预防医学专业第三届 教材评审委员会名单

主任委员:陈学敏

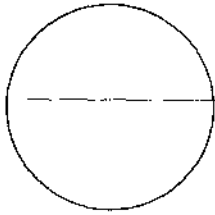
副主任委员:孙贵范

委 员 (以姓氏笔画为序)

马 骁 孙振球 刘宝林 姜庆五

胡永华 凌文华 梁万年

秘 书:孙秀发



前 言

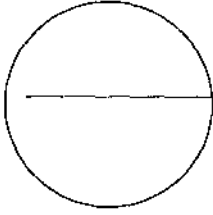
本教材第一版《卫生毒理学基础》于1991年出版,至今已12年,其间经过3次修订,为我国公共卫生与预防医学基础学科的教学、科研和人才培养发挥了积极作用。为紧跟新世纪生命科学的飞速发展,应对现代毒理学对教学和科研的严峻挑战,根据全国高等学校预防医学专业规划教材第五轮修订的基本原则和要求,我们于2002年7月至2003年5月完成了第4版的修订,并更名为《毒理学基础》。

在认真学习和总结前3版教材成功的经验,参考近年来国内外毒理学和药理学教科书与专著,以及吸取多个院校师生对第3版教材意见或建议的基础上,《毒理学基础》第四版教材的修订具有以下五个特点:①在编写的指导思想,力求符合高素质、创新性预防医学专业人才的培养目标,适应新世纪经济社会和卫生事业发展的迫切需求;②在编写的原则上,力求体现“三基”,即基本理论、基本知识和基本技能,坚持理论与实践结合、知识与技能并重;③在编写的内容上,力求反映“五性”,即思想性、科学性、启发性、先进性和适用性,坚持传承与发展的统一,基础与应用的统一,科学与艺术的统一;④在编写的方法上,力求深浅适宜、概念统一、知识更新、重点突出,坚持以描述毒理学-机制毒理学-管理毒理学为主线贯穿全书始终;⑤在编写的框架上,力求贯彻“三定”,即特定的对象、特定的要求和特定的限制,本教材虽然对各章节内容进行了修改、调整、删减、充实和更新,但全书仍控制在40万字左右,可作为全国高等医药院校本科生、研究生基础课程教学的教科书或参考书。

本书共分19章,其中总论部分10章,各论部分9章,主要作了如下修订:①更新了各章内容,特别是绪论、毒理学基本概念、外源化学物的毒作用机制、致突变、致癌等;②合并了一些章节,例如化学毒物在体内的生物转运和化学毒物的生物转化合并为一章;③调整了某些章节,例如将化学毒物的生殖毒性作用调整扩充为发育毒性与致畸作用和生殖毒理学两章,而化学毒物危险度评价和我国毒理学安全性评价程序两章调整更改为管理毒理学;④突出了靶器官毒理学的重要性,新增了毒理学各论9章;⑤书末附有主要参考书目和英中文对照,以便于读者查阅。此外,为进一步深化教育教学改革,改变“千校一面”的单一性、验证性实验,开设设计性、综合性实验,本书删去了第3版实习内容,尝试新编了第1版《毒理学实验方法与技术》,旨在进一步巩固和拓展学生的基础理论与实践技能。

在本版教材的修订编写过程中,承蒙卫生部教材办公室和人民卫生出版社的鼎力支持,全国13所高校的专家、教授和中山大学公共卫生学院张桥教授花费了大量的时间和精力,在此我们一并表示衷心感谢。由于我们的水平和能力有限,本书难免存在错误和不当之处,恳请广大师生、同行专家和其他读者不吝赐教和指正。

王心如 周宗灿
2003年5月



目 录

毒理学原理

第一章 绪论	1
第一节 毒理学概述	1
一、描述毒理学	1
二、机制毒理学	2
三、管理毒理学	2
四、毒理学科学与艺术	3
第二节 毒理学简史	3
一、古代与中世纪毒理学	3
二、启蒙时代毒理学	5
三、现代毒理学	6
第三节 毒理学展望	7
一、从高度综合到高度分化	7
二、从整体动物试验到替代试验	8
三、从阈剂量到基准剂量	8
四、从结构-活性关系到定量结构-活性关系	8
五、从危险度评价到危险度管理	9
第二章 毒理学基本概念	11
第一节 毒物、毒性和毒作用	11
一、毒物及其分类.....	11
二、毒性及其分级.....	12
三、毒作用及其分类.....	13
四、损害作用与非损害作用.....	14
五、毒效应谱.....	15
六、靶器官.....	15

七、生物学标志	15
第二节 剂量、剂量-量反应关系和剂量-质反应关系	17
一、剂量	17
二、量反应与质反应	17
三、剂量-量反应关系和剂量-质反应关系	17
四、剂量-反应曲线	18
第三节 表示毒性常用指标	20
一、致死剂量	20
二、阈剂量和最大无作用剂量	21
三、毒作用带	22
第四节 安全限值	22
第三章 外源化学物在体内的生物转运与转化	24
第一节 生物膜和生物转运	24
第二节 吸收	26
一、经胃肠道吸收	26
二、经呼吸道吸收	27
三、经皮肤吸收	28
四、其他途径吸收	29
第三节 分布	29
一、外源化学物分布的毒理学意义	29
二、毒物在组织中的贮存	30
三、特殊的屏障	31
四、特殊的膜转运机制	32
第四节 排泄	32
一、经肾脏(尿)排泄	32
二、粪便排泄	33
三、经肺(呼气)排泄和其他排泄途径	34
第五节 毒物动力学	34
一、经典毒物动力学	35
二、生理毒物动力学模型	39
第六节 毒物的代谢转化	42
一、生物转化和毒物代谢酶	42
二、I相反应	44
三、II相反应	53
四、毒物代谢酶的诱导和激活、抑制和阻遏	56
第四章 毒性机制	59

第一节 外源化学物的增毒与终毒物的形成	59
一、亲电物的形成	60
二、自由基形成	62
三、亲核物的形成	67
四、氧化还原活性还原剂的形成	68
五、解毒	68
六、解毒过程失效	70
第二节 终毒物与靶分子的反应	70
一、靶分子的属性	70
二、反应的类型	71
三、毒物对靶分子的影响	73
第三节 细胞功能障碍与毒性	76
一、毒物引起的细胞调节功能障碍	76
二、毒物引起的细胞维持功能改变	83
第五章 外源化学物毒性作用的影响因素	92
第一节 化学物因素	92
一、化学结构	92
二、理化性质	94
三、不纯物和化学物的稳定性	95
第二节 机体因素	96
一、物种间遗传学的差异	96
二、个体间遗传学的差异	97
三、机体其他因素对毒性作用敏感性的影响	98
第三节 环境因素	100
一、气象条件	100
二、季节或昼夜节律	100
第四节 化学物的联合作用	101
第六章 化学毒物的一般毒性作用	103
第一节 急性毒性作用	103
一、急性毒性的概念	103
二、急性毒性试验的目的	104
三、急性毒性试验方法的要点	104
四、急性毒性分级和评价	111
第二节 蓄积毒性作用	112
一、蓄积毒性作用的基本概念	112
二、蓄积作用的研究方法	113

第三节 亚慢性和慢性毒性作用·····	116
一、亚慢性毒性作用·····	116
二、慢性毒性作用·····	120
第七章 外源化学物致突变作用·····	123
第一节 概述·····	123
一、基本概念·····	123
二、遗传学基础·····	124
第二节 化学毒物致突变的类型·····	125
一、基因突变·····	125
二、染色体畸变·····	126
三、非整倍体和多倍体·····	126
第三节 化学毒物致突变作用的机制及后果·····	127
一、引起突变的 DNA 变化·····	127
二、引起突变的细胞分裂过程的改变·····	128
三、其他的改变·····	129
四、突变的后果·····	129
第四节 机体对致突变作用的影响·····	131
一、DNA 损伤的修复·····	132
二、遗传因素对致突变作用的影响·····	133
第五节 观察化学毒物致突变作用的基本方法·····	134
一、观察项目的选择·····	134
二、常用的致突变试验·····	136
三、致突变试验中的一些问题·····	139
第八章 外源化学物致癌作用·····	142
第一节 化学致癌机制·····	142
一、与致癌作用有关的代谢·····	143
二、化学致癌作用的分子机制·····	143
三、化学致癌过程·····	145
四、非遗传毒性致癌机制·····	147
第二节 化学致癌物的分类·····	147
一、根据致癌物对人类和动物的致癌作用分类·····	147
二、根据化学致癌物作用机制的分类·····	149
第三节 观察化学毒物致癌作用的基本方法·····	150
一、短期试验·····	150
二、哺乳动物长期致癌试验·····	152
三、人群流行病学调查·····	153

四、作为致癌作用模型的转基因小鼠和基因敲除小鼠	154
第九章 发育毒性与致畸作用	155
第一节 概述	155
一、发育毒理学	155
二、从畸胎学到发育毒理学	155
第二节 发育毒性与致畸性	156
一、基本概念和发育毒性的终点	156
二、发育各阶段发育毒性作用的特点	157
三、母体毒性与发育毒性	159
四、发育毒性的剂量-反应模式和阈值的概念	160
第三节 致畸(发育毒性)作用机制	162
第四节 发育毒性和致畸作用试验与评价	164
一、动物发育毒性试验	165
二、流行病学研究和人类的证据	165
三、发育毒性的替代试验	168
第十章 管理毒理学	170
第一节 概述	170
第二节 危险度评价	171
一、基本概念	172
二、危险度评价	173
三、危险度管理	181
第三节 安全性评价	181
一、毒理学安全性评价的意义	182
二、毒理学安全性评价程序的基本内容	183
三、安全性评价需注意的问题	186
靶器官毒理学	
第十一章 血液毒理学	189
第一节 概述	189
一、血液和造血组织的组成	189
二、血液作为靶器官	191
第二节 红细胞系毒理学	192
一、红细胞生理学	192
二、环境因素对红细胞生成的毒性作用	194
第三节 白细胞系毒理学	197

一、白细胞对毒性物质的反应	197
二、白血病	198
第四节 血小板对中毒损伤的应答	201
第五节 血液毒理学研究方法	202
第十二章 免疫毒理学	204
第一节 概述	204
第二节 免疫系统对外源化学物的毒性反应与机制	205
一、免疫抑制	205
二、超敏反应	208
三、自身免疫	210
第三节 免疫毒性检测方案	212
第四节 免疫毒性试验方法与评价	215
一、免疫学方法	216
二、检测细胞因子的方法	219
三、转基因动物模型	220
第十三章 生殖毒理学	222
第一节 概述	222
一、历史	222
二、环境内分泌干扰物	223
三、生殖危害	223
第二节 外源化学物对雄性生殖能力的损害作用与机制	224
一、下丘脑-垂体-睾丸轴	224
二、支持细胞	225
三、间质细胞	228
四、成熟精子	230
第三节 外源化学物对雌性生殖能力的损害作用与机制	232
一、下丘脑-垂体-卵巢轴	232
二、卵泡发育	234
三、卵母细胞	236
第四节 外源化学物对生殖能力影响的检测与评价	238
一、雄性生殖能力检测与评价	238
二、雌性生殖能力检测与评价	241
三、生殖能力综合评价	244
第十四章 神经系统和行为毒理学	247
第一节 概述	247

第二节 神经系统对外源化学物的毒性反应	248
一、神经毒物及分类	248
二、神经系统对外源化学物的毒性反应	249
三、神经毒性作用特点	251
第三节 神经毒性作用机制	251
一、神经递质与神经毒性	252
二、通道与神经毒性	252
三、受体信号转导与神经毒性	253
四、神经胶质细胞与神经毒性	255
五、细胞骨架与神经毒性	256
第四节 神经系统和行为毒理学研究方法与评价	256
一、动物神经系统疾病模型	257
二、神经行为功能测试组合	258
三、学习和记忆功能测试	259
四、运动功能测试	262
第十五章 呼吸毒理学	265
第一节 概述	265
一、呼吸系统的结构与功能	265
二、呼吸系统毒物	267
第二节 呼吸系统对外源化学物的毒性反应	270
一、急性损伤	271
二、变态反应	271
三、慢性损伤	271
四、肺损伤的适应	273
第三节 肺损伤机制	274
一、肺血管内皮和上皮细胞损伤	274
二、巨噬细胞损伤	274
三、肺表面活性物质破坏	275
四、细胞因子在肺损伤中的作用	275
第四节 呼吸毒理学研究方法	276
一、整体试验	276
二、支气管肺泡灌洗	278
三、离体试验	279
第十六章 肝脏毒理学	280
第一节 概述	280
第二节 肝毒物	281

一、肝毒物分类	282
二、肝毒物接触方式	282
第三节 肝对外源化学物的毒性反应与机制	283
第四节 化学性肝损伤的检测与评价	286
一、肝损伤的体内试验评价	286
二、肝损伤的体外试验评价	291
第十七章 肾脏毒理学	293
第一节 概述	293
一、肾是毒物的重要靶器官	293
二、引起肾毒性的化学物	293
三、肾对毒物的易感性	294
第二节 肾结构与功能的生物学基础	294
一、肾小球的滤过功能	294
二、肾吸收和分泌	295
三、逆流放大系统和尿液浓缩机制	296
四、肾中外源化学物的生物转化	296
第三节 中毒性肾损伤的部位与类型	297
一、肾小球损伤	297
二、肾近曲小管损伤	297
三、髓袢、远曲小管及集合管损伤	298
四、肾疾病分类	298
第四节 肾的毒性作用机制	299
一、细胞死亡	299
二、活性中间代谢产物	299
三、细胞容积和离子内稳态	300
四、细胞骨架和细胞极性	300
五、钙的内稳态	300
第五节 肾损害的检测与评价	300
一、整体实验	300
二、离体试验	302
第六节 几种常见的肾性毒物	303
一、汞	303
二、镉	304
三、氟仿	304
四、四氟乙烯	304
五、溴化苯	305

第十八章 心血管毒理学	306
第一节 概述	306
一、心血管毒理学概念	306
二、心血管系统构成及特点	307
第二节 毒物对心脏和血管的毒性作用	307
一、心血管毒物对心脏的毒性作用	307
二、心血管毒物对血管的毒性作用	313
第三节 心血管毒物的毒作用机制	316
一、心脏毒性的一般机制	316
二、心肌适应	317
三、心脏毒性的分子机制	318
四、血管毒性的一般机制	321
第四节 心血管毒性的检测与评价	321
一、心血管毒理学实验模型	322
二、形态学和功能学检测与评价	323
第十九章 皮肤毒理学	324
第一节 概述	324
第二节 皮肤的组织结构和功能	324
一、皮肤的组织结构	324
二、皮肤的功能	326
第三节 皮肤毒作用类型和机制	327
一、接触性皮炎	327
二、光毒性作用	330
三、痤疮和氯痤疮	333
四、色素异常	333
五、肉芽肿疾病	334
六、荨麻疹	334
七、中毒性表皮溶解坏死	335
八、皮肤肿瘤	335
第四节 皮肤毒理学研究方法和评价	336
附录一 主要参考书目	338
附录二 英中文对照	339

第一节 毒理学概述

毒理学(toxicology)的传统定义是研究外源化学物(xenobiotics)对生物体损害作用(adverse effects)的学科。现代毒理学超越了这一简单定义,它以毒物为工具,在实验医学和治疗学的基础上,发展为研究化学、物理和生物因素对机体的损害作用、生物学机制(biologic mechanisms)、危险度评价(risk assessment)和危险度管理(risk management)的科学。毒理学主要分为三个研究领域,即描述毒理学(descriptive toxicology)、机制毒理学(mechanistic toxicology)和管理毒理学(regulatory toxicology)。虽然每个领域都有其明显的特征,但三者互为关联,对于危险度评价至关重要。

一、描述毒理学

描述毒理学工作者直接关注的是毒性鉴定,以期为安全性评价和危险度管理提供信息。采用实验动物进行适当的毒性试验,可获得用于评价人群和环境特定化学物暴露的危险度信息。就药品和食品添加剂而言,这些信息可能仅限于对人类的影响。然而,工业毒理学工作者不仅要研究工业化学物(例如:杀虫剂、除草剂、杀真菌剂、有机溶剂等)对人类的危险度,而且要研究这些化学物对鱼、鸟、蚕、陆栖动物和植物以及其他可能破坏生态系统平衡的因素的潜在影响。描述毒理学研究还可为化学物的毒作用机制提供重要线索,通过形成假设为发展机制毒理学作出贡献,这些研究成果也是管理毒理学工作者进行危险度评价的关键内容。

二、机制毒理学

机制毒理学工作者的研究重点是化学物对生物体产生毒作用的细胞、生化和分子机制。机制研究结果在应用毒理学的许多领域非常重要。在危险度评价中,机制毒理学研究资料主要有以下四方面用途:①证实与人类直接相关的实验动物中所观察到的损害作用(癌症、出生缺陷等)。例如,根据对有机磷杀虫剂(OPI)一般作用机制(抑制乙酰胆碱酯酶活性)和OPI在不同动物种属体内生物转化差异的了解,我们即可准确预测OPI对啮齿类动物和昆虫的相对毒性作用。②验证可能与人类无关的发生于实验动物中的有害效应。例如,广泛使用的人造甜味剂糖精可致大鼠膀胱癌,而正常饮食中的糖精摄取率并不引起人类膀胱癌。机制研究已经证实,只有在尿液中糖精达到很高浓度并形成结晶状沉淀的情况下才会诱导膀胱癌。剂量-反应关系研究结果提示,即使在大量饮食后,人的膀胱中也不可能达到如此高的糖精浓度。③设计和生产较为安全的化学物以及合理治疗化学中毒和临床疾病。例如,最初在欧洲市场上用作孕妇镇静剂的反应停(thalidomide),因为在怀孕的关键时期服用该药可导致出生缺陷,1962年被禁用。然而,过去几十年机制研究已经证实,该药具有独特的分子作用机制,即干扰某些血管生成(angiogenesis)基因的表达。正是基于对这种作用机制的了解,反应停已被用于治疗某些传染病(麻风、AIDS等)、许多炎症性疾病以及某些癌症,但孕妇严格禁用。④进一步加深对基础生理学、药理学、细胞生物学和生物化学的了解。例如,对于有机氟乙醇和酸的毒性研究,可了解糖和脂类的基础代谢;通过对河豚毒素等生物毒素和DDT等合成化学物的研究,大大增加了对神经轴突膜中离子梯度调节的了解。分子生物学和基因组学研究中新技术的出现,为机制毒理学家科学探索同样暴露于有毒物质后人和实验动物的反应差异提供了新的工具,这些工具也被用于早期识别对环境因素易感的个体。例如,现在已认识到,少数人缺乏对用于治疗某些白血病的化疗药物6-巯基嘌呤的解毒能力,患有白血病的青少年常伴有同型遗传性状,他们对该药标准治疗剂量可能会产生严重的中毒反应。现在可预先采用遗传毒理学试验来筛选易感个体,这种新的毒物基因组学(toxicogenomics)研究为将来机制毒理学家识别和保护易感个体免受有害环境暴露的影响,以及根据个体的遗传性状制定药物治疗方案(提高有效率并最大限度地降低毒性反应)等方面,提供了振奋人心的机会。

三、管理毒理学

管理毒理学原理和实验毒理学原理

管理毒理学工作者的主要职责和任务是根据描述和机制毒理学的研究资料进行科学决策,协助政府部门制定相关法规条例和管理措施并付诸实施,以确保化学物、药品、食品等进入市场足够安全,达到保护人民群众身心健康的目的。例如,近40年来,发达国家和许多发展中国家都先后成立了相应的管理机构并颁布了有关药品、食品和化妆品法,农药杀虫剂、杀真菌剂和灭鼠剂法,有害物质控制法和环境资源保护法等。管理毒理学工作者还需根据危险度评价的原理和方法,结合描述和机制毒理学研究提供的科学信息,制定大气、职业环境和饮用水中化学物的卫生标准。为了出色地做好上述各项工作,毒理学工作者还应具备较强的哲学和逻辑思维能力。

除了上述三个主要研究领域外,毒理学其他的特殊领域还包括:法医毒理学(forensic toxicology)、临床毒理学(clinical toxicology)和环境毒理学(environmental toxicology)等。法医毒理学是分析化学与基础毒理学原理结合而形成的一门交叉学科,主要研究化学物对人和动物有害效应的法医学(medico legal)问题。法医毒理学工作者主要协助确定死亡原因,明确尸检结果。临床毒理学作为医学科学范畴中的一个重点专业领域,主要研究由毒物或药物引起的疾病,研发解毒剂,发展新方法,改进治疗方案,控制中毒的发生以及外源化学物的损害作用。环境毒理学重点研究环境中化学污染物对生物体的影响,虽然环境毒理学工作者也关注环境污染物对人群健康的影响,但更多的是致力于研究外源化学物对鱼、鸟以及陆栖动物的影响。生态毒理学(ecotoxicology)是环境毒理学中的特殊领域,侧重于研究生态系统中毒物对群体动态的影响。环境中化学物的迁移、转归及其交互作用是环境毒理学和生态毒理学的关键研究内容。总之,毒理学研究领域十分广阔,毒理学家的科技活动与贡献多种多样,纵有不同,但极具互补性、科学性和战略性,充分体现了毒理学科学的鲜明特色和促进社会经济发展与文明进步的强大生命力。

四、毒理学科学与艺术

正如医学一样,毒理学既是一门科学(science),又是一门艺术(art)。其科学性体现在观察和收集资料方面,而艺术性则体现在利用这些资料预测人群和动物种群的暴露结局方面。大多数情况下,这两方面都是相互联系的,因为前者所观察到的事实和收集的数据被用于外推(extrapolation)并形成假设(hypothesis),以便对尚不了解或了解甚少的外源化学物的损害作用进行解释。例如,发现TCDD可诱导雌性SD大鼠肝细胞瘤是一个事实,然而,由此得出TCDD也可致人类肝细胞瘤的结论就是一种预测(prediction)或假设。将科学与艺术区分开来是非常重要的,如果我们不能区分毒理学的科学与艺术,那我们就会混淆事实与预测,就会认为它们同样正确,而事实上这显然是错误的。与所有其他科学一样,毒理学科学中的理论(theory)要比假设肯定,而假设又依次比推测(speculation)、观点(opinion)和猜测(conjecture)肯定。通过对本学科历史发展过程的审视,我们可以更深刻地了解现代毒理学的内涵以及毒理学家的角色、观点、活动、贡献和未来发展的趋势。

第二节 毒理学简史

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有关文献中,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)。长期以来很难对毒物进行确切的定义,目前毒物的概念是指较低的剂量进入机体后能引起疾病或危及生命的物质。我们的祖先常用动物的毒液和植物的提取液来狩猎、作战和

暗杀。从20世纪初开始,由于不断从自然科学和生物科学的大量分支学科中吸收知识和技术,毒理学逐步发展为现代科学。

神农被认为是中医、草药和农业之父。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、硫磺和汞等),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1553~1500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、硫磺、明矾、苏打、铅、铜和铋等)、875~900个处方以及47例病史记录。有关早期埃及(公元前2000~1400)医药实践的资料还有Edwin Smith、Hearst、Kahun、Berlin和Brugsch等文献。

占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6章,介绍了1120种疾病,列出了760种本地药用植物,描述了动物和矿物疗法,强调了卫生的重要性。第五章着重叙述了毒理学,绝大部分是有关解毒剂的介绍。

古希腊人认为,医药学既是一门艺术,又是一门科学。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,植物组分和金属生物学效应的实验研究,控制中毒的科学方法研究。在医学和毒理学方面作出重要贡献的主要代表人物有:Pathagoras(公元前580~489),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460~355),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370~286)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《植物学史》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120~63)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(公元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催吐和导泻疗法。

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,这可能就是本书广为流传的原因,自公元1472年始共出版了14次。

二、启蒙时代毒理学

中世纪后期科学和医学史上—位重要人物是文艺复兴人 Paracelsus(1493 ~ 1541),他被誉为弗洛伊德学说的先驱、化学解剖学家、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个支柱。他的著名格言是:所有的物质都是毒物,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。Paracelsus 为实验毒理学研究、毒理学中靶器官毒性以及剂量-反应关系等基本概念的确立作出了重大贡献。法国内科医生、诗人和剧作家 Crevin(1538 ~ 1570)被誉为现代生物毒理学之父,1568 年在他的经典著作中进一步发展了化学-生物学相互影响的重要概念。

工业革命快速发展导致许多职业病发病率的升高。卓越的意大利内科医生 Ramazzini(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。1775 年英国著名职业医学/毒理学家和矫形外科医生 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 10000 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西班牙医生,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伟大贡献。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;他的著名学生之一 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 CO 与血红蛋白的不可逆性结合而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中的经典。Bernard 的学生 Blake(1815 ~ 1893)发现了药物的化学结构-生物学活性关系,后来英国出现了大量有关化学物结构-活性关系的研究,最为成熟的可能要数 Brown(1838 ~ 1922)和 Fraser(1841 ~ 1920)对有机生物碱的研究。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巨大贡献,Schmiedeberg(1838 ~ 1921)和 Lewin(1850 ~ 1929)是其中的两位天才。Schmiedeberg 着重研究了不同动物种属肝脏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。此外,Kobert(1854 ~ 1918)对洋地黄甙和麦角生物碱进行了研究。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开始发展的标志,然而本学科快速发展是在二战时期,这时期药品、农药、军需品、合成纤维以及工业化学物生产急剧大量增加。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)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 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 年创刊了实验毒理学杂志之一《Archives of Toxicology》,同年在美国成立了 NIH。1937 年引起急性肾衰竭和死亡的“磺胺(sulfanilamide)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。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中的领头人。

20 世纪 40 年代前后,机制毒理学研究使人们加深了对许多化学物毒性作用的了解并研制出多种解毒剂。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、抗疟药和放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 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 1948 年的放射性标记二苯并蒽的使用,促进了对细胞色素 P-450 蛋白家族的大量研究工作的开展。

20 世纪 50 年代,在美国著名管理毒理学家 Lehman(1900 ~ 1979)指导下,FDA 对毒理学的职能开始加强。1955 年,他和他的同事共同出版了《食品、药品和化妆品中化学物的安全性评价》,这是首次通过 FDA 为毒理学研究提供的指南。此外,Lehman 与 Fitzhugh 还首次共同提出安全系数(SF)的概念,WHO 根据 SF 提出了每日允许摄入量(ADI)的概念,Coulston、Lehman 和 Hayes 共同创办了毒理学中的权威杂志《Toxicology and Applied Pharmacology》。

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。60年代后5年,由于发展了化学物的超痕量(10^{-9})分析和快速检测点突变的技术,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70~80年代,涉及毒理学的相关法规、杂志和新的协会呈指数扩展。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 Sipes 等主编出版的毒理学参考书《Comprehensive Toxicology》共有13卷。

第三节 毒理学展望

纵观毒理学的历史沿革,我们不难看出,他是借助于多个学科成长并繁荣起来的科学。随着现代生物技术信息(例如美国国家 GENBANK 数据库中心、欧洲分子生物学 EMBL 系统、日本 DDBJ 数据库以及相应的 ENTRE2 或 BLAST 研究系统)的快速扩增和现代分析技术与方法(例如化学物的超痕量分析、高通量筛选、定量结构-活性关系的预测分析以及生物分析培养等)的超常规发展,毒理学的研究领域、评价过程和相关的管理及信息系统正发生着革命性的变化。可以预料,我们所面临的、令人振奋而富有挑战性的毒理学科学的未来发展趋势是:从高度综合(集化学、生命科学和基础学科知识为一体)到高度分化(形成多个交叉分支学科);从体内试验(in vivo)到体外试验(in vitro);从结构-活性关系(SAR_s)到三维(3D)定量结构-活性关系(QSAR_s);从定性毒理学到定量毒理学;从微观(细胞、生化、分子)、宏观(环境)到人体(群体、个体);从观察现象、探明机制到科学规范管理。

一、从高度综合到高度分化

毒理学的发展与测试手段的快速发展,以机制研究为基础的毒理学已形成许多重要的交叉学科:例如分子毒理学、细胞毒理学、遗传毒理学、生化毒理学、受体毒理学等。

1. 在不断深入研究毒物损伤机体各脏器、系统的过程中,靶器官毒理学已成为毒理学的主要组成部分:例如肺(呼吸系统)毒理学、血液(造血系统)毒理学、免疫系统毒理学、生殖与内分泌毒理学、神经系统与行为毒理学、肝与胃肠道毒理学、肾毒理学、心血管系统毒理学、皮肤毒理学、眼毒理学等。

2. 随着现代生命科学高新技术和测试手段的快速发展,以机制研究为基础的毒理学已形成许多重要的交叉学科:例如分子毒理学、细胞毒理学、遗传毒理学、生化毒理学、受体毒理学等。

3. 根据研究对象和学科领域的不同,毒理学又进一步分化为:药物毒理学、食品毒理学、临床毒理学、分析/法医毒理学、环境毒理学、职业毒理学等。

4. 按照毒物的不同性质,毒理学的分支学科主要划分为:农药毒理学、金属毒理学、有机溶剂毒理学、放射毒理学等。

二、从整体动物试验到替代试验

鉴于普遍而日益增加的公众舆论压力和经济上的考虑,整体动物试验如目前采用的兔 Draize 试验、LD₅₀ 毒性试验和致癌试验等正面临再评价并可能被替代。替代法(alternatives)又称“3R”法,即优化(refinement)试验方法和技术,减少(reduction)受试动物的数量和痛苦,取代(replacement)整体动物试验的方法。1980年以来,体外毒性试验研究领域快速发展,美国、欧洲、日本等国还成立了相应的动物试验替代中心或研究机构。

三、从阈剂量到基准剂量

在整体动物试验中,不可能获得准确的阈剂量,但可以获得类似的参数“观察到损害作用的最低剂量(LOAEL)”;不可能获得准确的最大无作用剂量,却可以获得“未观察到损害作用的剂量(NOAEL)”。LOAEL和NOAEL是试验中获得的具体数量值,是计算参考剂量(RfD)和确定SF时的关键参数。因其常受试验组数、每组样本量大小和剂量组距宽窄等因素的影响,故有一定的局限性。为此,由Grump(1984)首先提出并由Kimmel和Gaylor(1988)进一步发展的基准剂量法(BMD),被推荐用来替代NOAEL或LOAEL。BMD是指ED₁、ED₅或ED₁₀的95%可信限下限值。由BMD推导RfD的优点是:依据剂量-反应关系曲线的所有数据计算获得,大大提高了准确性;计算反应剂量95%可信限下限值,充分考虑了试验组数,每组动物数以及观察终点参数的离散程度;对于未直接获得NOAEL的试验,仍可计算出BMD。BMD已成功地用于生殖与发育毒性的危险度评价。

四、从结构-活性关系到定量结构-活性关系

进行啮齿类动物的终生致癌试验需要花大量资金和时间,但根据化学物的结构、理化特性和某些生物学活性,即SARs,则可初步预测其潜在危害性或致瘤性。例如,美国OSHA和EPA曾对14个职业性致癌物进行了分析,发现其中8个属于芳香胺类化学物,并以N-亚硝基或芳香胺基团、氨基偶氮染料或非核结构等作为评价潜在致癌物的基础构型。EPA也曾根据化学物对AhR的诱导作用,以等毒系数(TEFs)法来评价环境化学混合物中与TCDD相关的化合物、氯化二苯-对-二噁英、氧芴以及平面联苯的危险度。此外,在用TEFs评价PCBs、多氯二苯-对-二噁英(PCDDs)和多氯氧芴(PCDFs)对人以及野生动物的毒性方面,WHO也曾致力于国际间的协调以便达成一致。然而,SARs法不能用于评价伴有丙戊酸、视黄酸、乙二醇醚等相关结构的化学物的危险度,也不能超越化学物的种类,尤其是避开多个毒性终点,而仅以一种生物学反应来预测化学物的毒性。例如,因为在这些复杂的混合物中的化学物可能竞争相同的受体,目前尚不能直接测量人体靶组织中的AhRs。为此,EPA又提出以CYP1A2活性或表皮生长因子受体(EGFR)浓度来评价化学物的潜在危害性。然而,美国NTP应用计算机辅助的SARs法预测研究44个化学物对啮齿类动物的致瘤性未能获得成功。令人振奋的是,制药公司则成功地应用3D分子模型方法设计出在空间构型上与目的受体相对应的配体(新药),实施这种战略的基础

是需要药效基团图谱和 3D 搜索与分子设计,并要确立 QSARs。这种 QSARs 研究,尤其是包括多个毒性终点以及致突变、致畸和致癌的 QSARs 研究,为开展环境中大量存在的混合化学物(复合暴露)的危险度评价创造了良好的条件。

五、从危险度评价到危险度管理

1976 年美国 EPA 首先推荐了危险度评价系统,1983 年美国 NRC 提出了危险度评价程序,目前已进一步细化为四个步骤:①危害性认定,即通过 SARs 或 QSARs 分析、体内和体外试验以及人群流行病学调查,评价特定化学物产生损害作用的可能性;②剂量-反应关系评价,即通过分析接触一定剂量或浓度的化学物与人群中产生有害效应之间的关系,确定危险度的基准值;③接触评定,即要明确人群接触特定化学物的总量,并阐明接触特征,例如接触类型、水平和持续时间等;④危险度特征分析,即通过综合分析前三个阶段提供的信息,阐明接触人群中产生损害作用的性质,并预测该损害作用在接触人群中的发生率。危险度评价过程中需考虑以下几个重要问题:动物实验资料外推到人时,要注意有无阈值、高剂量向低剂量外推、小样本向大样本外推、内剂量与外剂量(接触剂量)不平行等问题。为降低或控制外推数据的不确定性,可考虑计算 BMD 值,采用以生理学为基础的毒物动力学模型(PBTK)和以生物学为基础的剂量-反应模型(BBDR)来分别加以校正;通过加强人体毒理学(human toxicology)研究,构建人群接触性(例如化学物内剂量和生物效应计量)、效应性(例如早期生物效应、结构/功能改变、疾病)和易感性(例如疾病易感基因及其多态性)生物学标志(biomarkers)信息数据库,可直接降低以动物实验数据外推到人的不确定性;根据对整体动物试验、体外试验与人体组织细胞的体外反应试验的比较分析结果,然后再平行地将动物实验数据外推到人,即所谓的平行程序法(parallelogram),也可降低外推的不确定性;为有效控制以动物实验资料外推到人的不确定性,在进行整体动物毒性试验过程中,须严格执行良好实验室规范(GLP)和标准操作规程(SOP)。

危险度评价的根本目的是危险度管理。从危险度评价到危险度管理,反映了从描述毒理学、机制毒理学到管理毒理学研究的全过程。管理毒理学使全世界的政府和企业领导逐步认识到毒理学科学的重要性,从而使学术界、工业界和政界的科学家与管理学家进行有效的相互交流与协作,共同采取行动以保护公众的身心健康,维护生态平衡,促进经济发展,推动社会文明进步。在整个 20 世纪,特别是近 40 年来,以美国、欧洲、日本为代表的发达国家,先后制定并完善了多种法规条例以加强对有毒物质的管理。例如,美国 1976 年颁布的《有毒物质管理法》和 1979 年的《联邦食品、药品和化妆品法》,80 年代前后出台的联邦杀虫剂、杀真菌剂和灭鼠剂法、资源保护与恢复法、综合环境治理、赔偿与责任法、饮水安全法和空气净化法等;1973 年日本和 1977 年法国的《化学物质管理法》;1975 年加拿大的《环境污染法》;1976 年挪威的《产品管理法》等。80 年代以来,我国政府陆续颁布了多种法规条例、毒理学评价程序或试验方法。例如,1983 年试行并于 1994 年批准的《食品安全性毒理学评价程序》,1987 年颁布的《化妆品安全性评价程序和方法》,1991 年颁布的《农药安全性毒理学评价程序》和 1995 年颁布的《农药登记毒理学试验方法》,1993 年颁布的《新药审批办法》和《新药(西药)毒理学研究指导原则》以及 1999 年试行的《药品非临床研究质量管理规范》和 2000 年颁布的《化学品毒性鉴定管理规范》等。此外,全球已有 70 个国家(包括中国)成立了药物不良反应(ADR)监测中心。

毒理学是集成的、多元的、创新的和服务性的科学,很少有学科能像毒理学一样既是基础科学又能直接应用。毒理学已历经漫漫长途,如今他正伴随现代科学技术的发展而加速前进,毒理学时代已经到来。

(王心如)

2

第二章

毒理学基本概念

第一节 毒物、毒性和毒作用

一、毒物及其分类

毒物按其来源可分为天然毒物、化学毒物、生物毒素等。

在一定条件下,以较小剂量进入机体就能干扰正常的生化过程或生理功能,引起暂时或永久性的病理改变,甚至危及生命的化学物质称为毒物(poison)。但实际上,几乎所有的化学物质都有引起机体损伤的可能。例如,各种药物在其治疗剂量范围内发挥疗效,而超出该范围达到中毒剂量时,则成为毒物。另一方面,人体内经常有痕量的铅、汞等重金属存在,但这并不意味着发生了重金属中毒。可见,毒物与非毒物之间并没有绝对的界限,使两者之间发生互变的重要条件是剂量。正如毒理学实验研究的奠基人 Paracelsus(1493 ~ 1541)所说:所有物质都是毒物,剂量将它们区分为毒物与药物。

人类最早接触的毒物,主要是动植物中的天然毒物。自 19 世纪工业革命以来,化学合成物大量面世。特别是 20 世纪 40 年代以来,随着科学技术的迅猛发展,越来越多的化学合成物进入各种生产和生活领域。目前,全世界登记的化学物质已达 1000 多万种,人们经常使用和接触的约有 7 ~ 8 万种,此外,每年还有 1000 多种新产品投入市场,使人们接触的化学物质无论是品种还是数量都在不断增加。有关化学物质的分类,随目的和习惯不同有多种方法。例如,按其用途和分布范围可分为:

1. 工业化学品 如生产原料、辅剂、中间体、副产品、杂质、成品等。
2. 食品添加剂 如糖精、香精、食用色素、防腐剂等。
3. 日用化学品 如化妆品、清洁与洗涤用品、防虫杀虫用品等。
4. 农用化学品 如化肥、杀虫剂、除草剂、植物生长调节剂、保鲜剂等。
5. 医用化学品 如各种剂型的药物、消杀剂、造影剂等。
6. 环境污染物 如存在于废水、废气、废渣中的各种化学物质。
7. 生物毒素 如动物毒素、植物毒素、细菌毒素、真菌毒素等。
8. 军事毒物 如芥子气等战争毒剂。

9. 放射性物质 如放射性核素、天然放射性元素等。

此外,还可按化学结构和理化性质、毒性级别、毒作用性质和部位、毒作用的生理生化机制等对化学物质进行分类,可根据具体情况予以选择。

二、毒性及其分级

毒性(toxicity)指化学物质能够造成机体损害的能力。在同等剂量下,对机体损害能力越大的化学物质,其毒性越高。相对于同一损害指标,需要剂量越小的化学物质,其毒性越大。如同“毒物”和“非毒物”是相对的一样,化学物质的毒性大小也是相对的。只要达到一定的剂量水平,化学物质就具有毒性,而如果低于某一剂量水平时,不具有毒性。因此,剂量是化学物质毒性的决定因素。

除了剂量外,接触条件如接触途径、接触期限、速率和频率等因素对化学物质的毒性及性质也有影响。

1. 接触途径 多数情况下,化学物质需要进入血液并随血流到达作用部位才能发挥其毒性,而同一种化学物质经由不同途径(经口、经皮、经呼吸道等)与机体接触时,其吸收系数(即入血量与接触量之比)是不同的。例如,经静脉染毒时,化学物质直接入血,吸收系数为1,即完全被吸收,通常表现出的毒性也最高。其他静脉外途径染毒,一般吸收系数都小于1,表现出的毒性也相对较低。经口染毒时,化学物质在胃肠道吸收后经由门静脉系统到达肝脏被代谢(称为首过效应,first pass effect)。在这种情况下,代谢产物的毒性直接影响化学物质对机体的损害能力。

2. 接触期限、速率和频率 在毒理学研究中,通常按给动物染毒的时间长短分为急性、亚慢性和慢性毒性试验。急性毒性试验为1次或24h内多次对实验动物高剂量染毒,而亚慢性和慢性毒性试验则为较长时间(至少1个月以上)内对动物反复多次低剂量染毒。许多化学物质的急性染毒与较长时间染毒的毒性表现不同,一般前者迅速而剧烈,后者则相对平缓。除了强度差别外,有时还有性质差别。例如,有机溶剂苯的急性中毒表现是中枢神经系统抑制,而重复接触则导致再生障碍性贫血和白血病。

不同化学物质即使染毒剂量相同,但吸收速率不同则中毒表现也将不同。吸收速率快者(如静脉注射)可在短时间内到达作用部位并形成较高浓度,从而表现出较强的毒性。

与时间相关的另一影响因素是接触频率。对于具体的化学物质而言,接触的间隔时间如短于其生物半减期($t_{1/2}$)时,进入机体的量大于排出量,易于积累至一个高水平,从而引起中毒。反之,如接触的间隔时间长于 $t_{1/2}$ 时,就不易引起中毒(高剂量接触时除外)。

选择毒性(selective toxicity)系指一种化学物质只对某种生物产生损害作用,而对其他种类生物无害;或只对机体内某一组织器官发挥毒性,而对其他组织器官不具毒作用。

化学物质出现选择毒性的原因可能在于:

(1)物种和细胞学差异:如植物在许多方面不同于动物,它们没有神经系统和有效的循环系统及肌肉系统,但具有细胞壁和光合系统。细菌有细胞壁,人体细胞则没有细胞壁。利用这些差异研制出来的各种抗菌药物,可以杀死致病菌而对人体细胞无害。

(2)不同生物或组织器官对化学物质生物转化过程的差异:如细菌不能直接吸收叶酸,而是

利用对位-氨基苯甲酸、谷氨酸和蝶啶来合成叶酸。与其相反,哺乳动物体内不能合成叶酸,只能从食物中摄取。据此发明了磺胺类药物,它们在荷电数与分子结构和大小上相似于对位-氨基苯甲酸,可以拮抗其参与叶酸的合成,故对细菌有选择毒性,而对人体细胞无害。

(3)不同组织器官对化学物质亲和力的差异:如CO与血红蛋白的二价铁具有高度亲和力,浓集于红细胞中阻断氧的摄取和释放,发挥其毒性。再如除草剂百草枯主要蓄积在肺内,导致肺组织损伤,继而纤维化,丧失通气功能。

(4)不同组织器官对化学物质所致损害的修复能力的差异:如脑组织的再生能力很差,一旦发生实质性的损害就很难恢复。而肝、肾等器官的再生能力很强,即使造成损害,只要脱离接触,就可望得到修复,恢复正常功能。

选择毒性反映了生物现象的多样性和复杂性,使毒理学动物试验结果外推至人发生困难。但也正是由于选择毒性的存在,人类才得以发明各种特异性药物用于临床医疗、农业和畜牧业等领域,并从中获益。

在毒理学研究中,不同阶段的试验可用于观察化学物质的不同毒作用或毒性终点(endpoint)。如急性毒性试验以受试物引起的机体死亡为毒性终点指标;亚慢性、慢性毒性试验以受试物造成的生理、生化、代谢等过程的异常改变为毒性终点指标;而遗传毒理学试验则以受试物导致的基因突变、染色体畸变、畸形、肿瘤形成等为毒性终点。因许多毒性终点之间无法类比,故化学物质的毒性分级标准以终点为基础,如急性毒性根据LD₅₀分级,致畸物则根据致畸指数分级。

三、毒作用及其分类

毒作用是指化学物质对生物体产生的有害生物学效应。

化学物质的毒作用(toxic effect)是其本身或代谢产物在作用部位达到一定数量并停留一定时间,与组织大分子成分互相作用的结果。毒作用又称为毒效应,是化学物质对机体所致的不良或有害的生物学改变,故又可称为不良效应、损伤作用或损害作用。

化学物质的毒作用可根据其特点、发生的时间和部位,按不同的方法进行分类。

1. 速发与迟发作用 速发作用(immediate effect)指机体与化学物质接触后在短时间内出现的毒效应。迟发作用(delayed effect)指机体接触化学物质后,中毒症状缺如或虽有中毒症状但似已恢复,经过一定的时间间隔才表现出来的毒效应。致癌物的潜伏期往往很长,从机体与之初次接触到出现肿瘤有时需要20~30年时间,又称为远期作用。

2. 局部与全身作用 局部作用(local effect)指发生在化学物质与机体直接接触部位处的损伤作用。全身作用(systemic effect)是指化学物质经血液循环到达体内其他组织器官引起的毒效应。大多数化学物质引起全身作用。如铅吸收后,可引起血液、神经、消化、生殖等多系统病变。某些化学物质兼有这两种作用。如四乙基铅在接触部位对皮肤有损害作用,吸收后分布到全身,对中枢神经系统以及肝、肾等实质性脏器发挥其毒性。某些严重的局部作用也可间接引起全身作用,如严重的酸灼伤后,可引起未接触到酸的肾脏损害。

3. 可逆与不可逆作用 可逆作用(reversible effect)指停止接触化学物质后,造成的损伤可以逐渐恢复。常见于接触化学物质的剂量较低、接触时间较短、损伤较轻时。不可逆作用(irreversible effect)是指停止接触化学物质后,损伤不能恢复,甚至进一步发展加重。化学物质的毒作用

是否可逆主要取决于被损伤组织的再生能力。如对于肝脏这样的再生能力强的器官,多数损伤是可逆的;而对于中枢神经这样的再生能力很差的组织,则损伤多为不可逆的。

4. 过敏性反应 过敏性反应(hypersensitivity)也称变态反应(allergic reaction)。该反应与一般的毒性反应不同。首先,某些作为半抗原的化学物质(致敏原)与机体接触后,与内源性蛋白结合为抗原并激发抗体产生,称为致敏;当再度与该化学物质或结构类似物质接触时,引发抗原抗体反应,产生典型的过敏反应症状。化学物质所致的过敏性反应在低剂量下即可发生,难以观察到剂量-反应关系。损害表现多种多样,轻者仅有皮肤症状,重者可致休克,甚至死亡。

5. 特异体质反应 特异体质反应(idiosyncratic reaction)系由于遗传因素所致的对某些化学物质的反应异常。如肌肉松弛剂琥珀酰胆碱正常时可为血浆中的拟胆碱酯酶迅速分解,故作用时间很短。而某些病人由于该酶基因中的个别单核苷酸发生了改变,使之缺乏分解该药物的能力。当被给予标准剂量的琥珀酰胆碱时,呈现持续性的肌肉松弛,甚至窒息。再如,先天缺乏NADH-细胞色素b5还原酶活力的患者,对亚硝酸盐类等可致高铁血红蛋白血症的化学物质异常敏感。原因是该酶基因中的127密码子发生了突变,致使原来的丝氨酸为脯氨酸所取代,故丧失了活性。

四、损害作用与非损害作用

毒理学原理 毒理学原理 毒理学原理 毒理学原理 毒理学原理 毒理学原理 毒理学原理 毒理学原理 毒理学原理 毒理学原理

化学物质对机体产生的生物学作用既有损害作用又有非损害作用,但其毒性的具体表现是损害作用。研究损害作用并阐明作用机制是毒理学的主要任务之一。但在许多情况下,区别损害作用和非损害作用比较困难,尤其在临床表现出现之前更是如此。一般认为,损害作用与非损害作用之间有以下区别。

(一) 损害作用

损害作用(adverse effect)所致的机体生物学改变是持久的,可逆或不可逆的,造成机体功能容量,如进食量、体力劳动负荷能力等涉及解剖、生理、生化和行为等方面的指标的改变,维持体内的稳态能力下降,对额外应激状态的代偿能力降低以及对其他环境有害因素的易感性增高,使机体正常形态、生长发育过程受到影响,寿命缩短。

(二) 非损害作用

与损害作用不同,非损害作用(non-adverse effect)所致机体发生的一切生物学变化都是暂时和可逆的,应在机体代偿能力范围之内,不造成机体形态、生长发育过程及寿命的改变,不降低机体维持稳态的能力和对额外应激状态代偿的能力,不影响机体的功能容量的各项指标改变,也不引起机体对其他环境有害因素的易感性增高。

损害作用与非损害作用都属于生物学作用,后者经过量变达到某一水平后发生质变而转变为前者。由于现有水平的限制,人们对于损害作用的认识尚不完全,现在认为是非损害作用的生物学改变将来可能会被判定为损害作用。随着科学研究的不断深入,检测技术和手段的进步,有关化学物质的毒作用机制在更深层次的阐明,损害作用的指标和概念必将不断得以更新。

五、毒效应谱

毒理学基本概念

化学物质与机体接触后引起的毒效应包括肝、肾、肺等实质器官损伤、内分泌系统紊乱、免疫抑制、神经行为改变、出现畸胎、形成肿瘤等多种形式。效应的范围则从微小的生理生化正常值的异常改变到明显的临床中毒表现,直至死亡。毒效应的这些性质与强度的变化构成了化学物质的毒效应谱(spectrum of toxic effects)。

在毒理学研究中,人们使用不同的毒作用终点来检测化学物质引起的各种毒效应。这些反映毒作用终点的观察指标大致可以分为两类。一类是特异指标。例如,有机磷农药抑制血液中胆碱酯酶活性,致使神经递质乙酸胆碱不能及时水解而堆积于神经突触处,引起瞳孔缩小、肌肉颤动、大汗、肺水肿等中毒表现。又如苯胺可致红细胞内高铁血红蛋白形成,各组织器官乏氧,出现中枢神经系统、心血管系统及其他脏器的一系列损害。这类指标的出现与特定化学物质之间有着明确的因果关系,常有助于中毒机制的阐明是其优点。不足之处是这样的指标在完成系统的毒理学研究之前常难以确定。而且由于指标的多种多样,无法对不同化学物质的毒性大小进行比较。另一类是死亡指标。该指标简单、客观、易于观察,虽然比较粗糙,不能反映毒作用的本质,但可作为衡量不同作用部位和作用机制的化学物质毒性大小的标准。特别是在急性毒性评价中,死亡是经常使用的主要指标。

六、靶器官

毒理学基本概念

化学物质被吸收后可随血流分布到全身各个组织器官,但其直接发挥毒作用的部位往往只限于一个或几个组织器官,这样的组织器官称为靶器官(target organ)。

许多化学物质有特定的靶器官,另有一些则作用于同一个或同几个靶器官,这在化学结构与理化性质近似的同系物或同类物中更为多见。如卤代烃都可引起肝脏损伤;苯系物则均可通过血-脑脊液屏障而作用于中枢神经系统。另外,在同一靶器官产生相同毒效应的化学物质,其作用机制可能不同。如苯胺和CO均可作用于红细胞影响其输送氧的功能,但前者是使血红蛋白中的 Fe^{2+} 氧化为 Fe^{3+} ,形成高铁血红蛋白,而后者是直接和血红蛋白结合为碳氧血红蛋白,两者之间表现出作用机制的差异。

组织器官成为化学物质的靶器官是多种因素作用的结果。机体对于化学物质的处置过程、化学物质本身的结构与理化性质、组织器官的组织结构与生理功能、代谢酶的活化状态、化学物质或其代谢产物与生物大分子如核酸、酶、受体、蛋白质间相互作用的能力等都可以明显的影响化学物质对于特定组织器官的毒作用。

七、生物学标志

毒理学基本概念

生物学标志(biomarker, biological marker)又可称生物学标记或生物标志物,是指针对通过生物学屏障进入组织或体液的化学物质及其代谢产物、以及它们所引起的生物学效应而采用的检测指标,可分为接触生物学标志、效应生物学标志和易感性生物学标志三类。

(一) 接触生物学标志

接触生物学标志(biomarker of exposure)是对各种组织、体液或排泄物中存在的化学物质及其代谢产物,或它们与内源性物质作用的反应产物的测定值,可提供有关化学物质暴露的信息。

接触生物学标志又分为体内剂量标志和生物效应剂量标志。体内剂量标志可以反映机体中特定化学物质及其代谢物的含量,即内剂量或靶剂量。如检测人体的某些生物材料如血液、尿液、头发中的铅、汞、镉等重金属含量可以准确判断其机体暴露水平。生物效应剂量标志可以反映化学物质及其代谢产物与某些组织细胞或靶分子相互作用所形成的反应产物含量。如苯并(a)芘可与 DNA 结合形成加合物,环氧乙烷可与血红蛋白形成加合物。这些加合物的形成往往预示着毒效应的起始,而加合物的数量则决定了毒效应的强度。故生物效应剂量标志的使用有助于准确的建立剂量-反应关系。

(二) 效应生物学标志

效应生物学标志(biomarker of effect)是指可以测出的机体生理、生化、行为等方面的异常或病理组织学方面的改变,可反映与不同靶剂量的化学物质或其代谢产物有关的健康有害效应的信息。

效应生物学标志包括早期效应生物学标志、结构和功能改变效应生物学标志和疾病效应生物学标志。早期效应生物学标志主要反映化学物质与组织细胞作用后,在分子水平产生的改变。如 DNA 损伤、癌基因活化与抑癌基因失活、代谢活化酶的诱导和代谢解毒酶的抑制、特殊蛋白质形成及抗氧化能力降低等。结构和功能改变效应生物学标志反映的是化学物质造成的组织器官功能失调或形态学改变。如谷丙转氨酶活力增高表示有肝脏损伤, δ -氨基- γ -酮戊酸脱水酶(ALAD)受抑表示血红素合成障碍等。疾病效应生物学标志与化学物质导致机体出现的亚临床或临床表现密切相关,常用于疾病的筛选与诊断。如成人血清甲胎蛋白的出现常与肝脏肿瘤有关,心肌梗死患者表现为血清谷草转氨酶的活性增高。

(三) 易感性生物学标志

易感性生物学标志(biomarker of susceptibility)是反映机体对化学物质毒作用敏感程度的指标。由于易感性的不同,性质与剂量相同的化学物质在不同个体中引起的毒效应常有很大差异,这种差异的产生是多种因素综合作用的结果,其中遗传因素起到了十分重要的作用。现有研究表明,药物或毒物代谢酶的多态性直接影响化学物质在体内的结局和与生物大分子相互作用的活性,与某些疾病的高发有关。如具有谷胱甘肽硫转移酶 M10/0 基因型(不能产生活性酶蛋白的基因型)的个体患肺癌的危险性远高于正常人。再如患有着色性干皮症的病人,由于有多种 DNA 修复酶的遗传缺陷,对于紫外线和某些化学诱变剂所致的 DNA 损伤格外敏感,其细胞易于发生突变甚至癌变。易感性生物学标志主要用于易感人群的筛检与监测,在此基础上可采取有效措施进行有针对性的预防。

总之,生物学标志的研究与应用可准确判断机体接触化学物质的实际水平,有利于早期发现特异性损害并进行防治,对于阐明毒作用机制、建立剂量-反应关系、进行毒理学资料的物种间外推具有重要意义,是阐明毒物接触与健康损害之间关系的有力手段。

第二节 剂量、剂量-量反应关系和剂量-质反应关系

一、剂 量

剂量(dose)有多种表示方式。不但可指机体接触化学物质的量或在试验中给予机体受试物的量(外剂量),又可指化学物质被吸收入血的量(内剂量)或到达靶器官并与其相互作用的量(靶剂量、生物有效剂量)。虽然靶剂量直接决定了化学物质所致机体损伤的性质与强度,但由于检测比较复杂,故毒理学中的剂量通常是指机体接触化学物质的量或给予机体化学物质的量,单位为 mg/kg 体重、mg/cm² 皮肤等。当一种化学物质经由不同途径与机体接触时,其吸收系数与吸收速率各不相同。因此在提及剂量时,必须说明接触途径。在接触环境污染物时,则根据空气、水、食品等介质中存在的浓度(分别为 mg/m³, mg/L 和 mg/kg)乘以进入体内的介质总量来计算剂量。

二、量反应与质反应

反应(response)指化学物质与机体接触后引起的生物学改变,可分为两类:一类属于计量资料,有强度和性质的差别,可以某种测量数值表示。如有机磷农药抑制血中胆碱酯酶活性,其程度可用酶活性单位的测定值表示。这类效应称为量反应(graded response)。另一类效应属于计数资料,没有强度的差别,不能以具体的数值表示,而只能以“阴性或阳性”、“有或无”来表示,如死亡或存活、患病或未患病等,称为质反应(quantal response)。量反应通常用于表示化学物质在个体中引起的毒效应强度的变化,质反应则用于表示化学物质在群体中引起的某种毒效应的发生比例。

三、剂量-量反应关系和剂量-质反应关系

剂量-量反应关系(graded dose-response relationship)表示化学物质的剂量与个体中发生的量反应强度之间的关系。如空气中的 CO 浓度增加导致红细胞中碳氧血红蛋白含量随之升高,血液中铅浓度增加引起 ALAD 的活性相应下降,都是表示剂量-量反应关系的实例。

剂量-质反应关系(quantal dose-response relationship)表示化学物质的剂量与某一群体中质反应发生率之间的关系。如在急性吸入毒性实验中,随着苯的浓度增高,各试验组的小鼠死亡率也相应增高,表明存在剂量-质反应关系。

剂量-量反应关系和剂量-质反应关系统称为剂量-反应关系,是毒理学的重要概念。化学物质的剂量越大,所致的量反应强度应该越大,或出现的质反应发生率应该越高。在毒理学研究中,剂量-反应关系的存在被视为受试物与机体损伤之间存在因果关系的证据。当然,前提是排除实验干扰因素造成的假象。

四、剂量-反应曲线

(一) 剂量-反应曲线的形式

剂量-反应关系可以用曲线表示,即以表示量反应强度的计量单位或表示质反应的百分率为纵坐标、以剂量为横坐标绘制散点图,可得到一条曲线。常见的剂量-反应曲线有以下几种形式:

1. S形曲线 是典型剂量反应曲线,多见于剂量-质反应关系中,分为对称S形曲线和非对称S形曲线两种形式。

(1) 对称S形曲线:当群体中的全部个体对某一化学物质的敏感性差异呈正态分布时,剂量与反应率之间的关系表现为对称S形曲线(图2-2,中图)。对称S形曲线往往见于试验组数和每组动物数均足够多时,在毒理学中仍属少见。

(2) 非对称S形曲线:与对称S形曲线比较,该曲线在靠近横坐标左侧的一端曲线由平缓转为陡峭的距离较短,而靠近右侧的一端曲线则伸展较长。它表示随着剂量增加,反应率的变化呈偏态分布(图2-1)。由于毒理学试验使用的实验组数和动物数有限,受试群体中又存在一些高耐受性的个体,故此种曲线最为常见。

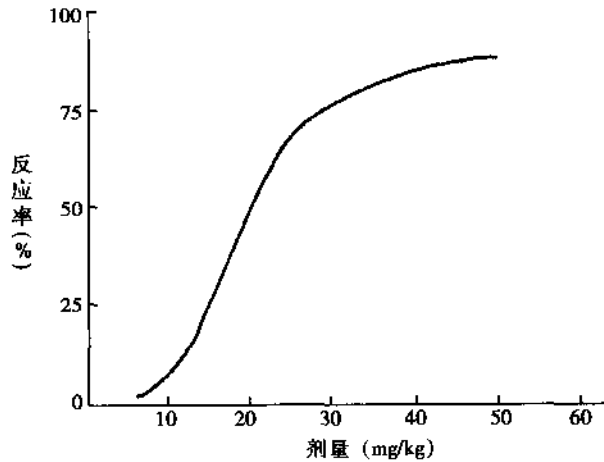


图2-1 非对称S形曲线

无论是对称还是非对称S形曲线,在50%反应率处的斜率最大,剂量与反应率的关系相对恒定。因此,常用引起50%反应率的剂量来表示化学物质的毒性大小。如半数致死剂量(LD₅₀)、半数中毒剂量(TD₅₀)、半数效应剂量(ED₅₀)等。

2. 直线 化学物质剂量的变化与反应的改变成正比。由于在生物体中,反应的产生要受到多种因素的影响,情况十分复杂,故此种曲线少见。

3. 抛物线 为一条先陡峭后平缓的曲线,类似于数学中的对数曲线,又称为对数曲线型。这种曲线只需将剂量换算为对数即可转变为一条直线。可见于剂量-量反应关系中。

(二) 剂量-反应曲线的转换

为通过数学的方法更加准确地计算 LD_{50} 等重要的毒理学参数并得出曲线的斜率,有必要将 S 形曲线转换为直线。

当把纵坐标的标识单位反应率改为反应频率时,对称 S 形曲线转换为高斯曲线(图 2-2, 下图)。在该分布曲线下,如把使一半受试个体出现反应的剂量作为中位数剂量,并以此为准划分若干个标准差,则在其两侧 1 个、2 个或 3 个标准差范围内分别包括了受试总体的 68.3%、95.5% 和 99.7%。将各标准差的数值均加上 5 (-3 ~ +3 变为 2 ~ 8) 即为概率单位。

概率单位与反应率之间的对应关系见表 2-1。当纵坐标标识单位用概率单位表示时,对称形曲线即转换为直线(图 2-2, 上图)。

表 2-1 反应率与概率单位之间的对应关系

反应率(%)	概率单位
0.1	2
2.3	3
15.9	4
50.0	5
84.1	6
97.7	7
99.9	8

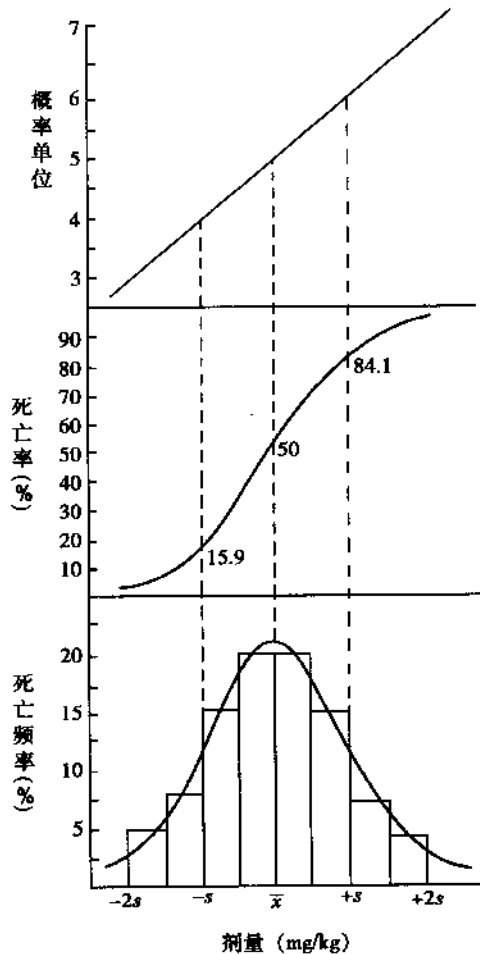


图 2-2 S 形剂量-反应曲线向直线的转换

非对称 S 形曲线转换为直线,需要分两步进行:先把横坐标的剂量单位换算为相应的对数,再把纵坐标的反应率改为概率单位,即可得到一条直线。

转换而来的直线可以建立数学方程,计算出各剂量对应的反应率及曲线斜率。 LD_{50} 、 TD_{50} 、 ED_{50} 等只是引起 50% 反应率发生的一个点剂量,不能全面反映化学物质的毒性特征,而曲线斜率可反映这方面的情况。如图 2-3 所示,A、B 两化学物质的 LD_{50} 相同,但其曲线斜率不同。A 物质的曲线斜率小,需要有较大的剂量变化才能引起明显的死亡率改变;而 B 物质的曲线斜率大,相对小的剂量变化即可引起明显的死亡率改变。在较低剂量时,A 物质的危险性较大,而在较高剂量时,B 物质的危险性较大。

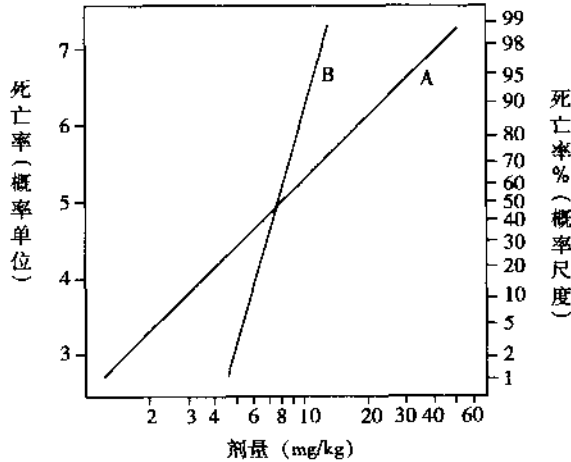


图 2-3 两种化学物质的毒性比较

第三节 表示毒性常用指标

毒理学中常用的毒性指标包括致死剂量、阈剂量、最大无作用剂量和毒作用带等。当受试物质存在于空气或水中时,上述各指标中的剂量改称为浓度(concentration)。

一、致死剂量

~~~~~

##### (一) 绝对致死剂量

绝对致死剂量(absolute lethal dose,  $LD_{100}$ )是指化学物质引起受试对象全部死亡所需要的最低剂量或浓度。如再降低剂量,就有存活者。但由于个体差异的存在,受试群体中总是有少数高耐受性或高敏感性的个体,故  $LD_{100}$  常有很大的波动性。

##### (二) 最小致死剂量

最小致死剂量(minimal lethal dose, MLD 或  $LD_{01}$ )指化学物质引起受试对象中的个别成员

出现死亡的剂量。从理论上讲,低于此剂量即不能引起死亡。

### (三) 最大耐受剂量

最大耐受剂量(maximal tolerance dose, MTD 或  $LD_0$ )指化学物质不引起受试对象出现死亡的最高剂量。若高于该剂量即可出现死亡。与  $LD_{100}$  的情况相似,  $LD_0$  也受个体差异的影响,存在很大的波动性。

上述  $LD_0$  和  $LD_{100}$  常作为急性毒性试验中选择剂量范围的依据。

### (四) 半数致死剂量

半数致死剂量(median lethal dose,  $LD_{50}$ )指化学物质引起一半受试对象出现死亡所需要的剂量,又称致死中量。 $LD_{50}$  是评价化学物质急性毒性大小最重要的参数,也是对不同化学物质进行急性毒性分级的基础标准。化学物质的急性毒性越大,其  $LD_{50}$  的数值越小。

$LD_{50}$  是一个生物学参数,受多种因素影响。对于同一种化学物质,不同种属的动物敏感性不同。如异氰酸甲酯对大鼠的  $LD_{50}$  为 69mg/kg, 对小鼠则为 120 mg/kg。接触途径不同也可影响  $LD_{50}$  的值。如内吸磷对大鼠经口染毒的  $LD_{50}$  为 2.5mg/kg, 经皮染毒时  $LD_{50}$  为 8.2mg/kg。因此,在表示  $LD_{50}$  时,必须注明动物种属和接触途径。对于某些化学物质,同种不同性别的动物敏感性不同。如有机磷农药马拉硫磷和甲基对硫磷对雄性动物毒性大,而对硫磷和苯硫磷对雌性动物毒性大。对于这样的化学物质,还应标明不同性别动物的  $LD_{50}$ 。此外,实验室环境、喂养条件、染毒时间、受试物浓度、溶剂性质、实验者操作技术的熟练程度等均可对  $LD_{50}$  产生影响。据 Web 报道,用 26 种化学物质对大鼠灌胃染毒,并对每种化学物质  $LD_{50}$  的最大值和最小值进行比较,结果相差小于 2 倍者 12 种,2~2.5 倍者 8 种,2.5~3 倍者 3 种,大于 3 倍者 3 种,说明  $LD_{50}$  有较大的波动性。因此,在计算  $LD_{50}$  时,还要求出 95% 可信限,以  $LD_{50} \pm 1.96\sigma$  来表示误差范围。在各种急性毒性分级标准中,等级间的数值一般可相差 10 倍,就是充分考虑到了  $LD_{50}$  的波动性。

## 二、阈剂量和最大无作用剂量

阈剂量和最大无作用剂量是毒理学中两个重要的概念,它们分别指引起生物效应的最低剂量和在不引起任何有害效应的情况下所能给予的最高剂量。

### (一) 阈剂量

阈剂量(threshold dose)指化学物质引起受试对象中的少数个体出现某种最轻微的异常改变所需要的最低剂量,又称为最小有作用剂量(minimal effect level, MEL)。分为急性和慢性两种:急性阈剂量(acute threshold dose,  $Lim_{ac}$ )为与化学物质一次接触所得;慢性阈剂量(chronic threshold dose,  $Lim_{ch}$ )则为长期反复多次接触所得。由于实际工作中,在哪个剂量水平才能发现化学物质所致的损害作用受到所选观察指标、检测技术的灵敏度和精确性、试验设计的剂量组数以及每组受试对象数等多种因素的影响,准确的测定阈剂量是很困难的,故该概念只有理论上的意义。在毒理学试验中获得的类似参数是观察到损害作用的最低剂量(lowest observed adverse

effect level, LOAEL)。

## (二) 最大无作用剂量

最大无作用剂量(maximal no-effect dose, ED<sub>0</sub>)指化学物质在一定时间内,按一定方式与机体接触,用现代的检测方法和最灵敏的观察指标不能发现任何损害作用的最高剂量。与阈剂量一样,最大无作用剂量也不能通过试验获得。毒理学试验能够确定的是未观察到损害作用的剂量(no-observed adverse effect level, NOAEL)。NOAEL 是毒理学的一个重要参数,在制订化学物质的安全限值时起着重要作用。

需要指出的是,对于同一化学物质,在使用不同种属动物、染毒方法、接触时间和观察指标时,往往会得到不同的 LOAEL 和 NOAEL。因此,在表示这两个毒性参数时应注明具体实验条件。另外,化学物质的 LOAEL 和 NOAEL 不是一成不变的,随着检测手段的进步和更为敏感的观察指标的发现,这两个毒性参数也会得以更新。

## 三、毒作用带

毒作用带是表示化学物质毒性和毒作用特点的重要参数之一,分为急性毒作用带与慢性毒作用带。

毒作用带(toxic effect zone)是表示化学物质毒性和毒作用特点的重要参数之一,分为急性毒作用带与慢性毒作用带。

### (一) 急性毒作用带

急性毒作用带(acute toxic effect zone, Z<sub>ac</sub>)为半数致死剂量与急性阈剂量的比值,表示为:

$$Z_{ac} = LD_{50}/Lim_{ac}$$

Z<sub>ac</sub>值小,说明化学物质从产生轻微损害到导致急性死亡的剂量范围窄,引起死亡的危险性大;反之,则说明引起死亡的危险性小。

### (二) 慢性毒作用带

慢性毒作用带(chronic toxic effect zone, Z<sub>ch</sub>)为急性阈剂量与慢性阈剂量的比值,表示为:

$$Z_{ch} = Lim_{ac}/Lim_{ch}$$

Z<sub>ch</sub>值大,说明 Lim<sub>ac</sub>与 Lim<sub>ch</sub>之间的剂量范围大,由极轻微的毒效应到较为明显的中毒表现之间发生发展的过程较为隐匿,易被忽视,故发生慢性中毒的危险性大;反之,则说明发生慢性中毒的危险性小。

## 第四节 安全限值

安全限值即卫生标准,是对各种环境介质(空气、土壤、水、食品等)中的化学、物理和生物有害因素规定的限量要求。它是国家颁布的卫生法规的重要组成部分,是政府管理部门对人类生活和生产环境实施卫生监督 and 管理的依据,是提出防治要求、评价改进措施和效果的准则,对于

保护人民健康和保障环境质量具有重要意义。

### (一) 每日容许摄入量

每日容许摄入量(acceptable daily intake, ADI)指允许正常成人每日由外环境摄入人体内的特定化学物质的总量。在此剂量下,终生每日摄入该化学物质不会对人体健康造成任何可测量出的健康危害,单位用 mg/(kg bw)表示。

### (二) 最高容许浓度

在劳动环境中,最高容许浓度(maximum allowable concentration, MAC)是指车间内工人工作地点的空气中某种化学物质不可超越的浓度。在此浓度下,工人长期从事生产劳动,不致引起任何急性或慢性的职业危害。在生活环境中,MAC是指对大气、水体、土壤等介质中有毒物质浓度的限量标准。接触人群中最敏感的个体即刻暴露或终生接触该水平的化学物质,不会对其本人或后代产生有害影响。由于接触的具体条件及人群的不同,即使是同一化学物质,它在生活或生产环境中的MAC也不相同。

### (三) 阈限值

阈限值(threshold limit value, TLV)为美国政府工业卫生学家委员会(ACGIH)推荐的生产车间空气中有害物质的职业接触限值。为绝大多数工人每天反复接触不致引起损害作用的浓度。由于个体敏感性的差异,在此浓度下不排除少数工人出现不适、既往疾病恶化、甚至罹患职业病。

### (四) 参考剂量

参考剂量(reference dose, RfD)由美国环境保护局(EPA)首先提出,用于非致癌物质的危险度评价。RfD为环境介质(空气、水、土壤、食品等)中化学物质的日平均接触剂量的估计值。人群(包括敏感亚群)在终生接触该剂量水平化学物质的条件下,预期一生中发生非致癌或非致突变有害效应的危险度可低至不能检出的程度。

在制定安全限值时,毒理学资料是重要的参考依据,其中最重要的毒性参数是LOAEL和NOAEL。化学物质的安全限值一般是将LOAEL或NOAEL缩小一定的倍数来确定的。这个缩小的倍数称为安全系数或不确定系数。在选择安全系数或不确定系数时要考虑多种因素,如化学物质的急性毒性等级、在机体内的蓄积能力、挥发性、测定LOAEL或NOAEL采用的观察指标、慢性中毒的后果、种属与个体差异大小、中毒机制与代谢过程是否明了等。需要说明的是,经验在安全系数或不确定系数的选择上会起到很大的作用,故最后确定的数值大小常带有一定的主观色彩。

(蔡原)



# 3

## 第三章

# 外源化学物在体内的 生物转运与转化

机体对化学毒物的处置(disposition)可简单地分成相互有关的吸收、分布、代谢及排泄四个过程(ADME过程)。化学毒物在体内的吸收、分布和排泄过程称为生物转运(biotransportation),化学毒物的代谢变化过程称为生物转化(biotransformation)。化学毒物的代谢和排泄合称为消除(elimination)。应该指出,吸收、分布、生物转化和排泄的过程可能同时发生。

化学毒物对机体的毒性作用,一般取决于两个因素:一是化学毒物的固有毒性和接触量,二是化学毒物或其活性代谢物在靶器官内的浓度及持续时间。而后者与化学毒物在体内的ADME过程有关。因此,对外源化学物ADME过程的研究有重要的意义:①有助于阐明外源化学物毒作用的机制,阐明对化学物处置的物种差异,可用于预测人类暴露化学物后的处置及其在毒性中的作用;②有助于阐明两种或两种以上外源化学物联合毒作用的机制,外源化学物可在ADME过程中交互作用,改变靶器官中外源化学物的浓度;③可通过改变外源化学物ADME过程,以预防和治疗外源化学物中毒。

在机体对化学毒物的处置过程中,化学毒物在体内的浓度随时间变化的规律,可用数学方程或动力学参数来描述。毒物动力学(toxicokinetics)研究机体对化学毒物的作用(ADME过程)和靶器官中化学毒物或其活性代谢物的量。而毒物效应动力学(toxicodynamics)研究在靶器官内化学毒物或其活性代谢物与大分子(靶分子)的作用,及所引起的局部的或整体的毒性效应。

## 第一节 生物膜和生物转运

外源化学物的吸收、分布和排泄过程是通过由生物膜构成的屏障的过程。生物膜(biomembrane)是细胞膜(cell membrane,也称质膜)和细胞器膜的总称。

一般将生物膜结构描述为流动镶嵌模型。生物膜主要由脂质和蛋白组成,生物膜表面也含有少量的糖。生物膜的基本结构是连续排列的脂质双分子层,膜蛋白可以是结构蛋白、受体、酶、载体和离子通道等。生物膜主要有三个功能:①隔离功能,包绕和分隔内环境;②是进行很多重要生化反应和生命现象的场所;③内外环境物质交换的屏障。生物膜也是一些毒物的毒作用靶,膜毒理学研究外源化学物对生物膜的毒作用及其机制。

化学物通过生物膜的转运方式主要有被动转运[包括简单扩散(simple diffusion)、易化扩散(facilitated diffusion)和滤过(filtration)]、主动转运(active transport)和膜动转运(cytosis)三大类。被动转运是顺浓度梯度进行,不消耗能量的;易化扩散和主动转运由载体介导,可饱和;而主动转运和膜动转运消耗能量,并可逆浓度梯度进行。主要影响转运的因素有外源化学物本身结构、分子量大小、脂-水分配系数大小、带电性、与内源性物质的相似性等。膜动转运分为胞吞(endocytosis)和胞吐(exocytosis)。胞吞对颗粒物称为吞噬(phagocytosis),对液滴称为胞饮(pinocytosis)。

外源化学物主要经简单扩散的方式经生物膜转运。简单扩散方式的条件是:①膜两侧存在浓度梯度;②外源化学物有脂溶性;③外源化学物是非解离状态。解离型极性大,脂溶性小,难以扩散;而非解离型极性小,脂溶性大,容易跨膜扩散。非解离型的比例,取决于该外源化学物的解离常数 $pK_a$ 和体液的 $pH$ 。简单扩散方式不消耗能量,不需载体,不受饱和限速与竞争性抑制的影响。

外源化学物的脂溶性(亲脂性)可用脂-水分配系数(lipid-water partition coefficient)来表示。脂-水分配系数是当一种物质在脂相和水相的分配达到平衡时,其在脂相和水相中溶解度的比值。实际工作中,常以正辛醇、氯仿或己烷来代表脂相。一般来说,外源化学物的脂-水分配系数越大,经膜扩散转运的速率较快;但也有一些例外的情况,如脂-水分配系数极高的外源化学物易存留在膜内,不易通过膜。脂溶性外源化学物易于以被动扩散方式通过生物膜,如外源化学物A和B的脂-水分配系数分别为1和10,见图3-1。当膜外侧水相浓度为1,膜内侧水相浓度为0.5时,在膜脂相外侧和内侧的浓度差外源化学物A为0.5(即 $1 \times 1 - 0.5 \times 1$ ),而外源化学物B为5(即 $1 \times 10 - 0.5 \times 10$ )。因此外源化学物B经膜扩散速率为A的10倍。

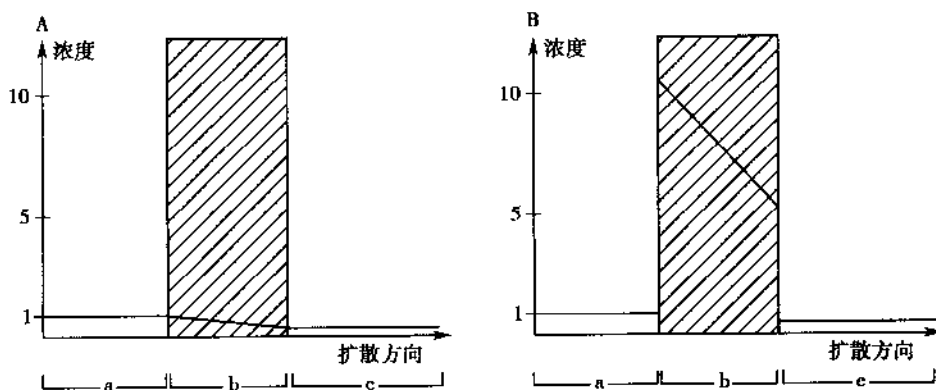


图3-1 脂水分配系数不同的两种化学物(A为1, B为10)经脂膜扩散

注:a和c为脂膜外的水相,b为脂相。选择的时间点为膜外浓度是膜内的2倍。化学物B的扩散速度是A的10倍

近年来,对外源化学物主动转运系统的认识有了重大的进展。主动转运对已吸收的外源化学物在体内的不均匀分布和排泄具有重要意义。生物膜的主动转运具有下列特点:①需有载体参加;②外源化学物可逆浓度梯度转运;③该系统需消耗能量,因此代谢抑制剂可阻止此转运过程;④载体对转运的外源化学物有特异选择性;⑤转运量有一定极限,当外源化学物达一定

浓度时,载体可达饱和状态;由同一载体转运的两种外源化学物间可出现竞争性抑制。目前已鉴定的主动转运系统有以下8种:①多药耐受(mdr)蛋白或p-糖蛋白质家族可将化疗药物转运出肿瘤细胞,导致肿瘤的耐药。mdr也可通过将化学物质转运出小肠细胞、脑上皮细胞、肝细胞、肾细胞等以保护这些细胞不受化学物质的伤害,也可保护胎体免受某些化学物质的伤害;②多耐受药物蛋白质(mrp)家族也可将化学物质移出细胞,Ⅱ相代谢物(葡萄糖醛酸和谷胱甘肽结合物)是它们的首选底物;③有机阴离子转运多肽(oatp)家族不仅转运酸,还转运碱和中性化合物,在肝脏吸收外源化学物中特别重要;④有机阴离子转运体(oat)家族与有机阴离子转运多肽相反,在肾脏吸收阴离子中特别重要;⑤有机阳离子转运体(oct)家族在肝脏和肾脏吸收外源化学物中都很重要;⑥核苷转运体(nt)家族协助胃肠道吸收核苷;⑦二价金属离子转运体(dmt)协助胃肠道吸收金属;⑧肽类转运体(pept)协助胃肠道吸收二肽和三肽。

## 第二节 吸 收

吸收(absorption)是指外源化学物从接触部位,通常是机体的外表面或内表面(如皮肤,消化道粘膜和肺泡)的生物膜转运至血循环的过程。外源化学物主要通过呼吸道、消化道和皮肤吸收。在毒理学实验研究中有时还采用特殊的染毒途径如腹腔注射、静脉注射、肌肉注射和皮下注射等。

外源化学物在从吸收部位转运到体循环的过程中已开始被消除,此即在胃肠道粘膜、肝和肺的首过效应(first-pass effect)。例如,乙醇可被胃粘膜的醇脱氢酶氧化,吗啡在小肠粘膜和肝内与葡萄糖醛酸结合。因此首过效应可减少经体循环到达靶器官组织的外源化学物数量,或可能减轻毒性效应。外源化学物在吸收部位引起的消化道粘膜、肝和肺的损伤也与首过效应有关。

### 一、经胃肠道吸收

水和食物中的有害物质主要是通过消化道吸收。毒物的吸收可发生于整个胃肠道,甚至是在口腔和直肠中,但主要是在小肠,因肠绒毛,可增加 $200 \sim 300\text{m}^2$ 的小肠吸收面积。毒物经胃肠道吸收主要通过被动扩散、膜孔过滤、载体中介、吞噬或胞饮等机制。

外源化学物经胃肠道被动扩散主要取决于外源化学物的脂溶性和pKa、胃肠道腔内pH。消化道从口腔至胃、肠各段的pH相差很大,吸收率的物种差异可能与消化道中pH有关,如大鼠胃pH为 $3.8 \sim 5.0$ ,兔为 $1.9$ 。有机酸和有机碱在不同pH溶液中的解离度不同,在胃肠道不同部位的吸收有很大差别,如弱酸(苯甲酸)易被胃所吸收;相反,在小肠内(pH 6)则苯甲酸吸收减少,而弱碱(苯胺)吸收增多。因此,有机酸在胃内(pH2)主要呈非解离状态,脂溶性大,主要在胃和十二指肠内吸收,而有机碱在胃内呈解离状态难以吸收,主要在小肠吸收。分子量较小的水溶性外源化学物可经膜孔滤过。通过膜孔的水流可能携带小分子外源化学物通过膜。特别是高剂量水溶性差的外源化学物以较大容量的低渗溶液染毒时,可能因大量水流通过膜孔导致吸收增加。同时有亲水性和亲脂性的分子通过胃肠管壁是依据物理化学的基本原理,对子亲脂性较强的分子,静水层是限速屏障;而对于亲水性较强的化合物则上皮细胞膜是屏障。

某些外源化学物可以通过相同的特殊转运系统吸收。例如,氟尿嘧啶通过嘧啶转运系统吸收,铈、钴和锰通过铁转运系统吸收,铅通过钙转运体吸收。某些二肽和寡肽转运体在含有 $\beta$ -内酰胺结构的药物的主动吸收中发挥重要的作用。胃肠道至少有一个主动转运系统可减少外源化学物的吸收,多药耐受转运体(mdr)定位于肠细胞,当可作为mdr底物的化学物质(免疫抑制剂环孢霉素和化疗药紫杉醇、秋水仙碱、长春新碱)进入肠细胞时,可被排回到肠腔,不易从胃肠道吸收。此外,一些颗粒物质如偶氮染料和聚苯乙烯乳胶可通过吞噬或胞饮作用进入小肠上皮细胞。

某些外源化学物受胃肠道中的消化酶或菌群的作用后,可形成新的外源化学物而影响其吸收或改变其毒性。如饮用含有高浓度硝酸盐的井水,易引起婴儿高铁血红蛋白血症,因新生儿胃肠道的pH值较高并存在某些细菌,可使硝酸盐还原成亚硝酸盐,使血中变性血红蛋白增高。小肠内的菌群还能还原芳香硝基成芳香胺,后者是可疑致甲状腺肿物和致癌物。

此外,其他因素诸如胃肠道的内容物减少、胃排空时间和肠蠕动减缓均有助于增加外源化学物的吸收。

外源化学物的胃肠吸收具有物种差异的原因尚不清楚,可能有:①大部分外源化学物吸收的限速屏障是肠粘膜的静水层,静水层厚度的物种差异可能对亲脂性化合物吸收有影响;②被动扩散具有膜表面积和位置依赖性,不同物种肠道的相对长度差异很大,在反刍动物和杂食动物还存在功能差异,而且不同物种胃肠道的pH值差异可以达到2;③胃肠菌丛的差异。

## 二、经呼吸道吸收

经呼吸道吸收

空气中的外源化学物主要从呼吸道侵入机体。呼吸道从鼻腔到肺泡由于各部分结构不同,对外源化学物的吸收情况也不同。经呼吸道吸收,以肺泡吸收为主,经肺吸收的速度相当快,仅次于静脉注射。鼻腔的表面积较小,但鼻粘膜有高度通透性,因此经鼻腔吸收也受到重视。

气态物质水溶性影响其吸收部位,易溶于水的气体如二氧化硫、氯气等在上呼吸道吸收,水溶液性较差的气体如二氧化氮、光气等则可深入肺泡,并主要通过肺泡吸收。气态物质到达肺泡后,主要经简单扩散透过呼吸膜而进入血液,其吸收速度受多种因素影响,主要是肺泡和血液中物质的浓度(分压)差。呼吸膜两侧的分压达到动态平衡时,在血液内的浓度与在肺泡空气中的浓度之比称为该气体的血-气分配系数(blood-gas partition coefficient),此系数愈大,气体愈易被吸收入血液。例如乙醇的血-气分配系数为1300,乙醚为15,二硫化碳为5,乙烯为0.4,说明乙醇远比乙醚、二硫化碳和乙烯易被吸收。此外,气态物质的吸收速率还取决于其在血中的溶解度、肺通气量和血流量。血气分配系数低的气态外源化学物经肺吸收速率主要取决于经肺血流量(灌注限制性),在血液和气相之间达到平衡时间约为8~21min。血气分配系数高的气态外源化学物经肺吸收速率主要取决于呼吸的频率和深度(通气

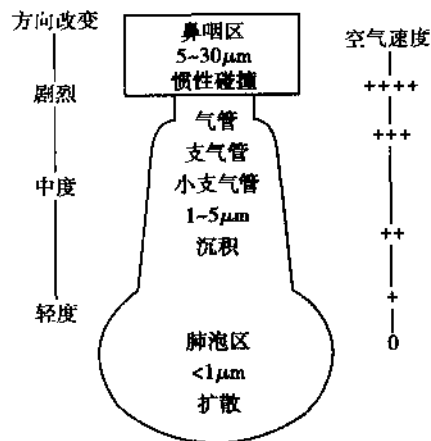


图 3-2 影响颗粒物沉积的参数

限制性),在血液和气相之间达到平衡的时间至少为 1h。

影响气溶胶吸收的重要因素是气溶胶中颗粒的大小和化学物质的水溶性。气溶胶的沉积部位主要取决于颗粒物大小(图 3-2 及图 3-3)。直径在  $5\mu\text{m}$  及以上的颗粒物通常在鼻咽部沉积。在有纤毛的鼻表面粘液层,通过纤毛运动推动不溶性的颗粒物。这些颗粒物和经口吸入的颗粒物在数分钟内被咽下。直径在  $2\sim 5\mu\text{m}$  的颗粒物主要沉积在肺的支气管区域,主要通过呼吸道纤毛部分的粘液层逆向运动而被清除,颗粒物质最终可能被吞咽下并在胃肠道吸收。直径在  $1\mu\text{m}$  及以内的颗粒物可到达肺泡,它们可以被吸收入血或通过肺泡巨噬细胞吞噬移动到粘液纤毛远端的提升装置被清除,或通过淋巴系统清除。颗粒物从肺泡中清除的效率不高,在第一天仅有大约 20% 的颗粒物被清除,24h 后剩余部分的清除非常缓慢。

颗粒物可引起上呼吸道炎症、肺炎(如锰尘)、肺肉芽肿(如铍尘)、肺癌(如石棉尘、镍尘)、肺尘埃沉着病(如二氧化硅尘)以及过敏性肺部疾患。可溶性有毒颗粒物很快被吸收入血引起中毒,不溶性颗粒物则可引起肺尘埃沉着病。毒物经肺吸收的物种差异是由于生理学的差异(呼吸速度,血流速度等)和暴露条件(如寿命)的不同造成。

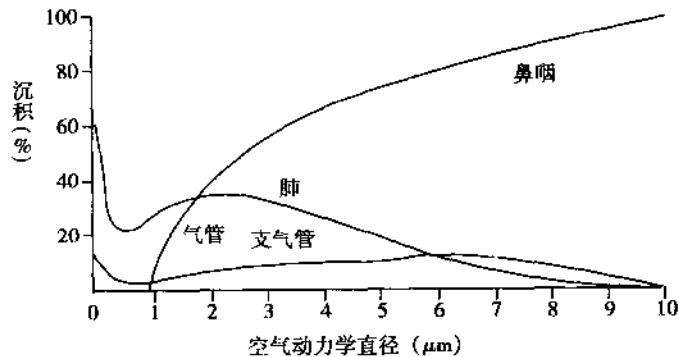


图 3-3 吸入气溶胶沉积部位与颗粒大小的关系

### 三、经皮肤吸收

毒物经皮吸收必须通过表皮或附属物(汗腺、皮脂腺和毛囊)。汗腺和毛囊在皮肤的分布密度不同,其总截面积仅占皮肤总面积的 0.1% ~ 1.0%。尽管少量毒物可以较快速度通过附属物吸收,但化学物质主要还是通过占皮肤表面积较大比例的表皮吸收。化学物质经皮吸收必须通过多层细胞才能进入真皮小血管和毛细淋巴管。化学物质经皮吸收的限速屏障是表皮的角质层。

经皮吸收的第一阶段是外源化学物质扩散通过角质层。极性物质似乎是通过含水的角质层蛋白细丝的外表面扩散,而非极性分子则溶解于蛋白细丝间脂质基质并扩散。非极性毒物的扩散速度与其脂溶性成正比,与其分子量成反比。但也有例外,如高度亲脂性的 TCDD 的皮肤渗透速度非常有限。

经皮吸收的第二个阶段包括毒物扩散通过表皮较深层(颗粒层、棘层和生发层)及真皮,然后通过真皮内静脉和毛细淋巴管进入体循环。扩散的速度取决于血流、细胞间液体运动,以及与真皮成分的相互作用。

一般来说,脂水分配系数高的外源化学物质易经皮肤吸收,分子量大于300的物质不易通过无损的皮肤。外源化学物的经皮吸收还受其他一些因素的影响,如表皮损伤可促进外源化学物的吸收;在皮肤潮湿时,角质层可使其结合水增加3~5倍,可导致通透性增加2~3倍;溶剂二甲亚砜(DMSO)也可通过增加角质层的通透性等机制,增加毒物经皮吸收。

人体不同部位皮肤对毒物的通透性不同,阴囊>腹部>额部>手掌>足底。不同物种动物皮肤通透性不同,大鼠及兔的皮肤较猫的皮肤更易通透,而豚鼠、猪和猴的皮肤通透性则与人相似。化学物质经皮肤附属物吸收和穿透角质层都有高度的物种依赖性,此外,皮肤血流量和有助于吸收的皮肤生物转化也有物种差异。皮肤吸收的物种差异可解释农药对昆虫和人的毒性不同。例如,对哺乳动物和昆虫注射途径给予DDT的 $LD_{50}$ 相近,但当经皮肤接触时,DDT对昆虫的毒性远大于哺乳动物。这可能是由于DDT很容易穿过昆虫的壳质外甲,并且,昆虫相对于其体重的体表面积大。

#### 四、其他途径吸收

外源化学物通常经上述三种途径吸收。但在毒理学动物实验中有时也采用腹腔、皮下、肌内和静脉注射进行染毒。静脉注射可使外源化学物直接进入血液,分布到全身。腹腔注射因腹腔具有丰富的血流供应和相对广大的表面积,使外源化学物的吸收迅速。经腹腔染毒的化合物主要通过门脉循环吸收,因此在其到达其他器官前必先经过肝脏。皮下或肌内注射时吸收较慢,但可直接进入体循环。

通过比较外源化学物经不同途径染毒的毒性可获得关于其吸收、生物转化和排泄的初步信息。

### 第三节 分 布

#### 一、外源化学物分布的毒理学意义

外源化学物通过吸收进入血液和体液后,随血流和淋巴液分散到全身各组织的过程称为分布(distribution)。不同的外源化学物在体内各器官组织的分布也不一样。研究外源化学物在体内的分布规律,有利于了解外源化学物的靶器官和贮存库。

器官或组织的血流量和对外源化学物的亲和力是影响外源化学物分布的最关键的因素。在外源化学物的初始分布阶段主要取决于器官或组织的灌注速率。人体器官组织灌注速率高的有肺、肾上腺、肾、甲状腺、肝、心、小肠、脑[血流速率 $1000 \sim 55 \text{ ml}/(\text{min} \cdot 100\text{g})$ ],灌注速率低的有皮肤、骨骼肌、结缔组织、脂肪[血流速率 $5 \sim 1 \text{ ml}/(\text{min} \cdot 100\text{g})$ ]。在初始分布阶段,灌注好的器官,外源化学物浓度高。但随时间延长,分布受到外源化学物经膜扩散速率和器官组织对外源化学物的亲和力的影响,引起外源化学物的再分布(redistribution)。如铅一次经口染毒后2h,剂量的50%在肝内,1个月后铅体内残留剂量的90%与骨结合。一次静脉注射二噁英(TCDD)后

5min,剂量的15%在肺内,仅约1%在脂肪中,但24h后仅有剂量的0.3%在肺中,约20%在脂肪中。

某些毒物不易通过细胞膜而使其分布受限,仅存在于血液中;而有些毒物可迅速通过细胞膜而分布在全身;有些毒物因为蛋白结合、主动转运或高度脂溶性而在机体的某些部位蓄积。

## 二、毒物在组织中的贮存

毒物蓄积部位可被认为是贮存库(storage depot)。在这些贮存库中的毒物总是与血浆中的游离型保持动态平衡。当化学物质经生物转化或经机体排泄时,贮存库就会释放出更多的来补充。因此,有蓄积的化学物可有很长的生物半减期。外源化学物在体内的贮存具有两重意义:一方面对急性中毒具有保护作用,可减少在靶器官中的外源化学物的量;另一方面贮存库中的毒物与血浆中游离型毒物间存在平衡,当血浆中游离型毒物被排除后(如通过生物转化和排泄),贮存库中的化学物就会释放进入血液循环,而成为血液游离型毒物的来源,具有潜在的危害。

### (一) 血浆蛋白质作为贮存库

血浆中各种蛋白均有结合其他化学物质的功能,尤其是清蛋白的结合量最高。不同的外源化学物与血浆蛋白质结合的量不同,如安替比林不结合,丙烯巴比妥结合50%,杀虫剂狄氏剂结合99%。结合型外源化学物由于分子量增大,不能跨膜转运,暂无生物效应,不被代谢排泄,可延缓消除过程和延长外源化学物的毒作用。因此,也有认为血浆蛋白是暂时贮存库。外源化学物与血浆蛋白结合可降低血游离型外源化学物浓度,此可能增加胃肠道或肾小管与血液的浓度梯度,增加从胃肠道或肾小管向血液的扩散。外源化学物与血浆蛋白结合是可逆的,与血浆中游离型外源化学物形成动态平衡。游离型外源化学物转运到靶部位产生毒作用,游离型外源化学物浓度与毒作用强度相关。外源化学物-蛋白复合物的解离速率以毫秒计,与组织扩散时间比较可以忽略不计。在肝和肾等组织以主动转运方式使血浆外源化学物游离型浓度迅速降低,外源化学物可迅速从血浆蛋白解离。不同的外源化学物与血浆蛋白的结合是有竞争性的,结合力更强的外源化学物可取代已被结合的外源化学物,使之成为游离态而显示毒性。例如DDE(DDT的代谢产物)能竞争性置换已与清蛋白结合的胆红素,使其在血中游离出现黄疸。

与血浆蛋白结合的差异也可导致外源化学物分布的物种差异,主要的是清蛋白浓度、结合亲和力和(或)与内源性物质的竞争结合的物种差异。

### (二) 肝和肾作为贮存库

肝和肾具有与许多外源化学物结合的能力。这些组织细胞中含有一些特殊的结合蛋白。如肝细胞中有一种配体蛋白(ligandin)能和许多有机酸结合,而且还能与一些有机阴离子、偶氮染料致癌物和皮质类固醇结合,使这些物质进入肝脏。肝、肾还有一种可诱导蛋白即金属硫蛋白(metallothionein)能与镉、汞、锌及铅结合。肝、肾既是一些外来外源化学物贮存的场所,又是体内有毒物质转化和排泄的重要器官。肝脏对铅的摄取说明了肝脏可快速结合外源性化学物,单次染毒后仅30min,肝脏中铅的浓度就比血浆中浓度高出50倍。

### (三) 脂肪组织作为贮存库

脂溶性有机物易于分布和蓄积在体脂内,如有机氯农药(氯丹、DDT、六六六)、多氯联苯、多溴联苯和二噁英(TCDD)等。体脂可占肥胖者体重的50%,占消瘦者体重的20%。外源化学物在脂肪中的贮存可降低其在靶器官中的浓度。因此,这类外源化学物对肥胖者的毒性要比消瘦者低。但当脂肪迅速动用时,可使血中浓度突然增高而引起中毒。

应重视外源化学物贮存于脂肪的物种差异,生理药代动力学模型已证明,组织和机体的生长对六氯苯的分布的影响比对其排泄的影响要大。

### (四) 骨骼组织作为贮存库

由于骨骼组织中某些成分与某些外源化学物有特殊亲和力,因此这些物质在骨骼中的浓度很高,如氟离子可替代羟基磷灰石晶格基质中的OH,使骨氟含量增加,而铅和镉则替代了骨质中的钙而贮存在骨中。外源化学物在骨中的沉积和贮存是否有损害作用,取决于外源化学物的性质,如铅对骨并无毒性,但骨氟增加可引起氟骨症,放射性镉可致骨肉瘤及其他肿瘤,故骨骼也是氟和镉的靶组织。

## 三、特殊的屏障

毒理学、毒理学、毒理学、毒理学、毒理学、毒理学、毒理学、毒理学、毒理学、毒理学

屏障是阻止或减少外源化学物由血液进入某种组织器官的一种生理保护机制。主要的屏障有血-脑脊液屏障和胎盘屏障等,但是这些屏障都不能有效地阻止亲脂性物质的转运。

### (一) 血-脑脊液屏障

血-脑脊液屏障(blood-brain barrier)并非是对毒物进入中枢神经系统的完全屏障,仅表现为较身体其他多数部位的通透性小。由于血-脑脊液屏障的存在,许多毒物不易进入中枢神经系统,这主要是由于四个解剖和生理的原因:①中枢神经系统的血管内皮细胞结合紧密,细胞间没有或仅有很小的孔隙。②脑毛细血管内皮细胞含有一种ATP依赖的转运体即多药耐受蛋白(mdr蛋白),它可将某些化学物质转运回血液。③中枢神经系统的毛细血管很大程度上被胶质细胞(星状细胞)包围。④中枢神经系统组织间液的蛋白质浓度较机体其他部位要低。这些特性防止了毒物分布到中枢神经系统,避免对中枢神经系统的毒性。对于水溶性小到中等的分子,毛细血管内皮的紧密连接和胶质细胞的脂质膜是主要的屏障。但是也有例外,一些脂溶性外源化学物如TCDD也不易进入脑,其机制尚不清楚,可能由于它和血浆蛋白或脂蛋白的紧密结合,限制了TCDD进入大脑。

新生动物的血-脑脊液屏障还没有发育完全,这也是吗啡、铅等化学物质对新生儿的毒性较成人大的原因之一。

### (二) 胎盘屏障

过去曾有胎盘屏障(placental barrier)的概念,但至今还没有肯定胎盘在防止毒物从母体进入胚胎的特殊作用。致畸物可经过胎盘引起胚胎畸形,有些致癌物也具有经胎盘致癌作用。大



多数脂溶性外源化学物经被动扩散通过胎盘,脂溶性越高,达到母体-胚胎平衡越迅速。胚胎中不同组织的毒物浓度则取决于胚胎组织浓集该毒物的能力。例如在胚胎脑中可见到较高浓度的铅和二甲基汞,这是因为胚胎的血-脑脊液屏障未发育完全。母体和胚胎的组织成分的差别是胎盘屏障的另一个原因,例如胚胎几乎没有脂肪,因此对高度脂溶性物质(如 TCDD)无蓄积作用,而母体则相反。胎盘是由在母体与胎体血液循环之间的多层细胞构成。胎盘的细胞层数随动物物种不同和不同妊娠阶段而各异。最多的有6层,称之为上皮绒毛膜胎盘;人有3层称血绒毛膜胎盘;大鼠仅有一层称血内皮胎盘。家兔在妊娠初期有6层细胞,到妊娠末期时仅有一层。还没有有关胎盘层数和其通透性关系的准确研究,但目前不认为它是决定化学物质分布到胎体的最重要的因素。

大部分毒物是通过单纯扩散穿过胎盘。但一些与内源性嘌呤和嘧啶结构类似的抗代谢物,是靠主动转运在母体和胎体循环间转运的生理物质。有研究表明胎盘具有主动转运系统如 mdr 以保护胎体免受某些外源化学物的伤害。胎盘具有生物转化能力,这可防止某些有毒物质到达胎体。胎体不同组织中毒物的浓度取决于胎体组织富集毒物的能力。例如,山羊胎体血浆中苯妥英的浓度是母体的一半,这是由于血浆蛋白浓度和血浆蛋白对苯妥英的亲合力不同所致。此外,某些器官如新生儿和胎体的肝脏对某些外源化学物无富集作用,因此在胎体肝脏中浓度较低。相反,由于胎体的血-脑脊液屏障发育不完善,某些化合物如铅和二甲基汞在胎体脑中有较高的浓度。

### (三) 其他屏障

血-眼屏障,血-睾丸屏障等可以保护这些器官减少或免受外来外源化学物的损害。在性腺,由于有多层细胞将生殖细胞与毛细血管分隔开,如卵母细胞为粒层细胞包绕,精原细胞由支持细胞和血-睾丸屏障的其他成分所包绕,可阻止水溶性毒物进入生殖细胞。

## 四、特殊的膜转运机制

某些细胞具有特殊的膜主动转运机制,主动摄取毒物或排出毒物,使这些细胞成为靶细胞或使细胞避免毒物的损伤。

## 第四节 排 泄

排泄(excretion)是外源化学物及其代谢产物向机体外转运的过程,是生物转运的最后一个环节。毒物通过不同的途径排出机体,主要经肾脏(尿)、经粪便和经肺(呼气)排出。还可随各种分泌物,如汗、唾液、泪水和乳汁等排出。

### 一、经肾脏(尿)排泄

肾脏是排泄外来外源化学物最重要的器官,涉及肾小球的被动滤过、肾小管的重吸收和主动



为  $325 \pm 50$ , 豚鼠为  $440 \pm 50$ , 兔为  $475 \pm 50$ , 人约为 500。在大鼠, 分子量小于 350 不从胆汁排泄, 分子量大于 450 不从尿排泄, 分子量在 350 ~ 450 则由此两种途径排泄, 一种途径排泄受阻可导致另一途径排泄增加。排泄入胆汁的外源化学物通常根据其在胆汁和血浆中浓度的比值可分为三类。A 类物质在胆汁和血浆中比值几乎为 1, 包括钠、钾、葡萄糖、汞、铊、铯和钴。B 类物质的比值远大于 1 (通常在 10 到 1000 间), 包括胆汁酸、胆红素、磺溴酞、铅、砷、锰和许多其他外源化学物, 大部分 B 类物质是通过主动转运通过肝细胞的两侧排泄到胆汁。C 类物质的比值低于 1 (如: 菊粉、清蛋白、锌、铁、金和铬)。但化合物经胆汁排泄的重要性不一定取决于其在胆汁中高度富集。例如汞并不在胆汁中富集, 但胆汁是缓慢清除这种物质的主要排泄途径。

外源化学物及其代谢物由胆汁进入肠道。一部分可随粪便排出, 一部分由于肠液或细菌的酶催化, 增加其脂溶性而被肠道重吸收, 重新返回肝脏, 形成肠肝循环 (enterohepatic circulation), 这就使外源化学物从肠道排泄的速度显著减慢, 生物半减期延长, 毒作用持续时间延长。例如甲基汞主要通过胆汁从肠道排出, 由于肠肝循环, 使其生物半减期平均达 70 天。临床上给予甲基汞中毒患者口服巯基树脂, 此树脂可与甲基汞结合以阻止其重吸收, 促进其从肠道排出。

3. 肠内排泄 粪便中的许多化学物质是直接从血液转运到小肠内的。对大多数外源化学物, 是通过被动扩散。在某些情况下, 小肠细胞的快速脱落可能使某些化合物经粪便排泄。肠内排泄是一个较缓慢的过程, 仅对于那些生物转化速度低和 (或) 肾或胆汁清除少的化合物, 肠内排泄才成为主要排泄途径。此外, 在大肠中存在有机酸和有机碱的主动分泌。

4. 肠壁和菌群 外源化学物口服后未吸收部分及胆汁或肠壁中的部分通过膜渗透性被肠道微生物摄取并代谢。有证据表明在许多情况下粪便中的外源化学物是来自于细菌的生物转化。微生物生物转化在经粪便排泄中的重要性可通过比较正常动物和无菌动物的实验来研究。

### 三、经肺 (呼气) 排泄和其他排泄途径

在体温下主要以气相存在的物质主要通过肺排出。挥发性液体与其气相在肺泡处于动态平衡, 也可通过肺排泄。液体通过肺排泄的量与其气体分压成正比。肺排泄是通过单纯扩散进行的, 排出速度大致与其吸收速度成反比。因此, 在血液中溶解性低的气体如乙烯经肺快速排泄, 而在血液中有更高溶解性的氯仿经肺排泄速度则非常慢。在血液中溶解度低的气体的排出速度是灌注限制的, 而在血液中溶解度高的气体的排出速度是通气限制的。

外源化学物在体内还可经乳汁等途径排出。乳汁虽非排泄毒物的主要途径, 但具有特殊的意义。因有些外源化学物可经乳汁由母体转运给婴儿, 也可由牛乳转运至人。此外, 有些外源化学物可通过汗腺和毛发排泄, 因而毛发中重金属等含量可作为生物监测的指标。

## 第五节 毒物动力学

毒物动力学是以速率论的观点出发, 用数学模型分析和研究化学毒物在体内吸收、分布、代谢和排泄的过程及其动力学的规律。目的在于: ①有助于毒理学研究的设计 (如剂量和染毒途径选择); ②通过对暴露、时间依赖性的靶器官剂量与毒作用关系研究, 解释毒作用机制; ③确

定有关剂量、分布、代谢和消除的参数,用以进行对人的危险性评价。

毒物动力学研究的数学处理一般利用计算机程序,如为建立药物动力学资料的室模型,有几种计算机软件程序可供使用,如 WinNonlin、PKAnalyst、Summit 和 SAS,以及国内的 3P97 程序,均可进行房室数、计算模型、权重和收敛精度选择,并输出各种参数和作图。本节介绍经典毒物动力学的基础概念和近年对生理毒物动力学模型研究进展。

## 一、经典毒物动力学

经典动力学的基本理论是速率论和房室模型。房室模型(compartment model)是用来描述毒物在体内的分布情况,房室模型是假设机体像房室,毒物进入体内可分布于房室中,由于分布速率的快慢,可分为一室开放模型、二室开放模型或多室模型(图 3-4)。通常将化学毒物内转运的速率过程分为一级、零级和非线性 3 种类型。

### (一) 时量曲线

血浆毒物浓度随时间变化的动态过程,可用时量关系来表示。在染毒后不同时间采血样,测定血毒物浓度,以血毒物浓度为纵坐标,时间为横坐标作图即为毒物浓度时间曲线(concentration-time curve),简称时量曲线,通过曲线可定量地分析毒物在体内动态变化。毒物在体内的吸收、分布、代谢及排泄过程是同时进行的。时量曲线实际上是吸收、分布速率和消除速率的代数值。

非静注染毒的时量曲线(图 3-5)可分为三个期:潜伏期、持续期及残留期。潜伏期(latent period)是染毒后到开始出现毒作用的一段时间,主要反映毒物的吸收和分布过程。静注染毒时一般无潜伏期。峰时间(peak time)是指染毒后达到最高浓度的时间。峰浓度(peak concentration)与毒物剂量成正比,峰浓度超过最低有害浓度时,就出现毒作用。持续期(persistent period)是指毒物维持有害浓度的时间,其长短与毒物的吸收及消除速率有关。残留期(residual period)是指体内毒物已降到有害浓度以下,但尚未从体内完全消除。残留期的长短与消除速率有关。残留期长反映毒物在体内储存,多次反复染毒易引起蓄积中毒。

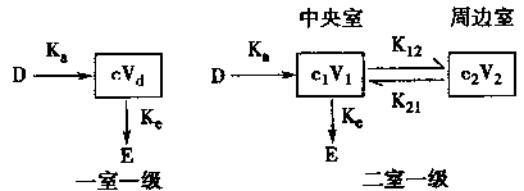


图 3-4 一室开放模型和二室开放模型

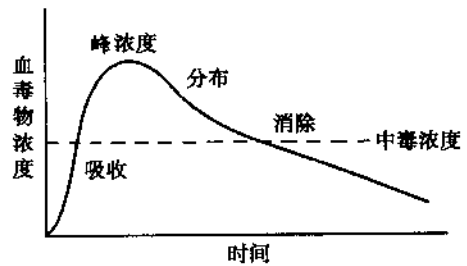


图 3-5 非静注染毒的时量曲线

### (二) 毒物动力学参数及其概念

毒物动力学参数可说明化学毒物在体内吸收、分布和消除的动力学规律。其中,  $K_a$ ,  $T_m$ ,  $C_m$ ,  $AUC$  和  $F$  表示化学毒物吸收程度和速度。 $V_d$  代表化学毒物分布情况,  $K$ ,  $CL$  和  $t_{1/2}$  反映化学毒物消除的特点。

1. 消除半减期 消除半减期( $t_{1/2}$ )是指体内血毒物浓度下降一半所需的时间,它是表示毒物消除速度的参数, $t_{1/2} = 0.693/k$ 。 $t_{1/2}$ 短,说明毒物消除迅速,不易蓄积中毒。在一级消除动力学, $t_{1/2}$ 不受血毒物浓度和染毒途径的影响,肝肾功能不全可能延长  $t_{1/2}$ 。

2. 曲线下面积 曲线下面积(area under curve, AUC)指时量曲线下覆盖的总面积,单位为  $\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$ 。AUC 表示经某一途径给以毒物后一定时间内吸收入血的毒物相对量。在静脉染毒时, $\text{AUC} = X_0 / (V_d \cdot K_e) = C_0 / K_e$ 。

3. 表观分布容积 表观分布容积(apparent volume of distribution,  $V_d$ )指在体内达到动态平衡时,根据与体内毒物量(D)血毒物浓度(C)的比值,表示毒物以血毒物浓度计算应占有的体液容积,单位用 L 或  $\text{L}/\text{kg}$  表示。由于它并不代表真正的容积,故称为表观分布容积,用于推测毒物在体内分布范围的广窄。

$V_d = D(\text{体内毒物量})/C(\text{血毒物浓度})$  或  $V_d = D_0(\text{静注毒物量})/C_0(\text{零时毒物浓度})$

$V_d = \text{血浆容量}$ ,说明毒物只分布在血液中, $V_d = \text{体液总量}$ ,说明毒物在体液中分布均匀; $V_d > \text{体液容量}$ ,说明组织摄取量大、毒物与组织蛋白结合或对药物有特殊亲和力,药物贮存于某些特定组织中。

4. 消除速率常数 消除速率常数(elimination constant,  $K_e$ )表示体内消除毒物的快慢,可以单位时间内体内毒物被消除的百分率表示,其单位为  $\text{h}^{-1}$ 。 $K_e$ 值大,说明消除速率快。如某化学毒物  $K_e$  为  $0.25 \text{ h}^{-1}$ ,表示每小时可消除体内毒物量的 25%。

5. 清除率 对整体动物清除率(clearance, CL)是指在单位时间内,从体内清除表观分布容积的部分,即每单位时间多少升血中毒物量被清除,其单位为  $\text{L}/\text{h}$  或  $\text{L}/(\text{h} \cdot \text{kg})$ 。当毒物流经某一消除器官时,每单位时间被消除的毒物量称为消除速度(rate of elimination, RE),其单位为  $\text{g}/\text{h}$ 。被消除的毒物的百分数称为消除率(elimination ratio, ER),用%表示。

按清除途径不同,可有肾清除率( $\text{CL}_r$ ),肝清除率( $\text{CL}_h$ )。血浆清除率则是肾和肝清除率的总和。 $\text{CL} = V_d \cdot K_e$  或  $\text{CL} = D/\text{AUC}$

肾清除率( $\text{CL}_R$ )可描述尿排泄动力学, $\text{CL}_R$  是毒物的尿排泄速率除以血浆浓度,即  $\text{CL}_R = (dA_u/dt)/c$ 。一般用尿排泄速率对相应集尿期中点时间的血浆浓度作图,所得直线的斜率为  $\text{CL}_R$ 。

6. 生物利用度 生物利用度(bioavailability, F)又称生物有效度,是指毒物被机体吸收利用的程度。经口生物利用度指经口染毒的 AUC 与该毒物静注后的 AUC 的比值,以经口吸收百分率表示。 $F = (\text{AUC}_{\text{po}}/\text{AUC}_{\text{iv}}) \times 100\%$

7. 吸收速率常数(absorption constant,  $K_a$ )、峰浓度(peak concentration,  $C_m$ )、峰时间(peak time,  $T_m$ )均表示毒物吸收程度和特点。

8. 房室概念 生理学将体液分为血浆、细胞外液及细胞内液等几个部分(房室),药代动力学的房室(compartment)概念与此不同,它是一种抽象的数字概念,其划分取决于毒物在体内转运速率。当毒物在体内转运速率高,体内分布迅速达到平衡时,可将机体看成单一房室模型。如果毒物在体内不同器官被认为是中央室,血流量少而穿透率慢的器官,不能立即与血液中毒物达到平衡,被认为是周边室,可把机体设想为二室或多室模型。大多数毒物在体内的转运和分布符

合二室模型,但经过一段时间(分布相)体内毒物分布达到平衡后,其消除率恒定时,此时两室可视为一室。

在一级动力学(见下述)消除时,消除半减期( $t_{1/2}$ )与消除速率常数( $K_e$ )的关系是  $t_{1/2} = 0.693/K_e$ , 而  $K_e = CL/V_d$ , 故  $t_{1/2} = V_d/CL$ 。可见毒物的  $t_{1/2}$  与清除率成正比,与分布容积成反比。消除速度(RE)是清除率(CL)与平衡时血毒物浓度的乘积,即  $RE = CL \cdot C_p$ 。故单位时间被子消除的毒物量为  $CL \cdot C \cdot dt$ , 而  $C \cdot dt$  正是一定时间内的 AUC, 故当血中毒物被全部清除时,则体内毒物量  $A = CL \cdot AUC$ 。所以上述毒物动力学参数的综合性公式为:  $CL = k \cdot V_d = A / AUC$ 。这些毒物动力学参数的相互关系是有理论意义和实际用途的。

### (三) 毒物消除动力学

很多毒物动力学过程,如吸收、消除或生物转化速率可以用一级动力学(first-order kinetics)来描述。一级动力学过程的速率与毒物的浓度成比例。一级动力学服从以下式:

$$-dc/dt = kc$$

式中  $c$  为在时间  $t$  毒物的浓度,  $k$  是速率常数。

毒物消除动力学又称线性毒物动力学,给药剂量与毒物动力学参数之间遵循:剂量改变时,相应时间点上的  $C$ , 与给药剂量成正比;  $t_{1/2}$  与给药剂量  $D$  之间无关; AUC 与给药剂量  $D$  之间成正比。

一级消除动力学的特征如下:①毒物在任何时间的消除速率与毒物该时间在体内的量成正比;②血浆浓度的对数值对时间作图得一直线;③毒物的半减期( $t_{1/2}$ )恒定,不因染毒剂量高低而变化;④血浆和其他组织的毒物浓度以单位时间某恒定分值(消除速率常数,  $K_{el}$ )减少,即恒比衰减。

如果一个动力学过程有可饱和性,如载体中介的转运过程或酶中介的代谢,此过程可能服从非线性的 Michaelis-Menten 动力学。对非线性一室开放模型,即有

$$-dc/dt = V_m c / (K_m + c)$$

式中  $V_m$  为最大速率,  $K_m$  为此过程的 Michaelis 常数。当毒物浓度极低时(如通常的实际接触剂量)  $C \ll K_m$ , 可应用一级动力学。相反,当  $C$  非常大(如在最大耐受剂量实验中)时  $C \gg K_m$ , 此系统可近似为零级动力学(zero-order kinetics)。

零级消除动力学的特征为:①血浆浓度对时间作图为一直线;②毒物在任何时间的消除速率是一常数,为恒量衰减,半减期与体内毒物量无关;③毒物的半减期( $t_{1/2}$ )随初始的浓度或剂量增加而增加。

### (四) 一室和二室开放模型

1. 一室开放模型 当毒物吸收入血循环后,立即均匀分布到全身体液和各组织器官中,迅速达到动态平衡,称为一室开放模型(open one compartment model)。D 为染毒剂量,  $K_a$  为吸收速率常数,  $c$  为血毒物浓度,  $V_d$  表现分布容积,  $cV_d$  为体内毒物量,  $K_e$  为消除速率常数,  $E$  为消除毒物量。

在静注之后,以化学毒物的血浆浓度的对数值对时间作图,如能配合一条直线,则该化学毒

物在机体是符合一房室模型(图 3-6A)。这并不是说在体内此化学毒物的浓度是相同的,而是假定血浆浓度的改变反映了组织浓度的改变。以原形毒物经尿采样中点时间的排泄速率的对数值对时间作图,也应得到一条直线。以一室模型处置的化学毒物从机体的消除通常符合一级动力学。

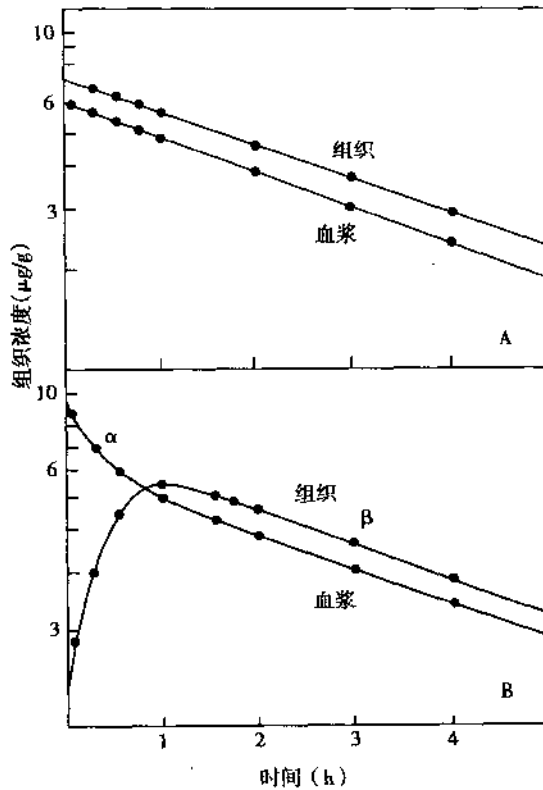


图 3-6 一室开放模型(A)和二室开放模型(B)的时量曲线

2. 二室开放模型 当毒物在体内组织器官中分布速率不同,毒物先进入中央室,包括全血和血流充盈的器官如肾、脑、心、肝等。然后较缓慢地进入周边室,如血管供应较少、血流缓慢的脂肪、肌肉、皮肤等。中央室和周边室之间的转运是可逆的, $K_{12}$ 是毒物从中央室转至周边室的一级动力学速率常数; $K_{21}$ 是毒物从周边室转至中央室的一级动力学速率常数;达到动态平衡时,两室间的转运速率相等, $K_{12} = K_{21}$ 。二室模型有3个亚型,毒物只能从中央室消除的亚型最为常用。大多数毒物在体内的转运和分布符合二室开放模型(open two compartment model)。

符合二室模型毒物在快速静注后,时量曲线可分解成分布相和消除相(图 3-6B)。

(1) 分布相( $\alpha$ 相):静注后血毒物浓度迅速下降,表示毒物立即随血流进入中央室,然后再分布到周边室。同时也有部分毒物经代谢、排泄而消除,该时相主要与分布有关,故称为分布相。

(2) 消除相( $\beta$ 相):分布逐渐达到动态平衡后,血毒物浓度的下降主要是由于毒物从中央室消除。周边室的毒物浓度则按动态平衡规律,随同血毒物浓度按比例地降低,因而该段近于直

线,称为消除相。如属一级动力学消除,可计算  $t_{1/2\beta}$ ,称为消除相半减期。

### (五) 非线性动力学

非线性毒物动力学(Non-linear toxicokinetics)是指外源化学物剂量较大,化学物在体内的某些过程不符合线性速度过程的要求,存在明显的非线性特征。当血毒物浓度很高时,毒物消除慢、血毒物浓度的变化相当于零级,为非线性动力学过程;当血毒物浓度较低时转为线性动力学过程。

由于非线性毒物动力学主要是随剂量改变而导致毒物动力学参数变化,因此,也将非线性毒物动力学称为剂量依赖性毒物动力学。出现非线性毒物动力学的主要原因是:①外源化学物剂量较大;②在吸收、分布、代谢和排泄过程中,有酶、载体以及转运系统的参与。例如:主动转运饱和,血浆蛋白结合位点饱和,高浓度时,代谢酶系统的饱和,肾小管重吸收饱和等。

下列各点提示存在非线性毒物动力学:①体内毒物浓度不呈指数关系,即消除动力学不呈一级动力学特征;②毒物的半减期( $t_{1/2}$ )随剂量增加而增加;③血浆毒物浓度-时间曲线下面积(AUC)与染毒剂量不成正比关系;④排泄物在性质上和数量上随剂量改变而改变;⑤由相同的酶进行生物转化或主动转运的其他化学物可显示对排泄的竞争性抑制;⑥随剂量增加至明显饱和和作用之后,剂量-反应曲线显示反应不成比例的改变。

非线性动力学过程在毒理学中具有重要的意义,具有非线性动力学特征的毒物,在重复染毒时血毒物浓度的增加与剂量增加不成正比关系。剂量增加,会使稳态血毒物浓度的增加超过按比例的增加量,毒性效应增强。

### (六) 多次染毒的时量曲线

每次剂量和间隔时间均相同的多次染毒时量曲线先为一锯齿形上升曲线,随后渐趋于平衡,当染毒量与消除量达到动态平衡时,锯齿形曲线在某--范围内波动,称为稳态血浆浓度(steady state plasma concentration,  $C_{ss}$ )或坪浓度(plateau concentration)。影响时量曲线的主要因素为:毒物的生物利用度、血浆半减期、每次剂量、染毒间隔时间、毒物的表观分布容积和每日染毒总量。坪浓度的高低与每日总量成正比,每日总量加倍时,坪浓度也提高1倍。锯齿形曲线浓度的峰值和谷值之间差距与每次染毒量成正比。如果单位时间内染毒总量不变,缩短染毒间隔时间,可减少血毒物浓度的波动。延长染毒间隔时间,则血毒物浓度波动加大。为了使血毒物浓度迅速达到稳态浓度,可采用首次剂量加倍的方法。

由消除半减期可估计多次染毒后体内毒物蓄积量和停止染毒后毒物的消除量。一次染毒约经5个消除半减期体内毒物量消除96%以上,可认为基本消除;每隔一个半减期染毒一次,约经5个半减期可达稳态浓度。

## 二、生理毒物动力学模型

经典毒物动力学房室模型的研究已有多年的历史,目前仍被广泛应用,但是它也存在许多缺

点。例如,组成模型的基本单位“房室”,仅仅是一个数学上的抽象概念,缺乏实际的解剖学、生理学意义。20世纪60年代中后期,Bischoff以及Dedrick等开始了比较可行的“生理药理学”的



研究。近年对生理毒物动力学模型 (physiological toxicokinetics; physiologically based toxicokinetics, PBTK) 研究有了很大的发展。

生理毒物动力学模型是指一种比较符合毒物在体内动态变化的具体状况的模型。在该模型中,以“生理学室”代替经典模型中的隔室,这些“生理学室”分别代表与毒物体内分布有主要关系的单个或多个脏器、组织或体液。毒物以血流的传送为驱动力,透过各种生物膜被送入某“生理学室”,而毒物离开该“生理学室”时可能发生的消除,则应以该“生理学室”的各种清除率进行描述(代谢清除率、排泄清除率)。根据质量平衡关系,按模型建立速度方程、对方程组进行求解,得出各个组织或器官的毒物浓度与时间的关系。采用这种方法,可基本明确阐述毒物在体内动态增加或减少的真实情况。图 3-7 是苯巴比妥和苯的生理毒物动力学模型

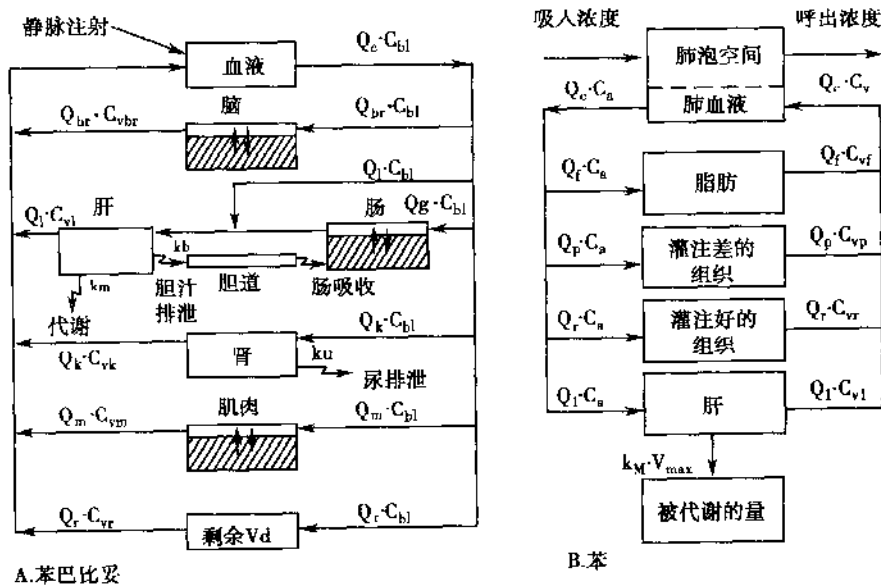


图 3-7 苯巴比妥 i. v. (A) 和苯吸入 (B) 的生理毒物动力学模型

### (一) 模型建立

PBTK 模型对各生理学室可分为:①灌注限制室,生理学室摄取外来化合物的速率受到该组织的携带该物质的血液速率的限制,而与该物质跨越细胞膜的速率无关。在多数组织是灌注速率限制室;②扩散限制室,生理学室摄取外来化合物的速率由细胞膜的渗透性和膜的总面积决定,被称之为扩散限制模型。当外来化合物的跨膜转运速率慢于到达该组织的血流速度时,发生扩散限制转运。

在灌注限制模型,毒物经组织室时的变化规律,根据质量平衡原则,当毒物随血流进入某组织后,组织中药量的变化速度应为:

#### 1. 无清除作用的组织

$$V_{is} \times dC/dt = Q_{is} \times C_{in} - Q_{is} \times C_{out}$$

式中  $V_{is}$  = 组织的解剖容积;  $C$  = 毒物浓度;  $t$  = 时间;  $Q_{is}$  = 组织血流量;  $C_{in}$  = 流入(动脉)

血中毒物浓度;  $C_{out}$  = 流出(静脉)血中毒物浓度。

即:毒物在某一组织累积速率 = (进入该组织动脉血流速率 × 动脉血毒物浓度) - (流出该组织静脉血流速率 × 静脉血毒物浓度)

## 2. 有清除作用的组织

$$V_{ts} \times dC/dt = Q_{ts} \times C_{in} - Q_{ts} \times C_{out} - CL_{ts} \times C_{ts}'$$

式中,  $CL_{ts}$  = 组织对毒物的清除率;  $C_{ts}'$  = 组织中游离毒物浓度。

即:毒物在某一组织累积速率 = (进入该组织动脉血流速率 × 动脉血毒物浓度)

- (流出该组织静脉血流速率 × 静脉血毒物浓度) - (毒物在组织中生物转化和排泄速率)  
在稳态时,组织中的毒物量基本保持不变。

$$V_{ts} \times dC/dt = 0; \quad CL_{ts} \times C_{ts}' = Q_{ts} \times C_{in} - Q_{ts} \times C_{out}$$

得出  $CL \times C_{in} = Q_{ts} \times C_{in} - Q_{ts} \times C_{out}$ ;  $CL$  = 该组织对毒物的表观清除率。

进而得出:  $CL = Q_{ts} \times [(C_{in} - C_{out})/C_{in}] = Q_{ts} \times \cdot E$

式中  $E$  为提取率  $E = (C_{in} - C_{out})/C_{in}$

在组织中,真正被清除的是游离型毒物,而组织中的游离型毒物浓度又等于从组织流出的静脉血中游离型毒物浓度。

$$\text{因此, } CL \times \cdot C_{in} = CL_{int} \times \cdot f \cdot \times C_{out} = Q_{ts} \times \cdot C_{in} - Q_{ts} \times \cdot C_{out}$$

式中  $CL_{int}$  代表组织的固有清除率,反映组织对毒物进行清除的真实能力;  $f$  代表血液中毒物的游离分数。

根据质量平衡原则,对每一生理室可以列出一个微分方程描述化学毒物在室内动态变化,设计多少个生理室,就可写出多少个方程,这一套方程组即是生理毒物动力学模型的表达方式。

## (二) 收集资料和解方程组

选定模型后应收集所需的资料,包括:①解剖学参数:模型中每个生理室的解剖容积;②生理学参数:血流速率、肺泡通气量和肝、肾脏清除率;③热力学参数:外来化合物的分配或分布系数;④转运;外来化合物穿过界膜时的转运速率。然后,进行必要的动物实验和检测。

对于求解由各个生理室的微分方程组成的微分方程组,已有计算机软件如连续模拟语言(Advanced Continuous Simulation Language)、模拟控制程序(Simulation Control Program)、MATLAB、Excel 及 SAS 等可供使用。

## (三) 生理毒物动力学模型的主要用途

生理毒物动力学模型的主要用途是预测在靶组织中毒物原型或其活性代谢物的剂量。利用化学物靶组织的剂量可为危险性评定的剂量-效应关系研究提供可靠的基础,可能预测和估算不同暴露方案、途径、剂量和物的靶组织剂量,有助降低传统外推方法的不确定性,包括从一种接触条件向另一种接触条件(接触程度、时间、途径和方式)、从一个种属向另一个种属(实验动物向人)以及从一个群体向另一群体(一般群体向敏感群体)所作外推时的误差。

## 第六节 毒物的代谢转化

### 一、生物转化和毒物代谢酶

生物转化(biotransformation)是指外源化学物在机体内经多种酶催化的代谢转化,生物转化是机体对外源化学物处置的重要的环节,是机体维持稳态的主要机制。对于外源化学物或毒物,“生物转化”和“代谢”两个名词常常作为同义词使用。

#### (一) 生物转化的意义

外源化学物生物转化酶所催化的反应一般分为两大类,称为 I 相反应和 II 相反应(图 3-8)。I 相反应包括水解反应、还原反应和氧化反应,这些反应涉及暴露或引入一个功能基团,如 -OH、-NH<sub>2</sub>、-SH 或 -COOH,通常仅导致水溶性少量的增加。II 相反应包括葡萄糖醛酸化、硫酸化、乙酰化、甲基化,与谷胱甘肽结合以及氨基酸结合,如甘氨酸、牛磺酸和谷氨酸。这些反应的辅助因素与外源化学物功能基团反应,功能基团可以是外源化学物原有组成成分,也可以是经 I 相反应引入或暴露的。大多数 II 相反应可导致外源化学物的水溶性显著增加,且加速其排泄。当然也有例外,如经呼气排泄的挥发性代谢物。同样,在脑和睾丸中外源化学物的生物转化,假如其代谢物不能透过血-脑脊液屏障或者血睾屏障,则生物转化就阻碍其排泄。

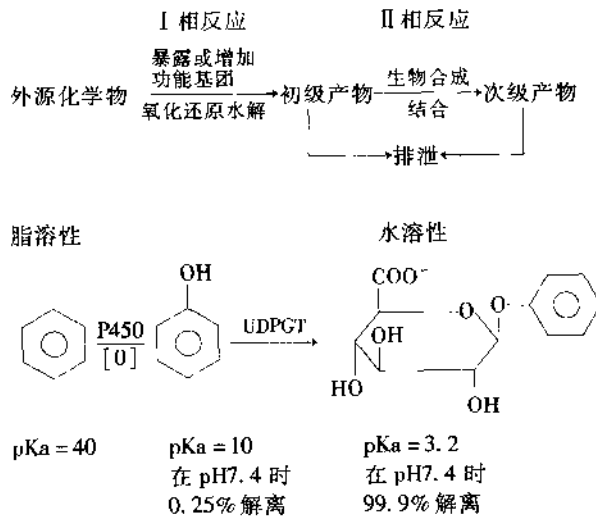


图 3-8 I 相反应和 II 相反应

外源化学物生物转化的另一结果是改变其毒效学性质。大多数情况是生物转化终止了药物的药效作用或降低了外源化学物的毒性,但对有的毒物却可使毒性增强,甚至产生致癌、致突变和致畸效应,又称为代谢活化(metabolic activation)或生物活化。经代谢活化生成的活性代谢产

物可以分为4类:①生成亲电子剂,最为常见,关于苯并(a)芘和2-乙酰氨基芴的代谢活化见下文;②生成自由基,如百草枯、硝化呋喃妥英经催化还原,四氯化碳还原脱卤,醌经单电子还原,生成自由基等;③生成亲核剂,少见,如苦杏仁苷经肠菌群酶催化生成氰化物,二卤甲烷经氧化脱卤生成一氧化碳;④生成氧化还原剂,少见,如硝酸盐经肠菌群酶催化生成亚硝酸盐,还原酶催化Cr(VI)生成Cr(V),Cr(V)再催化生成HO·。

代谢解毒:化学物(毒性)→中间产物(低毒性或无毒性)→产物(无毒性);

代谢活化:化学物(无毒性)→中间产物(毒性)→产物(无毒性)。

## (二) 毒物代谢酶的基本特性

生物转化酶类底物特异性广泛,一类或一种酶可代谢几种外源化学物,而且还可代谢内源性化学物如乙醇、丙酮、甾体激素、维生素A和D、胆红素、胆酸、脂肪酸及花生酸等。

生物转化酶类在体内持续地少量表达,可称为结构酶;外源化学物可刺激(诱导)很多生物转化酶类合成,可称为诱导酶。

某些生物转化酶具有多态性,其结构(即氨基酸序列)和活性不同。不同个体的生物转化酶多态性,造成外源化学物生物转化速度的个体差异。化学物生物转化酶中氨基酸改变对催化活力的影响通常存在底物依赖性,例如,生物转化酶的等位变体可与某些底物及抑制剂正常地相互作用,但对于其他底物则反应异常。

有些手性外源化学物的生物转化具有立体选择性,即一种对映体(或立体异构体)的生物转化速率要快于另一对映体。例如,抗癫痫药物麦山妥英,它是R-和S-型外消旋混合物,其在人体S-对映体迅速由细胞色素2C19羟化并排泄;而R-对映体则较慢。有些手性外源化学物具有抑制生物转化酶的能力,也具有立体选择性。而且,在某些情况非手性分子(或非手性中心)可转变成对映体代谢物的混合物,代谢产物也有立体选择性,即一种对映体要优于其另一对映体的形成。

外源化学物生物转化酶的命名,由于其具有广泛的和交叉的底物特异性,如按其催化反应来命名,不可避免地造成混乱。现在,许多生物转化酶已被克隆和测序,基于单个酶的氨基酸一级序列而建立的命名系统可避免在命名上的混乱。

## (三) 毒物代谢酶的分布

毒物代谢过程主要在肝脏进行,但肝外组织也有一定代谢能力,如肾脏、小肠、肺脏和皮肤等(表3-1)。在脊椎动物,肝脏是含外源化学物生物转化酶最丰富组织,次之为皮肤、肺脏、鼻粘膜、眼及胃肠道。此外,其他组织如肾脏、肾上腺、胰、脾、心、大脑、睾丸、卵巢、胎盘、血浆、血细胞、血小板、淋巴细胞及大动脉等均有生物转化酶。肠道菌群在某些外源化学物生物转化中起着重要的作用。由胃肠道吸收的外源化学物,肝脏和肠道上皮限制了经口摄入外源化学物的全身生物活性作用,称为首过消除。例如,在小肠经细胞色素P-450的环孢菌素氧化反应及吗啡与葡萄糖醛酸结合反应,限制了这些药品的全身生物学活性。不同的组织对外源化学物生物转化能力的显著区别对于解释化学物损伤的组织特异性具有重要的毒理学意义。

外源化学物生物转化酶广泛分布于全身组织,在细胞则分布于几种亚细胞组分。在肝脏及大多数组织中,外源化学物生物转化酶主要位于内质网(微粒体)或脂质的可溶部分(胞浆),在

线粒体、细胞核及溶酶体则较少分布。内质网富含生物转化酶是因为经尿液或胆汁排泄的外源化学物多为脂溶性,在内质网脂质双层中易于溶解进行生物转化。

表 3-1 生物转化的主要器官和细胞

| 转化能力 | 器 官 | 细 胞               |
|------|-----|-------------------|
| 强    | 肝脏  | 实质细胞(肝细胞)         |
|      | 肺脏  | Clara 细胞、II 型上皮细胞 |
| 中等   | 肾脏  | 近曲小管细胞            |
|      | 小肠  | 粘膜内层细胞            |
|      | 皮肤  | 上皮细胞              |
| 弱    | 睾丸  | 输精管与支持细胞          |

## 二、I 相反应

生物转化的 I 相反应(phase I biotransformation)主要包括氧化、还原和水解反应,各类反应及相应酶的亚细胞分布见表 3-2。

表 3-2 外源化学物生物转化 I 相反应的亚细胞分布

| 反 应 | 胞 浆                          | 线粒体        | 微粒体                          | 溶酶体   | 其 他                    |
|-----|------------------------------|------------|------------------------------|-------|------------------------|
| 氧化  | 醇脱氢酶、醛脱氢酶、醛氧化酶、黄嘌呤氧化酶、双胺氧化酶  | 醛脱氢酶、单胺氧化酶 | 前列腺素 H 合成酶、黄素加单氧酶、细胞色素 P-450 | /     |                        |
| 还原  | 偶氮和硝基还原、羰基还原、二硫还原、硫氧化物还原、醌还原 | /          | 偶氮和硝基还原、羰基还原、醌还原、还原性脱卤       | /     | 肠道菌群:偶氮和硝基还原<br>血:羰基还原 |
| 水解  | 酯酶、环氧水化酶                     | /          | 酯酶、环氧水化酶                     | 酯酶、肽酶 | 血:酯酶、肽酶                |

### (一) 氧化作用

1. 细胞色素 P-450 酶系 微粒体细胞色素 P-450 酶系又称为微粒体混合功能氧化酶(microsomal mixed function oxidase, MFO),或单加氧酶(monooxygenase)。该酶系主要由三部分組成,即血红素蛋白类(细胞色素 P-450 和细胞色素 b5)、黄素蛋白类(NADPH-细胞色素 P-450 还原酶和 NADH-细胞色素 b5 还原酶)和磷脂类。其中以细胞色素 P-450(以下简称为 P-450)最为重要。

很早就了解 P-450 至少有两种。用苯巴比妥(PB)和 3-甲基胆蒽(3-MC)处理动物,对大鼠肝微粒体的药物氧化代谢有不同的作用,将诱导型 P-450 分为 PB 型和 3-MC 型。后者又称为 P-448,主要存在于肝外组织,其催化的底物及其他性质不同于 P-450。目前已确定,P-450 是一

个蛋白质超家族,其每一种对底物专一性有特征性谱,其中某些是 P-450 结构型的,其他的是诱导型的。很多 P-450 的 cDNA 和基因结构已经阐明。这些蛋白质根据结构的相似性组成家族和亚族。

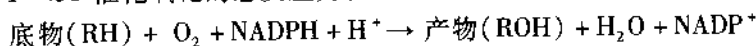
P-450 酶氨基酸序列相似性 >40% 是属于同一家族,如 >59% 则属于同一亚族。至 1995 年 10 月已分离鉴定了 481 个 P-450 基因和 22 个假基因。这些基因又分为 36 个基因族,其中哺乳类 12 个,由 22 个基因亚族组成。目前已定位了人类 P-450 基因组的 17 个基因亚族和小鼠的 15 个基因亚族,每个亚族代表着一个紧密连接的基因簇。P-450 的命名是用斜体词根 CYP 代表除小鼠之外所有物种的细胞色素 P-450 的基因和 cDNA(小鼠用 Cyp),词根后的阿拉伯数字代表基因族,大写英文字母代表基因亚族,字母后的阿拉伯数字代表基因亚族中的一个基因。如 CYP1A1 表示 P-450 的 1 基因族 A 亚族第 1 基因。所有物种 P-450 的 mRNA 和酶都用大写字母表示。人肝脏主要含 15 种以上不同的生物转化毒物和(或)内源性底物的 P-450(CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C18, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5, 3A7, 4A9, 和 4A11)。涉及毒物生物转化的人肝主要 P-450 的底物、抑制剂和诱导剂举例见表 3-3。

表 3-3 人肝主要 P-450 底物、抑制剂和诱导剂举例

| P-450   | 底物        | 抑制剂          | 诱导剂         |
|---------|-----------|--------------|-------------|
| CYP1A2  | 乙酰苯胺,咖啡因  | $\alpha$ 萘黄酮 | 焦牛肉,吸烟      |
| CYP2A6  | 香豆素,丁二烯   | 二乙二硫氨甲酯      | 苯巴比妥(PB)    |
| CYP2B6  | 环磷酸胺      | 邻甲基苯海拉明      | 未知          |
| CYP2C8  | 酰胺咪嗪      | 槲皮素          | 未知          |
| CYP2C9  | 双氯高灭酸,苯妥英 | 苯磺唑酮         | 利福平         |
| CYP2C19 | 安定,环己烯巴比妥 | 反苯环丙胺        | 利福平         |
| CYP2D6  | 异喹啉       | 氟西汀,洛贝林,奎尼丁  | 未知          |
| CYP2E1  | 乙醇,亚硝酸    | 氨基三唑,二甲亚砷    | 乙醇,异烟肼      |
| CYP3A4  | 尼非地平,二氢吡啶 | 乙炔雌二醇        | 地塞米松,PB,利福平 |

注:人肝不表达 CYP1A1

P-450 催化氧化的总反应为:



P-450 的催化机制见图 3-9,共有 7 步:①氧化型细胞色素 P-450( $\text{Fe}^{3+}$ )首先与 RH 结合形成一种复合物;②再在 NADPH-细胞色素 P-450 还原酶的作用下,由 NADPH 提供一个电子使其转变为还原型细胞色素 P-450( $\text{Fe}^{2+}$ )复合物;③此复合物和一个分子氧结合形成含氧复合物;④ $\text{Fe}^{2+}\text{O}_2$ 复合物再加上一个质子( $\text{H}^+$ )和由 NADPH-细胞色素 P-450 还原酶或由细胞色素  $\text{b}_5$  提供的第二个电子,转变成  $\text{Fe}^{2+}\text{OOH}$  复合物;⑤第二个质子的加入使  $\text{Fe}^{2+}\text{OOH}$  复合物裂解,形成水和  $(\text{FeO})^{3+}$  复合物;⑥ $(\text{FeO})^{3+}$  复合物将氧原子转移到底物,生成 ROH,并提供一个电子,使其中的  $\text{O}_2$  活化,活化氧;⑦释放 ROH 产物,此时 P-450( $\text{Fe}^{2+}$ )变为 P-450( $\text{Fe}^{3+}$ ),可再次参与氧化过程。P-450 的催化机制还有些附加反应,如果催化循环在不同的步骤中断(解偶联),则可分别产生单电子还原、生成超氧阴离子、生成过氧化氢和过氧化物旁路。

细胞色素 P-450 催化下面几种类型的氧化反应:

- (1) 脂肪族或芳香族碳的羟基化;
- (2) 双键的环氧化作用;

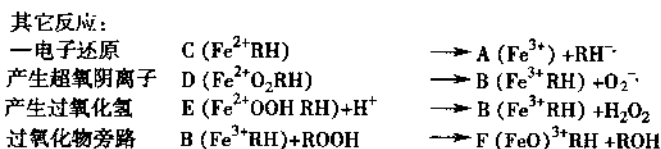
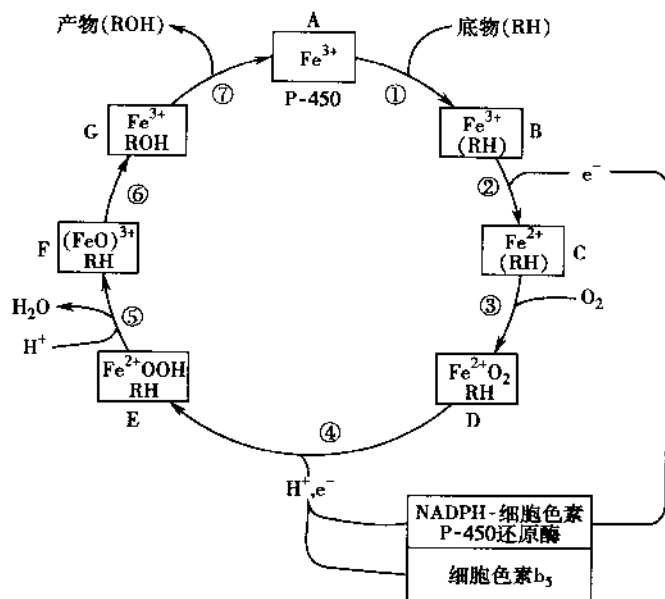


图 3-9 细胞色素 P-450 的催化循环

- (3) 杂原子(S-,N-,I-)的氧化和 N-羟基化;
- (4) 杂原子(O-,S-,N-和 Si-)脱烷基作用;
- (5) 氧化基团的转运;
- (6) 酯的裂解;
- (7) 脱氢作用。

在前三种反应类型中,来自  $FeO^{3+}$  复合物的氧与底物结合,否则底物将维持原态。在第四种反应类型,导致胺(N-脱烷基)或醚(O-和 S-脱烷基)裂解的重排反应跟随底物氧化后发生。来自  $FeO^{3+}$  复合物的氧与残留烷基合并,生成一分子醛或酮。第五种反应类型中,底物氧化后,随后发生导致杂原子丢失的重排反应(氧化基团转移)。第六种反应类型中,酯的裂解与杂原子脱烷基相似,功能基团裂解后与来自  $FeO^{3+}$  复合物的氧合并成一个残余基团,生成一分子醛。在第七种反应类型中,两个氢从底物中抽提出来,使底物形成双键的形式( $C=C, C=O$  或  $C=N$ ),而氢与从  $(FeO)^{3+}$  复合物还原的氧结合生成水。需要特别指明的是,这一长串反应列表并不包括细胞色素 P-450 催化的所有反应。本部分前文指出的细胞色素 P-450 能够催化还原反应(如偶氮还原、硝基还原和还原脱卤化)和异构化反应(如  $PGH_2$  转变为血栓素和前列腺环素)。在合成类固醇激素的过程中,细胞色素 P-450 催化 C-C 键的断裂以及被置换的环己烷的芳香化,C-C

键断裂发生在胆固醇在支链裂解酶(也称 P-450<sub>scc</sub> 和 CYP11A1)作用下转变为孕烯醇酮的时候,而被置换的环己烷的芳构化则发生在当雄激素在芳香酶(P-450<sub>aro</sub> 和 CYP19)的作用下转变为雌激素的时候。

P-450 催化的反应类型举例如下。

(1) 脂肪族和芳香族的羟化(hydroxylation of an aliphatic or aromatic carbon):又可称为碳羟化反应。脂肪族在体内的羟化往往是末端的或倒数第二个碳原子被氧化成羟基。例如:有机磷农药八甲磷(schradane, OMPA)末位甲基羟化生成 N-羟基八甲磷,后者在体内毒性增高,抑制胆碱酯酶的能力较八甲磷强 10 倍。大多数芳香族毒物被羟化为酚类。例如苯胺可氧化为对氨基酚、邻氨基酚或羟基苯胺。

(2) 双键的环氧化(epoxidation of a double bond):黄曲霉毒素 B1 (AFB1)和氯乙烯等含双键的芳香族和烯烃类毒物氧化时,常常形成环氧化中间产物,环氧化物不稳定可重排而成酚类。如苯环上有卤素取代,或是多环芳烃进行环氧化时,则能形成较稳定的环氧化物。很多环氧化物是亲电子剂,毒性高于母体毒物。环氧化的解毒过程包括:①非酶催化的水化;②非酶催化的与 GSH 反应;③环氧化物水化酶催化的水化反应;④谷胱甘肽 S-转移酶催化的结合反应。

苯并(a)芘(BaP)是一种重要的环境致癌物,已在体内鉴定了包括各种结合产物在内共 50 多种代谢产物,其中 3-羟 BaP 是主要的解毒产物。BaP 的代谢活化途径见图 3-10。BaP 首先由 P-450 酶系催化生成 4,5-,7,8-,9,10-三种主要的环氧化物。这些环氧化物在环氧化物水化酶(EH)的催化加水生成二氢二醇衍生物。7,8-和 9,10-二氢二醇可由 P450 酶系进一步生成邻二氢二醇环氧化物,即 7,8-二氢二醇-9,10-环氧化物和 9,10-二氢二醇 7,8-环氧化物。7,8-二氢二醇-9,10-环氧化物有 4 种异构体,其中 7,8-二氢二醇-9,10-环氧化物(+)-II 为终致癌物。

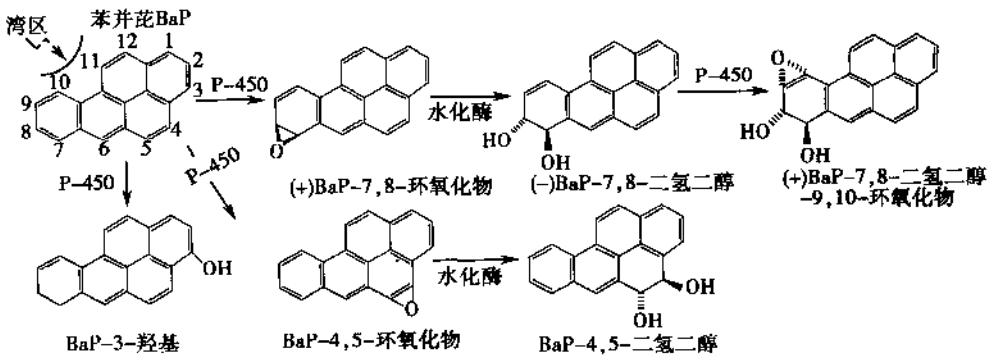


图 3-10 苯并(a)芘(BaP)的代谢活化和解毒

(3) 杂原子(S-,N-和 I-)氧化和 N-羟化(heteroatom oxygenation and N-hydroxylation):含有硫醚键(-C-S-C-)的有机磷毒物,可在 MFO 的催化下进行 S-氧化反应,转化成亚砷或砷,这些氧化产物毒性可增高 5~10 倍。例如内吸磷在体内通过此反应而毒性增强。

对芳香胺毒物,可在其 NH<sub>2</sub> 基上进行 N-羟化生成羟氨基毒物,毒性往往较母体毒物高。如苯胺进行 N-羟化生成 N-羟基苯胺,后者可导致血红蛋白氧化成高铁血红蛋白,引起组织缺氧。

(4) 杂原子(O-,S-和 N-)脱烷基(heteroatom dealkylation):氮、氧和硫原子上带有烷基的毒



物,可以发生脱烷基反应。这些反应过程是先使烷基氧化为羟烷基毒物,后者又分解产生醛或酮。如:氨基比林的 N-脱烷基过程,可以产生甲醛。

二甲基亚硝胺通过 P-450 的催化作用,进行 N-脱烷基反应,进一步产生有亲电子剂  $\text{CH}_3^+$  (碳宾离子),可使 DNA 发生烷化作用,致癌和致突变。

(5) 氧化基团转移(oxidative group transfer):氧化基团转移是经 P-450 催化的氧化脱氨、氧化脱硫、氧化脱卤素作用。如苯丙胺经 P-450 催化氧化脱氨生成苯丙酮,释出氨;氧化脱氨作用也可由单胺氧化酶(MAO)催化,但苯丙胺不是 MAO 的良好底物。有机磷农药对硫磷经氧化脱硫后形成对氧磷,对氧磷的大鼠经口  $\text{LD}_{50}$  值约为对硫磷的 1/3,即毒性大 3 倍。

(6) 酯裂解(cleavage of esters):P-450 催化磷酸酯裂解,如对硫磷氧化生成中间产物,此中间产物也可裂解生成对硝基酚和二乙基硫代磷酸。P-450 催化羧酸酯裂解可生成羧酸和醇,而酯酶水解生成羧酸和醇。 $\text{R}_1\text{COOCH}_2\text{R}_2 + [\text{O}] \rightarrow \text{R}_1\text{COOH} + \text{R}_2\text{CHO}$

(7) 脱氢(dehydrogenation):P-450 也催化很多毒物的脱氢反应,如尼古丁,对乙酰氨基酚(acetaminophen,扑热息痛)。对乙酰氨基酚可脱氢活化成肝毒物 N-乙酰苯醌亚胺。

2. 微粒体含黄素单加氧酶 肝、肾、肺等组织微粒体含一种或几种含黄素单加氧酶(microsomal flavin-containing monooxygenase, FMO)可氧化多种毒物的亲核性氮、硫和磷杂原子。此酶以黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)为辅酶,需要 NADPH 和  $\text{O}_2$ 。由 FMO 催化的很多反应也可为 P-450 催化。

与 P-450 酶系的不同之处是此酶不能在碳位上催化氧化反应。FMO 可催化亲电子的胺氧化生成 N-氧化物,催化伯胺氧化生成羟胺和肟。如苯异丙胺、苯达明、氯丙嗪、氯氮平、胍乙啶、丙咪嗪、甲苯丙胺、奥氮平及三苯氧胺等含氮药物,可经 FMO 进行 N-氧化,但大多数情况经细胞色素 P-450 进行 N-氧化。FMO 还可氧化含硫的外源化学物(如硫醇、硫醚、硫酮、硫代氨基甲酸盐、甲氧咪呱和舒林酸硫化物)和磷化氢分别生成 S-和 P-氧化物。胍类化合物、碘化物、硒化物和含硼化合物也是 FMO 的底物。

FMO 的催化机制见图 3-11。经 NADPH 将 FAD 分子还原成  $\text{FADH}_2$  后,氧化性辅助因子 NADP 仍结合在酶上, $\text{FADH}_2$  然后结合氧产生过氧化物(即 FAD 的 4a-氢化过氧化黄素)这种过氧化物相对稳定,可能是因为 FMO 的活性中心由非亲核性,亲脂性氨基酸残基组成。在外源化学物氧化期间,4a-氢过氧化黄素蛋白转变成 4a-羟基黄素蛋白,并将黄素蛋白过氧化物的氧转送到底物上,FMO 产生的代谢物是在外源化学物与过氧化物或过酸化物之间反应的产物。与 P-450 不同,FMO 在与底物结合前就与分子氧结合并使之活化。催化循环的最后一步涉及 4a-羟基黄素蛋白的脱氢作用,并释放  $\text{NADP}^+$ 。因为它是限速反应,且在底物氧化后完成。

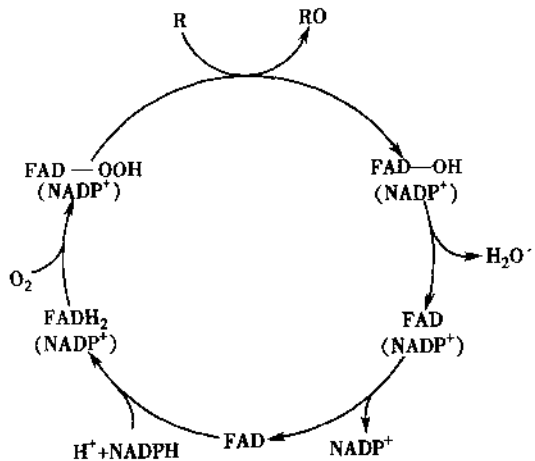


图 3-11 FMO 的催化机制

人类和其他哺乳动物的表达 5 种不同的黄素加单氧酶 (FMO1、FMO2、FMO3、FMO4 和 FMO5), 具有物种特异性和组织特异性。FMO 和 P-450 相对表达的物种差异, 决定了吡咯烷生物碱类、千里光宁、倒千里光碱及单响尾蛇毒蛋白的毒性物种差异。这些化合物经 FMO 解毒, 其催化形成叔胺 N-氧化物, 但它们经细胞色素 P-450 是活化产生有毒的亲电化合物。大鼠有较高的形成吡咯的 P-450 活性和较低的形成 N-氧化物的 FMO 活性; 而豚鼠相反。这就是吡咯烷生物碱对大鼠是剧毒, 而对豚鼠则低毒的原因。在人体, FMO 在几种药物 (如苯达明、西咪替丁、氯氮平、呱乙啶、甲硫咪唑、奥氮平、舒林酸、硫醚、他莫昔芬和各种二甲基氨基烷化吩噻嗪衍生物如氯丙嗪和丙咪嗪, 外源化学物 (如可卡因、甲苯丙胺、尼古丁、酪胺) 以及内源性底物 (如三甲胺、半胱氨酸) 的生物转化中起着重要作用。在肝微粒体表达的 FMO 酶类调节控制与 P-450 不一样。在大鼠, 巴比妥或 3-甲基胆蒽诱导 P-450, 阻遏 FMO1 的表达; 吡啶-3-甲醇与 3-甲基胆蒽一样诱导 P-450, 可明显地抑制大鼠肝脏和小肠的 FMO 活性。

### 3. 醇、醛、酮氧化-还原系统和胺氧化

(1) 醇脱氢酶: 醇脱氢酶 (ADH) 是一种含锌酶, 位于胞浆, 分布于肝脏 (含量最高)、肾脏、肺脏及胃粘膜。人 ADH 是由两个 40kDa 亚单位组成二聚体蛋白质, 其亚单位有 6 个不同的基因位点 (ADH1 - ADH6) 编码, 它们是  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $r$ 、 $\pi$  和  $\chi$  以及第 6 个亚单位  $\delta$  与或者  $\mu$ 。

ADH 依不同的分子分为四类。I 型 ( $\alpha$ -ADH、 $\beta$ -ADH 和  $r$ -ADH) 主要存在于肝脏和肾上腺等, 包括 ADH1、ADH2 和 ADH3, 它们是同工酶, 催化乙醇及其他短链脂肪醇的氧化过程, 吡啶可抑制酶活性。II 型 ( $\pi$ -ADH) 主要表达在肝脏, 而在胃的量较低。在肝脏它主要催化长链脂肪醇和芳香醇的氧化, II 型 ADH 对乙醇和甲醇的氧化几乎不起作用, 且不受吡啶的抑制。III 型 ADH ( $\chi$ -ADH) 的底物是长链醇 (戊醇和更长) 及芳香醇 (如肉桂醇)。III 型 ADH 是普遍存在于全身组织, 包括脑, 它在甲醛的解过程起着重要作用。II 型和 III 型 ADH 均不受吡啶的抑制。IV 型 ADH 在成人的肝脏中没有表达, 它主要在胃肠道的上部, 与慢性乙醇中毒者导致肿瘤有关。其原因是 IV 型 ADH 使乙醇转变成乙醛 (乙醛可能导致上胃肠道肿瘤); 乙醇中毒抑制 IV 型 ADH 代谢维生素 A 的活性, 而维生素 A 在上皮细胞生长和分化中有重要作用。

(2) 乙醛脱氢酶: 乙醛脱氢酶 (ALDH) 以  $NAD^+$  为辅助因子将乙醛氧化成羧酸。几种 ALDH 酶类涉及醛类化合物的氧化过程, 亦具有酯酶的活性。在人体, 有 12 种 ALDH 基因被鉴定, 即 ALDH1 - 10, SSDH 和 MMSDH。已在人体证实了 ALDH 的遗传多态性, 在日本人、中国人、韩国人和越南人中约有 45% ~ 53% 的人因为点突变 ( $Glu_{487} \rightarrow Lys_{487}$ ) 而缺乏 ALDH2 的活性。许多亚洲人在饮酒后易产生红晕综合征, 其原因是乙醛的迅速堆积, 造成局部血管因释放儿茶酚胺而扩张。其他 ALDH<sub>s</sub> 的遗传缺陷可损害其他醛类的代谢, 这是某些疾病发生的基础。例如, ALDH4 缺乏, 干扰了脯氨酸代谢, 引起 II 型高卟啉血症, 其症状包括智力发育迟缓和惊厥。

(3) 二氢二醇脱氢酶: 除几种羟化类固醇脱氢酶和醛糖还原酶外, 醛-酮还原酶 (AKR) 超家族还包括几种二氢二醇脱氢酶。

(4) 钼水解酶 (molybdozymes): 醛氧化酶和黄素脱氢酶/黄素氧化酶 (XD/XO) 为有含钼酶, 钼酶的最适底物不是细胞色素 P-450 的底物。醛氧化酶能氧化许多取代基团如吡咯、吡啶、嘧啶、嘌呤、蝶啶及碘离子。由醛氧化酶催化的外源化学物还原反应需要无氧条件或者有还原性底物, 如 N'-甲基尼古丁胺、2-羟基嘧啶或者苯甲醛的存在。

(5) 单胺氧化酶、二胺氧化酶: 在肝、肾、肠、神经等组织的线粒体中有单胺氧化酶, 胞液中有

二胺氧化酶,这些酶能使各种胺类氧化脱氨生成醛和氨。

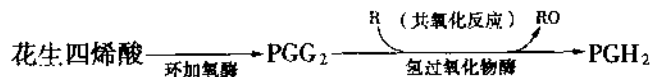
单胺氧化酶有两种形式,称为 MAO-A 和 MAO-B。MAO-A 主要氧化 5-羟色胺,去甲肾上腺素和苄心胺的脱烷基代谢物。Clorgyline 可抑制 MAO-A 的活性。而 MAO-B 主要氧化  $\beta$ -苯乙胺和苄胺,可受 1-司来吉兰的抑制。

单胺氧化酶是因为其在 MPTP(1-甲基-4-苯基-1,2,5,6-四氢吡啶)活化成为神经毒素中的作用而受重视。MPTP 在人和猴可引起帕金森病,而在啮齿类动物则未见。研究表明 MPTP 的活化为神经毒性代谢物主要由 MAO-B 催化。

MAO-B 敲除小鼠在给予 MPTP 后,未发现黑质纹状体多巴胺神经元的选择性损害,证实此观点。MAO-B 是可影响帕金森病易感性的遗传因素之一。

二胺氧化酶位于胞浆,是含铜离子的磷酸吡哆醛依赖的酶类。其分布于肝脏、肾脏、小肠和胎盘,其选择性底物包括组胺和简单的烷基二胺,具有 4 或 5 碳原子的支链。

4. 过氧化物酶依赖性的共氧化反应 过氧化物酶催化的外源化学物生物转化。它包括氢过氧化物的还原和其他底物氧化生成脂质氢过氧化物,这一过程称为共氧化。几种不同的过氧化物酶可催化外源化学物的生物转化,它们见于各种组织和细胞内。例如,肾脏髓质、血小板、血管内皮细胞、胃肠道、脑、肺及膀胱上皮细胞含有前列腺素 H 合成酶( PHS),乳腺上皮细胞的乳过氧化物酶,以及白细胞的髓过氧化物酶。PHS 具有两个催化活性:一为环加氧酶,可将花生四烯酸的转变成环状内氢过氧化物  $PGG_2$ ,该过程涉及 2 个氧分子加到花生四烯酸的每个分子上;另一是过氧化物酶,将氢过氧化物转变成相应的醇  $PGH_2$ ,它通过外源化学物的氧化来完成。例如氨基比林的 N-脱甲基反应、对乙酰氨基酚的脱氢反应、苯并(a)芘羟化反应和 7,8-二氢二醇苯并(a)芘的环氧化、黄曲霉毒素  $B_1$  的 8,9-环氧化反应等都可通过共氧化作用而完成。



肾髓质和膀胱上皮的 P-450 含量较低,而 PHS 含量相对较高。在肾髓质 PHS 活化黄曲霉毒素和乙酰胺基苯可产生肾毒性,膀胱上皮的 PHS 能活化芳香胺,如联苯胺、4-氨基联苯和乙-氨基萘,形成 DNA 反应性代谢物,引起某些物种如人和狗的膀胱癌。

## (二) 还原作用

在哺乳动物组织中还原反应活性较低,但在肠道菌群内还原酶的活性较高。

1. 硝基和偶氮还原 偶氮还原和硝基还原是经肠道菌群和两种肝脏酶,如细胞色素 P-450 和 NADPH 醌氧化还原酶(一种胞浆黄素酶,也称为 DT-黄递酶)催化。在某些情况下,醛氧化酶也参与偶氮还原反应和硝基还原反应。其反应需要  $NAD(P)H$ ,可被氧抑制。胃肠道下段的无氧条件很适合偶氮还原和硝基还原反应,所以这些反应主要由肠道菌群催化的。而在低氧分压时,细胞色素 P-450 也能催化外源化学物的还原反应。

肠道菌群催化的硝基还原对某些硝基芳香毒物的毒性起重要的作用。如雄性大鼠肝致癌物二硝基甲苯的代谢活化见图 3-12。二硝基甲苯经肝 P-450 氧化后与葡萄糖醛酸结合成葡糖苷排入胆汁,由肠道菌群进行生物转化,一个或两个硝基被硝基还原酶还原成胺,葡糖苷为  $\beta$ -葡糖苷酶水解。水解后的代谢物被重吸收转运至肝,新生成的氨基由 P-450 催化 N-羟化,并可乙酰

化或与硫酸结合。这些结合物可裂解生成高度反应性的氮宾离子,氮宾离子可攻击 DNA,引起肝细胞突变和肝癌。因此,某些化学致癌物的代谢活化涉及几个不同的生物转化酶,并可需要几个器官组织的配合。因而,2,6-二硝基甲苯与 DNA 反应并引起突变,在大多数评价化学物遗传毒性的短期试验中是观察不到的。因为这些体外的遗传毒性试验缺乏肠道菌群的生物转化或者 II 相(结合)酶的作用。

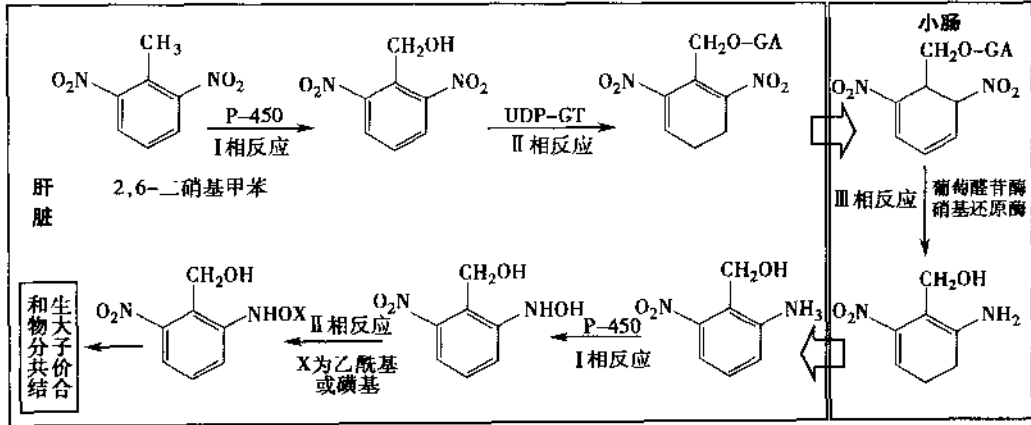


图 3-12 二硝基甲苯经肝和肠道菌群的代谢活化

2. 羰基还原作用 某些醛类还原成伯醇和酮类还原成仲醇的过程是经醇脱氢酶和羰基还原酶催化。羰基还原酶是单聚体,依赖 NADPH 的酶,分布于血液和肝脏、肾脏、大脑及其他神经细胞的胞浆中。经羰基还原酶还原的外源化学物有氟哌啶醇(抗精神病药物)、己酮可可碱、乙酰苯磺环乙胺、柔红霉素、依他尼酸、华法林、甲萘醌以及 4-硝基苯乙酮等。前列腺素可能是羰基还原酶的生理性底物。

肝脏的羰基还原酶活性主要在胞浆,而在微粒体则有不同的羰基还原酶。胞浆和微粒体羰基还原酶的区别在于它们立体选择由酮还原成仲醇的程度不同。

在大鼠肝脏胞浆,醌的还原作用主要由 DT-黄递酶催化(见醌还原反应)。而在人肝脏胞浆醌的还原作用则由 DT-黄递酶和羰基还原酶共同催化。人肝脏和脑组织的胞浆有一种以上的羰基还原酶。在不同个体中,肝脏胞浆的羰基还原酶低亲和性与高亲和性的活性之差有 10 倍。在结构上,羰基还原酶属于短链脱氢酶/还原酶(SDR)的超家族(包括某些羟基甾类脱氢酶和前列腺素脱氢酶)。虽然某些醛还原酶属于醛酮还原酶(AKR)超家族(包括其他的羟化甾类脱氢酶和醛糖还原酶)。

3. 二硫化物、硫氧化物和 N-氧化物还原 含硫基团还原反应在体内较少。二硫化物还原并裂解成巯基毒物,如戒酒硫由肝、肾细胞胞浆中硫氧化还原依赖性酶催化还原。

在肝、肾细胞胞浆中硫氧还蛋白依赖性酶类可还原硫氧化物(如亚砷),硫氧化物又可通过 P-450 或 FMO 而形成的,通过这些相反作用的酶系统的再循环可能延长某些外源化学物的生物半减期。

N-氧化物本身毒性不高,由细胞色素 P-450 和 NADPH 细胞色素 P-450 还原酶催化经单电子还原迅速活化生成氧化性氮氧的自由基,转变成细胞毒性或与 DNA 结合的毒物。

4. 醌还原 醌由 NAD(P)H-醌氧化还原酶催化还原成氢醌,此酶是黄素蛋白,又称为 DT-黄递酶,催化醌双电子还原。醌双电子还原还可由羧基还原酶催化。醌的双电子还原是无毒性的。但醌经 NADPH-P-450 还原酶催化单电子还原,生成半醌自由基。半醌自由基可经自氧化,伴有氧化应激,生成具有细胞毒性的超氧阴离子、过氧氧自由基、过氧化氢、羟基自由基(图 3-13)。氧化应激是某些含醌或可转变为醌的毒物毒作用的重要机制,如多柔比星和柔红霉素的心脏毒性、百草枯和硝基咪喃妥因的肺毒性、6-羟基多巴胺的神经毒性。

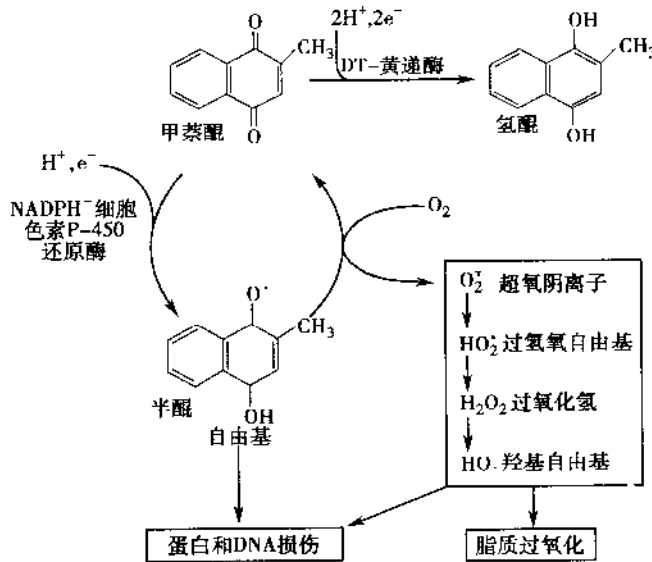


图 3-13 甲萘醌二电子还原成氢醌和一电子还原成半醌时生成活性氧自由基

5. 脱卤反应 有三种机制涉及脱卤素反应,即还原脱卤反应、氧化脱卤反应和脱氢脱卤反应。还原脱卤反应和氧化脱卤反应由 P-450 催化,脱氢脱卤反应由 P-450 和 GSH S-转移酶催化。这些反应在一些卤代烷烃的生物转化和代谢活化中起重要的作用。如肝脏毒物四氯化碳经还原脱卤反应代谢活化,单电子还原生成三氯甲烷自由基( $\cdot\text{CCl}_3$ ),后者启动脂质过氧化作用并产生各种其他代谢物。

### (三) 水解作用

外源化学物的水解作用(hydrolysis)主要由酯酶和酰胺酶、肽酶、环氧水化酶催化。

1. 酯酶和酰胺酶 哺乳动物含有许多种水解酶,包括各种酯酶(esterase)和酰胺酶(amidase),可水解含有羧酸酯(普鲁卡因)、酰胺(普鲁卡因酰胺)、硫酯(螺甾内酯)、磷酸酯(对氧磷)及酸酐等功能基团的外源化学物。酯类毒物被酯酶催化水解生成醇和酸,酰胺被酰胺酶催化水解成酸和胺,硫酯被分解为羧酸和硫醇。

在 1953 年, Aldridge 依据其与有机磷酸酯相互作用的性质将酯酶进行了分类。水解有机磷酸酯的酯酶分为 A-酯酶,有机磷酸酯可抑制的酯酶为 B-酯酶,而不能与有机磷酸酯相互作用的酯酶为 C-酯酶。羧酸酯酶和胆碱酯酶属于 B-酯酶,也可称为血清酯酶家族。像对氧磷酶等有机



Ⅱ相反应可引起代谢活化,如致癌物 2-乙酰氨基芴(2-acetylaminofluorene,2-AAF)和 2-氨基芴,可以在 N-乙酰转移酶和脱乙酰酶催化互相转化,并均可经 P-450 和黄素加单氧酶催化形成 N-羟基芳酰胺和 N-羟基芳胺。这两种毒物是近致癌物,与硫酸结合、乙酰化和葡糖苷酸结合(反应途径见图 3-14),结合物在酸性 pH 尿可水解或由小肠菌丛的  $\beta$ -葡糖苷酸酶催化水解,生成 N-羟基芳香胺,后者可自发性生成芳基氮宾离子(亲电子剂),攻击 DNA,引起膀胱癌和结肠癌。

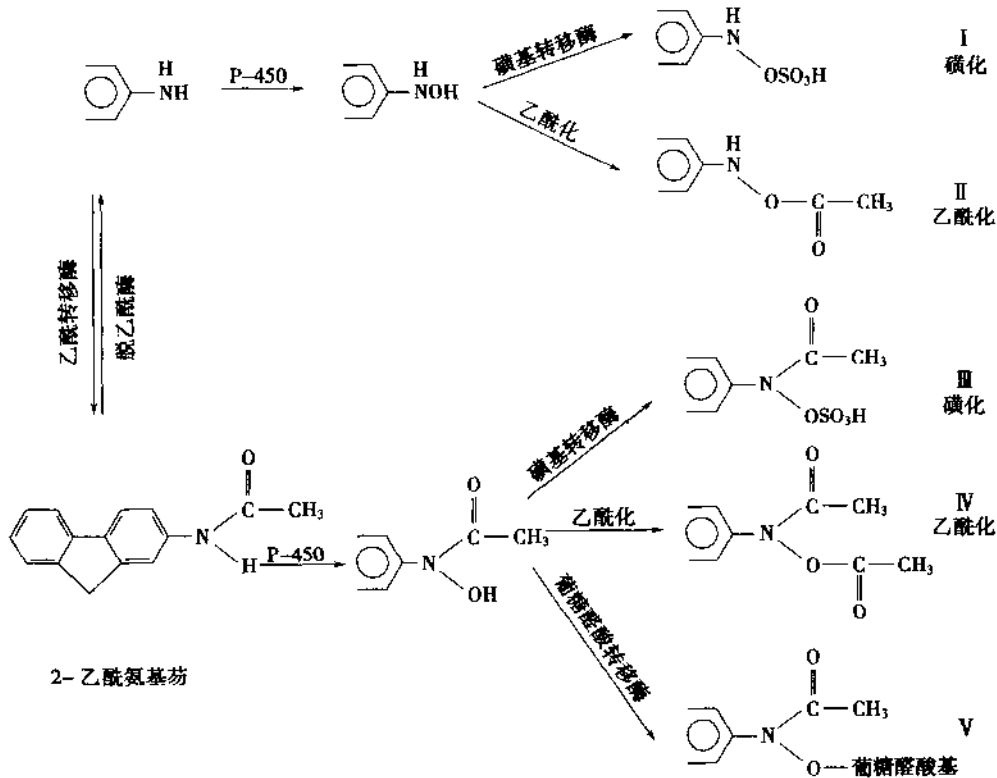


图 3-14 2-乙酰氨基芴代谢活化成为有致突变性和致癌性的代谢物(I-V)

### (一) 葡糖醛酸结合

葡糖醛酸结合(glucuronidation)是Ⅱ相反应中最普遍进行的一种,由 UDP-葡糖醛酸基转移酶(UDP-glucuronyl transferase, UDPGT)催化对毒物的代谢(解毒和活化)具有重要的作用。

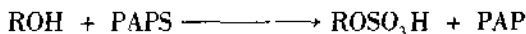
葡糖醛酸结合反应中葡萄糖醛酸供体是来自胞液的尿苷二磷酸葡萄糖醛酸(uridine diphosphate glucuric acid, UDPGA)。外源性底物包括羟基、羧基、胺基和巯基毒物。UDPGT催化的结合反应中,UDPGA的葡糖醛酸部分 C-1 碳原子被活化受到底物中 O、N、S 或 C 原子的亲核攻击,形成有  $\beta$  构型的糖苷酸结合物,并释出 UDP。葡糖苷酸结合物是高度水溶性,易于从尿和胆汁排泄。

UDPGT 是一组分子量为 50-60kDa 的同工酶,主要定位于肝内质网和核膜,是可诱导酶。基于序列分析,人肝内已鉴定了两个亚族共 9 种酶。第 1 亚族的 4 种同工酶催化酚和胆红素的葡

糖苷酸结合,一般不催化类固醇和胆盐;第2亚族的5种同工酶催化类固醇、胆盐和某些毒物的葡糖苷酸结合。

## (二) 硫酸结合

硫酸结合(sulfate conjugation)反应的供体是3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸(PAPS)在磺基转移酶(sulfo-transferase)作用下,生成硫酸酯:



此反应从PAPS转移 $-\text{SO}_3^-$ (不是 $-\text{SO}_4^-$ )至毒物。结合反应涉及亲核性氧或氮原子攻击PAPS分子中的亲电性硫原子,磷硫脂键断裂。磺基转移酶不被典型的诱导剂(PB和3MC)所诱导。

由于PAPS的前体自由半胱氨酸浓度有限,细胞PAPS浓度( $\sim 75 \mu\text{mol/L}$ )显著低于UDPGA( $\sim 350 \mu\text{mol/L}$ )和GSH( $\sim 10 \text{mmol/L}$ )。硫酸结合与葡糖醛酸结合的底物功能基团相似,对于酚类,硫酸结合亲和力高、代谢容量低,而葡糖醛酸结合亲和力低、代谢容量高。因此同一种毒物与硫酸和葡糖醛酸结合的相对量取决于染毒剂量。在低剂量时主要的代谢产物为硫酸结合物,剂量增加则与葡糖醛酸结合的比例增加。外源化学物的硫酸结合物主要经尿排泄,少部分从胆汁排泄。毒物与硫酸结合后尿中有机硫酸酯与无机硫酸盐比值明显增加,可以用作一些毒物的接触指标。

## (三) 乙酰化作用

乙酰化作用(acetylation)涉及酶催化或非酶催化的从乙酰辅酶A将乙酰基转移到含伯胺、羟基或巯基的毒物。这些酶分布在很多器官,但肝是N-乙酰化作用的主要器官。芳香伯胺和胍的伯胺基乙酰化作用是这些毒物的主要生物转化途径。

人类的乙酰化也有多态性,根据对异烟肼乙酰结合反应的速度,将人群分为快乙酰化型和慢乙酰化型。

## (四) 氨基酸结合

与氨基酸结合(amino acid conjugation)有两类毒物,即羧酸和芳香羟胺。羧酸必须首先经酰基辅酶A合成酶催化,需要ATP和乙酰辅酶A,活化生成酰基辅酶A硫酯,再由N-乙酰转移酶催化与氨基酸如甘氨酸、谷氨酸、牛磺酸的氨基反应,形成酰胺键。例如苯甲酸与甘氨酸结合生成马尿酸。羧酸的氨基酸结合是解毒反应。芳香羟胺则由氨酰-tRNA合成酶催化并需要ATP,与氨基酸的羧基反应,生成N-酯,后者可形成亲电子的氮宾离子和碳宾离子,因此是活化反应。

## (五) 甲基化作用

内源性底物的甲基化如组胺、氨基酸、蛋白、糖和多胺对细胞的正常调节有重要的意义,仅当毒物符合这些酶的底物要求,甲基化作用(methylation)才有重要性,甲基化反应不是毒物结合的主要方式。甲基化反应由S-腺嘌呤蛋氨酸(SAM)供给甲基。甲基化反应可分为N-,O-,S-甲基化。这种结合形成的产物虽然可能比母体毒物水溶性降低,但一般都能使毒物解毒。



### (六) 谷胱甘肽结合

谷胱甘肽 S-转移酶 (glutathione S-transferase, GST) 催化还原性 GSH (亲核剂) 与含有亲电子 C、N、S、O 的毒物反应, 生成结合物。GST 的底物的共同点为: 有一定疏水性, 含有亲电子原子, 并可与 GSH 发生非酶反应。GSH 结合物具有极性和水溶性, 可经胆汁排泄, 并可经体循环转运至肾。在肾内 GSH 结合物经一系列酶催化反应转变为硫醚氨酸 (mercapturic acid) 衍生物, 由尿排泄。GST 在细胞内含量很高, 可高达细胞总蛋白的 10%, 主要存在于胞液中, 在微粒体内含量较低, GST 是可诱导酶。

GST 催化的 GSH 结合反应是亲电子剂解毒的一般机制, 并在自由基解毒中也起重要作用。然而, 如果上述亲电性物质在体内的量过大, 则可引起谷胱甘肽的耗竭, 导致明显毒性反应, 如对乙酰氨基酚与肝蛋白共价结合与谷胱甘肽的耗竭关系如图 3-15。

结合作用的主要类型及结合酶定位小结于表

3-4。

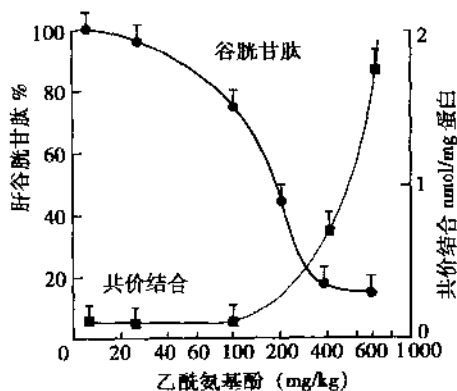


图 3-15 谷胱甘肽在对乙酰氨基酚与肝蛋白共价结合的保护作用

表 3-4 结合作用的主要类型及结合酶定位

| 结 合 物 | 底物类型           | 结合基团的来源         | 酶 定 位   |
|-------|----------------|-----------------|---------|
| 葡萄糖醛酸 | 酚、醇、羧酸、胺、硫基    | 尿苷二磷酸葡萄糖醛酸      | 微粒体     |
| 硫 酸   | 酚、醇、芳香胺        | 3'-磷酸腺苷-5'-磷酸硫酸 | 胞液      |
| 乙酰基   | 芳香胺、胺等         | 乙酰辅酶 A          | 线粒体、胞液  |
| 甲 基   | 酚、胺            | S-腺苷蛋氨酸         | 胞液      |
| 甘氨酸   | 酰基辅酶 A         | 甘氨酸             | 线粒体、微粒体 |
| 谷胱甘肽  | 环氧化物、卤化物、硝基毒物等 | 谷胱甘肽            | 胞液、微粒体  |

## 四、毒物代谢酶的诱导和激活、抑制和阻遏

毒物在体内的生物转化过程, 受很多因素的影响, 如物种、性别、遗传、年龄、营养、疾病等。

本节仅介绍毒物代谢酶的诱导 (激活) 或抑制 (阻遏) 对生物转化的影响。

人体在生产和生活环境中往往同时接触多种化学物质 [包括空气中 (车间空气和大气)、食物中及饮水中], 尤其是同时服用某些药物或嗜烟、酒。这些化学物质中如果含有某种能诱导和激活或抑制和阻遏代谢酶, 则可改变其他毒物的代谢。很多毒物可有多种可能的代谢途径, 产生多种生物学活性的不同的代谢产物, 这些途径之间的平衡和竞争对于毒物的毒作用有重要的意义。当代谢酶被诱导和激活, 对在体内是经代谢活化的毒物, 则表现出毒性增强; 对经代谢转化减毒的毒物, 则表现为毒性降低。当代谢酶被抑制和阻遏, 则得到相反的结果。

### (一) 毒物代谢酶的诱导和阻遏

有些毒物可使某些毒物代谢酶系合成增加并伴活力增强,此种现象称为酶的诱导(induction)。凡具有诱导效应的毒物称为诱导剂(inducer)。除 P-450 酶系外,其他一些生物转化酶也可被诱导,见表 3-5。

诱导剂分为双功能和单功能诱导剂。双功能诱导剂包括  $\beta$ -萘黄酮、苯并(a)芘、三甲基胆蒽和 TCDD,它们既能诱导 I 相酶(细胞色素 P-450 酶系如 CYP 1A1),又诱导 II 相酶如 GSH-S-转移酶和 UDP-葡萄糖醛酸转移酶。这些化合物的信号通过两种不同机制转导,一是涉及 ARE(抗氧化效应因素),也称为 EpRE 亲电子效应因素;另一是首先与 Ah 受体结合,活化外源化学物效应因子(XRE),XRE 是 DNA 的短序列,常常位于基因 5' 区域的上游,其可结合控制基因表达的转录因子。有些酶,如 CYP 1A1 主要由 XRE 调控,而其他的,如谷胱甘肽 S-转移酶,主要由 ARE 调控。有些酶,如 DT-黄递酶可由两种机制调控。单功能诱导剂不与 Ah 受体结合,而是通过 ARE 来诱导 II 相酶的合成。

表 3-5 P-450 酶系以外的其他生物转化酶的诱导剂

| 生物转化酶           | 诱导剂                   |
|-----------------|-----------------------|
| 葡糖醛酸基转移酶        | PB, 3MC, TCDD, PCB    |
| NADPH-P-450 还原酶 | PB, PCB, 异黄樟素         |
| 环氧化物水化酶         | PB, 3MC, PCB, 异黄樟素    |
| 谷胱甘肽转移酶         | PB, 3MC, TCDD         |
| 细胞色素 b5         | 2-乙酰氨基芘, 二丁基羟基甲苯(BHT) |
| 肉碱乙酰转移酶         | 氟贝特                   |
| 过氧化氢酶           | 氟贝特, 邻苯二甲酸盐           |

毒物代谢酶的阻遏(enzyme repression)较酶诱导作用少见。有时对某些毒物代谢酶的诱导的同时也阻遏了另一些毒物代谢酶的阻遏。如某些过氧化物酶体增生剂能显著地降低几种 GST 和 CYP 同工酶的表达,同时诱导了 CYP4A1、UGT1 和 sHE。

### (二) 毒物代谢酶的抑制和激活

许多毒物对代谢酶产生抑制作用(inhibition)。抑制作用可以分为几种类型。

1. 抑制物与酶的活性中心发生可逆或不可逆性结合 如  $\beta$ -二乙基氨基苯丙基乙酯(SKF-525A)和胡椒基丁醚与 P-450 的结合而抑制其活性。对氧磷能抑制羧酸酯酶,以致马拉硫磷水解速度减慢,加强马拉硫磷的生物学作用,表现为对昆虫杀虫效果增强,对人畜毒性增高。

2. 两种不同的毒物在同一个酶的活性中心发生竞争性抑制 如 1,2-亚乙基二醇和甲醇中毒,此两种毒物经醇脱氢酶催化代谢而导致毒性,临床上给予乙醇治疗,因乙醇与此酶有更大的亲和力,故可降低 1,2-亚乙基二醇和甲醇的代谢和毒性。

3. 破坏酶 如四氯化碳、氯乙烯、胍等的代谢产物可与 P-450 共价结合,破坏其结构和功能。

4. 减少酶的合成 如氯化钴抑制涉及血红素合成的  $\delta$ -氨基酮戊酸合成酶,并增加血红素氧

化酶活性,故可抑制 P-450 酶系活性。

5. 变构作用 如一氧化碳可与 P-450 结合,引起变构作用,阻碍其与氧结合。

6. 缺乏辅因子 如马来酸二乙酯可耗尽 GSH,抑制其他毒物经 GSH 结合代谢。

毒物代谢酶的激活(activation)是指外源化学物直接作用于酶蛋白,使其活性增加。例子较少,如异喹啉和克霉唑在体外可使 mEH 对苯乙烯氧化物的活性增加 5 倍。

(周宗灿)

# 4

## 第四章

# 毒性机制

中毒是有毒化学物与机体交互作用,导致机体的功能或结构产生不良改变的结果,这些改变除与机体本身的属性有关外,主要取决于化学物暴露的程度与途径。定性和定量地描述这些有害或有毒效应的特征,深入研究引起毒性表现的机制,即毒物是如何进入机体的、如何与靶分子交互作用、机体又是如何应对这种侵害的,对于评价特定化学物的潜在危险性具有重要价值。

由于有毒化学物数量庞大,可能被损害的生物学过程复杂,因而中毒的表现多种多样,可能导致毒性的各种不同机制相应地存在着。有的毒物当转运到靶部位时即与靶分子反应,所引起的细胞功能失调本身就是毒性。有时一种外源化学物并不是与特定的靶分子反应,而是对生物学环境(微环境)产生有害的影响,引起分子、细胞器、细胞或器官等不同水平的功能失调,导致毒效应。

更复杂的毒性反应涉及更多过程:首先,毒物转运到一个或多个靶部位,此后经毒物与内源靶分子交互作用,触发细胞功能和结构的紊乱,随后启动分子、细胞和(或)组织水平的修复机制。当毒物引起的紊乱超过修复能力或修复功能低下时,毒性就会出现,如组织坏死、癌症和纤维化。

## 第一节 外源化学物的增毒与终毒物的形成

毒效应的强度主要取决于终毒物在其作用位点的浓度及持续时间。终毒物是指与内源靶分子(如受体、酶、DNA、微丝蛋白、脂质)反应或严重地改变生物学(微)环境、启动结构和(或)功能改变而表现出毒性的物质(表4-1)。终毒物可为机体所暴露的原化学物(母化合物),有些外源化学物(如强酸与强碱、烟碱、氨基糖苷、环氧乙烷、甲基异氰酸盐、重金属离子、HCN、CO)具有直接毒性作用;而另外一些毒物的毒性主要是由于其代谢物引起,生物转化为有害产物的过程称为增毒(toxication)或代谢活化(metabolic activation)。对于某些外源化学物,增毒过程使生物学微环境和它们的化学结构发生了不利于机体的变化,例如,由乙二醇形成的草酸可引起酸中毒和低血钙,并可因草酸钙沉淀而导致肾小管阻塞。有时化学物通过生物转化而获得更有效地与特定受体或酶相互作用的结构特征和反应性。例如,有机磷杀虫剂对硫磷转化为一种高活性的胆碱酯酶抑制剂对氧磷;杀鼠药氟乙酸盐在柠檬酸循环中转变为一种抑制顺乌头酸酶的假底物氟

柠檬酸；然而，最为多见的情况是增毒使外源化学物(有时也包括机体的其他分子)如氧和氧化氮(NO)转变为：亲电物(electrophiles)、自由基(free radicals)、亲核物(nucleophiles)、氧化还原性反应物(redox-active reductants)。

靶分子上终毒物的浓度取决于毒物在靶位点浓度增加或消减过程的相对效力。毒物的吸收、作用部位的分布、重吸收以及增毒(代谢活化)过程促进终毒物在其靶部位的蓄积。而毒物进入大循环前的排除、从作用部位分布到其他部位、排泄与解毒,则与上述过程相反,减少终毒物在靶分子的蓄积(表4-1)。

表 4-1 终毒物的来源及其类型

|                                           |                                               |
|-------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| 原外源化合物作为终毒物                               |                                               |
| 铅离子                                       |                                               |
| 河豚毒素                                      |                                               |
| TCDD                                      |                                               |
| 异氰酸甲酯                                     |                                               |
| HCN                                       |                                               |
| CO                                        |                                               |
| 外源化合物的代谢物作为终毒物                            |                                               |
| 苦杏仁苷                                      | → HCN                                         |
| 砷酸盐                                       | → 亚砷酸盐                                        |
| 氟乙酰胺                                      | → 氟柠檬酸                                        |
| 1,2-亚乙基二醇                                 | → 草酸,乙二酸                                      |
| 己烷                                        | → 2,5-己二酮                                     |
| 乙酰氨基酚                                     | → N-乙酰-p-苯醌亚胺                                 |
| CCl <sub>4</sub>                          | → CCl <sub>3</sub> OO·                        |
| 苯并(a)芘(BP)                                | → BP-7,8-二醇-9,10-环氧化物                         |
| 苯并(a)芘(BP)                                | → BP 自由基阳离子                                   |
| 活性氧或活性氮作为终毒物                              |                                               |
| 过氧化氢                                      | } → 羟基自由基(HO·)<br>→ 过氧亚硝基(ONOO <sup>-</sup> ) |
| 敌草快,阿霉素,呋喃妥英                              |                                               |
| Cr(V), Fe(II), Mn(II), Ni(II)             |                                               |
| 百草枯 → O <sub>2</sub> <sup>-</sup> · + NO· |                                               |
| 内源化合物作为终毒物                                |                                               |
| 磺胺类药物 → 清蛋白结合的胆红素                         | → 胆红素                                         |
| CCl <sub>3</sub> OO· → 不饱和脂肪酸             | → 脂质过氧自由基                                     |
| CCl <sub>3</sub> OO· → 不饱和脂肪酸             | → 脂质烷氧自由基                                     |
| CCl <sub>3</sub> OO· → 不饱和脂肪酸             | → 4-羟基壬醛                                      |
| HO· → 蛋白质                                 | → 蛋白羰基                                        |

## 一、亲电物的形成

\*\*\*\*

亲电物是指含有一个缺电子原子(带部分或全部正电荷)的分子,这使它能通过与亲核物中

的富电子原子共享电子对而发生反应。亲电物的形成涉及许多化学物的增毒作用(表 4-2), 这样的反应产物常常通过插入一个氧原子而产生, 该氧原子从其附着的原子中抽取一个电子, 使其具有亲电性。醛、酮、环氧化物、芳烃氧化物、亚砷类、亚硝基化合物、磷酸盐和酰基卤类形成就是如此; 另一种情况是共轭双键形成, 它通过氧的去电子作用而被极化, 使得双键碳之一发生电子缺失(即成为亲电子的), 这种情况发生于 $\alpha$ 、 $\beta$ -不饱和醛和酮以及醌和醌亚胺(quinoneimines)形成时, 许多这些亲电代谢物的形成是由 P-450 催化的; 而阳离子亲电物的形成是键异裂的结果, 例如, 甲基替代的芳香族化合物如 7,12-二甲基苯蒽以及芳香胺(酰胺)如 2-乙酰氨基苄分别被羟化为苄基醇和 N-羟基苄胺(酰胺)。这些物质一般为磺基转移酶所酯化。这些酯类的 C-O 或 N-O 键的异裂分别导致硫氰酸盐阴离子以及苄基碳鎓离子和芳基氮鎓离子的共同形成。由无机化学物形成亲电毒物的实例有: 金属汞氧化为  $Hg^{2+}$ 、 $CrO_4^{2-}$  还原为  $Cr^{3+}$  以及  $AsO_4^{3-}$  还原为  $AsO_3^{2-}/As^{3+}$ 。

表 4-2 亲电子代谢物产生的毒性

| 亲电子代谢物                        | 原毒物                 | 催化增毒酶        | 毒性作用    |
|-------------------------------|---------------------|--------------|---------|
| 非离子亲电物                        |                     |              |         |
| 醛, 酮                          |                     |              |         |
| 乙醛                            | 乙醇                  | ADH          | 肝纤维化(?) |
| 佐美酸葡萄糖醛酸苷                     | 佐美酸                 | GT→异构化作用     | 免疫反应(?) |
| 2,5-己二酮                       | 己烷                  | P-450        | 轴索疾病    |
| $\alpha$ 、 $\beta$ -不饱和醛, 酮   |                     |              |         |
| 丙烯醛                           | 丙烯醇                 | ADH          | 肝脏坏死    |
| 丙烯醛                           | 丙烯胺                 | MAO          | 血管损伤    |
| 粘糠醛                           | 苯                   | 多个酶          | 骨髓损伤    |
| 4-羟基壬醛                        | 脂肪酸                 | 脂质过氧化作用      | 细胞损伤(?) |
| 苯醌, 苯醌亚胺                      |                     |              |         |
| DES-4,4'-苯醌                   | DES                 | 过氧化物酶        | 致癌作用(?) |
| N-乙酰基-p-苯醌亚胺                  | 对乙酰氨基酚              | P-450, 过氧化物酶 | 肝脏坏死    |
| 环氧化物, 芳烃氧化物                   |                     |              |         |
| 黄曲霉素 B <sub>1</sub> -8,9-环氧化物 | 黄曲霉素 B <sub>1</sub> | P-450        | 致癌作用    |
| 2-氯环氧乙烷                       | 氯化乙烯                | P-450        | 致癌作用    |
| 溴苯 3,4-环氧化物                   | 溴苯                  | P-450        | 肝脏坏死    |
| BP-7,8-二醇-9,10-环氧化物           | 苯并(a)芘              | P-450        | 致癌作用    |
| 亚砷                            |                     |              |         |
| 硫代乙酰胺 S 氧化物                   | 硫代乙酰胺               | FMO          | 肝脏坏死    |
| 亚硝基化合物                        |                     |              |         |
| 亚硝基~磺胺甲基异噁唑                   | 磺胺甲基异噁唑             | P-450        | 免疫反应    |
| 磷酸盐                           |                     |              |         |
| 对氧磷                           | 对硫磷                 | P-450        | ChE 抑制  |
| 酰卤化物                          |                     |              |         |
| 光气                            | 氯仿                  | P-450        | 肝脏坏死    |

续表

| 亲电子代谢物                                                                                                  | 原毒物                                                           | 催化增毒酶                                                        | 毒性作用                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|----------------------------------------------|
| 三氟乙酰基氯化物<br>硫羰乙酰卤化物                                                                                     | 氟烷                                                            | P-450                                                        | 免疫性肝炎                                        |
| 2,3,4,4-四氯硫丁基-3-烯醇酸氯化物                                                                                  | HCBd                                                          | GST→GGT→DP→C<br>βCL                                          | 肾小管坏死                                        |
| 硫乙烯酮<br>氯-1,2,2-三氯乙烯<br>-硫乙烯酮                                                                           | HCBd                                                          | GST→GGT→DP→<br>CCβL                                          | 肾小管坏死                                        |
| 阳离子亲电子物<br>碳镱离子<br>苯甲基碳镱阳离子<br>碳镱阳离子<br>氮镱离子<br>芳基氮镱离子<br>硫离子<br>表硫离子<br>金属离子<br>二价汞离子<br>二水合二氨基铂离子(II) | 7,12-DMBA<br>DENA<br>AAF, DMAB, HAPP<br>1,2-二溴乙烷<br>汞元素<br>顺铂 | P-450→ST<br>P-450→s. r.<br>P-450→ST<br>GST<br>过氧化物酶<br>s. r. | 致癌作用<br>致癌作用<br>致癌作用<br>致癌作用<br>脑损伤<br>肾小管坏死 |

注:AAF:2-乙酰氨基芴,ADH:醇脱氢酶,CCβL:半胱氨酸结合β裂解酶;ChE:乙酰胆碱酯酶;DENA:二乙基亚硝胺;DMAB:N,N-二甲基-4-氨基偶氮苯;7,12-DMBA:7,12-二甲基苯并蒽;DES:二乙基己烯雌酚;DP:二肽酶;FMO:黄素单加氧酶;GT:尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶;GGT:γ谷氨酰基转移酶;GST:谷胱甘肽硫转移酶;HAPP:杂环芳香胺热裂解产物;HCBd:六氯丁二烯;P-450:细胞色素P-450;ST:磺基转移酶;s. r.:自发重排

## 二、自由基形成

自由基(free radicals)是独立游离存在的带有不成对电子的分子、原子或离子。自由基主要是由于化合物的共价键发生均裂而产生。其共同特点是:具有顺磁性、其化学性质十分活泼、反应性极高,因而半减期极短,一般仅能以 $\mu\text{s}$ 计,作用半径短。近30年来,自由基在生物学和医学领域中的研究取得了一些重要的进展和突破,自由基在肿瘤、辐射损伤、老化和某些疾病(白内障、糖尿病、精神病、肺气肿、炎症和缺血性疾病)发生发展中的作用得到了进一步的证实。自由基在体内虽然不断产生,但也不断为机体的防御体系(自由基清除体系)所清除。在生理条件下,处于平衡状态下的自由基浓度很低,不仅不会对机体造成损伤,而且还具有重要的生理功能。但是,当环境中的物理因素或外源化学物质直接或间接诱导产生的大量自由基超过了机体的清除能力,或内源性自由基产生和清除失去平衡,就会使机体处于氧化应激(oxidative stress),进而造成机体的损害。

### (一)自由基的类型

自由基种类繁多,在生物医学及相关领域,最常见且研究最深入的是氧自由基。与生物体有关的自由基列表4-3。其中最主要的是氧中心自由基,这类自由基持续不断地在机体内产生。

活性氧(reactive oxygen species, ROS)这个术语实际上是一个集合名词,不仅包括氧中心自由基如  $O_2^{\cdot -}$  和  $\cdot OH$ , 而且也包括某些氧的非自由基衍生物,如  $H_2O_2$ 、单线态氧  $\Delta g$  和次氯酸(HOCl),甚至还包括过氧化物、氢过氧化物和内源性脂质及外源化学物的环氧代谢物,因为它们都含有化学性质活泼的含氧功能基团。

分子氧是一个双自由基分子,因为在它的两个  $\pi^*$  抗成键轨道中,每个轨道含有一个不配对电子。然而,由于这两个电子的自旋方向是平行的,因此,分子氧的反应性很低。氧的活性可以通过使其两个外层电子中的一个电子改变自旋方向或依次单价还原为自由基而增加(图 4-1)。

表 4-3 与生物体系有关的自由基类型

| 自由基类型  | 实例                                                                                                  | 评价                                                                                                                                                                                                                                       |
|--------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 以氢为中心  | H 原子(一个质子,一个电子)                                                                                     | 从含碳化合物抽取 H 原子常启动自由基链式反应,例如 $\cdot OH$ 能通过从膜 脂肪酸侧链抽出 H 而启动脂质过氧化:<br>$LH + \cdot OH \rightarrow L\cdot + H_2O$                                                                                                                             |
| 以碳为中心  | 三氯甲基自由基 ( $\cdot CCl_3$ )                                                                           | 通过 H 抽取反应形成的膜脂质中的碳中心自由基 ( $L\cdot$ ), 为 $CCl_4$ 毒性的主要动因。                                                                                                                                                                                 |
| 以硫为中心  | 烷硫自由基 $R-S\cdot$                                                                                    | 硫化化合物氧化时产生的活性自由基(由过渡金属促发)                                                                                                                                                                                                                |
| 以氮为中心  | 苯基二胍自由基 $C_6H_5N=N\cdot$                                                                            | 参与苯胍的红细胞毒性                                                                                                                                                                                                                               |
| 以氧为中心  | 无机:超氧阴离子( $O_2^{\cdot -}$ )<br>羟基自由基( $\cdot OH$ )<br>有机:烷氧自由( $LO\cdot$ )<br>烷过氧自由基( $LO_2\cdot$ ) | 氧化应激的主要动因: $\cdot OH$ 十分活跃, $O_2^{\cdot -}$ 较弱<br>由 $L\cdot$ 与 $O_2$ 反应产生 ( $LO_2\cdot$ ), 或由金属依赖的脂质过氧化产物破坏产生 $LO\cdot$ 和 $LO_2\cdot$ , 任何碳中心自由基通常迅速与 $O_2$ 反应产生过氧自由基,如:<br>$\cdot CCl_3 + O_2 \rightarrow CCl_3O_2\cdot$<br>(三氯甲基过氧自由基) |
| 过渡金属离子 | $Cu^+ / Cu^{2+}$ , $Fe^{2+} / Fe^{3+}$<br>$Ti^{3+} / Ti^{4+}$                                       | 接受和供给电子的能力使它们成为自由基反应的重要催化剂                                                                                                                                                                                                               |

注: $O_2$  本身是自由基,双原子氧分子有 2 个不同配对电子,所以氧经单电子还原为  $O_2^{\cdot -}$  (一个不配对电子)和双电子还原为  $H_2O_2$  (没有不配对电子),故  $H_2O_2$  不是合格的自由基,虽然它能形成  $\cdot OH$  而成为重要的氧化剂。

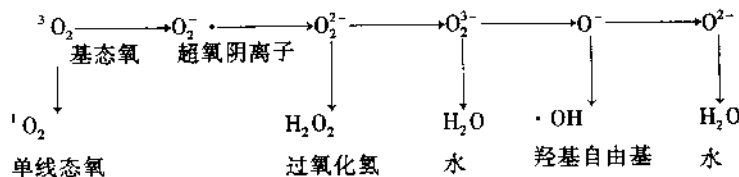


图 4-1 氧分子依次单电子还原流程图

下面分别介绍几种主要的活性氧。

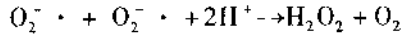
1. 单线态氧 单线态氧具有较高的反应性。单线态氧分为两种,一种是  $\Delta$  单线态氧 ( ${}^1\Delta g O_2$ ), 另一种是  $\Sigma$  单线态氧 ( ${}^1\Sigma g O_2$ )。前者在生物学上更为重要,因为它的寿命很长,但不含不配对电子,不属于自由基。而  $\Sigma$  单线态氧具有占据不同轨道的反方向平行自旋的电子,它具



有很高的反应性,但其半减期很短,因为在其形成后立即就衰变为  $\Delta$  单线态氧状态。

2. 超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot -}$ )  $O_2^{\cdot -}$  的化学特性主要取决于其所在的溶液环境,在水溶液中, $O_2^{\cdot -}$  是一种弱氧化剂,能氧化某些分子如维生素 C 和巯基。然而, $O_2^{\cdot -}$  在更多情况下是一种很强的还原剂,能还原几种含铁复合物如细胞色素 C 和  $Fe^{2+}$ -EDTA。 $O_2^{\cdot -}$  的重要性很大程度上是由于  $O_2^{\cdot -}$  是两种增毒途径(图 4-2)的启动物质:一是导致过氧化氢的形成,然后形成羟基自由基( $\cdot OH$ ),二是产生过氧亚硝基[peroxynitrite( $ONOO^-$ )],最终形成二氧化氮( $\cdot NO_2$ )和碳酸盐阴离子自由基( $CO_3^{\cdot -}$ )。

在水溶液中  $O_2^{\cdot -}$  通过歧化反应能迅速消失,并产生  $H_2O_2$  和  $O_2$ 。



铜-锌超氧化物歧化酶(SOD)可大大加速上述反应。 $O_2^{\cdot -}$  的质子化所形成的氢过氧自由基  $HO_2^{\cdot}$  与  $O_2^{\cdot -}$  本身相比,是更强有力的氧化剂和还原剂,但在 pH7.4 时,几乎没有  $HO_2^{\cdot}$  存在。由上述可见,不能单纯将活性氧看作氧化剂,实际上, $O_2^{\cdot -}$  的还原性比氧化性更强些。

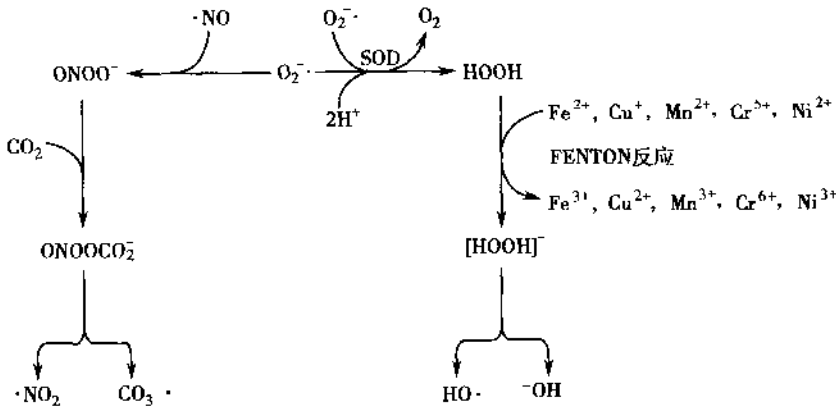
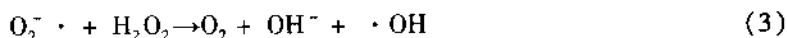
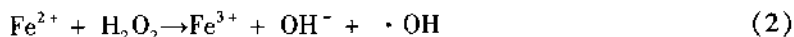


图 4-2 超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot -}$ )通过非自由基中间产物( $ONOO^-$ 和  $HO_2^{\cdot}$ )生成自由基产物( $\cdot NO_2, CO_3^{\cdot -}$ 和  $HO\cdot$ )增毒的两种途径

3. 过氧化氢( $H_2O_2$ ) 由于歧化反应的结果,任何产生  $O_2^{\cdot -}$  的系统也将产生  $H_2O_2$ 。许多酶如尿酸氧化酶、葡萄糖氧化酶和 D-氨基酸氧化酶都能直接通过转移 2 个电子给氧而产生  $H_2O_2$ 。 $H_2O_2$  是一种弱氧化剂和弱还原剂,在缺乏过渡金属离子时是相对稳定的。它能迅速与水混合,在机体迅速通过细胞膜扩散并被处理为水分子。 $H_2O_2$  的氧化还原特性及其在过渡金属存在时形成高活性自由基的能力使机体在长期的进化过程中形成对抗它的防御体系,包括过氧化氢酶(catalase)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase)以及某些其他的过氧化物酶。

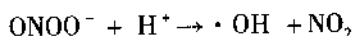
4. 羟基自由基( $\cdot OH$ )  $\cdot OH$  是分子氧三电子还原的产物。这是一种化学活性极强的自由基,能与任何生物分子起反应。 $\cdot OH$  的半减期很短(不到  $1\mu s$ ),作用直径也很短(3nm)。与  $\cdot OH$  相比, $O_2^{\cdot -}$  和  $H_2O_2$  的反应性弱得多,但它们有较长的寿命,使得它们能在远离自由基产生的部位与分子反应。 $\cdot OH$  的主要来源是金属催化的 Haber-Weiss 反应或称 Fenton 型 Haber-Weiss 反应。单纯 Haber-Weiss 反应速度很慢,但是在  $Fe^{3+}$ -络合物存在下的 Fenton 型 Haber-

Weiss 反应却很快,其反应式如下:



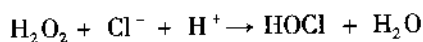
5. 臭氧 臭氧( $\text{O}_3$ )对防止地球的太阳辐射提供了一个重要的同温保护层(地球的“抗氧化剂”)。然而,在地面,臭氧是一种有毒的氧化污染物。在污染的城市空气中存在臭氧,同时也由科学仪器和某些光复印机中使用的强光源产生。臭氧可损害肺,能迅速氧化蛋白质、DNA 和脂质。

6. 氮的氧化物 一氧化氮(NO)和二氧化氮( $\text{NO}_2$ )含奇数电子,因而也是自由基,而氧化亚氮则不是自由基。机体的血管内皮细胞和其他细胞从 L-精氨酸合成少量这种气体。目前,NO 难以与血管舒张内皮衍生的松弛因子相区别,这种松弛因子与另一种自由基  $\text{O}_2^- \cdot$  反应产生活性中间产物过氧亚硝基( $\text{ONOO}^-$ ), $\text{ONOO}^-$  是一种强氧化剂,能损害许多生物分子,并能在酸性 pH 下降解,释放出少量羟基自由基,这种羟基自由基的产生是不需要金属催化的。

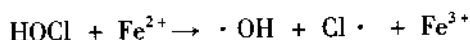


此外, $\text{ONOO}^-$  很容易与普遍存在的  $\text{CO}_2$  反应产生亚硝基过氧碳酸盐( $\text{ONOOCO}^-$ ),它可自发地均裂为两种自由基:氧化剂与硝化剂二氧化氮( $\cdot\text{NO}_2$ )和氧化剂碳酸阴离子自由基( $\text{CO}_3^- \cdot$ )。因此, $\text{ONOO}^-$  及其以后的自由基形成代表着  $\text{O}_2^- \cdot$  与 NO 的增毒机制。由于 NO 是一氧化氮合酶(NOS)的产物,因此,这种机制在组成型表达 NOS 的细胞(如神经元与内皮细胞)内与细胞周围均有密切关联,同时,在对细胞因子应答时表达可诱导型 NOS 的细胞里或细胞周围也有密切关系。

7. 次氯酸 次氯酸( $\text{HOCl}$ )是一种强氧化剂,在体内由活化的中性粒细胞形成。吞噬细胞胞浆中的含血红素的酶——髓过氧化物酶催化  $\text{H}_2\text{O}_2$  和氯离子形成  $\text{HOCl}$ 。



最近有人提出, $\text{HOCl}$  可通过不依赖铁的反应和依赖铁的反应而形成羟基自由基。



## (二) 自由基的来源

1. 生物系统产生的自由基 自由基的存在对细胞有有利的一面。事实上,自由基持续不断地在机体内产生,其中大多数是执行某些生物学功能所必需的。然而,当自由基过度产生或机体的抗氧化防御体系因某些原因而削弱时,则细胞损害就可能出现。由生物体系的细胞产生的自由基主要有以下几个途径:

(1) 胞浆中的小分子:细胞浆中的儿茶酚胺类、黄素类、四氢蝶呤类、醌类和巯基类等可溶性

小分子的自氧化过程可促使  $O_2$  的还原而产生氧自由基。

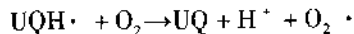
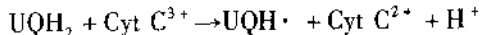
(2) 胞浆蛋白质:某些胞浆酶如黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase)可通过酶促循环而直接还原分子氧自由基及  $H_2O_2$ ,可能还有羟基自由基。其他的氧化酶如多巴胺- $\beta$ -羟化酶(dopamine- $\beta$ -hydroxylase)、D-氨基酸氧化酶(D-amino acid oxidase)、尿酸氧化酶(urate oxidase)和脂肪酰 CoA 氧化酶(fatty acyl CoA oxidase)也能生成 ROS。

(3) 膜酶活性:在白三烯、凝血噁烷和前列腺素合成过程中,脂肪氧合酶(lipoxygenase)和环加氧酶(cyclooxygenase)催化的反应能产生氧自由基,这些自由基又能使环加氧酶失活,这可能是前列腺素合成的反馈调节机制。环加氧酶也能代谢某些外源化学物为毒性更高的代谢物,这些代谢物可与氧反应产生非常高活性的活性氧。

(4) 吞噬细胞的吞噬过程及“呼吸暴发”(respiratory burst):这一途径是生物体中  $O_2^- \cdot$  的主要来源之一。当吞噬细胞被活化并准备吞噬时,就会出现氧耗的增高。1973年, Babior 等首先证实了活化的吞噬细胞的这种“呼吸暴发”的过程,使氧分子还原为超氧自由基。随后的研究工作证实了这一反应是受还原型烟酰胺-腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)氧化酶催化的。

(5) 过氧化酶体:刺激过氧化酶体生物合成的化学物能诱导  $H_2O_2$  的过量生成。过氧化酶体含有高浓度的氧化酶,如乙醇酸氧化酶(glycollate oxidase)或 D-氨基酸氧化酶(D-amino acid oxidase),能催化分子氧二价还原形成  $H_2O_2$ 。

(6) 线粒体电子传递过程能生成 ROS:利用分离的亚线粒体组分推算,用于产生 ROS 的氧耗达线粒体总氧耗的 2%,但体外推算,可能估计过高。尽管如此,线粒体在整体或离体确实都产生 ROS,主要是  $O_2^- \cdot$ 。线粒体产生 ROS 的过程可能涉及 NADH-辅酶 Q(复合物 I)、琥珀酸-辅酶 Q(复合物 II)和辅酶  $QH_2$ -细胞色素 C 还原酶(复合物 III),一种非血红素铁-硫蛋白似乎也参与在各部位转移电子。复合物 I、II 和 III 分别含有 NADH-辅酶 Q 还原酶、琥珀酸脱氢酶与辅酶 Q-细胞色素 C 还原酶的催化功能。辅酶 Q(泛醌  $UQH_2$ )可转变为泛半醌( $UQH \cdot$ ),如氧化型细胞色素 C( $CytC^{3+}$ )可使  $UQH_2$  氧化为  $UQH \cdot$  自由基,然后自氧化为 UQ,同时产生  $O_2^- \cdot$ 。



一般认为,复合物 I 和 III 都含 UQ,是产生  $O_2^- \cdot$  的主要部位,而将电子传递至 UQ 的复合物 II 却是次要的。正常情况,由线粒体电子传递系统产生的少量 ROS 可迅速被抗氧化防御体系如 SOD 和谷胱甘肽过氧化物酶清除,因而不会积累到足以损伤机体的浓度。但是在线粒体结构和功能受到影响时,ROS 产生可能增多,如果其增多量超过生物体的内在防御能力,就会发生活性氧对机体的损伤。

(7) 微粒体电子传递系统:内质网膜系统含有混合功能氧化酶家族,该酶在氧化底物时需要由 NADPH 供给电子以产生部分还原的氧中间体,在电子传递过程中可发生渗漏,导致周围组织结构的损害。当正常过程受到损害或外源化学物存在时可大大提高这一来源的 ROS。细胞色素还原酶参与细胞色素 P-450 和  $b_5$  的氧化还原反应,当它们催化某些外源化学物还原然后发生自氧化时,也能产生  $O_2^- \cdot$  和  $H_2O_2$ 。

2. 外源化学物的氧化还原代谢 许多外源化学物可通过各种不同途径形成自由基,但其中

最主要的途径是通过氧化还原循环(redox cycling)。如百草枯(paraquat)和呋喃妥英(nitrofurantion)能从还原酶接受一个电子而形成自由基(图4-3)。这些自由基典型地将额外电子转移到分子氧,形成超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot -}$ )并再生为容易获得新电子的原外源化学物。单电子还原通常由黄素蛋白如NADPH-细胞色素P-450还原酶催化。其他一些还原酶也可能参与这一反应。毒性与“氧化还原循环”产生的自由基有关的化学物有:

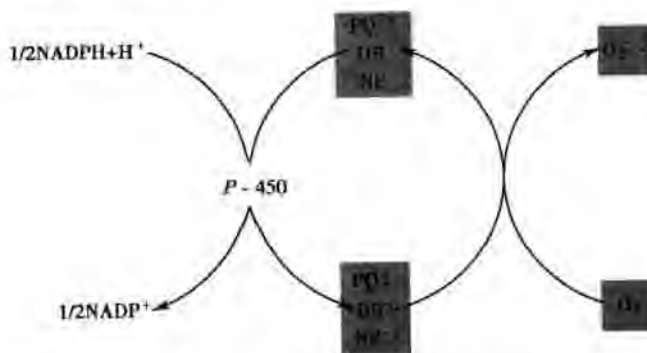


图4-3 外源化学物的氧化还原循环

百草枯( $PQ^{\cdot +}$ )、阿霉素(DR)和呋喃妥英(NF)产生的超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot -}$ )。  $O_2^{\cdot -}$  的形成不是这些外源物质毒作用过程的最终阶段,因为  $O_2^{\cdot -}$  能产生反应性更强的羟基自由基。

(1) 醌类:某些带有活性基团或杂环的对一苯醌类、取代蒽醌类和其他复杂的醌类的毒性已在临床用作为抗癌药物。如丝裂霉素、链黑霉素、阿霉素、博莱霉素、道诺霉素和黑孢霉素等均能产生ROS。

(2) 硝基化合物:苯的硝基化合物如硝基苯、二硝基苯、三硝基甲苯以及硝基杂环化合物包括呋喃妥因、呋喃西啉、氯霉素、米索硝唑(misonidazole)和甲硝唑(metronidazole)等均能被黄素蛋白、NADPH-细胞色素P-450还原酶或其他细胞内还原酶还原活化,引起血液毒性和肝毒性。

(3) 双吡啶化合物:百草枯(paraquat)和杀草快(diquat)引起肺损害。

(4) 卤代烷烃: $CCl_4$ 、卤烷( $CF_3CHClBr$ )引起肝损害。

(5) 乙醇:长期摄入过量乙醇与脂肪肝硬化有密切关系。

(6) 肼类衍生物:肼、苯肼和肼类药物如肼屈嗪(hydrodazine)、异烟肼(isoniazid)异烟酰异丙肼(iproniazid)等引起血液毒性。

### 三、亲核物的形成

亲核物的形成是毒物活化作用较少见的一种机制。例如:苦杏仁经肠道细菌 $\beta$ -糖苷酶催化形成氰化物;丙烯腈环氧化和随后谷胱甘肽结合后形成氰化物;以及硝普钠(sodium nitroprusside)经巯基诱导降解后形成氰化物;CO是二卤甲烷经过氧化脱卤的有毒代谢产物;一种强亲核物和还原剂硒化氢是由亚硒酸盐与谷胱甘肽或其他巯基反应形成的。

## 四、氧化还原活性还原剂的形成

除了上述那些机制外,还存在着一种特殊的产生氧化还原活性还原剂的机制。例如:硝酸盐通过肠道细菌还原、亚硝酸酯或硝酸酯与谷胱甘肽反应而形成产生高铁血红蛋白的亚硝酸盐;氨苯砜(dapsone)羟胺和5-羟伯氨喹啉(分别为氨苯砜和伯氨喹啉的羟化代谢物)通过协同氧化作用而引起高铁血红蛋白的形成;还原剂如维生素C以及还原酶如NADPH依赖的黄素酶使 $\text{Cr}^{6+}$ 还原为 $\text{Cr}^{5+}$ 。氧化还原循环形成的外源性自由基以及 $\text{O}_2^- \cdot$ 和 $\cdot\text{NO}$ 能还原结合于铁蛋白的 $\text{Fe}^{3+}$ ,随后以 $\text{Fe}^{2+}$ 形式将其释放,由此形成的 $\text{Cr}^{5+}$ 和 $\text{Fe}^{2+}$ 催化 $\cdot\text{HO}$ 形成。

总之,大多数反应性代谢物是缺电子的分子或分子片段,如亲电物和中性或阳离子自由基。虽然某些亲核物是具有反应性的(例如HCN、CO),但许多亲核物是通过转变为亲电物或自由基而活化。同样,具有多余电子的自由基在 $\text{HOOH}$ 形成及其后发生均裂的过程中产生中性 $\cdot\text{OH}$ 而导致损害。

## 五、解 毒

排除终毒物或阻止其形成的生物转化过程称为解毒。在某些情况下,解毒可与增毒过程竞争某一化学物。解毒可以几种途径进行,取决于有毒物质的化学特征。

1. 无功能基团毒物的解毒 一般而言,无功能基团的化学物如苯、甲苯以两相方式解毒。首先,功能基团如羟基或羰基被引入到分子中,最为常见的是通过细胞色素P-450酶,随后一种内源性的酸如葡萄糖醛酸、硫酸或氨基酸通过转移酶加入功能基团中,最终的产物为失活的、高度亲水的、易于排泄的有机酸,但也有某些例外。

2. 亲核物的解毒 亲核物一般通过在亲核功能基团上的结合反应来解毒。羟化的化合物通过硫酸化作用、葡萄糖醛酸化作用、偶尔也通过甲基化作用来结合。而巯基化合物被甲基化或葡萄糖醛酸化;胺类和胍类则被乙酰基化。这些反应防止由过氧化物酶催化的亲核物转变为自由基,以及酚、氨基酚、儿茶酚和氢醌生物转化为亲电性的醌和醌亚胺。排除巯基化合物和胍类的另一个途径是通过含黄素酶的单加氧酶类的氧化作用。某些醇类如乙醇经醇及醛脱氢酶氧化为羧酸而解毒。一种特殊的解毒机制是氰化物经硫氰酸酶生物转化而形成硫氰酸。

3. 亲电物的解毒 亲电性毒物的解毒一般是与巯基亲核物谷胱甘肽结合而解毒。这种反应可自发地发生,也可由谷胱甘肽-S-转移酶催化。金属离子如 $\text{Ag}^+$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Hg}^{2+}$ 和 $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ 易于与谷胱甘肽反应并通过谷胱甘肽来解毒。亲电化学物解毒的特殊机制包括:环氧化物水化酶催化的环氧化物与芳烃氧化物分别生物转化为二醇类和二氢二醇类;羧基酯酶催化的有机磷酸酯杀虫剂的水解。另外一些机制包括:醌经黄递酶(DT)双电子还原为氢醌; $\alpha$ 、 $\beta$ -不饱和醛由醇脱氢酶还原为醇、或由醛脱氢酶氧化为酸;具有巯基反应活性的金属离子由金属硫蛋白形成复合物;氧化还原活性的二价铁由铁蛋白形成复合物。亲电物与蛋白质的共价结合也可看作解毒过程,倘若这种蛋白质不具有关键性的功能,同时不会成为一种新抗原或其他有害的方式,例如,羟基酯酶不仅是通过水解使有机磷失活,而且还通过共价结合机制。

4. 自由基的解毒 由于  $O_2^- \cdot$  可转变为反应活性更高的化合物(图 4-4), 故其排除是一种重要的解毒机制。这一转变是通过超氧化物歧化酶(SOD)——定位于胞浆(Cu、Zn-SOD)和线粒体(Mn-SOD)的高效力酶来实施的。这些酶将  $O_2^- \cdot$  转变为 HOOH。随后, HOOH 被胞浆中含硒半胱氨酸的谷胱甘肽过氧化物酶(GPO)或过氧化物酶体中的过氧化氢酶(CAT)还原为水。

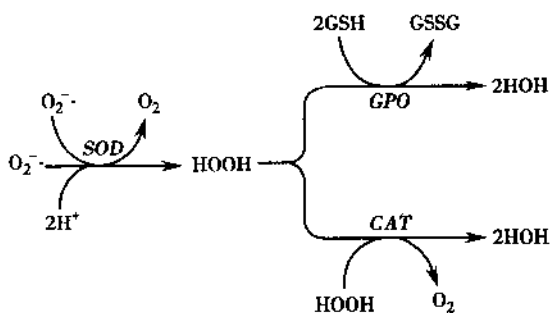


图 4-4 超氧化物歧化酶(SOD), 谷胱甘肽过氧化物酶(GPO)和过氧化氢酶(CAT)对超氧阴离子自由基( $O_2^- \cdot$ )的解毒作用

没有任何的酶能排除  $\cdot OH$ , 虽然某些相对稳定的自由基如过氧自由基易于从谷胱甘肽、维生素 E 或维生素 C 抽取一个氢原子, 因而变成非自由基, 但这些抗氧化剂对于  $\cdot OH$  的解毒通常是无效的, 这是由于  $\cdot OH$  的半衰期极短 ( $10^{-9}s$ ), 几乎无法提供  $\cdot OH$  到达抗氧化剂并与其反应的时间。因此, 对于  $\cdot OH$  的惟一有效的保护是通过排除其前体—— $H_2O_2$  (使其转变为水) 来阻止它的形成。

$ONOO^-$  (不属于自由基氧化剂) 明显比  $\cdot OH$  更稳定(半衰期约 1s)。然而, 小的生物抗氧化剂分子(谷胱甘肽、尿酸、维生素 C、 $\alpha$ -维生素 E) 在终止其形成方面仍然是相对无效的。因为  $ONOO^-$  易于与 CO 反应而形成具有反应活性的自由基。比较有效的是含有硒半胱氨酸的谷胱甘肽过氧化物酶, 它通过 HOOH 还原为水相同的方式将  $ONOO^-$  还原为亚硝酸盐( $ONO^-$ )。含有 10 个硒半胱氨酸残基并覆盖在内皮细胞表面的硒蛋白也还原  $ONOO^-$ , 可能作为血液中这种氧化剂的保护剂。此外,  $ONOO^-$  与氧合血红蛋白、含血红蛋白的过氧化物酶和清蛋白反应, 所有这些蛋白质可能都是  $ONOO^-$  的排除场所。而且, 两种  $ONOO^-$  前体的排除 [即通过与氧合血红蛋白反应(产生高铁血红蛋白和硝酸)排除 NO 以及通过 SODs 排除  $O_2^- \cdot$ ] 是防止  $ONOO^-$  增高的有意义机制。

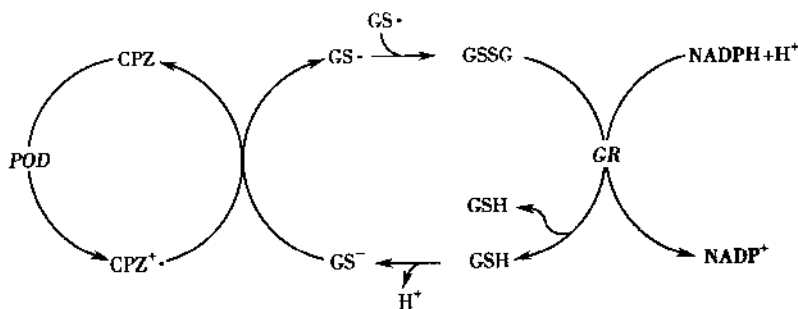


图 4-5 过氧化物酶(POD)产生的自由基如氯丙嗪自由基( $CPZ \cdot$ )由谷胱甘肽(GSH)解毒。副产物是谷胱甘肽硫自由基( $GS \cdot$ )和谷胱甘肽二硫化物(GSSG), 再由谷胱甘肽还原酶(GR)作用生成 GSH

过氧化物酶生成的自由基通过来自谷胱甘肽的电子转移来排除。这就导致谷胱甘肽的氧

化,而谷胱甘肽的氧化可被 NADPH-依赖的谷胱甘肽还原酶所逆转(图 4-5)。因此,谷胱甘肽在亲电物和自由基的解毒中起重要作用。

5. 蛋白质毒素的解毒 据推测,细胞外和细胞内的蛋白酶参与有毒多肽的失活作用。在蛇毒发现的几种毒素,如  $\alpha$ -和  $\beta$ -银环蛇毒素、半环扁尾蛇毒素和磷脂酶含有它们活性所需的分子内二硫键。这些蛋白质可被一种还原必需二硫键的内源性双巯基蛋白——硫氧还蛋白(thioredoxin)所失活。

## 六、解毒过程失效

解毒可因下述几种原因而失效:

1. 毒物可能使解毒过程失效 引起解毒酶耗竭,共底物(cosubstrates)的消耗或细胞抗氧化剂如谷胱甘肽、维生素 C 和  $\alpha$ -维生素 E 的耗竭,这就导致解毒失效而终毒物的蓄积。

2. 偶尔可见某种具有反应活性的毒物使解毒酶失活 例如,ONOO<sup>-</sup>使 Mn-SOD 失效,这种酶在正常情况下可对抗 ONOO<sup>-</sup>的形成。

3. 某些结合反应可被逆转 例如, $\alpha$ -萘胺(膀胱致癌物)在肝被 N-羟化并进行葡萄糖醛酸结合,以葡糖苷酸式排泄到尿中。而在膀胱中,葡糖苷酸被水解,释放的芳基羟胺经质子化过程和脱水过程转变为具有反应性的亲电子芳基硝鎓离子。异氰酸盐和异硫氰酸盐形成可被释放的不稳定的谷胱甘肽结合物。于是,甲基异氰酸盐在吸入后易于在肺部形成谷胱甘肽结合物,并由此处分布到其他组织,在这些组织中,具有反应活性的亲电子母化合物可被再生,这样的结合物可看作毒物的转运形式。

4. 有时解毒过程产生潜在的有害副产物 在自由基解毒过程中产生如谷胱甘肽自由基和谷胱甘肽二硫化物(图 4-5)。谷胱甘肽二硫化物能与蛋白巯基形成混合二硫化物,而谷胱甘肽巯基自由基(GS·)在与硫醇盐(GS<sup>-</sup>)反应后形成一种谷胱甘肽二硫化物自由基阴离子(GSSG<sup>-·</sup>),它能使 O<sub>2</sub> 还原为 O<sub>2</sub><sup>-·</sup>。

## 第二节 终毒物与靶分子的反应

从典型意义上讲,毒性是由终毒物与靶分子的反应所介导的一系列继发生化过程,导致在不同生物学组织结构水平(如靶分子本身、细胞器、细胞、组织和器官,甚至整个机体)上的功能失常与损伤。终毒物与靶分子间的交互作用触发毒性效应需考虑以下几个方面:①靶分子的属性;②终毒物与靶分子之间反应的类型;③毒物对靶分子的效应。最后,还必须考虑到,一些并非直接由终毒物与靶分子反应所启动,而是由于生物学微环境(关键的內源分子、细胞器、细胞和器官在这样的微环境中运行)改变所引起的毒性。

### 一、靶分子的属性

实际上所有的內源化合物都是毒物潜在的靶标,然而,最为流行的毒理学上相关的靶标是

大分子,如核酸(特别是 DNA)和蛋白质。在小分子中,膜脂质最为常见,此外,辅因子如辅酶 A 和吡哆醛也被涉及。

内源性分子作为一个靶分子必须具有合适的反应性和(或)空间构型,以容许终毒物发生共价或非共价反应。为了发生这些反应,靶分子必须接触足够高浓度的终毒物,因此,处于反应活性化学物邻近或接近它们形成部位的内源性分子常常是靶分子。活性代谢物的第一个靶分子常常是催化这些代谢物形成的酶或邻近的细胞内结构,例如,负责甲状腺激素合成的酶——甲状腺过氧化物酶将某些亲核的外源化学物[如甲硫咪唑(methimazole)、氨基三唑(amtrole)和间苯二酚(resorcinol)]转变为活性自由基代谢物,这些自由基代谢物又使甲状腺过氧化物酶失活,这是这些化学物抗甲状腺作用以及诱发甲状腺肿瘤的基础。

四氯化碳由细胞色素 P-450 活化后破坏细胞色素 P-450 酶本身及其邻近的微粒体膜。几种线粒体酶(包括琥珀酸脱氢酶、丙酮酸脱氢酶和细胞色素 C 氧化酶)是肾毒性半胱氨酸结合物如二氯乙烯半胱氨酸的合适靶分子,因为这种结合物在相同的细胞器由线粒体半胱氨酸结合物  $\beta$ -裂合酶转变为亲电物。在密切靠近其形成部位未能找到合适内源性分子的活性代谢物时,可发生扩散直至它们遇到这样的反应物。例如,硬亲电物如 N-甲基-4-氨基偶氮苯的芳基硝鎓离子代谢物易于与核酸中的亲核原子反应,因而也就易于与核中的靶 DNA 反应,即使亲电物是在胞浆中产生。

并非化学物的所有靶分子都发生有害效应,虽然 CO 通过与亚铁血红蛋白结合而引起毒性,但它也可与细胞色素 P-450 的铁结合而极少出现或不出现后果。毒物与各种各样的细胞内蛋白共价结合包括酶和结构蛋白的结合已经被证实,但哪一种蛋白参与有毒理学意义的结合常常是不确定的。乙酰氨基酚引起的某些肝线粒体蛋白的芳基化与这种药物引发的肝损害可能具有因果相关,因为乙酰氨基酚的非肝毒性异构体不容易与这些蛋白质共价结合。相反,由乙酰氨基酚引起的许多胞浆蛋白的芳基化可能是不重要的,因为这种药物的非肝毒性异构体也芳基化这些蛋白质。不出现不良后果的蛋白质共价结合甚至可能代表某种形式的解毒作用(通过占有毒理学相关的靶分子),如:有机磷杀虫剂血浆胆碱酯酶是一种保护机制,因为减少了靶分子乙酰胆碱酯酶共价结合的磷酸化。因此,为了最终确认引起毒性的靶分子,就必须证实:①终毒物与靶标反应并对其功能产生不良影响;②终毒物在靶部位达到有效的浓度;③终毒物在某种机制上以所观察的毒性相关的方式改变靶标。

## 二、反应的类型

\*\*\*\*\*

终毒物可能以非共价或共价的形式与靶分子结合,也可能通过去氢反应、电子转移或酶促反应而改变靶分子。

1. 非共价结合 非共价结合(noncovalent binding)可能是通过非极性交互作用或氢键与离子键的形成,具有代表性的是毒物与膜受体、细胞内受体、离子通道以及某些酶等靶分子的交互作用。例如,番木鳖碱(strychnine)结合于脊髓运动神经元上甘氨酸受体,TCDD 结合于芳烃受体,哈蚌毒素(Saxitoxin)结合钠通道,佛波酯结合于蛋白激酶 C 以及杀鼠灵(warfarin)结合于维生素 K 2,3-环氧化物还原酶。这种作用力也促使吡啶黄(acridine yellow)和阿霉素(doxorubicin)插入双螺旋 DNA。由于这些化学物原子的空间排列使它们与内源性分子的互补部位结合,或多



或至少有点像钥匙与锁的关系,因而这些化学物表现出毒性效应。非共价结合通常是可逆的,因为这种结合的键能相对较低。

2. 共价结合 共价结合 (covalent binding) 实际上是不可逆的,由于这种结合持久地改变内源分子,因此具有重要的毒理学意义。共价加合物的形成常见于亲电毒物,如非离子和阳离子亲电物以及自由基阳离子。这些毒物与生物大分子如蛋白质和核酸中的亲核原子反应,亲电原子对亲核原子表现出某些选择性,取决于它们的电荷/半径比。一般而言,软亲电物较易与软亲核物(两者均具有较低的电荷/半径比)反应,而硬亲电物较易与硬亲核物(两者均具有较高的电荷/半径比)反应。表4-4列出了一些实例。如银和汞这样的金属离子被归类为软亲电物,它们优先与软亲核物反应;而锂、钙和钡这样的硬亲电物优先与硬亲核物反应;在这两个极端之间的金属如铬、锌和铅显示出与亲核物的普遍反应性。亲电物的反应性决定了哪种内源性亲核物能与之反应并成为其靶分子。

中性自由基如 $\cdot\text{OH}$ 、 $\cdot\text{NO}_2$ 和 $\text{Cl}_3\text{C}\cdot$ 也能共价结合于生物分子。 $\text{Cl}_3\text{C}\cdot$ 加入到脂质的双键碳或脂质自由基产生含有氯甲基脂肪酸的脂质。羟基自由基加入到DNA碱基导致许多产物的形成,包括8-羟嘌呤、5-羟甲基嘧啶以及胸腺嘧啶和胞嘧啶的乙二醇。

原则上亲核毒物倾向于与亲电内源化合物反应,但这样的反应不常发生,因为在生物分子中亲电物十分罕见。其实例包括胺类和胍类与一种脱羧酶的共底物醛吡哆醛(pyridoxal)的共价反应;一氧化碳、氧化物、硫化氢和叠氮化物与各种血红素蛋白中的铁形成配位共价键。其他亲核物以电子转移反应的方式与血红蛋白反应。

表4-4 软、硬亲电物和亲核物实例

| 亲电子物                                  | 亲核物                           |
|---------------------------------------|-------------------------------|
| 极化双键中的碳(如酮, $\alpha$ 、 $\beta$ -不饱和酮) | 软 巯基化合物中的硫(如蛋白质和谷胱甘肽中的半胱氨酸残基) |
| 环氧化物、应变环内酯、芳基卤化物                      | ↑ 甲硫氨酸中的硫                     |
| 芳基碳鎓离子                                | ↓ 蛋白质的一级和二级氨基基团中的氮            |
| 苄碳鎓离子、氮鎓离子                            | 核酸中嘌呤碱基中的氮                    |
| 烷基碳鎓离子                                | 硬 核酸中嘌呤和嘧啶中的氧                 |
|                                       | 核酸中磷酸酯的氧                      |

3. 去氢反应 自由基可迅速从内源化合物去除氢原子,将这些化合物转变为自由基。从巯基化合物(R-SH)去除氢形成巯基自由基(R-S $\cdot$ ),这种自由基是其他巯基氧化产物如次磺酸(R-SOH)和二硫化物(R-S-S-R)的前身。自由基能从游离氨基酸或蛋白质氨基酸残基的 $\text{CH}_2$ 基去除氢,转变为羰基化合物,这些羰基化合物与胺类反应,形成与DNA或其他蛋白质的交联。从DNA分子中的脱氧核糖去除氢产生C-4'-自由基,这是DNA断裂的最初步骤。从脂肪酸去除氢产生脂质自由基并启动脂质过氧化。蛋白质中酪氨酸残基的硝基化可能涉及去氢反应,随后发生形成的酪氨酰(tyrosyl)自由基与 $\text{NO}_2$ 之间的共价结合。

4. 电子转移 化学物能将血红蛋白中的 $\text{Fe}^{2+}$ 氧化为 $\text{Fe}^{3+}$ ,形成高铁血红蛋白血症。亚硝酸盐能氧化血红蛋白,而N-羟基芳胺(如氨基酚羟胺)、酚类化合物(如5-羟伯氨唑)和胍类(如苯胍)与氧合血红蛋白共氧化,形成高铁血红蛋白与过氧化氢。

5. 酶促反应 少数一些毒素通过酶促反应(enzymatic reaction)作用于特定靶蛋白上。例如,蓖麻蛋白(ricin)诱发核糖体的水解断裂,阻断蛋白质的合成。几种细菌毒素催化 ADP-核糖从 AND<sup>+</sup> 转移到特定蛋白质。例如,白喉毒素阻断蛋白质合成过程中延伸因子(elongation factor)的功能,霍乱毒素通过这样一种机制活化一种 G 蛋白,蛇毒含有破坏生物分子的水解酶。

总之,大多数终毒物借助于它们化学反应性作用在内源分子上,具有一种类型以上反应性的那些毒物可以通过不同机制与不同的靶分子反应。例如,醛类可以作为电子受体启动巯基氧化或导致脂质过氧化的自由基反应,但它们也可以作为软亲电物共价结合于蛋白巯基。铅离子当与血红素合成过程中的主要靶酶  $\delta$ -ALAD 的关键巯基形成配位共价键时,是作为软亲电物;然而,当它结合于蛋白激酶 C 或阻断钙通道、在这些靶部位替代天然配体  $Ca^{2+}$  时,它的表现又像一种硬亲电物或一种离子。

### 三、毒物对靶分子的影响

终毒物与内源性分子反应可引起功能与结构失常,对蛋白质而言,这种反应可使蛋白质变成免疫系统的外源蛋白。

1. 靶分子功能失调 某些毒物活靶蛋白分子,模拟内源性配体,例如:吗啡激活鸦片受体;氯苯丁酯(clofibrate)为一种过氧化物酶体增殖物激活性受体的激动剂;佛波酯和铅离子刺激蛋白激酶 C。

但在更多情况下,化学物通常抑制靶分子的功能。有些外源化学物如阿托品、箭毒(curare)和番木鳖碱(strychine)通过附着于配体结合部位或通过干扰离子通道的功能而阻断神经递质受体。例如:河豚毒素(tetrodotoxin)和蛤蚌毒素(saxitoxin)抑制神经元膜上电压激活的钠通道开放;而 DDT 和除虫菊酯(pyrethroid)杀虫剂抑制它们的关闭;某些毒物阻断离子转运蛋白;另外一些毒物抑制线粒体电子转移复合物;许多毒物抑制酶活性;结合于微管蛋白如长春花碱、秋水仙素、紫杉醇、三价砷或肌动蛋白如细胞松弛素  $\beta$ 、次毒蕈环肽的化学物损害这些细胞骨架蛋白的组装(聚合)的拆装(解聚)过程。

当蛋白质与毒物交互作用而改变其构型结构时,蛋白质的功能即受损害,许多蛋白质具有催化活性和聚合为大分子复合物所必需的关键部分,特别是巯基。对其巯基的共价和(或)氧化修饰敏感的蛋白质包括酶类,如蛋白酪氨酸磷酸酶、甘油醛 3-磷酸脱氢酶和丙酮酸脱氢酶, $Ca^{2+}$  泵和转录因子 AP-1 等。这些蛋白质和许多其他的蛋白质的活性受巯基反应化学物所损害,触发异常的信号转导和(或)损害细胞能量和代谢稳态,蛋白酪氨酸硝化也可改变蛋白质功能或干扰酪氨酸激酶和磷酸酶参与的信号途径。

毒物可干扰 DNA 的模板功能。化学物与 DNA 共价结合引起复制期间核苷酸错配。例如,黄曲霉毒素 8,9-氧化物共价结合于鸟嘌呤的 N-7 位使得带有加合物的鸟嘌呤与腺嘌呤配对而不是与胞嘧啶配对,导致不正确密码的形成及不正确的氨基酸插入蛋白质。在黄曲霉毒素诱发的 ras 原癌基因及 p53 肿瘤抑制基因突变时会出现这种情况。8-羟基鸟嘌呤和 8-羟基腺嘌呤是由  $\cdot OH$  引起的致突变碱基,能引起本身的错配以及与邻近的嘧啶错配。化学物如阿霉素(doxorubicin)插入在双螺旋 DNA 中的重叠碱基间,迫使邻近的碱基对分开,通过移动读码框架引起 DNA 的模板功能的较大的错误。

2. 靶分子的破坏 除了加合物形成以外, 毒物还可通过交联和断裂而使内源分子的初级结构改变。双功能的亲电物如 2,5-己二酮、二硫化碳、丙烯醛、4-羟壬醛(4-hydroxynonenal) 和氮芥烷化剂能交联细胞骨架蛋白、DNA, 或使 DNA 与蛋白质交联。羟基自由基通过使上述大分子转变为活性亲电物(如蛋白羰基)或自由基也引起交联, 前者可与另一个大分子的亲核部位反应, 而后者则可彼此发生反应。交联使被连接的分子发生结构与功能的抑制。

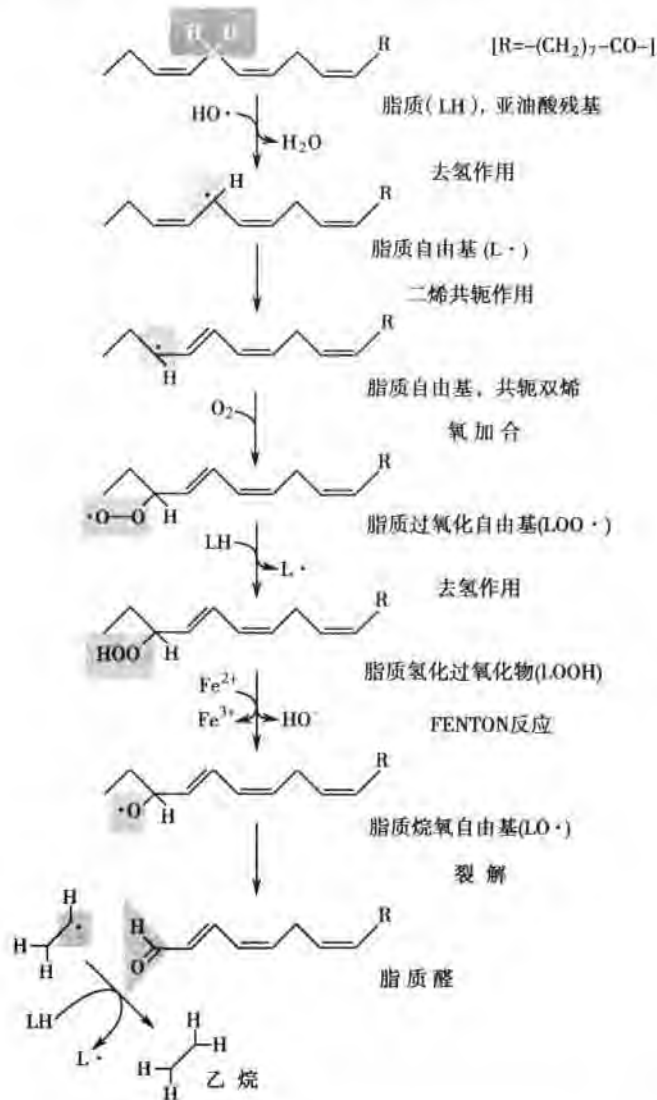


图 4-6 由羟基自由基启动的脂质过氧化反应

注: 自由基和  $\alpha, \beta$ -不饱和醛等许多产物都具有反应活性, 而其他产物如乙烷, 不具有反应却是脂质过氧化的指示剂

某些靶分子对化学物攻击后的自发性降解敏感, 自由基如  $\text{Cl}_3\text{COO}\cdot$  和  $\cdot\text{OH}$  可通过从脂肪酸去除氢而启动脂质的过氧化降解, 所形成的脂质自由基 ( $\text{L}\cdot$ ) 紧接着通过氧固化作用转变为

脂质过氧自由基( $\text{LOO}\cdot$ ); 并通过去氢反应形成脂质氢过氧化物( $\text{LOOH}$ ), 通过  $\text{Fe}^{2+}$  催化的 Fenton 反应形成脂质烷氧自由基( $\text{LO}\cdot$ ), 随后的断裂引起烃(如乙烷)以及活性醛(如 4-羟壬醛和丙二醛)的形成(图 4-6)。因此, 脂质过氧化不仅破坏细胞膜脂质, 而且还容易与膜蛋白质反应, 或与更远的分子如 DNA 反应。

除毒素和辐射引起的水解降解之外, 毒物引起的蛋白质降解尚未完全证实。然而, 却存在着酶辅基破坏的实例。例如, 细胞色素 P-450 将烯丙基异丙基乙酰胺转变为具有反应活性的代谢物, 它使酶的血红素部位发生烷基化, 导致变化了的血红素丢失及卟啉症的发生。 $\text{ONOO}^-$  在乌头酸酶的  $[\text{4Fe-4S}]^{2+}$  结构簇攻击乌头酸, 这一结构簇上的一个 Fe 原子是十分易变的(因为它与一个无机硫复合, 而不是像其他结构簇一样复合于酶结合的半胱氨酸)。由于  $\text{ONOO}^-$  的氧化作用, 易变的 Fe 丢失。从而使酶失活, 罹及乌头酸酶参与催化功能的柠檬酸循环。

毒物可引起几种形式的 DNA 断裂。例如, DNA 碱基受  $\cdot\text{OH}$  攻击可形成咪唑环开放的嘌呤或环收缩的嘧啶, 这将阻断 DNA 复制。在鸟嘌呤 N-7 位置上大块加合物的形成使 N-糖苷键不稳定, 诱发脱嘌呤作用, 脱嘌呤作用导致具有致突变作用的无嘌呤部位的形成。很具代表性的是, 羟基自由基通过从 DNA 的核糖提取 H、产生 C-4' 自由基、随后发生  $\text{O}_2^-$  加成、Griegee 重排和磷酸二酯链的断裂而引起单链断裂。多种羟自由基攻击长度较短的 DNA(这种情况发生在电离辐射后)引起双链断裂, 这对于受影响细胞常表现为致死效应。

3. 新抗原形成 虽然外源化学物或其代谢物的共价结合对于免疫系统功能的影响通常是不重要的, 但在某些个体, 这些变化了的蛋白质常激发免疫应答。某些化学物(如硝基氯苯、青霉素、镍)可能具有足够高的反应性而自发地结合于蛋白质。另外一些化学物可通过自氧化为醌类(如漆酚为毒长春藤中的变应原)或通过酶促生物转化而获得反应性。例如, 细胞色素 P-450 将氟烷生物转化为三氟乙酰氯(trifluoroacetyl chloride), 作为半抗原与肝各种微粒体和细胞表面蛋白质结合, 诱导抗体产生。免疫反应被认为是敏感病人中所见到的肝炎样综合征的原因。药物引起的狼疮和粒性白细胞缺乏症是由药物-蛋白质加合物触发的免疫反应所介导的。导致这类反应的化学物通常都是亲核物, 如芳香胺[氨基比林(Aminopyrin)、氯氮平(clozapine)和异烟肼(isoniazid)]和巯基化合物[如丙基硫氧嘧啶(propylthiouracil)、甲硫咪唑(methimazole)和(S)-1-(3-巯基本点-甲基-1-氧代丙基)-L-脯氨酸(captopril)]。这些物质能被激活的粒细胞释放的髓过氧化物酶或该种细胞产生的 ROS/RNS( $\text{HO}\cdot$ ,  $\text{ONOO}^-$ ,  $\text{HOCl}$ )所氧化, 形成与这些细胞表面蛋白结合的活性代谢物, 使它们成为抗原。遗憾的是, 某些带有加合物的蛋白质能模拟正常蛋白质, 因此也能受抗体攻击。

4. 化学物引起的生物学微环境改变与毒性 某些外源化学物不是通过或不完全通过与特定内源性靶分子交互作用而引起毒性, 而是通过改变生物学微环境而导致毒性, 包括: ①能改变生物水相中的  $\text{H}^+$  离子浓度的化学物, 如酸和能生物转化为酸的物质(如甲醇和乙二醇)以及质子解偶联剂(如 2,4-二硝基酚和五氯酚), 它们在线粒体基质中使酚的质子分离, 因而使推动 ATP 合成的质子梯度消失; ②使细胞膜脂质相发生物理化学改变以及破坏细胞功能所必需的穿膜溶质梯度的溶剂及去垢剂; ③仅通过占据位置或空间引起危害的其他外源化学物, 如某些化学物(如乙二醇)在肾小管中形成不溶水的沉淀物; 磺胺类化合物通过占据清蛋白的胆红素结合位点而引起新生儿胆红素毒性(核黄疸);  $\text{CO}_2$  取代肺泡腔的氧引起窒息。

### 第三节 细胞功能障碍与毒性

多细胞机体的每个细胞都执行着特定的程序,某些程序决定细胞的命运——分裂、分化(即表达专一化功能的蛋白)或凋亡。另一些程序控制分化了的细胞的瞬息活动[ongoing (momentary) activity],决定细胞分泌物质的数量、是否收缩或舒张、转运和代谢营养物质的速率等。细胞具有能被外部信号分子激活或灭活的信号网络来调节这些细胞程序。为了执行这些程序,细胞装备有合成、代谢、运动、转运和产生能量的体系以及结构元件,组装为大分子复合物、细胞膜和细胞器,以维持自身的完整性(内部功能)和支持其他细胞(外部功能)。毒物与靶分子的反应可导致细胞功能损害。

#### 一、毒物引起的细胞调节功能障碍

细胞受信号分子所调节,它激活与信号转导网络所联系的细胞受体,而信号转导网络将信号传递给基因的调节区域和(或)功能蛋白。受体激活最终可导致:①改变基因的表达,增加或减少特定蛋白的功能;②通过磷酸化使特定蛋白发生化学修饰,从而激活或抑制蛋白质。控制细胞命运的程序主要影响基因表达,而调节日常瞬息活动的那些程序主要影响功能蛋白的活性;然而,由于信号网络的分支和交互联系,一个信号常常触发两类应答。

##### (一) 基因表达调节障碍

基因表达调节障碍可发生于直接负责转录的元件上、细胞内信号转导途径的成员以及细胞外信号分子的合成、贮存或释放过程中。

1. 转录调节障碍 遗传信息从 DNA 转录给 mRNA 主要受转录因子(TFs)与基因的调节或启动区域间的相互作用所控制。通过与这一区域的核苷酸序列相结合,激活的转录因子促进前起始复合物(preinitiation complex)的形成,促使相毗邻的基因的转录。外源化学物可与基因的启动子区域、转录因子或前起始复合物的其他元件交互作用,然而,转录因子激活作用的改变似乎是最常见的方式。从功能角度看,已知有两种类型的 TF:配体激活的 TF 和信号激活的 TF。

许多天然化合物,如激素(如类固醇、甲状腺激素)和维生素(视黄醇和维生素 D)通过结合与激活而影响基因的表达(表 4-5)。外源化学物可模拟天然配体。例如:祛脂酸类(fibric acid)降血脂药和邻苯二甲酸酯替代多不饱和脂肪酸作为过氧化物酶体增殖物激活性受体(PPAR)的配体。而  $Cd^{2+}$  替代  $Zn^{2+}$ ——金属应答元件结合的转录因子(MTF-1)的内源性配体。天然或外源化学物配体在以极端剂量摄入或在个体发生的关键期摄入时,可通过配体激活的 TFs 而引起毒性。糖皮质激素可引起淋巴细胞的凋亡,虽然在治疗淋巴瘤恶性肿瘤时希望出现这种现象,但在许多其他情况下并不希望得到这种反应。TCDD[一种芳烃受体(AHR)的配体]通过引起胸腺细胞的凋亡而导致胸腺萎缩。雌激素在表达雌激素受体的细胞(如雌性生殖器官、乳腺和肝脏中所见到的细胞)可促进有丝分裂。在雌激素长期暴露时,由雌激素诱导的增殖似乎是这些器官肿瘤形成的原因。据推断,环境外源雌激素如 DDT、多氯联苯、双酚 A 和莠去津(atrazine)促使乳腺

癌发生率增加。一种真菌雌激素饲料污染物玉米赤霉烯酮(zearalenone)引起猪阴道下垂,这是雌激素受体介导的增殖性损害的一个实例。过氧化物酶体增生物的促有丝分裂作用及肝肿瘤促进作用也是受体介导的,因为在 PPAR $\alpha$  缺失的小鼠未能观察到这种现象。人类与啮齿动物不同,PPAR $\alpha$  以低水平表达,同时常以无功能的形式存在,因而不会表现出肝细胞及过氧化物酶体的增生。作用于配体激活的 TFs 的化学物,如糖皮质激素、TCDD 和维生素诱发胎儿畸形,这可看作不合适的基因表达。候选的靶基因是早期个体发生期间决定身体轮廓的同源框基因(homeoboxgene)。

表 4-5 作用于配体激活的转录因子的毒物

| 配体激活的转录因子            | 内源性配体                                                               | 外源性配体                                         | 效 应                                                                      |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| 雌激素受体(ER)            | 雌二醇                                                                 | 乙炔基雌二醇<br>二乙基己烯雌酚<br>DDT<br>玉米赤霉烯酮            | 乳房和肝脏的致癌作用<br><br>猪的外阴下垂                                                 |
| 糖皮质激素受体(GR)          | 皮质醇                                                                 | 地塞米松                                          | 淋巴细胞凋亡致畸作用(腭裂)                                                           |
| 视黄酸受体(RAR, RXR)      | 全反式视黄酸                                                              | 1,3-顺式视黄酸 致畸作用<br>(颅面骨、心脏、胸腺的畸形)              |                                                                          |
| 芳香烃受体(AHR)           | 未知                                                                  | TCDD<br>PCBs<br>PAHs                          | 胸腺萎缩<br>消耗性综合征<br>致畸作用(腭裂)<br>大鼠肝脏致癌<br>酶诱导(如 $\uparrow$ CYP1A1)         |
| 过氧化物酶体增殖物激活的受体(PPAR) | 脂肪酸                                                                 | 祛脂酸酯<br>(如氯苯丁酯)<br>苯二甲酸酯<br>(如 DEHP)          | 大鼠肝脏致癌<br>过氧化物酶体增殖酶诱导<br>(如 $\uparrow$ CYP4A1,<br>$\uparrow$ 乙酰辅酶 A 氧化酶) |
| 组成型雄甾烷受体(CAR)        | 3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -雄烯醇<br>3 $\alpha$ ,5 $\alpha$ -雄烷醇<br>(抑制剂) | 苯巴比妥<br>DDT,PCP<br>氯丙嗪                        | 酶诱导<br>(如 CYP2B,CYP3A)                                                   |
| 孕烷 X 受体(PXR)         | 孕烯醇酮<br>黄体酮                                                         | PCN<br>地塞米松<br>螺旋内酯固醇<br>环丙氯地孕酮<br>PCBs<br>氯丹 | 酶诱导<br>(如 $\uparrow$ CYP3A)                                              |
| 金属应答元件结合的转录因子(MTF-1) | Zn <sup>2+</sup>                                                    | Cd <sup>2+</sup>                              | $\uparrow$ 金属硫蛋白合成                                                       |

作用于配体激活的 TFs 的化合物也能使各种不同基因过度表达而改变细胞分化的类型。例如,PPAR-配体祛脂酸衍生物刺激编码过氧化物酶体酶的基因,在啮齿动物肝诱导过氧化物酶体增生。

TCDD、苯巴比妥和孕甾烯醇酮 16- $\alpha$ -腈(PCN)分别活化 AHR、组成型雄甾烷受体(CAR)和孕烷 X 受体(PXR)(表 4-5),它们对细胞色素 P-450 起诱导作用。其他外源化学物代谢酶的基因也受这些化学物所激活,例如,TCDD 增加细胞色素 P-450 1A1、UDP-葡萄糖醛酸基转移酶-1 和几种小鼠及大鼠谷胱甘肽-S-转移酶亚单位的表达,因为这些酶的基因的启动子区域含有一个二噁英(或外源化学物)应答元件,这一元件被与核转位蛋白 ARNT 复合的 TCDD 激活的 Ah 受体所识别。在 AHR 缺失的小鼠,TCDD 既不诱导这些酶,也不具有表 4-5 所列的有害作用。

2. 信号转导调节障碍 细胞外信号分子,如生长因子、细胞因子、激素和神经递质能利用细胞表面受体和细胞内信号转导网络激活 TFs。这些 TFs 控制着影响细胞周期进展、决定细胞结局的基因的转录活性。在这些 TFs 中,有 c-Fos 和 c-Jun 蛋白,它们以二聚体的形式(称之为 AP-1)结合到十四烷酰佛波醇乙酸酯[tetradecanoyl phorbol acetate(TPA)]应答元件(TRE),如细胞周期蛋白 D 基因启动子中的 TRE。另一个是 c-Myc 蛋白,当它与 Max 蛋白二聚化并结合于其同源的核苷酸序列时,能激活细胞周期蛋白 D 和 E 基因,接着细胞周期蛋白通过活化细胞周期蛋白依赖的蛋白激酶而加速细胞分裂周期。因此,促有丝分裂的信号分子诱导细胞增生;相反,TGF- $\beta$  诱导细胞周期蛋白依赖的蛋白激酶抑制蛋白(如 P27)的表达,这种蛋白介导着抗有丝分裂作用。

从细胞表面受体到 TFs,信号通过连续的蛋白质-蛋白质相互作用和蛋白质磷酸化而分段传递。暴露于所有细胞表面的生长因子受体实际上是起磷酸化作用的酶(即受体蛋白酪氨酸激酶)。当受体与配体结合诱导配体发生磷酸化,接着,这些受体能结合于连接物蛋白(adapter protein),并通过这些连接物蛋白激活 Ras,活化的 Ras 建立了有丝分裂原激活的蛋白激酶(MAPK)级联反应,涉及一系列蛋白激酶的磷酸化,最终到达 TFs。因此,从受体经激酶再到转录因子的许多信号元件的活性受特定丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸羟基磷酸化的影响。这些信号转导蛋白一般通过蛋白激酶催化的磷酸化来激活,同时通过蛋白磷酸酶执行的脱磷酸化反应使之失活。

化学物可通过多种途径引起信号转导的异常,最常见的是通过改变蛋白磷酸化,偶尔也通过干扰 G 蛋白(如 Ras)的 GTPase 活性、破坏正常的蛋白质-蛋白质相互作用、建立异常的交互作用、改变信号蛋白的合成与降解。这样的干扰最终可影响细胞周期的进展。

(1) 具有增殖效应的化学物对信号转导的影响:促使信号转导蛋白磷酸化的外源化学物常会促进有丝分裂和肿瘤形成,佛波酯和串珠镰孢霉素  $\beta$ (fumonisin $\beta$ )模拟一种激活蛋白激酶 C(PKC)的生理激活剂二酰基甘油(DAG)而激活 PKC;而  $Pb^{2+}$  模拟另一种 PKC 的生理性激活剂  $Ca^{2+}$ ,它对 PKC<sub>c</sub> 的效应具有浓度依赖性:在 pmol( $10^{-12}$ )浓度, $Pb^{2+}$  仅占据 PKC 的高亲和力部位,表现出刺激作用,而在  $\mu$ mol( $10^{-6}$ )浓度时,低亲和力的部位被占据,则表现出抑制作用。活化的 PKC 至少以两种方式促进有丝分裂信号形成:①通过磷酸化 MAPK 途径的第一种蛋白激酶 Raf;②通过磷酸化某种蛋白磷酸酶,使转录因子在特定位点脱磷酸,因而使其能与 DNA 结合。蛋白激酶也可通过受外源化学物改变的蛋白质相互作用而激活。例如,有人观察到 TCDD 诱导的豚鼠肝细胞周期蛋白和细胞周期蛋白依赖性蛋白激酶过度表达,其原因可能是 TCDD 和 AHR 与 MAPK 的结合。

蛋白质磷酸化不仅随激酶磷酸化的增加而增加,而且也可能通过磷酸酶的脱磷酸作用而产生。磷酸酶的抑制似乎是各种化学物、氧化应激和紫外(UV)辐射促有丝分裂作用的基本机制。蛋白酪氨酸磷酸酶和双特异性的磷酸酶(即从磷酸化的酪氨酸以及丝氨酸和苏氨酸残基除去磷

酸的酶)含有一个具有催化活性的半胱氨酸,它们对氧化失活和SH反应化学物的共价反应是易感的。事实上,外源化学物如碘乙酰胺、有机金属化合物三丁基锡、亚砷酸盐和氧化剂(如HOOH)通过干扰蛋白酪氨酸磷酸酶(这种酶会使受体脱磷酸化因而抑制受体的作用)而引起表皮生长因子的磷酸化;亚砷酸盐可能也使双特异性磷酸酶失活[这种酶具有脱磷酸化作用并抑制某些MAPK(JNK,P38)];而甲基甲磺酸(MMS)似乎抑制一种使蛋白酪氨酸激酶Src失活的蛋白磷酸酶;巯基氧化剂二酰胺(增加MAPKs的磷酸化)和酚类抗氧化剂(形成苯氧自由基并增加c-Fos和c-Jun表达)也可以通过使蛋白酪氨酸磷酸酶失能而发挥其作用。蛋白磷酸酶2A(PP2A)是细胞内的主要可溶性丝氨酸/酪氨酸磷酸酶,可能至少部分承担着逆转生长因子诱导的MAPK刺激,来保持MAPK活性的程度及维持时间在控制范围内。PP2A也清除有丝分裂触发的蛋白激酶(p34<sup>CDC2</sup>)中的活性磷酸。几种天然毒素包括蓝绿藻毒素、微囊素-LG(microcystin-LG)和双鞭甲藻(dinoflagella)衍生的冈田酸(okadaic acid)是PP2A的极强抑制剂,在长期低剂量暴露的实验动物,它们是肿瘤促进剂。

除了磷酸酶外,还存在着一些能使信号保持在受控下的抑制性结合蛋白,结合于NF- $\kappa$ B的I $\kappa$ B就是如此,这种结合阻止NF- $\kappa$ B转移到核内并行使TF功能。在磷酸化时,I $\kappa$ B被降解,使得NF- $\kappa$ B变为游离的。释放出来的NF- $\kappa$ B能反式激活c-Myc基因,并以几种细胞因子(如TNF- $\alpha$ ,IL-1 $\beta$ )和急性期蛋白质(如c-反应蛋白, $\alpha$ 1-酸性糖蛋白)为靶分子。因此,此种TF在炎症和急性期反应中起一种引导作用。I $\kappa$ B降解和NF- $\kappa$ B活化也能由氧化应激所诱导,过氧化物似乎是介导这种作用的活性氧,活化的NF- $\kappa$ B可能引起对氧化应激的增生和炎症反应。NF- $\kappa$ B也可通过维持c-Myc转录(这对于存活是必不可少的)和反式活化抗凋亡的IAP蛋白的基因(抑制天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶)而防止细胞凋亡的发生。

(2)化学物改变的抗增生效应信号的转导:细胞损伤后增加了的细胞信号的衰减可能危及损伤细胞的取代。有人观察到暴露于乙酰氨基酚的Hepal-6细胞出现下述过程:Raf的抑制 $\rightarrow$ I $\kappa$ B降解减少 $\rightarrow$ NF- $\kappa$ B结合于DNA减少 $\rightarrow$ c-MYC mRNA表达减少。正常有丝分裂信号的下调使细胞偏离生存、走向凋亡。事实上,一种PKC的抑制剂星形孢菌素(staurosporin)和一种I $\kappa$ B降解的抑制剂胶霉毒素(gliotoxin)是强有力的凋亡诱导物。TGF- $\beta$ 和糖皮质激素增加I $\kappa$ B合成,随后减少NF- $\kappa$ B激活和c-MYC表达,这些机制可能是TGF- $\beta$ 和糖皮质激素的致凋亡作用的原因。

## (二)细胞瞬息活动的调节障碍

特定细胞正常运行的控制是通过作用于膜受体的信号分子来实施的,这些受体通过调节Ca<sup>2+</sup>进入胞浆或刺激细胞内第二信息的酶促形成而传递信号。Ca<sup>2+</sup>或其他第二信息最终改变功能蛋白质的磷酸化,改变其活性,随后几乎立即引起细胞功能的变化。毒物可通过中断信号连接过程中的任何一个步骤而影响细胞的瞬息活动。

1. 电可兴奋细胞的调节障碍 许多外源化学物影响可兴奋细胞如神经元、骨骼肌、心肌和平滑肌细胞的细胞活动,这些细胞的功能如神经递质的释放、肌肉的收缩受邻近神经元合成和释放的递质或介质的控制,干扰这些机制的化学物见表4-6。

神经和肌肉活动调节的变化是许多药物作用的基本机制,也是与药物过量使用、杀虫剂以及微生物、植物和动物毒素相关的毒效应的原因为。神经元是信号转换细胞,化学物对神经元的影响



表 4-6 作用于形成神经递质信号系统以及引起电兴奋细胞  
(如神经元和肌肉细胞)瞬息活动调节障碍的物质

| 受体/通道/泵                      |                   | 激动剂/活化剂                                                               |                                      | 拮抗剂/抑制剂                                                                                       |                                      |
|------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| 名称                           | 定位                | 化学物                                                                   | 效 应                                  | 化学物                                                                                           | 效 应                                  |
| 1. 烟碱样乙酰胆碱受体                 | 骨骼肌               | 烟碱<br>类毒素-a<br>毒扁豆碱<br>Ind:ChE 抑制剂                                    | 肌纤维颤动,<br>接着麻痹                       | 筒箭毒碱<br>丛毛茛菪素<br>$\alpha$ -环蛇毒素<br>$\alpha$ -眼镜蛇毒素<br>$\alpha$ -蜗牛毒素<br>埃博拉毒素 b<br>Ind:肉毒杆菌毒素 | 肌肉麻痹                                 |
|                              | 神经元               | 如上                                                                    | 神经元兴奋                                | $Pb^{2+}$ , 全身麻醉剂                                                                             | 抑制神经元                                |
| 2. 谷氨酸受体                     | CNS 神经元           | N-甲基-D-天冬氨酸<br>红藻氨酸盐<br>软骨藻酸<br>喹啉酸盐<br>使君子氨酸<br>Ind:缺氧,HCN<br>→释放谷氨酸 | 神经元兴奋<br>→惊厥,<br>神经元损伤<br>(兴奋性毒性)    | 苯环己呱啶<br>氯胺酮<br>全身麻醉剂                                                                         | 抑制神经元<br>→麻醉                         |
|                              |                   | 3. GABA <sub>A</sub> 受体                                               | CNS 神经元                              | 蝇蕈醇<br>除虫菌素<br>镇静剂(巴比妥酸,盐,苯(并)<br>二氮草类)<br>全身麻醉剂(氟烷)<br>醇类(乙醇)                                | 抑制神经元<br>→镇静<br>全身麻醉<br>昏迷<br>抑制中枢神经 |
| 4. 甘氨酸受体                     | CNS 神经元           | 除虫菌素(?)<br>全身麻醉剂                                                      | 抑制运动神经元<br>→麻痹                       | 番木鳖碱<br>Ind:破伤风毒素                                                                             | 运动神经元<br>去抑制<br>→强直性惊厥               |
| 5. 毒蕈碱 M <sub>2</sub> 乙酰胆碱受体 | 运动神经元<br>心肌       | Ind:ChE 抑制剂                                                           | 心率和收缩性降低                             | 颠茄生物碱(如阿托品)<br>阿托品样药物(如 TCAD)                                                                 | 心率增加                                 |
| 6. 鸦片样受体                     | CNS 神经元<br>内脏的神经元 | 吗啡和同类的物质(如二醋吗啡<br>哌替啶)                                                | 抑制神经元<br>→止痛,<br>抑制呼吸中枢<br>便秘<br>尿潴留 | 纳洛酮                                                                                           | 鸦片中毒效应                               |

续表

| 受体/通道/泵                                          |       | 激动剂/活化剂                                                |                    | 拮抗剂/抑制剂                                 |                                 |
|--------------------------------------------------|-------|--------------------------------------------------------|--------------------|-----------------------------------------|---------------------------------|
| 名称                                               | 定位    | 化学物                                                    | 效应                 | 化学物                                     | 效应                              |
| 7. 电压门控<br>Na <sup>+</sup> 通道                    | 神经元   | 乌头碱                                                    | 神经元兴奋              | 河豚毒素                                    | 抑制神经                            |
|                                                  | 肌肉细胞等 | 尤定形藜芦碱<br>木藜芦毒素<br>树蛙毒素<br>蝎毒素<br>鱼肉毒素<br>DDT<br>拟除虫菊酯 | →惊厥                | 石房蛤毒素<br>μ-食鱼螺毒素<br>局部麻醉剂<br>苯妥英<br>奎尼丁 | 元→麻痹,<br>麻醉<br>抗惊厥作用            |
| 8. 电压门控<br>Ca <sup>+</sup> 通道                    | 神经元   | Maitotoxin(?)                                          | 神经元/肌肉             | ω-食鱼螺毒素                                 | 抑制神经                            |
|                                                  | 肌肉细胞等 | Atrotoxin(?)<br>黑寡妇蜘蛛<br>毒素(?)                         | 兴奋<br>细胞损伤         | Pb <sup>2+</sup>                        | 元→麻痹                            |
| 9. 电压/Ca <sup>2+</sup><br>激活的K <sup>+</sup> 通道   | 神经元   | Pb <sup>2+</sup>                                       | 神经元/肌肉<br>抑制       | Ba <sup>2+</sup>                        | 神经元/肌肉兴                         |
|                                                  | 肌肉细胞  |                                                        |                    | 蜂毒明肽<br>(蜜蜂毒液)<br>树眼镜蛇毒素                | 奋→惊厥/痉挛                         |
| 10. Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> -<br>ATPase | 广泛存在  |                                                        |                    | 洋地黄糖苷                                   | 增强心脏收缩<br>兴奋性                   |
|                                                  |       |                                                        |                    | 夹竹桃甙<br>氰甙                              | 提高神经元的<br>兴奋性→震颤                |
| 11. 毒蕈碱 M <sub>3</sub><br>乙酰胆碱受体                 | 平滑肌   | Ind; ChE 抑制剂                                           | 平滑肌痉挛<br>流涎, 流泪    | 颠茄生物碱<br>(如阿托品)                         | 平滑肌松弛→<br>肠麻痹                   |
|                                                  | 腺体    |                                                        |                    | 颠茄碱样药物<br>(如 TCAD)                      | 流涎减少<br>流汗减少                    |
| 毒蕈碱 M <sub>1</sub> 乙<br>胆碱受体                     | CNS   | 氧震颤素<br>Ind; ChE 抑制剂                                   | 神经元兴奋<br>→惊厥       | 如上                                      |                                 |
| 12. 肾上腺素<br>α <sub>1</sub> 受体                    | 血管    | 去甲肾上腺素                                                 | 血管收缩               | 呱唑嗪                                     | α <sub>1</sub> 受体激动<br>毒的解毒作用   |
|                                                  | 平滑肌   | Ind; 可卡因<br>酪胺<br>苯丙胺<br>TCAD                          | →缺血<br>高血压         |                                         |                                 |
| 13. 5-HT <sub>2</sub> 受体                         | 平滑肌   | 麦角类生物碱<br>(麦角胺, 麦角<br>新碱)                              | 血管收缩<br>→缺血<br>高血压 | 酮色林                                     | 麦角中毒<br>的解毒作用                   |
| 14. 肾上腺素<br>β <sub>1</sub> 受体                    | 心肌    | 去甲肾上腺素                                                 | 增强心脏收缩<br>性以及兴奋性   | 氨乙心安<br>甲氧乙心安                           | β <sub>1</sub> 受体激动剂<br>中毒的解毒作用 |
|                                                  |       | Ind; 可卡因<br>酪胺<br>苯丙胺<br>TCAD                          |                    |                                         |                                 |

注: CN; = 中枢神经系统; ChE; 乙酰胆碱酯酶; Ind; 间接作用(如通过改变神经递质水平); TCAD; 三环抗抑郁剂

不仅见于受毒物影响的神经元,而且也见于受原发靶细胞影响的下游细胞。因此,阻断运动神经元电压门控的  $\text{Na}^+$  通道的河豚毒素可引起骨骼肌麻痹。相反,阻断中枢神经系统 GABA 受体的环二烯(cyclopicene)杀虫剂诱发神经兴奋和惊厥。化学物引起的瞬息细胞活动的障碍可能是由于4方面的改变:①神经递质浓度;②受体功能;③细胞内信号转导;④信号终止过程。

(1)神经递质水平的改变:化学物可通过干扰神经递质的合成、贮存、释放或从受体附近清除而改变突触的神经递质水平。酰肼(hydrazides)的致惊厥作用是由于它们能降低抑制性神经递质 GABA 的合成。利血平(reserpine)通过抑制去甲肾上腺素、5-羟色氨和多巴胺在神经元中的贮存而耗竭这些递质,引起几种严重的不良效应。肉毒杆菌毒素(botulinum toxin)引起的骨骼肌麻痹是由于乙酰胆碱从运动神经元释放的抑制作用以及神经肌肉接头上乙酰胆碱受体缺乏刺激。相反,有机磷或氨基甲酸酯农药或化学战争毒剂(如梭曼)可抑制胆碱酯酶的释放阻碍乙酰胆碱的水解,导致胆碱能受体的强大刺激和出现胆碱能危象。可卡因和三环抗抑郁药引起的去甲肾上腺素在神经元再摄取的抑制是血管平滑肌  $\alpha_1$ -肾上腺能受体过度兴奋的原因,导致可卡因严重滥用者鼻粘膜溃疡和心肌梗死;而  $\beta_1$ -肾上腺能受体的过度刺激导致威胁生命的心律不整。类似的心脏疾患可由氨非他明的滥用引起,因为氨非他明提高去甲肾上腺素从肾上腺素能神经元的释放并完全抑制这种介质的重摄取。高血压危象可发生于三环抗抑郁药和单胺氧化酶抑制剂(阻断不同机制的去甲肾上腺素排除的药物)联合应用时。

(2)毒物-神经递质受体交互作用:某些化学物直接与神经递质受体交互作用,这些化学物包括:①与受体上的配体结合部位相联系的激动剂以及模拟天然配体的激动剂;②占据配体结合部位但不能激活受体的拮抗剂;③激活剂;④抑制剂。在不存在其他作用时,激动剂和激活剂模拟、而拮抗剂和抑制剂阻断内源性配体特有的生理应答。例如,毒蝇菌胺(muscimol),一种蘑菇毒素是抑制性  $\text{GABA}_A$  受体的激动剂,而巴比妥酸盐、苯(并)二氮草类(benzodiazepines)、全身麻醉剂和醇类是活化剂。因此,所有这些物质引起中枢神经系统活性的抑制,随着摄入剂量的不同,导致镇静作用、全身麻醉、昏迷,最终导致延髓呼吸中枢的阻断。由激动剂/激活剂在兴奋性受体上所引起的应答及拮抗剂/抑制剂在抑制性部位所诱发的应答也存在着类似问题。因此,谷氨酸受体激动剂和毒蕈碱受体激动剂引起大脑神经元的兴奋性过高,最终导致惊厥, $\text{GABA}_A$  受体拮抗剂也是如此。在抑制性受体上作为激动剂/激活剂的化学物和在兴奋性受体上作为拮抗剂/抑制剂的化学物显然也起同样的作用。由于每一种神经递质具有多种类型的受体,这些受体受毒物的影响可能是有差异的。例如,神经元烟碱样乙酰胆碱受体对铅离子的抑制极其敏感,而肌肉的烟碱受体亚型却并非如此。

(3)毒物-信号转导蛋白交互作用:许多化学物通过作用于信号转导过程而改变神经元和(或)肌肉的活动。电压门控的  $\text{Na}^+$  通道转换和放大由配体门控的阳离子通道生成的兴奋性信号,它们受许多植物和动物毒素以及合成化学物如 DDT 激活,导致兴奋过度。相反,阻断电压门控的  $\text{Na}^+$  通道的毒物(如河豚毒素和蛤蚌毒素)可引起麻痹。 $\text{Na}^+$  通道在感觉神经元信号转导中也很重要。因此, $\text{Na}^+$  通道激活剂激惹感觉与反射,而  $\text{Na}^+$  通道抑制剂引起麻醉作用,这就解释了摄入附子后出现的反射性心动过缓和口中烧辣感(因为其中含有  $\text{Na}^+$  通道激活剂乌头碱)以及应用  $\text{Na}^+$  通道抑制剂如普鲁卡因和利多卡因的局部麻醉作用。

(4)毒物-信号终止蛋白的交互作用:由阳离子内流生成的细胞信号由于阳离子经通道或通

过转运蛋白清除而终止。阳离子的输出的抑制可延长兴奋,在  $\text{Ca}^{2+}$  活化的  $\text{K}^+$  通道被  $\text{Ba}^{2+}$  抑制时就出现这种情况,伴有潜在的致死亡神经兴奋和致痉作用;来自毛地黄和其他植物的糖苷抑制  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase,因而增加细胞内  $\text{Na}^+$  浓度,随后通过  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$  交换减少  $\text{Ca}^{2+}$  的输出,由此引起的细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度的升高提高了心肌的收缩性和兴奋性。

$\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  泵的失效也被认为是缺氧、低血糖和氰化物中毒引起的神经元损害的原因。鉴于神经元中生成的 70% ATP 用于驱动  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  泵,ATP 合成的中断引起细胞去极化并停留在去极化状态。去极化引起的神经递质释放(如谷氨酸从神经元释放)被认为是由谷氨酸的神经毒性作用引起的缺氧性癫痫发作和神经元损害进一步放大的重要原因。

2. 其他类型细胞活动的调节障碍 虽然很多信号转导机制也在非可兴奋细胞中运作,但这些过程的失调通常没有显著后果。例如,大鼠肝细胞具有  $\alpha_1$ -肾上腺素能受体,这些受体的激活引起代谢改变,如葡萄糖水解和谷胱甘肽输出的增加。细胞内钙的升高可能对细胞有毒理学意义。

许多外分泌细胞受毒蕈碱样乙酰胆碱受体调控。有机磷杀虫剂中毒后唾液分泌、流泪和支气管过度分泌就是由于这些受体的刺激;相反,这些受体的阻断可导致阿托品中毒时的高热。枯否细胞(居留于肝脏的巨噬细胞)分泌可损伤邻近细胞的炎症介质。由于枯否细胞具有甘氨酸受体,即甘氨酸门控的  $\text{Cl}^-$  通道,这些巨噬细胞的分泌功能(如炎症介质的分泌)可因摄入甘氨酸(通过  $\text{Cl}^-$  内流诱导超极化)而阻断,这种干预作用缓解了乙醇引起的肝损害。

某些磺胺药引起实验动物低血糖的发现导致了糖尿病患者口服血糖药的开发。这些药物抑制胰腺  $\beta$  细胞的  $\text{K}^+$  通道,随后诱导去极化, $\text{Ca}^{2+}$  通过电压门控的  $\text{Ca}^{2+}$  通道的内流以及胰岛素从细胞外排,抗高血压药二氮嗪以相反的方式作用于  $\text{K}^+$  通道,损害胰岛素的分泌。虽然这种作用通常并不希望出现,但它可开发应用于无法手术治疗的胰岛素分泌型胰腺肿瘤的治疗。

## 二、毒物引起的细胞维持功能改变

毒物引起细胞维持功能改变

在多细胞机体,细胞必须具备完整的自我维持功能,并对其他细胞提供支持功能。这些细胞的自身维持功能可被许多毒物所破坏,导致毒性反应。

### (一) 细胞内部维持自身功能的损害

为了生存,所有细胞必须合成内源性分子,组装大分子复合物、膜及细胞器,维持细胞内环境,并产生细胞活动所需的能量。破坏这些功能的毒物,特别是损害线粒体能量产生功能和控制基因组功能的蛋白质合成的毒物均可危及生存并可引起中毒性细胞死亡。

1. 危害细胞存活的原发性代谢紊乱 如 ATP 耗竭、 $\text{Ca}^{2+}$  蓄积、ROS/RNS 生成。

(1) ATP 耗竭:ATP 作为生物合成的化学物质和能量的主要来源在细胞维持中起核心作用。它用于许多生物合成反应、通过磷酸化和腺苷化作用活化内源化合物,掺入到辅因子及核酸中去。它对肌肉收缩和细胞骨架的聚合作用、为细胞运动、细胞分裂、囊泡转运提供能量和维持细胞形态都是必不可少的。ATP 驱动离子转运蛋白,如:质膜的  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase、质膜和内质网膜的  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase、溶酶体膜以及含神经递质的囊泡的  $\text{H}^+$ -ATPase。这些泵维持了各种细胞功能所必需的条件,例如:由  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  泵形成的穿质膜  $\text{Na}^+$  浓度梯度驱动  $\text{Na}^+$ -葡萄糖和  $\text{Na}^+$ -氨基酸

协同转运蛋白以及  $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$  反向转运蛋白,促使这些营养素的进入和  $\text{Ca}^{2+}$  的移动。

化学能通过 ATP 水解为 ADP 或 AMP 的形式来释放。ADP 在线粒体中由 ATP 合酶重新磷酸化(图 4-7)。与氢氧化为水相偶联,这一过程称为氧化磷酸化。除了 ATP 合酶,氧化磷酸化还需要:①氢以 NADH 的形式传递给初始电子转运复合物;②氧传递给终末电子转运复合物;③ADP 和无机磷转运给 ATP 合酶;④电子沿电子传递链流向  $\text{O}_2$ ,伴有质子从基质腔穿内膜逐出;⑤质子沿电化学梯度下穿越内膜返回到基质腔从而驱动 ATP 合酶。

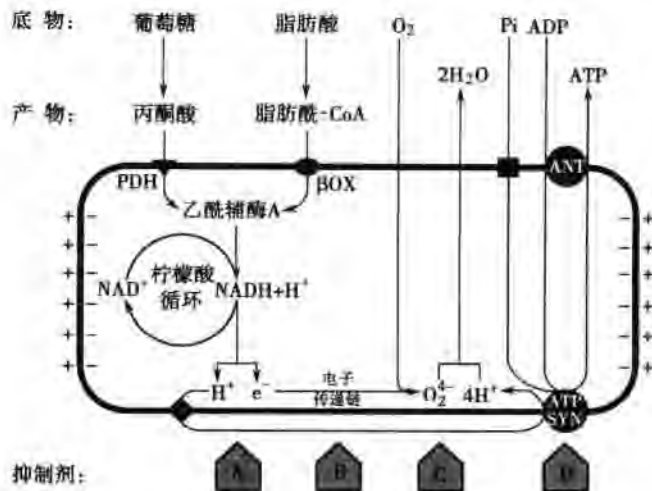


图 4-7 线粒体内的 ATP 合成(氧化磷酸化作用)

注:BOX:脂肪酸的 $\beta$ 氧化作用; $e^-$ :电子;Pi:无机磷酸盐;  
ANT:腺嘌呤核苷转位蛋白;ATP SYN:ATP 合酶( $F_0F_1$ ATP 酶)

几种化学物阻碍这些过程,干扰线粒体 ATP 合成。这些化学物分为五组(表 4-7):A 类物质干扰氢向电子传递链传递,例如,氟乙酸抑制柠檬酸循环和还原性辅因子的产生。B 类化学物如鱼藤酮和氰化物抑制电子沿电子传递链转移到分子氧。C 类毒物干扰氧传递到终末电子转运蛋白——细胞色素氧化酶。D 类化学物抑制 ATP 合酶(氧化磷酸化的关键酶)的活性。

表 4-7 损害线粒体 ATP 合成的化学物

A. 抑制氢向电子传递链传递的物质(作用于下述过程或作为下述因子)

1. 糖酵解(在神经元中起重要作用):低血糖症;碘乙酸盐和  $\text{NO}^+$  作用于 GAPDH
2. 糖原异生(在肾小管中起重要作用):辅酶 A 耗竭剂
3. 脂肪酸氧化作用(在心肌中起重要作用):降糖氨酸,4-戊烯酸
4. 丙酮酸脱氢酶:亚砷酸盐,DCVC,p-苯醌
5. 柠檬酸循环
  - (a) 乌头酸酶:氟乙酸盐,  $\text{ONOO}^-$
  - (b) 异柠檬酸脱氢酶:DCVC
  - (c) 琥珀酸脱氢酶:丙二酸盐,DCVC,PCBD-cys,2-溴氢醌,3-硝基苯丙酸,顺-巴豆酰胺杀菌剂
6. TPP 耗竭剂(抑制 TPP 依赖的 PDH 和  $\alpha$ -KGDH):乙醇

续表

7. 辅酶 A 耗竭剂:4-(二甲氨基)苯酚,p-苯醌
8. NADH 耗竭剂
  - (a) 见表 4-8 的 A. V. 1 组
  - (b) 聚(ADP-核糖)聚合酶的激活剂:引起 DNA 损伤的化学物(如 MNNG,过氧化氢,ONOO<sup>-</sup>)
- B. 电子传递的抑制物(作用于下述过程或作为下述因子)
  1. 电子传递复合物的抑制物
    - (a) NADH-辅酶 Q 还原酶(复合物 I):鱼藤酮,异戊巴比妥,MPP<sup>+</sup>,百草枯
    - (b) 细胞色素 Q-细胞色素 c 还原酶(复合物 III):抗霉素-A,粘噻唑
    - (c) 细胞色素氧化酶(复合物 IV):氰化物,硫化氢,叠氮化物,甲酸盐,·NO,磷化氢(PH<sub>3</sub>)
    - (d) 多作用点抑制物:二硝基苯胺和二苯基乙酰除草剂,ONOO<sup>-</sup>
  2. 电子受体:CCl<sub>4</sub>,阿霉素,维生素 K<sub>3</sub>,MPP<sup>+</sup>
- C. 抑制氧向电子传递链传递的物质
  1. 引起呼吸麻痹的化学物:CNS 抑制剂,抗惊厥剂
  2. 引起缺血的化学物:麦角类生物碱,可卡因
  3. 抑制血红蛋白氧合作用的化学物:一氧化碳,形成高铁血红蛋白的化学物
- D. 抑制 ADP 磷酸化作用的物质(作用于下述过程或作为下述因子)
  1. ATP 合酶:寡霉素,环己锡,DDT,十氯酮
  2. 腺苷酸转位蛋白:苍术甙,DDT,游离脂肪酸,溶血磷脂
  3. 磷酸转运蛋白:N-己基顺丁烯二酰亚胺,撒利汞,p-苯醌
  4. 降低线粒体膜电位的化学物(氧化磷酸化反应解联剂)
    - (a) 阳离子载体:五氯苯酚,二硝基酚除草剂,苯甲氰除草剂,噻重氮除草剂,水杨酸盐,阳离子的两亲药物(胺碘酮,呱克昔林),缬氨霉素,短杆菌肽,钙霉素(A23187)
    - (b) 能透过线粒体内膜的化学物:PCBD-cys,十氯酮
- E. 引起线粒体 DNA 损伤和损害关键线粒体蛋白转录的化学物:
  1. 抗病毒药:叠氮胸苷,2',3'-双脱氧胞苷,2',3'-双脱氧肌苷,脱氧氟代呋喃阿糖碘代尿嘧啶
  2. 乙醇(长期饮用)

注:DCVC:二氯乙烯基-半胱氨酸;GAPDH:3-磷酸甘油醛脱氢酶; $\alpha$ -KGDH: $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶;MNNG:N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍;MPP<sup>+</sup>:1-甲基-4-苯基吡啶鎓;PCBD-cys:五氯丁二烯基-半胱氨酸;PDH:丙酮酸脱氢酶;TPP:焦磷酸硫胺素

氧化磷酸化的损伤对细胞是有害的,因为 ADP 未能重新磷酸化导致 ADP 及其破坏产物的堆积以及 ATP 的耗竭。因此,由于腺苷二磷酸盐和三磷酸盐(以 Mg 盐形式存在)的水解以及磷酸和 Mg<sup>2+</sup> 的释放,暴露于 KCN 和碘乙酸的肝细胞胞浆 H<sup>+</sup> 和 Mg<sup>2+</sup> 迅速升高。丙酮酸转变为乳酸增加也可能引起酸中毒。ATP 的缺乏危及需 ATP 的离子泵的运用,导致离子及细胞容量调节控制的丧失。细胞内的酸中毒及高镁血症后不久,暴露于 KCN 和碘乙酸的肝细胞即出现细胞内 Na<sup>+</sup> 的升高,可能是由于 Na<sup>+</sup> 泵的失效,随后质膜出现大疱状结构。细胞内磷酸症是有益的,可能是由于释放的磷酸形成不溶性的磷酸钙,防止具有有害后果的胞浆 Ca<sup>+</sup> 的升高。此外,低 pH 也直接降低了磷脂酶的活性,抑制线粒体渗透转移。最终,细胞内 pH 升高,增加酸酯酶活性,这就导致不可逆的膜损伤,不仅是通过磷脂的降解,而且也通过内源性去垢剂如溶血磷脂和游离脂肪酸的生成。由于溶血性磷脂与脂肪酸的再酰化过程受损,ATP 的缺乏加剧了这种变化。

(2) 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的持续升高; 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平是受到严格调控的。细胞外和胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  浓度之间所存在的 10,000 倍差异是通过质膜对  $\text{Ca}^{2+}$  的不渗透和  $\text{Ca}^{2+}$  从胞浆清除的转运机制来维持,  $\text{Ca}^{2+}$  从胞浆穿过质膜被主动泵出, 并隔离在内质网和线粒体内(图 4-8)。由于线粒体配备的转运蛋白为低亲和力的, 故仅当胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  水平升高到微摩尔浓度范围时, 线粒体才在  $\text{Ca}^{2+}$  隔离中起有意义的作用。在这种情况下, 大量  $\text{Ca}^{2+}$  蓄积于线粒体中, 以磷酸钙形式沉积。

毒物通过促进  $\text{Ca}^{2+}$  向细胞质内流或抑制  $\text{Ca}^{2+}$  从细胞质外流而诱导胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  水平的升高(表 4-8)。配体或电压门控的  $\text{Ca}^{2+}$  通道开放或质膜损伤引起细胞外液与细胞质间  $\text{Ca}^{2+}$  浓度梯度的下移。毒物也可诱导  $\text{Ca}^{2+}$  从线粒体或内质网漏出而增加胞浆  $\text{Ca}^{2+}$ 。它们也可通过抑制  $\text{Ca}^{2+}$  转运蛋白或耗竭其驱动力而减少  $\text{Ca}^{2+}$  的外流。几种能引起胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  水平持续升高的化学物列于表 4-8。细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  的持续升高是有害的, 因为它能导致: ①能量储备的耗竭; ②微丝功能障碍; ③水解酶的活化; ④ROS 和 RNS 的生成。

表 4-8 引起细胞质内  $\text{Ca}^{2+}$  浓度持续增高的化学物

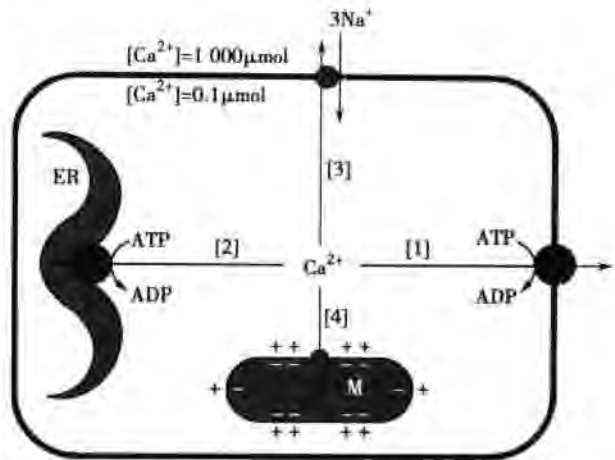


图 4-8  $\text{Ca}^{2+}$  从细胞浆中消除的四种机制

注:  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶介导的  $\text{Ca}^{2+}$  泵入 [1] 细胞外空间以及 [2] 内质网 [ER]; 离子梯度驱动  $\text{Ca}^{2+}$  转运到 [3] 细胞外空间 (通过  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$  交换体) 以及 [4] 线粒体 (M; 通过  $\text{Ca}^{2+}$  单向转运蛋白)

#### A. 诱导 $\text{Ca}^{2+}$ 流入胞浆的化学物

##### I. 神经元的配体门控通道

1. 谷氨酸受体激动剂(“兴奋毒素”): 谷氨酸盐, 红藻氨酸盐, 软骨藻酸盐
2. “辣椒素受体”激动剂: 辣椒素, 树脂毒素

##### II. 经电压门控通道: 沟鞭藻毒素 (maitotoxin) (?), $\text{HO} \cdot$

##### III. 经“新形成的孔道”: 沟鞭藻毒素, 两性霉素 B, 十氯酮, 甲基汞, 烷基锡

##### IV. 通过被破坏的细胞膜:

1. 去污剂: 外源性去污剂, 溶血磷脂, 游离脂肪酸
2. 水解酶: 蛇毒中的磷脂酶, 内源性磷脂酶  $\text{A}_2$
3. 脂质过氧化剂: 四氯化碳
4. 细胞骨架毒物(通过诱导细胞膜大疱形成): 细胞松弛素, 鬼笔环肽

##### V. 从线粒体流出

1. 线粒体内 NADH 的氧化剂: 四氧嘧啶, t-BHP, NAPBQI, 豌豆嘧啶, 脂肪酸氯化氧化物, 维生素  $\text{K}_3$ ,  $\text{MPP}^+$
2. 其他: 苯胍氧化物, 胶毒霉素,  $\cdot \text{NO}$ ,  $\text{ONOO}^-$

##### VI. 从内质网流出:

1.  $\text{IP}_3$  受体激活剂:  $\gamma\text{-HCH}$  (林丹), 在“兴奋毒性作用”中形成的  $\text{IP}_3$
2. 理阿诺碱 (ryanoidine) 受体激活剂:  $\delta\text{-HCH}$

续表

B. 抑制  $\text{Ca}^{2+}$  流出胞浆的化学物(细胞膜和(或)内质网  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 的抑制剂)

- I. 共价结合物:乙酰氨基酚,溴苯,  $\text{CCl}_4$ , 氯仿, DCE
- II. 巯基氧化剂:胱胺(形成混合的二硫化物), 二元胺, t-BHP, 维生素  $\text{K}_3$ , 敌草快
- III. 其他:钒酸盐,  $\text{Cd}^{2+}$
- IV. 破坏线粒体 ATP 合酶的化学物

注: DCE: 1,1-二氯乙烯; t-BHP: t-丁基氢氧化物; HCH: 六氯环己烷;  $\text{MPP}^+$ : 1-甲基-4-苯基吡啶鎓; NAPBQI: N-乙酰基-p-苯醌亚胺

1) 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  持续升高对细胞能量平衡产生不良的影响; 其机制至少有三种: 首先, 胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  水平升高引起线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  单转运蛋白(uniporter)摄取  $\text{Ca}^{2+}$  增加。这种单转运蛋白像 ATP 合酶一样, 利用线粒体内膜的负电位( $\Delta\psi_m$ )作为驱动力。因此线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  摄取使  $\Delta\psi_m$  消失, 并抑制 ATP 合成。此外, 氧化线粒体 NADH 的毒物可激活从线粒体基质间腔逐出  $\text{Ca}^{2+}$  的转运蛋白, 紧接着发生的  $\text{Ca}^{2+}$  由线粒体继续摄取和外运(“ $\text{Ca}^{2+}$  循环”), 进一步危害氧化磷酸化过程。其次,  $\text{Ca}^{2+}$  也可能通过对内膜造成氧化损伤而损害 ATP 合成。其三, 胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  的持续升高不仅损害 ATP 合成, 而且也由于  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 用于排除多余的  $\text{Ca}^{2+}$  而增加 ATP 的消耗。

2) 胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  不可控制的升高引起细胞的微丝的解离: 遍布细胞的肌动蛋白(actin)微丝网络借助于其纤丝附着于质膜的肌动蛋白结合蛋白来维持细胞的形态。胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  的增高引起肌动蛋白纤丝与  $\alpha$ -辅肌动蛋白( $\alpha$ -actinin)和胞影蛋白(fodrin)解离, 导致质膜大疱形成, 使质膜易于破裂。

3) 高  $\text{Ca}^{2+}$  水平可激活降解蛋白质、磷脂和核酸的水解酶: 许多整合性膜蛋白质是  $\text{Ca}^{2+}$  激活的中性蛋白酶或钙蛋白酶(calpains)的靶分子。钙蛋白酶介导的肌动蛋白结合蛋白的水解也可引起膜大疱形成;  $\text{Ca}^{2+}$  对磷脂酶的激活引起膜的破坏;  $\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+}$ -依赖的核酸内切酶的激活引起染色质的断裂;  $\text{Ca}^{2+}$  水平的升高封闭拓扑异构酶 II, 使已断裂的 DNA 无法重新联结。总之, 细胞内钙升高激活了干扰细胞维持其结构和功能完整性的过程。

(3) ROS 与 RNS 的过度产生: 有许多外源化学物可直接生成 ROS 与 RNS, 如氧化还原循环物质和过渡金属。此外, ROS 和 RNS 的过度产生可继发于细胞内高钙, 因为  $\text{Ca}^{2+}$  以下述方式激活生成 ROS 和 RNS 的酶:

1)  $\text{Ca}^{2+}$  活化柠檬酸循环中的脱氢酶加速氢从柠檬酸循环中产出, 然后, 电子沿电子传递链流动, 这一过程与 ATP 合酶活性的抑制共同增加由线粒体电子传递链形成的  $\text{O}_2^- \cdot$ 。

2)  $\text{Ca}^{2+}$  激活的蛋白酶通过蛋白质水解过程使黄嘌呤脱氢酶转变为黄嘌呤氧化酶, 其副产品是  $\text{O}_2^- \cdot$  和  $\text{HOOH}$ 。

3)  $\text{Ca}^{2+}$  激活神经元和内皮细胞组成型表达的 NO 合酶(NOS)。由于 NO 与  $\text{O}_2^- \cdot$  具有极高的反应性, 这些自由基的共同产物必将不可避免地导致  $\text{ONOO}^-$  的形成, 这是一种高反应性的氧化剂。而且,  $\text{ONOO}^-$  能通过使高敏感性的 Mn-SOD (可清除  $\text{ONOO}^-$  的前身  $\text{O}_2^- \cdot$ ) 失效而增加其自身的形成。

2. 原发性代谢紊乱之间的相互影响导致的细胞紊乱 上面讨论的细胞生化过程的原发性紊乱不是孤立的, 而是以多种方式相互作用、彼此放大:



(1) 细胞 ATP 储存的耗竭剥夺了内质网质膜  $\text{Ca}^{2+}$  泵的燃料,引起胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  的升高。随着  $\text{Ca}^{2+}$  内流进线粒体,  $\Delta\psi_m$  下降, ATP 合酶发生障碍。

(2) 如上所述,细胞内高钙促进 ROS 和 RNS 的形成,而 ROS 与 RNS 使巯基依赖的  $\text{Ca}^{2+}$  泵发生氧化性失活,这反过来又加剧了高钙。

(3) ROS 与 RNS 也能消耗 ATP 储备, NO 是一种可逆的细胞色素氧化酶的抑制剂。NO<sup>+</sup> (亚硝基鎓阳离子,一种 NO 的产物)使甘油醛-3-磷酸脱氢酶发生 S-亚硝酰化,因而使之失活,损害糖酵解作用,而 ONOO<sup>-</sup> 使呼吸链复合物 I、II、III 和顺乌头酸酶发生不可逆的失活(与这些酶的 Fe-S 中心反应)。因此,NO 和 ONOO<sup>-</sup> 抑制细胞 ATP 合成。

(4) ONOO<sup>-</sup> 能诱发 DNA 单链断裂,导致聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)激活。作为修复策略的一部分,激活了的 PARP 将来自 NAD<sup>+</sup> 的多个 ADP-核糖部分转移到核蛋白和 PARP 本身, NAD<sup>+</sup> 的消耗严重地危及 ATP 合成,而 NAD<sup>+</sup> 的再合成又消耗 ATP,因此由 ONOO<sup>-</sup> 引起的 DNA 损害的主要后果是细胞能量亏欠。

这些功能障碍过程及其引起一系列损害有些是某些细胞特有的。例如,氰化物的神经毒性去极化和谷氨酸释放,随后  $\text{Ca}^{2+}$  经电压门控及谷氨酸门控的通道内流有关。神经元在表达  $\text{Ca}^{2+}$  激活的 NOS 时,也易于产生“亚硝化应激”,这种应激不仅影响神经元本身,可能更重要的是影响邻近的星形胶质细胞。相反,在氰化物和碘乙酸中毒的肝细胞,胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  增加不是早期发生,也可能与 NO 形成极少有关。然而,ATP 耗竭,细胞内高钙和 ROS 及 RNS 过度产生有交互影响,涉及多步毒性循环,可能进行性的加剧生化紊乱,直至细胞死亡。

3. 线粒体损伤在细胞死亡(坏死与凋亡)中的作用 线粒体  $\text{Ca}^{2+}$  摄取、 $\Delta\psi_m$  下降、ROS 和 RNS 生成、ATP 耗竭和原发性代谢紊乱(如无机磷、游离脂肪酸和溶血磷脂的蓄积)可引起线粒体内膜渗透性突然升高。线粒体渗透转变(mitochondrial permeability transition, MPT)是由一种跨越线粒体内外膜间的蛋白质孔(“巨通道”)开放而引起的。由于这种孔洞对小于 1500Da 的溶质是可通透的。因此,它的开放使质子自由地内流进基质间隙,引起的  $\Delta\psi_m$  迅速和完全消散、ATP 合成的中断以及水的渗透内流,导致线粒体膨胀,已蓄积于基质间隙的  $\text{Ca}^{2+}$  通过孔流出,涌进胞质。这样的线粒体不仅不能合成 ATP,而且由于内膜的去极化迫使 ATP 合酶以相反的模式(即作为一种 ATPase 水解 ATP)运作,从而浪费余留的资源。然后,糖酵解也按需 ATP 的糖酵解酶(己糖激酶,磷酸果糖激酶)ATP 供应不足而被危及。假如毒物引起的代谢紊乱十分广泛以至于大部分或全部的线粒体都发生 MPT,引起细胞 ATP 耗竭时,细胞降解过程(如大分子和膜的氧化性和水解性降解以及细胞内溶质和容积稳态的崩解)将不可避免地发生,引起细胞结构和功能维持的完全丧失、细胞溶解或坏死。

化学物也可诱发另一种形式的死亡——凋亡。坏死的细胞出现肿胀与溶解,而凋亡的细胞则出现皱缩,其核和胞质物质浓缩,然后破坏,形成被吞噬的膜结合的碎片(凋亡小体)。

如上所述,一个细胞在其通往坏死的道路上所经历的多重代谢缺陷是互为因果的,但在次序上却是相当随机的。与之相反,通往凋亡之路是有序的,牵涉到最终细胞解组装的分解代谢过程的级联样激活,近年来,许多凋亡途径的详情已被揭示。大多数化学物(即使不是全部)诱发的细胞死亡涉及线粒体,导致的线粒体功能失调(如  $\text{Ca}^{2+}$  的蓄积,  $\Delta\psi_m$  的消散、ROS/RNS 的过量产生),最终触发坏死或凋亡(图 4-9)。同时, MPT 是这两个过程的关键事件。另一个相关事件是细胞色素 C(Cyt C)从线粒体进入胞质。

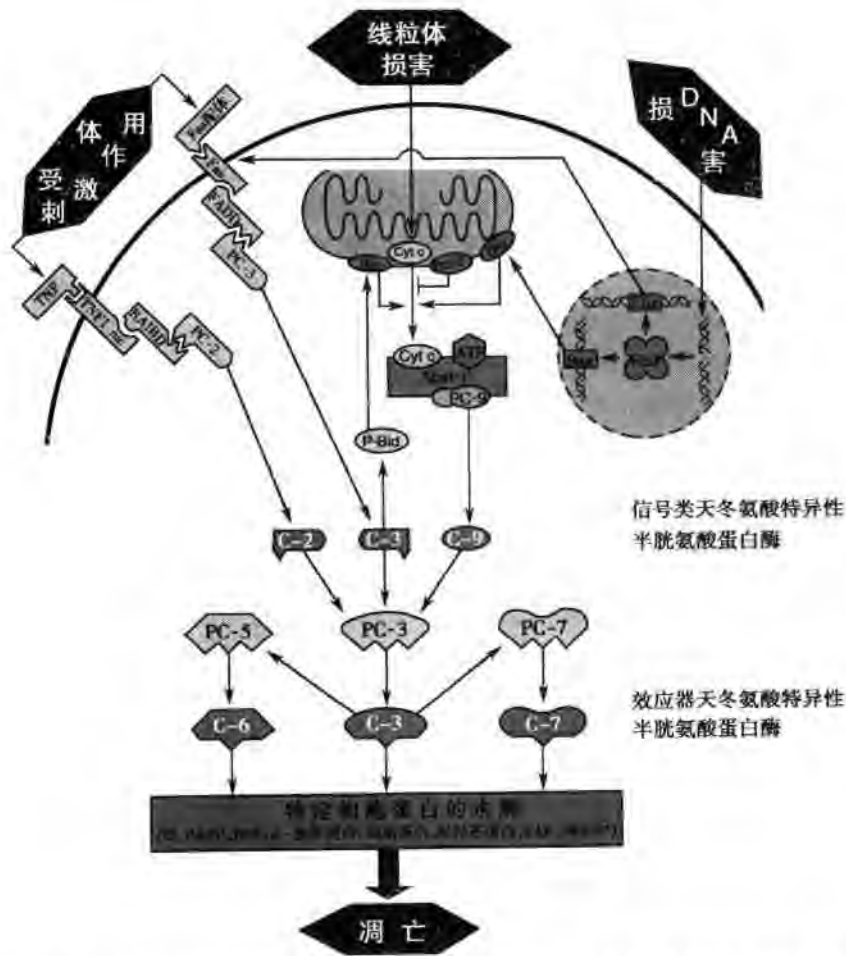


图 4-9 线粒体损害,核 DNA 损害和 Fas 或 TNF 受体刺激启动的凋亡途径

注:本图为凋亡三种途径的简图:①线粒体损害最终打开了跨越线粒体膜的通透性转变孔道和(或)引起细胞色素 C(Cyt C)从线粒体逸出。Cyt C 逸出为 Bax 或 Bid 蛋白所促进,为 Bcl-2 蛋白所抑制。②DNA 损伤,特别是双链断裂,激活 P<sub>53</sub> 蛋白,提高了 Bax 蛋白(介导 Cyt C 逸出)和膜受体蛋白 Fas 的表达。③Fas 配体或肿瘤坏死因子结合并激活它们对应的受体(Fas 和 TNF1 受体),这些配体结合的受体和逸出的 Cyt C 与特定的连接物蛋白(如, FADD, RAIDD 和 Apaf-1)相互作用,使天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶原(PC)蛋白水解活化成为活性的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶(C)。随后依次裂解和激活其他蛋白(如, Bid, P-Bid 的前体)和 PC-3(一种主要的效应器天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶原)。活化的效应器天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 激活其他效应天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶前体(PC-6, PC-7)。最后 C-3, C-6 和 C-7 剪切特异的细胞蛋白,借此凋亡发生。这些途径不是在所有类型细胞都同等相关的,其他途径如应用 TGF- $\beta$  作为细胞外信号分子和神经酰胺作为细胞内信号分子的那些途径也存在。DFF:DNA 断裂因子;FAK:粘着斑激酶;PARP:聚(ADP-核糖)聚合酶;SREBP:固醇调节元件结合蛋白。

Cyt C 释放的意义有两方面:①由于 Cyt C 处于线粒体电子传递链上倒数第二个环节,它的丢失将阻断 ATP 合成。增加的  $O_2 \cdot$  形成,促使细胞走向死亡;②同时,释放的 Cyt C(可能还有从线粒体游离的其他蛋白质)代表一种指引细胞向凋亡途径发展过程中的一种信号或启动环节。当 Cyt C 与 ATP 一起结合于一种连接物蛋白(Apaf-1)时,Cyt C 能诱发 Apaf-1 结合的休眠

状态的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶原-9 (procaspase-9), 发生蛋白水解断裂而成为活性的天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-9 (caspase-9)。

caspases 是一类能在特定的天冬氨酸残基劈裂蛋白质的半胱氨酸蛋白酶(即它们具有催化活性的半胱氨酸)。它们以无活性的形式——天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶原存在于胞质中, 该酶原经蛋白水解转变为活性蛋白酶。某些 caspases (如 2、8 和 9) 断裂和激活 procaspases。借此这些信号型 caspases 传递活化的信号波到所谓效应器 caspases, 它们修剪特定的细胞蛋白, 使细胞蛋白的活化或失活。正是 caspase 催化的这些特定蛋白的水解, 直接或间接地解释了凋亡细胞的形态学和生物化学改变。例如, PARP 酶蛋白的水解失活阻止了无效的 DNA 修复和 ATP 的浪费; DNA 断裂因子的水解活化诱导核 DNA 的断裂; 结构蛋白(如  $\alpha$ -胞影蛋白、肌动蛋白、核纤层蛋白)的修剪有助于细胞的解组装; 粘着斑激酶的失效使得细胞与细胞外间质分离; 固醇调节元件结合蛋白的水解激活可导致固醇的蓄积和质膜中磷脂酰丝氨酸的外在化, 这种外在化作用使吞噬细胞识别凋亡细胞。

MPT 和 Cyt C 释放受 Bcl-2 家族的蛋白质控制, 这一家族包括促进(如 Bax、Bad、Bid)和抑制(如 Bcl-2、Bcl-XL)上述过程的成员。促进死亡的成员可能直接作用于线粒体膜, 而它们的抑制死亡对应物被认为主要是通过与死亡激动剂二聚作用, 因而使之中性化。因此, 相当数量的这些拮抗性蛋白质作为细胞存活与死亡之间的调节开关而发挥其功能。

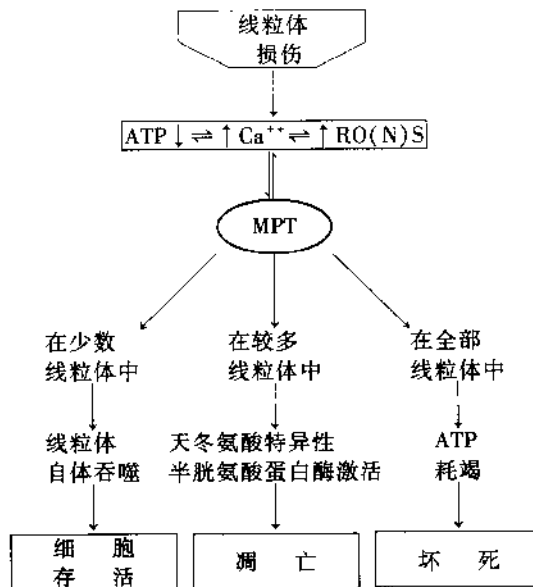


图 4-10 受损细胞命运的“决定方案”

注: MPT: 线粒体通透性转变, RO(N)S: 活性氧或活性氮

4. ATP 的利用度决定细胞死亡的形式 凋亡与坏死存在着几种共同的特征。首先, 许多外源化学物如肝毒物乙酰氨基酚、1,1-二氯乙烯、硫代乙酰胺和镉以及肾毒物赭曲霉毒素引起细胞凋亡, 也引起坏死。毒物在低暴露水平或高水平暴露后的早期阶段倾向于诱发凋亡, 而在高暴露水平后则引起坏死。此外, 由细胞毒物引起的两种形式的细胞死亡就可能涉及类似的代谢紊乱, 其中最重要的是 MPT。而 MPT 的阻断剂(如环孢霉素 A、Bcl-2 过度表达)既阻止凋亡, 也阻止坏

死的发生。那么,决定受损伤的细胞是发生凋亡还是坏死的因素是什么呢?最近的发现提示,ATP 的利用度是决定细胞死亡形式的关键。在  $\text{Ca}^{2+}$ -暴露的肝细胞、Fas 刺激的 T 细胞和 HOOH 暴露的内皮细胞这样不同的实验模型中,均发现细胞耗竭 ATP 时出现坏死,但当提供 ATP 生成的基质而使 ATP 耗竭得以缓解时,则发生凋亡(图 4-10)。毒物导致细胞死亡的结局往往是未知的,假如这些过程突然发生,则可能以坏死的形式出现,而假如这些过程拖延较久,则以凋亡形式出现。

## (二) 细胞外部维持功能的损害

毒物也能干扰那些给其他细胞组织或整个机体专门提供支持的细胞。作用于肝脏的毒物就是这类毒性的一个实例。肝细胞产生并释放许多蛋白质和营养素进入循环中,从循环中清除胆固醇和胆红素,将它们分别转化为胆汁酸和胆红素葡萄糖醛酸酯,这些过程的中断可能对机体、肝或对两者均是有害的。例如,由香豆素引起的肝脏凝血因子合成抑制并不损害肝,但可因出血而引起死亡。这是杀鼠灵灭鼠作用的机制。在禁食状态,肝葡萄糖异生作用抑制剂如降糖氨因其限制脑的葡萄糖供应可能具有致死作用。同样地,Reye 综合征被认为是因病毒性疾病(可诱导肝 NOS)和水杨酸(可激发 MPT)摄取的联合作用引起的肝线粒体损伤。这种综合征不仅引起肝细胞损害,而且也引起影响其他器官的严重代谢紊乱(低血糖和高血氨)。对脂肪酸  $\beta$ -氧化或合成、组装和脂蛋白分泌的化学性干扰使肝脏脂质过度负荷,引起肝功能紊乱。 $\alpha$ -萘异硫氰酸酯引起的细胞间紧密连接(封闭胆小管作用)的分离,损害胆汁分泌并导致胆汁酸和胆红素滞留,对肝脏和整个机体造成不良影响。

(庄志雄)

化学物对不同的物种、品系、个体,在不同的条件下,在不同的环境中所诱导的毒性是有差异的。认识外源化学物毒性作用的影响因素对外源化学物的安全性评价、毒理学研究的设计及其资料的评估都是十分重要的。

外源化学物或其代谢产物必须以具有生物学活性的形式到达靶器官、靶细胞,达到有效的剂量、浓度,持续足够的时间,并与靶分子相互作用,或改变其微环境,才能够造成毒性作用。任何影响这一过程的因素都会影响化学物的毒性作用。影响因素归纳为四个方面:①化学物因素;②机体因素;③化学物与机体所处的环境条件;④化学物的联合作用。

## 第一节 化学物因素

化学物的化学结构决定其理化性质和生物学活性,影响吸收、分布和排泄。而其剂型、不纯物含量、稳定性等因素也会影响其生物学活性。

### 一、化学结构

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

化学物的化学结构决定了将会发生的代谢转化类型,可能参与和干扰的生化过程,从而决定它的毒性作用的性质和大小。研究化学物的化学结构与其毒性作用之间的关系,找出其规律,有助于通过比较预测,开发高效低毒的新化学物;从分子水平上推测新化学物的毒作用机制;预测新化学物的毒性效应和安全接触限量。

#### (一) 取代基的影响

苯具有麻醉作用和抑制造血功能的作用,当苯环中的氢被甲基取代后(成为甲苯或二甲苯),抑制造血功能的作用不明显但麻醉作用大于苯;被氨基取代后,有形成高铁血红蛋白的作用;而被硝基(硝基苯)或卤素取代(卤代苯)后,具有肝毒性。烷烃类的氢若被卤素取代,其毒性增强,对肝的毒作用增加,且取代愈多,毒性愈大,如  $\text{CCl}_4 > \text{CHCl}_3 > \text{CH}_2\text{Cl}_2 > \text{CH}_3\text{Cl}$ 。

## (二) 异构体和立体构型

异构体的生物活性有差异,典型的例子是六六六,有七种同分异构体。常用的有 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 和 $\delta$ 等: $\gamma$ 、 $\delta$ -六六六急性毒性强; $\beta$ -六六六慢性毒性大; $\alpha$ 、 $\gamma$ -六六六对中枢神经系统有很强的兴奋作用; $\beta$ 、 $\delta$ -六六六则对中枢神经系统有抑制作用。带两个基团的苯环化合物的毒性是:对位>邻位>间位,分子对称的>不对称的。三邻甲苯磷酸酯(TOCP)可导致迟发性神经毒性,但当邻位的甲基转到对位,则失去了其迟发性神经毒性。反应停的S(-)镜像物比R(+ )镜像物有更强的胚胎毒性。

某些酶和受体有立体构型的特异性,从而生物转运和生物转化的各个阶段都可能受到影响,如:L-二羧基苯丙胺酸比D-同分异构物更容易从胃肠吸收;布洛芬(+ )和(-)镜像物与血浆蛋白质的结合率之比是1.5;普萘洛尔的S镜像物选择性地储藏在某些组织如心脏的肾上腺素能神经末梢中;化学物的(+ )与(-)镜像物在肾脏和胆汁中的排泄也是不同的。

酶通常以高度立体和对映体选择性方式与其底物交互作用,对对映体区别对待,不同的同分异构物代谢的比率可能不同。对于细胞增殖抑制药物如环磷酰胺和异环磷酰胺, $\beta$ -肾上腺素能拮抗药如美托洛尔等,现已有对映体被选择性代谢的报道。而更受到关注的是前致癌物表现出立体选择性的活化作用。如:多环烃苯(a)苊被特异的细胞色素P-450同工酶CYP1A1立体选择性地代谢为(+)-7R, 8S环氧化物,再被环氧化物水解酶代谢为(-)-7R, 8R二氢二醇,进而被代谢为(+)-苯并(a)苊7R, 8S二氢二醇,9S, 10R环氧化物,其羟基和环氧化物是反式(反镜像物)。这一有完全结构7R, 8S, 9S, 10R的(+)-反镜像物的直接诱变性和致癌性最高。

当化学物的外消旋混合物被给予动物时,要么立体选择性地代谢,形成两种或更多不同的异构产物,要么只有一种同分异构物被代谢。这有重要的毒理学意义。

## (三) 同系物的碳原子数和结构的影响

饱和脂肪烃甲烷和乙烷是惰性气体,仅仅在高浓度时引起单纯窒息作用;从丙烷起随着碳原子数的增多麻醉作用增强,脂溶性随着碳原子数的增多而增加,超过9个碳原子后,对人体产生麻醉作用的危险逐步减少。 $\omega$ -氟羧酸的比较毒性研究表明:其碳原子数是奇数的毒性大,偶数的毒性小。而一般碳原子数相同时直链化合物毒性大于异构体,成环化合物毒性大于不成环化合物。如直链烷烃的麻醉作用大于其同分异构体:庚烷>异庚烷,正己烷>新己烷;环烷烃的麻醉作用>开链烃:环戊烷>戊烷。

## (四) 分子饱和度

碳原子数相同时,不饱和键增加其毒性增加,如乙烷的毒性<乙烯的毒性<乙炔的毒性。

## (五) 与营养物和内源性物质的相似性

某些外源化学物结构与主动转运载体的底物类似,可借助这些特异的载体系统吸收。例如,尿嘧啶类似物抗癌药物氟尿嘧啶被嘧啶转运系统携带;铬和锰通过铁转运机制吸收;铅在肠管经由钙转运系统主动吸收。除草剂百草枯被主动吸收进入肺组织决定了它的肺毒性。



## (二) 大小

较小分子量 ( $<200$ ) 的亲水性分子如乙醇或尿素能经膜孔 (直径为  $0.4\text{ nm}$ ) 以滤过方式越膜。然而离子化合物、甚至小离子, 例如钠, 则不能通过膜孔, 因为在水性环境中钠离子事实上成为水合物而大于正常膜孔。化学物微粒的大小与分散度成反比。分散度越大粒子越小, 其比表面积越大, 表面活性越大。如一些金属烟的表面活性大, 可以与呼吸道上皮细胞或细菌等蛋白作用, 引起发热 (金属热)。而微粒较大的金属粉尘却不能引起金属热。分散度的大小还可影响其进入呼吸道的深度和溶解度, 从而影响毒性作用。

## (三) 挥发性

在常温下挥发性大的液态化学物易形成较大的蒸气压, 易于经呼吸道吸入。例如, 苯与苯乙烯的  $LC_{50}$  均为  $45\text{ mg/L}$  左右, 但苯的挥发性较苯乙烯大 11 倍, 故其经呼吸道吸入的危害性远较苯乙烯为大。但对污染皮肤并经皮吸收的液态化学物, 则挥发性大的较挥发性小、粘稠不易去除的危害性小, 因其接触时间较短。拌饲染毒时应注意, 挥发性的化学物加入饲料后可因挥发而减少接触剂量。

## (四) 比重

在密闭的、长期空气不流通的空间, 如沼气池、竖井、地窖、地沟和废矿井中, 有毒气体可能因比重不同而分层, 不乏贸然下去导致中毒事故的报道。化学性火灾的有毒烟雾比重较轻, 应匍匐逃生。

## (五) 电离度和荷电性

化学物主要以简单扩散的方式跨生物膜转运, 只有非离子化形式可以简单扩散通过脂质双分子层。pKa 值不同的化学物在 pH 不同的局部环境中电离度不同, 影响其跨膜转运。如在酸性条件下弱酸主要是非离子化的而弱碱主要是离子化的。空气中的化学物微粒的荷电性影响其在空气中的沉降和呼吸道的阻留率。

## 三、不纯物和化学物的稳定性

评价化学物的毒性应尽可能采用其纯品。但实际工作中, 常常需要评价工业品和商品的毒性。受检样品中常含有不纯物, 包括原料、杂质、副产品、溶剂、赋形剂、稳定剂和着色剂等。这些不纯物可能影响受检化学物的毒性, 甚至比受检化学物的毒性高, 可影响对受检化学物毒性的正确评价。例如早期对除草剂 2,4,5-T 进行研究时, 由于样本中含有相当量 ( $30\text{mg/kg}$ ) 的剧毒物质二噁英 (TCDD), 其急性经口  $LD_{50}$  (雌大鼠) 仅为 2,4,5-T 的万分之一; 其致胚胎毒性的剂量相当于 2,4,5-T 经口  $LD_{50}$  (雌大鼠) 的 400 万分之一。因而, 得到的 2,4,5-T 的毒性结果都是 TCDD 的。即使 2,4,5-T 中杂质含量低于  $0.5\text{ mg/kg}$ , 仍然影响其毒性。这提示我们, 要尽可能弄清楚受检化学物的组成、成分及其比例, 包括同分异构体的组成和比例。

毒物在使用情况下不稳定可能影响毒性。如有机磷酸酯杀虫剂库马福司在储存中形成的分



解产物对牛的毒性增加。所以在进行毒理学实验研究之前,应获得使用情况下的稳定性资料。

## 第二节 机体因素

动物的不同物种、品系和个体,对同一化学物的毒性反应有量和质的差异。个体之间的反应也可从无到出现严重损伤以至死亡,即使在双生子之间亦不例外。而且,大多数化学毒物只造成机体一个或几个组织器官的损害,而不能使所有的组织器官受累。

目前认为引起物种、品系、个体差异以及选择毒性的比较重要的机体因素是:①物种间遗传学的差异;②个体遗传学的差异;③机体的其他因素。

### 一、物种间遗传学的差异

#### (一) 解剖、生理的差异

不同物种、种属、品系的动物的解剖、生理、遗传学和代谢过程均有差异。例如肝脏分叶,狗为7叶,兔5叶,大鼠6叶,小鼠4叶,且大鼠无胆囊;大鼠和小鼠全年均可发情,狗只有在春秋两季两次发情;体细胞染色体的数目狗为78个,兔44个,大鼠42个,小鼠40个,人46个。各种动物的脉率(次/分钟)随体重增加而降低:小鼠600次,大鼠352次,豚鼠290次,猫240次,兔251次,狗120次,绵羊43次,马38次。此外,以人心脏每分钟输出量占总血量的比值为1,则小鼠为20,所以化学物从血浆中清除的半衰期小鼠较人短,相同剂量的化学物对人体的作用时间比小鼠长。这可以部分解释人比小鼠对毒物更敏感。

#### (二) 代谢的差异

代谢转化的差异,包括量的差异和质的差异,是影响化学物毒性的主要因素。量的差异意味着占优势的代谢途径不同,可导致毒性反应的不同。如小鼠每克肝脏的细胞色素氧化酶活性为141活性单位,大鼠为84,兔为22。苯胺在猪、狗体内转化为毒性较强的邻氨基苯酚,而在兔体内则生成毒性较低的对氨基苯酚; $\beta$ -萘胺在人体内经N-羟化可诱发膀胱癌,而豚鼠肝脏内不能将其N-羟化,因而不诱发肿瘤。乙二醇氧化代谢生成草酸和 $\text{CO}_2$ 的代谢速率在不同的动物中不同,猫>大鼠>兔,其毒性反应也依此递减。

代谢酶还存在质的差异。如猫,缺乏催化酚葡萄糖醛酸结合的同工酶,因而猫对苯酚的毒性反应比其他能通过葡萄糖醛酸结合解毒的动物敏感。

为了对人类的情形作出切合实际的预测,选择正确的物种和品系是非常重要的。如,一般来说,灵长类大体上是最好的动物模型。但如果用猕猴研究烹饪的肉中存在的杂环胺的致癌作用,由于猕猴缺乏使大部分的杂环芳酰胺活化所需要的CYP1A2,所以不是恰当的动物模型,可能得出假阴性结果。而另一种灵长类动物猴的肝脏有重要的CYP1A2表达,可将这些杂环胺转变为强致癌物。



分子水平阐明毒作用机制等。

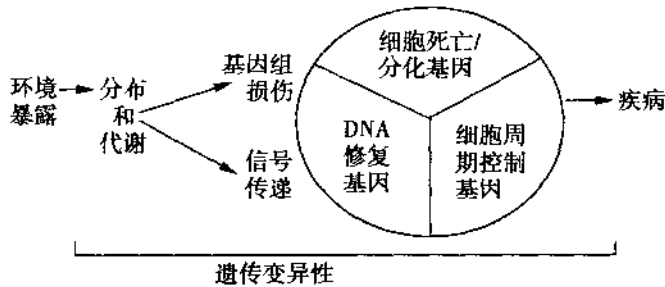


图 5-1 环境反应基因

### 三、机体其他因素对毒性作用易感性的影响

机体的健康状况、免疫状态、年龄、性别、营养状况、生活方式等因素对于毒作用的敏感性可以产生不同程度的影响。

#### (一) 健康状况

一些遗传缺陷或遗传病与毒作用敏感性有关系。如着色性干皮病(XP)、共济失调性毛细血管扩张(AT)和先天性全血细胞减少症(FA)等均是常染色体隐性遗传病,有DNA损伤的修复缺陷,XP、AT和FA的杂合子对紫外线、烷化剂或某些化学致癌物作用的敏感性较常人高。这类遗传缺陷的名单已愈来愈长。

当一种疾病对于机体所产生的损害和某种化学物作用的部位或方式相同时,接触这种化学物往往会加剧或加速毒作用的出现。例如严重肝炎与肝硬化的病人肝细胞P-450含量下降50%;急性化学性肝坏死病人血浆内苯巴比妥、安替比林的半减期延长一倍。肾功能下降或衰竭时,许多化学物的排泄半减期亦延长,这对于药效和毒效都会产生影响。

免疫状态过低或过高都可能带来不良的后果。过敏性反应可出现于接触多种药物和金属化学物时,主要见于少数敏感者。最好能在接触这类致敏物前发现这类敏感者,以便及时采取适当的措施。

不利的环境条件或在动物中引起应激的刺激可影响药物代谢和分布。如过度的噪声引起的应激,可增加芳香族的羟基化作用。

#### (二) 年龄

1. 生物转运的差异 新生儿和老人胃酸分泌较少,因此可改变某些化学物的吸收。如,婴儿青霉素吸收增加而对乙酰氨基酚吸收减少。肠的运动性也可受年龄影响而改变化学物的吸收位置。婴儿肠管菌丛缺乏可影响化学物吸收前的转化。婴儿和老人血浆蛋白质和血浆清蛋白水平都较低,可能减少与化学物的结合,增加游离化学物的浓度。如婴儿中利多卡因只有20%与血浆蛋白质结合,而成人中有70%。婴儿血浆pH降低也将会影响某些化学物与蛋白质结合、分布和排泄。由于血-脑脊液屏障不健全,通透性高,吗啡对新生大鼠的毒性是成年的3~30倍,铅对新生大鼠有神经毒性。婴儿和老人肾小球的滤过作用和肾小管分泌都较低,其结果是减少化

学物从身体内清除,延长接触时间,在慢性给药时导致蓄积毒性增加。如,抗关节炎药物苯噻洛芬(opren)引起某些老年患者严重的毒性,被迫从市场撤药。

2. 药物代谢酶系统 ①婴儿的药物代谢酶不完善,同工酶的构成比与成年动物可能有非常大的差异。新生小鼠中,需代谢失活的环己烯巴比妥的睡眠时间为成年小鼠的70倍,使成年小鼠睡眠时间小于1h的剂量对乳鼠有致命的毒性。需要代谢活化的对乙酰氨基酚对新生小鼠的肝毒比成年小鼠小;四氯化碳在新生大鼠中无肝毒。氯霉素90%与葡萄糖醛酸结合,新生儿期葡萄糖醛酸结合的缺乏导致未变化的氯霉素持续高血浆水平,可导致人类婴儿严重的发绀和死亡。胆红素与葡萄糖醛酸结合不足可提高自由胆红素的水平,加上血-脑脊液屏障不健全,可引起新生儿黄疸并导致脑损害。②老年动物对某些化学物的药物代谢能力较年轻成年动物低。某些药物(如普萘洛尔和利多卡因)的清除在老年人可能减少。可能导致毒性并与成年动物有差异。

3. 神经系统  $CS_2$  通过抑制多巴胺 $\beta$ -羟化酶,使多巴胺转化成肾上腺素的能力下降而作用于神经系统锥体外系。老年人神经递质的合成能力下降,肾上腺受体亦趋于减少,对神经毒物 $CS_2$ 的敏感性明显增加。

### (三) 性别

1. 一般雄性代谢化学物比雌性更快速 如:环己烯巴比妥的生物半衰期在雌大鼠中比在雄大鼠中长得多,诱导的睡眠时间也比雄大鼠长;杀虫剂阿特灵和七氯在雄性中比在雌性中更快速地代谢为毒性更大的环氧化物;1-萘酚的葡萄糖醛酸结合、磺胺的乙酰化在雄性中都比雌性大鼠更强。但有一些例外,如苯胺或氯苯噻唑胺(肌弛缓剂)的羟基化作用性别差异极小,而环己烯巴比妥或氨基比林在雄性大鼠中的代谢比雌性大3倍。

2. 排泄的性别差异 雄性大鼠对工业化学物2,4-二硝基甲苯的致肝癌性有更大的感受性,是由于在雄性中其葡萄糖醛酸结合物更多由胆汁排泄,随后在肠管被解离、还原后再吸收,此还原产物有致肝癌性。

3. 性别差异受激素和遗传因素影响 如氯仿对小鼠的肾毒性,性别差异在青春期时出现,雄性比雌性更敏感,阉割雄性动物能消除性别差异,随后给予雄激素可恢复性别差异。在体外,来自雄性肾脏的微粒体比来自雌性小鼠的对氯仿的代谢快10倍。

### (四) 营养条件

动物的营养状态公认对药物代谢、分布和毒性有重要的影响。

1. 蛋白质缺乏 动物喂以含蛋白量为5%的饲料与含20%蛋白饲料的动物相比较,微粒体蛋白质的水平较低,血浆清蛋白水平减少,非结合化学物的血浆水平增加,酶活性显著丧失;四氯化碳的肝毒性下降,黄曲霉毒素的致癌性减少,但巴比妥酸盐睡眠时间延长,扑热息痛的肝毒性增加。

2. 脂肪酸缺乏 可减少微粒体酶的水平 and 活性,使乙基吗啡,环己巴比妥和苯胺代谢减少。脂类是细胞色素P-450所必需的。

3. 矿物和维生素缺乏 也易减少化合物的代谢。饥饿或饮食改变可能减少必要的辅助因子,如II相结合反应必需的硫酸盐的耗损。动物整夜禁食可能因正常水平的谷胱甘肽50%被消耗,影响对乙酰氨基酚和溴苯解毒,增加其肝毒性。

近年有学者研究了限量饮食(DR)对动物的影响。限量饮食是指给予动物应有饲料量的

60%,但补充足够的维生素和矿物质。有人认为它可以延长动物的寿命,对于肿瘤的自然发生和化学诱癌有抑制作用。动物试验证明限量饮食可增加大鼠肝、肾的 GST 活性,减少致癌物加合物的形成。

### (五) 动物笼养形式

动物笼养的形式、每笼装的动物数、垫料和其他因素也能影响某些化学物的毒性。大鼠为群居性动物,单独笼养会使大鼠烦躁易怒,凶猛具有攻击性。异丙基肾上腺素对单独笼养3周以上的大鼠的急性毒性明显高于群养的大鼠。养于“密闭”笼(四壁和底为薄铁板)内的群鼠对吗啡等物质的急性毒性较养于“开放”笼(铁丝笼)中的大鼠为低。

## 第三节 环境因素

### 一、气象条件

气象条件对毒物的吸收、分布、代谢和排泄的影响

#### (一) 温度

环境温度的改变可引起不同程度的生理、生化系统和内环境稳定系统的改变,如改变通气、循环、体液、中间代谢等并影响化学物的吸收、代谢、毒性。有人比较了58种化学物在不同环境温度(8℃、26℃和36℃)中的大鼠LD<sub>50</sub>。结果表明,55种化合物在36℃高温环境下毒性最大,26℃环境下毒性最小。一般在正常生理状况下,高温引起动物皮肤毛细血管扩张、血循环和呼吸加快,胃液分泌减少,出汗增多,尿量减少。使经皮和经呼吸道吸收的化学物吸收增加;经胃肠道吸收减少,随汗液排出增加,经尿液排出减少。引起代谢增加的化学物如五氯酚,2,4-二硝基酚在8℃毒性最低,而引起体温下降的化学物如氯丙嗪在8℃时毒性最高。

#### (二) 气湿

高气湿可造成冬季易散热,夏季不易散热,增加机体体温调节的负荷。高气湿伴高温可因汗液蒸发减少,使皮肤角质层的水合作用增加,进一步增加经皮吸收的化学物的吸收速度,并因化学物易粘附于皮肤表面而延长接触时间。

#### (三) 气压

一般变化不大。气压增加往往影响大气污染物的浓度,气压降低可以因降低氧分压而增加CO的毒性。

### 二、季节或昼夜节律

生物体的许多功能活动常有周期性的波动

生物体的许多功能活动常有周期性的波动。如24h的(昼夜节律)或更长周期(季节节律)

的波动。

化学物的毒性可因每日给药的时间或给药的季节不同而有差异。如夜行动物小鼠下午 2 时给予苯巴比妥的睡眠时间最长,而清晨 2 时给药睡眠时间最短(约为下午 2 时给药的 40% ~ 60%)。给予大鼠苯巴比妥的睡眠时间春季最长,秋季最短(只有春季的 40%)。人对某些药物的排出速度亦有昼夜节律,如口服水杨酸,早上 8 时服排出速度慢,在体内半衰期最长;晚上 8 时服,排出速度快,半衰期最短。

昼夜节律有的是受体内某种调节因素所控制,如切除肾上腺后的大鼠其昼夜节律变得不明显。有的是受外环境因素如进食、睡眠、光照、温度等调节,如单独笼养动物昼夜节律的幅度减小;动物处于 24 小时光照下昼夜节律消失。大鼠对吸入二氯乙烯毒性的感受性有昼夜节律,与肝谷胱甘肽浓度的节律有关,而谷胱甘肽浓度的昼夜节律又与喂食活动有关。有人认为动物对化学物毒性敏感性的季节差异,与动物冬眠反应或不同地理区域的气候有关。

## 第四节 化学物的联合作用

在生活和生产环境中,人类往往同时或先后接触来自多种来源的大量化学物,在毒理学中研究多种外源化学物对机体的综合毒性作用,比鉴定单一外源化学物的毒性作用更为复杂。制订单一外源化学物的卫生标准是重要的,制订多种外源化学物的联合作用的卫生标准同样重要。

同时或先后接触两种或两种以上外源化学物对机体产生的毒性效应被称为联合作用。联合作用分为以下几类:

### (一) 非交互作用

1. 相加作用 相加作用(addition joint action)指每一化学物以同样的方式,相同的机制,作用于相同的靶,仅仅它们的效力不同。它们对机体产生的毒性效应等于各个化学物单独对机体产生效应的算术总和。例如,大部分刺激性气体引起的呼吸道刺激作用;或同分异构物或结构类似物如:PCBs 和二噁英的联合毒性,多呈相加作用。

相加作用也称为简单的相似作用、简单的联合作用或剂量相加作用,是一个非交互的过程。这种联合作用中每个化合物都按照他们的相对毒性和剂量比例对总毒性作贡献。

2. 独立作用 独立作用(independent action)也称为简单的独立作用、简单的不同作用或反应(或效应)相加作用。在这一事件中,各化学物不相互影响彼此的毒性效应,作用的模式和作用的部位可能(但不是必然)不同,各化学物表现出各自的毒性效应。效应相加是由混合物中每个化合物的反应的总和决定的相加效应。

在这里,术语“反应”和“效应”通常被当作同义词使用。但是,术语“反应相加”应该更明确地被用来描述群体中的“反应的数量”。因为,群体中的每个个体存在是否对混合物中的化学物有耐受性的问题。如果浓度超过耐受剂量,个体将显示出对一个毒物的一个反应。在这种情况下,应得出反应的数量而非混合物对一群个体的平均的效应。

在人体实际低剂量接触两种以上化学物时,反应相加和剂量相加的概念有很大差别。对于反应相加,当各化学物剂量低于无作用水平,即各化学物造成的反应为零时,总联合作用为零。

而对于剂量相加模型,各化学物低于无有害作用水平也可发生联合毒作用,低剂量的混合暴露,剂量相加可能导致严重的毒性。

## (二) 交互作用

两种或两种以上化学物造成比预期的相加作用更强的(协同,增强)或更弱的(拮抗作用)联合效应,在毒理学中称之为化学物对机体的交互作用(interaction)。交互作用的机制很复杂,可能是生理化学和(或)生物学的,也可能是在毒物动力学相中存在的交互作用。毒物动力学相中的交互作用可以是相互之间的化学反应或对吸收和排泄过程的相互影响,但最明显最重要的是酶诱导和(或)抑制作用,化学物通过影响生物转化酶的量影响其他化学物的毒性。如果两种化学物竞争同一个受体,可发生毒效学的交互作用。

1. 协同作用 协同作用(synergistic effect)化学物对机体所产生的总毒性效应大于各个化学物单独对机体的毒性效应总和,即毒性增强,称为协同作用。例如,马拉硫磷与苯硫磷联合染毒,毒性明显增加,可能是苯硫磷可以抑制肝脏分解马拉硫磷的酯酶,使马拉硫磷分解减慢之故。

2. 加强作用 加强作用(potentiation joint action)一种化学物对某器官或系统并无毒性,但与另一种化学物同时或先后暴露时使其毒性效应增强,称为加强作用。例如已知有些化学物本身不致癌,但是它们与致癌物同时或先后进入人体却成为助癌物或促癌物。

3. 拮抗作用 拮抗作用(antagonistic joint action)化学物对机体所产生的联合毒性效应低于各个化学物单独毒性效应的总和,即为拮抗作用。其机制可以是功能拮抗、化学拮抗或灭活、处置拮抗、受体拮抗。如治疗有机磷农药中毒的阿托品,就是有机磷化合物毒性的拮抗剂;解磷定则是有机磷化合物的生化拮抗剂。

当混合物由两个以上的化学物组成时,或当靶更复杂时,很有可能同时发生这些作用。实际生活和生产环境中人类接触的不仅仅是众多的化学物,还有各种物理因素,如噪声、射频辐射、电离辐射、磁场等等。此外,社会性因素及心理、精神因素等对化学物毒性效应也有影响。例如,气温在30℃以上时,酚和甲醛的联合毒性作用增强;紫外线照射不足和高温都可使机体对六氯苯的抵抗力降低;而最适剂量的紫外线照射,可提高机体对六氯苯的耐受性;噪声能增加耳毒性药物如卡那霉素对耳蜗的损害作用。

(胡渝华)

# 6

## 第六章

# 化学毒物的一般毒性作用

化学毒物的一般毒性作用研究是毒理学工作中非常重要的内容。根据接触毒物的时间长短,可将产生的一般毒性作用分为急性毒性、亚慢性毒性和慢性毒性。相应地,按毒物接触时间长短所进行的观察和评价毒效应的试验即为急性毒性试验、亚慢性毒性试验和慢性毒性试验。实际工作中,毒物的一般毒性作用观察是毒理学的经常性工作,能够进入人类生态环境和人密切接触的物质,特别是新化学物,均需对其进行一般毒性作用的观察和评价,如新的食品、药品、农药、工业化学品等等。化学毒物一般毒性作用的研究对防治外源化学物所致急慢性中毒,对毒理学安全性评价和危险度评定,制订卫生标准以及管理毒理学的决策方面均具有十分重要的意义。

## 第一节 急性毒性作用

观察外源化学物毒性和毒理机制的试验方法越来越多,但急性毒性试验仍然难以被取代,是我们了解外源化学物对机体产生急性毒性的主要依据,是毒理学研究中最基础的工作。根据外源化学物种类的不同,急性毒性试验的程序和要求有所不同。本节介绍急性毒性试验的基本原则和方法。

### 一、急性毒性的概念

急性毒性是指机体(实验动物或人)一次或24h内多次接触外源化学物后在短期内所产生的毒性效应,包括一般行为和外观改变、大体形态变化以及死亡效应。

急性毒性(acute toxicity)是指机体(实验动物或人)一次或24h内多次接触外源化学物后在短期内所产生的毒性效应,包括一般行为和外观改变、大体形态变化以及死亡效应。

急性毒性概念中有几个问题要注意:

1. 急性接触的次數 关于一次或24h内多次接触,“一次”在经口、经注射途径染毒是指瞬间给予实验动物染毒,在经呼吸道与经皮肤染毒时,则是指在一段规定的期间内使实验动物持续接触毒物的过程。而“多次”的概念是指当外源化学物毒性很低,一次最大染毒给予实验动物后还不能达到充分了解该毒物急性毒性作用的目的,从而在24h内分次染毒,即为“多次”。

2. 中毒效应出现的时间 急性毒性效应一般是指机体接触化学物后,在较短时间内观察到



的毒性症状。有的化学毒物在实验动物接触数分钟内即可产生严重中毒症状,甚至瞬间死亡;而有些化学毒物几天、十几天后动物才产生明显的中毒症状和死亡,呈现迟发毒效应和死亡。有的化学毒物在出现快速和剧烈的毒效应后很快恢复;有的化学物早期仅有较轻微症状,很快恢复,但在几天后又出现严重中毒症状甚至死亡。因此不能仅以接触毒物后毒性症状出现的时间来判定该毒物的某种毒性效应是否属于急性毒性,主要应以接触毒物的时间,即上述定义中所规定的“一次或24h内多次接触”后所产生的毒性效应。在实际工作中,大部分毒物的急性毒性症状在短期内出现。国内外许多毒理学安全性评价程序中对急性毒性的观察时间有规定,一般为7~14天,如有必要可延长至14天以上。

3. 中毒效应的强度 急性毒性和亚慢性、慢性中毒相比,为了观察到明确的毒性作用,通常一次性大剂量接触毒物,所表现出的一般行为、外观、大体形态的改变常常十分明显,中毒症状严重,常发生死亡。

## 二、急性毒性试验的目的

急性毒性试验,常常是认识和研究外源化学物对机体毒效应的第一步,可以提供短期接触所致毒作用的许多信息和资料,归纳起来试验目的有如下几个方面:

1. 测试和求出毒物的致死剂量以及其他急性毒性参数,通常以 $LD_{50}$ (半数致死剂量)为最主要的参数,并根据 $LD_{50}$ 值进行急性毒性分级。
2. 通过观察动物中毒表现、毒作用强度和死亡情况,初步评价毒物对机体的毒效应特征、靶器官、剂量-反应(效应)关系和对人体产生损害的危险性。
3. 为亚慢性、慢性毒性试验研究以及其他毒理试验提供接触剂量和观察指标选择的依据。
4. 为毒理学机制研究提供线索。

## 三、急性毒性试验方法的要点

急性毒性试验应用很广,尤其对于和人类生活密切接触的化学物如新的食品、药品、农药、化妆品、工业毒物等毒理学安全性评价,通常是必做的试验,是评估毒性大小的第一步工作。虽然急性毒性试验的程序,在国内外的一些法令性规定(如食品、农药、化妆品、药物毒理学安全性评价程序)中有不同的要求,但总体原则和要点是相似的,主要包括实验动物、染毒途径、染毒剂量、观察周期、观察指标的选择、计算方法和评价等。一个设计周密、操作规范、质量保证严格的急性毒性试验对于评价新化学物急性毒性有决定性作用。一般来说,一个新化学物在研制初期就要进行急性毒性试验。若急性毒性很大,那么就可能对人类健康产生巨大的危险,或对生态环境形成潜在危害,即使它不具有遗传毒性或其他毒作用,也不应冒风险,须放弃对该化学物的使用或严密控制,严格限定使用量和用途,以保护人类健康和生态环境。

### (一) 实验动物的选择和要求

急性毒性试验选择动物的主要原则:尽量选择急性毒性反应与人近似的动物;易于饲养管理、试验操作方便的动物;繁殖生育力较强,数量较大能够保障供应;价格较低,易于获得的动

物。实验动物的选择包括物种和品系、年龄、体重、数量等方面。在基础性研究工作中按科研课题的具体要求选择。在法规性毒理学评价工作中,必须按照其规范要求进行。

1. 实验动物的物种和品系 除有特殊需要外,急性毒性试验一般首先选择哺乳动物,其中又以大小鼠为最常用。尤其是大鼠,几乎占全世界所报道的研究化学物急性毒性所用实验动物的一半,第二位是小鼠。也有使用豚鼠、兔、犬、猴和其他实验动物。相比较而言,大小鼠基本符合选择的原则。急性毒性试验所用大鼠的品系以 Sprague-Dawley (SD)、Wistar 为主,小鼠则以昆明种、NIH、ICR 为多。

有些情况下规定用两种物种的动物,包括啮齿类(rodent species)和非啮齿类(nonrodent species)。啮齿类多选用小鼠和大鼠,非啮齿类一般选用犬或猴。

不同的接触途径选择实验动物的种类有所不同,一般来说,急性经口和急性吸入毒性试验选择大鼠和小鼠,而急性经皮毒性试验可选用成年大鼠、豚鼠或家兔。

2. 实验动物的年龄和体重 除特殊要求外,急性毒性试验选用的实验动物的年龄和体重通常要求刚成年的动物,且为健康未曾交配和受孕的动物。在合格的饲养条件下,小动物的年龄与体重相关性较好,所以一般按体重来选择购买。通常大鼠 180~240g、小鼠 18~25g、家兔 2~2.5kg、豚鼠 200~250g、Beagle 犬 4~6kg、杂种犬 8~15kg。新农药、食品、药品等的急性毒性试验,其相应的试验规范或指导原则对动物体重有各自的要求。如《新药(西药)临床前研究指导原则——毒理学药理学》中规定:急性毒性试验选用 17~22g 的小鼠、120~150g 的大鼠,并规定同次试验小鼠体重相差不超过 4g,大鼠不超过 10g。这种严格的规定其目的在于尽量保持实验动物基本条件的一致性,减少试验误差。一般来说,同一次试验同一批实验动物体重变异范围不应超过该批动物平均体重的 20%。

3. 实验动物的性别 通常要求为雌雄各半。但如有资料或预试验发现试验品对雌、雄动物毒效应有明显的性别差异,则应单独分别试验并求出雌性和雄性动物各自的  $LD_{50}$  值。如果试验仅是为一些特殊的试验研究作准备,也可仅作单一性别的急性毒性试验,如雄性生殖方面的毒理学研究,可仅作雄性动物的急性毒性试验;致畸试验,可仅作雌性动物的急性毒性试验。

4. 实验动物分组与数量 急性毒性试验所用动物的数量根据组数和每组数量来决定。不同的  $LD_{50}$  计算方法对动物组数的要求有所不同,一般为 4~6 组。大、小鼠等小动物每组数量通常为 10 只,犬等大动物为 6 只。由于实验动物本身的差异和对化学毒物的毒效应个体敏感性差异,因此在动物分组时应严格遵循随机化的原则,提高每组动物间的均衡性,尽可能减少非处理因素对试验结果的影响。

5. 实验动物的预检 在选择和购买实验动物后,应先进行动物的给药前检疫观察。大鼠、小鼠、豚鼠、兔的检疫期为 1 周,犬、猴等适当地延长至 2~3 周。设定检疫期有两个主要目的:一是让外购来的实验动物在本试验室条件下适应一段时间,减少环境和生理条件变化可能对试验结果的影响;二是筛检健康等不符合试验要求的动物。在检疫期内出现临床异常者应予放弃,不可用于试验。犬、猴等大动物还应检查或补做疫苗接种和驱虫等检疫工作。检疫期内雌雄必须注意分笼饲养,防止交配和受孕。如有动物生病,小动物一般不作治疗,直接处死弃去,大动物可做适当治疗,痊愈后可继续用于试验。

6. 实验动物的给药前禁食处理 如采用经口途径染毒,实验动物胃肠道内食物存留量对化学毒物的毒性可产生较明显的干扰,因此在试验给药前应作禁食处理。大鼠主要在夜间进食,所

以要求染毒前应隔夜禁食,一般在前一天傍晚下班时或晚间将饲料撤掉。小鼠和大鼠基本类似,但由于其消化吸收和代谢速度较快,可隔夜禁食也可禁食4h以上。大动物常在上午染毒,前一天正常给食,染毒前不喂食即可。禁食期间均正常给予饮水。染毒2h后提供饲料。经口多次染毒,可不禁食。

## (二) 受试物及处理

受试物的接受、分样、保管、称量、配制以及在此过程中严格的质量保证是急性毒性试验成功与否的重要环节。受试物的化学结构、纯度、杂质成分、理化性质特别是挥发性、溶解性等均需了解,检索与受试物化学结构和理化性质相似的化学物的毒性资料。计算试验所需受试物的总量,一次备齐全部实验的用量。应以同一批号为宜。受试物成分和配方应稳定不变。异构体混合物,其异构体比例必须固定。目前在实际工作中对受试物的真实性,活性成分的纯度,杂质成分和含量的确证性监测比较薄弱,尤其是送样委托性检测。受试物贮存、保管、配制时需注意稳定性、均匀性等,应反复核对,保证不出现差错。

急性毒性试验受试物配制的常用剂型为水溶液、混悬液、油溶液。水溶性受试物的溶剂,通常为蒸馏水或去离子水,注射等胃肠道外染毒需用生理盐水,保持与体内渗透压一致。水不溶性受试物应溶于或悬浮于适当的有机溶剂中,常用0.5%羧甲基纤维素钠、10%阿拉伯胶、天然植物油(如玉米油、橄榄油)。受试物一般应临用前新鲜配制,除非已证明溶液贮存是稳定的。

急性毒性试验受试物给予动物染毒的量有规定。毒性较大的受试物给药量较小,一般按适宜容积染毒。毒性较低的受试物为充分了解其急性毒性,常需一次较大的染毒,但不应超过最大给药容积,减少非特异性因素对受试物急性毒性的影响。给药容积的大小,根据染毒途径和实验动物物种来确定。一般推荐,染毒最大量为:①经口20ml/kg(对空腹动物);②经皮2ml/kg(根据体表面积计算,限于染毒的准确性);③静脉1ml/kg(5min以上);④肌内注射0.5ml/kg(一个部位);⑤每眼0.01ml;⑥直肠0.5ml/kg;⑦阴道:大鼠0.2ml,兔1ml;⑧吸入2mg/L;⑨鼻:猴或犬每鼻孔0.1ml。

## (三) 染毒方法

急性毒性试验染毒途径(exposure routes)的选择应考虑几方面因素:模拟人在生活和生产环境中实际接触该受试物的途径和方式;有利于不同化学物之间急性毒性大小的比较;受试物的性质和用途;各种受试物毒性评价程序的要求等。最常用的染毒途径为经口、经呼吸道、经皮及注射途径。一般来说,工业化学毒物的接触途径多以经呼吸道吸入和经皮接触为主;农用化学物多以经口、经皮接触和经呼吸道吸入;药品多以经口和经注射途径;食品多以经口途径;环境污染物则经口、经呼吸道、经皮多途径接触。不同染毒途径对受试物急性毒性的大小影响很大,通常取决于不同途径的吸收量和吸收速率。吸收速率依次排列,一般是静脉注射>吸入>肌内注射>腹腔注射>皮下注射>经口>皮内注射>经皮。同一受试物不同染毒途径LD<sub>50</sub>的大小通常也符合此规律,除非该受试物在某种途径特别易于吸收。

1. 经口(胃肠道)染毒 经口途径可分为灌胃、喂饲、吞咽胶囊等方式。一般来说新的化学物均先进行经口染毒途径的急性毒性试验,求出LD<sub>50</sub>值。通常以经口途径的LD<sub>50</sub>值来比较不同

化学物急性毒性大小。

经口灌胃染毒是急性毒性试验中最常用的染毒途径。灌胃时将受试物配制成溶液或混悬液,以注射器经导管注入胃内。因灌胃量大小可影响毒性,急性毒性试验最好是利用等容量灌胃法,即受试物按不同剂量组配制制成不同浓度,实验动物单位体重的灌胃容量相同。大小鼠常使用灌胃针灌胃给药,兔、猫、犬、猴等大动物通常以导尿管为灌胃导管经开口器插入胃内给药。灌胃法优点是剂量准确,缺点是工作量大,并有误入气管和伤及食管的可能。吞咽胶囊常用于犬、猴的给药。将一定剂量的受试物装入胶囊中,放至舌后部,迫使动物咽下。此法适用于有异味、易挥发、易水解的受试物。喂饲是将受试物掺入动物饲料或饮水中供实验动物自行摄入。喂饲法符合人类接触许多化学物的实际情况,染毒方便,但缺点较多,给药量误差较大,适口性差,影响动物摄食和生长发育。

胶囊和喂饲法一般不用于急性毒性试验,在实际工作中以灌胃为最主要、最常用的方法。

2. 经呼吸道染毒 研究生产条件下以气体、蒸气、粉尘、烟、雾等形式存在于车间空气中的工业毒物,评价环境空气污染物,以吸入为给药途径的药物,常常采用经呼吸道染毒的途径。呼吸道染毒方式分为吸入和气管内注入;吸入染毒又分为静式吸入染毒和动式吸入染毒。

急性经呼吸道染毒的毒性试验一般用静式吸入染毒。该法是将一定数量的实验动物置于有一定体积的密闭容器中,加入易挥发的液态受试物或气态受试物,形成一定浓度的受试物空气环境进行染毒。染毒柜的体积、试验动物的物种和数量、接触时间三者之间相互关系要恰当,依据实验动物的最低需气量计算。小鼠最低需气量 3.45L/h,大鼠 30.5L/h。一般 50L 的染毒柜接触 2h,放入小鼠 6~10 只或大鼠 1 只。静式吸入染毒多以计算的方法得到染毒柜中受试物浓度,以  $\text{mg}/\text{m}^3$  表示。静式吸入染毒的优点是设备简单、操作方便、受试物消耗量少,尤其适合于小鼠接触易挥发的液态或气态化学物的急性毒性试验。缺点也较多,主要是实验动物在整个接触期间内,得不到氧气的补充,随着试验的进行,氧分压下降,柜内受试物浓度逐渐下降,实验动物有经皮吸收的可能;不适合稍大动物的使用;挥发性不强的受试物使用此法受限。动式吸入染毒是指将实验动物处于有空气流动的染毒柜中,这种染毒柜装置有机械通排风系统,可使新鲜空气不断流入,污染空气不断流出,温度、湿度、氧及二氧化碳分压相对恒定,并有随时补充受试物,维持受试物浓度稳定的配气系统。可采样监测受试物浓度,可持续接触受试物基本不受时间限制。动式吸入染毒装置由染毒柜、机械通风系统和配气系统三大部分组成。动式吸入染毒又分为两种形式,一种是将实验动物整体置于染毒柜中,另一种只是将动物的口鼻部分与含有受试物的空气接触,而身体其他部位置于染毒柜外。前者为动式吸入接触,或称动式染毒,后者一般称为面罩接触,或称面罩吸入染毒。动式吸入染毒的优点是显而易见的,染毒过程中受试物浓度和氧分压较稳定,缺点是对设备要求高,消耗受试物量很大,操作比较复杂,费时费工。因此急性毒性试验中很少使用该法。

3. 经皮肤染毒 外源化学毒物经皮肤接触的机会很多,如农药、化妆品、工业毒物、环境污染物、外用药物等。职业接触也很多见。就皮肤解剖、生理特征而言,与人类较近似的动物为小型猪、家兔或豚鼠。但是,由于外源化学毒物经皮肤染毒途径的急性毒性试验所需动物数量较大,使用猪、兔和豚鼠不经济,因此常用大鼠。

经皮肤染毒的方式:先使用化学法脱毛(常用脱毛剂为硫化钡加滑石粉 1:4 或硫化钠加淀粉 1:4)或机械法脱毛(剪剃去毛),将动物脊柱两侧背毛脱去,去毛面积常为体表面积 10%。

局部涂敷受试物并以玻璃纸覆盖固定一定时间接触染毒。为定性观察化学毒物是否经皮吸收产生毒性,可采用大鼠、小鼠浸尾法染毒,即将动物固定,鼠尾浸入受试物溶液中持续一定时间,观察中毒体征和产生程度。

4. 经注射途径染毒 对注射药品或需作比较毒性观察的药品进行急性毒性试验时,须作经注射途径染毒。另外在进行化学毒物毒作用机制研究,了解毒物代谢动力学等研究时,常采用注射途径。注射途径可分为静脉注射或滴注、腹腔注射、肌肉注射、皮下注射、皮内注射、椎管内注射等。使用注射途径染毒时需注意控制注射量、注射速度。应调整受试物的 pH 及渗透压, pH 一般应为 5~8,用等渗溶液。

#### (四) 剂量选择

测试一个新化学物的急性毒性和  $LD_{50}$ ,在设计剂量之前,首先要了解受试物的化学结构式,确定其属于哪一类已知化合物(或衍生物),了解有何特殊基团、分子量、常温常压下的状态、溶解度、挥发度、水溶性、脂溶性、pH 值、比重等理化特征,了解生产批号、纯度、杂质成分与含量等。然后根据该受试物的特点、研究目的和法规要求,确定用何种方法设计试验和计算  $LD_{50}$  值,以确定剂量分组。也可通过查阅文献,找到与受试物化学结构与理化特征相近似的化学物毒性资料,或调阅本实验室既往相近似被检样品的试验资料,比较采用相同或相近动物种类、染毒途径的  $LD_{50}$  值,或预期毒性剂量范围作为参考选择预试验剂量。每个剂量组间的组距可大些,以便寻找出受试物的致死剂量范围。

剂量选择是急性毒性试验成功的基础,也是能否以较少的动物消耗,尽快得到准确的急性毒性参数的前提。总的原则是先用少量动物,以较大的剂量间隔(一般是按几何级数)染毒,找出 10%~90%(或 0%~100%)的致死剂量范围。然后即可设计正式试验的剂量和分组。剂量组数需根据试验设计所选用的  $LD_{50}$  计算方法来确定。如寇氏法、Bliss 法,一般设 5~8 个剂量组;霍恩氏法设 4 个剂量组。

可根据以下公式计算各组剂量:

$$i = (\lg LD_{90} - \lg LD_{10}) / (n - 1)$$

或 
$$i = (\lg LD_{100} - \lg LD_0) / (n - 1)$$

式中  $i$  为组距(相邻的两个剂量组对数剂量之差);  $n$  为设计的剂量组数。

求得  $i$  值后,以最低剂量值( $LD_0$  或  $LD_{10}$ )的对数剂量加上一个  $i$  值,即是第二个剂量组的对数剂量,依次类推直至最高剂量组,查各自的反对数即可得出各组剂量的值。

然而有的化学物在急性毒性试验中当给以高剂量达到 5g/kg 时,实验动物仍无明显毒性体征,或虽有毒性体征,但无死亡,此时一般可不再求  $LD_{50}$ 。所以,有时对未知毒性的化学物,估计毒性较低时,预试验也可以 5g/kg 剂量进行摸索,来决定是否需正式求  $LD_{50}$ 。一般来说,化学物  $LD_{50}$  如大于 5g/kg 已表明毒性不大,但不同的规范可有不同要求,也有规定 2g/kg。我国药品的毒理研究指导原则规定要以最大容积最高浓度给予动物后未见死亡,方可不进一步试验求出  $LD_{50}$  值。

急性毒性试验除设立几个剂量组外,是否设正常和溶剂对照组,有不同意见。但在实际工作

中,除有特殊规定外,均不设立对照组。

### (五) 毒性作用观察

急性毒性试验不应简单地理解为  $LD_{50}$  测定,实际上急性毒性试验的内涵和目的是很丰富的。在急性毒性试验过程中,要全面观察动物的各种反应和变化,仔细分析实验动物在染毒后出现的中毒表现、剂量效应、时间分布等,这对于了解新化学物的毒性作用特征,获取尽可能多的毒性信息非常重要,可以补充  $LD_{50}$  ( $IC_{50}$ ) 表示急性毒性的不足。只有这样,才是一个完整和成功的急性毒性试验。

急性毒性试验的观察和记录内容主要包括 4 个方面:中毒体征及发生过程、死亡情况和时间分布、体重和病理形态学变化。

1. 中毒体征及发生过程 应仔细观察和记录动物出现的中毒体征、发生时间和体征发展的经过。

机体对毒物作用的反应可以表现出各个系统的特征。不同系统的毒性表现可不一样,也有一些中毒体征和行为的改变是多个系统的毒性反应。应注意仔细观察和记录。记录毒性体征要避免使用不规范的或自撰的术语。表 6-1 为啮齿类动物急性中毒各系统的主要中毒表现。

表 6-1 啮齿类动物急性中毒表现

| 系统和器官            | 观察项目         | 中毒后常见的表现                            |
|------------------|--------------|-------------------------------------|
| 中枢神经系统与躯体感觉和运动系统 | 行为           | 体位异常,叫声异常,活动异常,不安,多动、少动或呆卧,侧倒       |
|                  | 运动状态         | 运动异常、运动失调、步态蹒跚、痉挛、抽搐、强直、麻痹,后肢无力,管状尾 |
|                  | 对外界刺激反应性     | 易兴奋、易激惹,感觉迟钝或过敏,反应低下或过高             |
| 自主神经系统           | 脑、脊髓反射       | 减弱或消失                               |
|                  | 肌肉张力         | 松弛或紧张                               |
|                  | 瞳孔           | 散大或缩小                               |
| 呼吸系统             | 腺体分泌         | 流涎,流泪,出汗                            |
|                  | 鼻            | 鼻孔溢液,鼻翼煽动                           |
| 心血管系统            | 呼吸表现         | 呼吸徐缓、过速,张口或腹式呼吸,呼吸困难、衰竭             |
|                  | 心区触诊、听诊      | 震颤、心动过速或过缓、心律不齐等                    |
| 消化系统             | 四肢末端血管       | 充血,四肢末端明显发红                         |
|                  | 摄食           | 不摄食、少食、拒食                           |
|                  | 大便           | 腹泻、便秘                               |
|                  | 腹部外形         | 膨隆、凹陷                               |
| 泌尿生殖系统           | 粪便硬度与颜色      | 不成形,色泽异常(黄色、灰白色、褐色、咖啡色等)            |
|                  | 小便           | 尿频,失禁,混浊,血尿                         |
| 皮肤和被毛            | 阴户、阴道口、乳腺、阴茎 | 肿胀,分泌物增多,会阴部污秽,脱出,遗精                |
|                  | 颜色、张力        | 皮肤松弛、皱褶、发红、紫绀、皮疹、溃疡、被毛蓬松、竖毛         |
| 粘膜               | 结膜、口腔        | 分泌物增多、充血、水肿、苍白、紫绀、黄疸                |
| 眼睛               | 眼睑           | 上睑下垂                                |
|                  | 眼球           | 突出、震颤、充血                            |
|                  | 角膜           | 混浊、血性分泌物                            |
| 其他               | 直肠温、皮温       | 升高或降低                               |
|                  | 一般情况         | 消瘦、姿势异常等                            |

表中所列为主要和常见的中毒体征。毒性表现因受试物不同可有多种,也有些很难列于某系统和器官中,可能是多系统病变导致的。急性毒性试验通过观察到的毒性表现可初步确定该受试物的急性毒性靶器官。如血尿则反映毒性靶器官为肾脏;鼻孔血性分泌物,则可能是肺损伤、肺出血;出现侧倒(侧卧),则中枢神经和神经肌肉系统受累;发绀往往是心、肺循环障碍、肺损伤的表现;管状尾则提示神经肌肉系统受累;心搏缓慢或过速其靶器官可能是心肺循环、自主神经障碍等。

实验动物的毒性表现有一些规律,许多毒物染毒后,往往出现兴奋→抑制→死亡,或者抑制→死亡的现象。最高剂量组和高剂量组许多动物染毒后中毒体征急剧发展,来不及从容观察,动物很快出现死亡。能否充分、全面地观察急性毒性表现需要多方面的准备和长期经验的积累。不同的化学物引起的具体毒性表现常有所不同,正是这种不同可提供毒性机制的信息,如含有氰基( $-\text{CN}$ )的氢氰酸和丙烯腈对大鼠和小鼠染毒后,都很快出现兴奋。接触丙烯腈的动物首先出现活动增加、骚动、窜跑,甚至跳跃,之后出现呼吸困难,耳与尾青紫色;而氢氰酸呈一过性兴奋,呼吸加快、加深,之后呼吸困难,耳与尾则为桃红色。可见同为氰化物,其中毒机制有所不同。动物的中毒表现是多种多样的。治疗骨肿瘤晚期高钙血症的二磷酸盐类药物如伊班磷酸钠染毒后,动物先表现为一般性的中毒表现,很快恢复,数日内均“安然无恙”,近一周后才逐渐表现为抑制、拒食、消瘦、衰弱、昏迷直至死亡,原因为受试物进入体内迅速沉积于骨骼中,逐渐释放产生毒性,表现为一种比较特殊的毒性进展状况和中毒机制。N-苯甲酰基-(3,4-二氯苯基)-2-氨基-丙酸乙酯,大鼠与小鼠灌胃染毒后,动物很快表现为抑制现象,闭目静卧、四肢无力、站立不稳、步态蹒跚、呼吸减慢,最后缺氧、口鼻青紫死亡。羰基镍吸入染毒在大、小鼠先出现前肢反复搔鼻等呼吸道刺激体征。小鼠吸入染毒某些馏温段的冷油后,大汗淋漓,被毛全湿,表现为神经系统体征。

2. 死亡情况和时间分布 急性毒性试验中实验动物的死亡数是计算  $\text{LD}_{50}$  值的依据,动物死亡数量每增加或减少一只都会对  $\text{LD}_{50}$  值产生明显影响,因此应认真观察和记录。分析中毒死亡时间的分布规律,也可以提供重要信息。例如久效磷小鼠经口与腹腔注射染毒,均呈现染毒剂量增加,死亡时间缩短,呈直线负相关,这提示实验动物致死原因是化学物原形所致。而过氧化二磷酸二环己酯给大鼠腹腔注射后呈现明显的染毒剂量对数值与死亡时间呈负相关关系,但给小鼠腹腔注射后,染毒剂量与死亡时间无明显相关。这提示可能与该化学物在大鼠和小鼠体内代谢不同有关。

3. 体重 实验动物体重变化指标,可以反映动物中毒后综合性整体变化,是一个比较客观简便的量化指标。因此在观察实验动物中毒体征的同时,对存活动物应定期多次称量动物的体重变化,一般为每周1次或2次。体重降低或增长缓慢的原因是多方面的,如果毒物影响了食欲或消化系统的功能受累而厌食或拒食,可以使体重改变。如果是因毒物影响食物的吸收和利用,也能导致体重变化。还有影响水的摄取或肾功能急性损伤,也可能在体重上有反映。因此,对体重指标的变化要仔细观察和分析。

4. 病理检查等 急性毒性试验中,对死亡动物应及时进行大体解剖,肉眼观察大体病理变化,如脏器外观、大小、色泽的变化,有无充血、出血、水肿或其他改变,如有改变须取材作组织病理学检查。对存活动物在观察期结束时亦应进行解剖检查,必要时做组织病理学检查。

急性毒性试验中,根据需要可进一步扩大观察项目,如体温、心电图和一些生化指标的测定。

### (六) 观察时间和周期

高剂量组动物染毒后常在数分钟或数十分钟内出现死亡,染毒以后应即刻开始观察动物的中毒表现和死亡情况。给药当天应连续或多次观察,以后可根据情况,每天2次或多次观察直到试验周期结束。急性毒性试验观察周期一般为14天, $LD_{50}$ ( $LC_{50}$ )计算时以观察周期内各组动物的总死亡数为依据。值得注意的是,不同的化学物其中毒体征出现的时间和特点各有不同,而且引起动物死亡的时间也存在很大的个体差异。有些化学物染毒后迅速引发中毒体征并使动物迅速死亡,如氰化物和某些有机磷化合物染毒后多数动物在染毒后几分钟至几小时内死亡;但有些化学物中毒体征发展迟缓,甚至出现体征暂时缓解,然后再发生严重体征和迟发性死亡。例如羰基镍染毒早期先出现上呼吸道体征,很快就缓解,但2~3天后甚至更迟些又出现明显的中毒体征,表现为严重的肺水肿、呼吸困难,然后死亡。此外,有些化学物对不同个体的毒作用存在明显差异,如给小鼠腹腔注射过氧化二磷酸二环己酯后,同一剂量组的动物死亡时间却明显不同,最早的在染毒后7h死亡,最迟的可达150h。

在实际工作中,对速杀型化学毒物可以仅计算24h的死亡率求其 $LD_{50}$ ( $LC_{50}$ )。某些速杀型化学毒物的24h $LD_{50}$ ( $LC_{50}$ )与测定14天的 $LD_{50}$ ( $LC_{50}$ )值往往没有明显差别,但在试验报告中应注明为24h的 $LD_{50}$ ( $LC_{50}$ ),以便于在进行毒性比较时有共同的基础。

## 四、急性毒性分级和评价

急性毒性试验求出 $LD_{50}$ ( $LC_{50}$ )值,通过 $LD_{50}$ 值进行急性毒性分级(acute toxicity classification),评价毒物的急性毒性强弱,比较毒物的急性毒性大小。许多国家和国际组织制定了急性毒性分级标准,我国除参考使用国际上几种分级标准外,也陆续制定了一些,如农药、食品、工业毒物等均有国家标准参照执行。联合国世界卫生组织(WHO)推荐了一个五级标准(表6-2)。我国在1995年颁布实施的国家标准《农药登记毒理学试验方法》中提出农药急性毒性分级标准(表6-3)。1994年颁布实施的《食品安全性毒理学评价程序和方法》中提出急性毒性分级的六级标准(表6-4)。按急性毒性分级标准评价毒性大小是一种相对粗略的分级方法,根据 $LD_{50}$ ( $LC_{50}$ )参考这个标准将毒物急性毒性作大体上的分级。不论我国或国际上急性毒性的分级标准都还存在不少缺点和不足,实际应用中应注意急性毒性试验结束时,除报告该毒物的 $LD_{50}$ 值

表 6-2 WHO 急性毒性分级

| 毒性分级 | 大鼠一次经<br>口 $LD_{50}$<br>(mg/kg) | 6只大鼠吸入<br>4h,死亡2~4只<br>的浓度(ppm) | 兔经皮<br>$LD_{50}$<br>(mg/kg) | 对人可能致死的剂量 |                |
|------|---------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-----------|----------------|
|      |                                 |                                 |                             | g/kg      | 总量<br>(g/60kg) |
| 剧毒   | <1                              | <10                             | <5                          | <0.05     | 0.1            |
| 高毒   | 1~                              | 10~                             | 5~                          | 0.05~     | 3              |
| 中等毒  | 50~                             | 100~                            | 44~                         | 0.5~      | 30             |
| 低毒   | 500~                            | 1000~                           | 350~                        | 5~        | 250            |
| 实际无毒 | 5000~                           | 10000~                          | 2180~                       | >15       | >1000          |



和急性毒性级别外,还应对中毒和死亡特征加以报告。这是因为毒物之间即使在同样实验条件下的  $LD_{50}$  相同或相似,但它们的毒性特征、毒作用带或致死剂量范围可明显不同,也就是说它们的实际毒性有差异。因此,在评价化学毒物的急性毒性时,除  $LD_{50}$  外,还应详细描述中毒体征及程度、出现体征的时间、死亡前征兆、死亡的时间和剂量组间分布、存活动物的体重变化和恢复情况、死亡动物的病理变化等。

表 6-3 我国农药的急性毒性分级

| 级别  | 经口 $LD_{50}$<br>(mg/kg) | 经皮 $LD_{50}$<br>(mg/kg)4h | 吸入 $LC_{50}$<br>(mg/m <sup>3</sup> )2h |
|-----|-------------------------|---------------------------|----------------------------------------|
| 剧毒  | <5                      | <20                       | <20                                    |
| 高毒  | 5 ~                     | 20 ~                      | 20 ~                                   |
| 中等毒 | 50 ~ 500                | 200 ~ 2000                | 200 ~ 2000                             |
| 低毒  | >500                    | >2000                     | >2000                                  |

表 6-4 化学物质急性毒性分级

| 级 别  | 大鼠口服 $LD_{50}$<br>(mg/kg) | 相当于人的致死剂量       |      |
|------|---------------------------|-----------------|------|
|      |                           | mg/kg           | g/人  |
| 极毒   | <1                        | 稍尝              | 0.05 |
| 剧毒   | 1 ~ 50                    | 500 ~ 4000      | 0.5  |
| 中等毒  | 51 ~ 500                  | 4000 ~ 30000    | 5    |
| 低毒   | 501 ~ 5000                | 30000 ~ 250000  | 50   |
| 实际无毒 | 5001 ~ 15000              | 250000 ~ 500000 | 500  |
| 无毒   | >15000                    | >500000         | 2500 |

## 第二节 蓄积毒性作用

### 一、蓄积毒性作用的基本概念

蓄积毒性作用是指外源化学物进入机体后,经过代谢转化排出体外,或直接排出体外。但是当其连续地、反复地进入机体,而且吸收速度或总量超过代谢转化排出的速度或总量时,化学物质就有可能在体内逐渐增加并贮留,这种现象称为化学物质的蓄积作用(accumulation)。化学物质易蓄积的组织部位称为储存库(depot)。机体常见的储存库有血浆蛋白、脂肪组织、肝脏、肾脏、骨骼等。化学物质可以原型或代谢转化产物的形式,或与机体中某些物质结合的形式存在于储存库中。

外源化学物的蓄积作用是发生慢性毒性作用的基础。当实验动物反复多次接触化学毒物后可以用分析方法在体内测出物质的原型或其代谢产物时,称为物质蓄积(material accumulation)。但有的化学毒物在长期接触后,机体内虽不能测出其原型或代谢产物,却出现了慢性毒性作用,称之为功能蓄积(functional accumulation),也有称为损伤蓄积、机制蓄积。功能蓄积是机体多次

接触化学毒物引起损伤效应累积的结果,或物质蓄积和功能蓄积兼而有之。实际上,两种蓄积作用的划分是相对的,它们可能同时存在,难以严格区分。

## 二、蓄积作用的研究方法

研究外源化学物在机体内的蓄积性是评价该化学物慢性毒性的依据之一,也是卫生标准制定时选择安全系数的主要依据。蓄积毒性试验目的是求出外源化学毒物的蓄积系数,了解蓄积毒性的强弱,并为慢性毒性试验及其他有关毒性试验的剂量选择提供参考。

蓄积毒性作用的研究方法有多种,常用方法有蓄积系数法和生物半减期法。

### (一) 蓄积系数法

蓄积系数法是一种以生物效应为指标,用经验系数(K)评价蓄积作用的方法,即将多次染毒与一次染毒所产生的毒性效应(或死亡)进行比较。这种方法较为简便,但不能区分化学毒物的蓄积性是物质蓄积还是功能蓄积。蓄积系数(accumulation coefficient)是多次染毒使半数动物出现效应(或死亡)的蓄积剂量 $[ED_{50(n)}]$ 与一次染毒使半数动物出现相同效应(或死亡)的剂量 $[ED_{50(1)}]$ 的比值,即:

$$K = \frac{ED_{50(n)}}{ED_{50(1)}}$$

在毒理学中研究化学毒物蓄积作用多选择动物来进行,以动物死亡一半为效应指标,那么上式可改写为:

$$K = \frac{LD_{50(n)}}{LD_{50(1)}}$$

K 值越小,表示化学毒物的蓄积性越大。如化学毒物在动物体内全部蓄积或每次染毒后毒效应是叠加的,则  $LD_{50(n)}$  等于  $LD_{50(1)}$ , 即  $K = 1$ 。如果反复染毒时实验动物对化学毒物发生过敏现象,则可能出现  $K < 1$ 。随着化学毒物蓄积作用减弱, K 值增加,通常认为  $K \geq 5$ , 其蓄积毒性极弱。一般依据蓄积系数分级标准来评价其蓄积毒性,见表 6-5。

表 6-5 蓄积系数分级标准

| 蓄积系数(K) | 蓄积毒级分级 |
|---------|--------|
| <1      | 高度蓄积   |
| 1~      | 明显蓄积   |
| 3~      | 中等蓄积   |
| 5~      | 轻度蓄积   |

蓄积系数法对评价化学毒物蓄积作用有一定使用价值,但是运用蓄积系数评价化学毒物潜在的慢性毒性仍应慎重,因为有些化学毒物的慢性毒性效应无法用 K 值表示。例如有的化学物质反复接触后产生免疫毒性,但其 K 值不一定很小。有机磷化合物往往 K 值很大,按评价标准多属于轻度蓄积,但是它的中枢神经系统的慢性危害与非胆碱能的毒作用却表现出慢性毒性效应。

蓄积系数法常用的实验方案主要有:

1. 固定剂量法 常选用大、小鼠等小型实验动物,染毒途径多用经口灌胃或腹腔注射。先

求出某毒物的  $LD_{50}$ , 然后选取相同条件的 40 只 (或更多) 实验动物, 随机分为两组, 一为染毒试验组, 一为对照组, 每组至少 20 只, 雌雄各半。在  $1/20 \sim 1/5 LD_{50}$  的范围内选定一个剂量, 每日以固定剂量, 定时和相同途径对试验组进行染毒, 观察记录动物死亡数。当试验组累积发生一半动物死亡即可终止试验。此时, 计算累积总接触剂量 [ $LD_{50(n)}$ ], 根据公式计算 K 值, 然后依上表进行评价。若接触剂量已累积达到 5 个  $LD_{50}$  剂量, 也可终止试验, 此时计算出  $K > 5$ 。固定剂量法试验期为 25 ~ 100 天。

2. 剂量递增法 试验方案同上, 仅是实验开始时按  $0.1 LD_{50}$  剂量给予试验组染毒, 以 4 天为一期, 按一定比例增加染毒剂量。一般来说, 在试验的头 4 天, 每日给予  $0.1 LD_{50}$  剂量染毒, 从第五天开始每 4 天为一期递增 1.5 倍, 即  $0.1 LD_{50} \times 4$  天,  $0.15 LD_{50} \times 4$  天,  $0.22 LD_{50} \times 4$  天, 依次类推。这一方案试验期最长 28 天。在试验期间, 当化学毒物引起动物累积死亡一半时即可终止试验, 计算 K 值进行评价。一般来说, 在试验第 21 天也可结束试验, 因为这之前如果动物没有死亡或死亡数不足一半, 说明其累积剂量已达  $5.26 LD_{50}$ , 即  $K > 5$ 。使用本方法时要注意染毒期间定期 (每 4 天一次) 给动物称重, 按实测体重, 调整化学毒物的染毒绝对量。本方法剂量设计方案见表 6-6。

表 6-6 剂量递增法使用剂量表

|                      |      |      |      |       |       |       |       |
|----------------------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|
| 接触天数(天)              | 1~4  | 5~8  | 9~12 | 13~16 | 17~20 | 21~24 | 25~28 |
| 每日接触剂量( $LD_{50}$ )  | 0.10 | 0.15 | 0.22 | 0.34  | 0.50  | 0.75  | 1.12  |
| 4日接触总剂量( $LD_{50}$ ) | 0.40 | 0.60 | 0.90 | 1.36  | 2.00  | 3.00  | 4.48  |
| 累积接触总剂量( $LD_{50}$ ) | 0.40 | 1.00 | 1.90 | 3.26  | 5.26  | 8.26  | 12.74 |

3. 剂量固定的 20 大蓄积法 该法是基于蓄积系数的原理而设计的。它通常采用经口灌胃染毒方式, 将动物随机分为 5 个组, 包括阴性对照组和  $1/20 LD_{50}$ 、 $1/10 LD_{50}$ 、 $1/5 LD_{50}$  和  $1/2 LD_{50}$  四个剂量组, 每组动物数 10 只, 雌雄各半。每日染毒一次, 连续染毒 20 天。观察每组雌雄合计的死亡动物数量。试验结束时根据下列标准进行评定: ①各剂量组均无死亡, 即为蓄积性不明显; ②如仅  $1/2 LD_{50}$  剂量组有死亡, 其他组均无死亡, 则为弱蓄积性; ③如  $1/2 LD_{50}$  剂量组无死亡, 其他各组间死亡数有剂量反应关系时, 则为中等蓄积; ④如  $LD_{50}$  剂量组有死亡, 且有剂量反应关系, 则为强蓄积性。

## (二) 生物半减期法

生物半减期法 (biological half-life,  $t_{1/2}$ ) 是用毒物动力学原理描述化学毒物在机体内的蓄积作用。

化学毒物在体内蓄积的速度和量与机体单位时间内吸收该物质的速度以及清除速度有关。即使化学毒物以相等的时间间距恒速吸收入血液, 该物质在一定剂量范围内在机体的蓄积量也不呈直线无限地增加, 而是呈曲线形上升并有一定极限。这是因为化学物质吸收进入机体的同时体内也发生着代谢转化及清除的过程 (包括血中化学毒物向组织脏器的分配过程)。当化学

毒物的吸收过程与代谢转化清除的过程达到平衡时,其蓄积量基本上不再增加。

一般来说, $t_{1/2}$ 较短的化学毒物达到蓄积极限所需的时间也短, $t_{1/2}$ 长者达到蓄积极限的时间也长。化学毒物 $t_{1/2}$ 与其在体内蓄积过程的典型曲线关系见图6-1。

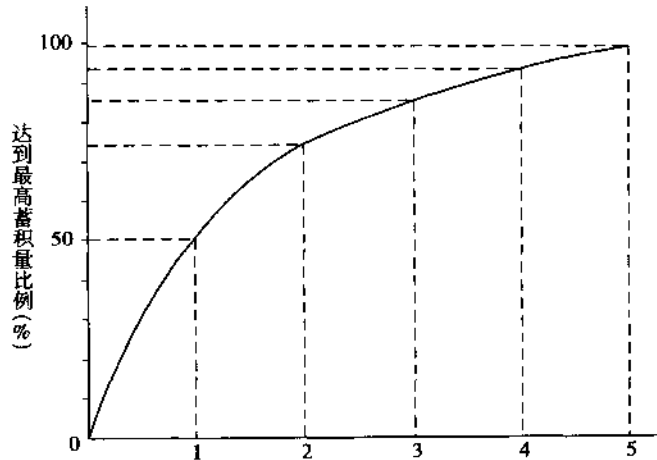


图6-1 化学毒物在机体内的蓄积曲线

从上图来看,一种化学毒物若以 $t_{1/2}$ 相等的时间间距染毒,其在体内经过6个 $t_{1/2}$ 的接触期就可以基本上达到蓄积的极限,此时理论蓄积量达到极限的98.4%。此后即使继续接触该物质,机体内的蓄积量基本上也不会增加。

根据 $t_{1/2} = 0.693/K_e$ ,通过动物血浆中化学毒物浓度求得 $t_{1/2}$ 。根据公式 $C = C_0 e^{-K_e t}$ 可推算蓄积极限值,该公式以积分成为下式:

$$C = C_0 / K_e (1 - e^{-K_e t})$$

若以每日机体吸收化学毒物量 $a$ 代替 $C_0$ ,以经过 $t$ 天后机体内化学毒物总蓄积量 $A$ 代替 $C$ ,则上式可写成:

$$A = a / K_e (1 - e^{-K_e t})$$

当 $t = \infty$ ,则该式变为下式:

$$A_{\infty} = a / K_e$$

以 $t_{1/2} = 0.693 / K_e$ 代入式,则:

$$A_{\infty} = a \frac{0.639}{t_{1/2}}$$

展开即成:

$$A_{\infty} = 1.44 a t_{1/2}$$

由此可见:蓄积极限值( $A_{\infty}$ )等于每日机体吸收化学毒物的量与 $t_{1/2}$ 的乘积,再乘以常数1.44。

研究外源化学物蓄积作用的方法虽有多种,但尚有缺陷和不足之处,有待进一步发展。

### 第三节 亚慢性和慢性毒性作用

#### 一、亚慢性毒性作用

##### (一) 亚慢性毒性的概念

亚慢性毒性(subchronic toxicity)是指实验动物或人连续较长期接触外源化学物所产生的中毒效应。所谓“较长期”是相对于急性、慢性毒性而言。并没有统一的、严格的时间界限,通常为1~6个月。

##### (二) 亚慢性毒性试验的目的

亚慢性毒性试验以化学毒物连续反复的染毒、比较充分而适当的接触时间、较大范围的剂量和广泛深入的检测,可以观察实验动物所产生的生物学效应,获得丰富的毒理学信息。在实际工作中应用很多,特别是在评价新化学物的毒性方面,目前尚无法替代。归纳起来亚慢性毒性试验的目的为:

1. 研究受试物亚慢性毒性剂量-反应(效应)关系,确定未观察到有害作用的剂量(NOEL)和其观察到有害作用的最低剂量(LOAEL),提出安全限量参考值。
2. 观察受试物亚慢性毒性效应谱、毒作用特点和毒作用靶器官。
3. 观察受试物亚慢性毒性作用的可逆性。
4. 为慢性毒理试验的剂量设计和观察指标选择提供依据。
5. 为在其他试验(急性、亚急性、其他动物物种的亚慢性试验等)中发现的或未发现的毒作用提供新的信息,比较不同动物物种毒效应的差异,为受试物毒性机制研究和将研究结果外推到人提供依据。

##### (三) 亚慢性毒性试验方法的要点

###### 1. 实验动物的选择

(1)物种和品系:亚慢性毒性试验一般要求选择两种实验动物,一种是啮齿类,一种是非啮齿类,以便全面地了解受试物的毒性。从理论上说亚慢性毒性试验选择的实验动物应是对受试物的生物转化、生理生化、毒性反应与人类相当或相似的物种,但是在实际工作中往往不易满足。基本上均使用大鼠和犬,有时用猴,这取决于受试物的重要性和试验条件。亚慢性经皮毒性试验,可用兔或豚鼠。实验动物品系大鼠常用 Wistar 和 Sprague-Dawley。犬的亚慢性毒性试验国外使用的品系多为 Beagle 犬,国内过去限于条件,使用杂种犬较多。杂种犬性情暴躁,种系混杂,寄生虫病严重,生理生化指标不稳定,不适合做亚慢性毒性试验,现多选用 Beagle 犬。

(2)性别、年龄和动物数:亚慢性毒性试验一般要求选用两种性别,每组雌雄各半。特殊情况下如研究某种受试物的性腺毒性或生殖毒性,也可选用单性别的动物。一般选择离乳不久的

动物,大鼠6~8周龄(体重80~100g)。同组动物体重相差不应超过平均体重的10%,组间平均体重不超过5%。大鼠、小鼠每组不少于20只,犬、猴每组不少于6只。若试验要求在试验中期处死部分动物作中期检测,则每组动物数量要相应增加。对照组和剂量组动物数应相同,体重(年龄)一致。

(3)微生物学寄生虫学等级和饲养环境:亚慢性毒性试验周期较长,观察指标较多,实验动物的质量、饲料条件和试验环境明显影响受试物的毒性反应。应尽可能使用高等级实验动物,在符合国家实验动物标准的试验环境中进行。按原国家实验动物微生物学和寄生虫学等级及监测分类,实验动物分四级:普通级、清洁级、无特定病原体级(SPF级)、无菌级。我国2001年版实验动物新的国家标准,对微生物学和寄生虫学等级进行了重新设定,取消了实验大鼠和小鼠的普通级,犬和猴分为普通级和SPF两级。亚慢性毒性试验,应使用清洁级及以上等级大小鼠,并饲养在屏障环境内进行试验。该环境严格控制人员、物品和环境空气的进出。保持符合规范的温度、日温差、湿度、换气次数、气流速度、压强梯度、落下菌数、空气洁净度、氨浓度、噪声和照度。合理营养的饲料,洁净的饮水,清洁无污染的垫料和笼具。不同项目的试验应分室进行。人工控制昼夜交替。

2. 染毒方式 亚慢性毒性试验染毒途径的选择主要考虑二点:一是应当尽量选择与人类接触途径相似的方式;二是应当与预期进行的慢性毒作用研究的接触途径相一致。一般以经口、经呼吸道和经皮染毒为多。染毒频率通常每日一次,连续给予,如试验期为3个月或超过3个月时,也可每周6次。实际工作中,亚慢性毒性试验染毒中有几个问题要注意。

(1)经口染毒途径有三种方式:灌胃法、喂饲法、胶囊法。一般大小鼠建议灌胃法,特别是在要求染毒量准确性较高的情况下。犬采用胶囊法或灌胃法。在采用将受试物混入饲料,让动物自行食入的喂饲法时,应提供受试物在饲料中混合均匀性、稳定性等方面的资料 and 措施,否则易影响试验结果。长期灌胃给药需熟练的技术和非常认真负责的工作态度,每只实验动物经受几十次、上百次的灌胃,一次失误就可能损失一只动物,进而影响试验结果。如出现失误,均应如实记录,以利试验结果的准确评价。

(2)经呼吸道染毒的时间通常为每日2~6h,根据设计需要可缩短或延长。工业毒物可以缩短至1h,环境污染物可延长至8h。

(3)随着注射剂型的新药增多,需经常进行注射染毒长期毒性试验。犬静脉注射比较易行、常用。但大鼠反复长期的静脉注射十分困难,即使有熟练的技术人员,也是难以进行的。如无专用的大鼠静脉注射和留置装置,可用其他注射途径代替,如腹腔注射。尽管大鼠有较强的抗感染能力,但长期反复腹腔注射仍应注意无菌操作。

(4)一些特殊染毒途径的亚慢性毒性试验,受目前技术条件的限制较难进行,常不能确保给药量的准确。如长期反复的直肠用药、眼睛用药等,期待研制出完善的专用装置。

(5)在进行亚慢性毒性试验时,最好结合进行毒代动力学血药浓度的监测。为了维持实验动物体液中有一个准确的血药浓度水平,保持受试物生物学效应每日相似性,亚慢性毒性试验每日染毒的时间应保持一致。一般在每日上午进行,给药后喂食。

3. 剂量选择和分组 在亚慢性毒性试验的设计中,染毒剂量的选择是最重要的和最难的问题之一。为了得出准确的剂量反应关系,充分观察受试物亚慢性毒性作用,一般至少应设3个剂量组和1个阴性(溶剂)对照组。高剂量组应能引起明显的毒性或少量动物的死亡(少于

10%)。低剂量组应无中毒反应,相当于未观察到有害作用剂量(NOAEI)。高低剂量组间设置1个中剂量组,比较理想的中剂量组约相当于观察到有害作用的最低剂量(LOAEI)。通常可根据两个参数确定高剂量,急性毒性的阈剂量,或1/5~1/20的LD<sub>50</sub>剂量(同一动物品系和同样染毒途径)。高、中、低剂量组距以3~10倍为宜,一般不少于2倍。对于药物,还常采用人临床拟用剂量和药剂量作依据,大鼠可用人临床拟用剂量的10、30和100倍,非啮齿类可用5、15、50倍。农药、食品添加剂、工业化学品和其他非药用化学物试验剂量选择的基本原则有很多相似之处,但由于各自具有专业特殊性以及管理部门的不同,均有各自不同的剂量设计规范要求。一些国际组织和专业国际协调会议(如ICH)多次就剂量选择及有关问题进行了讨论和改进,并发布研究指南。在实际工作中,由于受试物多样性和试验中多种因素的变化,亚慢性毒性试验的剂量设计和确定是很不容易的,需要具有丰富的毒理学经验。

4. 观察指标 对经外源化学物染毒后的实验动物进行全面、系统、深入的观察检测是亚慢性毒性试验必做的工作,检查的时间包括试验过程中、染毒结束时,有些情况下,还需在染毒前和染毒结束后的恢复期做检查。检查的项目包括一般性指标、实验室指标、系统尸解和组织病理学检查、其他特殊指标检查。图6-2为检测各种毒性终点的流程图。

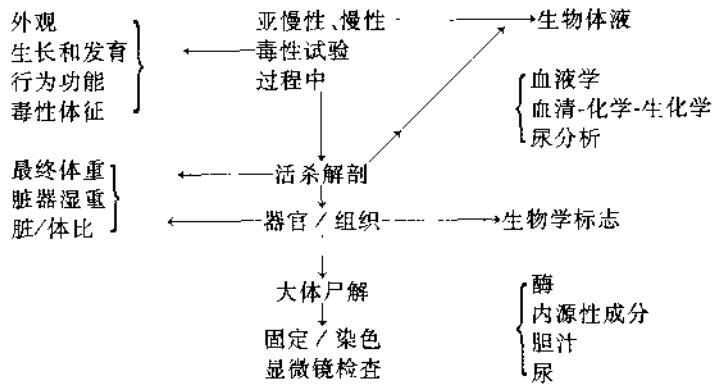


图6-2 亚慢性和慢性毒性试验检测各种毒性终点的流程图

合理地选择观察指标和采用灵敏、精确的检测方法是正确评价化学毒物对机体毒效应的关键。一般来说,亚慢性毒性试验选择的指标应比较广泛,具有筛选性。观察指标和测试项目一般根据急性试验、蓄积试验提供的数据,以及参考有关文献资料或已有的同系物毒性资料进行选择。通常包括一般性指标、组织病理学检查和特异性指标。

(1)一般性指标:主要指外观体征和行为活动、粪便性状、食量及体重变化等,常常能综合反映毒物对机体的毒作用,往往是敏感的综合毒效应指标。在试验过程中,应详细记录,仔细分析,可以从中发现一些化学毒物的毒性特征。

1)外观体征、行为活动:每日观察实验动物出现的外观体征和行为改变,记录各体征出现的时间和先后次序,包括食欲、活动、被毛、分泌物、排泄物、呼吸等,尤其要留意动物被毛的光洁度与色泽、眼分泌物、呼吸、神态、行为等。这些资料有助于分析化学毒物损害机体的部位及程度。

2)动物体重:动物体重是一个相当重要且比较敏感、客观的指标,反映了受试物对实验动物的生长发育及一般状态的影响。与对照组处于相同的喂食条件下,如果受试组动物体重增长比

对照组低 10%，可以提示是由受试物引起的毒效应，如果各剂量组体重增长改变有剂量-反应关系，则可以肯定是一种毒性效应。实际工作中需注意的是对照组和各试验组的饲养条件一致，不仅仅指用同一批动物，同样的饲养条件，而且动物所处笼盒的位置、局部光照、湿度等各组间也应设法保持一致。一般每周称重一次，3 个月以后也可每 2 周称重一次。

对各剂量组和对照组同期体重的统计比较可有多种方式，可以用体重直接统计，也可用体重的增长重量，或用体重百分增长率（以染毒开始时体重为 100%）进行统计和比较。

3) 饲料消耗量：亚慢性试验期间必须每周观察并记录动物的饲料消耗量，并计算食物利用率，即动物每食入 100g 饲料所增长的体重克数（g 体重/100g 饲料）。在经喂饲法染毒时，可计算各组动物实际染毒剂量。比较各染毒组与对照组动物的食物利用率，有助于了解化学物的毒性效应，尤其将体重指标和食物利用率结合起来分析。如果受试物影响食欲，则每日进食量减少，体重增长会受影响，但食物利用率不一定改变。如果受试物干扰了食物的吸收或代谢，虽然不一定影响食欲，但体重增长却减慢，因而食物利用率也会有改变。

(2) 实验室检查：通常包括血、尿常规和血液生化指标检测，在亚慢性毒性试验中，这是非常重要不可缺少的检查。血、尿等体液的实验室检查目的是发现受试物所致器官损伤和功能紊乱，体内生化转化和排泄的重要器官肝和胃的功能是检查重点，血液是另一个重要的靶器官。

1) 血液学检查：包括红细胞计数、血红蛋白含量、白细胞计数及分类、血小板计数、凝血时间等。

2) 血液生化检查：通常为血清天门冬氨酸氨基转移酶（AST）、丙氨酸氨基转移酶（ALT）、碱性磷酸酶（ALP）、尿素氮（BUN）、总蛋白（TP）、清蛋白（ALB）、血糖（GLU）、总胆红素（T-BIL）、肌酐（Crea）、总胆固醇（T-CHO）等。正常情况下，血清中可检测到 AST、ALT 等酶，组织特异性并不强。但在肝脏细胞浆中水平较高，在某些毒物作用下，肝细胞膜受损，肝细胞浆中的酶进入血液，导致血清中酶水平升高。血清酶类指标的检测对毒物的肝毒性作用较敏感，对于其他靶器官毒性的敏感性不如肝脏。当仅有单个参数变化时，分析其生物学意义应慎重。对血液生化学指标变化的毒理学意义的正确分析和判断，需要深厚的医学生物学和毒理学经验。

尿液检查包括外观、pH 值、蛋白、糖、潜血和沉淀物镜检等，可提供与毒物有关的靶器官毒性和中间代谢产物的信息。

如用大鼠作试验，不需在给药前作实验室检查，只需在试验结束时取血检查，若有必要或试验期较长，应在染毒期间增加检测 1~2 次。如用大动物犬等试验，应在染毒前检测 1~2 次。如有恢复期试验，在恢复期结束时亦应作实验室检查，对判断受试物作用的可逆性、延迟性有重要意义。不影响实验动物生理功能的最大取血量为其总血量的 10%。总血量约为 50ml/kg，0.3kg 的大鼠约有 15ml 血液，一次取血量不应超过 1.5ml。

(3) 系统尸解和组织病理学检查：试验结束时活杀实验动物，作系统解剖，进行详细的肉眼检查，测定脏器重量并作组织病理学检查。在试验中间死亡或处于濒死状态的动物，亦应作及时的系统尸解和病理学检查。

1) 脏器重量和脏器系数：一般称取心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、卵巢或睾丸、脑等脏器湿重，并计算其脏器系数。脏器系数或称脏体比，指某个脏器的湿重与单位体重的比值，通常是每 100g 体重中某脏器所占的质量，表示为脏器质量（g）/体重（100g）。该指标比较适用于实质性脏器，若某脏器的脏器系数增大或减小，则反映该脏器的肿大或缩小，如增生、充血、水肿、萎缩等变化。



应用时既要注意称重前洗净脏器表面血污,用滤纸吸干表面水分,也要防止脏器风干失水,还应注意去净结缔组织。

2)病理学检查:组织病理学检查是亚慢性毒性试验中最重要的检测指标之一,目的是确定化学毒物对机体毒作用的靶部位、损害的性质和程度,从病理学角度寻找化学毒物与病理改变的剂量效应关系,为了解化学毒物的毒效应及其机制提供依据。

病理学检查包括:大体检查、常规组织病理学检查、酶组织化学检查、免疫组织化学检查、细胞超微结构检查等,分别从大体、组织、细胞、亚细胞,甚至分子水平等多个方面发现化学毒物的毒效应。

亚慢性毒性试验必须重视组织病理学检查。凡是在染毒过程中死亡的动物应及时解剖,肉眼检查后取材进行组织病理学检查,必要时作组织化学或电镜检查。关于选择哪一种脏器和组织进行病理学检查,应参照化学毒物急性毒性的脏器改变或亚慢性中毒体征及其他生化检查阳性结果而定,必要时应对所有脏器进行病理学检查。

(4)其他指标的检查 在亚慢性毒性试验中,除了上述通常的检查指标外,常根据受试物毒性资料、试验中的观察和受试物的结构等线索增加一些检查项目。如推测受试物可能对心血管系统有毒性,可进行心电图、血压、眼底检测;对神经系统有影响,可进行神经行为、神经反射等检查;对电解质、微量元素代谢有毒作用,则检测血钙、血磷等含量;还可增加眼科、骨髓象检查等等。病理学方面除大体解剖和常规病理检查外,还可根据需要,增加酶组织化学检查、免疫组织化学检查和细胞超微结构检查等。总之,为了充分了解受试物的中毒特征,获得尽可能多的揭示毒性靶器官和中毒机制的线索,亚慢性毒性试验应认真仔细地选择观察指标,如能有特异性指标则更好。所谓特异性指标是指能反映毒物对机体毒作用本质的特征性指标,常与其毒作用机制有关。实际上特异性指标就是生物学标志。确定特异性指标的难度较大。有时为了充分评价某种新药的毒性,常用几年时间,先后进行一系列的亚慢性毒性试验,针对前一个试验中发现的中毒表现线索,专门设计新的试验和增加特殊观察指标,或进行靶器官毒理学研究,以准确评价其毒性。

## 二、慢性毒性作用

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

### (一) 慢性毒性的概念

慢性毒性(chronic toxicity)是指实验动物或人长期(甚至终生)反复接触外源化学物所产生的毒性效应。所谓“长期”,一般是指2年。对大鼠相当于终生染毒,对兔相当于生命期的36%,对犬为20%,对猴为13%。

### (二) 慢性毒性试验的目的

1. 研究慢性毒性剂量-反应(效应)关系。确定长期接触造成有害作用的最低剂量(LOAEL)或阈剂量和未造成有害作用的剂量(NOAE),为制定人类接触时的安全限量标准,如最高容许浓度(MAC)和每日容许摄入量(ADI)以及危险度评价提供毒理学依据。

2. 观察慢性毒性效应谱、毒作用特点和毒作用靶器官。

3. 观察慢性毒性作用的可逆性。
4. 为毒性机制研究和将毒性结果外推到人提供依据。

### (三) 慢性毒性试验方法要点

1. 实验动物的选择 慢性毒性试验选择实验动物的原则与亚慢性毒性试验相同,应使用2种哺乳动物。实际工作中大多用大鼠、犬和猴,经皮染毒也可使用豚鼠和家兔。动物数量要明显多于亚慢性试验,每组大鼠40~60只,犬8~12只,雌雄各半。如在试验过程需要分批处死部分动物时,则应适当增加每组的动物数,以满足试验结束时数据统计处理的要求。试验结束时每个剂量组每性别的啮齿类动物数不少于10只,非啮齿类不少于4只。慢性毒性试验期长,故应选择年龄较小的动物,一般选初断奶的动物,即小鼠出生后3周(体重约10~15g),大鼠出生3~4周(体重约50~70g),犬一般在4~6月龄时开始试验。

2. 染毒途径和时限 从理论上来说染毒途径应选择和人类实际接触相似的途径,但在长达2年多的慢性试验中有些染毒途径很难进行,实际工作中多采用经口染毒,一般每周染毒5~6天。根据需要也可经皮肤染毒和经呼吸道染毒,长期呼吸道染毒需有良好的专用动式吸入染毒装置。

慢性毒性试验动物染毒的期限究竟以多长为宜,应根据试验具体要求和所选用的动物物种而定。研究工业毒物一般认为染毒6个月或更长时间,环境毒物与食品的慢性毒性试验染毒期则要求1年以上或2年。也有学者主张动物终生染毒,这样求得的阈剂量或LOAEL和NOAEL更能准确反映化学物质的慢性毒性作用。如果慢性毒性试验与致癌试验结合进行,则实验动物染毒时间最好接近于动物的预期寿命,甚至动物终生染毒。

3. 剂量分组 慢性毒性试验一般设3个染毒剂量组和1个对照组,必要时另设1个溶剂对照组,一般认为以亚慢性毒性试验的LOAEL等确定。以其1/5~1/2为高剂量组,以1/50~1/10为中剂量组,1/100为低剂量组。

如无亚慢性试验资料,可以参照LD<sub>50</sub>值设计剂量,如以1/10 LD<sub>50</sub>为高剂量组,1/100 LD<sub>50</sub>为中剂量组,1/1000 LD<sub>50</sub>为低剂量组。各染毒剂量组之间的剂量间距应当大一些,组间剂量差一般以5~10倍为宜,最低不小于2倍。

慢性毒性试验由于周期长,人力、物力、财力消耗很大。由于剂量设置不合理造成慢性毒性试验失败和结果不理想是毒理学工作者的严重失误。如果是承担农药或药品等法规性安全性评价,将会造成委托检测单位难以弥补的损失,也会极大影响试验研究者的声誉。合理的剂量设置应能得到如下结果:足够高的剂量以能观察到受试物的毒性作用,阐明毒性靶器官,同时试验能顺利进行;有明确的剂量-反应关系,得到理想的LOAEL和NOAEL。要做到这些实属不易,应该说一个慢性毒性试验的剂量选择是对毒理学家知识和经验的最困难的挑战之一。

4. 观察指标 慢性毒性试验的观察和亚慢性毒性试验相似,亦需进行一般性指标、实验室检查、病理学检查及其他特异性指标的检查四方面,每个方面的观察指标选择更多更全面。以亚慢性毒性试验所提供的毒效应和靶器官为基础,重点观察在亚慢性毒性试验中已经显现的阳性指标。优先采用亚慢性毒性试验筛选出来的敏感指标或特异性指标。必须指出的是,在慢性毒性试验和(或)致癌试验中,组织病理学检查是非常重要的和必不可少的,常常是最客观和最有说服力的指标。

试验结束时,部分实验动物停止染毒,继续留养1~2个月,进行恢复期观察,对已显现变化的指标进行追踪观察,有助于了解受试物有无后作用、迟发作用及损害效应的可逆性,为制订卫生标准和确定人类使用的安全限量标准时选择安全系数提供参考。

#### (四) 慢性毒性试验的注意事项

慢性毒性试验有不少特殊性。时间长,试验过程中动物容易发生自发性疾病,干扰实验结果。实验人员操作错误出现的可能性较大,检测仪器和试剂的变化不易控制。长期低剂量染毒,实验动物处在不断损伤、不断适应和恢复的过程中,观察指标的变化程度较小,变化规律复杂。慢性毒性试验通常和终生致癌试验合并进行,观察指标多,毒性反应观察终点复杂。总之,影响慢性毒性试验结果的客观和主观因素繁杂,在试验中应充分注意以下几点:

1. 试验动物环境的要求 试验动物的饲养和试验环境规范化十分重要。如用大鼠作慢性毒性试验必须在符合国家实验动物标准的屏障环境中进行,试验环境的各项参数见前述亚慢性毒性试验。相对于设施的硬件条件来说,“软件”即运行的管理和严密的维护更重要。相对于屏障系统静态的达标来说,动态试验过程中的稳定规范运行更有意义。保持试验动物屏障设施在两年多的试验期间一直稳定有效规范地工作,是慢性毒性试验正常开展的基本要求,但却不易做到。需有优良的设施和备用条件,有认真负责、工种齐全、技术精湛的维护人员队伍。

2. 检测条件的控制 慢性毒性试验在试验前、试验过程中和结束时要多次检测,这就不仅要求所有检测仪器和辅助条件在短期内的准确可靠,而是长期稳定可比。惟一的方法就是实施严格的质量控制。国家在临床检验规范化和质控方面有一套组织机构和标准,承担长期毒性试验的单位应主动加入国家甚至国际有关的质控体系。从仪器设备、试剂的选购、安装、保管、维护、校正,到检测方法、样品处理等的标准操作规程(SOP)制订,经常性的室间和室内质控,操作人员的培训等均纳入科学的管理之中。

3. 重视试验前和对照组的检测,动态地、密切地观察检测试验全过程各项指标的变化。在试验前尽可能多的获取检测数据,剔除个体差异过大的动物,使实验对象保持齐同,为最后结果的比较、评价和毒性结论的判断提供良好基础。染毒期间动态检测,在原先设定的检测外根据毒性反应情况可增加观察的频度和范围。在试验过程中濒死或死亡动物,要注意提前采集生物材料作检查。

总之,慢性毒性试验应在优良实验室规范亦即GLP规范下进行,在试验全过程中贯彻和执行GLP的要求。

(肖 杭)

# 7

## 第七章

# 外源化学物致突变作用

## 第一节 概 述

### 一、基本概念

生物在世代繁衍中存在着遗传与变异,它是普遍存在于生物界的生命现象。生物物种可以通过各种繁殖方式来保证世代间生命的延续,这个过程称为遗传。遗传是保持生物种族特性的根本。遗传的稳定是相对的,一方面生物的遗传物质在自我复制过程中有可能发生改变;另一方面生物个体发育在受到复杂变化的内外环境条件影响下,性状的发育可能有所不同。于是在亲子之间或子代个体之间出现不同程度的差异,这种差异称为变异(variation)。变异是生物物种推陈出新的来源。造成生物变异的原因有:①亲代个体杂交产生子体,由于重组而发生;②由于基因突变而发生,它是新基因产生的根本来源;③由于生物的染色体组成或细胞质发生变化而产生。

遗传结构本身的变化及其引起的变异称为突变(mutation)。突变实际上是遗传物质的一种可遗传的变异。突变可分为自发突变(spontaneous mutation)和诱发突变(induced mutation)。自发突变的发生率极低,物种的进化与自发突变有密切关系。诱发突变是指人为地造成突变,它已被农、林、牧、渔业和园艺学家利用来培育和选择新种或良种。另一方面,突变也会引起人类健康的危害,早在1927年Muller推测体细胞突变可引起癌,直到20世纪60年代初,人们才认识到致突变的健康危害。随之产生一门新学科,即遗传毒理学(genetic toxicology),它研究化学性和放射性物质的致突变作用以及人类接触致突变物可能引起的健康效应。遗传毒理学主要研究致突变的作用机制,应用检测系统发现和探究致突变物,提出评价致突变物健康危害的方法。致突变作用(mutagenesis)的广义概念是外来因素,特别是化学因子引起细胞核中的遗传物质发生改变的能力,而且此种改变可随同细胞分裂过程而传递。突变(mutation)是致突变作用的后果,其中包括从一个或几个DNA碱基对的改变,即基因突变(gene mutation)到染色体的结构及数目改变,即染色体畸变(chromosome aberration)。简单地说,突变的发生及其过程即为致突变作用。能够引起突变的物质称为致突变物(mutagen)。

## 二、遗传学基础

1. DNA 与基因 生物界遗传与变异现象,都与遗传物质 DNA 的特殊结构及其精确复制和高保真度的修复方式有密切关系。在真核细胞中,遗传信息储存在核内的 DNA 链上,DNA 是大分子物质,由脱氧核糖、磷酸及碱基组成,其基本成分为四种核苷酸,形成双螺旋结构。基因(gene)是 DNA 分子中最小的完整功能单位。基因的基本作用在于决定蛋白质的一级结构,即每个基因决定一条多肽链或者说一个基因决定一种酶。基因是生物遗传信息的携带者,细胞或生物体的一套完整单体的遗传物质称基因组(genome)。

2. 染色质与染色体 在间期细胞的细胞核中,通过光镜可见一种能被碱性染料着色的物质,即染色质(chromatin)。它由 DNA、组蛋白、非组蛋白及少量的 RNA 组成,形似串珠状的复合体。在间期细胞核中,一般没有染色体结构,只有在细胞分裂时,染色质才螺旋化并折叠成染色体(chromosome),故染色质与染色体是由相同物质组成的;染色体存在于细胞中,通常只有在细胞分裂时经过特殊染色才能清楚地看到。将体细胞的全部染色体按其大小形态等方式排列起来即构成细胞的核型。每一种生物种属的核型是固定的,这是细胞分类学的基础。

染色体与基因有着平行的关系,表现为:①染色体可以在显微镜下看到,有一定的形态结构;基因是遗传学的单位,每对基因在杂交中仍保持它们的完整性和独立性。②染色体成对存在,基因也成对存在。在配子中每对基因只有一个,而每对同源染色体也只有一条。③个体中成对的基因一个来自母本,另一个来自父本。染色体也是如此,两条同源染色体分别来自母本和父本。④不同对基因形成配子时的分离与不同对染色体在减数分裂期的分离,都是独立分配的。

3. 体细胞和生殖细胞 大多数真核生物由体细胞和生殖细胞组成。体细胞(somatic cell)多是二倍体(diploid)细胞,含有两组完全相同的染色体,其遗传损伤不会遗传给下一代。生殖细胞(germ cell)往往是单倍体,其染色体改变即突变可传给下一代。突变的生殖细胞根据其在二倍体中的表达,分为显性或隐性。显性突变无论纯合子,还是杂合子均会出现表型异常;隐性突变如为纯合子,将出现表型异常,若为杂合子,则为表型正常的携带者。

4. 基因型与表型 基因型系指控制生物性状的基因组成,它是生物体的遗传组成。通过杂交试验才能鉴定。基因型是性状发育的内因,是表型形成的根据。环境因素对遗传所起的作用必须通过基因型才能实现。表型指在发育过程中由基因所控制的生物性状的具体表现。它可以用理化方法直接测定。表型是不同基因之间以及基因与环境之间极其复杂的相互作用的结果。确切地说基因型只能决定表型可能发育的范围,会产生怎样的表型将取决于生物生长发育所处的环境。外界环境是基因型转变成具体表型的必要条件。

5. 细胞周期、有丝分裂与减数分裂 细胞周期指细胞一次分裂结束,并开始生长,到下一次分裂终止所经历的过程。此过程所需的时间为细胞周期时间。过去将细胞周期分为间期和分裂期。目前,将细胞周期分为四个时期:G<sub>1</sub>期是细胞进行急剧合成的时期;S期完成DNA复制;G<sub>2</sub>期为有丝分裂做准备,M期是有丝分裂期。有丝分裂(mitosis)指细胞核分裂的过程,一个细胞由此生成两个子细胞,每个子细胞各具有与亲代细胞完全相同的染色体。有丝分裂经历一系列复杂的生物学过程,包括核的变化、染色体和纺锤体的变化、细胞器的变化以及染色体平均分配到每个子细胞。有丝分裂中期染色体进一步浓缩成典型的形态,且分散排列在赤道面上,故中

期很适于做染色体的形态和结构方面的研究。

减数分裂(meiosis)指通过两个细胞周期使染色体数目减少一半的细胞分裂方式。它是一种特殊的有丝分裂。其细胞核分裂两次,而染色体只复制一次,经过分裂后染色体数目减少一半,变成单倍体(haploid)。减数分裂的生物学意义在于维持生物染色体数目的恒定,保证有性生殖顺利进行,对个体发育和物种延续起重要作用。

## 第二节 化学毒物致突变的类型

遗传毒理学家主要关注三类遗传学损伤,即基因突变、染色体畸变及染色体数目改变。这些损伤多因 DNA 受损所致,也可能因 DNA 以外的靶组织受损所致。基因突变、染色体畸变及染色体数目变化的本质是相同的,其区别在于受损程度。通常以光学显微镜的分辨率  $0.2\mu\text{m}$  来区分基因突变和染色体畸变。基因突变是用光学显微镜观察不到的,须通过生长发育、生化、形态等表型改变来判断,而染色体畸变可用光学显微镜进行观察。

### 一、基因突变

基因突变指基因中 DNA 序列的变化。因基因突变限制在一特定的部位,故称为点突变(point mutation)。传统的研究突变方法是通过给予致突变物,观察遗传学改变。例如,通过耳长或色素变化可检出小鼠发生了可见的特别突变。目前,可直接分析 DNA 序列来研究突变。基因突变可分为两种类型,即碱基置换和移码突变。

1. 碱基置换 碱基置换(base substitution)指某一碱基配对性能改变或脱落所致的突变。当 DNA 链上某一碱基由于致突变物作用而脱落或其配对性能发生改变,在 DNA 复制过程中该 DNA 互补链上的相应位点配上一个错误的碱基,即错误配对(mispairing)。这一错误配对的碱基在下次 DNA 复制时,按正常规律配对,于是原来的碱基对被错误碱基对所置换,称碱基置换。在碱基置换中, DNA 的一对碱基(如 G:C)被另一对碱基(如 A:T)所取代,如果是嘌呤置换另一嘌呤,或者是嘧啶置换另一嘧啶,称为转换(transition);如果是嘧啶换成嘌呤,或者嘌呤换成嘧啶,称为颠换(transversion)。转换和颠换的结果取决于其在蛋白质合成过程中的错义密码和无义密码的多少。在错义突变中,密码子发生了改变,从一种氨基酸变成另一种氨基酸,突变可能产生无活性的基因产物,对其功能无影响或者是严重影响,它取决于替代的特定氨基酸及其在蛋白质一级结构中所处的位置。在无义突变中,基因产物是不完全或是无功能的。这种突变可通过防止转录或 RNA 的正常拼接阻止形成具有作用的基因产物。

2. 移码突变 移码突变(frameshift mutation)指发生一对或几对(3对除外)的碱基减少或增加,以致从受损点开始碱基序列完全改变,形成错误的密码,并转译成为不正常的氨基酸。在移码突变中,基因产物有明显地改变,因为在突变点之后,信使 RNA 的每个三联体均已改变。其基因产物也许是不完全的,因新的阅读框架似乎包括无义密码子(UAA, UAG 及 UGA),它不代表任何氨基酸,产生一个无功能的肽链片段。移码突变较易成为致死性突变。如果减少或增加的碱基对刚好是 3 对,则基因产物的肽链中仅减少或增加一个氨基酸,其后果与碱基置换相似,与

移码突变不一样,故不包括在移码突变范畴。

## 二、染色体畸变

染色体畸变(chromosome aberration)指染色体的结构改变,它是指遗传物质大的改变,一般可用光学显微镜检查适当细胞有丝分裂中期的染色体来发现。细胞学检测可发现染色体断裂及由断裂所致各种重排。畸变涉及复制染色体中两条染色单体中的一条,称为染色单体型畸变(chromatid-type aberration),而涉及两条染色单体,称为染色体型畸变(chromosome-type aberration)。例如,在DNA复制前电离辐射,可诱导染色体型畸变,如在DNA复制后,可诱导染色单体型畸变。产生何种畸变,取决于损伤发生在DNA复制前,还是复制后。当然,任何情况下见到的染色单体型畸变都将在下一次细胞分裂时衍生为染色体型畸变。

染色体结构异常是染色体或染色单体断裂所致。当断端不发生重接或虽重接而不在原处,即可出现染色体结构异常。染色体结构异常的类型:①缺失(deletion):染色体上丢失了一个片段。②重复(duplication):在一套染色体里,一个染色体片段出现不止一次。③倒位(inversion):一个染色体片段被颠倒了,如颠倒的片段包括着丝点,称为臂间倒位(pericentric inversion);如不包括着丝点则称为臂内倒位(paracentric inversion)。④易位(translocation):一个染色体片段的位置发生改变。最常见的是相互易位(reciprocal),涉及两个非同源染色体片段的交换。

有些畸变是稳定的,可通过重复细胞分裂传给子代。这些畸变如缺失、倒位、重复及平衡易位等,多数为染色体重排,可在机体或细胞群传递。除稳定的畸变外,染色体断裂可产生无中心粒的片段、双中心粒染色体、环状染色体及各种其他不对称重排等,均为不稳定的畸变。因为,通常由于他们丧失重要的遗传物质或有丝分裂的机械障碍导致细胞死亡。稳定的畸变可用染色体分带染色技术检出,而用不分带的常规细胞分析方法则不易检出。然而,染色体分带分析要比标准细胞遗传学分析更费工。因此,染色体损伤的细胞中期相分析是常用的分析不分带染色体结构大的改变的首选。虽然,要检出的许多变化是不稳定的,但它可提供染色体断裂的直接证据。容易观察到的畸变有染色单体断裂、染色体断裂、无中心粒片段、染色单体交换、双中心粒染色体、环状染色体及某些相互易位。

## 三、非整倍体和多倍体

非整倍体(aneuploidy)和多倍体(polyploidy)的细胞的染色体数目是不同于正常的细胞染色体数目。非整倍体指增加或减少一条或几条染色体;而多倍体指染色体数目成倍增加。例如,人类体细胞正常为二倍体( $2n$ ),有46条染色体。例如,Down氏综合征,由21号染色体三体(trisomy 21)所致,它多了一条染色体,有三条21号染色体,染色体数目为47条,即该病由非整倍体所引起。如果细胞有45或47条染色体,则定义为非整倍体。如果有69条染色体,则定义为多倍体,此为三倍体。

### 第三节 化学毒物致突变作用的机制及后果

在实验动物中,用化学物质可诱导基因突变、染色体畸变、非整倍体和多倍体。在已检出的致突变物中,大多数有不同程度的特异性。这是因为化学毒物作用细胞靶部位的不同,诱导基因突变和染色体畸变的主要靶分子为 DNA,而诱导非整倍体和多倍体的靶部位常是有丝分裂和减数分裂的成分,如纺锤体等。

#### 一、引起突变的 DNA 变化

致突变作用的基础是 DNA 结构的化学或物理性质的改变。由于致突变物引起 DNA 变化的理化性质及位置不同而不同,故所致的突变类型也不同。

##### (一) 碱基损伤

1. 碱基错配 烷化剂(alkylating agent)是对 DNA 和蛋白质都有强烈烷化作用的物质。烷化作用指烷化剂提供甲基或乙基等烷基与 DNA 共价结合的过程。常见的烷化剂有烷基硫酸酯、N-亚硝基化合物、氮芥和硫芥等环状烷化剂和卤代亚硝基脲等。

烷化剂所致甲基损伤表现为错配。例如,乙基亚硝基脲(ethylnitrosourea, ENU)上的乙基可与 DNA 共价结合。烷化的碱基可表现出同样配对特性,像正常碱基一样;或者是不同的配对特性,主要取决于烷化的位置。通常在鸟嘌呤 7 位氮(N-7)上的烷化有正常配对特性,而在鸟嘌呤 6 位氧(O<sub>6</sub>)上的烷化很易与胸苷错配,引起 G:C-A:T 转换。

错配不是烷化剂引起突变的惟一机制,有些烷化碱基可引起 DNA 二级结构改变。例如,在 N-7 烷化鸟嘌呤上的烷基,它是由许多烷化剂形成的主要加成物,造成碱基与脱氧核糖连接的键不稳定,致使碱基丧失。丧失碱基的 DNA 留下了一个无嘌呤或无嘧啶的位点,通常称 AP 位点(apurinic or apyrimidinic site)。如果不正确的碱基插入 AP 位点,可引起突变,且大部分是颠换。

2. 平面大分子嵌入 DNA 链 化学致突变的关键是致突变物与 DNA 发生共价结合反应。然而,有些化合物,如 9-氨基吖啶(9-aminoacridine)的致突变作用,其机制是插入 DNA 的碱基对中。在 DNA 复制时,由于吖啶分子是较为扁平的分子,能够结合到 DNA 分子上,插入邻近的碱基对,使它们分开,造成 DNA 链歪斜,引起排列参差,产生两个重组子,一个碱基对增多,一个碱基对减少,即造成碱基对的缺失或者额外碱基对的插入。故 9-氨基吖啶是一种移码突变物。

3. 碱基类似物取代 有些化学物的结构与碱基非常相似,称为碱基类似物。它们在细胞周期的 DNA 合成期(S 期)中,能与正常的碱基竞争,取代其位置。取代后碱基类似物常造成错误配对,即发生碱基置换。常见的例子是 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU)取代胸腺嘧啶,2-氨基嘌呤(2-AP)取代鸟嘌呤。

4. 碱基的化学结构改变或破坏 有些化学物可对碱基产生氧化作用,从而破坏或改变碱基的结构,有时还引起链断裂。它们主要改变核酸中核苷酸的化学组成,其作用与 DNA 复制无关。例如,亚硝酸盐能使腺嘌呤和胞嘧啶发生氧化性脱氨,相应生成次黄嘌呤和尿嘧啶;羟胺使胞嘧



啉 C-6 位的氨基变为羧氨基。上述改变将造成碱基置换。破坏碱基结构还有另一机制,如甲醛,可在机体内形成有机过氧化物或自由基来破坏嘌呤碱,最终导致 DNA 链的断裂。

## (二) DNA 链受损

1. 二聚体的形成 当细胞或机体受到紫外线刺激,会使 DNA 发生化学变化,其主要产生环丁烷嘧啶二聚体和(4-6)光产物(4-6-photoproduct)。这些损伤可阻止 DNA 的复制,并引起细胞死亡。

紫外线和许多化学物致突变性表明突变作用作为细胞过程的复杂性,不仅涉及已改变碱基的配对特异性,而且还涉及与复制和修复有关的细胞机制相互作用。例如,辐射的致突变机制有:使连接 A-T、C-G 之间的氢键断裂;DNA 分子的一个或两个键中的糖-磷酸基之间断裂;DNA 同一条链上,相邻的嘧啶形成二聚体;水的电离,可产生自由基,也可引起突变。此外,辐射可组成 DNA 双链断裂或单链断裂,从而引起缺失、倒位、易位,甚至碱基破坏,情况比较复杂。

2. DNA 加合物形成 它是活性化学物与细胞大分子之间通过共价键形成的稳定复合物,通常很难用一般的化学或生物学方法使其解离。例如,烷化的 DNA 加合物, O<sub>6</sub>-甲基脱氧鸟苷,可引起碱基置换, N-乙酰基-N- $\alpha$ -乙酰氨基苄的 C<sub>8</sub>-鸟嘌呤加合物引起移码突变。

此外, DNA 加合物形成可活化癌基因,影响调节基因和抑癌基因的表达。

3. DNA-蛋白质交联物 (DNA-protein crosslinks, DPC) 形成 它是致突变物对生物大分子物质的一种重要的遗传损害,也是一种稳定的共价结合物。已知许多外来化合物如烷化剂、苯并(a)芘、砷化合物、醛类化合物如甲醛及一些重金属如镍、铬等,均可引起 DNA-蛋白质发生交联,虽然不同的化学物引起 DNA-蛋白质交联物的交联有所不同,但 DPC 一旦形成,必将对 DNA 构象与功能产生严重影响。其原因是核蛋白与 DNA 交联,核蛋白作为维持 DNA 构象的重要成分,并参与 DNA 复制与转录的调控,故 DPC 出现将造成突变。

## 二、引起突变的细胞分裂过程的改变

细胞分裂过程的改变

非整倍体和多倍体的产生不同于其他致突变作用,因为它们涉及不同的细胞靶分子。非整倍体和多倍体是由于染色体分离异常而产生的。主要涉及细胞分裂过程的改变如纺锤体,微管蛋白的合成与聚合,微管结合蛋白合成与功能发挥,细胞分裂纺锤纤维的功能发挥,着丝粒与之有关的蛋白质作用,极体复制与分离,减数分裂时同源染色体联合配对和重组等。

非整倍体细胞由正常细胞未分裂而产生,其原因有同源染色体减数分裂 I 期不能适当分离,或者姐妹染色体在减数分裂 II 期,或有丝分裂期不能适当分离。不分裂的结果是纺锤体的一极接受了同源或两个染色单体,而另一极则没有。假定只有一条染色体或一对染色体不分离,在子细胞中将多出一条或一对染色体,而在另一子细胞中将少一条或一对染色体。

与非整倍体不同,多倍体涉及整个染色体有三种情况:①在细胞增殖过程,细胞周期正常染色体复制,但在接下来的有丝分裂期,染色体分裂时,染色体单体不能分离,即产生一个 4 倍体细胞。②由于接受分裂错误,配子为 2 倍体,而不是单倍体,所以会产生一个多倍体的受精卵。③如一个卵子被一个以上精子授精,也将产生多倍体。

非整倍体与多倍体产生机制是相似的,可能有程度上不同。例如,对纺锤体形成的干扰,如

完全阻止,即形成多倍体,如部分阻止,则形成非整倍体。当然,对于它们产生的生化机制已有一定研究,主要是有关纺锤体的,现介绍如下:

1. 与微管蛋白二聚体结合 微管蛋白二聚体是构成纺锤体的基本成分。如该蛋白的某一特定位置被占据,将妨碍微管的正确组装,导致细胞分裂被抑制。秋水仙碱即可与该结合部位结合,导致细胞染色体不分离。

2. 与微管上的巯基结合 微管蛋白带有巯基,化学毒物可与之特异性结合,影响微管的作用。不同化学结构的物质,与微管蛋白不同部位的巯基结合,如苯基汞与着丝粒微管结合,甲基汞易于与极间微管结合,将造成多种后果。通常是使细胞分裂部分抑制,即造成非整倍体。

3. 已组装好的微管的破坏 在正常细胞中,微管处于游离二聚体的聚合和解聚的动态平衡中。微管结合蛋白使二聚体聚合,维持微管的结构与功能的发挥。化学毒物有多种方式破坏微管:①秋水仙碱,灰黄霉素,长春花碱可与微管结合蛋白结合,虽结合点和作用方式不尽相同,都可使已组装好的微管解聚。②非特异性作用微管,使其蛋白质变性,如毛地黄皂苷。③使微管失去定向能力,主要通过通过对细胞分裂和 DNA 合成的复杂作用,如异丙基-N-氨基甲酸苯酯。

4. 中心粒移动受阻 秋水仙碱妨碍有丝分裂早期两对中心粒的分离和移向两极。其机制尚不清楚。

5. 其他作用  $N_2O$  也可产生与秋水仙碱作用相同的后果,但观察不到微管组装受抑制,组装好的微管破坏,中心粒位置不正常等现象,故  $N_2O$  的作用机制不明。

### 三、其他的改变

对 DNA 合成和修复有关的酶系统作用可间接导致 DNA 损伤,诱发基因突变或染色体畸变。

1. DNA 的高保真复制需多种酶类的参与,并且在基因调控下进行,其过程中的任何一个环节损伤,将影响 DNA 复制的高保真性,有可能引起突变。例如,一些氨基酸类似物可使 DNA 合成有关的酶受破坏,而诱发突变。此外,有些化合物,虽然不损伤 DNA 分子,作用于组蛋白和非组蛋白成分,也可造成突变。在生物体内的遗传物质,包括 DNA 和蛋白质。蛋白质主要为组蛋白和非组蛋白,它们不携带任何遗传信息,而在维持遗传结构的完整性和表达调控方面均有重要意义。关于影响复制有关的酶类及组蛋白和非组蛋白的例子并不多,但提示它也是致突变作用的机制之一。

2. 修复 DNA 修复过程是清除受损伤的 DNA 片段,并合成新的片段来替换的过程。DNA 是生命物质中惟一具有自身修复能力的分子,其修复过程是依赖各种各样的酶来进行。例如,光修复的光裂合酶,切割修复的 DNA 糖基酶和切除核酸酶。它们有可能成为化学毒物的靶分子。

### 四、突变的后果

对细胞分裂和修复有关的酶系统作用可间接导致 DNA 损伤,诱发基因突变或染色体畸变。

突变的后果,取决于化学毒物所作用的靶细胞,是生殖细胞,还是体细胞。如是体细胞,其影响仅能在直接接触该物质的个体身上表现出来,而不可能遗传到下一代;如是生殖细胞,其影响才有可能遗传到下一代。图 7-1 显示两类细胞发生突变的可能后果。

基因突变和染色体畸变对于人类健康的重要意义在于其在遗传性疾病和肿瘤中所起的作用。

用, 这里将重点讨论。

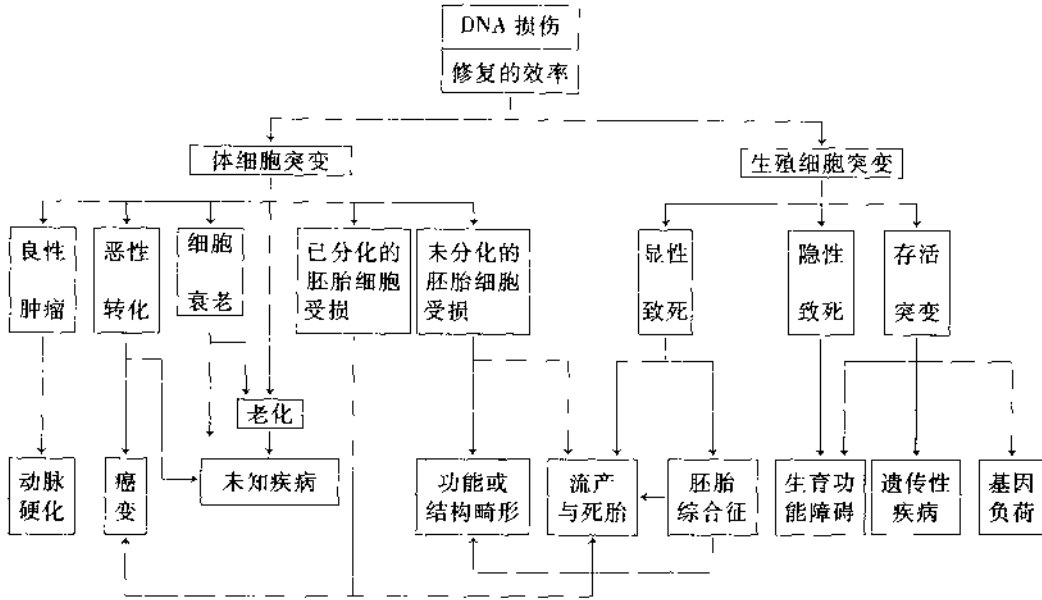


图 7-1 突变后果示意图

1. 生殖细胞突变 基因突变对于健康的意义在于与许多按孟德尔定律遗传的疾病有关。例如,在新生儿遗传病中,约有 1.3% 为常染色体显性遗传,0.25% 为常染色体隐性遗传及 0.05% 与性染色体有关。在这些遗传病中,经分子生物学分析证实有几乎一半的突变是碱基置换,余下的大多数是小缺失。许多遗传病是由隐性突变表达所致,如苯丙酮症(phenylketonuria),它由上一代遗传,当父母均有基因突变时,该病即可表现出来。如只有一方的基因突变,后代即是表型正常的携带者。

基因突变除了引起按孟德尔遗传规律遗传的疾病外,在人类许多复杂病因的疾病中,遗传因素也起着部分作用。即增加下一代基因库(gene pool)的遗传负荷(genetic load)。基因库指某一物种在特定时期中能将遗传信息传至下一代的处于生育年龄的群体所含有的基因总和。遗传负荷指一种物种的群体中每一个携带的可遗传给下一代的有害基因的平均水平。例如,在婴儿中,约有 3%~6% 受到先天性畸形的影响,在人群中,那些发病较晚的疾病,如心脏病,高血压及糖尿病,遗传因素影响的比例可高达 60%。

在遗传性疾病中,还有一个原因是染色体异常。大约每 1000 名婴儿中有 4 名患有与染色体畸形有关的综合征。染色体异常估计在受检的双亲中有 5%,在死亡的婴儿有 6%,在自然流产和死亡胚胎占 30%。引起遗传病染色体异常的类型中,非整倍体最常见,多倍体次之,结构异常约占 5%。与基因突变不同,许多染色体异常是由亲代遗传下来,故有 85% 染色体异常可在新生儿检出。

突变除引起遗传病外,还可造成生殖毒性,表现为胚胎死亡、畸胎、胚胎功能不全及生长迟缓。生殖毒性可由亲代生殖细胞突变所致,也可由胚胎细胞突变所致。详细请见第九章。

综上所述,生殖细胞突变的后果可分为致死性突变和非致死性突变,其又可分为显性与隐

性。显性致死突变使精子不能受精,或合子在着床前死亡或着床后早期胚胎死亡。隐性致死需纯合子或半合子才能出现死亡。如果是杂合子则不出现死亡。对于非致死性突变,显性遗传将造成下一代遗传病发生率增加或新病种出现;隐性遗传则增加下一代基因库的遗传负荷。致死性与非致死性突变所致后果,对人类健康的意义是不同的,致死性突变将导致死胎,它影响后代的数量而非质量;非致死性突变主要影响后代的质量。

2. 体细胞突变 体细胞突变后果有肿瘤、衰老、动脉粥样硬化及致畸等,最受注意的是肿瘤。突变与癌发生过程有关的重要证据是来自于癌基因和抑癌基因的分子生物学研究。当原癌基因突变为癌基因后,可刺激细胞异常增殖,而抑癌基因的突变,可导致细胞增殖失去抑制作用。

癌基因作用在遗传学上有优势,当同细胞内正常的等位基因存在时,有一个单一活化的癌基因即可表达。原癌基因可经点突变和染色体畸变转变为活化的癌基因。例如,在人类许多肿瘤中,发现 *ras* 原癌基因有碱基置换。在 Burkitt 淋巴瘤中,约有 90% 是 8 号染色体长臂的 *c-myc* 癌基因位点与 14 号染色体发生易位。易位可通过移动在新染色体上活化原癌基因。抑癌基因(或称为肿瘤抑制基因,抗癌基因(*antioncogene*)的突变失活或缺失在许多肿瘤发生过程中起着重要作用。与癌基因不同,抗癌基因是隐性遗传,即为杂合子时,它不能表达。研究发现突变、缺失、染色体丧失及有丝分裂的重组可使正常的显性等位基因失活或丧失,导致前述的杂合子细胞内隐性癌基因的表达。

许多肿瘤涉及癌基因的活化和抑癌基因的失活。所观察到多基因改变将支持癌起源于遗传变化积累的观点,说明致癌作用是一多阶段、多步骤的过程。它包括引发(*initiation*),促癌(*promotion*, 促长)和进展(*progression*)三个阶段。突变在引发和进展阶段中均有作用。

## 第四节 机体对致突变作用的影响

遗传物质 DNA 可能受到自发性化学降解如水解、氧化及非酶性甲基化,环境中化学致突变物和辐射等因素的影响,并使 DNA 受到损伤。然而,遗传物质在所有的物种中,均是世代相传。这是因为:①DNA 执行高保真度的复制,对复制中的错误能及时纠正,即通过修复而达到高度保真;②机体已进化到有多种机制修复 DNA 损伤,以保护亲代 DNA 链,使其免受化学毒物的作用而发生改变。机体修复 DNA 损伤的机制可分为两大类:损伤耐受机制和修复机制。损伤耐受指 DNA 遗传可绕过那些阻止 DNA 复制的 DNA 损伤。例如,细菌的重组修复,其复制机制是绕过不能配对的嘧啶二聚体或者较大的化学加合物,在受损对应的新 DNA 链上留下一间隙,然后,通过重组过程,将来自母链的 DNA 片段填上间隙。DNA 修复机制可分为直接修复和切除修复。直接修复指引起 DNA 损伤的反应为可逆性的,如光修复。切除修复指将损伤或不正确的甲基去除和替换,如核苷酸去除,它是负责较大范围损伤的修复。

上述可知,机体对 DNA 损伤有修复机制,以保护遗传物质免受外界因素干扰。而在自然环境中,人群接触同样,即相同剂量及接触条件的化学致突变物,并不是人人均引起致突变作用,即在个体之间的反应有很大差异。目前研究表明,个体对致突变物敏感性差异的原因有:代谢酶的遗传多态性;修复能力差异以及宿主因素等。机体对致突变作用的影响相当复杂,本节就机体

修复机制、代谢酶遗传多态性等进行论述。

## 一、DNA 损伤的修复

1. 光复活 光复活是一种依赖光的过程,它通过酶切下 DNA 上嘧啶二聚体,将毗连的嘧啶接回原结构上。这主要是针对紫外线损伤产生的胸腺嘧啶二聚体的修复机制。光复活所依赖的酶,为光裂合酶(photolyase)。它广泛存在于原核生物和真核生物体内。

2. “适应性”反应 前述已知鸟嘌呤  $O_6$  位被烷化,易造成碱基错配。机体有一种修复功能,依赖烷基转移酶作用,将鸟嘌呤  $O_6$  位甲基转给蛋白质  $O_6$ -甲基鸟嘌呤-DNA 甲基化转移酶。这样,鸟嘌呤可恢复其正常的碱基配对特性。有研究证明,大肠杆菌的甲基转移酶也可将甲基从嘧啶的  $O_6$  位上移出,但不是很有效。目前,深入研究的是  $O_6$ -甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶,广泛存在于酵母、大鼠及人类。

3. 切除修复 切除修复是负责较大范围损伤的修复机制,它是一种多步骤修复过程,分为两种:一是切除核苷酸修复,另一是切除碱基修复。切除修复不仅存在于细菌,也存在于真核生物,但它们在某些细节上有差异。

1) 核苷酸切除修复 它始于内切酶如大肠杆菌的 uvr ABC 切除核苷酸酶(excinuclease),打开受损 DNA 的双链,在 helicase 作用下,除去含有受损的寡核苷酸链,在真核生物留下 27~29 个核苷酸长度的间隙,在细菌留下 12~13 个核苷酸长度的间隙。在修复聚合酶如大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 作用下,以对应的 DNA 链为模板,合成新 DNA 链,填补留下的间隙。最后,由 DNA 连接酶封闭,恢复原有的 DNA 序列。

核苷酸切除是所有生物体内最常见的修复机制。它基本上可修复所有种类的 DNA 损伤,包括紫外线光产物;其他机制不能去除较大的 DNA 加合物以及由化学毒物所致的 DNA 链间交联如顺铂(cisplatin)。修复机制非常复杂,虽已有深入研究,但对于修复中的不均一性解释,在转录、修复及突变之间关系的不可预见性等方面所知尚少。

2) 碱基切除修复 由 DNA 糖基酶(DNA glycosylase)作用于受损的 DNA,该酶可识别异常的碱基,通过切断碱基与脱氧核糖连接的键,使受损的碱基脱落,产生一个无嘌呤或无嘧啶位点即 AP 位点。AP 内切酶将 DNA 链切断,由聚合酶及连接酶作用完成修复过程。与核苷酸切除修复相比,碱基切除修复的 DNA 糖基酶专一性更强。在大肠杆菌中至少有 7 种 DNA 糖基酶,每一种都特异地识别一种或少数几种异常碱基,如 3-甲基胸腺嘧啶、羟甲基尿嘧啶及尿嘧啶等。

3) 误配修复 误配修复(mismatch repair)是一类性质截然不同的切除修复。它可以识别并除去错配的碱基对,如 G:T 和 A:C。像这样的碱基对可作为重组中间体,在复制时错误地出现或者通过碱基活性修饰如 5-甲基胞嘧啶的脱氨作用而产生。该误配修复见于自然界许多生物。目前了解较为深入的是细菌误配修复。正在试图探讨其在人类的作用,主要目的是阐明误配修复与肿瘤发生的关系。

4. 复制后修复 复制后修复(post replication repair, PRR)与前述的修复交联不同,例如,切除修复可使 DNA 链在结构上部分或全部恢复原来的状态。PRR 达不到这种目的,它只是通过填补损伤部位,使复制得以继续进行,但 DNA 损伤部位仍然存在。所以 PRR 严格来说,不是修复,而是一种耐受过程,一种以容忍损伤继续存在和在突变率情况下,以换取细胞继续生存的

耐受过程。

5. 呼救性修复(SOS repair) 亦可称 SOS 修复,此种修复对致突变作用不能提供完全的保护。突变作为修复的结果或者作为损伤旁路发生时,称为易错修复(error-prone repair)。易错修复的典型例子是 SOS 修复。SOS 修复的特点是:①诱导性修复,即它是在各种诱导因素作用下,才使 SOS 功能群表达;②修复过程有明显误差,即不同长度核苷酸链错误插入,因而表现为高频率的突变;③SOS 系统为多基因控制,如 *rec A*、*lex A*、*recB*、*recC* 等,其中任何一个发生突变,SOS 修复功能就不能表达。

上述五类修复方式,是机体长期进化的结果,其中有的对机体有利,可切除受损核苷酸,恢复 DNA 的正常功能;有的对机体不利,如易错修复;有的使机体对高突变率产生耐受。修复与突变有不可分的关系,提供对 DNA 损伤的细胞效应分析,发现致突变作用是涉及多元因素相互作用的复杂细胞过程,它包括突变、修复和代谢。对于化学致突变作用的模式应为损伤-修复-突变模式。

## 二、遗传因素对致突变作用的影响

前述已知,机体对 DNA 损伤至少有 5 类修复机制,化学致突变作用的模式为损伤-修复-突变,只有修复功能饱和或能力不足时才会引起突变。据流行病学调查,在实际生活中,人类在众多的环境致癌物影响下,肿瘤发生率每年约为 1‰。表明人群虽均受环境致癌物影响,但仅少数人发生肿瘤,可见个体因素在致突变作用中有一定的意义。典型例子是吸烟可引起肿瘤,调查发现吸烟者中患肺癌的相对危险度为非吸烟者的 6 倍。说明肿瘤的发生,致癌因素显然很重要,但个体因素也不容低估。个体因素影响致突变作用有两个方面,一是先天性,即遗传因素,也就是遗传多态性(genetic polymorphism)。二是后天性,主要指不同生活方式如吸烟、饮酒、营养缺乏或不平衡等。一般认为,遗传多态性在个体因素影响致突变作用中起决定作用。再者,后天的敏感性亦有可能在一定遗传背景上出现。

### (一) 代谢酶遗传多态性

代谢酶在致突变作用中有着重要意义,代谢酶遗传多态性的生物学意义在于解释有些人易受致突变作用,是因为其体内代谢酶与大多数人不同,可增强代谢活化或抑制代谢灭活。对于代谢酶遗传多态性研究主要从不同个体代谢酶功能改变后引起代谢过程变化或受损,或者是通过酶电泳图像所出现的变异型等方法进行。几种多态性研究较为深入的酶,如细胞色素 P-450、乙醇脱氢酶和乙醛脱氢酶、N-乙酰基转移酶、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶、酯酶、环氧水化酶(EH)、谷胱甘肽 S-转移酶等。这些酶的遗传学差异是不同个体间肿瘤易发差异的原因之一。

### (二) 修复功能的个体差异

机体对 DNA 损伤有多种修复系统,使其遗传保持高保真度。修复过程由不同功能的酶参与,表现出明显的个体差异。说明修复酶存在多态性。即修复能力差异造成机体对损伤的反应不一。

1. O<sub>6</sub>-甲基鸟嘌呤-DNA-甲基转移酶(MGMT) 它是体内一种特异性修复酶。其作用是将

嘌呤与胸嘧啶上的烷基转移到自身胱氨酸的残基上,而使碱基恢复原有的配对性。该酶有明显的组织差异和个体差异。

2. 聚(二磷酸腺苷-核糖)多聚酶(PARP) 是另一类参与 DNA 断裂的修复酶。它可能是氧化损伤的一种重要修复形式,对其修复作用的认识尚不够深入。目前已知 PARP 可通过其催化的反应产生多种多样的生物学效应,如诱导细胞 NAD 消耗;抗重组和基因稳定的作用;核酶修饰作用;组蛋白结合及对染色体构型的影响;参与细胞凋亡等。但是,它的确切生物学效应仍不十分清楚。

综上所述,遗传因素不仅是化学毒物的作用靶部位,而且是决定化学毒物毒作用性质和强度的一个重要因素。遗传因素对致突变作用影响的研究,为预防和治疗肿瘤提供了新思路,目前研究正方兴未艾,对于 DNA 修复机制以及遗传损伤敏感性本质即代谢酶或修复酶遗传多态性研究是热点之一,它不仅具有重大的理论价值,而且对提高预防和治疗水平有实际意义。

## 第五节 观察化学毒物致突变作用的基本方法

观察化学毒物致突变作用一般通过致突变试验来进行。试验方法的研究发展很快,包括新方法的建立,原有方法的日益完善。目前已有 200 多种试验,但重要的和作为常规使用的约 20 种。

### 一、观察项目的选择

1. 观察效应终点的类型 基因突变和染色体畸变的检测可直接反映化学毒物的致突变性,是评价化学毒物致突变性惟一可靠的方法。还有许多试验所观察到的现象并不反映基因突变、染色体畸变和染色体分离异常,而仅反映致突变过程中发生的其他事件。因此,将试验观察到的现象所反映的各种事件统称为遗传学终点(genetic endpoint)。国际环境致突变物致癌物防护委员会(ICPEMC)于 1983 年提出致突变试验的遗传学终点分为 5 类:①DNA 完整性的改变(形成加合物、断裂、交联);②DNA 重排或交换;③DNA 碱基序列改变;④染色体完整性改变;⑤染色体分离改变。其中③实际上指基因突变,④指染色体畸变。表 7-1 是较常见的致突变试验所反映的遗传学终点。

表 7-1 主要致突变试验所反映的遗传学终点

| 试验名称              | DNA 完整性 | DNA 重排或交换 | DNA 碱基序列改变 | 染色体完整性改变 | 染色体分离改变 |
|-------------------|---------|-----------|------------|----------|---------|
| 细胞遗传学试验           |         |           |            | 1        | 2       |
| 微核试验              |         |           |            | 1        | 2       |
| 显性致死试验            |         |           |            | 1        | 2       |
| 体外姐妹染色单体交换试验(SCE) |         | 2         |            | 1        |         |
| 可遗传易位试验           |         |           |            | 1        |         |

续表

| 试验名称            | DNA 完整性 | DNA 重排或交换 | DNA 碱基序列改变 | 染色体完整性改变 | 染色体分离改变 |
|-----------------|---------|-----------|------------|----------|---------|
| 细菌回复突变试验        |         |           | 1          |          |         |
| 哺乳动物细胞突变试验      |         |           | 1          |          |         |
| 果蝇伴性隐性致死试验      |         |           | 1          |          |         |
| 转基因动物检测系统       |         |           | 1          |          |         |
| DNA 测序及分子杂交检测技术 |         |           | 1          |          |         |
| 小鼠特定基因座突变试验     |         |           | 1          |          |         |
| 酵母重组试验          |         | 1         | 2          |          |         |
| 细菌 DNA 修复试验     | 1       |           |            |          |         |
| 体外 UDS 试验       | 1       |           |            |          |         |
| 单细胞凝胶电泳技术       | 1       |           |            |          |         |
| DNA 加合物检测技术     | 1       |           |            |          |         |

注:1 和 2 分别代表主要和次要反映的终点

上述遗传学终点,并不能反映所有的致突变试验,例如,细胞转化试验,它的最终产物是形态、生长形式和生化反应变化了的细胞团。不能归于上述 5 类遗传学终点。

2. 成套的观察项目 由于一种致突变试验通常只能反映一个或两个遗传学终点。实际工作中,没有一种致突变试验能涵盖所有的遗传学终点,故需用一组试验配套进行检测。用何种方法来评价化学毒物,主要取决于测试方案制定者的需要。例如,我国对食品、农药化学品和工业毒物分别提出了相应的遗传毒理学评价程序。从遗传毒理学试验中,包括基因突变、断裂作用、重组作用、非整倍体或多倍体的测定试验,受试化合物在任何一种试验中出现可重复的阳性结果,即可认为是遗传毒物。

遗传毒理学评价程序通常为—组体内、外遗传毒理学试验。因为:①化学毒物的种类和结构多种多样,其致突变的机制不尽相同,作用的靶细胞也不一样,有的是体细胞,或生殖细胞,或两者兼而有之。故在成套观察项目中既要用体细胞检测又要用生殖细胞;除了从分子水平还要从细胞水平来检测化学毒物的遗传毒性。②致突变物中仅少数具有直接致突变作用,如烷化剂;大多数为间接致突变作用,即需要在体内代谢活化后,才具有致突变作用。体内试验具有完整的活化系统,而体外试验则通过加入模拟代谢系统,如 S9 来弥补缺乏活化系统的不足。这是体内与体外试验的主要差别。在选择体内、体外试验时,还需要对其方方面面深入了解。③化学毒物的致突变性有强,也有弱;有的在某一检测系统中是强致突变物,而在另一系统中可能是弱的致突变物。对于弱致突变物在某些系统中比较容易漏检,即出现假阴性。所以,对每一化学毒物都需要—组试验或成套试验,来评价其遗传毒性。

关于遗传毒理学成套观察项目中哪些试验可入选的原则有:①已知遗传毒性主要有基因突变、染色体畸变、染色体分离异常及原发性 DNA 损伤。—组可靠的试验系统应包括每一类型的遗传学终点。依照表 7-1,选择细胞回复突变试验、微核试验、细菌 DNA 修复试验和 SCE 等四种致突变试验,即可满足要求。所以,选择的遗传毒性试验应包括 5 种类型的遗传学终点。②通常的实验材料有病毒、细菌、真菌、培养的哺乳细胞、植物、昆虫及哺乳动物等。一般认为配套实验应包括多种进化程度不同的物种,如原核细胞、低等和高等真核细胞,这样观察化学毒物在不同



系统发育的多种生物体的致突变性,更具说服力。③体内试验与体外试验配合。体内试验接近实际情况,但由于毒性动力学或其他原因,有时会漏检致突变物。且在时间、经费、人力及物力均比体外试验花费大。而体外试验简便易行,通常检出率大大优于体内试验。它的明显不足在于生物转化及解毒等方面与体内不同。故在配套试验中,依据试验目的,选择体内和体外试验,取长补短,综合考虑。

目前,已确认的哺乳动物生殖细胞致突变物都在体细胞致突变试验中得到阳性结果。一般认为,当体内体细胞致突变试验得到阳性结果,并有生殖细胞接触证据时,再进行哺乳动物生殖细胞致突变试验。

通常,对于一种受试物应当先用原核细胞或体细胞的体外试验按遗传学终点合理配套进行试验,并对有阳性结果的遗传学终点验证其在体内的真实性,必要时再选用生殖细胞致突变试验进行遗传危害的评价。

## 二、常用的致突变试验

第六节 细菌回复突变试验

1. 细菌回复突变试验(Ames 试验) 细菌回复突变试验是利用突变体的测试菌株,观察受试物能否纠正或补偿突变体所携带的突变改变,判断其致突变性。常用的菌株有鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)和大肠杆菌(*E. Coli*)。

鼠伤寒沙门菌突变试验是应用最广泛的检测基因突变的方法。它是由 Ames BN 于 1979 年建立,常称 Ames 试验。其原理是人工诱变的突变株在组氨酸操纵子中有一个突变,突变的菌株必需依赖外源性组氨酸才能生长,而在无组氨酸的选择性培养基上不能存活,致突变物可使其基因发生回复突变,使它在缺乏组氨酸的培养基上也能生长。已知 Ames 试验菌株有不同的突变菌株,其检出能力也不一,因此在试验中菌株也要配套。我国普遍采用 1983 年由 Maron 和 Ames 推荐的组合菌株,即 TA100、TA98、TA97 和 TA102。Ames 试验的方法有平板掺入法,点试法及预培养法等。

除上述细菌回复突变试验外,在遗传毒理学试验中还有正向突变试验。正向突变指野生型基因失活的突变。正向突变试验是利用培养的哺乳动物细胞系如小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞系和中国仓鼠肺(V79)细胞株,观察特定基因座位(locus)上是否诱变产生突变体,突变体检出可依赖于营养需求型,细胞周期型,辐射及拟辐射物质敏感型,药物耐受性及溴尿嘧啶脱氧核苷依赖性指标。最常用的基因座是 hprt 和 tk。tk 位于常染色体,其基因产物是胸苷激酶(TK)。hprt 位于 X 染色体,其基因产物是次黄嘌呤鸟嘌呤转磷酸核糖基酶(HPRT)。正向突变试验可检测座位内的碱基置换、缺失、移码和重排等点突变。

2. 微核试验 微核(micronucleus)与染色体损伤有关,是染色体或染色单体的无着丝点断片或纺锤丝受损伤而丢失的整个染色体,在细胞分裂后期遗留在细胞质中,末期之后,单独形成一个或几个规则的次核,包含在子细胞的胞质内,因比主核小,故称微核。在细胞质中微核来源有二:断片或无着丝粒染色体在细胞分裂后期不能定向移动,而遗留在细胞质中;有丝分裂毒物的作用使个别染色体或带着丝粒的染色体环和断片在细胞分裂后期被留在细胞质中。微核试验(micronucleus test, MNT)是观察受试物能否产生微核的试验。其主要可检出 DNA 断裂剂和非整倍体诱变剂。微核试验的灵敏度与细胞遗传学试验基本相同,但它观察技术简易而省时,故

发展迅速。

目前对微核试验已有较大的改进:①体外微核试验,常用细胞有中国仓鼠肺细胞(CHL),中国仓鼠卵巢细胞(CHO)及中国仓鼠成纤维细胞(V79)等,体外试验比体内试验易于操作和控制受试物浓度。②周围血微核试验,使其有可能成为在人群中观察化学毒物遗传毒性的一种手段。③双核细胞法,以提高微核的灵敏度。④免疫荧光染色法和荧光原位杂交法,不仅可提高其灵敏度,还可判断微核是来源于断片还是染色体。

3. 染色体畸变分析 观察染色体形态结构和数目改变称为染色体畸变分析(chromosome aberration analysis),又称细胞遗传学试验(cytogenetic assay)。因为它将观察细胞停留在细胞分裂中期相,用显微镜检查染色体畸变和染色体分离异常。对于染色体畸变,它可观察到裂隙、断裂、断片、无着丝粒环、染色体环、双或多着丝粒染色体、射体和染色体粉碎。关于缺失,除染色单体缺失外,需作核型分析或用流式细胞仪作电脑图像分析才能作出判断。关于倒位、插入、重复以及易位(除生殖细胞非同源染色体相互易位外)均需显带技术检查。对于染色体分离异常,需在染毒后经过一次细胞分裂才能发现,但此时一些不稳定的染色体畸变往往消失。故试验中观察时间应是多次,且注意致突变物可能在细胞周期的不同时期所起的作用。

4. 姐妹染色单体交换试验 姐妹染色单体交换(sister-chromatid exchange, SCE)指染色体同源座位上DNA复制产物的相互交换,其频率与DNA断裂和修复有关。姐妹染色单体交换试验的原理:对于分裂的细胞,如将5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-BrdU)加入合成DNA的原料中,经过两个分裂周期后,两条染色单体,其中一条DNA链的双股内的胸腺嘧啶核苷均被BrdU取代,另一条只有一股被取代。此时,用染色剂如吉姆萨和光处理,使双股含BrdU的染色单体着色浅淡,而单股含BrdU的染色单体着色深。在普通光学显微镜下,可清晰分辨出交换的染色单体,计数SCE数。借此判断受试物对DNA是否有损伤作用。

许多致突变物可诱导培养细胞和整体哺乳动物的SCE。尽管SCE测定方便、有效,但有关SCE的结果较染色体分析的结果可信度稍差些。主要是因为不能肯定SCE形成的机制,形成过程是否涉及DNA损伤或DNA合成的紊乱。

5. 果蝇伴性隐性致死试验 果蝇伴性隐性致死试验(sex-linked recessive lethal test, SLRL)是利用隐性基因在伴性遗传中具有交叉遗传特征,选择黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)为实验动物,给予雄蝇受试物,如雄蝇的X染色体有突变,传给F1代雌蝇,再通过F1代雌蝇传给F2代雄蝇,使位于X染色体上的隐性基因在半合型雄蝇表现出来。

SLRL是果蝇各种测试系统中最敏感的实验,果蝇具有世代周期短、繁殖率高、饲养方便、经济、判断突变终点客观、不需活化等优点,其不足之处是它与哺乳动物差异较大,对其结果外推应慎重。一般认为,果蝇实验的阳性结果有高度的实用价值,而阴性结果在没有真核系统试验支持前不能完全认为无致突变性。SLRL能检出点突变、小缺失、重排等几种遗传变异的类型。

6. 显性致死试验 显性致死试验(dominant lethal test)是一种体内试验,用于检测整体哺乳动物生殖细胞遗传性损伤,如单纯的染色体断裂所导致的大缺失或重复,或者同时还有因染色体重排所形成的不平衡染色体分离或不分离,即非整倍体。显性致死突变指哺乳动物生殖细胞染色体发生结构和数目变化,出现的受精卵在着床前死亡和胚胎早期死亡。本试验是对雄性动物染毒,观察一个精子发育周期中各个阶段雌鼠胚胎早期死亡发生率的变化,进而判断受试物有无对雄性生殖系统的损害及损害发生的敏感阶段,是否具有致突变作用。它是评价化学毒物对雄

性动物的生殖细胞遗传毒性较好的方法之一,还可进一步确证体外试验或其他试验系统获得的阳性结果。

本试验多选用小鼠,也可用大鼠、仓鼠、豚鼠、果蝇等。它在哺乳动物体内进行,不需特殊设备条件,是一种较为实用的方法。其不足之处是灵敏度差和使用动物数量大,且要求一定的受孕率。

7. 程序外 DNA 合成试验 正常细胞需经过细胞周期达到增殖的目的,细胞周期包括 G<sub>1</sub> 期、S 期、G<sub>2</sub> 期和 M 期,在 S 期的 DNA 合成是按固定程序进行的,称为程序性 DNA 合成(scheduled DNA synthesis)。当 DNA 损伤时,即会发生在 S 期半保留 DNA 程序合成之外的 DNA 合成,称之为程序外 DNA 合成(unscheduled DNA synthesis),它是机体为保证其遗传特征的高度稳定而对 DNA 双链上出现的变异或损伤进行修复合成的过程。

程序外 DNA 合成试验是观察分离或培养的细胞,加入标记 DNA 合成原料,如<sup>3</sup>H-胸苷,在 S 期外是否有 DNA 合成发生,即是以<sup>3</sup>H-胸苷掺入细胞量的增加,判断受试物是否造成 DNA 损伤。它具有经济、快速、操作简便、无需昂贵设备和复杂技术的特点。

8. 单细胞凝胶电泳(SCGE)试验 又称彗星试验(comet assay),是一种近年发展起来的在单细胞水平上检测有核细胞 DNA 损伤与修复的方法。增加的 DNA 迁移是和增加 SSB(单链 DNA 断裂)的水平有关。可进行体外试验和体内试验。基本方法为:获得细胞悬液,制作好含有细胞的琼脂糖的载玻片;裂解细胞以释放 DNA;在碱性溶液中(pH 13)获得单链 DNA,在碱性条件下电泳,中和碱,DNA 染色和彗星显像,记数彗星。与其他遗传毒性试验相比,此方法的优点为:检测低水平 DNA 损伤的敏感性高,对样品的细胞数要求少,适应性高,低花费,操作简便,使用的实验物质相对少,完成实验所需的时间较短。

9. 观察方法的新进展 目前已知,对于致突变物有 200 种以上的测定方法。然而,大量的遗传毒理学试验主要依赖相对较少的几个试验,说明致突变试验有许多地方需要完善。例如,随着生活的现代化,人们不得不面对众多的化学物质进入生活,就需要对这些化学物质的危害性作出评价,包括遗传毒性的评价;对原有的方法提出新的要求,如自动化检测。此外,随着科学技术的进步,尤其是分子生物学技术的日新月异,有可能更准确地测定致突变作用,如转基因小鼠致突变检测系统和荧光原位杂交技术(FISH)。

(1)转基因小鼠致突变检测系统:正常情况下,哺乳动物体内基因突变率很低,难以检测。故检测突变方法大多用于体外培养细胞。但由于体外试验需加入模拟的代谢系统,其结果不尽如人意。随着分子生物学技术发展,有可能在体内检测基因突变,这就是转基因小鼠致突变检测系统。它是利用穿梭载体于原核和真核间往返转移,带可回收靶基因载体的转基因小鼠提供哺乳动物体内基因的检测系统,用以测定自发和诱发突变率,分析基因突变的组织专一性和顺序变化,阐明 DNA 修复、基因毒性、突变和癌变的分子机制。

转基因动物是指基因组中整合以实验方法导入的稳定的外源 DNA,并能遗传给后代的一类动物。其优点有:可根据需要导入目的基因,即致突变的靶基因;敏感性高,因为选用的外源基因对遗传损伤敏感性高,导入动物体内后,仍有高敏感性;结果可靠性高,它是一完整生物体系,繁殖多代后仍能带有目的基因,具有四维特征,从根本上优于以前的体外检测系统。已建有供致突变试验用的转基因小鼠模型,其注册商品名为 Big Blue Mouse 和 Muta Mouse。此外,转基因细胞也可用于体外毒理学试验。

(2) 微核自动化检测技术:微核试验已得到广泛的运用,但需要检测的新化合物及人群标本越来越多,人工检测微核的方法已远不能满足要求,迫切需要自动化检测。目前,主要使用流式细胞仪和图像分析系统两种仪器。流式细胞仪具有测定精确,定量参数多,检测速度快的特点。它利用染色技术,即用 RNA 特异荧光染料和 DNA 特异染料,在双激光流式细胞仪上检测小鼠外周血,可鉴别嗜多染红细胞(PCE)、成熟红细胞(NCE)、含微核的嗜多染红细胞(MPCE)、含微核的成熟红细胞(MNCE),计算出受试物的微核率。该技术已达到实用程度。而对于人外周淋巴细胞,各种体外培养细胞等有核细胞的微核自动化检测尚不能达到实用阶段。图像分析系统用于微核试验,其难度在于制片和编制软件。自动化检测无疑极大地推动致突变试验的发展。

(3) 荧光原位杂交技术 荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)是原位杂交(in situ hybridization, ISH)的一种。ISH 是一种在保持组织、细胞或染色体原有形态结构基础上,对其内部特殊核苷酸顺序进行检测及定位的分子生物学手段。FISH 与放射性核素标记不同,它用荧光探针,具有操作、观察分析简便,立体分辨率高,信号明亮清晰和安全性高的优点,是分子遗传学与经典细胞遗传学之间的桥梁。通过 FISH,可准确、迅速地分析不同生理状态下自发和诱发的细胞遗传物质结构及成分的改变,特别是对于分裂活跃和分裂不活跃的细胞中进行染色体结构成分分析,大大优于常规细胞生物学技术。

FISH 是利用荧光探针,将已标记或经特殊修饰的核酸探针与已固定的组织、细胞或染色体中 DNA、RNA 杂交,继而通过分析标记探针在被检对象中的显示状况而达到对特殊目标顺序进行检测、定位的目的。它在遗传毒理学中主要有以下两个方面的应用:一是对染色体精细结构的分析,另一是对非整倍体的检测。它无论在体细胞或生殖细胞、分裂细胞或间期细胞,都能检出染色体断裂剂、非整倍体诱变剂,并可检出染色体精细结构改变。存在的不足是缺乏应用广泛的标记探针。

### 三、致突变试验中的一些问题

1. 阴性、阳性对照的设立 科学实验常是通过对比来说明问题。进行任何科学实验都离不开对照,只有做到正确的对比才能做到正确的鉴别。此外,通过对照可消除或减少实验误差。在遗传毒理学实验中,常以生物为实验对象,如大鼠、小鼠、果蝇、仓鼠、细菌及真菌等,它们本身存在变异,使试验难以控制,再者实验条件对结果也有影响。对照是将实验组与非实验组即对照组的非处理因素处于相等状态,使判断结果时认为处理因素所致,且抵消或实验误差。在遗传毒理学实验中均应设立阴性对照和阳性对照。控制影响实验的各种因素,可使所获数据更具可比性,这样才能作出科学判断。

1. 阴性、阳性对照的设立 科学实验常是通过对比来说明问题。进行任何科学实验都离不开对照,只有做到正确的对比才能做到正确的鉴别。此外,通过对照可消除或减少实验误差。在遗传毒理学实验中,常以生物为实验对象,如大鼠、小鼠、果蝇、仓鼠、细菌及真菌等,它们本身存在变异,使试验难以控制,再者实验条件对结果也有影响。对照是将实验组与非实验组即对照组的非处理因素处于相等状态,使判断结果时认为处理因素所致,且抵消或实验误差。在遗传毒理学实验中均应设立阴性对照和阳性对照。控制影响实验的各种因素,可使所获数据更具可比性,这样才能作出科学判断。

(1) 阴性对照:即未处理对照或溶剂对照。阴性对照除了无处理因素外,与实验组完全相同,其目的是获得实验的基础数据。例如,Ames 试验的未处理对照可了解所用的细菌的自发回复突变率;溶剂对照证实除处理因素外无任何使回复突变率增加或减少的因素。

(2) 阳性对照:是用某种已知能产生阳性反应的物质作为对照。其目的是通过对阳性物质的试验证明实验方法的可靠;验证实验者在本实验条件下,完成技术和鉴定致突变物的能力;证实经一段时间后,本实验的重复性。例如,Ames 试验中阳性对照未出现阳性结果,应考虑实验菌株可能发生问题,另一种可能代谢活化能力不足。所以,当阳性对照结果未呈阳性,其实验组

的实验数据可靠性亦大大降低。

2. 体外试验的活化系统 许多化合物不具有致突变性,经哺乳动物代谢才转变成致突变物。这类物质称为前致突变物(promutagen)。由于微生物和培养的哺乳动物细胞缺乏整体动物体内的许多代谢能力。在遗传毒理学试验中,必须加入代谢活化系统以检出前致突变物。

(1)哺乳动物细胞介导:使用完整的细胞,特别是大鼠肝原代细胞,与测试细菌或细胞一起培养。它有完整的细胞结构和各种酶及内源性辅助因子,代谢能力优于无细胞系统如 S9,但不如体内活化系统。

(2)S9:S9 指经酶诱导剂处理后制备的肝匀浆,再经 9000g 离心分离所得上清液,加上适当的缓冲液和辅助因子。它主要含有混合功能氧化酶(MFO),是国内常规应用于体外致突变试验的代谢活化系统,其缺点是 S9 随实验动物种属或器官不同而有差异;S9 含有大量亲核物质有可能影响试验的敏感性。

(3)纯化酶和基因工程:应用纯化细胞色素 P-450、谷胱甘肽转移酶及过氧化物水解酶,可严格控制代谢产物诱发突变的条件,但技术难度大。利用基因工程,将人的细胞色素 P-450 基因插入组合细胞内,用上述细胞进行致突变试验,使细胞具有代谢活化系统。尽管上述代谢活化系统很有用,但它不可能完全取代整体哺乳动物代谢。因为,有些组织在活化或降解化学毒物反应性方面有差异;消化道的正常菌群在整体动物内也具有代谢活化系统;诱导酶系统的物质以及可改变生理状态的物质也可能改变毒物的代谢;体外活化与解毒之间的平衡也不同于整体动物体内。最理想的活化系统是转基因小鼠致突变检测系统。不仅有整体的代谢活化系统,而且有易于检测突变的的目的基因。

3. 致突变试验与致癌试验的关系 化学物质按遗传毒性和致癌性分类:遗传毒性致癌物,非遗传毒性致癌物,遗传毒性非致癌物和非遗传毒性非致癌物四类。致突变试验仅可检出遗传毒性致癌物和非遗传毒性非致癌物,有可能出现假阳性如遗传毒性非致癌物和假阴性如非遗传毒性致癌物。人类致癌物检测方法有三大类:短期试验,哺乳动物诱癌试验和人类流行病学观察。致突变试验是短期致癌物检测试验中的一大类,它需与其他试验结合,互为补充,以获得可靠的结论。

4. 试验结果在毒理学安全性评价中的作用 各种致突变试验都有其特定的遗传学终点,但在实验结束后均会面临一个共同问题,即所取得的数据表示阳性结果或表示阴性结果。

在评定阳性或阴性之前,应首先检查实验的质量控制情况。目前,致突变试验的质量控制通过以下措施来实现:①设立阴性对照和阳性对照,其意义前已述及。②盲法观察,指观察人员不了解观察标本的染毒剂量或组别,以免除观察人员对实验数据产生主观影响。③资料的统计学分析,它是检验各处理组与对照组之间的差异,研究剂量-反应关系和定量强度。④试验结果的重现性,即重复试验所得到的相同结果。重复试验指在不同时间完成的试验,而并非试验中的平行样本。

阴性结果判定条件:①最高剂量应包括受试物溶解度许可或灌胃量许可的最大剂量。如该剂量毒性很大,则体内试验和细菌试验应为最大耐受量。使用哺乳动物细胞进行体外试验,常选 LD<sub>50</sub> 或 LD<sub>01</sub> 为最大剂量。溶解度大,毒性低的化学物,在细菌试验中可以 5000 μg/皿作为最高剂量。②各剂量组的组间差距不应过大,以防漏检仅在非常狭窄范围内才有突变能力的某些化学毒物。满足上述条件,仍为阴性,才慎重下结论。

阳性结果应具有剂量反应关系,即随剂量增加致突变作用增加;在一组或多组的观察值与阴性对照比较有显著性差异。阳性结论,即表明受试物具有致突变性,而不同致突变试验的遗传学终点不同,其所表示的含义不一。如基因突变是具有导致遗传性疾病的突变,DNA 修复的实际后果尚不明确。

从目前国内外食品、药品、农药及环境保护等管理部门颁布化学物评价遗传毒性的程序来看,最常用的短期致突变试验有 Ames 试验,哺乳动物细胞体内、体外染色体畸变分析和微核试验。这些试验的结果,最终将被用来评估化学物质对人类的潜在遗传毒性。如果一种物质经几个测试系统(包括整体动物可遗传试验)证明是有致突变性的,除非有令人信服的证据证明对人是非致突变物,否则就应考虑其对人也致突变物。随着测试方法的创新和不断改进,致突变试验将在评价化学毒物的致突变性及预测致癌性方面发挥更大的作用。

(石 年)

# 8

## 第八章

# 外源化学物致癌作用

肿瘤(tumor, neoplasm)是一种常见病、多发病。因其严重危害性而备受关注,人们在不同领域,从不同层次研究肿瘤。毒理学家主要研究化学致癌作用,最重要成就之一是已明确鉴定出一批人类致癌物或致癌因素。明确了致病因子,可指导如何对其采取相应措施,使人类避免或减少与之接触,以达到减少肿瘤发生的目的。

肿瘤指有分裂潜能的细胞受致癌因素作用后发生恶性转化和克隆性增生所形成的新生物。在人体的任何部位、任何组织都可以发生肿瘤。它分为良性和恶性两大类。良性肿瘤呈膨胀生长,与周围组织有明显的界限,多有包膜,它们生长常有“自限性”,对机体破坏较小。恶性肿瘤则包括癌和肉瘤。由上皮细胞来源的恶性肿瘤称为癌(carcinoma)。例如,胃癌、肝癌、肺癌及乳腺癌等。由间质细胞来源的恶性肿瘤称为肉瘤(sarcoma),例如,平滑肌肉瘤、脂肪肉瘤、血管肉瘤及淋巴肉瘤等。恶性肿瘤呈增殖失控,细胞异常分化,且具有侵袭和转移的能力。在毒理学中,“癌”具有广泛的概念,它包括癌、肉瘤及良性肿瘤。实质上,毒理学所指“化学致癌作用”,其意义是化学致肿瘤作用。

化学致癌物(chemical carcinogen)指凡能引起动物和人类肿瘤、增加其发病率或死亡率的化合物。例如,黄曲霉毒素、苯并(a)芘及苯等。化学致癌作用(chemical carcinogenesis)指化学致癌物在体内引起肿瘤的过程。研究化学致癌作用已有200多年的历史。近年随着生物学技术的进步,人类肿瘤发病率和死亡率高居不下以及使用的化学物质日益增加,使化学致癌作用的研究备受关注,并取得了长足的进步。例如,化学致癌物的鉴定,化学致癌过程发生与发展规律,肿瘤生物标记的发展与利用,以及肿瘤的化学预防等方面,为解决化学致癌问题提出了一些新理论和新途径。

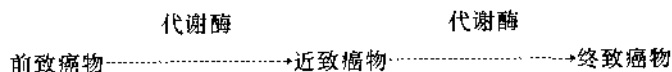
## 第一节 化学致癌机制

化学致癌作用机制目前还有许多尚未彻底阐明。关于化学致癌机制较为公认的学说:化学致癌作用——一个多因素、多基因参与的多阶段过程。以下将从化学致癌物的代谢活化、DNA修复与致癌、癌基因有关的致癌分子机制、化学致癌过程以及某些致癌机制的新进展等方面,阐述化学致癌作用的机制。

## 一、与致癌作用有关的代谢

在人们接触的大多数化学致癌物中,如多环芳烃、亚硝胺类均是间接致癌物。它们必须经过酶系统的代谢激活,形成终致癌物才能作用于细胞的遗传物质 DNA,使细胞转化为恶性细胞。

正常生物转化酶的生理作用是转变外来化合物,使其成为容易经尿液或胆汁排泄的代谢产物。即生物转化酶系统的作用主要是解毒作用,哺乳类动物的许多组织细胞都含有复杂的生物转化酶系统。例如,肝脏是机体代谢外来化合物的主要脏器,肝脏细胞中内质网细胞色素 P-450 是其生物转化主要的酶系统之一。生物转化酶系统主要起解毒作用,给非极性、非活性的分子提供一个环氧基或羟基活性功能基团,使外来化合物易与葡萄糖醛酸、硫酸或谷胱甘肽等内源性化合物结合,形成易于排泄的结合物,但是在某些情况下,也可催化生成活性代谢物,造成机体的损伤,即代谢活化作用。与致癌作用有关的化学致癌作用的代谢活化过程如下:



机体在进化过程中形成保护机体免受有毒化学物损伤的酶系统也可催化本身并不直接致癌的化学物产生活性致癌物,即终致癌物。人群有机会接触多种化学致癌物,但只有少数人患有肿瘤的原因是他们代谢活化作用占优势。化学致癌物代谢活化作用,不仅包括 I 相代谢酶如细胞色素 P-450,而且包括 II 相代谢酶如硫酸转移酶,谷胱甘肽转移酶及葡萄糖醛酸转移酶等。

前致癌物 (precarcinogens) 本身并不直接致癌,必须在体内经代谢转化,其所形成的代谢产物才具致癌作用。前致癌物是指还未经代谢活化的形式,即母体化合物。

近致癌物 (proximate carcinogens) 指前致癌物经代谢活化过程形成一种或一系列中间代谢产物。近致癌物必须经进一步代谢活化,才能形成终致癌物。

终致癌物 (ultimate carcinogens) 指不需代谢活化的直接致癌物和间接致癌物经代谢活化所形成的具有致癌作用的代谢物的统称。

## 二、化学致癌作用的分子机制

### (一) DNA 加合物

化学致癌机制可分为两类:一是造成 DNA 损伤而引发肿瘤的遗传毒性机制;另一是对 DNA 以外的靶分子作用的非遗传毒性机制。遗传毒性致癌机制主要与 DNA 发生作用,其结果是 DNA 加合物的形成。当然, DNA 加合物形成并不一定导致肿瘤,其后果取决于加合物在 DNA 链上的位置和加合物的性质。例如,化学致癌物在生物转化酶系统作用下,经代谢活化,产生有致癌活性的终致癌物,即含有亲电子结构基团的化合物,它能与细胞靶分子——生物大分子如 DNA、RNA 及蛋白质的亲核基团, DNA 中的 N-7-, C-8-鸟嘌呤, N-3-, N-1-, N-7-腺嘌呤, O-2-, O-4-,



N-3-胸腺嘧啶发生共价结合,形成加合物使这些生物大分子烷基化,导致DNA的突变。突变的结局有多种,其中部分可发展成恶性转化,即产生肿瘤。因此,可以肯定DNA损伤与肿瘤发生是相关的,但并不是有DNA损伤即可导致肿瘤。换句话说,形成突变仅是化学致癌物作用机制的一部分。

一般认为化学致癌物诱导生成DNA加合物的数量与致癌性有密切关系,故DNA加合物可作为人类接触环境致癌物的标志。例如,人体接触环境致癌物如黄曲霉毒素 $B_1$ ,多环芳烃及N-亚硝胺化合物等,在细胞和体液中(如血液、尿液)可测出致癌物或其代谢产物与DNA或蛋白质共价结合的加合物。

## (二) DNA修复与化学致癌

化学致癌物对于人体内DNA损伤的方式是多种多样的。这方面研究较为广泛和深入。另一方面,也发现机体对DNA损伤相应发展了多种形式的修复机制,即有多种酶持续地监视着基因组的完整性,并十分有效和精确地修复各类损伤。修复的目的是将受损的部分去掉,再补上被除去部分的空缺。DNA修复有两种后果,一是正确修复,使机体内受损的DNA完全回复原有的结构和功能。另一是错误修复,指经修复的DNA部分仍可能在结构和功能上有缺陷。通常,经错误修复的细胞,尽管能够生存并保持了部分功能,但其代价是出现突变。

化学致癌机制,与致突变有关。突变的出现不只是损伤—突变的模式,而是损伤—修复—突变模式,即DNA损伤能够正确修复,突变就不会发生;如果修复错误或未经修复,进行DNA复制后,可出现突变。所以,化学致癌作用在一定程度上与DNA修复相关。

## (三) 癌基因、原癌基因及抑癌基因

随着现代分子生物学技术的发展,发现了肿瘤基因。这是肿瘤研究领域的一次革命。因为癌基因与抑癌基因的发现对于阐明肿瘤的发生机制、肿瘤的基因治疗以及抗肿瘤药物的发展提供了科学依据。

1. 癌基因 癌基因(oncogene)指一类在自然或实验条件下具有诱发恶性转化的潜在基因,它们是化学致癌物作用的主要靶分子,在细胞癌变过程中起着关键作用。癌基因实质上是一类被激活的基因,所指导合成的蛋白质能够促成细胞恶性表型的形成。原癌基因(proto-oncogene)指机体内正常细胞所具有的能致癌的遗传信息。正常情况下它呈静止状态,对细胞无害且具有重要生物学功能(调控细胞生长分化,促进细胞分裂、增殖等)。原癌基因在进化过程中高度保守,它们在细胞中行使正常的生物学功能,对细胞增殖、分化和信息传递的调控起重要作用。当发生突变、缺失、病毒整合、染色体易位、基因扩增或促长剂插入时,原癌基因发生改变,失去正常的调控细胞生长和分化功能,使细胞发生恶性转化。发生恶性转化的原癌基因即是癌基因。只有化学、物理或生物等致癌因素作用于细胞后,引起原癌基因突变使之激活,转变成癌基因后才会导致细胞癌变。

2. 抑癌基因 抑癌基因(anti-oncogene)是正常细胞分裂生长的负性调节因子,其编码的蛋白质能够降低或抑制细胞分裂活性,或称为肿瘤抑制基因(tumor suppressor gene)、肿瘤易感基因(tumor susceptibility gene)。这类基因对细胞的生长、增殖和分化起负调节作用,即抑癌作用。它的发现是肿瘤分子生物学及癌变机制的又一重大进展。

癌基因是一大类基因族,通常以原癌基因的形式普遍存在于正常机体基因组内。原癌基因在生物进化过程中高度稳定。原癌基因编码的蛋白质多是对正常细胞生长很重要的生长因子和生长因子受体、重要的信号传递蛋白质及核调节蛋白等,因此它们的存在不仅对细胞无害,而且在控制细胞生长核分化中起重要作用。表 8-1 列出典型癌基因和抑癌基因产物的功能。

只有在受到化学致癌物作用或其他致癌因素作用后,发生点突变、DNA 重排、外源或内源启动子顺序插入、基因扩增,原癌基因被激活为  $\beta$  活性形式的癌基因时,才引起细胞癌变。癌基因的激活表达是许多肿瘤细胞发生发展的重要步骤。而抑癌基因,正常时可抑制肿瘤细胞的肿瘤性状的表达。只有当它自身不能表达或其基因产物去活化才允许肿瘤性状的表达。所以,正常细胞转化为肿瘤细胞最少涉及两类基因的遗传学改变,即癌基因和抑癌基因的改变。

#### (四) 基因表达调控异常与肿瘤发生

癌细胞染色体的数量和质量的变化是其特征之一,癌基因与抑癌基因的发现及研究又为癌发生与遗传物质的密切关系充实了证据。对这些发现及研究的深入必然要涉及到基因调控问题。基因表达的调控是一个多水平,包括基因组、转录、转录后、翻译及翻译后等的复杂过程。肿瘤发病机制学说中有两大学派:一是基因学说,即癌变是由于基因的改变;二是基因外学说,即基因表达调控失常,基因本身不一定有改变。随着研究的广泛和深入,两大学派已在癌基因发病的理论中走向了统一,癌的发生是在多层次上异常所致,仅从单方面去认识与解释都将是局限的。

### 三、化学致癌过程

人类或动物的正常细胞如何在化学致癌物的作用下,逐步转化成癌细胞。在体内如何逐步发展成可见肿瘤,并转移到机体其他组织。肿瘤的发生是一个长期的、多阶段、多基因改变累积的过程,具有多基因控制和多因素调节的复杂性。因此,对肿瘤的起源与演进的研究和进一步认识肿瘤的发生、发展以及推动肿瘤防治均有重要的理论意义和实践价值。

目前较公认的学说是化学致癌作用至少包括 3 个阶段:引发阶段(initiation)、促长阶段(promotion)和进展阶段(progression)。该学说已在动物实验模型中得到证实,而在人体只能进行间接研究。

1. 引发阶段 或称启动阶段,为化学致癌作用的第一步骤。它通常是一相对迅速的过程。化

表 8-1 典型癌基因和抑癌基因产物的功能

| 基因产物的功能        | 基 因                  |
|----------------|----------------------|
| 1. 癌基因         |                      |
| 生长因子           | <i>sis, fgf</i>      |
| 受体/酪氨酸蛋白激酶     | <i>met, neu</i>      |
| 酪氨酸蛋白激酶        | <i>src, ret</i>      |
| 与膜有关的 G 蛋白     | <i>ras, gip-2</i>    |
| 胞浆血清蛋白激酶       | <i>raf, pim-1</i>    |
| 核转录因子          | <i>myc, fos, jun</i> |
| 尚不清楚           | <i>bcl-2, crk</i>    |
| 2. 抑癌基因        |                      |
| GTP 酶的活化       | NF1                  |
| 细胞周期 - 调节核转录因子 | RB-1, p53            |
| 错配 DNA 修复      | hMLH1                |

学致癌物对靶细胞 DNA 产生损伤作用,经细胞分裂增殖固定下来,造成单个或少量细胞发生永久性、不可逆的遗传性改变,即成为突变细胞,或称为“启动细胞”(intitiated cell)。这就是引发阶段,即化学致癌物不可逆地将正常细胞转变为肿瘤细胞的起始步骤。具有引发作用的化学物质,称为引发剂(initiator)或启动剂。

2. 促长阶段 为化学致癌作用第二阶段,即促进引发形成肿瘤细胞分裂生长的作用阶段。该阶段有如下特点:①引发物作用之后,促癌物的作用是长期、慢性,才能引起肿瘤;②引发物单独作用一般不会引起肿瘤,即仅有引发物是不够的;③只有促癌物的慢性作用而没有引发物的作用也不会引起肿瘤;④引发物与促长物的作用先后次序十分重要,引发必须发生在促长之前;⑤引发产生的作用是不可逆改变,促长在早期阶段的改变是可逆的。具有促长作用的化学物质,称为促长剂(promotor)。

随着对促长作用的认识深入,认为促长阶段是肿瘤形成过程较易受干扰的阶段,也是最容易取得预防效果的阶段。

3. 进展阶段 为化学致癌作用的第三阶段,指在肿瘤形成过程中,在促进之中或之后,细胞表现出不可逆的遗传学改变,其标志为遗传不稳定性增加和恶性变化,在形态上或功能代谢和行为方面逐渐表现出肿瘤的特征,如生长速度、侵袭性、转移能力及生化、免疫性能改变。关于进展机制,与引发和促长相比,了解甚少,仍有待今后研究。

引发、促长和进展三个阶段是对化学致癌过程的基本划分。多阶段致癌的形态学和生物学特征见表 8-2。通常难以清楚地界定三个阶段,为了讲述或研究的方便分为三个阶段。实际上肿瘤的发生、发展非常复杂,有许多方面还需进一步阐明。

表 8-2 多阶段致癌的形态学和生物学特征

| 引 发                             | 促 长                          | 进 展                      |
|---------------------------------|------------------------------|--------------------------|
| 1. 不可逆性                         | 1. 在基因表达和细胞水平上有可逆性           | 1. 不可逆性                  |
| 2. 经引发的“干细胞”在形态学上不能鉴定           | 2. 持续给以促长剂才可维持促长细胞群          | 2. 核型不稳定性导致细胞基因组结构的形态学改变 |
| 3. 对外源化学物及其他化学因子敏感              | 3. 对衰老、饮食和激素因子敏感             | 3. 在进展阶段早期,已改变的细胞对环境因子敏感 |
| 4. 引发细胞可能自发(内源性)发生              | 4. 内源性促长剂可起“自发性”促长作用         | 4. 在进展阶段观察到良性或恶性肿瘤       |
| 5. 需经细胞分裂“固定”                   | 5. 剂量-反应关系显示有阈值和最大作用         | 5. 进展剂使已促长的细胞进入此期        |
| 6. 剂量-反应关系没有易于确定的阈值             | 6. 以能否有效地扩大引发细胞群来确定促长剂的相对强度。 |                          |
| 7. 经规定的促长阶段后,定量癌前病变来确定引发剂的相对强度。 |                              |                          |

## 四、非遗传毒性致癌机制

传统上将致癌过程中致癌因素对于 DNA 所引起的一系列启动作用列为遗传机制,而对于 DNA 外靶子所起的作用称为非遗传毒性机制,或称非突变学说,文献中亦称为渐成说(epigenetic theory)。非遗传毒性致癌机制的证据是一部分致癌物用目前已有的常用致突变试验不能检出其致突变性,常见的非遗传毒性致癌物有石棉、激素、免疫抑制剂、多氯联苯及 TCDD 等。关于非遗传毒性致癌机制涉及的因素很多,目前研究得比较充分的主要有:细胞间隙连接通讯(gap junction intracellular communication, GJIC),信号传导系统,纺锤丝系统, DNA 修复系统以及基因表达调控系统等。它们在不同方面不同程度上参与了多阶段的致癌过程。虽然,对于非遗传毒性致癌机制的了解远不如对遗传毒性致癌机制,但是,对于某些致癌因素,这些非遗传毒性致癌机制对于它们所诱导的致癌过程起着关键作用,是不容忽视的方面。

化学致癌作用是一个多因素、多基因参与的多阶段过程,见图 8-1。

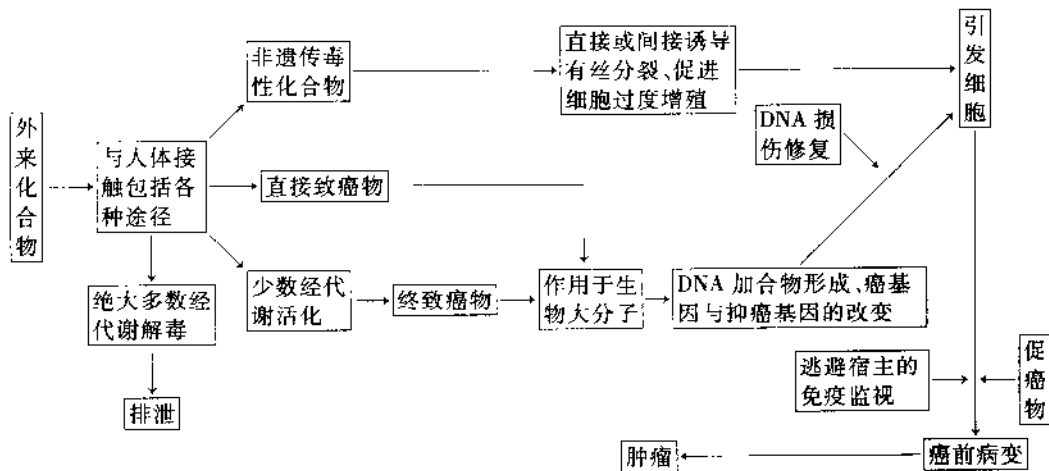


图 8-1 多阶段致癌理论图解

## 第二节 化学致癌物的分类

化学致癌物的种类繁多,且分类方法不尽相同。现将常用的分类方法介绍如下。

### 一、根据致癌物对人类和动物的致癌作用分类

目前评定致癌物的机构主要是国际癌症研究中心(IARC)。它是一国际性癌症研究专家工作组,主要利用世界各地所发表的可供利用资料,根据对人类和对实验动物致癌性资料,以及在实验系统和人类其他有关的资料(包括癌前病变、肿瘤病理学、遗传毒性、结构-活性关系,代谢和动力学,理化参数及同类的生物因子)进行综合评价,将环境因子和类别、混合物及暴露环境与

人类癌症的关系分为下列四组(2002年 IARC 共评价 878 种):

组 1,对人类是致癌物。对人类致癌性证据充分者属于本组。有 87 种。

组 2,对人类是很可能或可能致癌物。又分为两组,即组 2A 和组 2B。

组 2A,对人类很可能是致癌物,指对人类致癌性证据有限,对实验动物致癌性证据充分。有 63 种。

组 2B,对人类是可能致癌物,指对人类致癌性证据有限,对实验动物致癌性证据并不充分;或指对人类致癌性证据不足,对实验动物致癌性证据充分。有 234 种。

组 3,现有的证据不能对人类致癌性进行分类。有 493 种。

组 4,对人类可能是非致癌物。有 1 种。

IARC 已确定的人类致癌物或生产方式及其靶器官举例见表 8-3。

表 8-3 已知的人类致癌物或生产方式及其靶器官举例

| 致癌物或生产方式          | 靶器官               |
|-------------------|-------------------|
| 黄曲霉毒素             | 肝(肺)              |
| 4-氨基酚             | 膀胱                |
| 砷及砷化合物            | 肺、皮肤              |
| 石棉                | 肺、胸膜、腹膜(胃肠、咽部)    |
| 硫唑嘌呤              | 淋巴系统、间质、肝胆系统、皮肤   |
| 苯                 | 造血系统              |
| 联苯胺               | 膀胱                |
| N-N-双(2-氯乙基)-2-苯胺 | 膀胱                |
| 双氯甲醚及工业级氯甲甲醚      | 肺                 |
| 1,4-丁二醇-二甲磺酸盐     | 造血系统              |
| 口服避孕药(复合)         | 肝                 |
| 口服避孕药(连续)         | 子宫                |
| 氦及其裂变产物           | 肺                 |
| 含石棉纤维的滑石          | 肺                 |
| 硫替派               | 造血系统              |
| Treosulphan       | 造血系统              |
| 氯乙烯               | 肝、血管(肺、脑、淋巴系统)    |
| 酒精饮料              | 咽、食管、肝、喉、口腔(乳房)   |
| 含非那西丁的退热剂         | 膀胱、肾              |
| 含烟草的槟榔            | 口腔、咽喉、食管          |
| 煤焦油沥青             | 皮肤、肺、膀胱(咽、口腔)     |
| 煤焦油               | 皮肤、肺(膀胱)          |
| 矿物油(轻度处理或不处理)     | 皮肤(肺、膀胱、胃肠道)      |
| 页岩油               | 皮肤(胃肠道)           |
| 烟臭                | 皮肤、肺              |
| 烟草制品(无烟)          | 口腔、咽、食管           |
| 烟草制品(有烟)          | 肺、膀胱、口腔、咽喉、食管、胰、肾 |
| 铝生产               | 肺、膀胱(淋巴系统)        |

续表

| 致癌物或生产方式   | 靶器官                    |
|------------|------------------------|
| 金胺生产       | 膀胱(前列腺)                |
| 鞋制造与修理     | 鼻腔、造血系统(咽、肺、肝、胃、肠道、膀胱) |
| 煤气生产       | 皮肤、肺、膀胱                |
| 焦煤生产       | 皮肤、肺、肾                 |
| 硬木家具生产     | 鼻腔                     |
| 钢铁冶炼       | 肺(胃肠、生殖泌尿系统、造血系统)      |
| 异丙醇生产      | 鼻腔(咽)                  |
| 品红生产       | 膀胱                     |
| 职业油漆工      | 肺                      |
| 橡胶业        | 膀胱、造血系统(肺、胃肠道、皮肤、淋巴系统) |
| 地下开采赤铁矿接触氨 | 肺                      |

靶器官栏内( )内是指可能作用的其它靶器官或系统

美国 EPA 的分类方法相似,分为 A, B1, B2, C, D, E 五组(表 8-4)。网址为 [hppt://www.EPA.gov/iris](http://www.EPA.gov/iris)。

表 8-4 基于证据权重的致癌物分类

| 分类        | IARC | US EPA              | 人证据   | 动物证据               |
|-----------|------|---------------------|-------|--------------------|
| 人类致癌物     | 1    | A                   | 充分    | 充分或有限              |
| 很可能是人类致癌物 | 2A   | B1, B2 <sup>a</sup> | 有限或不足 | 充分                 |
| 可能是人类致癌物  | 2B   | C                   | 缺乏或不足 | 充分或有限 <sup>b</sup> |
| 未分类       | 3    | D                   | 缺乏或不足 | 不足或缺乏              |
| 非致癌物      | 4    | E                   | 缺乏    | 至少 2 个物种阴性结果       |

注 a: EPA 将动物证据充分的致癌物归于很可能是人类致癌物(B 类),根据对人致癌证据分为 B1 和 B2。b: IARC 接受阳性遗传毒性资料替代人类资料。

## 二、根据化学致癌物作用机制的分类

根据化学致癌物对细胞成分作用,及引起癌变的机制不同可分为遗传毒性致癌物和非遗传毒性致癌物。

根据化学致癌物对细胞成分作用,及引起癌变的机制不同可分为遗传毒性致癌物和非遗传毒性致癌物。

1. 遗传毒性致癌物 遗传毒性致癌物(genotoxic carcinogens)指进入细胞后与 DNA 共价结合,引起机体遗传物质改变,导致癌变的化学物质。这类致癌物约占化学致癌物的大多数,因其作用机制是损伤遗传物质,故可利用遗传毒理学试验来检测这类致癌物。

(1) 直接致癌物(direct carcinogens)本身直接具有致癌作用,在体内不需要经过代谢活化即可致癌。例如,各种烷化剂,其大多为亲电子反应物。

(2) 间接致癌物(indirect carcinogens)本身并不直接致癌,必须在体内经代谢转化,其所形成的代谢产物才具致癌作用。例如,多环芳烃、芳香胺类化合物等。

(3) 无机致癌物:有些可能是亲电子剂,但有些是通过选择性改变 DNA 复制保真性,导致 DNA 的改变,如金属镍、铬。

2. 非遗传毒性致癌物 非遗传毒性致癌物(epigenotoxic carcinogens)指不作用于机体遗传物质的化学致癌物。非遗传毒性致癌物包括以下几种:

(1) 促长剂:本身无致癌性,在给予遗传毒性致癌物之后再给予促长剂可增强遗传毒性致癌物的致癌作用,也可促进“自发性”转化细胞发展成癌。如佛波酯(TPA及其衍生物)、苯巴比妥、二丁基羟基甲苯(BHT)、1,8,9-蒎三醇、DDT、Alkanes及胆盐等。

(2) 内分泌调控剂:主要改变内分泌系统平衡及细胞正常分化,常起促长剂作用。如乙烯雌酚、雌二醇、硫脲。

(3) 免疫抑制剂:主要对病毒诱导的恶性转化起增强作用。如嘌呤同型物。

(4) 细胞毒剂:可能引起细胞死亡,导致细胞增殖活跃及癌发展。如次氨基三乙酸及氟仿等。

(5) 过氧化物酶体增殖剂:过氧化物酶体增殖可导致细胞内氧自由基过量生成。如祛脂乙酯、邻苯二甲酸乙基己酯。

(6) 固态物质:物理状态是关键性因素,可能涉及细胞毒性。如塑料、石棉等。

3. 未分类 如二噁烷、美舍吡伦。

此外,有些化合物,本身既不具有引发作用,也不具有促长作用,但可以促进引发作用和增强促长作用,即能促进或增强全部致癌过程,故称为助致癌物(cocarcinogens)。如乙醇、二氧化硫等。

### 第三节 观察化学毒物致癌作用的基本方法

化学致癌物的判别包括两个方面证据:一是人群流行病学调查,此项中必须具备两项以上由不同研究者在不同地点、不同对象中以不同调查方法获得的结论相符的证据;二是动物实验证据,要求至少也有两项按现行常规设计进行,符合GLP(good laboratory practice),在不同物种动物中所得结果一致的动物致癌物鉴定资料。由于肿瘤是一种后果严重的毒性效应,因此化学致癌物的判别是一项极其重要、慎重而复杂的工作。它需要充足的时间、充分的研究和肯定的证据。上述两类证据,经严格评审后,证据可分为证据充足、证据有限和证据不足三类,以此评定化学物质的致癌性。

化学致癌物的判别需从定性和定量两个方面进行。定性判别即判断受试物能否致癌;定量判别是进行剂量反应关系分析,以推算其可接受的危险度的剂量,或人体实际可能接触剂量下危险度。定性是定量的基础。常用的致癌物判别方法包括三大类:短期试验、动物致癌试验及人类流行病学调查。下面分别予以介绍。

#### 一、短期试验

.....

##### (一) 致突变试验

致突变试验主要是对致癌物的筛选,其依据是化学物的致突变性与致癌性相联系,即大多数

化学致癌物具有致突变性,而大多数非致癌物无致突变性。利用致突变试验进行致癌物的筛查的毒理学意义是可检出基因遗传毒性的致癌物。该方法的局限性是无法检出非遗传毒性致癌物(假阴性)和具有遗传毒性的非致癌物(假阳性)。

按照对致癌机制的认识,遗传毒性致癌物可能有多种致癌机制,目前尚不知何种遗传学终点可反映,故对致癌物的筛选需一组致突变试验,最好每一遗传学终点均有一个试验。假如在组合试验中有一项是阳性结果,即可认为该受试物为致突变物,因而就可能是遗传毒性致癌物。组合试验中出现的阳性结果愈多,受试物致癌的可能性就愈大。Ames 试验是应用筛检致癌物最广泛和最敏感的致突变试验。许多致突变试验详细的方法见有关致突变章节。当然,致突变试验还需进一步改进或建立新的试验,以适应对致癌物的筛检需要。

## (二) 细胞转化试验

细胞转化是指受试物与正常细胞在体外接触,如有致癌作用,可使正常细胞形态、功能发生变化,发生与癌细胞相似的过程。细胞转化试验的目的是了解体外培养细胞接触受试物后,细胞生长是否发生癌变,其观察内容包括生长自控能力、细胞形态、细胞生长能力、生化表型以及移植于动物体内形成肿瘤的能力等。它是短期试验系统中一类重要的方法,也是研究肿瘤细胞在不同发展阶段中细胞生物学特征的一重要手段。由于它不以致突变为观察终点,可以弥补以致突变试验来筛查化学致癌物的不足,即它可检出遗传毒性致癌物和非遗传毒性致癌物。

有三类细胞可应用于细胞转化试验:①原代细胞,如叙利亚仓鼠胚胎细胞(SHE 细胞)、人类成纤维细胞、小鼠皮肤或大鼠支气管上皮细胞等;②细胞系,常用细胞系 BALB/C-3T3、C3H10T1/2 和 BHK-21;③病毒感染细胞,如 RLV/RE 细胞(劳舍尔白血病病毒感染的小鼠胚胎细胞)和 SA7/SHE 细胞(猿猴腺病毒感染的 SHE 细胞)。

试验的观察终点是恶性变的细胞。恶性变的细胞表现如下:形态:细胞偏大,且大小不等;核大而畸形,染色质深染而粗糙,核浆比例倒置,核膜粗厚,核仁增生而肥大;核仁核胞浆因 RNA 增多而偏酸性,呈嗜碱性染色而偏蓝;多见核分裂现象。正常的接触抑制消失,它的克隆不是单层细胞且细胞排列有序,而是多层细胞且细胞排列紊乱。生长表型的改变。

本试验所指转化大多数为形态转化或恶性前期转化。它们可以发展成为真正的恶性变,但亦可能到此为止,其结局不一定形成肿瘤。这是本试验的局限性。因此,对于其阳性结果的解释仍应持慎重态度,它提示受试物具有致癌的可能性,但它不能代替动物试验作出肯定的结论。

## (三) 哺乳动物短期致癌试验

哺乳动物短期致癌试验是一种有限的动物试验(limited in vivo bioassay)。它是在有限的短时间内完成而不是终生,其观察的靶器官也限定为一个而不是全部器官和组织。哺乳动物短期致癌试验的迅速发展有两个原因,其一,科技进步和生活水平提高,大量的新化学物不断出现,如仍用长期动物致癌试验或流行病学调查来阐明其致癌性,远远不能满足对化学物致癌性评价的需求;其二,利用致突变试验的筛查又必然漏去非遗传毒性致癌物,这是令人担心又迫切需要解决的问题。

常用的哺乳动物短期致癌试验有:小鼠肺肿瘤诱发试验,小鼠皮肤肿瘤诱发试验,雌性大鼠乳腺癌诱发试验和大鼠肝转变化灶试验等。这些试验是在给予受试物后,多次持续给予促长剂,例



如,小鼠肺肿瘤诱发试验给予丁基羟甲苯(BHT),小鼠皮肤肿瘤诱发试验给予佛波酯(TPA)等,在20~30周左右观察局部(如肺、肝、皮肤和乳腺等)组织有无肿瘤。由于肝和肺是最常见的发生肿瘤器官,也是许多化学致癌物的靶器官,因此作为新化学物致癌性的筛查,小鼠肺肿瘤诱发试验和大鼠肝转变灶试验的应用价值较高。至于小鼠皮肤肿瘤诱发试验和大鼠乳腺癌诱发试验,仅适用部分类型的化学物质。例如多环芳烃、芳香胺、氯烷、亚硝基脲等都能在9个月内诱发乳腺癌。小鼠皮肤肿瘤诱发试验适用于煤、石油和烟草的焦油以及其中所含的多环芳烃,还有许多直接致癌物如硫芥、氮芥、双氯甲醚和丙环内酯等。

上述任一试验的阳性结果,其意义与长期动物致癌试验相当。由于试验期较短,又未检查其他器官和系统,特别是皮肤肿瘤和乳腺癌的诱发试验似乎仅适用于较小范围的化学物质类型,所以哺乳动物短期试验阴性结果的意义较差。

## 二、哺乳动物长期致癌试验

目前公认的确证动物致癌物的经典方法是哺乳动物长期致癌试验,又称哺乳动物终生试验。化学致癌的一个最大特点是潜伏期长。如利用人类接触致癌物确认方法——流行病学调查,一般需要人类接触受试物20年后才能进行。利用大鼠致癌试验,试验期为2年,相当于人类大半生的时间。克服了潜伏期长的难题。再者,动物试验可严格控制试验条件,而人群流行病学调查不易排除许多混杂因素的影响。该方法的最大局限性是动物试验结果外推至人存在不肯定性。

### (一) 动物选择

在致癌试验中选择动物最重要依据是对诱发肿瘤的易感性,肿瘤易感性可在物种、品系、年龄和性别等方面有不同的表现。

物种的选择,特别在针对受试物可能有特定的靶器官时更为重要。例如,大鼠对诱发肝癌敏感,小鼠对诱发呼吸道或肺肿瘤敏感,金黄地鼠或犬对诱发膀胱癌敏感,而大、小鼠对诱发膀胱癌均不敏感。如果无法知道受试物的靶器官时,可选用两种啮齿类动物,如大、小鼠。在选择物种和品系时,应考虑自发肿瘤率。例如,小鼠对肝脏肿瘤的易感性与大鼠相近,但小鼠肝脏肿瘤的自发率较高,且易患各种肝脏疾病,干扰观察,故肝脏诱发试验不选择小鼠。

在年龄方面,选用断乳或断乳不久的动物。虽然,新生动物对毒物更敏感,因要在动物大部分生命时间内接触受试物,多还是选择断乳的动物。性别选择一般是雌雄各半。除非已证明该受试物结构近似的致癌物有易感性性别差异,才有依据选择易感的一种性别。

关于动物数量,每组动物数较一般毒性试验多。因为,致癌作用是严重损害健康的一种毒性效应,试验应减少或避免假阴性结果,所以,要增加每组动物数。此外,自发肿瘤率增高也需相应增加每组动物数,一般每组动物数为雌雄各50只。

### (二) 剂量设计

一般设3个染毒剂量组和1个对照组,必要时另设一个溶剂对照组。3个染毒剂量组包括无作用剂量组、阈剂量组、发生肿瘤的剂量组(此为最高剂量组),以求出明确的剂量反应关系。为了在每组动物数不太大的条件下,使染毒组的肿瘤发生率显著地高于对照组的肿瘤自发率,一

般认为最高剂量应尽可能加大,这样才不至于漏检致癌物。

### (三) 试验期限与染毒时间

原则上试验期限要求长期或终生。致癌试验通常与慢性毒性试验结合起来进行。所谓长期,因不同物种寿命长短不一,观察时间要求不同。一般情况下小鼠最少1.5年,大鼠2年。

### (四) 结果的观察、分析和评定

试验过程观察基本同慢性毒性试验。重点是观察指标与结果评价不同。致癌试验常用的指标如下:

1. 肿瘤发生率 它是最重要的指标,可计算肿瘤总发生率、恶性肿瘤总发生率、各器官或组织肿瘤发生率和恶性肿瘤发生率,以及各种类型肿瘤发生率。

2. 多发性 肿瘤的多发性是化学致癌作用的又一特征。多发性指一个动物出现多个肿瘤或一个器官出现多个肿瘤。一般计算每一组的平均肿瘤数,有时还可计算每一组中出现2个、3个或多个肿瘤的动物数或比例。

3. 潜伏期 通常用各组第一个肿瘤出现的时间作为该组潜伏期。其局限性是只适用于能在体表观察的肿瘤,如皮肤肿瘤和乳腺肿瘤等。对于内脏肿瘤的潜伏期,则需分批剖杀,计算平均潜伏期。

分析以上三种指标时首先注意有无剂量反应关系,染毒组应与对照组作显著性检验。假如存在剂量反应关系,并与对照组差异显著时,判定为阳性结果。如染毒组发生对照组未出现的肿瘤类型,也作阳性结果,但需对照组的历史资料。假如,仅在较高剂量才出现与对照组显著性差异,其毒理学意义不如在较低剂量下或在人类可能实际接触的剂量出现显著性差异的意义重大。因为,大剂量出现阳性结果,存在无法肯定的问题,一是实际上是否有无接触可能的问题;二是机体是否出现代谢饱和或出现低剂量时没有的活化途径。

对于阴性结果的认定应非常慎重。注意试验设计的最低要求:两个物种动物,两种性别,至少三个剂量水平且其中一个接近最大耐受量。每组有效动物数至少50只(动物数量与其自发肿瘤率成正比,即自发率高,动物数量多)。

## 三、人群流行病学调查

人群流行病学调查是研究人类疾病发生、发展和转归的重要方法。

要判别化学物是否为人类致癌物,流行病学资料具有决定意义。它是确定人类致癌物唯一手段。通常方法是,一般先通过动物致癌试验,根据阳性结果检出潜在的人类致癌物,或先进行描述流行病学调查或临床观察发现怀疑人类致癌物,再进行分析性流行病学调查,即定群调查(或称队列调查)和病例对照调查。

人群流行病学调查的不足是观察指标多为化学致癌作用的结果,即肿瘤发病数和肿瘤死亡数。这对于早期发现、早期治疗与预防很不利。随着分子生物学飞速地发展,近年来出现了新的领域,即分子流行病学。它是利用一些生物标记物,在一定条件下来判别受试物对于人类的致癌性,进行致癌危险性评价及肿瘤干预试验等工作。

致癌性判别不单纯是一个学术上的问题,而且和管理部门制定政策有密切关系。必须将短

期试验、动物试验以及人群流行病学资料所得结果综合起来,加以分析,才能得出较为可靠的结论。目前这三个方面试验方法仍然有许多不足之处,有待进一步完善。

#### 四、作为致癌作用模型的转基因小鼠和基因敲除小鼠

上述三类方法是确认致癌物的主要方法,近年来生物学技术的进步,基因工程技术为研究肿瘤提供了良好的模型,如转基因动物和基因敲除小鼠等。转基因动物(transgenic animal)系指借助基因工程技术将确定的外源基因通过生殖细胞或早期胚胎导入动物个体的染色体上,在其基因组内稳定地整合经导入的外源基因,并能遗传给后代的一类动物。基因敲除小鼠指将小鼠基因组中特定内源基因定点突变的小鼠。转基因动物技术是20世纪80年代初发展起来的生物高新技术,它使动物和人体基因工程研究由以往的单基因离体水平,发展至离体和在体相结合的分子和细胞水平。

利用转基因小鼠和基因敲除小鼠建立的肿瘤模型,使人们对肿瘤发生与发展的机制有了更深刻认识。主要作用如下:

1. 肿瘤演进模型 引起肿瘤的小鼠,可建立在某一基因的突变与导致肿瘤的细胞内变化间的直接因果性联系的试验模型。转基因小鼠发生的肿瘤在发展的过程中可识别其组织学改变,通过识别在该过程每个阶段发生的遗传学变化,不仅可以分析单个基因的功能,而且可以将肿瘤发展中的遗传学事件排序。

2. 肿瘤病因、发病机制研究 建立携带有肿瘤基因的转基因动物是癌基因活性和肿瘤发生研究的一种极为重要的新方法,它具有四维特征,能够从空间和时间角度同时观察目的基因的活动情况。不仅可以检测一些已知的癌基因或抑癌基因的改变在肿瘤发生中的作用,而且对识别其他影响肿瘤发生的基因也有很大帮助。

癌基因的激活是一个显性过程,而抑癌基因是隐性的,除非两个等位基因同时失活,否则不表现出后果。因此,构建这种隐性的、失去功能的癌基因转移模型较显性的、获得功能的癌基因转移模型更为困难,因为前者涉及正常的抑癌基因两个等位基因的丢失、失活问题。

(石 年)

# 9

## 第九章

# 发育毒性与致畸作用

## 第一节 概 述

### 一、发育毒理学

发育毒理学 (developmental toxicology) 是毒理学的重要分支学科, 研究发育生物体在受精卵、妊娠期、出生后、直到性成熟的发育过程中, 由于出生前接触导致异常发育的理化因素或环境条件后的发病机制和结果。

### 二、从畸胎学到发育毒理学

发育毒理学是在畸胎学基础上发展起来的毒理学分支学科。但是, 畸胎学, 或出生结构缺陷的研究, 作为一个描述性的科学在有文字之前就已经存在了。四大文明古国都有畸胎的记载, 最早可以追溯到 6500 D. B.。那时人们相信异常的婴儿是上天的惩罚、星象的反映和未来的预兆, 或者是人和动物之间杂交的结果。随着 16、17 世纪生物科学的兴旺发展, William Harvey 于 1651 年提出了畸形起因于器官或结构的不完全发育的发育障碍学说, 来解释除遗传起源以外的所有畸形。

现代实验畸胎学开始于 19 世纪初, 许多 19 和 20 世纪的胚胎学家, 使用各种不同的物理 (震动, 倒置, 针刺) 和化学因素处理鸡蛋, 产生了畸形小鸡, 有神经管缺陷、无脑畸形、脊柱裂、独眼畸形、心脏缺陷、位置颠倒和联体双胞胎等。重要的是, 他们注意到作用时间在决定畸形类型方面比损伤的性质更重要。

20 世纪早期发现多种环境条件 (体温, 微生物毒素, 药物) 可扰乱鸟、爬虫类、鱼和两栖类的发育。1935 年, Hale 首次报道, 维生素 A 缺乏诱导哺乳动物母猪产下突眼和腭裂的畸形后代。之后, 许多饮食、环境因素 (化学和物理因素), 如: 氮芥, 锥蓝, 激素, 抗代谢物, 烷化剂, 缺氧和 X 线的致畸作用被研究。1941 年, Gregg 报告了在奥地利由于母亲感染了风疹病毒导致子代眼睛心脏和耳缺陷以及智力发育延迟的发病率增加, 并分析了与感染时间的关系。虽然已发现哺乳

动物包括人的胚胎,普遍对外部的影响和子宫内的感染敏感,但这些调查结果在那时的冲击并不大。然而,1961年,反应停事件是一个转折。

反应停(thalidomide),20世纪60年代前后在欧洲和日本广泛作为安全有效的抗早孕反应药物,口服剂量50~200mg/d。1961~1962年,联邦德国的儿科病房中出现了大量罕见的短肢畸形儿,多数为四肢缺陷、无眼、腭裂、骨骼发育不全、十二指肠和肛门闭锁。同一时期,全球出现了5850个短肢畸形儿。McBride和Lenz在德国和澳洲的独立研究,均确认反应停是其原因。反应停被迫从市场撤回,动物模型复制成功。其致畸剂量相当于1mg/(kg·d),只要末次月经后6~8周内口服200mg反应停便可引起严重的短肢畸形;服药妇女还有流产、早产和死胎等发生。

反应停事件是人类历史上的一个悲剧。但由此,促进了化学致畸的研究以及管理法规的建立。在许多国家中,管理机构开始发展动物测试方法与慢性毒性研究分开,以评估药物对妊娠的影响。1966年美国FDA提出了三段生殖毒性试验指南,包括对致畸等发育毒性的评价。但是,尽管早就提出了发育毒性的四大表现,实际研究中仍将注意力放在致畸作用上,而忽略了对其他发育毒性的评价。直到20世纪80年代后期美国环境保护局(EPA)提出可疑发育毒物危险度评价指南,第一次明确提出了对发育毒性的评价。

现在知道,在人类不良生殖结局中,着床后的丢失(流产和死胎)估计为31%;自发单一畸形的比率相当小,大约<10%,但严重畸形的总率在出生时约有2%~3%,到1岁时约6%~7%。事实上在出生时可发觉的畸形只是冰山之顶,较小的出生缺陷有14%;低出生体重7%;1岁之前婴儿死亡率1.4%;神经功能异常占16%~17%。所以正常生育率只有50%左右。我国每年有30~40万患严重的、肉眼可识别的先天缺陷的新生儿出生,其中很大比例在一年内死亡。先天畸形占围生期死亡原因的第二、第三位。先天缺陷导致寿命缩短是肿瘤和心血管疾病的8倍和5倍。

## 第二节 发育毒性与致畸性

在发育期间由于外源性理化因素的毒性而产生的改变,可以通过损伤功能和引起生长迟缓而使发育体长期存活,接触时期和接触程度的不同导致从次要的变异到大体畸形和死亡的不同表现。

### 一、基本概念和发育毒性的终点

\*\*\*\*\*

1. 畸形 畸形(malformation)指出生前因素引起发育生物体的严重的解剖学上形态结构的缺陷。对发育、生长、形态、生理功能、生育力和(或)寿命可产生有害影响,可以存活也可能不能存活。

致畸性(teratogenicity)和致畸作用(teratogenic effect)均指在妊娠期(出生前)接触外源性理化因素引起后代结构畸形的特性或作用。在妊娠期接触能引起子代畸形的理化因素称为致畸物(teratogen)。如果诱发的畸形是在无明显母体毒性剂量下出现的,那么该物质就是一种真正的或选择性致畸物。

2. 变异 变异(variation)是由遗传和遗传外因素控制的外观变化,或由于分化改变而引起

的中途歧异(deviation)。指同一种属的子代与亲代之间或子代的个体之间,有时出现不完全相同的现象,是小的或次要的结构改变。例如肋骨或椎骨数目多于或少于正常,甚至某些内脏异位也属于变异。一般认为变异不影响正常生理功能,更不危及生命。但是在动物致畸试验中,如果某种变异出现较多,并呈一定剂量-效应关系,应该引起注意。

3. 胚胎-胎儿毒性 从受精卵直到出生的整个发育生物体,包括胚胎(或称胚体)、胎儿(或称胎体)和胎膜,称为孕体(conceptus)。胚胎毒性(embryotoxicity)通常指外源性理化因素造成的孕体着床前后直到器官形成期结束的所有的毒性;胎儿毒性(fetotoxicity)指器官形成期结束后的因素引发的任何毒性表现(包括死亡、体重降低、骨化迟缓、功能缺陷以及结构异常);在实验动物发育毒性试验中,通常不去区分胎儿与胚胎,所以使用胚胎-胎儿毒性更恰当。

4. 发育毒性 发育毒性(developmental toxicity)指出生前经父体和(或)母体接触外源性理化因素引起的在子代到达成体之前内出现的有害作用,包括:结构畸形、生长迟缓、功能障碍及死亡。能造成发育毒性的物质称为发育毒物(developmental toxicant)。发育毒物应是在未诱发母体毒性的剂量下产生发育毒性的物质。

5. 出生缺陷 出生缺陷(birth defect)是指婴儿出生前即已形成的发育障碍,包括形态结构异常(畸形)和功能缺陷(如智力低下,代谢和行为的异常)。

其他的一些术语,如:行为畸胎学(behavioral teratology)、功能发育毒理学(functional developmental toxicity)、精神畸胎学(psychoteratology)、发育神经毒理学(developmental neurotoxicology)、功能畸胎学(function teratology)均应归入发育毒理学。

## 二、发育各阶段发育毒性作用的特点

不同的化学毒物作用于不同发育阶段。过早或过迟接触都可能不产生效应。每个发育阶段可再细分,如着床前期又分为受精、卵裂、囊胚形成。而不同系统和器官的形成与发育是不完全同步的,有不同速度,有先有后,日期不同。在胎儿期,器官长大和功能成熟,但神经系统和生殖系统等功能的完全成熟延伸至出生后的儿童期、少年期、青春期。所以,应该从更长时间来评价发育毒性。

### (一) 着床前期

着床前期又称分化前期,从受精时算起,到完成着床之前。其期限在人类为第11~12天;啮齿动物为前6天。卵子受精后,细胞迅速分裂而形成胚囊,分化很少,受损的是相对未分化细胞。一般认为,此时很少发生特异的致畸效应,通常是未分化细胞受化学毒物损伤而致胚泡死亡,称为着床前丢失(preimplantation loss)。然而,也有着床前期接触毒物导致胎儿畸形的例子。如,环氧乙烷,甲基亚硝脲,乙基亚硝基脲,乙基磺酸甲烷和三乙烯三聚氰胺等。小鼠妊娠前第2.5天、第3.5天和第4.5天用甲基亚硝脲处理可造成子代神经管缺陷和腭裂。

### (二) 器官形成期

着床后孕体即进入器官形成期,直到硬腭闭合。还可细分为原肠胚形成(有人将其称为着床后期)和各器官结构的形成。人是3~8周。一般认为大鼠、小鼠、兔的着床时间为妊娠第6~7天,硬腭闭合时间为妊娠第15~18天。器官形成的迅速变化需要细胞增殖,细胞移动,细胞与

细胞交互作用和形态发生的组织改造。一个毒物可能影响一个或一些发育事件,因此一个结构的敏感性的模式因毒性作用的性质而不同。

器官形成期特别容易感受致畸物的作用而诱发器官结构的缺陷,即结构畸形,故又称为致畸敏感期或致畸作用危险期(critical period)。器官形成期也可能引起胚胎死亡。一胎多仔动物(如啮齿类)胚胎死亡后被吸收,称为吸收胎(resorption),在人和灵长类则以流产告终。所以,在这一时期,外源化学物表现出发育毒性,以结构畸形最突出,也可有胚胎死亡、生长迟缓。

各个器官发育最旺盛时感受性最强,不同器官的敏感期(有人称为“靶窗”,target window)不同,且有交叉重叠(图9-1)。表现为:不同器官致畸高峰时间不同,在器官形成期中不同时间给予致畸物会诱发不同器官畸形;同一天染毒可引起多个器官受损。如大鼠器官形成期为受精后第9~17天,眼的敏感期为受精后第9天,心脏和主动脉弓约为第9~10天,脑约为第10天,头与脊椎骨约为第11天,腭为第12~13天,泌尿生殖器官约为第15天。即使同一致畸物,给予的日期不同,也可能产生不同的畸形,出现不同的器官畸形综合征:如小鼠孕第8~12天的不同时间给予环磷酰胺20 mg/kg,虽然均引起趾畸形,但随着给药时间的不同分别出现多趾、并趾、缺趾、无趾。同一物质不同时间给予可能引起不同的发育毒性:如硝酸铅(25mg/kg,静脉注射),第9.5天给大鼠引起后部畸形,因为这时胎鼠全身循环还未形成,由卵黄囊供应后部营养,毒物只作用于后部;第10天给予大鼠引起死亡,因为此时大鼠全身循环已经形成,毒物作用于全身。

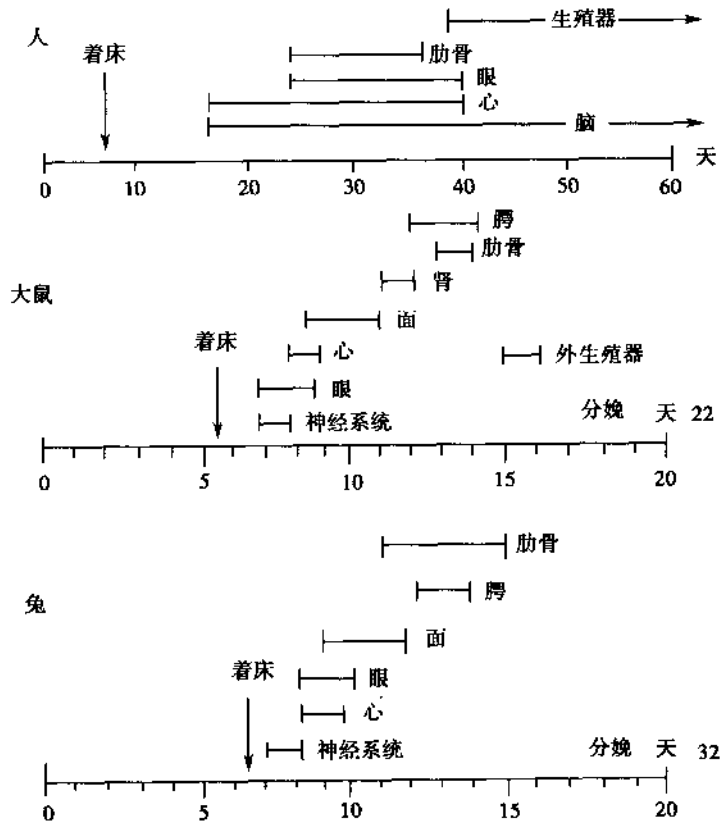


图9-1 人、大鼠和兔致畸敏感期的比较

### (三) 胎儿期

器官形成结束(以硬腭闭合为标志)后即进入胎儿期(人类从第56~58天起),直到分娩。胎儿期以组织分化,生长和生理学的成熟为基本特色,这一过程一般在器官形成完成之前就开始并持续到出生后的生长期。在胎儿期接触发育毒物很可能对生长和功能成熟产生效应。如免疫系统、中枢神经系统和生殖器官的功能异常,包括行为的、精神的、运动的缺陷和生殖力降低等。这些临床表现出生前不明显,需要出生后对子代仔细观察和测试。某些结构变化在胎儿期也能发生,但是这些通常是变形(干扰先前正常的结构)或异常而非畸形。在胎儿期毒性暴露的一些效应可能需要多年才变得明显。所以,胎儿期外源化学物的不良作用主要表现为:全身生长迟缓、特异的功能障碍、经胎盘致癌和偶见死胎。

### (四) 围生期和出生后的发育期

研究较多的是发育免疫毒性、神经行为发育异常和儿童期肿瘤。

妊娠期或围生期接触某些外源化学物,会严重影响出生后T细胞、B细胞和吞噬细胞的发育、迁移、归巢和功能。可能暂时或永久地损伤机体的免疫系统。如,氯氰菊酯诱导儿茶酚胺释放介导T细胞迁移和归巢,引起胸腺细胞分布和功能改变;干扰某些细胞因子的产生和释放;损伤IL-2和IL-2的产生并影响其导致的胸腺细胞增殖。引起子代胸腺细胞数量减少,ConA诱导的T细胞增殖受抑制。

许多化学物具有发育神经毒性,表现为对感觉、运动、自主和认知的影响。如妊娠期饮酒造成的乙醇综合征胎儿(FAS),出现包括小头、颅面畸形,子宫内和出生后生长迟缓,精神、运动和智力发育滞后,智商低(平均IQ 68并且随时间几无变化),终身神经行为紊乱等神经发育异常。人在出生前后从母乳、空气、食物、环境、玩具中摄入铅,会引起幼儿认知功能发育和学习障碍。父母亲吸烟(烟碱)可改变胎儿中枢神经系统烟碱受体发育,增加出生后的学习、行为和注意力障碍;还引起自发流产,增加婴儿突然死亡综合征(SID)和低出生体重的危险。妊娠期接触人类致畸物抗惊厥药丙戊酸盐的妇女,生育脊柱裂的孩子的预期危险是1.2%。

围生期是一生中对致癌物最敏感的时期,因为这一时期细胞增殖快,药物代谢酶的个体发生不全,免疫监视功能低,许多儿童期高发的肿瘤(急性淋巴细胞性白血病、神经母细胞瘤、骶骨前畸胎瘤、胚性腺肌瘤等)都可能与出生前因素有关。动物实验已证明,孕期接触能诱发子代肿瘤高发的所谓发育致癌物已有30多种,如亚硝基化合物。5岁以下儿童在家庭内接触菊酯类和有机磷类杀虫剂,脑癌相对危险度增高,且与母体经食物摄入亚硝酸盐量有关。所以,儿童肿瘤的发生与出生前和出生后的接触有关。

## 三、母体毒性与发育毒性

母体毒性是指化学毒物对孕母产生的损伤作用,表现为增重减慢、功能异

### (一) 母体因素对发育毒性的影响

母体毒性(maternal toxicity)是指化学毒物对孕母产生的损伤作用,表现为增重减慢、功能异



常、临床症状,甚至死亡。目前常常用增重减慢和死亡率来表示。虽然所有的发育毒性最后一定起因于细胞水平对孕体的损伤,但是,可能是直接对孕体的效应,间接通过对母体及胎盘的毒性,或直接、间接效应的组合毒性。

1. 遗传学 孕母的遗传结构已知是孕体发育结果的一个决定因素。如唇腭裂[CL(P)]的发病率依赖于母体的而非胚胎的基因型,白人中的发病率比黑人中更高。在两个相关的小鼠品系 A/J 系和 CL/Fr 系中,自发 CL(P)率分别为 8%~10% 和 18%~26%。

2. 疾病 母体未控制的糖尿病,某些母体的感染,经过间接的疾病相关的母体变化或直接经胎盘的感染对孕体有不利的影响。如巨细胞病毒感染与胎儿死亡,小头畸形,心智发育延滞、盲目和耳聋有关联。过高热是实验动物的强致畸因子,在人类妊娠最初三个月内母体发热与中枢神经系统畸形有关。

3. 营养 蛋白质、热量、维生素、微量元素及酶辅因子的缺乏已知对妊娠有不利的影响。美国医学研究会(MRC)的研究发现,有生育神经管缺陷(NTDs)婴儿危险的妊娠妇女,补充 4 mg 叶酸可减少 NTD 复发超过 70%。

4. 应激 不同形式的母体毒性可能通过诱导生理学的应激反应产生发育毒性。如,妊娠大鼠和小鼠对贯穿妊娠期的噪声应激可产生发育毒性。

5. 对胎盘的毒性 胎盘是母体和孕体进行物质交换的结构,提供营养,气体交换和废物移出。胎盘也产生维持妊娠的关键的激素,而且能代谢和(或)储存外源化学物。胎盘也可能是毒作用的靶。对胎盘的毒性可能危及这些功能和产物,或促进对孕体的有害效应。

## (二) 母体毒性与胚胎毒性的关系

最常见的有以下几种:

1. 具有胚胎毒性,但无母体毒性 表示致畸作用有特定的机制,与母体毒性无关。如反应停。这类化学物最容易被忽视也最危险。

2. 出现胚胎毒性也出现母体毒性 尤其是当发育毒性只在母体毒性存在时才能被观察到的时候,效应可能是间接的,往往不具有特定的致畸机制。许多已知的人类发育毒物,包括乙醇和可卡因,主要在母体毒性水平对胚胎/胎儿有有害影响,他们的发育毒性可能部分归咎于母体生理学的紊乱的继发效应。如嗜酒者通常营养状态不良,而且酒精影响胎盘的营食物转运,可增强对孕体的直接效应。

3. 具有母体毒性,但不具有致畸作用 这类物质在妊娠期很容易引起警觉,避而远之。

4. 在一定剂量下,既无母体毒性,也不表现胚胎毒性。

## 四、发育毒性的剂量-反应模式和阈值的概念

\*\*\*\*\*

### (一) 发育毒性的剂量-反应模式

在出生时观察到的出生以前暴露的发育毒性效应主要是胚胎致死,畸形和生长迟缓。其剂量-反应(效应)关系十分复杂,并且因化学物的类型,暴露的时间和剂量而改变。主要有以下三类(见图 9-2):

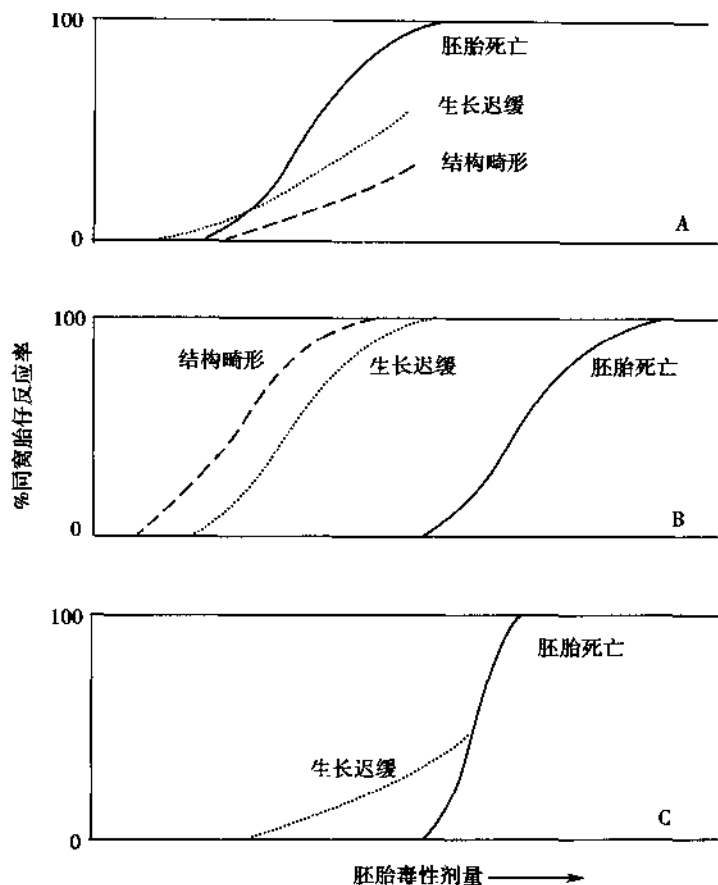


图 9-2 发育毒性的剂量-反应模式

1. 除了在较高剂量几乎全窝胚胎死亡外,正常胎、生长迟缓和结构畸形同时存在这一类型较常见。对某些化学物,低剂量导致生长延迟,随剂量增加导致畸形和致死,这些终点能代表逐渐增加的毒性效应。

2. 在远低于胚胎致死剂量下即可出现致畸,甚至全窝致畸。致畸胎儿常有生长迟缓。当剂量增加到远远超过全窝畸形时才出现胚胎死亡,后者的剂量范围常与明显的母体毒性剂量范围重叠。这种模式表示受试物有高度致畸作用,较少见。

3. 有生长迟缓和胚胎致死但没有畸形发生。往往生长迟缓首先出现,曲线较平缓,较大剂量才出现胚胎死亡,其曲线较陡,近于“全或无”。表明胚胎的存活有明显的界限值。出现这种曲线时,应在开始生长迟缓到致死的剂量之间多设几组重复实验,以确证无畸形。除非被证明,是由于结构畸形而造成死亡,这类化学物可被认为是具有胚胎毒性(包括胚胎致死性)的,但不是致畸性的。

## (二) 发育毒性的阈值的概念

因为哺乳动物的胚胎有高恢复健康的生长潜力、细胞的自我平衡的机制、母体的代谢的防

卫、哺乳动物的发育毒性通常被认为是一种阈值现象。假定的阈值低于它就不会发生有害效应的母体的剂量。

但是,发育毒性是否有阈值还有争论。首先,很难用实验找出一个发生率很低的剂量-反应关系,因为那需要极大的样本数,如每剂量组几百到几千窝的动物;第二,多数发育毒性机制还不了解,有的已知机制支持阈值的存在,而有些机制则不支持。甚至有人提出,基因突变导致异常发育,理论上,如果一个分子能到达胚胎中的一个原始细胞,一次击中一个关键的基因,导致一个点突变,就可能导致基因产物的有害改变和必然发生异常的发育。

在人类健康的危险评估中,考虑个体的阈值和群体的阈值之间的区别是重要的。人群内的差异很大,人群的阈值决定于人群中最敏感个体的阈值。

### 第三节 致畸(发育毒性)作用机制

发育的特点是在大小、生物化学和生理学、形态和功能方面的变化。这些变化受到管理基因转录的因素调节,这些因素在胚胎的基因组中使调节基因活动,而且连续的基因激活作用次第持续贯穿发育。现在,细胞间和细胞内对正常发育所必要的信号传导路径已被阐明,已知它们依赖于转录、翻译,以及翻译后(如,磷酸化作用)的调控。

化学毒物对发育损伤的机制十分复杂,多数还不清楚。Wilson(1977)提出了畸形发生的9种机制,包括突变、染色体断裂、有丝分裂改变、改变核酸完整性或功能、减少前体或底物的补给、减少能源支持、改变膜特性、渗透压不平衡和酶抑制作用。近年来在分子水平的研究有很大的进展,虽然胚胎有代偿机制弥补外源性化学物的影响,但是,是否产生畸形依赖于在致病过程中的每个步骤在损伤和修复之间的平衡。

1. 干扰基因表达 某些基因的表达受到抑制或异常表达可能引起畸形。如有报道在培养的小鼠胚胎中用反义寡核苷酸探针抑制原癌基因 Wnt-1 或 Wnt-3a,都可产生中脑和后脑,或中脑、后脑和脊髓的畸形。剔除 Wnt-1 基因的突变小鼠也可产生中脑和后脑的畸形。反之,如向小鼠胚胎中加入鸡的  $\beta$ -肌动蛋白启动子时,Hox-1.1 基因表达,并产生多种颅面部和颈椎的畸形。

2. 基因突变与染色体畸变 已发现诱变原有潜在致畸性,如电离辐射、烷化剂、亚硝酸盐、多数致癌物都可能致畸。实验证明,妊娠第 13 天的大鼠胚胎羊膜内注入 CP 及其两个代谢活化的致畸性产物 PM 或 AC 后,CP 和 AC 引起了脑积水、露眼、腭裂、小颌畸形、脐疝、尾部和肢部缺陷;而 PM 仅仅引起脑积水,尾部和肢部缺陷。 $^3\text{H}$  标记 CP 的实验显示大约 87% 的放射性与蛋白质结合,5% 与 DNA 结合,8% 与 RNA 结合。使用碱洗脱,证实 CP 和 PM 引起单链 DNA 断裂,以及 DNA-DNA 和 DNA-蛋白质交联。进一步的实验证实:PM 的一个单功能烷化衍生物,有能力产生单链断裂但无 DNA 交联作用,引起了和 PM 一样的效应谱;而 PM 的一个非烷化衍生物(CP 类似物)和 AC 不引起 DNA 损伤。AC 易与蛋白质结合,而 PM 易与 DNA 结合。PM 和 AC 对培养中的肢芽有明显的不同效应。这些结果提示 PM 和 AC 在胚胎中有不同的靶,PM 对 CP 诱导的 DNA 损伤有责任,而 AC 可能通过与蛋白质结合而致畸。

有报道染色体畸变占人类发育缺陷原因的 3% 左右。这数字可能比实际低得多,因为常染色体数目的过多或缺少常常使胚胎死亡,难以发现或未作检查。而生殖丢失占很大比例。现在,

大量的研究已证实,自发流产的胚胎中至少 50% 存在染色体畸变(主要是不分离)。电离辐射,病毒以及能引起染色体畸变的某些化学毒物都有致畸作用。

3. 损伤细胞和分子水平的翻译 细胞增殖对发育显然是必要的。细胞增殖率在个体发生过程中空间和时间都在变化,在胚胎中细胞增殖、分化和凋亡之间有精致的平衡。用 CP 处理妊娠第 10 天大鼠,引起胚胎的 S-期细胞周期阻断,在细胞迅速增殖区域观察到细胞死亡。细胞周期长度的不同可能部分地影响敏感性。如:胚胎的神经上皮对 CP 诱导的细胞死亡相当敏感,而心脏有抵抗力。第 10 天大鼠胚胎神经上皮的细胞周期时间大约为 9.5h,而在心脏中的细胞周期大约是 13.4h,这是由于心脏细胞比神经上皮有更长的  $G_0/G_1$  期。对 DNA 的损伤可在  $G_1$ -S 转换时、S 期和  $G_2$ -M 转换时抑制细胞周期的进展。CP 诱导 DNA 损伤可导致细胞周期混乱和特定的细胞群体中的细胞死亡。如果 DNA 损伤被修复,细胞周期能恢复正常,但如果损伤太广泛,或细胞周期抑制太久,可能引发凋亡。在全胚胎培养中使用活化的 CP 也观察到相似的胚胎细胞周期阻断和细胞死亡。

4. 细胞凋亡 细胞凋亡,又叫程序性细胞死亡,指胚胎中在遗传基因的控制之下的特定类型的细胞死亡。凋亡对来自原基的结构造型是必需的。有不少致畸物,如细胞生长依赖激素、乙醇、抗癌药物都能促进细胞凋亡。

在凋亡中起一定作用的基因在不断增长。p53 基因,有肿瘤抑制基因的作用,能促进凋亡或生长停止。在正常的发育期间出现的凋亡不需要 p53 基因,例如,有 p53-缺陷的胚胎能正常发育。然而,p53 可能在对 DNA 损伤的反应中对导致生长停止或凋亡有重要作用。如,与正常纯合子(+ / +)的对照相比较,在杂合子 p53 缺陷(p / +)妊娠小鼠的子代中,苯并[a]芘引起的胎儿吸收和产后死亡的发病率分别增加了 3 倍和 10 倍以上。生长因子和一些细胞因子(IL-3, IL-6)能预防 p53-依赖的凋亡。

c-myc 产物的表达使 DNA 持续不断地合成,而面临 DNA 损伤时它可能促成凋亡。Bcl-2 有作为凋亡的阻遏物的功能和与类似物 Bax 结合的功能,Bax 可与它自己或与 Bcl-2 成为二聚物。Bax 同型二聚体促成细胞死亡,Bcl-2/Bax 异型二聚体抑制细胞死亡。

已证实,致畸因子过高热、环磷酸胺或硝酸盐处理着床后的小鼠胚胎,在一些胚芽组织中与凋亡一起导致 DNA 断裂,caspase-3 的活化和多聚(腺苷酸二磷酸-核糖)聚合酶(PARP)的分裂。这些因子还能引起胚胎线粒体的改变而造成细胞色素 C 的释放,并造成 caspase-3 上游的活化因子 caspase-9 的活化。

5. 干扰细胞-细胞交互作用 反应停的代谢活化产物引起胚胎细胞的粘接受体(adhesive receptors)下调,阻碍发育过程中细胞与细胞和细胞与基质之间的相互作用,干扰了细胞之间的通讯从而导致肢芽结构异常。

6. 通过胎盘毒性引起发育毒性 已知对卵黄囊或绒毛膜尿囊胎盘有毒性的毒物有 46 个,包括镉(Cd)、砷或汞、香烟、乙醇、可卡因、内毒素和水杨酸钠等。如 Cd 在妊娠中晚期通过引起胎盘毒性(坏死,减少血流)和抑制对营养物质的传送导致发育毒性。

实验发现,在妊娠晚期大鼠体内注入 Cd 造成胎儿死亡,但几乎没有 Cd 进入胎儿体内,而是在 10h 内伴随子宫胎盘血流减少发生胎儿死亡;如胎儿直接注射 Cd,尽管胎儿的 Cd 负荷比母体给药后高几乎 10 倍,胎儿死亡仅只有轻微增加。此外,Cd 可在胎盘诱导金属结合蛋白(或称金属硫蛋白,MT),而 MT 对 Zn 有高亲和力,可在胎盘中结合 Zn 而干扰 Zn 转移通过胎盘。Cd

的理化性质与必需元素锌(Zn)相似,可竞争性抑制人类通过胎盘微泡吸收 Zn 跨膜转运,以及竞争性地在胎盘中抑制其他的 Zn 依赖的过程。联合给予 Zn 可以改善 Cd 的发育毒性。

7. 干扰母体稳态 二氟苯水杨酸,引起兔的中轴骨骼缺陷。其发育毒性剂量引起严重的母体贫血并损耗红细胞 ATP 水平。妊娠第 5 天给单剂量的二氟苯水杨酸引起持续到第 15 天的母体贫血,而这正是缺氧引起类似的中轴骨骼缺陷的关键日子,胚胎中血药浓度低于母体的血药峰水平的 5%。因此,二氟苯水杨酸对兔的致畸性或许是由于母体的贫血造成缺氧的结果。

苯妥英在实验动物中能影响母体的叶酸代谢致畸。孕第 10 天,易感的 A/J 小鼠的心率剂量依赖性地被苯妥英降低,实验性给氧可减少小鼠中苯妥英的致畸性;而抗性的 C57B1/6J 小鼠心率不降低。因而认为,畸形与母体的心率降低和胚胎的缺氧有关。

减少子宫的血流被认为是羟基脲引起致畸的一种机制,它提高收缩压,改变心率,减少心输出,严重地减少子宫的血流,而且在妊娠兔中增加血管的阻力,给药后胚胎立即显示颅面和心包出血。而通过夹紧妊娠兔子官血管 10min 可引起同样的胚胎异常。

MT 合成可被包括金属、酒精、胺基甲酸乙酸、内毒素、烷化剂、高或低血糖和电离辐射等许多化学和物理因素诱导,也可被糖皮质激素和某些细胞因子等内源性调节剂诱导。MT 合成的诱导可导致孕母肝 MT 浓度大大高于正常,降低血浆 Zn 浓度,进而使孕体可利用的 Zn 减少、Zn 缺乏而导致发育毒性。这已为多种不同的化学物包括内戊酸、6-巯基嘌呤、乌拉坦、乙醇和常春藤皂甙的实验所证实。

孕妇缺乏代谢前体或基质也是致畸机制之一。膳食中某些营养素缺乏,特别是维生素和无机盐类缺乏易导致生长迟缓、致畸或胚胎死亡。我国因孕期母体缺碘或新生儿期缺碘,导致的智力低下儿童近 1000 万。所以政府推广食用加碘盐。

8. 内分泌干扰作用 激素具有对内环境稳定的维护和发育过程的调节作用。内分泌干扰物为干扰激素的制造、释放、传送、代谢、结合、作用或排除的外源性因子。包括杀虫剂、除草剂、杀菌剂、塑化剂、表面活性剂、有机金属、卤代杂环烃、植物雌激素等。由于激素在许多组织中有指导分化的关键作用,发育中的生物体对有激素或抗激素活性的化学物尤其敏感。内分泌干扰物至少通过四种干扰内分泌系统的作用模式引起发育毒性:①作为类固醇受体的配体起作用;②改变类固醇激素代谢酶;③扰乱下丘脑-垂体激素释放;④通过目前还不清楚的模式作用。

典型的例子是己烯雌酚(DES),在小鼠中导致包括雄性和雌性生殖道和脑畸形的发育毒性。雌性子代出现不育,输卵管、子宫、子宫颈和阴道的结构异常和卵泡的损耗和畸形;雄性子代可表现出尿道下裂,精子形态学和运动性异常,生殖道损害(包括隐睾症和睾丸癌),不育等。在发育期暴露抗雄激素物质主要显示男性异常,包括尿道下裂,保留乳头,睾丸和副性腺重减少,精子产生减少。

## 第四节 发育毒性和致畸作用试验与评价

评价化学毒物对后代的安全性,可以通过进行环境流行病学调查,动物发育毒性试验和体内外替代试验而获得。化学毒物结构与活性资料也对安全性评价有一定帮助。

## 一、动物发育毒性试验

动物毒性实验的优点在于容易控制接触条件、接触动物数量、年龄、状态以及选择检测效应指标(终点),甚至一些轻微的效应。对新的化学物或产品,不可能进行流行病学研究,首先靠动物实验来预测它们的生殖发育毒性。但是,动物实验结果外推到人存在不肯定性(参见安全性评价)。

1966年,美国FDA提出人体使用药物生殖毒性安全性评价的三段试验。美国FDA,欧洲和日本三方经过多年多次的国际协调会和众多科学家的协作科研,1993年和1995年成功地产生了新的改进的、已为国际接受的试验程序——检测人用医药产品生殖毒性的ICH三阶段实验指南。提供了动物种(系)选择,给药途径,剂量水平,给药次数和间隔,暴露期间,实验的样本大小,观察技术,统计分析和报告要求的指南。程序的改进包括将给药期延伸到发育的较早或较后的时间点,将观察期延伸到出生后并且选用较复杂的终点。美环保署1998年发布了一个改进的发育神经毒性的大鼠试验的程序,包括观察出生后的生长,青春期的发育界标(包皮腺分离,阴道开口),直到出生后第60天不同年龄的运动性,听觉惊愕,学习记忆和神经病理学的发育标记。研究的目的在于明确受试物是否有生殖发育毒性,而且要在已知其具有发育毒性时,确定其对后代的NOAEL及剂量-反应关系。我国的规范基本仿效它们。

决定研究方案的主要有:受试化学物的预期使用与生殖的特殊关系;物质的类型和预期给药途径;任何已知的毒性、药物动力学以及同其他化学物结构或活性相似性的资料。有些药物可能在一生中仅用一次(如诊断性药物、术前用药),则不必长期低剂量持续染毒,可采用缩短染毒时间的方案,并采用较高剂量。就雌性个体而言,如果不可能妊娠期用药,则不必试验。仅限于女性使用的药物,如口服避孕药,则一阶段不进行雄性染毒;对绝大多数药品三阶段试验已足够了;食品添加剂、环境污染物(如农药),则要求多代实验。

最佳联合方案是对成年动物进行染毒并包括子代从受精卵到性成熟所有生长发育阶段;观察期应贯穿一个完整的生命周期,以检测近、远期效应。最常选用的方案为三阶段试验:

I阶段试验:雌雄性交配前-受孕-雌性受精-雌性着床期间染毒,研究对成年雌雄性的生殖功能、配子发生及成熟、交配行为、受精、着床前的发育和着床的影响;

II阶段试验:从着床到硬腭闭合期间染毒,研究对成年雌性生殖功能、胚胎发育、器官形成期的发育毒性。

III阶段试验:从着床到幼仔断乳期间对孕母(及乳母)染毒,研究包括从着床到子代性成熟的母体生殖毒性(成年雌性生殖功能:妊娠、分娩和哺乳)和子代的发育毒性(胚胎、胎儿生长发育,新生幼仔宫外生活的适应性,断乳前后的生长发育,独立生活能力和性功能成熟)。

此外,发育毒性的信息可以从多代动物试验中获得。

## 二、流行病学研究和人类的证据

\*\*\*\*\*

### (一) 人类证据的获得

可以用流行病学方法来研究环境发育毒物对人类发育的影响,包括其性质、程度以及原因。

在某些罕见的病例中,例如德国麻疹所致先心病、反应停所致短肢畸形,危险相对较高,而且结局是罕见的,可能不需要正式研究就可以识别异常出生结局的原因。在其他的情况下,对老污染物或老产品只能采用回顾性或横断面调查,除非人群接触剂量很大(如事故性接触——20世纪80年代发生在印度博帕尔联合碳化公司的毒气泄漏事故,使污染区妇女流产率比对照区高4.3倍,新生儿死亡率高4.1倍),这类调查较难获得明确的结论。要发现危险的增加,需要正确发现异常结局和相关的暴露,需要足够大的效应和研究人群。这对流行病学家是困难的。据估计要发现有统计学意义的增加,需要对超过100万的出生进行监测。另外,人类妊娠损失的高百分比可能使与某一特别暴露有关的妊娠失败难以在一般的人群中被发现。而且,由于出生前诊断的可行,畸形胚胎(特别是神经管缺陷)的妊娠被选择性流产。因此,在出生时异常结局的发生率不能反映异常的真实比率。其他的困难还包括同质性,记录的熟练和记录的混淆。一个异常结局可能被不同的记录单位作出不同的描述。如尿道下裂的男婴可能被误认为女婴。定义和命名法的不一致可能造成记录困难,而要确定或回忆与异常生殖结局有关的暴露情况也是有困难的。通常可正确地测定和回忆出生体重,但是自发流产和某些畸形则不能。此外,母亲的年龄和产次、饮食因素、疾病、药物使用和社会特性等因素也有影响。

病例报告和出生缺陷监测登记对获得对人类的发育毒性证据是有用的。Schardein 曾经对28个人类化学致畸物的动物和人类证据进行了综述。其中23个是人类的病例报告提出了第一证据。如:己烯雌酚和锂的病例报告很快就被出生缺陷登记证实,而甲基汞和乙内酰胺类得到了随后的流行病学研究的支持。有四种化学物:酒精、多氯联苯、卡马西平和可卡因是分析流行病学的研究提供了第一手的人类的证据。而化学物丙戊酸的证据首先来自于对出生缺陷登记的分析。总之,其中的11个人类化学致畸物,发育毒性的人类证据领先于发表的动物证据。现在人类的基因组计划已完成,出生缺陷的遗传感受性差异的信息被越来越多地成功获得。对环境诱导的出生缺陷感受性的遗传基础的了解不但在危险评估中提供了更多的考虑,而且也将导致更好地理解发育毒物的作用机制。

## (二) 发育毒性资料的使用

使用发育毒性资料要注意的是,药物的摄人是自愿的,通常是高剂量的;而对环境化学物(食品添加剂、农药以及环境污染物等)的暴露通常是非自愿的、低水平的。

国际生命科学研究所(International Life Sciences Institute, ILSI)1989年根据动物试验中发育毒性效应的类型、严重性和发生率将化学物分为四类,并规定各类型的不同的安全系数范围(表9-1),用以评定待测物发育毒性的危险度。

1. 药物 根据药物对人类的孕体造成危险的证据,美国FDA(1979)对于药物在妊娠期的使用采用字母A、B、C、D和X来进行等级评定,分类管理。ICH人类用药危险度分类研究设计中也有类似规定。要求医生按规定开处方,使妊娠妇女按规定使用这些药品。妊娠期用药类别见表9-2。

A类表示在妊娠人群中控制良好的研究未能证实有危险。

X类表示在妊娠期用药是不当的。即在动物或人的研究中,或进入市场后的报告已证实:对胎儿的危险比患者任何可能的受益更重要。

C类是默认值,表示危险不能够被排除。表示缺乏人的研究,而动物研究缺乏或是阳性,但

是药物对患者的好处可能证明潜在的危险是值得的。

表 9-1 致畸化学物的分类

| 基 准                   | A 类      | B 类              | C 类       | D 类      |
|-----------------------|----------|------------------|-----------|----------|
| 1. 最小母体中毒剂量与最小致畸剂量之比值 | 远大于 1    | 大于 1 或两剂量间有很大重叠  | 小于 1      | 母体中毒时无致畸 |
| 2. 畸胎率                | 高,与剂量有关  | 高,与剂量有关          | 低,但与剂量有关  | -        |
| 3. 较低剂量时畸形的类型         | 有特定的器官系统 | 一般为多发性,也可能有特定的特点 | 无特异性,广泛多发 | -        |
| 4. 靶细胞                | 特定细胞     | 特定细胞             | 泛化、非特定细胞  | 不详       |
| 5. 安全系数范围             | ~400     | ~300             | ~250      | ~100     |

表 9-2 妊娠期用药类型

| 人群研究结果 | 动物实验结果         |       |                |
|--------|----------------|-------|----------------|
|        | +              | -     | 无可用资料          |
| +      | X 或 D          | X 或 D | X 或 D          |
| -      | B              | A     | A 或 B          |
| 无可用资料  | C <sub>1</sub> | B     | C <sub>2</sub> |

B 类和 D 类分别代表与危险的关系相对地较小或较大。

A、B、C 类:仅在明显地需要时,或证明可能受益与对胎儿可能的危险比较是可取时,在怀孕期间可以使用。D 类:如果在怀孕期间使用,应通知病人对胎儿可能的危害。X:在怀孕或可能怀孕的妇女中禁止使用。

2. 环境化学物 对于环境化学物,发育毒性的危险性评价程序的目的通常是要得出一个 NOAEL,考虑安全的多变性或不确定因素,最终得出对人假定是相对安全的暴露水平(参见危险评估)。要注意的是,与成人相比较,孩子们的毒物接触状况不同,如在地上爬、吃手和其他物体,在高灰尘和污垢中游戏等。同时,孩子们正在成长和发育,更易受到有害影响。因此,1996 年,美国食物质量防护行动(FQPA)考虑到来自不同来源的同一毒物通过共同的作用模式的联合接触,以及内分泌干扰作用的累积效应,在利用动物实验得到的 NOAEL 为孩子计算允许摄入量时,除了考虑其他的不肯定因素外,额外增加了 10 倍的安全系数。

3. 确认人类致畸物的标准 Wilson 曾提出确认人类新的致畸物的标准如下:

- (1) 某种特异的缺陷或几种缺陷综合征的发病率突然增加。
- (2) 缺陷的增加与某种已知的环境改变,如某种新药的广泛使用巧合。
- (3) 已知在妊娠的特殊阶段接触环境的改变,产生有特征性的缺陷综合征。
- (4) 缺少妊娠时引起特征性缺陷婴儿产生的其他普通因子。



### 三、发育毒性的替代试验

用动物试验来检测、研究化学毒物的发育毒性既费钱又费时间。多年来许多研究者一直在寻求简单、快速的体内、外试验方法,用来评价化学毒物的发育毒性和(或)探讨其作用机制,迄今还没有满意的方法,因为发育毒性涉及亲代两性,从配子到下一代出生的多个发育阶段,不能只用一、二种方法去回答这么复杂的毒性问题。这些替代试验的验证仍然是主要的和迄今无法解决的问题,缺乏公认的标准,来自试验的敏感性的意义和对结果的特异性的评价都有疑问。已知的胚胎形成的复杂性和潜在的发育毒性机制和靶位置的多样性,期望有一个单一的,或者甚至大体上用一小套对活性化学物精确地预筛的试验也许都是不切实际的。

这类试验主要是哺乳动物或非哺乳动物的体内、外细胞、组织、器官培养。近年进行过较广泛的确认研究的主要有三个体外的胚胎毒性实验:大鼠全胚胎培养试验,大鼠胚胎肢芽微团实验和小鼠胚胎干细胞试验。这些试验不论是作为相应的筛选试验还是用于解释发生机制的研究,均可与整体动物试验相结合,提供有价值的资料并间接减少所用动物的数量。然而,由于缺少与发育过程一致的复杂性和母代与发育个体之间互动的动力学机制,这些试验并不能肯定某种效应的存在,对危险/暴露评价的意义不大,不能替代整体动物生殖毒性检测试验,不属于产品登记必须资料之列。

#### (一) 大鼠全胚胎培养

大鼠全胚胎培养(whole embryo culture, WEC)是从孕期第9~10天大鼠子宫取出胚胎,剥去 Reichert 膜,放入培养液中加入受试物,在含 O<sub>2</sub>、CO<sub>2</sub>、N<sub>2</sub> 环境中,旋转培养。观察胚胎发育情况,记录胚胎存活,检测胚芽、卵黄囊直径、体节和体长等。以胚胎的心跳和血液循环是否存在作为胚胎存活的指标;以卵黄囊直径、颅臀长和头长、体节数和胚胎重作为胚胎生长发育的指标;根据 Brown 评分对器官形态分化作出评价。可以筛试化学物的发育毒性、探讨其剂量反应关系和作用机制。

#### (二) 胚胎细胞微团培养

胚胎细胞微团培养(micromass culture)是从第11天的大鼠胚胎取得代表 CNS 的原代中脑细胞微团、肢芽区或其他区的细胞微团,在培养瓶中分别加入不同浓度的受试物共同培养5天;用中性红染色判断细胞存活;用 Alcian 蓝染色判断肢芽软骨细胞分化数量;苏木素染色判断 CNS 细胞分化数量。对结果进行处理,求出影响终点的 IC<sub>50</sub>。比较受试物组与对照组数据,评价化学毒物的细胞毒性和发育毒性。

#### (三) 小鼠胚胎干细胞试验

小鼠胚胎干细胞试验(the mouse embryonic stem cell test, EST)是将小鼠胚泡内细胞团衍生的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES 细胞)在特定条件下,可定向分化为机体多种细胞,因此可作为生物测试系统,用于哺乳动物细胞分化、组织形成过程的发育毒性研究。

其中,采用体外长期培养的细胞系进行的试验中,目前较成熟的 ES 细胞是小鼠 ES 细胞株

D3, 它可分化成各种类型的细胞, 包括: 心肌细胞、内皮细胞、胰岛细胞、神经细胞等。其优点是: ①利用建立的细胞株作为研究对象, 而不用剖杀怀孕动物; ②胚胎干细胞具有定向分化为多种细胞的潜能, 对模拟早期胚胎发育具有很强的代表性。其中一个实例是 ES 细胞分化成心肌细胞的 EST。该试验同时采用 D3 和小鼠已分化的成纤维细胞株 3T3。其中: D3 用于评价染毒后分化成为心肌细胞的能力; D3 和 3T3 用于比较分析细胞的存活能力。

#### (四) 发育毒性的体内预筛试验(C. K 试验)

1982 年由 Chernoff 和 Kavlock 改进的用于预筛发育毒性的体内试验得到了较体外试验更大的接受度。其原理是: 大多数出生前受到的损害将在出生后表现为存活力(存活率)下降和(或)生长迟缓。因此对妊娠动物在主要的器官形成期以接近母亲毒性的有限数量的剂量水平染毒, 待自然分娩后, 通过观察出生后 3 天内的新生仔外观畸形、胚胎致死、生长迟缓等发育毒性表现, 对新生儿代进行外部畸形、生长和生存能力的评估。而不进行传统常规试验中内脏和骨骼的检查, 就可达到筛试的目的。它已被证明对很多的化学物是可靠的, 美国 EPA 在“可疑发育毒物危险度评价指南”(1985)中指出, 在该试验中造成胎仔死亡的毒物应优先考虑进行深入的发育毒性试验, 影响胎仔生长的毒物次之, 该试验结果阴性而且试验设计合理者, 原则上不作进一步的测试。

(胡渝华)

### 第一节 概 述

在人类的生产和生活环境中存在着多种多样的化学物质,既有天然生成的,也有人工合成的。它们一方面为我们创造了大量的物质财富,提高了生活质量,另一方面也给人类健康带来了许多不利的影响。如日本发生的因有机汞污染所致的水俣病,欧洲妇女因服用反应停引起的大量新生儿畸形,印度博帕尔因剧毒物质异氰酸甲酯泄露造成的众多居民中毒死亡等重大不幸事件令世人震惊,一次又一次的给我们敲响了警钟。据估计,目前常用的7万多种化学物质中约有10%左右为致突变物。迄今为止,国际癌症研究所(International Agency for Research on Cancer, IARC)颁布的文集中确定有75种化学毒物或生产过程对人类有致癌性。在这种严峻的形势下,对特定化学物质产生毒害的可能性作出准确的评价,在此基础上制定相关的法律、法规、标准和条例,作为国家行政部门监督执法的依据,对化学品实施有效的管理以保护人民的身体健康和生产生活环境,显得十分重要。为适应此种需要,管理毒理学应运而生并迅速地发展起来。

管理毒理学(regulatory toxicology)是毒理学的一个分支,是将毒理学的原理、技术和研究结果应用于化学物质管理,以期达到保障人类健康和保护生态环境免遭破坏的目的。与其他的毒理学分支不同,管理毒理学需要行政管理机构和毒理学工作者的共同参与和密切合作。在这里,双方的交流和影响是双向进行、相辅相成的。一方面,行政管理部门在很大程度上要依据毒理学工作者提供的毒理学原理和实验数据做出决策。如在确定一组化学物质中哪个优先上市,批准或禁止某种新化学品的生产和使用方面,毒理学安全性评价或危险度评价的结果往往起着决定性的作用。毒理学实验室获得的化学物质毒性资料是行政管理部门制定防治法规和卫生标准时不可缺少的科学根据。另一方面,行政管理部门则通过制定规范、程序、准则对毒理学研究的设计和施行施加重要的影响。如我国颁布的《食品安全性毒理学评价程序》、《农药安全性毒理学评价程序》、《新药(西药)毒理学研究指导原则》、《化学品毒性鉴定管理规范》等,针对不同类别的化学物质提出了相应的毒性鉴定要求和试验程序,规定了从事毒理学鉴定的合格实验室条件和工作准则[如良好实验室规范(good laboratory practice, GLP)],以保证毒理学实验数据的质量,对毒理学试验方法的改进和标准化进程起到了有力的推动作用。

毒理学对于化学物质毒性及其作用机制的认识是逐步深化、不断完善的。以确定对人类致

癌的化学物质、生产过程等为例,1987年IARC公布的为50种,1995年为60种,1999年为75种,2002年为87种,数量不断增加。可见随着新技术的使用和研究的深入,人们对于化学物质本质的认识也越来越深刻,原来认为是安全的化学物质,现在可能发现其具有某种潜在毒性,甚至“三致”作用。另外,在对特定毒物进行研究的过程中,由于研究手段和观察角度的不同,人们会得到不同的实验结果或对相似的实验结果做出不同的解释,对于一些新的发现、新的进展会有不同的看法,以至于产生争论。如在我国就曾发生过有机物能否导致肺尘埃沉着病、儿童血铅浓度达到何种水平可判定为铅中毒的争论。这种学术上的争论不仅允许,而且应大力提倡,因为对于寻求真理大有裨益。行政管理则不然,它的目的是为了规范人们的行为,使之在已制定的法规和标准的允许范围内活动,具有权威性和强制性。故行政管理机构在制定管理文件时,只接受毒理学的基本原理、普遍规律及公认的观点,而不纳入学术上尚存在争议的内容。这使得现有的法规、标准具有相对的稳定性,可以阶段性的、圆满地解决有关化学物质方面的问题,而不致经常改动。只有在执行一定期限后,在掌握了充分的毒理学证据和人群资料的基础上,进行反复研讨才会进行修改,这通常需要数年、甚至数十年时间。

目前,我国行政管理部门对化学物质采用分类分级管理的办法,即对不同类别、不同毒性级别的化学物质采用不同的管理尺度,决定其能否使用及使用的范围、数量和条件。因此,确定化学物质的毒性大小与性质是首先需要解决的问题,也是进行管理的基础。在这里,毒理学安全性评价及近些年发展起来的危险度评价是行政管理部门获得化学物质毒性资料的主要来源,起着关键的作用。

## 第二节 危险度评价

长期以来,安全性评价的结果是政府部门管理化学物质的主要依据,通常是用由动物试验获得的NOAEL除以安全系数(safety factor, SF)来估测人的NOAEL,并在此基础上制订人的每日容许摄入量(acceptable daily intake, ADI)等安全限值。当人接触某种化学物质的量低于其安全限值时,即认为是安全的。如高于其安全限值时,就要采取措施进行干预,以保证接触者的健康。

在20世纪50年代末期,通过对致癌作用的研究,人们发现致突变物和致癌物的效应表现为“零”阈值,即在零以上的任何剂量都可以产生效应。对于这样的物质找不到安全限值,不能用原有的化学物质管理模式进行管理。特别是进入20世纪70年代以后,发现的具有致癌潜力的化学毒物越来越多,而且其中有一些是难以完全消除或经权衡利弊后尚需应用的。有鉴于此,发展了危险度评价的方法,提出了“可接受危险度”的概念。1976年,美国环境保护局(Environmental Protection Agency, EPA)首先提出并推荐了危险度评价系统,公布了致癌物评价指南,并成立了致癌物评价小组。1983年,美国国家科学研究顾问委员会(National Research Council, NRC)任命专门小组制订颁发了危险度评价的程序,将其主要内容和步骤分为四个部分,即危害认定、剂量-反应关系评价、接触评定和危险度特征分析,总称为危险度评价。在此基础上进一步对危险因素进行利弊权衡,作出决策并制订标准和措施的过程称为危险度管理。近些年来,危险度评价的方法发展得很快,不断完善。由于该方法具有可定量、有预测性等优点,其应用范围不断扩大,如美国EPA先后颁布了有关致癌物、致突变物、发育毒物和生殖毒物等一系列危险度

评价指南。危险度评价已成为许多国家对各类化学毒物进行管理的重要手段。

## 一、基本概念

### (一) 危险度与安全性

1. 危险度 危险度(risk)又称危险或危险性,指在特定条件下,因接触某种水平的化学毒物而造成机体损伤、发生疾病,甚至死亡的预期概率。需要指出的是,化学毒物引起中毒危险度的大小与其毒性的大小并非同一概念,要注意两者的区别。有些物质的毒性极大,如肉毒杆菌毒素,极少量即可致死,但实际上人们接触它的机会很少,故罕见中毒者。而乙醇的毒性虽然较小,却有不少中毒病例。因此,一种化学毒物引起中毒危险度的大小不仅取决于它本身的化学结构和理化性质,还取决于人们与它接触的可能性、接触剂量、吸收量、吸收速率与频率等多方面因素。

2. 安全性 安全性(safety)与危险度相反,安全性是指化学毒物在特定条件下不引起机体出现损害效应的概率。实际上,两者是从不同的角度来研究同一问题,即化学毒物与机体接触的结果。从理论上讲,安全性是指无危险度或危险度低至可以忽视的程度。可是人类在日常生活与生产过程中所从事的每一项活动都伴随一定的危险度,并不存在绝对安全或危险度为零的情况,故安全性只是相对的。

3. 可接受的危险度与实际安全剂量 化学物质在一定条件下都可以成为毒物,只要接触就存在中毒的可能性。理论上,只要接触剂量低于特定物质的阈值即没有危险。但实际上,在多种因素干扰下,某些化学毒物的阈值难以精确确定,或是虽然能够确定,但因为经济上的原因无法限制到绝对无危险的水平。尤其是致突变物和致癌物在零以上剂量均有引起损害的可能性,故要求绝对安全是不可能的。由此提出了可接受的危险度(acceptable risk)的概念。可接受的危险度是指公众和社会在精神、心理等各方面均能承受的危险度。表 10-1 显示的是当今美国社会可能引起死亡危险度增加  $10^{-6}$  的某些活动。

表 10-1 美国社会引起死亡率增加  $10^{-6}$  的某些活动

| 活 动          | 死 因 | 活 动         | 死 因  |
|--------------|-----|-------------|------|
| 吸烟(1.4支/d)   | 肺癌  | 驾车旅行 240km  | 车祸   |
| 饮酒(0.5L/d)   | 肝硬化 | 空中旅行 9600km | 飞机失事 |
| 煤矿井下劳动(1h/d) | 煤尘肺 | 在纽约市居住 2 天  | 大气污染 |

就特定化学毒物引起的具体疾病而言,即使从未接触过该物质的人群中也可以出现一定比例的患者。当接触人群中的发病率与非接触人群相比基本一致或略有增高时,即可将该水平的发病率视为这种化学毒物所致人体健康危害的可接受危险度。如美国把  $10^{-6}$  的肿瘤发生率和  $10^{-3}$  的畸胎发生率分别作为致癌物和致畸物作用的可接受的危险度。

实际安全剂量(virtual safe dose, VSD)是指与可接受的危险度相对应的化学毒物的接触剂量。如上例情况,则在此剂量下,致癌物和致畸物引起人群中的肿瘤发生率或畸胎发生率分别不

会超过  $10^{-6}$  或  $10^{-3}$ 。

### (一) 危险度评价

危险度评价(risk assessment)是在综合分析人群流行病学调查、毒理学试验、环境监测和健康监护等多方面研究资料的基础上,对化学毒物损害人类健康的潜在能力做定性和定量的评估,对评价过程中存在的不确定性进行描述与分析,进而判断损害可能发生的概率和严重程度。目的是确定可接受的危险度和 VSD,为政府管理部门正确地作出卫生和环保决策、制订相应的管理法规和卫生标准提供科学依据。

## 二、危险度评价

危险度评价由四个部分组成,即危害认定、剂量-反应关系评价、接触评定和危险度特征分析(图 10-1)。现分别予以介绍。

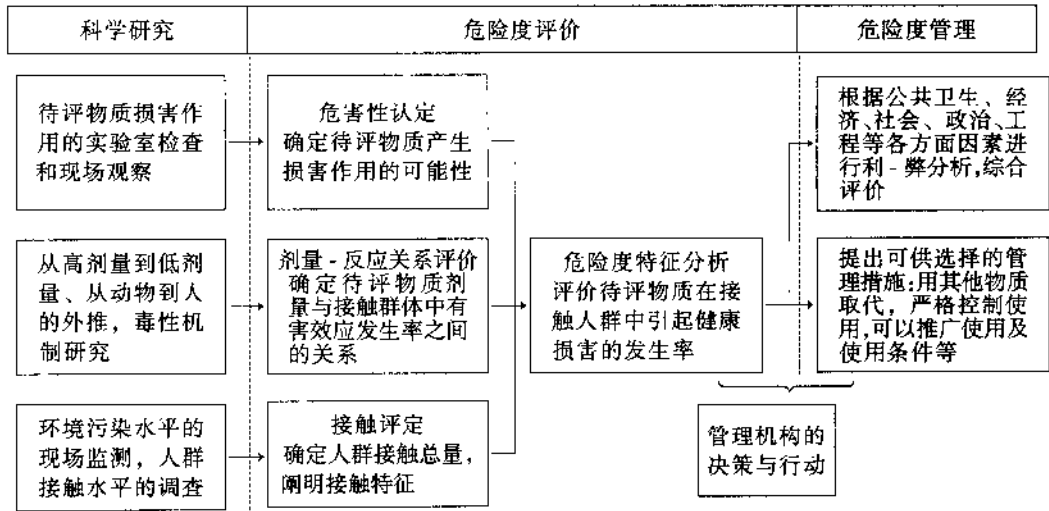


图 10-1 危险度评价与危险度管理的构成

### (一) 危害认定

危害认定(hazard identification)是危险度评价的第一阶段,为定性评价阶段。目的是确定待评化学毒物在一定条件下与机体接触后,能否产生损害效应;效应的性质、特点和强度如何;化学毒物与损害效应之间有无因果关系。

1. 危害认定的科学依据 在进行研究之前,首先要获得足够的相关科学资料作为依据,这是认定的基础。

(1) 待评化学毒物的资料:包括化学结构与理化特性方面的资料,如化学结构式、脂质与水中的溶解度、酸碱度、亲电性、挥发度、纯度、杂质种类及其含量等;有关用途、使用方式和范围等方面的资料以及在环境中稳定性如何,能否发生化学反应或转化为毒性更强或较弱的衍生物方

面的资料等。这些资料一般可以通过查阅有关文献获得或由生产厂家提供,但有时需要经实验室检测确定。结构-活性关系(structure-activity relationship, SAR)的研究对于危害认定可能具有重要意义。因为通过分析化学物质的结构和含有的某些特殊基团常可估测其引起危害的潜力。如N-亚硝基、芳香胺基、氨基偶氮和非核结构等与致癌活性有着密切的关联,对于具有这些组成的化学物质需高度重视其致癌能力的评价。

(2)人群流行病学调查资料:这类资料能直接反映特定化学毒物与机体接触后所造成的损害作用,不像毒理学动物试验结果那样存在种属间外推的问题,故不确定因素较少,易于确定因果关系,在危害认定中具有决定性意义。资料的来源包括在职业性接触人群或环境污染区居民中进行的调查、药物毒性的临床观察、意外事故的原因追查和对志愿人员的试验与检测等。通过这些研究可以获得有关接触者的主观感受以及精神和心理状态方面的资料,在动物试验中无法得到,显得尤为重要。但人群流行病学调查也有不足之处,如很难找到化学物质污染水平稳定,而且含有几个不同污染水平的现场,接触剂量难以准确估计;环境中往往是多种有害因素同时存在,不易控制等。尽管如此,设计周密的人群流行病学调查资料常可为危害认定提供最有价值的科学依据。特别是近年来人类基因组计划的进展使分子生物学标记越来越多的应用于流行病学调查之中,把疾病与机体细胞内的分子改变紧密地联系起来,为阐明其发生机制、探索危害的因果关系提供了有效的手段。接触、效应和敏感性分子生物学标记的应用不仅大大增加了人群调查资料的可靠性,而且有助于减少人群之间、实验动物与人之间资料外推的不确定性。

(3)毒理学试验资料:由于理想的人群流行病学调查资料较难获得,毒理学试验资料常被用作危险度评价的主要依据。毒理学试验最大的优点是可以人为地控制实验条件,排除混杂干扰因素的影响,获得比较确定的受试物与机体损害效应之间的剂量-反应关系和因果关系,在此基础上评价和预测对人体造成危害的可能性。

毒理学试验分为动物体内试验和体外试验两类。在进行动物体内试验时,可根据已掌握的待评化学物质资料选用最敏感的实验动物,确定动物的年龄、性别、各组染毒剂量与染毒方式、染毒期限和观察指标等。通过急性毒性试验,可以确定待评物质急性毒作用的性质、特点及毒性级别;局部毒性试验,能获得待评物质对于皮肤、粘膜、眼等部位的局部刺激作用和致敏作用的资料。较长时间的试验,如蓄积试验、亚慢性毒性试验和慢性毒性试验,可以反映待评物质在体内的滞留情况,寻找毒作用的靶器官并确定NOAEL和LOAEL。致突变试验如骨髓细胞微核试验和显性致死试验可检测待评物质对体细胞和生殖细胞的遗传毒性;致畸试验和长期致癌试验则可评价其对胚胎的毒性及诱发机体生癌的能力。此外,代谢动力学方面的研究可以提供待评物质在体内吸收、分布、代谢和排泄方面的数据,明确时-量关系,有助于阐明毒作用机制并为其他试验研究提供敏感指标。

毒理学体外试验使用包括哺乳动物的组织、器官和细胞,微生物、植物和非哺乳动物等各种层次的多种生物材料进行。如Ames试验、外周血淋巴细胞染色体畸变试验、哺乳动物细胞正向突变试验、V<sub>79</sub>细胞转化试验以及大鼠、小鼠的器官培养等多种试验方法经常被用来筛选待评物质在致突变和致癌方面的能力。

毒理学测试有统一的程序,分几个阶段进行,这样就可以根据不同阶段的结果作出判断,决定研究是否继续下去以及检测指标和项目的取舍。有关内容请参见本章第三节。

毒理学资料用于危险度评价的主要问题是种属差异带来的不确定性。在把动物试验结果外

推至人时,必须十分慎重。

2. 危害性效应的分类 根据待评物质对机体作用的部位、性质和剂量-反应关系类型,可将危害性效应分为两类:有阈值效应和无阈值效应。

(1)有阈值效应:化学物质对于机体产生的一般毒效应,如引起生理生化过程的异常改变、病理组织学的变化等,只有达到某一剂量水平时才能发生,低于此剂量即检测不到,属于有阈值效应,这样的化学毒物应按有阈值毒物进行评价。评价时要注意选择最敏感的指标,特别是应该重视对于中枢神经等系统和肝、肾等重要器官的损害作用。

化学毒物作用于生殖细胞、胚胎或胎儿,导致细胞死亡、生物合成减少、分化程度改变、形态发育障碍,最终表现为胚胎死亡、生长迟缓、畸形和功能不全,视为发育毒性或胚胎毒性。对于此类毒物目前尚缺少权重分类标准,但一般认为有阈剂量存在,故也应按有阈值毒物进行评价。

(2)无阈值效应:目前认为,化学毒物的致癌作用以及致体细胞和生殖细胞突变的作用在零以上的任何剂量均可发生,即具有零阈剂量-反应关系。具体说来,凡属于IARC分类标准中2B组以上的化学毒物,可以认为是致癌物。美国EPA在1986年曾根据致癌资料是否充分将化学毒物分为6级。由于该分类标准存在某些缺陷,1996年又修改为已知对人致癌、可能对人致癌和不可能对人致癌3类。另有无法进行评价的一类,包括资料不充分、资料不完整或无结论、无资料等3级。

## (二) 剂量-反应关系评价

剂量-反应关系评价(dose-response assessment)是危险度评价的第二阶段,又是定量危险度评价(quantitative risk assessment)的第一步。其目的是:在认定待评物质具有危害性的基础上,阐明不同剂量水平的待评物质与接触群体中出现的最为敏感的关键性的有害效应发生率之间的定量关系,确定特定接触剂量下评价人群危险度的基准值(criteria)。

因为多数情况下可用的人群资料有限,剂量-反应关系评价主要是基于动物试验的结果。但由于人类实际接触的化学物质水平往往低于动物试验所设计的剂量下限,故建立由高剂量向低剂量、由动物效应向人的危险度外推的方法成为剂量-反应关系评价的主要内容。

根据待评物质的性质和特点不同,分为有阈值化学毒物和无阈值化学毒物的剂量-反应关系评价。

1. 有阈值化学毒物的剂量-反应关系评价 有阈值化学毒物的剂量-反应关系评价方法即安全评价法。通过评价确定待评物质的NOEL或LOAEL,作为基准值来评价危险人群在某种接触剂量下的危险度,并估算该物质在各种环境介质中的最高容许浓度。

(1)参考剂量(reference dose, RfD):其单位为 $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。

(2)不确定系数(uncertainty factor, UF):即安全系数(SF)。由于人对于多数化学毒物的毒性反应要比动物敏感,在把动物试验结果向人外推的过程中,存在许多不确定因素,会造成误差。尤其是以 $\text{mg}/\text{kg}$ 体重表示剂量时更是如此,故在计算RfD时,应把实验动物的NOEL或LOAEL缩小一定倍数来校正误差,确保安全。这一缩小的倍数即为UF或SF,又称为外推系数(extrapolation coefficient)或转换系数(transfer coefficient)。UF具有保守的性质,可以防止低估有阈值化学毒物对人类健康的危害。



(3) 确定 RfD 时需要考虑的问题: 要确定有阈值化学毒物的 RfD, 应首先对人群流行病学调查资料与毒理学动物试验结果进行分析, 明确剂量-反应关系, 确定 NOAEL 或 LOAEL, 然后用 NOAEL 或 LOAEL 除以不确定系数 UF。UF 又可分为标准化不确定系数  $UF_s$  和修正系数 (modifying factor, MF) 两部分。计算公式如下:

$$RfD = NOAEL \text{ 或 } LOAEL / UF_s \times MF$$

下列几项内容可影响  $UF_s$  的数值:

1) 人群中个体敏感性的变异带来的不确定性, 取 10 倍系数。这是由于毒代动力学与毒效动力学两方面的差异所致, 两者的作用相等。因此, 将 10 倍系数等分为 2 个分系数, 即表示毒代动力学和毒效动力学的系数各为  $3.2(10^{0.5})$ 。

2) 从实验动物资料外推到人的不确定性, 取 10 倍系数。这也是由于毒代动力学和毒效动力学两方面的差异所致。但现有资料证明, 人和实验动物在毒代动力学方面的差异大于毒效动力学方面的差异。所以, 将表示前者的分系数定为  $4(10^{0.6})$ , 将表示后者的分系数定为  $2.5(10^{0.4})$ 。

3) 从亚慢性毒性试验资料推导慢性毒性试验结果的不确定性, 最大可取 10 倍系数。

4) 当以 LOAEL 替代 NOAEL 计算 RfD 时, 最大可取 10 倍系数。

5) 当用于推导的资料库不完整 (如受试物种太少, 缺乏生殖毒性资料等), 最大可取 10 倍系数。

MF 取值为  $< 10$ , 主要考虑研究的科学性以及上面各项未能包括的不确定因素, 如有无作用机制方面的资料、待测物质所致实验动物的损害作用是否与人类相似等。当研究中的不确定因素可由  $UF_s$  予以充分估计时, MF 取值为 1。

如果以上各项均取最大值 10 的话, 其乘积将达到  $10^6$ , 即 100 万倍, 这个数字显然过大。实际上, 美国 EPA 发表的有阈值化学毒物的 RfD 中, 大多数  $UF_s$  为 2~1000。  $UF_s$  太大, 说明毒性资料收集的不完全, 不确定因素过多, 因而计算所得的 RfD 的精确性也差, 缺乏可信度。

(4) 基准剂量 (benchmark dose, BMD): 在计算 RfD 的公式中, NOAEL 或 LOAEL 是关键参数。但它们往往受试验组数、每组实验动物数、各试验组的剂量间隔宽窄、对照组损害效应的发生率高度和实验数据的变异程度等因素的影响, 准确性不高。另外, NOAEL 和 LOAEL 都只是一个试验剂量, 是剂量-反应关系中的一个点值, 不能全面反映化学毒物有害效应的全部特征。NOAEL 或 LOAEL 相同或近似的物质, 其剂量-反应曲线的斜率可能不同, 这就会使推导出来的 RfD 产生较大误差。

用 BMD 来替代 NOAEL 或 LOAEL 计算 RfD 可较好的解决这个问题。BMD 是一个可使化学毒物有害效应的反应率稍有升高的剂量的 95% 可信限下限值。该反应率可以人为确定, 通常选择 1%、5% 或 10%。此时, 计算 RfD 的公式为:

$$RfD = BMD / UF_s \times MF$$

由 BMD 计算 RfD, 较之 NOAEL 或 LOAEL 有许多优点。首先, 它是依据剂量-反应关系曲线的所有数据计算获得的, 而不是仅仅依据一个点值, 在可靠性与准确性上都大大提高了; 其次, BMD 要计算反应剂量 95% 可信限的下限值, 就需要把试验组数、每组实验动物数以及终点指标观察值的离散度等均考虑在内。如果资料的质量不高 (每组受试对象少或反应的变异大), 则可

信限会很宽, BMD 也相应降低, 反映出有较大的不确定性存在, 反之亦然。再有, 对于未直接观察到 NOAEL 的试验结果, 仍可通过计算求出 BMD。BMD 既可通过分组的计数资料获得, 也可通过连续的计量资料获得, 故应用范围更为广泛。

2. 无阈值化学毒物的剂量-反应关系评价 这类化学毒物的致突变或致癌效应在除零而外的所有剂量均可能发生。因此, 进行评价的关键问题是确定低剂量范围内的剂量-反应关系, 在此基础上预测危险人群在特定接触水平下发生癌症的危险度。由于化学毒物的致突变和致癌作用主要靠毒理学鉴定程序来认定, 在把动物实验结果应用于人时, 不仅存在种属差异, 而且存在高剂量向低剂量外推的问题。许多化学毒物在高、低剂量下的毒效应是不一样的。如高剂量的糖精会在尿中析出结晶, 刺激膀胱内皮细胞异常增生, 继而引起膀胱癌, 但低剂量时无此效应。

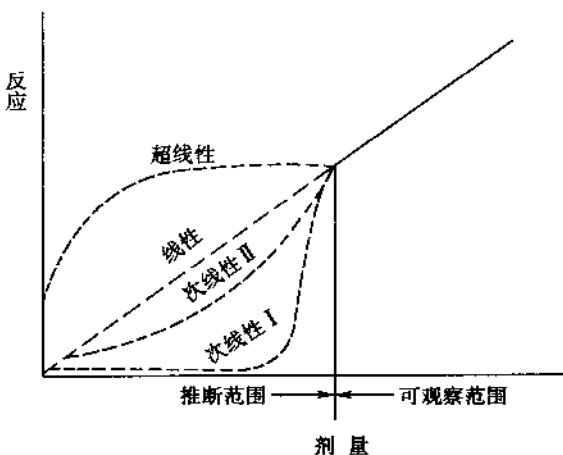


图 10-2 假设的致癌剂量反应曲线

即便是毒效应性质相同的化学毒物, 在低剂量区的剂量-反应曲线也有不同形式, 如超线性、线性、次线性等(图 10-2), 而毒理学研究往往不能提供这部分资料, 只能通过外推模型予以估测。但在使用不同外推模型对同一试验资料进行估测时, 常有很大差异。另一个影响剂量-反应关系形式的重要因素是代谢过程。某些化学毒物在高剂量时可使机体解毒能力饱和, 然后引起毒效应, 低剂量时就不会出现这种情况。如将高剂量所得结果向低剂量外推势必导致错误的结论。对于需经代谢活化的物质, 其毒效应通常不与接触剂量直接相关, 而与代谢产物的数量直接相关。因此, 代谢动力学过程和毒作用机制的深入研究对于正确地进行剂量-反应关系评价至关重要。

由于毒理学试验研究不能直接确定 NOAEL 以下剂量范围内的剂量-反应关系, 目前对于无阈值化学毒物, 特别是致癌物的低剂量外推主要是通过数学外推模型来估算, 即推断当致癌物的剂量相当于人类实际接触水平时, 与其致癌效应发生概率之间的关系。目前, 这样的数学外推模型有多种形式, 下面做一简单介绍。

(1) 概率分布模型(probability distribution models): 属于统计学模型。其假设为接触无阈值化学毒物群体中的每一个体均对其毒作用具有一定的耐受能力, 即存在阈值。但个体差异使这种耐受能力相差悬殊, 即每个人的阈值不同, 致使群体的耐受水平实际上是无阈值的。在模型中, 群体中的反应率为特定概率分布函数中的变量, 可用累计剂量-反应函数来模拟, 由此确定剂量-反应曲线的形式。这类模型包括概率单位模型(probit model)、Logistic 模型和 Weibull 模型。其中概率单位模型对毒理学试验资料的拟合程度相对较差, 故估测的危险度保守性最低。

(2) 机制模型(mechanistic models): 顾名思义, 这类模型是基于人们对于化学毒物致癌机制的认识而建立的。如最简单的一次打击模型(one-hit model)是基于体细胞突变理论, 假定靶细胞在一定时间内只要受到一次生物学有效剂量的打击后, 即可经由恶性转化和克隆扩增而发生癌变, 其估测的危险度保守性最高。而多次打击模型(multi-hit model)假设靶细胞需要经过多次

的生物学有效剂量打击后才能诱发癌变,反映了人们对致癌机制认识的深化。

美国 EPA 自 1986 年以来推广使用的线性多阶段模型(linear multi-stage model)也是机制模型中的一种,其假设为癌变效应的发生是多个不同的生物学事件作用的结果,即靶细胞必须经过突变、引发、转化、进展等一系列有序的多阶段的变化才能形成肿瘤。根据该模型,EPA 提出了致癌强度指数(carcinogenic potency index)的概念,作为致癌物剂量-反应关系评价中的重要参数。致癌强度指数系指实验动物或人终生接触剂量为  $1\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$  致癌物时的终生超额危险度。当以动物试验资料为依据时,其值为线性多阶段模型剂量-反应关系曲线斜率的 95% 可信限上限;当以人类资料为依据时,其值为该斜率的最大似然估计值(maximum likelihood estimate, MLE)。致癌强度指数用  $\text{mg}/(\text{kg}\cdot\text{d})$  表示。该值越大,则单位剂量致癌物所引起的动物或人的终生超额危险度越大。计算化学毒物的致癌强度指数有两种方法。一种方法是根据毒理学试验结果计算动物的致癌强度指数  $q_1^*$ (动物),再转换为人的致癌强度指数  $q_1^*$ (人)。为此,EPA 设计了专门的计算机程序 GLOBAL82 和 86。只要向方程式中输入必要的实验参数,就能自行算出  $q_1^*$ (动物),大大简化了数学运算过程。另一种方法则是根据人群流行病学调查资料直接计算人的致癌强度指数  $Q$ 。

(3)以生理学为基础的毒物动力学模型(physiologically based toxicokinetic model, PB-TK):上述的各种数学模型都是在接触剂量的基础上进行外推,但真正引起效应的却是作用部位处化学毒物的水平(靶剂量)。由于机体吸收、分布、代谢、排泄诸过程的影响,靶剂量与接触剂量并不总是平行的,这样以后者为基础作外推势必造成较大的不确定性。PB-TK 模型对此加以改进,不仅考虑接触剂量,而且还使用实验动物与人的器官血流量与组织容积等生理学参数、化学毒物在不同组织脏器中的分配系数以及与化学毒物体内生物转化过程有关的代谢参数等资料,计算靶剂量及代谢活化产物的数量,找出它们与致癌效应、肿瘤发生率等损害作用之间的关系,并提出有关毒作用机制方面的假设,从而为危险度评价提供了较多的科学依据。如用 PB-TK 模型对二氯甲烷(dichloromethane, DCM)进行的致癌危险度评价中,发现 B6C3F1 小鼠长期吸入 DCM 所致的肺和肝脏肿瘤明显增多,而经由饮水摄入 DCM 则未见此现象,其原因在于前者形成的谷胱甘肽硫转移酶代谢产物的数量远高于后者。在持续吸入含有 DCM  $1\text{mg}/\text{m}^3$  空气的条件下,单独使用线性多阶段模型估测的终生致癌超额危险度为  $4.1 \times 10^{-6}$ ,而在结合了由 PB-TK 模型求得的活性产物量后,估测值为  $3.7 \times 10^{-8}$ ,降低了 2 个数量级以上。再如用 PB-TK 模型评价四氯乙烯的致癌危险度时,发现该物质在小鼠肝脏的活性代谢产物量并不与经肺吸收的母体剂量完全平行,其体内过程符合非线性代谢动力学。在吸入浓度达到  $740\text{mg}/\text{m}^3$  以上时,代谢能力逐渐趋向饱和,肝内活性代谢产物量不再升高。因此,四氯乙烯的致癌危险度并非随其摄入量的增加而持续升高。在摄入量为  $7.4\text{mg}/\text{m}^3$  时,PB-TK 模型估测的对人的致癌超额危险度比传统评价方法低 1.6 倍;  $740\text{mg}/\text{m}^3$  时,低 24 倍;  $3700\text{mg}/\text{m}^3$  时,低 118 倍。显然,PB-TK 模型引入了更多的生物学数据,在阐明化学毒物的致癌机制、消除不确定因素、提高危险度定量评价的准确性和可信度等方面提供了一个重要的改进手段。

(4)以生物学为基础的剂量-反应模型(biologically based dose-response model, BBDR):该模型通过把细胞的某些生物学特征,如细胞周期动力学、细胞的生成和死亡率、细胞的克隆扩增、代谢酶的活性、受体结合水平等参数结合于机制模型中,使之替代原有模型中的缺省值和计算机求出的模拟值,以求更准确地反映特定肿瘤形成过程中的生物学变化。BBDR 近年来已应用于许

多致癌物的剂量-反应评价中。如在苯并(a)芘[B(a)P]所致的大鼠呼吸道肿瘤、氯丹所致的小鼠肝肿瘤、2-乙酰氨基芴(2-AAF)所致的小鼠肝、肾肿瘤、糖精所致的大鼠膀胱癌等动物致癌危险度评价中,均使用了这种模型。美国EPA在对二噁英进行的致癌危险度评价中使用了受体结合模型并取得了很好的效果。除了致癌危险度评价以外,人们正在积极探索该模型在发育毒性评价中应用的可能性。

除上述者外,还有时间-肿瘤反应模型(time-to-tumor response model)等。但迄今为止尚无一个为众人公认的普遍适用的外推模型。在使用不同模型对同一化学毒物的致癌危险度外推时,由于它们对毒理学动物试验资料的拟合方式和拟合程度的差异,各结果之间可相差几个甚至十几个数量级。因此,根据已有的资料情况来选用适宜的模型对于正确评价化学毒物的致癌危险度至关重要。

### (三) 接触评定

接触评定(exposure assessment)是危险度评价的第三个阶段,目的是确定危险人群接触待评化学毒物的总量并阐明接触特征,为危险度评价提供可靠的接触数据或估测值。如经此阶段认定待评化学毒物与人群无接触或虽有接触但不能引起健康危害,则危险度评价可不再继续进行。

接触评定涉及环境有害物质与接触人群两方面的研究。对于待评物质,要弄清它的来源、在环境中存在的总量以及在不同介质(空气、水体、土壤和食物)中的分布、转运、转化的情况和消长规律。对于接触人群,不仅要掌握人数、构成、范围等资料,而且要特别注意抽样的代表性问题。由于人力、物力有限,用于评定的生物监测资料一般都是来自于人群随机样本的测定结果,在此基础上估计总体人群或某些亚群的接触水平。如果样本的代表性差,会带来很大的不确定性。对于接触机会较多(如生产工人)或较为敏感(如老弱病残者)的某些亚群,在评定时应区别对待,分别进行。

人群接触剂量的估测不仅应考虑到经由不同途径吸收时吸收系数的影响,而且还要注意一种化学毒物经由多种途径进入机体的可能性。如重金属铅既可经呼吸道吸入,又可随饮水或食物由消化道吸收,还可存在于某些化妆品中经皮肤涂抹入血。因此,要对接触情况有一个全面的了解,在对单一接触情况做认真分析的基础上,综合评定总接触量。另外,接触剂量与靶器官剂量并非总是平行,而只有后者才能引起损害效应,故估测接触剂量时要结合健康效应进行。在这里,生物学标记的监测对于接触水平的准确评价常具有重要的意义。

### (四) 危险度特征分析

危险度特征分析(risk characterization)是危险度评价的最后总结阶段。通过对前三个阶段的评定结果进行综合、分析、判断,估算待评化学毒物在接触人群中引起危害概率(即危险度)的估计值,并以文件的形式阐明该物质可能引起的公众健康问题,为政府管理机构决策提供科学依据。

1. 有阈值化学毒物的危险度特征分析 分析常用以下方法:

(1)估计接触剂量达到危险水平的人数:一般以RfD为衡量标准。接触剂量如大于RfD者,可认为出现危险的可能性较大,由此求出达到危险水平的总人数。

(2)高危人群总接触量估计值(estimated exposure dose, EED):与RfD比较,EED为来自各

条途径的化学物质的总接触量。如 EED 小于或等于 RfD, 出现危险的可能性小, 反之则大。

(3) 用接触界限值表示: 接触界限值 (margin of exposure, MOE) 的计算公式为:

$$\text{MOE} = \text{NOAEL 或 LOAEL} / \text{EED}$$

用 MOE 与推导 RfD 的  $UF_s$  与 MF 之乘积比较, 如 MOE 大于或等于该乘积, 说明出现危险的可能性小; 反之, 可能性大。

(4) 用危险度估计值表示: 即根据 RfD 和 EED 计算接触人群的终生危险度。公式为:

$$R = (\text{EED} / \text{RfD}) \times 10^{-6}$$

式中: R: 发生某种健康危害的终生危险度。

$10^{-6}$ : 与 RfD 对应的可接受危险度水平。

2. 无阈值化学毒物的危险度特征分析 主要指致癌物的危险度特征分析, 包括计算超额危险度 (excess risk) 和超额病例数 (number of excess cases) 两部分内容。

(1) 计算终生 (以 70 岁计) 超额危险度 R:

$$R = 1 - \exp[-(q_1^* (\text{人}) \times D)] \text{ 或 } R = 1 - \exp[-(Q \times D)]$$

式中: R: 因接触致癌物而生癌的终生概率 (数值为 0~1)。

D: 个体日均接触剂量率, 单位为  $\text{mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ 。

当  $q_1^* (\text{人}) \times D$  的值小于 0.01 时, 上面公式可简化为:

$$R = q_1^* (\text{人}) \times D \text{ 或 } R = Q \times D$$

(2) 计算人均年超额危险度  $R_{(p)}$ :

$$R_{(p)} = R / 70$$

式中: 70: 指 0 岁组人群的期望寿命为 70 岁。

(3) 计算特定人群的年超额病例数 EC:

$$\text{EC} = R_{(p)} \times (\text{AG} / 70) \times \sum P_n$$

式中: AG: 标准人群平均年龄 (根据近期人口普查资料确定)。

$P_n$ : 平均年龄为 n 的年龄组人数。

### (五) 危险度评价中的不确定因素

在危险度评价的过程中存在着大量不确定因素。如在危害认定与剂量-反应关系评价阶段, 将动物试验结果应用于人的危险度评价时, 存在实验动物资料向人外推、高剂量向低剂量外推、较短染毒时间向长期持续接触外推、毒代动力学和毒效动力学资料不足等不确定因素。在接触评定阶段, 由于人体可经由多个途径接触化学毒物, 在一生中的不同阶段接触化学毒物的数量与种类也不相同, 会给接触总量的估测带来很大的不确定性。另外, 如果样本抽取的大小和代表性不合适, 也会产生不确定性。对于这些不确定因素, 在进行危险度评价之前就应予以充分的估计, 并采取积极可靠的措施尽量将其控制到最小程度。对于无法消除的不确定因素要在报告中明确提出并进行分析讨论, 使政府管理机构对于评价结果的有效性能做出正确的判断, 以便进行公共卫生决策。

### 三、危险度管理

危险度管理 (risk management) 是以危险度评价的结果为依据, 综合考虑社会发展的实际需要以及公共卫生、经济、工程、法律、政治等多方面因素, 进行费用-效益分析, 确定可接受的危险度, 制订有效的法规条例和管理措施并予以实施, 以达到保护人民群众身体健康的目的。

如果说危险度评价主要是毒理学工作者的任务的话, 危险度管理则需要卫生行政管理、毒理学、环境保护、工农业生产、经济学、工程技术等多方面的专业技术人员共同参与。他们根据危险度评价所提供的科学研究结果进行认真论证, 充分权衡利弊, 在此基础上决定取舍并制定政策。对于那些毒性较高, 易于造成环境污染和危害人体健康, 又并非工农业生产所必需 (如有替代品) 的化学毒物, 可认为弊大于利, 禁止其继续使用。而对于另一些化学毒物, 如铅、汞、镉等重金属, 虽然对于人体可能造成一定的危害, 但因为是重要的工业原料, 在国民经济建设中具有多种用途, 可以产生很大的社会 and 经济效益, 又没有其他适宜的物质可以取代, 经过综合分析之后可认为利大于弊, 可以继续使用, 但必须建立相应的控制和管理措施, 使其对环境与健康的危害低于可接受的危险度水平。这些措施包括制订和执行特定化学毒物的卫生标准, 对生活和生产环境进行监测, 对接触人群进行观察监护以及为控制危害发生将要采取的工程技术措施等。需要指出的是, 在制订措施的时候, 要密切结合国情, 抱着科学、严谨、实事求是的态度, 充分考虑社会各方面的承受能力, 把危险度控制在一个合理的水平上。如国际上目前对于致癌物的危险度管理多采用“社会可接受危险度”的概念并制订相应的实际安全剂量 (VSD), 而不是一味地追求“零”危险度, 就是一个很好的例子。

综上所述, 危险度评价和危险度管理对于认识化学毒物的有害作用、判断其危害程度、提出防护对策、制订卫生标准、为政府机构提供决策依据以及保护人民群众的身体健康和生存质量方面, 正发挥着越来越大的作用。由于发展的历史不长, 危险度评价和危险度管理在理论上和实际操作过程中还存在一些问题, 将会在不断发展和完善的过程中得到解决。

### 第三节 安全性评价

毒理学安全性评价 (toxicological safety evaluation) 是通过动物试验和对人群的观察, 阐明待评物质的毒性及潜在的危害, 决定其能否进入市场或阐明安全使用的条件, 以达到最大限度的减小其危害作用、保护人民身体健康的目的。安全性评价需按一定的程序进行, 通过一系列的毒理学试验, 获得 NOAEL 或 LOAEL。在此基础上, 根据待评物质的毒作用性质、特点、剂量-反应关系及人群实际接触情况等, 进行综合分析, 确定安全系数。用 NOAEL 或 LOAEL 除以安全系数, 可以制定安全限值, 即化学物的卫生标准。故毒理学安全性评价是制定卫生标准不可或缺的重要依据。

## 一、毒理学安全性评价的意义

自 19 世纪工业革命以来,化学合成工业获得了迅猛的发展,化学合成品的大量出现和广泛使用在改变了生产、生活面貌的同时,也对生态环境和人类健康产生了严重威胁,引起世界各国政府的重视,相继制定了有毒化学物质的卫生管理法规。如《有毒物质贸易法》(1969 年,瑞士),《化学物质管理法》(1973 年,日本),《环境污染法》(1975 年,加拿大),《产品管理法》(1976 年,挪威),《有毒物质管理法》(1976 年,美国),《化学物质管理法》(1977 年,法国),《有毒物质管理法》(1979 年,新西兰),《联邦食品、药物和化妆品法》(1979 年,美国),《有毒物质保护法》(1980 年,德国)等。在这些法规中,都明确规定了对化学物质的毒理学安全性评价要求。1982 年,国际经济与发展合作组织(Organization of Economic Cooperation Development, OECD)为对新化学物质实行统一的管理办法,制定了一整套毒理学实验指南及良好实验室规范(good laboratory practice, GLP),提出了新化学物质投放市场前所要求申报的毒性资料的下限,作为各国间互相承认的基础。

我国对化学物质的毒性鉴定始于 20 世纪 50 年代,但进展缓慢。直到 80 年代改革开放以后,为适应社会和经济的发展及国际贸易的需要,卫生立法有了迅速的进展。1983 年,卫生部公布了《食品安全性毒理学评价程序(试行)》,其间经过修订,于 1994 年批准通过为国家标准《食品安全性毒理学评价程序》,配合《中华人民共和国食品卫生法》予以实施。1991 年,卫生部和农业部颁发了《农药安全性毒理学评价程序》。1995 年,国家技术监督局发布的国家标准《农药登记毒理学试验方法》对农药登记所要求的毒理学的方法、条件作出规定。为配合 1984 年人大常委会通过的《中华人民共和国药品管理法》,卫生部分别在 1985 年和 1993 年颁布的《新药审批办法》和《新药(西药)毒理学研究指导原则》中,对药物的毒理学评价和具体的实验技术提出了明确的要求。此外还有:《化妆品安全性评价程序和方法》(1987 年),《化学危险品安全管理条例》(1987 年),《食品功能毒理学评价程序和检验方法(试行)》(1993 年),《新药(中药)毒理学研究指导原则》(1994 年)等。为适应我国加入 WTO 的形势、满足与国际接轨的要求,卫生部于 2000 年颁布了《化学品毒性鉴定管理规范》,对于毒性鉴定机构的资质认证、职责、毒性鉴定要求与试验程序,结果的评价等均做出了明确的规定。该《规范》已于 2001 年 6 月 1 日起正式实施。

卫生法规是卫生行政管理部门执法的依据,而毒理学安全性评价又是制定卫生法规的重要根据与基础。尽管世界各国因各自的国情不同,制定卫生法规的原则与标准会有所差异,但对化学物质的安全性评价无一例外地成为卫生法规中的基本内容。毒理学安全性评价的程序与内容并非一成不变,而是随着社会、经济和科技的发展逐渐得以完善。如在 20 世纪 50 年代末、60 年代初发生了反应停事件后,引起了人们对于化学物质发育、生殖毒性的重视,并在安全性评价程序中加强了这方面的内容。同样,出于对化学物质致突变、致癌作用认识的不断深化,建立了涉及微生物、体内和体外试验的多种方法,可以检测不同的遗传毒性终点,并在安全性评价中得到体现。目前,由于工农业生产的高速发展,特别是新的生物技术的应用,形成了一些新型工业,生产出诸如转基因物质、生物制剂等高科技产品,完全不同于以往的化学合成品,给安全性评价带来了新的问题。可以预言,未来毒理学安全性评价的对象和范围将更为广泛。与之相适应,毒理学的检测技术与方法也会得到不断地更新与长足的发展。

## 二、毒理学安全性评价程序的基本内容

人们平时所能接触的化学物质包括工业化学品、农业化学品、食品添加剂、日用化学品、医用化学品、环境污染物等。由于各类化学物质的使用方式、接触途径和程度的不同,对其进行安全性评价的程序与内容也有所侧重。通常系根据化学物质的种类和用途来选择国家标准、部委和各级政府发布的法规、规定和行业规范中相应的程序。

毒理学安全性评价遵循分阶段试验的原则。因为各毒理学试验之间是有关联的,在未完成某些试验前,不能进行另一些试验。如急性毒性试验是所有毒理学试验的基础, $LD_{50}$ 是蓄积毒性试验、致畸试验、亚慢性毒性试验和某些致突变试验剂量设计的参考依据;慢性毒性试验各组剂量和观察指标的选择要参考亚慢性毒性试验的结果。另一方面,为尽量减少人力、物力、财力的消耗,对于试验周期短、费用低、预测价值高的试验应予以优先安排。这样可以根据前一阶段的试验结果,判断是否需要进行下一阶段的试验。如某些待评物质,在进行了部分毒理学试验后,表现的毒性轻微,即可对其作出评价;而另一些物质在某个阶段的试验中表现出很强的毒性,即可将其放弃,而不必进行以后阶段的试验。这样,可以在最短的时间内,用最经济的办法,取得最可靠的结果。下面就我国现行的毒理学安全性评价程序的基本内容做一介绍。

### (一) 毒理学试验前的准备工作

在对特定的化学物质进行毒性鉴定之前,必须尽可能地收集它的相关资料。这是进行毒理学试验设计的基础。通常,受试物的化学结构与理化性质及生产工艺方面的资料由委托方提供,但有时需通过查阅文献或经实验室测定获得。包括:化学物质的名称、化学结构式、分子量、纯度、沸点、熔点、蒸气压、溶解度、杂质含量、用途、使用数量、使用方式、使用范围、在环境介质中的稳定性及定量分析方法等。此外,还要了解生产过程,包括使用的原料、添加剂和中间体等。对于待测的样品,要求其必须是工艺流程固定、成分稳定不变、规格、纯度完全一致的产品。一般情况,用于毒理学安全性评价的受试物为工业品或市售商品,而非纯品,以反映人体实际接触的情况。如需要确定毒性来自于该化学品还是其中含有的杂质时,可通过对纯品和工业品分别试验,比较其结果来判定。

### (二) 不同阶段的毒理学试验项目

我国现有的毒理学评价程序中,除了《化妆品安全性评价程序和方法》中将毒理学试验分为五个阶段进行外,多数为四个阶段试验。根据化学物质的种类、用途不同,试验的方法和先后顺序也不尽相同。而《新药审批办法》中的新药毒理研究的技术要求是个例外,系将毒理学研究部分分成全身性用药的毒性试验、局部用药的毒性试验和特殊毒理研究三个部分进行。下面将各阶段的试验内容做一简要介绍。

1. 第一阶段 包括急性毒性试验和局部毒性试验。主要是测定  $LD_{50}$  或  $LC_{50}$ ,对受试物的急性毒性进行分级,为其他试验的剂量设计提供参数,根据毒作用的性质、特点推测靶器官。试验通常要求使用两种动物,染毒途径应为受试物与人体的可能接触途径。农药、化妆品等可能与皮肤或眼接触的化学物质还要求进行皮肤、粘膜刺激试验、眼刺激试验、皮肤致敏试验、皮肤光毒和



光变态反应试验等。

2. 第二阶段 一般包括蓄积试验和致突变试验。本阶段的试验目的是了解受试物与机体多次接触后在体内的蓄积情况及可能造成的潜在危害,并判断受试物是否具有致突变性,进而估测其致癌危险性。由于以死亡为指标的蓄积试验有一定的局限性,故1994年颁发的《食品安全性毒理学评价程序》中已无此试验,在《化学品毒性鉴定管理规范》中也未将其列入。致突变试验包括原核细胞基因突变试验、真核细胞染色体畸变试验、微核试验或骨髓细胞染色体畸变分析等,需要几个试验组联合使用,以观察不同的遗传学终点。

某些受试物在结束第一、二阶段的试验后,根据试验结果可决定是否进行下一阶段的试验。如《食品安全性毒理学评价程序》中就规定,当受试物为已知的化学物质,世界卫生组织(WHO)已公布每人每日容许摄入量(ADI),而且申请单位有资料证明我国产品的质量规格与国外产品一致时,则先进行第一、二阶段毒性试验。若试验结果与国外产品的结果一致,可不做进一步的毒性试验。《化学品毒性鉴定管理规范》中也规定,引进国外的生产技术,生产国外已登记生产和应用的工业化学品,国内的生产部门证明所生产的产品的理化性质、纯度、主要杂质成分及含量均与国外产品一致时,可先进行第一阶段和第二阶段的有关试验项目。如试验结果与国外同类产品一致时,可以不再进行第三、第四阶段试验。

3. 第三阶段 一般包括亚慢性毒性试验、生殖与发育毒性试验和代谢试验。亚慢性毒性试验是为了确定较长时间内反复接触受试物所引起的毒效应强度、性质和靶器官,初步估计LOAEL和NOAEL,预测对人体健康的危害性,并为慢性毒性试验和致癌试验的剂量设计和指标选择提供参考依据。生殖与发育毒性试验包括致畸试验和繁殖试验,用于观察受试物对生殖过程的不利影响。代谢试验旨在了解受试物在体内的吸收、分布和消除情况,判断蓄积性的大小,寻找靶器官及剂量-反应关系。

4. 第四阶段 为慢性毒性试验和致癌试验。目的是检测受试物与机体长期接触所致的一般毒性和致癌作用,确定靶器官,探讨中毒机制,获得NOAEL和LOAEL,判断受试物能否使用,为制定拟使用者的卫生标准提供参考依据。本阶段的两个试验周期长、耗费的人力、财力、物力多,通常结合进行。

有关农药、食品、工业化学品和化妆品的毒理学安全性评价程序的阶段划分及各阶段的试验内容见表10-2。

### (三) 人群接触资料

由于实验动物与人之间、实验条件与人群接触受试物的实际情况之间存在诸多差异,将毒理学试验的结果外推到人具有不确定性。通常的解决办法是以动物试验的NOAEL或LOAEL除以适当的安全系数(不确定系数)来制定卫生标准,以增加标准的可靠性,达到保护人类健康的目的。但人群接触资料能直接反映受试物与机体接触后所造成的损害作用,一旦确定,即具有决定性意义。故在可能的情况下,应努力搜集这方面的资料,包括对职业性接触人群的监测、对环境污染区居民的调查、对药物毒性的临床观察、对中毒事故的原因追查和对志愿人员的试验与检测等。国外常进行志愿人员的试验,观察小剂量物质对人体的作用,以弥补动物试验的不足,尤其是化学物质的刺激、致敏、精神心理作用等方面的资料可为安全性评价提供重要的依据。

表 10-2 各类物质毒理学安全性评价程序的阶段划分与试验内容

|      | 农 药                                                                                                                        | 食 品                                                                                                       | 工业化学品                                                                                                                                                            | 化 妆 品                                                                                             |
|------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 法规名称 | 农药安全性毒理学评价程序                                                                                                               | 食品安全性毒理学评价程序                                                                                              | 工业化学品毒性鉴定规范                                                                                                                                                      | 化妆品安全性评价程序和方法                                                                                     |
| 第一阶段 | 1. 急性毒性试验(①急性经口毒性试验; ②急性经皮毒性试验; ③急性吸入毒性试验)2. 皮肤与眼粘膜试验(①眼刺激试验; ②皮肤刺激试验; ③皮肤致敏试验)                                            | 急性经口毒性试验                                                                                                  | 急性毒性试验(①急性经口毒性试验; ②急性经皮毒性试验; ③急性吸入毒性试验; ④眼粘膜刺激试验; ⑤皮肤刺激试验; ⑥皮肤致敏试验)                                                                                              | 1. 急性毒性试验(①急性皮肤毒性试验; ②急性经口毒性试验)2. 动物皮肤、粘膜试验(①皮肤刺激试验; ②眼刺激试验; ③皮肤变态反应试验; ④皮肤光毒和光变态反应试验)            |
| 第二阶段 | 1. 蓄积毒性试验; 2. 致突变试验(①原核细胞基因突变试验; Ames 试验及大肠杆菌回变试验; ②哺乳动物细胞染色体畸变分析; 体细胞-骨髓细胞微核试验或骨髓细胞染色体畸变分析; 生殖细胞-睾丸细胞染色体畸变分析或显性致死试验; ③其他) | 1. 遗传毒性试验(①细菌致突变试验; Ames 试验为首选; ②小鼠骨髓微核试验或骨髓细胞染色体畸变分析; ③小鼠精子畸形分析和睾丸染色体畸变分析; ④其他)2. 传统致畸试验; 3. 短期(30天)喂养试验 | 1. 致突变试验(①细菌回变试验; ②体外哺乳动物细胞染色体畸变检测; ③哺乳动物骨髓细胞染色体畸变检测; ④哺乳动物骨髓细胞微核检测; ⑤小鼠睾丸染色体畸变或小鼠精子畸形检测; ⑥小鼠或大鼠显性致死试验)2. 免疫毒性检测; 3. 亚急性毒性试验(①亚急性吸入毒性试验; ②亚急性经皮毒性试验; ③亚急性经口毒性试验) | 1. 亚慢性毒性试验(①亚慢性皮肤毒性试验; ②亚慢性经口毒性试验)2. 致畸试验                                                         |
| 第三阶段 | 1. 亚慢性毒性试验(①90天经口试验; ②21天经皮试验; ③21天或28天吸入试验; ④迟发神经毒性试验; ⑤两代繁殖试验; ⑥致畸试验。其中②③④根据需要确定)2. 代谢试验                                 | 亚慢性毒性试验(①90天喂养试验; ②繁殖试验; ③代谢试验)                                                                           | 1. 亚慢性毒性试验(①亚慢性吸入毒性试验; ②亚慢性经皮毒性试验; ③亚慢性经口毒性试验)2. 致畸试验; 3. 繁殖毒性试验; 4. 迟发性神经毒性试验                                                                                   | 致突变、致癌短期生物筛选试验(①Ames 试验; ②体外哺乳动物细胞染色体畸变和 SCE 检测试验; ③哺乳动物骨髓细胞染色体畸变率检测试验; ④动物骨髓细胞微核试验; ⑤小鼠精子畸形检测试验) |

续表

|      | 农 药                              | 食 品            | 工业化学品                                                                         | 化 妆 品                 |
|------|----------------------------------|----------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| 第四阶段 | 慢性毒性(包括致癌)试验(大鼠2年喂养试验或小鼠一年半喂养试验) | 慢性毒性试验(包括致癌试验) | 1. 慢性毒性试验(①慢性吸入毒性试验;②慢性经皮毒性试验;③慢性经口毒性试验)2. 致癌试验; 3. 代谢试验; 4. 有条件时对接触人群进行调查与观察 | 1. 慢性毒性试验;<br>2. 致癌试验 |
| 第五阶段 |                                  |                |                                                                               | 人体激发斑贴试验和试用试验         |

### 三、安全性评价需注意的问题

#### (一) 试验方法和操作技术的标准化

化学物质的毒理学安全性评价是一项十分严肃的工作,获得的毒性资料必须准确、真实、可靠,这样才能保证质量,科学、公正地作出评价。这里,试验方法和操作技术的标准化是决定评价结果是否可靠的关键,也是实现国际规范和国内外实验室之间数据互比较的基础。必须建立严格的规范,对评价全过程进行质量控制。

20世纪70年代,美国食品和药品管理局(FDA)、美国环境保护局(EPA)对一些从事安全性评价工作的实验室进行了检查,发现存在问题的毒理学资料占有很大比例,严重影响了评价结果的正确性,由此制定和颁布了良好实验室规范(GLP),并得到了OECD和世界许多国家的效仿。GLP对于承担化学品毒性鉴定工作的实验室的组织管理、质量监控、人员组成、实验用房、仪器设备、受试物与对照物、实验动物、实验方案、实验记录、实验结果、总结报告、资料存档等各个方面都做出了具体、明确的规定,以保证毒理学实验数据的准确可靠。

在GLP中,一个重要的工作是针对安全性评价涉及的整个管理过程、所有实验项目和操作方法制定一套细则,即标准操作规程(standard operation procedure, SOP)。SOP作为实验室内部的法规性文件,对于减少各种干扰因素的影响,保证研究结果准确、可靠具有重要意义。在制定SOP时,应细致、具体,紧密结合本实验室的实际,使之具有良好的指导性和可操作性,以便于遵照执行。SOP需要适时予以修订,但也必须按照SOP规定的程序进行。

#### (二) 注意毒理学试验方法的局限性

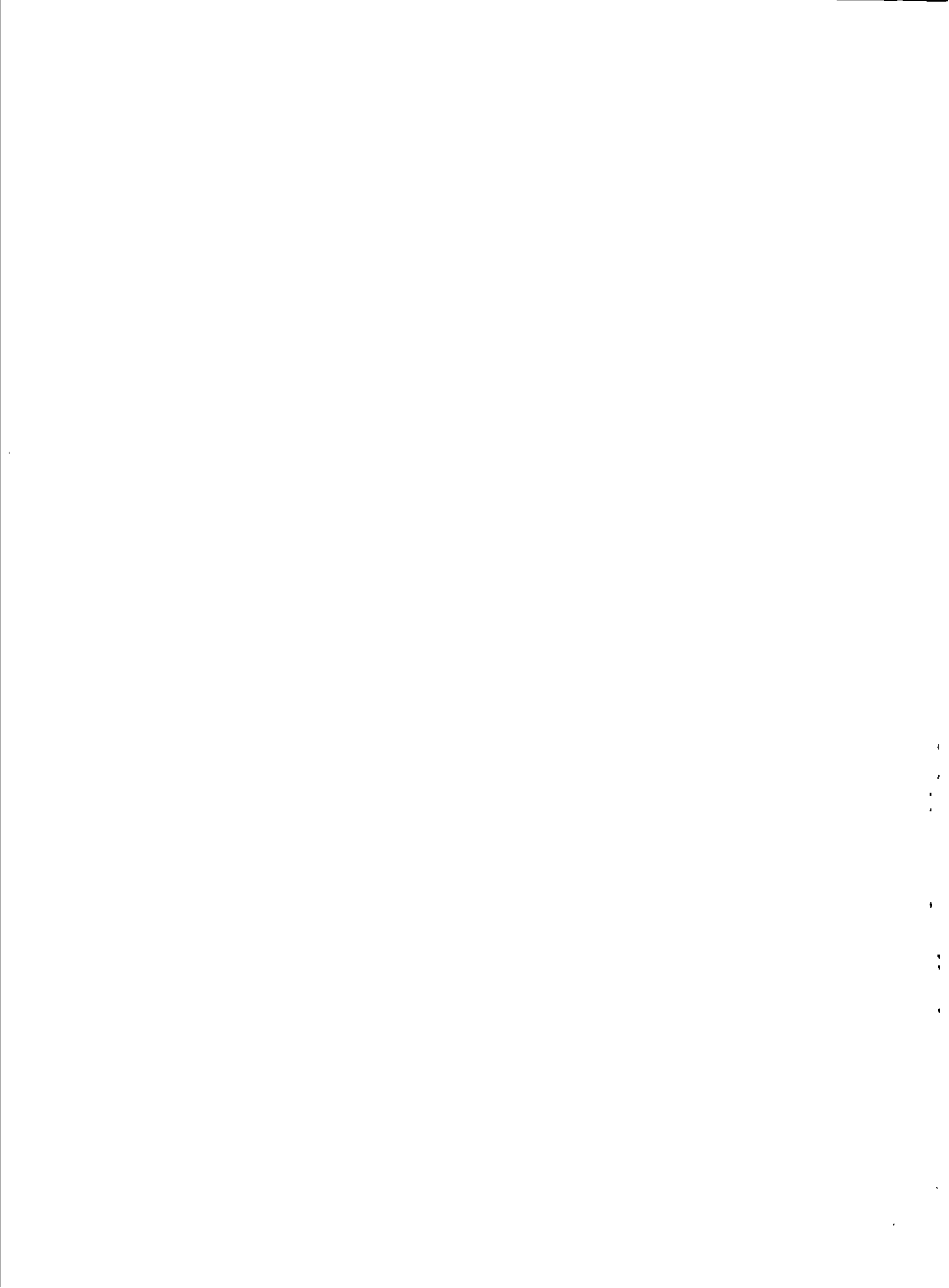
每项毒理学试验都有其自身的特点和观察终点,可以反映受试物的某些毒作用,但都不能阐明其全部的毒性特征。如通过急性毒性试验可以对受试物进行毒性分级,对于毒性高的物质自然会引起我们的注意,但毒性低的不等于就没有问题。有些物质的急性毒性虽然不大,但具有强

蓄积性或“三致”作用等其他毒性,同样会造成严重的后果。如镇静药反应停经检测为低毒,在欧洲的妊娠妇女中广泛使用,导致了10 000多名短肢畸形婴儿的出生,给这些家庭和社会带来了极大的痛苦和沉重的负担,是应该永远记取的惨痛教训。故在安全性评价时,不仅要明了每项毒理学试验所能说明的问题,还要掌握其局限性,这样才能对受试物的毒性作出正确的评价。

### (三) 在综合分析的基础上得出结论

对受试物作取舍的结论时应十分慎重。不仅要根据毒理学试验的数据和结果,还应考虑实际的需要。如它们在工农业生产中的用途、用量、使用方式、有无合适的替代品;可以产生的社会、经济效益以及对环境质量和自然资源的影响等。在进行充分的利弊分析后,提出禁用、限用、安全使用的条件及中毒的防治措施等方面的建议,为政府管理部门的最后决策提供科学依据。

(蔡 原)



### 第一节 概 述

血液系统涉及血液、骨髓、脾和各种淋巴组织。血液毒理学是研究药物、非治疗性化学物和其他环境因素对血液和造血组织产生毒害效应的一门交叉学科,它是综合了传统血液学和毒理学的基本理论而形成的。各种因素对血液系统的影响,主要表现在对外周血和骨髓造血功能的影响。

进入机体的各种化学物在吸收、分布、交换和排泄等过程中都依靠血液来运输,因此血液中的各种成分与化学物接触的机会较多,容易受到损伤。此外,外周血中的各种细胞均由骨髓中始祖细胞(造血干细胞)分化而来,而处于不同发育、分化阶段的各种血细胞对化学物和其他环境因素敏感性较高。因此血液系统可能比机体的其他组织器官更容易受到损伤。

外周血不仅常用作了解机体接触外源性化学物水平的窗口,随着分子生物学和分子遗传学技术的广泛应用,也作为了解机体遗传物质是否受到损伤的重要研究对象。血液毒理学实验动物模型还在探讨药物和其他外源性化学物对机体毒作用、敏感性生物标志物以及某些恶性肿瘤发生机制等方面发挥了重要的作用。然而,由于动物血液系统对外源性化学物的反应与人不尽相同,甚至不同种属的动物对同一化学物的血液学反应也迥异,因此开展血液毒理学研究特别是进行新药临床前研究时选择合适的动物模型至关重要。

#### 一、血液和造血组织的组成

血液和造血组织的组成

外周血的主要有形成分包括红细胞、白细胞和血小板。白细胞包括粒细胞、淋巴细胞和单核

细胞,其中粒细胞又分为中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞。

### (一) 红细胞

成熟的红细胞与其始祖细胞一起称为红细胞系,红细胞的主要功能是携带血红蛋白并保持血红蛋白功能的完整性。血红蛋白占红细胞湿重的30%。红细胞通过血红蛋白将氧运送到机体各个组织,支持有氧代谢并把二氧化碳带回肺组织。各种原因引起的红细胞或血红蛋白的急性损伤均可导致氧运输受损并继发外周缺氧。正常情况下,红细胞的寿命约120天。但不同种属生物体内红细胞寿命长短不一,普通实验动物如兔、大鼠,特别是豚鼠和小鼠的红细胞寿命明显短于人类。

### (二) 粒细胞和单核细胞

白细胞是血液有形成分中最复杂的体系,可在血管外发挥重要功能。虽然每种亚型具独特功能,但其主要功能是防御外来物的侵袭。这种功能通常涉及两种机制:即吞噬作用和由免疫系统产生抗体的作用。

粒细胞和单核细胞均属多形核吞噬细胞,根据瑞氏染色进行分型。瑞氏染色后在血涂片上它们的胞浆富含颗粒物质:中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞分别含有被染成中性(相对无色),酸性(红色)和碱性(蓝色)的颗粒,普通光学显微镜下易于辨别。中性粒细胞是最具吞噬活力的细胞;嗜酸性粒细胞则较不活跃,常出现在某些变态反应性疾病和寄生虫感染时;嗜碱性粒细胞与组织肥大细胞有关,在对免疫刺激的应答中释放组胺和其他介质。所有粒细胞都有一个分裂的核,或者一个核被挤压成多叶状。这种特征在中性粒细胞中最明显,又称作多形核白细胞(polymorphonuclear leukocytes, PMNs)。

中性粒细胞在血液白细胞中数量最多,在介导病原微生物引起的炎症、侵人和坏死中呈高度专一性。在炎症和感染时期,细胞数目骤增,而这些增加的中性粒细胞来自于骨髓。嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞则不是依靠增加细胞数量,而是通过释放不同的调节因子来调节炎症反应。这三种粒细胞都受体液免疫的影响,因为体液免疫在宿主的防御和保持动态平衡方面起着积极作用。

单核细胞是组织中巨噬细胞的前体形式,它们统称为单核细胞系(mononuclear phagocyte system, MPS)。它们从骨髓迁移到循环血,再从外周血分别迁移至肝、肾、皮肤、肺、骨髓和其他组织而成为各种特殊的具重要功能的细胞。单核细胞在血液循环中停留3-4天,当它们迁徙入网状内皮组织如肝、脾和骨髓后,便称为巨噬细胞。巨噬细胞在炎症和感染的吞噬反应中发挥作用,也在衰老细胞的破坏以及变性的血浆蛋白和脂蛋白的胞饮清除中起作用。

### (三) 淋巴细胞

淋巴细胞体积明显比巨噬细胞小,呈卵圆形或肾形核。在人外周血中其数目仅次于白细胞,并分成四种亚型:T细胞,B细胞,自然杀伤细胞和树突状细胞。与粒细胞不同的是,这些亚型细胞在形态学上一般很难区分。通常使用单克隆抗体或流式细胞仪根据膜抗原的不同进行分类和定量这些亚型细胞;除此之外,还可对这些细胞进行功能分群。

#### (四) 血小板和凝血因子

血小板是最小的血细胞成分(直径 $1\sim 3\mu\text{m}$ ),在血涂片上呈圆盘形碎片。产生血小板的过程是唯一的,即大量血小板从骨髓中最大的细胞——巨核细胞成批产生并释放。保持血液动态平衡和血管开放状态的主要物质是血小板和各种液相蛋白。成熟的小血小板与它们的祖先和前体统称为血小板系。血小板具有非常活跃的生物学作用,如吸附于破损的血管表面,接着激活凝血系统和相关程序。这些程序能使血管修复,保持健康状态下的血液动态平衡以及病理状态下的血栓形成。

正常止血最少需要约 $50\times 10^9/\text{L}$ 的血小板。当血小板计数 $<20\times 10^9/\text{L}$ 时,称为血小板减少,临床常有出血倾向。最常见的表现是极小的损伤后出现毛细血管渗漏(紫癜),也可见到瘀斑。实验室检查提示出血时间延长以及血块收缩不良等。

#### (五) 造血组织

骨髓是人体最大的造血器官。血细胞的产生是干细胞经增殖、分化、直至成为各种成熟血细胞的过程。通过这一过程,各种成熟血细胞释放到外周血中,从而满足机体对氧气运送、防御和修复、维持血液的动态平衡等重要功能的生理需求。

骨髓含有造血干细胞,是生成各种血细胞的原始细胞,又称为多能干细胞。当造血干细胞受到相应信号分子刺激时分化成定向干细胞,最终发育成熟为红细胞、白细胞和血小板。有些因素也可抑制或阻断骨髓干细胞的分化和成熟,从而发生不同类型的贫血、甚至血液恶性疾病如某些类型的白血病。

严重的骨髓损害使骨髓不能正常增殖,称再生障碍性贫血(简称再障)。有时骨髓细胞数虽然正常甚至增高,但仍不能生成正常的有形成分以维持正常细胞数,称为无效造血。有些化学物质(如苯)除对骨髓有直接细胞毒作用外,还干扰DNA的功能;骨髓损害还与免疫反应有关,如使用氯霉素的患者发生再障。

## 二、血液作为靶器官

血液在毒理学中只是作为一个靶器官。血液生成血细胞的重要功能以及这种高度增生性组织对中毒的敏感性使得造血系统像肝脏和肾脏那样在危险度评价中成为最重要的靶器官之一。在健康状态下,红细胞、血小板和中性粒细胞以每秒约300万的速率产生。在大量需要这些细胞的情况下,比如在溶血性贫血或继发性感染时,机体产生血细胞的速率会增加好几倍。这种特性使造血组织成为细胞抑制剂和抗有丝分裂剂极其敏感的靶器官。细胞抑制剂和抗有丝分裂剂常用作抗肿瘤剂、抗菌剂和免疫抑制剂。造血组织对各种毒物较敏感,一些毒物会影响其营养素如铁的供应;影响毒物及其代谢产物如尿素的清除;或影响重要的生长因子如促红细胞生成素的产生等。

各种原因的血液毒性造成的结局大致可分为三类:①血细胞生成异常,表现为外周血中各种细胞的减少或增多,如巨幼红细胞性贫血、粒细胞缺乏症、再生障碍性贫血、血细胞增多症和白血病等;②血红蛋白异常和溶血,高铁血红蛋白血症、硫化血红蛋白血症、碳氧血红蛋白血症、赫恩



小体溶血性贫血等；③出血性疾病，如血小板减少症、药物或化学物引起的凝血机制障碍而发生的出血等。

## 第二节 红细胞系毒理学

在哺乳动物中人类的红细胞可能是研究最多的细胞。这是由于红细胞容易获得，结构简单而缺乏细胞器，而且代谢活动有限。由于对其他种属的红细胞功能研究相对较少，很多人错误地推断它们与人类的红细胞作用可能十分相似，其实不然。虽然来自各种动物的红细胞其结构和功能相近，但它们具有自己的特点，这些特点对它们适应各种环境变化有重要作用。

### 一、红细胞生理学

#### (一) 红细胞的数量和形态

不同哺乳动物之间每毫升血液中的红细胞数差别很大，红细胞的大小或平均红细胞容积(MCV)也不一致。单个红细胞容积在小鼠的7~8fL和海象的220fL之间不等，相应的红细胞直径则在2~3 $\mu\text{m}$ 和11.4 $\mu\text{m}$ 之间。大多数红细胞的直径在5~8 $\mu\text{m}$ 范围内。通常，反刍动物的红细胞较小，而海洋哺乳动物的红细胞较大。但细胞体积大小与其功能有何关系目前还不很清楚。由于各种动物红细胞内的血红蛋白浓度大致相当，红细胞容积改变使平均红细胞血红蛋白量(MCH)变化较大。

#### (二) 红细胞的产生

红细胞生成又称红细胞发育，是指在不同造血生长因子，即集落刺激因子(colony stimulation factor, CSF)调节下红细胞的发生过程。红细胞由红系定向干细胞通过分化、增殖等过程而生成，通常经历红系定向干细胞、红系前体细胞(从原红细胞到晚幼红细胞)、网织红细胞和成熟红细胞等阶段。红系定向干细胞从造血干细胞定向分化而来，造血干细胞主要存在于骨髓、脾、肝等造血组织内，外周血中也有少量存在。

红细胞的分化、增殖过程十分迅速，通常从原红细胞分化、发育为网织红细胞只需约72h，再经过约48h即可发育为成熟红细胞。在此过程中，细胞体积逐渐变小，细胞核由大变小最后消失，但细胞内血红蛋白逐渐增多。

调节红细胞生成的因素较为复杂，生理状态下循环血中的红细胞数依靠机体对红细胞生成速度的反馈调节以保持稳定。各种原因导致机体内红细胞数量改变并达到一定程度时，造血组织便通过自身调节作用而在一定范围内维持这种动态平衡。

调节红细胞生成的机制还不很清楚。研究证明早期红系祖细胞的生长和发育可能主要受爆氏促进活化因子(burst promoting activator, BPA)调节，它可使处于 $G_0$ 期靶细胞进入DNA合成期(S期)，从而使早期红系祖细胞分化、增殖。促红细胞生成素(erythropoietin, EPO)可能主要调节晚期祖系红细胞的分化和增殖，其作用可能是通过去除对决定血红蛋白合成基因的阻遏因子

而实现的。EPO 对红细胞生成的调节作用包括刺激细胞有丝分裂、激活某些诱导细胞分化的特异性基因、抑制红系集落形成单位 (colony forming unit-erythroid, CFU-E) 的凋亡 (apoptosis) 以及加速网织红细胞的释放等。调节红细胞生成的其他因素包括另外一些细胞因子如红系分化因子、白介素-3 (IL-3) 和一些激素如雌激素、雄激素、甲状腺素和肾上腺皮质激素等。总之, 红细胞生成的调节是在一系列刺激和抑制因素的共同作用下完成的, 这些因素相互影响, 相互制约, 构成了对红细胞生成调节的反馈体系

对红细胞生成的评估, 通常包括形态学 (如骨髓穿刺和活检或对外周血涂片的观察), 临床实验室参数 (如细胞计数或红细胞指数) 和细胞化学 (组织中铁的普鲁士蓝染色) 三个方面。

### (三) 红细胞生理学功能

虽然红细胞的代谢容量与其他体细胞相比十分有限, 但它还是需要能量的。用于保持血红蛋白铁的还原状态, 保持血红蛋白的巯基团和红细胞的酶类处于活化的还原形式并且维持红细胞的双凹形状。在某些动物种类中, 维持胞内钾浓度在高水平, 钠和钙的浓度处于低水平; 相反在血浆中钠和钙的浓度高而钾的浓度低。这些活动所需的能量来自于糖酵解和磷酸戊糖通路。

成熟红细胞缺乏合成蛋白质的生物催化机制。因此, 当网织红细胞成熟, 蛋白质合成停止时, 它们必须有相当于酶的一套物质才能生存。如乳酸脱氢酶等在细胞衰老过程中没有显著的改变, 但己糖激酶、丙酮酸激酶和 6-磷酸葡萄糖脱氢酶等则随红细胞的老化而活性降低。红细胞酶活性可代表平均红细胞寿命。如果测定的红细胞酶来自红细胞寿命短的动物, 则这些酶的活性将升高。同样, 当由于骨髓抑制而引起红细胞寿命延长时, 会有一些酶的活性降低。

正常红细胞在外周血中的寿命约为 120 天。在此期间, 红细胞可能受各种因素影响而改变存活时间。任何原因造成红细胞破坏 (如溶血) 增加时均可引起贫血, 其特征是外周血网织红细胞数量增加和骨髓红系增生活跃。网织红细胞增多时外周血嗜多染红细胞 (polychromatophilic erythrocyte) 数增加。引起红细胞破坏的原因很多, 包括非免疫性和免疫性两类。前者包括微血管病变性、机械损伤性、传染性疾病、氧化性溶血和非氧化性化学诱导性溶血。后者系指由 IgG 或 IgM 抗体与红细胞膜抗原相互作用介导的红细胞免疫性破坏。

血红蛋白是哺乳动物红细胞中运送氧的蛋白。虽然异常血红蛋白在人类细胞中是相对普遍的, 但是其他哺乳动物体内并不存在相似的、产生疾病的、异常的血红蛋白。转基因小鼠可以为镰刀状细胞病、海洋性贫血和血红蛋白转变提供模型。

高铁血红蛋白 (methemoglobin) 是血红蛋白中铁卟啉复合物中的铁处于三价铁形式的衍生物, 通常在血红蛋白脱氧时形成。产生高铁血红蛋白的最常见的原因是接触能抑制 NADH-硫辛酰胺脱氢酶系统的氧化性外源性化学物。许多化学物和治疗药物可以引起高铁血红蛋白血症 (methemoglobinemia), 如苯佐卡因、利多卡因、磺胺、硝酸盐、亚硝酸盐、硝基苯、硝酸银、苯醌和美蓝等。这些化学物和药物分为直接氧化剂和间接氧化剂。前者是指将这些物质在体外或体内与红细胞作用时可形成高铁血红蛋白 (如亚硝酸盐), 而后者是指必须在体内经代谢修饰后才能引起高铁血红蛋白的物质 (如芳香氨基酸以及硝基化合物苯胺和硝基苯等)。许多物质引起高铁血红蛋白的确切机制仍不清楚。

由于高铁血红蛋白不能与氧结合, 所以红细胞含有一个能将高铁血红蛋白还原成脱氧血红

蛋白的酶系统。在完整的红细胞内细胞色素 b5 把高铁血红蛋白还原成血红蛋白。红细胞还有与 NADPH 有关的高铁血红蛋白还原系统。只要有如美蓝一类的人工电子载体存在,在完整红细胞中 NADPH 就可以还原高铁血红蛋白。在生理状态下 NADPH-高铁血红蛋白并没有活性,只有在提供人工电子载体的情况下,NADPH-高铁血红蛋白可以加速还原高铁血红蛋白,这一点对治疗高铁血红蛋白血症十分重要。对与 G-6-PD 缺乏者,由于形成 NADPH 的能力降低,使用美蓝则无效。

高铁血红蛋白能够可逆地与一些化学物结合,如氰化物、硫化物、过氧化物、氟化物和叠氮化物。高铁血红蛋白与氰化物的亲和力可被用于两个方面,一是在氰化物中毒后给予亚硝酸盐,形成的高铁血红蛋白可与游离的氰化物结合,以保护关键的细胞呼吸酶;另一方面,用铁氰化钾与血红蛋白作用可形成氰化-高铁血红蛋白,作为测定血红蛋白浓度的标准方法。

赫恩小体(Heinz body)是由变性血红蛋白组成的深染而致密的具折光性的颗粒,也可能是硫化血红蛋白。通过二硫键共价结合到红细胞膜的内膜面而导致细胞形态的变异,从而使这些成熟前红细胞被脾吞噬而消除;或使主动和被动的离子转运受损而引起渗透压变化、高通透性和血管内溶血。硫化血红蛋白、赫恩小体和溶血代表了氧化应激对红细胞作用的连续性事件。

不同种属的血红蛋白的氧化速度各不相同。在接触硝酸钠时,反刍动物(牛、山羊、绵羊)的高铁血红蛋白形成的速度比非反刍动物快得多。高铁血红蛋白的还原速度在不同的种属间也不同。当高铁血红蛋白化的红细胞被洗出并孵育在葡萄糖中时,高铁血红蛋白的还原速度由快到慢依次为:兔>豚鼠和鼠>牛>绵羊>山羊>人>狗>猫>马>猪。完整红细胞内的还原速度并不完全依赖于以分光光度法测出的细胞色素 b5 还原酶的活性。兔红细胞高铁血红蛋白还原速度和酶活性很高;而猪的高铁血红蛋白还原速度最低,但酶活性却位于中间水平。猪科动物的红细胞不能把葡萄糖转运入细胞内,因此就无法提供还原高铁血红蛋白所需的 NADPH。细胞色素 b5 还原酶活性从高到低依次为兔>豚鼠>狗>人、鼠和猪>绵羊和马>牛。

红细胞膜抗原由膜蛋白和复合糖基组成,如人类的 ABO 血型系统。通常,每一种动物都有一些独特的遗传特征性膜抗原,而有些抗原则有种属间交叉性。已知具有血型系统的动物有:狗、猫、马、牛、绵羊、猪以及兔。

## 二、环境因素对红细胞生成的毒性作用

环境因素对红细胞生成的毒性作用,包括物理因素、化学因素和生物因素等。

### (一) 电离辐射

急性高剂量全身辐射与短期骨髓再生障碍及死亡有关。经电离辐射后,在 36h 内死亡者主要是脑血管疾病所致;在 36h 和 10 天之间死亡者主要是因上皮组织如肠道液体大量丢失;在 3~6 周之间死亡者主要由于各类血细胞减少综合征。对广岛原子弹爆炸后的幸存者尸检显示,6 个星期后即有骨髓再生现象。因此,再生障碍性贫血并不是一种长期综合征。高剂量辐射后几天内,循环血中淋巴细胞、粒细胞和血小板计数均急剧下降,是由于急性干细胞损伤造成的。急性辐射引起的骨髓抑制对再生障碍性贫血有重要意义,但骨髓功能性抑制则可能是一种保护性反应,对造血生长因子可能起到有利的作用。暴露于低剂量辐射时,贫血的发生是渐进性的,长期接触者可发生再生障碍性贫血或白血病。

## (二) 金属元素

急性高剂量铅摄入可导致溶血性贫血。慢性低水平铅暴露常引起小细胞性(有时为正常细胞性)贫血。此类贫血的特征是红细胞嗜碱点彩,由典型的大而不规则的颗粒组成,这种细胞称为点彩红细胞。值得注意的是,点彩红细胞并非铅中毒所独有。铅主要通过影响红细胞系统卟啉代谢而抑制红细胞生成,此过程中涉及的酶包括 $\delta$ -氨基 $\gamma$ -酮戊酸脱水酶(ALAD)和血红素合成酶,粪卟啉原氧化酶等。诊断方法是检测血或组织中增高的铅浓度。治疗铅中毒的方法主要是使用螯合剂。

金中毒主要是医源性的,可导致再生障碍性贫血。但其发生机制并不清楚。金在骨髓网状内皮组织细胞中沉积,对骨髓有直接毒性作用。金也可通过影响造血祖细胞的嘧啶代谢而诱发再生障碍性贫血。雄激素相对缺乏可增加骨髓对金中毒作用的敏感性。

砷可引起一系列红细胞综合征,从非免疫性溶血性贫血到巨幼红细胞性贫血、铁粒幼红细胞性贫血,甚至骨髓再生障碍。据报道砷诱导的骨髓再生障碍可发展为急性白血病。骨髓象显示红细胞增生,伴有巨幼粒细胞性特征,或细胞增生减低,或出现环状铁粒幼红细胞,也可见严重的核碎裂。砷还可直接作用于造血祖细胞或红系前体细胞。

对红细胞生成有毒作用的金属元素还有锌、铜和铝等。锌中毒可通过诱导铜缺乏引起铁粒幼红细胞性贫血。铁与血红素结合需要铜,铜缺乏即可产生铁粒幼红细胞性贫血。铝中毒可引起小细胞性贫血,多见于血液透析人群。铝可对血红蛋白合成造成损伤,使用螯合剂去除铝可纠正贫血。

## (三) 其他化学因素

众所周知,苯和红细胞生成障碍,尤其是再生障碍性贫血有关。苯引起的血液学异常包括巨幼红细胞性贫血,各类血细胞减少综合征,红细胞增多症和急性白血病。骨髓检查显示正常细胞性,巨幼粒细胞性改变,或不同程度的细胞减少到再生障碍。轻度中毒者停止接触后血液学指标可恢复。苯可在骨髓脂肪中沉积,通常认为苯是通过其代谢产物如对苯二酚和苯酚作用于骨髓的。认为是代谢产物起作用的间接证据是来自对甲苯的研究,无造血毒性的甲苯在细胞色素P-450的代谢中与苯竞争,可降低苯的毒性。二甲苯和烷基苯对红细胞生成并无影响。苯代谢物的作用机制还不清楚,可能是抑制DNA合成或引起DNA断裂,与造血蛋白不可逆性结合,或损害基质细胞,引起某些必需细胞因子特别是IL-1的生成障碍。

有机氯和有机磷与红细胞生成紊乱,特别是再生障碍性贫血有关,但其机制仍未知。农药中毒者的红细胞乙酰胆碱酯酶活性降低,这一异常现象也发生在阵发性睡眠性血红蛋白尿(PNH)患者中。

乙醇作为一种环境毒物也有一定的骨髓毒性。长期接触乙醇者可有一系列异常表现:如巨幼红细胞性改变,红系前体细胞的空泡形成,环状铁粒幼红细胞性改变等。但这些改变是暂时的,停止摄入后几天内即可恢复。乙醇诱导的红系毒性分为三个阶段:负叶酸平衡,巨幼粒细胞和环状铁粒幼红细胞阶段。治疗剂量的叶酸对叶酸缺乏的乙醇中毒个体并无作用,说明乙醇损伤红系前体细胞中的叶酸利用,停止摄入可得到纠正。30%~50%的滥用乙醇者的骨髓象中可见环状铁粒幼红细胞,大小与铁缺乏相似。

#### (四) 药物对红细胞生成的毒性作用

一些生物制剂对红细胞生成有毒性作用。重组 DNA 技术广泛运用于造血和免疫反应中分子克隆和许多细胞因子和生长因子的合成。这些细胞因子,如干扰素(interferons, IFNs)和白介素-2(interleukin-2, IL-2)可直接用于肿瘤等疾病的临床治疗;而促红细胞生成素(EPO)、粒-单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)可用于临床支持治疗和防治继发病。

$\alpha$ IFN 是近来广泛应用于临床的药物,但 IFN 对造血祖细胞有部分抑制作用,可引起轻度贫血。 $\gamma$ IFN 和  $\beta$ IFN 对 CFU-E 集落形成有直接抑制作用, $\alpha$ IFN 间接作用于骨髓附属细胞。在体外,高浓度的重组 EPO(rhEPO)可纠正  $\gamma$ IFN 的抑制和促红细胞生长作用,但  $\gamma$ IFN 也可削弱贫血刺激 EPO 产生的作用。GM-CSF 和 G-CSF 主要用于治疗粒细胞减少症,对红细胞生成似乎无毒性作用。

许多临床使用的化学药物对红细胞生成也有毒性作用。如心血管药物甲苯多巴,抗心率失常药普鲁卡因胺以及血管紧张素转化酶抑制剂等与自身溶血病有关;一些抗惊厥药如乙内酰胺,丙戊酸,卡马西平在治疗过程中可引起再障;抗焦虑药如甲苯氨酯,氢氧化物可引起再生障碍性贫血;吩噻嗪引起粒细胞缺乏症,但也与骨髓再生障碍所致的贫血有关;麻醉性镇痛药对红细胞生成作用很小,但非麻醉性镇痛药与再障有关,包括吲哚美辛、保泰松、舒林酸和双氯芬酸钠;接触 NO 可通过抑制蛋氨酸合成引起巨幼红细胞性贫血,氟烷与纯红细胞再生障碍性贫血有关。激素、激素替代剂和激素拮抗剂对红细胞生成也有毒性作用,如口服降糖药氯磺丙脲和甲苯磺丁脲可使成熟红细胞和骨髓红系祖细胞补体依赖的自身免疫功能破坏,进而引起贫血;一些抗甲状腺药可引起贫血;雄激素可引起红细胞增多,继而造成血粘度增加;应用雌激素可抑制 B 细胞增殖;有报道使用己烯雌酚引起骨髓再生障碍,但这类病例很罕见;抗肿瘤药对造血有一定程度的抑制作用。但在有些情况下,抑制细胞增殖是主要的治疗手段,如在治疗急慢性白血病或骨髓增殖性疾病(红细胞增多症)时。

#### (五) 继发性红细胞生成抑制

一些原发病本身可抑制红细胞生成,使药物的毒性作用复杂化,如乙醇中毒性贫血,化疗引起的恶性微血管性贫血等。此外,慢性感染、炎症和恶性疾病也常引起贫血,此类贫血称为慢性病性贫血(anemia of chronic disease, ACD),与单纯因失血继而铁缺乏所致贫血的病因不同。有人对慢性病性贫血患者进行调查分析发现,52%的贫血患者并无出血、溶血或血液恶性病的证据。

通常认为 ACD 发展过程可分为三个阶段:①少量红细胞的减少,产生对骨髓增加红细胞生成的需求;②因 EPO 产生及红系祖细胞增殖和分化能力受损使骨髓不能满足增加造血需求;③单核吞噬细胞系统(RES)释放铁的能力受损。根据贫血和与其相关疾病的关系,认为一些炎性反应因子,如 TNF、IL-1 和 IFNs 可能是贫血的介质。在 ACD 患者中这些细胞因子的浓度常增高。

贫血常见于除了成人多囊肾外的各种原因引起的肾衰竭患者。尽管涉及多种发病机制,如红细胞寿命缩短、铁缺乏、骨髓纤维化等,但主要的病因是 EPO 产生不足。而甲状腺素、肾上腺

皮质激素和雄激素不足也可继发红细胞生成受抑。

### 第三节 白细胞系毒理学

粒细胞系的发生经历原粒细胞、早幼粒细胞、中幼粒细胞、晚幼粒细胞,进而分化为成熟的杆状核粒细胞和分叶核粒细胞释放入血。

正常成人白细胞数为 $(4 \sim 10) \times 10^9/L$ 。当粒细胞总数降至 $3 \times 10^9/L$ 称为粒细胞减少;粒细胞数达 $1 \times 10^9/L$ 时,病人容易发生感染;粒细胞数降至 $0.5 \times 10^9/L$ 时,极易发生严重感染。粒细胞缺乏是指边缘池和骨髓中均缺乏中性粒细胞(也称中性粒细胞减少)。粒细胞减少症是化学物诱导骨髓损害的最常见的表现,也可由电离辐射所致。烷化剂和抗代谢药物可引起粒细胞减少,吩噻嗪类、非甾体类抗炎药、抗甲状腺药物以及某些抗惊厥药有时也可诱发此反应。使用氨基比林或保泰松后由药物半抗原引起的外周粒细胞破坏则并不常见。

通常,应用肾上腺素、可的松以及一些内毒素后发生的短暂性外周血粒细胞过多并无生理意义。当粒细胞数超过 $10 \times 10^9/L$ 时称为粒细胞增多。慢性粒细胞增多常与接触特殊的化学物无关联,除非发生在白血病的初发阶段。

接触许多药物和环境理化因素可影响白细胞的生成或白细胞寿命。人和许多种属的动物在骨髓细胞产生的动力学方面非常相似。大多数物种产生红细胞和血小板的周期为4天,牛产生中性粒细胞的周期为6天,人产生中性粒细胞需10~14天。比较活跃的动物如猫和犬,其中性粒细胞产生的时间短于6天;能在较短时间内产生白细胞通常是因为其有丝分裂间期较短。

#### 一、白细胞对毒性物质的反应

药物的作用:白细胞减少和骨髓衰竭可因药物针对肿瘤的细胞减数治疗造成。一般说来,烷化物(如氮芥、白消安、苯丁酸氮芥和环磷酰胺)和抗代谢类(如甲氨蝶呤和氟尿嘧啶)都是最常见的与白细胞减少和中性粒细胞减少(联合放疗时加重)相关的药物。动物对髓细胞抑制治疗的反应差异取决于其干细胞池的正常不稳定性程度。比较不同动物间对某些药物和(或)疗法的敏感性,有助于我们选择更合适的动物模型用于毒理学实验或危险度评价。动物如猫、犬、灵长类动物以及啮齿动物,往往对炎症情况敏感,在轻微抑制治疗后会产非常迅速的反应,并且可比牛等动物骨髓敏感性低的动物承受更大的治疗剂量。对于后者,很难用此类药治疗肿瘤,或者因为考虑到试验的安全性等因素使治疗很难继续进行下去。骨髓克隆培养试验表明,有些化合物对鼠干细胞比对人或犬科动物具有更大的耐受性。因此对于这些化合物来说,犬是髓细胞毒性实验更合适的动物模型。因裸鼠能够耐受更大的治疗剂量,采用化疗可能治愈移植到裸鼠上的人类肿瘤。

真菌毒素是重要的食物链污染物,是谷物在潮湿条件下收获或不当储存所产生的。蛇形菌素(Diacetoxyscirpenol)是由镰刀菌属所产生的,为单端孢霉烯类真菌毒素的一种。当静脉给予猪、牛、和犬 $0.5\text{mg/kg}$ 时,均导致伴有核左移的严重的中性粒细胞减少症和毒血症。

铅对许多动物白细胞系统的影响已经定论。在大鼠,长期经口摄入无机铅导致早期髓系和

红系的不同步高增殖性改变。铅染毒大鼠可导致白细胞总数减少,而粒细胞数接近正常。骨髓粒细胞增生同时伴有外周血粒细胞的正常或减少时,称为无效骨髓细胞生成。在犬,白细胞数量和形态学改变均无特征性改变,也没有像人铅中毒所见到的嗜碱性点彩红细胞。大鼠和犬喂饲铅几周后,许多组织中的线粒体肿胀,溶酶体中出现由钙、镁和蛋白质组成的致密颗粒。暴露于铅的人群,贫血常是其晚期的特征,且常常是中等度贫血。血液学变化更多见于儿童,可能是因为儿童更容易合并铁缺乏。通常有网织红细胞轻度增加,且小斑点嗜碱性点彩红细胞是特征性表现,但阳性细胞仅为1%~2%。白细胞的变化不具特征性,但可以出现轻度毒性改变。

当各种具药理学活性的物质和外源性的化学物作用时,机体将以各种方式包括在白细胞数量和形态学上发生改变。尽管在不同动物和人类之间白细胞对毒性物质的反应存在差异,但最后的结局都涉及细胞数量紊乱、功能及形态学改变等。根据造血的特性和反应性,正确地选择适当的动物模型,将为潜在的毒性物质进行生物学评价提供可信的而有预见性的结果。

## 二、白血病

白血病代表一系列复杂的生物学疾病。其发生一般认为与病毒、放射线、化学物和遗传等因素有关。由于流行病学家和血液学家关注点的明显不同,使一些文献在探讨白血病与职业和环境因素关系的认识方面不够一致。

认识白血病为肿瘤性疾病已有150多年历史。而确认接触化学品和放射线导致白血病才半个多世纪。1939年Hunter报道了因职业接触发生苯中毒的89例中有一例患者为急性髓细胞性白血病(acute myelogenous leukemia, AML)。后来又陆续报道了一些因接触苯引起的白血病;但病例数较骨髓抑制即再生障碍性贫血,血小板减少和贫血等为低。20世纪下半叶,随着放疗和化疗技术的广泛应用,白血病前期或骨髓增生异常的发病率逐渐增加。同时发现,在继发于药物和化学物接触后的白血病人中,这些变化其实在白血病开始之前就已经频繁出现。白血病前期,在很大程度上表现为法-美-英(French-American-British, FAB)合作组分类中的骨髓增生异常综合征(myelodysplastic syndrome, MDS)。在MDS和AML之间,细胞生长和分化方面的功能性改变与实体组织瘤从化生和发育异常到肿瘤的进展相类似,并且通过研究发现两者在分子遗传上也是连锁的。说明MDS和AML可能代表同一疾病过程中的不同阶段,常见于化学性白血病形成过程中。

白血病患者通常白细胞计数超过 $30 \times 10^9/L$ 。在进展期的病人,其血液中的白细胞体积可超过血细胞比容,使血液颜色外观浅淡。慢性粒细胞性白血病较常发生在中年人,比急性粒细胞白血病的预后好。急性白血病若不采取有效化疗可在短期内死亡。通常将急性白血病分为两组,即急性淋巴细胞性白血病(acute lymphatic leukemia, ALL)和急性非淋巴细胞性白血病(acute non-lymphatic leukemia, ANLL),后者包括所有其他骨髓起源的白细胞性疾病。苯是目前惟一明确与人类白血病有关的化学物。但在实验动物中,丁二烯、环氧乙烷和烷化剂也可诱发白血病。

### (一) 白血病的定义和分类

白血病(leukemia)是一类起源于骨髓中单个干细胞或始祖细胞的单克隆性疾病,是常见的造血系统恶性肿瘤。发生白血病时循环血中的白细胞数目异常增加,且这种增加并不是由感染

所引起。通常,依据疾病自然史和早期恶性细胞的表型等将白血病分为髓细胞性和淋巴细胞性,主要取决于异常克隆的形态学是否与血细胞中的该系细胞的特征相一致。同时也发现,细胞表型与疾病的发展有一定的关系。慢性白血病,常有分化较好和功能相对成熟的异常细胞,通常自然病程较长。而急性白血病,其细胞为一种进展性的未分化表型。因此,白血病细胞成熟的特征是与病程进展紧密相关的,但与疾病最终预后并无必然的联系。

人类白血病可按不同方法分类,如 FAB 分型、免疫学分型和细胞遗传学分型等。按 FAB 分型,急性白血病分为:①急性淋巴细胞性白血病(ALL),按形态学细胞大小又分为  $L_1 \sim L_3$  三个亚型;②急性非淋巴细胞性白血病(ANLL),又称急性髓细胞性白血病(AML),按照细胞特性和分化程度等又可分为 8 个亚型,即  $M_0 \sim M_7$ ;除此以外,还有慢性淋巴细胞性白血病(chronic lymphatic leukemia, CLL),慢性髓细胞性白血病(chronic myelogenous leukemia, CML)以及骨髓增生异常综合征(MDS)等。

## (二) 白血病与环境因素

1. 急性髓细胞性白血病(AML) 又名急性髓样白血病或急性非淋巴细胞性白血病,是主要继发于接触化学物质和药物后的白血病。其 8 个亚型分别是  $M_0$ -微分化髓系白血病;  $M_1$ -未分化急性粒细胞性白血病;  $M_2$ -部分分化急性粒细胞性白血病;  $M_3$ -急性早幼粒细胞性白血病;  $M_4$ -急性粒-单核细胞白血病;  $M_5$ -急性单核细胞白血病;  $M_6$ -红白血病;  $M_7$ -急性巨核细胞白血病。具体分类依据详见有关白血病专著。

世界上报道继发于原发性恶性肿瘤接受烷化剂或放射线治疗后的 38 000 多例白血病患者中大多为 AML。MDS 和(或)AML 的白血病病人经过抗癌治疗以后,其 5 号或 7 号染色体发生缺失的频率大约平均在 67%~95% 之间。而这种细胞遗传学异常在原发性 AML 中频率要低得多。大多数出现 5 号染色体的部分长臂(5q-)缺失的病人在 AML 开始前出现一段“白血病前期”。这在职业接触苯和(或)与苯相关的混合溶剂后发生 AML 的病人中也有发现。通过检测苯接触工人的外周淋巴细胞发现,高浓度的慢性苯接触易导致 7 号和 8 号染色体高频率发生非整倍性畸变。在原发性的 AML 和继发性 AML(s-AML)中,5 号和(或)7 号染色体变异频率明显不同,这一点可能为鉴别两者提供非常有用的遗传学标记。相反,在研究中也发现其他有规律的克隆性染色体异常,例如 +8 或 +21,在暴露或非暴露的人群中均有增加,并不具有特异性。研究发现,除了 5 号和 7 号染色体以外,其他染色体都参与了 s-AML 的发病机制。但是,只有 5 号和 7 号染色体的畸变能作为遗传学标志物来区分原发性 AML 和 s-AML。

2. 慢性髓细胞性白血病(CML) 又名慢性髓样白血病或慢性粒细胞白血病,是一种克隆性的造血细胞恶性疾病。起源于多能干细胞或者少部分具有髓样和淋巴样分化潜能的细胞。CML 的特点是白细胞总数明显增加,以中、晚幼粒细胞为主,病程缓慢,伴脾肿大。除接触电离辐射外,CML 的其他病因还不清楚。对苯接触者的调查发现,CML 的发病率有所增加。但这些研究常缺乏细胞遗传学的证据。而且,相对于其他类型的白血病(主要是 AML)而言,接触苯的工人中 CML 不具代表性。

3. 慢性淋巴细胞性白血病(CLL) 是以单克隆性小淋巴细胞过度增殖,浸润骨髓、血液、淋巴结和其他器官,最终导致正常造血功能衰竭为特征的恶性疾病。大多数 CLL(占 95% 左右)都



是 B 细胞群的克隆性增殖所引起的,其特征是相对于正常细胞而言其增殖率较低,但细胞成活率较高。与其他白血病不同,CLL 是白血病中惟一表现为肿瘤细胞稳定不变的动力学倍增时间。

职业性暴露在 CLL 病因学中的作用还远不清楚。一方面,在接触电离辐射或接受烷化剂的治疗者中,CLL 的发病率并不增加。但是,有报道发现在生产橡胶轮胎工业中,与 CLL 相类似的淋巴瘤的发病率有所增加。早期研究主要认为可能是由于苯的作用而导致了 CLL 的产生。但是,在橡胶轮胎工厂中发现的白血病类型与接触苯而诱导的白血病类型并不一致;随后的研究也没有证实苯在 CLL 病因学中的作用。后来发现其他的溶剂例如四氯化碳、乙酸乙酯、正己烷或者二硫化碳与 CLL 的相关性比苯要强得多。但是这些相关因素中普遍缺乏因果关系。

4. 急性淋巴细胞性白血病(ALL) 又名急性成淋巴细胞性白血病或急性淋巴样白血病。依据恶性肿瘤克隆的免疫学特征可以分为 T 细胞性,B 细胞性或者非 T/非 B 性。尽管大多数 ALL 并不表达 B 或 T 细胞抗原,大约 80% 的 ALL 被认为来源于 B 细胞。ALL 的发病率表现为一种生物态年龄分布的现象。ALL 是儿童最常见的恶性疾病,在成年和中年人中少见,但 70 ~ 80 岁的老人中发病率又较高。除了已知与接触  $\gamma$  射线有关外,导致 ALL 的其他致病环境因素还不明确。

5. 多发性骨髓瘤 多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)是浆细胞异常增生的恶性肿瘤,表现为骨骼破坏,血清中出现单克隆免疫球蛋白,而正常的多克隆免疫球蛋白合成受抑。MM 是一种比较常见的疾病,大约占有恶性肿瘤的 1%,在人类造血系统恶性肿瘤中占近 10%。与 CLL 相似,MM 是一种老年性疾病,在 50 ~ 70 岁之间发病率上升,也有明显的家族倾向。MM 发病率增加可能与人类寿命延长以及诊断水平提高有一定关系。

职业和环境危险因素与 MM 发病的关系仍没有明确。在原子弹爆炸的幸存者中,高剂量的  $\gamma$  射线曾被认为是与 MM 发生有关的致病因素。但当 MM 与放射线的关系被报道的时候,那些病人从接触射线到 MM 发生实际上已间隔 20 年或更长的时间,这与发病随年龄而增加是相一致的。由于对原子弹爆炸的幸存者的队列分析并没有发现在这组人群中存在任何患 MM 危险性增加的证据,因此电离辐射与 MM 之间的关系还不能确定。苯接触与 MM 的发生的联系很弱且不一致,其因果关系不能令人信服。关于其他环境或者职业因素暴露对 MM 影响的报道,因其可靠性各异,也无定论。

6. 非霍奇金淋巴瘤 非霍奇金淋巴瘤(non-Hodkin's lymphoma, NHL)不是一种单一的疾病,而是一组可能由不同病史来源的恶性肿瘤。NHL 由不同亚型的细胞构成,这些细胞的表型与某些类型的白血病相对应,如伯基特淋巴瘤和 ALL-L3,一些弥漫性完全分化的淋巴瘤和 CLL 之间。然而,依据细胞的来源,疾病弥漫和扩散的方式,大多数 NHL 可与白血病相鉴别。

已知在许多免疫功能抑制或失调的病人中,NHL 的发病率增加。无论是明显的免疫抑制还是慢性抗原刺激,其在疾病的发病机制中都各有特点。在器官移植中,使用免疫抑制药物,如硫唑嘌呤、环磷酰胺、环孢菌素 A,或由于使用抗 T 淋巴细胞的抗体而造成的 T 细胞缺陷,可使淋巴瘤发生的危险性增加 50 倍。这些肿瘤都来源于 B 细胞,肿瘤细胞的基因组结构中有 EB 病毒基因组结构。所有病例的普遍特征是:明显的免疫抑制,EB 病毒感染,以及一些因子如环孢菌素不能通过以效应性淋巴细胞为靶细胞而产生作用,说明免疫抑制在医源性 NHL 中可能起直接作用,而并非由直接的遗传毒性机制所致。

## 第四节 血小板对中毒损伤的应答

正常人循环中血小板的数量变动在  $150 \times 10^9/L \sim 350 \times 10^9/L$  范围内, 血小板必须达到一定的数量才能维持正常的止血功能。人血小板平均寿命约为 8~9 天, 通常, 在需要时骨髓加速血小板生成 2~6 倍以补偿减少的血小板, 因此血小板寿命的适度缩短不会导致血小板减少症。在病理状态下, 血小板的寿命有时会缩短至几天, 甚至几小时, 即会促发血小板减少症和出血的症状。当血小板低于  $50 \times 10^9/L$  时, 可出现小的皮下出血、瘀斑和齿龈、胃肠道或尿道出血等症状。

有些外源性化合物通过直接作用于循环中的血小板而引起血小板减少症。有的可以诱导一种免疫应答, 产生抗体并与血小板膜上的靶蛋白结合, 引起血管内和(或)血管外血小板的破坏。一些药物, 如某些抗生素不仅能抑制血小板功能, 还可引起血小板减少症, 而且即使在血小板水平很高情况下, 也可能引起出血。具有重要临床意义的血小板减少症可由两种不同的机制引起: 一是因骨髓中缺乏生成血小板的巨核细胞而引起的血小板生成不足; 二是外周血中血小板的破坏增加。外源性化学物可通过其中的任一机制导致血小板减少症。

癌症患者或者器官移植接受者、自身免疫性疾病患者, 长期大量使用任何一种骨髓抑制药物都可以导致血小板减少症。同样, 一些抗病毒药物也是如此, 如用于治疗人类免疫缺陷病毒(HIV)感染的 3-叠氮基-3-脱氧胸苷(AZT)。苯和其他一些有机溶剂如煤油、四氯化碳等也都具有清除骨髓的特性。阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、甲氧蝶呤、白消安、环磷酰胺及顺铂等化疗药物都可抑制巨核细胞; 然而长春新碱却有保护血小板生成的倾向。间接证据表明, 一些用于治疗癌症的药物如放线菌素 D、苯乙哌啶酮、顺铂、苏拉明、硫脲嘌呤及环孢菌素 A 偶尔也有抗体介导的破坏血小板作用。临床上因骨髓抑制剂和免疫抑制剂可造成血小板减少症, 在一定程度上限制了这些药物的使用。如果一种新的血小板生成激素如巨核细胞生长和发育因子(MGDF)(也有命名为血小板生成素或 TPO)用于临床, 这种限制也许会减少。

许多外源性化学物可能是引起散发性的、无显著特点再生障碍性贫血的诱因。这种并发症并不存在剂量-反应关系, 但持续和间歇暴露后病情进一步发展, 这种药物高敏感性疾病的分子机制还不清楚。抗惊厥药、氯霉素、磺胺、重金属如金, 及非甾体类消炎药都非常容易导致这种并发症。一般来说, 接触这些药物者可发生全血细胞减少症。

阿纳格雷是一种口服有效的噻唑啉类化合物, 可选择性地引起血小板减少症, 而对粒细胞和红细胞作用相对甚微。阿纳格雷作用的分子机制尚不明确。阿纳格雷这种选择性抑制血小板生成的特性使其成为一种治疗初发和复发性血小板增多症的理想药物。

乙醇对血小板生成的抑制作用是相对比较特异的。乙醇也可抑制血小板的功能。这可解释为什么一些因酗酒而患有轻微血小板减少的病人容易出现出血症状。但乙醇引起的血小板减少症是可逆性的, 通常在停止饮酒 2 周后得以纠正。但因未知的原因, 有的病人即使戒酒很长时间仍然存在血小板减少症。

有些种类的动物在接受大剂量的雌激素后, 会产生严重的血小板减少症。然而发生这种现象有很大的种属差异。在人群中因雌激素而引起与巨核细胞发育不全相关的水小板减少症只有

少量的报道。这些病人在接触二乙基己烯雌酚后会罹患急性血小板减少症,提示这种药物会破坏循环中的血小板。这种与雌激素相关的血小板减少症在男性人群中鲜有报道,说明男性对雌激素诱导的巨核细胞分化和成熟的抑制有一定的抵抗力。

获得性和先天性血小板减少的鉴别通常很困难,但药物因素是其最常见的原因。骨髓抑制性抗癌药可引起血小板减少,且常为骨髓功能整体受抑的一部分。尚未发现接触化学物质引起的循环血小板异常增加(血小板增多症)。

## 第五节 血液毒理学研究方法

血液毒理学研究用来判断和评价某种环境物理因素、外源性化学物或药物潜在的血液毒性、骨髓毒性、血液学效应的潜伏期和可逆性等。外周血液学和骨髓组织学分析是评价造血组织的主要方法。

外周血液学分析包括的内容很多,如血细胞计数、分类和血红蛋白含量测定;血细胞功能测定;血细胞膜脆性、膜抗原、膜结构、酶活性以及基因表达水平;外周血细胞形态学、基因结构和染色体分析等。骨髓组织学分析包括骨髓细胞形态学、分类、细胞分化程度、基因结构和表达水平等。涉及的分析检测技术包括化学、生物化学、组织化学、免疫细胞化学、细胞生物学、细胞遗传学、分子生物学、基因组学等。

除此以外,还常选择动物模型评价环境理化因素或药物的血液毒性。使用动物模型时,理想的状况是其药效学与人可比。在普通毒理学研究中,最常用的动物种类是小鼠、大鼠、犬、非人灵长日和兔等。动物应是健康、青壮年、相同年龄和体重的成年两性动物。选用动物模型评价血液毒性,除了要考虑一般毒理学实验中遵循的原则外,还应特别注意各种动物造血系统的特性。如大小鼠作为动物模型的优点是体积小,尤其是当受试物短缺或昂贵时使用小动物更加经济和可行。但小鼠代谢率较高,可能影响受试物对造血系统的效应。另外,大小鼠体积小和有限的血容量也常常限制了对血液和骨髓标本的频繁采集和评价,通常需用足够的动物分次宰杀来满足对血液学效应评价的要求。当使用这些动物模型时,还应考虑啮齿类与人类的其他区别包括红细胞寿命、白细胞分布和免疫生物学特性等等。大动物如犬和猴作为血液毒性评价模型的主要优点是体积大,可连续采血和从骨髓抽样。这两种动物在造血和血细胞动力学上与人类也较相似。与用啮齿类动物相比,使用大动物的缺点是它们需要相对多的受试物,实验中容易引起呕吐等。

归纳起来,进行血液毒理学整体动物试验研究时应当注意以下几点:

1. 可能对试验结果产生影响的因素 动物实验的环境条件、动物的种属、品系、年龄、体重和健康状况;药代动力学结果中受试物和(或)代谢物的血液和组织浓度与血液毒性之间的相关性等。
2. 收集连续的血液和骨髓标本 建立受试物毒作用发生、发展的连续效应谱并为了解这些效应是否存在可逆性提供依据。
3. 动物实验合适剂量范围的确定 不仅对了解血液毒性的剂量-反应关系重要,有时还可控制结果的发生率。

4. 重视常规诊断和研究手段的应用 如对血液和骨髓的一般指标的观察,光学显微镜和电子显微镜技术的应用,以及特殊组织化学染色、血液免疫学技术和应用于整体和体内细胞在体外实验后再回输入体内的不同造血模型等。

(周建伟)

### 第一节 概 述

免疫毒理学(immunotoxicology)是在免疫学和毒理学基础上发展起来的一个毒理学分支学科,主要研究外源化学物和物理因素对机体免疫系统的有害作用及其机制。

免疫毒理学的研究内容主要包括以下几个方面:

1. 免疫毒性及作用机制研究 采用各种有效的研究手段,从整体、器官、细胞和分子等不同水平研究外源化学物和物理因素对人和实验动物的免疫损害,包括免疫抑制、超敏反应和自身免疫反应,并分析其作用机制。

2. 免疫毒性评价的方法学研究 改进、规范和完善已有的免疫毒理学试验方法,探索更灵敏、特异,更有预测价值的新方法和更全面合理的试验组合,提高试验的可靠性和效能。同时,从动物伦理学角度出发,为了顺应国际发展趋势,还要研究免疫毒理学的体外替代试验方法,以减少使用实验动物的数量。

3. 免疫毒性的危险度评价 研究适合于人群危险度评价的免疫毒性试验的观察终点,实验动物和人群免疫毒性的剂量反应规律和特性,建立合理的外推模型,分析免疫毒性的人群易感性和不同免疫危害的可接受危险度水平等。

有时候,免疫毒理学工作者也参与对外源化学物免疫毒性有预防和治疗作用的药品或保健品的研究。

免疫毒理学真正成为毒理学的分支还不到20年。虽然人们很早就注意到某些药物和外源化学物引起免疫异常的现象,如青霉素等药物引起的过敏性休克,职业接触某些食品添加剂引起的“面包师疱疹”,臭氧、氮氧化物、二氧化硫等空气污染物引起的呼吸道感染发病率升高、病情加重、病程延长等。但是,直到1977年Vos发表与毒理学有关的免疫抑制为题的综述,才将外源化学物对免疫系统的影响与毒理学联系在一起。作者根据一系列外源化学物对实验动物免疫功能的损害,推测接触外源化学物对人体免疫系统也可能有潜在的影响。国外最早的免疫毒理学专著出现在1983年(Gibson, et al)。1984年国际化学品安全规划署(IPCS)和欧共体委员会(CEC)共同组织的题为免疫系统是毒性损伤的靶的研讨会是免疫毒理学发展的重要里程碑,此后免疫毒理学才有了迅速的发展。

## 第二节 免疫系统对外源化学物的毒性反应与机制

免疫系统的主要功能是识别并清除入侵的病原体及其产生的毒素和体内产生的早期肿瘤细胞,保持机体内环境稳定(homeostasis)。在神经内分泌系统的调节下,免疫系统不同的免疫细胞和免疫分子协同作用,产生适当的免疫应答,这时免疫系统处于“正常状态”。在这种状态下,免疫系统能够充分发挥其免疫防御和免疫监视功能,又不至于产生不适当的应答。外源化学物和物理因素可以直接损伤免疫细胞的结构和功能,影响免疫分子的合成、释放和生物活性,或通过干扰神经内分泌网络等间接作用,使免疫系统对抗原产生不适当的应答,即过高或过低的应答,或对自身抗原的应答都会导致免疫病理过程,发展为免疫性疾病。应答过低可引起免疫抑制(immunosuppression),使宿主对病原体或肿瘤的易感性增加,严重时表现为免疫缺陷;应答过高则表现为超敏反应(hypersensitivity)。如自身抗原应答细胞被激活,则引起自身免疫(autoimmunity)(图 12-1)。

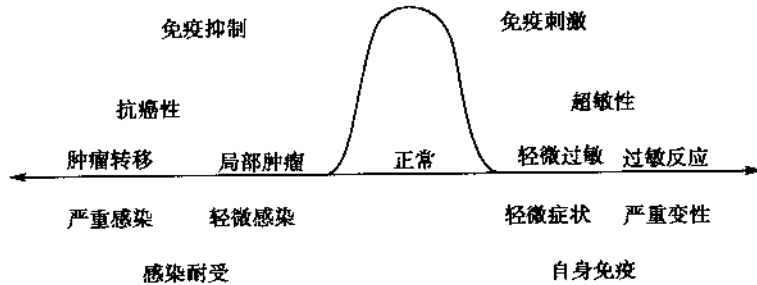


图 12-1 免疫反应的连续过程和可能结果

值得注意的是外源化学物对免疫系统的影响可能是复杂的过程,在以免疫系统为毒作用靶的同时,对非免疫系统的毒作用也可以影响免疫功能;反过来,对免疫系统的损害也可以影响其他组织器官的功能,有时两者之间是很难区别的。有的化学物既可以直接作用于免疫系统,又可以通过其他组织器官的毒性影响免疫功能。有的化学物可以引起多种异常的免疫应答,如铅、汞等重金属既可以引起免疫抑制,又可以引起超敏反应和自身免疫。

### 一、免疫抑制

1. 外源化学物免疫抑制的主要表现 外源化学物免疫抑制的结果是宿主抵抗力降低,主要表现为抗感染能力降低和肿瘤易感性增加。通过各种宿主抵抗力试验,在动物身上已经得到充分的证明。由于人群接触某些潜在免疫抑制剂的剂量和接触时间较难估计,加上其他众多的影响因素,有时难以做出准确的评价,但是可以从相对控制的临床用药人群中得到比较可靠的证据。如患自身免疫性疾病、慢性炎症和器官移植的临床病人使用免疫抑制剂后,细菌、病毒和寄生虫感染性并发症的发生率增高,使用免疫抑制剂的器官移植病人继发肿瘤的发生率增高。在一项大规模的临床研究发现,存活 10 年的肾移植病人癌症发生率可高达 50%,出现的肿瘤是

异质的(heterogenous),包括皮肤癌和唇癌(发病率比普通人群高21倍)、非霍奇金淋巴瘤(高28~42倍)、卡波西肉瘤(高400~500倍)和宫颈癌(高14倍)。因此人们推测,非临床接触免疫抑制剂也有可能产生严重的不良后果。实际上其他环境污染物引起的人群免疫抑制也有不少报道,如台湾多氯联苯和二呋喃污染食用油中毒事件中受害者免疫功能下降,肺部感染率增高。父母吸烟的学龄儿童因患呼吸道感染性疾病而缺课的比例明显高于父母不吸烟的儿童,可能是因为被动吸烟影响儿童呼吸道的抗感染力和免疫功能所致。非霍奇金淋巴瘤的病因可能与接触二噁英、多氯联苯、氯丹、氯酚等环境污染物有关,室内烹调油烟污染与女性肺癌之间也存在一定的关系。

2. 引起免疫抑制的外源化学物 可以引起免疫抑制的外源化学物种类繁多,目前研究较充分,结论比较肯定的有上百种,美国国立环境卫生科学院(NIEHS)公布的有近50种。常见的免疫抑制因子见表12-1。

表 12-1 常见的免疫抑制因子

| 来源    | 种类                                                  |
|-------|-----------------------------------------------------|
| 药物    | 肿瘤细胞减灭剂(化疗药等)、组织和器官移植用药物、麻醉药、抗艾滋病药                  |
| 工业化学物 | 有机溶剂、多卤代芳烃、多氯联苯、多环芳烃、乙二醇醚类                          |
| 环境污染物 | 重金属及其化合物、空气污染物、紫外线、粉尘(二氧化硅、石棉等)、农药、真菌毒素(如Gliotoxin) |
| 嗜好品   | 乙醇、烟草(香烟)、大麻、鸦片、可卡因                                 |

3. 外源化学物免疫抑制的机制 外源化学物引起免疫抑制的机制并未完全明了,而且不同的外源化学物可以通过不同的机制影响免疫功能,总的来说可以分为直接作用和间接作用两大类。外源化学物可以直接作用于不同的免疫器官、免疫细胞和免疫分子,影响正常的免疫应答,也可以通过影响神经内分泌系统的调节功能,造成免疫功能紊乱,或者继发于其他靶器官毒性而引起免疫损伤(表12-2)。特别应该强调的是,近年来发现免疫系统不是单独发挥作用的,而是与神经系统和内分泌系统相互联系、相互作用、相互调节,构成维持机体自身稳态的复杂网络(图12-2),这对于发挥免疫系统正常的功能具有十分重要的意义。外源化学物对该网络某一环节的损害,都有可能影响正常的免疫功能。比如近年来发病率不断上升的慢性疲劳综合征(chronic fatigue syndrome, CFC)或多种化学物敏感综合征(multiple chemical sensitivities syndrome, MCS)就被认为是神经-内分泌-免疫系统网络功能紊乱所致。

表 12-2 外源化学物引起免疫抑制的可能机制

| 作用类型 | 作用机制 | 举 例                                                                         |
|------|------|-----------------------------------------------------------------------------|
| 直接作用 | 功能改变 | 改变抗体介导的反应<br>改变细胞介导的反应<br>改变组胺等介质的释放<br>改变宿主抵抗力<br>一种或多种细胞不能发挥以下功能:<br>产生抗体 |

续表

| 作用类型 | 作用机制        | 举 例                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|------|-------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 结构改变 |             | 释放细胞因子<br>处理和提呈抗原<br>增殖和分化                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|      |             | 受体介导的信号传导<br>表面受体或配体改变<br>受体或配体的表达改变                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 混合改变 |             | 淋巴器官的组织病理学改变<br>改变脾淋巴细胞 CD3 <sup>+</sup> 、CD4 <sup>+</sup> 、CD8 <sup>+</sup> 、B220 <sup>+</sup> 和(或) Ig <sup>+</sup><br>改变胸腺淋巴细胞 CD4 <sup>+</sup> 、CD8 <sup>+</sup> 、CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup> 和(或) CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>-</sup><br>改变血液细胞学参数<br>改变循环免疫球蛋白<br>改变骨髓祖细胞集落(CFU)组成 |
| 间接作用 | 代谢活化        | 转化为活性代谢产物                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|      | 继发于其他靶器官的毒性 | 肝损伤诱导的急性期反应蛋白(如 C 反应蛋白)                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|      | 激素水平改变      | 肾上腺释放皮质激素增加                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
|      |             | 改变神经内分泌调节                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

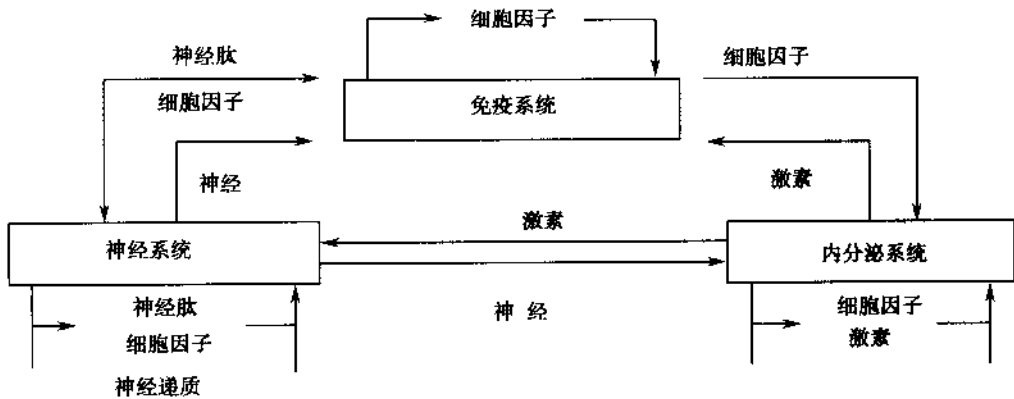


图 12-2 免疫、神经、内分泌系统关联示意图

此外,随着分子生物学、分子免疫学和分子遗传学的发展,人们对外源化学物免疫损伤的分子机制也有了进一步的认识。如外源化学物可以作用于转录核因子(nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B)或活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T-cell, NF-AT)引起免疫抑制。NF- $\kappa$ B 与抑制蛋白 I $\kappa$ B 结合形成无活性的 NF $\kappa$ B-I $\kappa$ B 复合物存在于胞浆中,当细胞受到某些免疫因子刺激后,可以导致 NF $\kappa$ B-I $\kappa$ B 解离,游离的 I $\kappa$ B 被降解,释放的 NF- $\kappa$ B 则迁移到核内,激活淋巴细胞靶基因,包括编码 IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-8、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ 、GM-CSF、MHC I、MHC II、ECAM-1、



ICAM-1、I $\kappa$ B 轻链等重要免疫调节基因的转录。糖皮质激素、对苯二酚、二甲基二硫代氨基甲酸盐等免疫抑制剂可以通过抑制 NF- $\kappa$ B, 引起免疫抑制。糖皮质激素不仅可以抑制 NF- $\kappa$ B 的转录, 还可以通过诱导 I $\kappa$ B, 使游离的 NF- $\kappa$ B 减少, 抑制 NF- $\kappa$ B 的活性。NF-AT 是免疫抑制剂环孢菌素 A (CsA) 和 FK506 的主要作用靶分子。NF-AT 在钙调神经磷酸酶 (calcineurin, CaN) 的作用下脱磷酸化后移至核内, 诱导 IL-2、IL-10 等细胞因子基因的转录。CsA 可与 CaN 形成复合物, 抑制 CaN 的活性, 阻止 NF-AT 的磷酸化, 因此阻断 IL-2 等重要细胞因子基因的转录, 抑制 T 细胞的活化。CsA 还可以促进 T 细胞的凋亡, 引起免疫抑制。

外源化学物还可以通过氧化应激反应、破坏细胞内钙稳态、抑制 cAMP 等机制影响淋巴细胞的正常功能, 引起免疫抑制。

## 二、超敏反应

超敏反应 (hypersensitivity) 也称为过敏反应 (anaphylaxis) 或变态反应 (allergy), 是机体对某些抗原初次应答后, 再次接受相同抗原刺激时发生的一种以生理功能紊乱和组织细胞损伤为主的异常的免疫应答。

1. 超敏反应的类型 1963 年 Grrl 和 Coombs 根据超敏反应的发生机制和临床特点, 将其分为 I、II、III 和 IV 型 (表 12-3)。

表 12-3 外源化学物引起超敏反应的类型

| 反应类型                 | 参与细胞和分子                        | 反应机制                                               | 临床表现                          |
|----------------------|--------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------|
| I 型<br>速发型           | IgE、肥大细胞、嗜碱性粒细胞                | 致敏细胞释放血管活性物质等, 使毛细血管扩张、通透性改变, 导致腺体分泌增加、平滑肌收缩       | 哮喘、鼻炎、特应性皮炎、胃肠变态反应、荨麻疹、过敏性休克等 |
| II 型<br>细胞毒型或细胞溶解型   | IgG 或 IgM、补体、M $\phi$ 、K 细胞    | IgG 或 IgM 与靶细胞结合, 活化补体, M $\phi$ 吞噬、K 细胞 ADCC 杀伤作用 | 溶血性贫血、粒细胞减少、血小板减少性紫癜、输血反应等    |
| III 型<br>免疫复合物型或血管炎型 | IgG、IgM 或 IgA、补体、嗜中性粒细胞、嗜碱性粒细胞 | 抗原抗体复合物在组织中沉淀引起细胞浸润、释放水解酶等                         | 慢性肾小球肾炎等自身免疫性疾病、过敏性肺炎等        |
| IV 型<br>迟发型          | T $_H$ 亚群细胞                    | 致敏 T $_H$ 释放淋巴因子吸引 M $\phi$ 并发挥作用                  | 接触性皮炎、湿疹、移植排斥等                |

2. 引起超敏反应的外源化学物 能引起超敏反应的外源化学物或混合物至少有数百种, 可以来自食物、药物, 也可以从职业或生活环境中接触。部分常见的致敏因子见表 12-4。

3. 外源化学物超敏反应的表现 超敏反应是危害人类健康的重要疾病之一, 影响的人群非常巨大。据估计, 美国至少有 3 500 万人患有超敏反应性疾病, 其中 2% ~ 5% 由职业性接触引起。职业接触外源化学物引起的超敏反应, 最主要的表现为接触性皮炎和过敏性哮喘。

接触性皮炎也称为过敏性皮炎, 约占全部职业性皮炎的 60%, 是致敏因子引起的迟发型 (IV 型) 超敏反应, 皮肤表现可以多样化, 一般为红肿、硬结和湿疹样改变, 严重时可引起局部组织坏死、皮肤溃疡和剥脱性皮炎。组织病理学改变为血管周围有单核细胞浸润, 表皮与真皮之间发生

水肿。另外有一种光过敏性皮炎,主要表现为类似晒斑的皮肤损害,为光敏性(photosensitivity)化学物与光线照射同时作用所引起的皮肤超敏反应,可伴有全身表现。常见的光敏性化学物有沥青、焦油等工业化学物,氯丙嗪、磺胺类、四环素、氮氯噻嗪、某些喹诺酮类药物,清洁剂、化妆品等生活用品,以及灰菜、芥菜、马齿苋、马兰头、无花果等食物。这类化学物单独作用时无明显的皮肤损害,但吸收特定波长的光线后发生化学变化,成为具有抗原性的物质,从而产生光敏性接触性皮炎。

表 12-4 常见的致敏因子

| 来源     | 种类                                                                                               |
|--------|--------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 药物     | 青霉素类、磺胺类、新霉素、哌嗪、螺旋霉素、盐酸安普罗铵、抗生素粉尘、抗组胺药、奎尼丁、麻醉药、血浆替代品                                             |
| 食品     | 蓖麻子、生咖啡豆、木瓜蛋白酶、胰腺提取物、谷物和面粉、食品添加剂、真菌                                                              |
| 化妆品    | 美容护肤品、香水、染发剂、脱毛剂、指甲油、除臭剂                                                                         |
| 工业化学物  | 乙(撑)二胺、邻苯二甲酸酐、偏苯三酸酐、二异氰酸酯类(TMI、HDI、MDI、TDI)、金属盐类、有机磷、染料(次苯基二胺等)、重金属(镍、汞、铬酸盐等)、抗氧化剂、增塑剂、鞣革制剂(甲醛等) |
| 植物     | 毒常青藤、橡树、漆树、豚草、樱草、花粉等                                                                             |
| 混合物有机体 | 棉尘、木尘、动物产品                                                                                       |

过敏性哮喘是过敏性肺病的典型表现。美国和欧洲职业性哮喘人群占0.2%~6%,日本约15%的哮喘病例与职业有关。接触甲苯二异氰酸酯(TDI)的工人有5%~10%出现过敏性哮喘,生产洗涤剂的工人约有2%因吸入产品中的酶类引起过敏性哮喘,金属冶炼厂接触铂盐的工人,呼吸道疾病的发病率也非常高。其他过敏性反应可表现为过敏性鼻炎、肺部肉芽肿等,如敏中毒性慢性肺炎和肺部肉芽肿。

有些化学物可以在不同的条件下引起不同类型的超敏反应,或者多种超敏反应同时存在。如青霉素通常引起Ⅰ型超敏反应,表现为过敏性休克、哮喘和荨麻疹,但也可以引起Arthus反应和关节炎等Ⅲ型超敏反应,长期大剂量静脉注射还可以引起Ⅱ型超敏反应,反复多次局部涂抹则可引起Ⅳ型超敏反应所致的接触性皮炎。

4. 外源化学物引起超敏反应的机制 目前有关外源化学物引起超敏反应机制的研究资料较少,远不如对免疫抑制机制的认识。常见的致敏因子有些本身就是一种抗原,如异种血清蛋白、洗涤剂中添加的酶、动物毛发和皮片、植物、花粉、微生物、尘螨等。但大多数致敏性外源化学物本身是小分子的半抗原,如氯乙烯、TDI、三硝基氯苯、重金属镍、铂等,当它们进入机体后与某些蛋白或其他大分子载体形成复合物才具有抗原性。外源化学物获得抗原性后可以通过上述4种不同的反应机制引起各种超敏反应。致敏性外源化学物可能因为有些某些结构上的特性使它们更容易与蛋白相结合,另一种可能是有的外源化学物可以调节机体识别、处理抗原的能力或免疫应答的强度,使机体处在高敏感状态,可以对更多的物质过敏或使超敏反应的强度增加。如职业性接触铅的工人过敏者血清IgE抗体高于非过敏者。汽车尾气、石英、炭黑等粉尘还能作为佐剂,刺激针对其他抗原的免疫反应。

### 三、自身免疫

2011年12月10日 14:02:00 第12章 自身免疫

自身免疫(autoimmunity)是指机体免疫系统对自身成分发生免疫应答的现象,自身免疫性疾病(autoimmune disease)是因机体免疫系统对自身成分发生免疫应答而导致的疾病。

1. 自身免疫的表现 自身免疫是自身免疫性疾病的先决条件,但发生自身免疫反应并不意味着出现疾病状态,引起自身免疫性疾病还有其他许多相关的要素。自身免疫性疾病的临床表现很复杂,因为它不是一种疾病,目前已知的至少有20多种,可以分为器官特异性和器官非特异性两大类。器官特异性自身免疫性疾病常局限于某一特定的器官,对该器官特异性抗原进行免疫应答,典型的有胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)和多发性硬化症(MS)。器官非特异性自身免疫性疾病又称为全身性或系统性自身免疫性疾病,病变可出现在多种器官和结缔组织,因此又叫结缔组织病或胶原病,典型的有系统性红斑狼疮(SLE)和类风湿性关节炎(RA)。其他常见的自身免疫性疾病有免疫复合物型肾小球肾炎、自身免疫性血小板减少性紫癜、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性甲状腺病等。

自身免疫性疾病以女性为多见,女性的发病率大约是男性的2.7倍。除了不同受累器官组织损伤和功能异常的表现外,还可以在血液检测到高效价的自身抗体和(或)自身应答性T细胞。经常反复发作,慢性迁延,其转归与自身免疫应答的强度密切相关,免疫应答强烈者可出现进行性损害。外源化学物引起的自身免疫性疾病在停止接触后往往可以恢复。

2. 引起自身免疫的外源化学物 很多能诱发Ⅱ型、Ⅲ型和Ⅳ型超敏反应的外源化学物都可以引起自身免疫,其中有许多是药物。最常见的例子是能引起中性粒细胞减少症、血小板减少症和免疫性溶血的药物,如多种抗生素和苯妥英等抗惊厥药。SLE患者10%~20%有使用普鲁卡因的历史,使用硫酸胍苯达嗪的患者,5%~20%出现药物诱发的SLE。引起人群自身免疫性疾病的常见外源化学物见表12-5。

表12-5 引起人群自身免疫性疾病的常见外源化学物

| 自身免疫性疾病             | 外源化学物                                       |
|---------------------|---------------------------------------------|
| 系统性红斑狼疮/免疫复合物型肾小球肾炎 | 胍苯达嗪、青霉素、氯丙嗪、抗惊厥药、异烟肼、普鲁卡因酰胺、紫花苜蓿芽、重金属、有机溶剂 |
| 溶血性贫血               | 氨基多巴、青霉素、甲灭酸、苯妥英、干扰素-α、磺胺药                  |
| 血小板减少症              | 乙酰唑胺、氯塞嗪、利福平、奎尼丁、氨基水杨酸、金盐                   |
| 硬皮病类                | 氯乙烯、石英、L-色氨酸                                |
| 天疱疮                 | 青霉素、吡啶硫胺素                                   |
| 甲状腺炎                | 多氯联苯、多溴联苯、碘、锂、IL-2                          |

3. 外源化学物引起自身免疫的机制 外源化学物引起自身免疫的机制尚不清楚,但是关键的过程是使机体失去自身免疫耐受,针对自身抗原产生自身抗体和(或)自身应答性T细胞,进行免疫应答,其机制类似于Ⅱ型、Ⅲ型和Ⅳ型超敏反应。如抗血细胞表面抗原的抗体可导致自身免疫性溶血性贫血、血小板减少症和中性粒细胞减少症;抗促甲状腺激素受体(TSHR)的自身IgG抗体,作用于TSHR,刺激甲状腺细胞过度分泌甲状腺素,引起甲状腺功能亢进;抗肾小球基

底膜Ⅳ型胶原抗体引起肾小球肾炎。上述都是自身抗体引起的Ⅱ型超敏反应导致的自身免疫性疾病。SLE一般是Ⅲ型超敏反应所致的自身免疫性疾病,患者体内可针对核体、剪接体、胞质小核糖蛋白复合体等核抗原产生自身IgG抗体,这些抗体与相应核抗原形成大量免疫复合物,沉积在肾小球、关节和其他脏器的小血管壁,激活补体,造成细胞损伤。损伤的细胞释放更多的核抗原,结果产生更多的自身IgG,形成更多的免疫复合物,引起广泛的小血管炎症性损伤。自身免疫性疾病也可以由T细胞对自身抗体发生免疫应答所引起。CD8TCL和 $T_{H1}$ 都可以造成自身细胞的免疫损伤,IDD患者 $CD8^+$ TCL可对胰岛的 $\beta$ 细胞发生免疫应答,将其特异性杀伤。

外源化学物可以造成自身隐蔽抗原的暴露或释放、改变自身抗原或形成新的自身抗原,从而引起自身免疫。研究发现吸烟引起肺部炎症,损伤肺泡毛细血管内皮细胞,使位于毛细血管内皮细胞和肺泡上皮细胞之间的肺基底膜暴露,血液中的抗基底膜Ⅳ型抗原抗体得以结合在基底膜上,产生免疫损伤性炎症,引起肺出血。临床上肺出血肾炎综合征患者几乎都是吸烟者。某些药物改变血细胞或其他组织细胞的抗原性,这种改变了的抗原刺激机体产生自身抗体,如甲基多巴能改变红细胞膜上Rh系统的e抗原,使机体产生抗红细胞抗原。长期服用甲基多巴的患者10%~15%抗球蛋白试验阳性,约1%出现溶血性贫血。胍苯达嗪、异烟肼等药物能与细胞核内组蛋白或DNA结合,改变其抗原性,诱导自身抗体,长期服用这些药物可以引起红斑狼疮样病变。双胍苯达嗪经CYP1A2转化为活性代谢产物后可以与CYP1A2特异性结合,形成新抗原,可能诱发异常免疫应答,引起自身免疫性疾病。

某些病毒或细菌与正常宿主细胞或细胞外成分具有相似的抗原决定基或交叉抗原,针对这些抗原决定基或交叉抗原的应答可引起自身免疫性疾病。这种现象也叫分子模拟(molecular mimicry)。

外源化学物还可以影响正常的免疫调节功能,如激活对自身抗原处于耐受态的T细胞,或通过抗原提呈细胞表面辅助刺激因子异常表达,或引起 $T_{H1}$ 和 $T_{H2}$ 功能失衡,引起自身免疫。辅助T细胞亚群 $T_{H1}/T_{H2}$ 失衡与免疫毒性,尤其是人的免疫反应关系密切,如 $T_{H1}$ 反应过度增强与器官特异性自身免疫性疾病,如多发性硬化症和桥本甲状腺炎有关,而系统性自身免疫性疾病,如风湿性关节炎和系统性红斑狼疮等与T淋巴细胞极化的关系则不明显。汞及其化合物引起的自身免疫性肾小球肾炎也被认为与 $T_{H1}$ 和 $T_{H2}$ 功能失衡有关,这在实验动物已经得到证实。许多细胞因子,如TNF- $\alpha$ 、干扰素、多种白细胞介素,以及NO等前炎症因子在自身免疫性疾病的发病机制中也有重要作用。

此外,虽然自身免疫疾病是免疫系统疾病,但也受许多非免疫因素的影响,包括T细胞受体多态性、药物代谢表型等遗传因素和感染、应激、膳食等非遗传因素。如汞及其化合物引起的自身免疫性肾小球肾炎具有明显的遗传特异性,在实验动物主要表现为敏感性的种属差异。对Brown Norway大鼠和A. SW、C57BL/6小鼠非常敏感,而Lweis大鼠和DBA/2小鼠却不敏感,Lweis大鼠不仅不出现自身免疫性肾炎,还表现为免疫抑制。同物种不同品系间及不同个体间自身免疫发病率也不同,如新西兰黑小鼠自身免疫疾病的发病率特别高。主要组织相容性抗原复合物(MHC)的不同基因型,自身免疫性疾病的易感性也不同。携带HLA-DR2、HLA-DR3、HLA-B8基因者,SLE和IDDM的发病率远远高于正常对照人群,金盐和D-青霉胺引起的RA和白细胞减少症患者多携带HLA-DR4。

### 第三节 免疫毒性检测方案

由于免疫系统组成和功能的高度复杂性,以及免疫毒物毒作用的靶细胞和靶分子的多样性,目前还没有一种免疫毒理学试验方法能够全面地反映外源化学物对整个免疫系统的影响,因此一般采用一组免疫毒性试验的方法。不同的国家和组织分别设计了各自的试验组合,包括动物免疫毒性检测方案和人群免疫毒性检测方案。

迄今为止我国还没有一个组织或毒理学评价规范中要求对化学物进行全面的免疫毒性检测,但这是一种发展趋势,也是我国的毒理学评价工作与国际接轨的需要。因此,我们应该加强免疫毒理学的研究,重视外源化学物免疫毒性的检测,当前可以参考国外的检测方案。如美国 NTP 推荐的小鼠免疫毒性检测方案(表 12-6),WHO 推荐的人群免疫毒性检测方案(表 12-7)。

表 12-6 美国 NTP 推荐的小鼠免疫毒性检测方案(Luster,1988)

| 检测项目     | 检测内容                                                      |
|----------|-----------------------------------------------------------|
| 筛选(一级)   |                                                           |
| 免疫病理     | 血液学—白细胞总数及分类<br>脏器重量—体重、脾、胸腺、肾、肝<br>细胞学—脾<br>组织学—脾、胸腺、淋巴结 |
| 体液免疫     | 对 T 细胞依赖抗原(RBC) IgM 抗体生成细胞数<br>对有丝分裂原 LPS 的反应             |
| 细胞免疫     | 对有丝分裂原 ConA 的反应及混合淋巴细胞反应                                  |
| 非特异性免疫   | NK 细胞活性                                                   |
| 广泛研究(二级) |                                                           |
| 免疫病理     | 脾 T、B 细胞数                                                 |
| 体液免疫     | 对 T 细胞依赖抗原(SRBC) IgG 抗体生成细胞数                              |
| 细胞免疫     | 细胞毒 T 细胞的溶细胞作用(CTL)<br>迟发型变态反应(DTH)                       |
| 非特异性免疫   | 巨噬细胞功能                                                    |
| 宿主抵抗力    | 对不同肿瘤和感染因子的抗性                                             |

美国食品与药品管理局(FDA)及其药品评价和研究中心(CDER)于 2002 年 10 月正式公布了新药研究中的免疫毒理学评价规范。与上述几个方案不同的是该规范根据药物的特点,采取了更为灵活的办法,而不是笼统地规定全部新药都需进行哪些免疫毒性试验。规范指出在常规非临床毒理学研究中,哪些参数可以评价药物对免疫功能的影响,什么时候需要增加免疫毒性检测项目,什么时候需要进行免疫机制研究。提出要考虑药物对免疫系统五个方面的影响,除了免疫抑制、超敏反应和自身免疫外,还有免疫原性(immunogenicity)和不良免疫刺激(adverse immunostimulation),前者指药物及其代谢产物引起免疫反应的能力,后者指药物对免疫系统某些成分的任何抗原非特异性的、不适当的或难以控制的活化作用。下面分别简述药物对这五个方面的

影响及评价方法。

1. 免疫抑制 所有药物都要考虑其对免疫系统的影响。在常规非临床毒理学研究中发现下列情况,应怀疑有免疫抑制作用:①骨髓抑制,如全血细胞减少、白细胞减少、淋巴细胞减少或其他血液异常;②免疫器官重量或组织学改变,如胸腺、脾、淋巴结或骨髓细胞过少;③血清球蛋白降低;④感染发生率增加;⑤肿瘤发生率增加。如果怀疑有免疫抑制作用,则要根据以下情况,决定是否增加免疫毒性试验:①用药人群,如用于治疗艾滋病药,即使没有发现免疫抑制现象也要进行免疫功能检测;②同类药物的作用,如定量构效关系分析;③药物动力学资料,如药物及其代谢产物在免疫组织中的浓度;④临床观察到可能有免疫抑制作用。

根据上述情况,如需要进行免疫毒性检测,则可采用一系列免疫功能试验。最常用的是检测药物对 T 细胞依赖抗原的反应,如抗绵羊红细胞(SRBC)初级抗体(IgM)反应和次级抗体(IgG)反应(溶血空斑试验)。

也可用酶联免疫吸附试验(ELISA)或酶联免疫印迹(ELISPOT)进行抗体和抗体生成细胞的定量。其他还可以进行NK细胞功能试验、体外淋巴细胞增殖试验、细胞毒T细胞功能试验、细胞因子和趋化因子生成试验、迟发型超敏反应以及宿主抗感染和抗移植瘤试验等。根据药物非临床毒理学研究发现的结果,还可以检测药物对其他免疫细胞或免疫分子的作用,如对成骨髓细胞(半体内前红细胞、粒细胞或巨噬细胞集落形成单位试验)、巨噬细胞或中性粒细胞功能、补体活化作用以及淋巴细胞表型分析等。

要注意区分免疫毒性是药物本身的药理作用还是不良反应,这是药物与其他外源化学物免疫毒性评价中的不同之处。如用于抗移植排斥反应的药物,其免疫抑制作用就是其治疗作用;许多抗肿瘤药物的骨髓抑制作用在治疗实体瘤时是不良反应,而治疗恶性血液系统疾病时则是正常的治疗作用。但有时两者难以区分,如某些非甾体抗炎药的免疫抑制作用。

2. 免疫原性 指药物及其代谢产物引起免疫应答的能力。分子量 10 000 以上的大分子蛋白或多肽的免疫原性较强,分子量 5 000 ~ 10 000 的小分子多肽免疫原性稍弱,分子量在 1 000 ~ 5 000 的化合物免疫原性较难预计,而分子量在 1 000 以下的小分子化合物只有与蛋白结合成半抗原-蛋白复合物才具有免疫原性。

药物的免疫原性要考虑药物过敏和抗药免疫反应(antidrug immune response)两个方面。临床前研究预测药物的致敏作用比较困难,因为虽然免疫原性是蛋白致敏原的重要特性,但有免疫

表 12-7 WHO 推荐的人群免疫毒性检测方案(WHO,1992)

|                                   |
|-----------------------------------|
| 全血细胞计数及分类                         |
| 抗体介导免疫(检测一项或多项)                   |
| 对蛋白抗原的初次抗体反应                      |
| 血清中免疫球蛋白水平(IgM、IgA、IgG、IgE)       |
| 对蛋白抗原的二次抗体反应(白喉、破伤风或脊髓灰质炎)        |
| 对回忆抗原的增殖反应                        |
| 用流式细胞仪分析淋巴细胞的表型                   |
| 分析淋巴细胞表面标记 CD3、CD4、CD8、CD20       |
| 细胞免疫                              |
| 用试剂盒检测皮肤迟发型过敏反应                   |
| 对蛋白抗原(KLH)的初次 DTH 反应              |
| 对血型抗原的天然免疫(如抗 A、抗 B)              |
| 自身抗体和炎症                           |
| C-反应蛋白                            |
| 自身抗体滴度                            |
| 对过敏原产生的 IgE 水平                    |
| 非特异性免疫的检测                         |
| NK 细胞数(CD56 或 CD60)或对 K52 细胞的溶解活性 |
| 吞噬作用(NBT 或化学发光)                   |
| 临床化学指标检测                          |

原性的蛋白质或多肽并不一定是致敏原,而且有些对实验动物致敏的药物对人并不致敏。抗药免疫反应是指药物引起的免疫反应改变了药物的生物学特性,如药效学、药代动力学和毒性。抗药抗体反应可以抵消药物的作用,改变药物的消除过程、血浆半衰期和组织分布。因此,在非临床研究中发现的药效学和药代动力学参数可能并不真正反映药物的药效和毒性。

3. 超敏反应(药物过敏) 是指药物引起的有损害效应的抗原特异性免疫反应,主要用于小分子药物的致敏性。按 Coombs 和 Cell 分类方法分为 I~IV 型超敏反应。此外还有假过敏或类过敏反应(pseudoallergic or anaphylactoid reactions)。

(1) I 型超敏反应: FDA/CDER 规范中并没有推荐用来检测药物 I 型超敏反应的具体方法。一般用被动皮肤过敏试验(PCA)、主动皮肤过敏试验(ACA)和主动全身过敏试验(ASA)检查药物特异性超敏反应抗体的诱导情况。这些试验本来用于检测蛋白质的致敏性,而在检测小分子致敏原方面并没有得到充分验证。从小分子药物处理后的动物收集的血清,在 PCA 或 ACA 中出现阳性反应,提示这些药物可能有致敏性,但阴性结果并不能排除其致敏性。ASA 的情况也与 PCA 或 ACA 类似,因此 FDA/CDER 并不推荐将这些试验作为新药研究的常规试验。

任何经吸入途径使用的药物都要检测是否能诱发 I 型超敏反应。小鼠皮肤给药后检测血清 IgE 和细胞因子,并与局部淋巴结试验(LLNA)联合应用可以检测药物的呼吸道致敏性。还可以用大鼠或豚鼠经皮肤或吸入致敏,经吸入激发,再用支气管容积测定或其他观察终点检测呼吸道致敏性。

(2) II 型和 III 型超敏反应: 目前没有预测药物 II 型和 III 型超敏反应的标准试验方法。有例子表明,应该追踪观察病理过程中是否涉及免疫机制。如发现贫血,直接凝集试验阳性,说明是免疫介导的溶血性贫血;又如发现血管炎等组织损害,用免疫组化检测到抗体或补体,可以说明是免疫病理改变。在动物实验中发现蛋白或多肽类药物形成免疫复合物,虽然不能直接表示能引起人免疫复合物性疾病,但发现免疫复合物,尤其当免疫复合物沉积引起病理改变时应引起重视。免疫复合物形成还可以抵消药效和改变药代动力学。

(3) IV 型超敏反应: 检测 IV 型超敏反应的经典方法是豚鼠迟发性皮肤超敏反应(DHR),最常用的是 Buecher 试验(BA)和豚鼠最大值试验(GPMT)。这两种方法比较可靠,而且与人皮肤致敏试验有良好的相关性,因此用来检测局部用药的致敏性。受损皮肤组织学检查碱性粒细胞渗出情况可以区分 IV 型和 I 型超敏反应。小鼠耳肿胀试验与 DHR 的原理相似,但没有广泛用于药物安全性评价。还可以用鼠局部淋巴结试验(LLNA)。在某些情况下,药物与蛋白的共价结合可以作为预测致敏性的生物标记,如知道某种药物属于某类致敏原,可以用体外或体内蛋白共价结合试验。

(4) 假过敏或类过敏反应: 可由炎症或非抗原特异性的免疫反应所引起,与直接组胺释放、补体激活或其他因素有关。假过敏反应往往有剂量-反应关系。

如在动物实验中发现类过敏反应,进一步可用体外药物诱导肥大细胞组胺释放等试验以区分 IgE 介导的过敏反应。在药物非临床毒理学研究中可观察到血清过敏性补体产物等生化标记。

4. 自身免疫 目前还没有预测药物自身免疫反应的标准方法。鼠腮腺淋巴结试验(PLNA)和其他局部淋巴结试验(LLNA)可以用来预测药物引起的自身免疫。其他还可以检测有自身免疫倾向的鼠类  $T_{H2}$  活化情况,在药物非临床毒理学研究中检测自身抗体产生情况等。

5. 不良免疫刺激 指药物对免疫系统某些成分的任何抗原非特异性的、不适当的或难以控制的活化作用,可以由慢性炎症等引起。与假过敏反应有交叉,实际上两者之间没有明确的界限。有这种作用的化合物一般称为免疫刺激物,如免疫佐剂。细胞因子释放综合征是另一种不良免疫刺激,与某些单克隆抗体药物有关。常见的表现是组织淋巴细胞浸润,因为病变可能发生在非免疫组织,有时难以发现。如高剂量 IL-2 引起的限制性免疫刺激毒性反应是弥漫性毛细血管渗漏。目前没有检测药物不良免疫刺激的特殊方法。

现将 FDA 新药免疫毒性评价规范的流程总结如图 12-3。

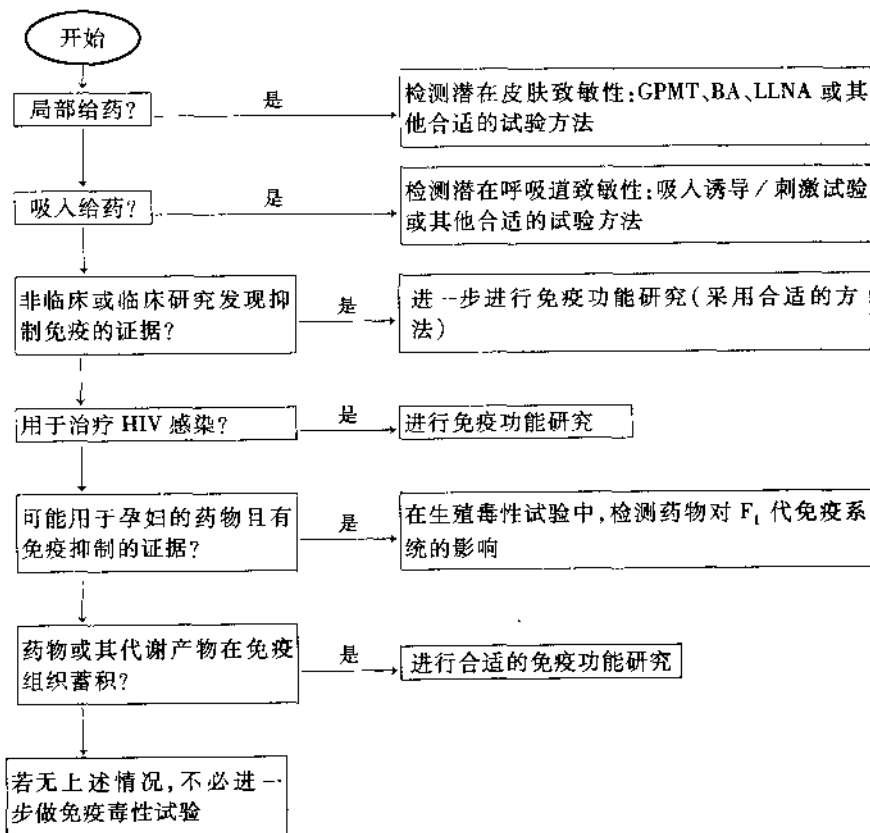


图 12-3 美国 FDA/CDER 新药免疫毒性评价规范中的试验流程图(FDA,2000)

#### 第四节 免疫毒性试验方法与评价

免疫毒理学的研究方法,大致可以分为免疫学方法、检测细胞因子的方法和转基因动物模型等三类。这些方法各有其优缺点,几种方法的联合应用能够更加全面地评价外源化学物的免疫毒性或了解免疫毒作用的机制。



## 一、免疫学方法

免疫系统包含多种免疫器官、免疫组织、免疫细胞和免疫分子,它们分工协作维持复杂的免疫功能。目前还没有一种免疫毒理学试验方法能够全面地反映外源化学物对整个免疫系统的影响,因此往往采用一组试验来观察外源化学物的免疫毒性。一些国家和有关组织先后推出各自的试验组合,包括动物免疫毒性检测方案和人群免疫毒性检测方案。各种试验组合之间大同小异,就啮齿动物免疫毒性检测方案而言,一般都包含以下几个方面:①免疫器官重量和组织形态学的改变;②淋巴组织、骨髓和外周血白细胞细胞结构的定量变化;③免疫细胞效应和调节功能的损害;④对病原体和移植瘤的易感性增加。采用这种组合试验的方法可以弥补单一试验的缺陷,增加试验的敏感性。但仍存在问题,比如很难确立轻微免疫改变在肿瘤和感染性疾病中的临床意义;在动物试验组合中有些试验包括损伤性的步骤,如免疫接种,这不太适合用于人群研究,影响了啮齿动物试验结果与人的可比性。现在有免疫毒理学家主张必要时用灵长类动物进行免疫毒性研究,以增加试验结果的预测价值,检测项目包括血液学指标、血清免疫球蛋白水平、NK细胞活性、淋巴细胞表面受体分析、巨噬细胞功能、淋巴细胞凋亡情况和宿主抵抗力测定等。此外,在动物免疫毒性检测方案中,一般偏重于检测免疫抑制作用,对于引起超敏反应和(或)自身免疫的化学物,则采用另外一些免疫学方法进行检测。

### (一) 免疫病理学检查

外源化学物对免疫系统的毒作用可表现为淋巴器官重量或组织学的改变、淋巴组织及骨髓细胞的量或质的变化、外周血淋巴细胞数目以及淋巴细胞表面标记改变等。除了检查外周血白细胞计数和分类,首先要观察免疫器官的大小(重量)和大体形态,然后进行组织学检查。主要观察胸腺、脾脏、淋巴结和骨髓的组织结构和细胞类型,同时要注意检查局部粘膜相关淋巴组织(mucosaassociated lymphoid tissue, MALT),包括鼻粘膜相关淋巴组织(NALT)、支气管粘膜相关淋巴组织(BALT)、肠粘膜相关淋巴组织(CALT)、皮肤粘膜相关淋巴组织(SALT)等。一般先用常规染色法染色,根据需要选择免疫组化等特异性方法。

利用荧光标记单克隆抗体和流式细胞仪观察淋巴细胞表面标记是目前检查淋巴细胞表型的可靠方法,而以往多采用直接或间接免疫荧光法。双色荧光染料可以让细胞同时染上两种标记。用这一方法,在单一细胞样品中可以同时检测 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 细胞。用这种双染色法可以确定胸腺中 $CD4^+/CD8^+$ (双阳性)和 $CD4^-/CD8^-$ (双阴性)细胞数,这样可以发现哪种T细胞是外源化学物毒作用的靶细胞,还可以了解外源化学物是否影响T细胞的成熟。利用细胞表面免疫球蛋白(Ig)和B220(B细胞上的CD45磷酸酶)抗体,可以区分B细胞。根据细胞表面标记可以发现淋巴细胞亚群的变化,这往往是免疫功能完整性受损的表现。但是,免疫功能试验检测外源化学物免疫毒性的敏感性更高。因此,分析细胞表面标记结合2~3种免疫功能试验,可以大大提高外源化学物免疫毒性的检测能力。

### (二) 免疫功能评价

免疫功能评价包括固有性免疫应答(innate immunity response)和适应性或获得性免疫应答

(adaptive or acquired immunity response) 的评价。固有性免疫应答主要评价 NK 细胞活性和巨噬细胞功能,获得性免疫应答主要评价体液免疫功能和细胞免疫功能。

1. NK 细胞活性测定 主要是观察 NK 细胞对敏感的肿瘤细胞(小鼠 NK 细胞敏感的 YAC-1 细胞株或人 NK 细胞敏感的 K562 细胞株)的溶解作用。将接触和未接触外源化学物的动物脾淋巴细胞与放射性核素( $^{51}\text{Cr}$ )标记的靶细胞共同孵育, NK 细胞溶解肿瘤靶细胞,将放射性核素释放至培养液。培养结束离心分离上清液,用  $\gamma$  计数器测定放射性核素强度,可反映 NK 细胞的活性。放射性核素释放法虽然客观、灵敏,但需价格昂贵的仪器,并有放射性污染环境等问题。国内常用乳酸脱氢酶(LDH)释放法,也可以得到比较客观、准确的结果,却无上述缺点,因此不失为检测 NK 细胞活性较实用的方法。

2. 巨噬细胞功能检测 有多种方法。经典的方法是放射性核素铬标记的鸡红细胞( $^{51}\text{Cr}$ -cRBCs)吞噬法。从小鼠腹腔收集巨噬细胞,在 24 孔板贴壁生长,加 $^{51}\text{Cr}$ -cRBCs 孵育后,弃去上清液中的 $^{51}\text{Cr}$ -cRBCs,再加氯化铵短暂培养,去除与巨噬细胞结合但未被吞噬的 $^{51}\text{Cr}$ -cRBCs。最后用 NaOH 溶解巨噬细胞,测定溶解液中的放射性强度。为了避免放射性核素,可以在显微镜下直接观察吞噬鸡红细胞的情况,分别计数出吞噬百分比和吞噬指数。也可以用乳胶珠代替鸡红细胞进行计数。巨噬细胞吞噬试验可以在体外或体内接触外源化学物。其他反映巨噬细胞功能的方法还有炭粒廓清试验、巨噬细胞溶酶体酶测定、巨噬细胞促凝血活性测定、巨噬细胞表面受体检测等。正常小鼠肝脏枯否细胞可吞噬清除 90% 炭粒,脾巨噬细胞约吞噬清除 10% 炭粒,给小鼠定量静脉注射印度墨汁(炭粒悬液),间隔一定时间反复取静脉血,测定血中炭粒的浓度,根据血流中炭粒被廓清的速度,判断巨噬细胞的功能。巨噬细胞富含溶酶体酶,如酸性磷酸酶、非特异性酯酶、溶菌酶等,测定这些酶的活性也可反映巨噬细胞的功能。激活巨噬细胞可产生一种与膜结合的凝血活性因子,加速正常血浆的凝固,因此取经 37℃ 预温的正常兔血浆和  $\text{CaCl}_2$  混合液,加入粘附单层巨噬细胞的试管中,移置 37℃,及时记录血浆凝固时间。当巨噬细胞与 LPS、肿瘤相关抗原等温育后,可见血浆凝固时间明显缩短。成熟的巨噬细胞表面具有 Fc 受体和 C3b 受体,这些受体能识别经 IgG 和 C3b 调理的颗粒,并迅速与之结合,促使细胞对相应颗粒的吞噬,因此检测这些受体可间接判断巨噬细胞的功能。常用抗羊红细胞致敏的羊红细胞悬液作指示物进行 EA 花环试验,也可用抗原(E)抗体(A)补体(C)复合物作 EAC 花环试验。

3. 体液免疫功能评价 一般用特异性抗原免疫动物,刺激脾 B 细胞活化并分泌抗体,然后观察抗体生成量或抗体形成细胞数。前者可用 ELISA、免疫电泳法、血凝法等直接测定血清抗体浓度,后者常用空斑形成细胞(plaque forming cell, PFC)试验。PFC 是检测体液免疫功能敏感的试验方法,反映宿主对特异性抗原产生抗体的能力。当用绵羊红细胞(SRBC)等 T-细胞依赖抗原免疫动物时,免疫应答需要一系列不同的免疫细胞参与协同作用,如巨噬细胞、T 细胞、B 细胞等。因此,对这些细胞功能的任何损害(如抗原处理和提呈、细胞因子生成,细胞增殖和分化等)都可以影响 B 细胞产生抗体的能力。而用 T 细胞非依赖抗原,如 DNP-Ficoll 或 TNP-LPS 等,则不受 T 细胞功能的影响。

4. 细胞免疫功能评价 可用 T 细胞表面标记、细胞毒性 T 细胞杀伤试验(CTL)、T 细胞增殖试验、迟发型超敏反应(DTH)和皮肤移植排斥反应等。其中 CTL、DTH 和淋巴细胞增殖试验是最常用的三种方法。

CTL 试验评价脾 T 细胞识别和溶解经抗原处理靶细胞的能力。经丝裂霉素 C 预处理的

P815 肥大细胞瘤细胞作为靶细胞,与脾淋巴细胞共同孵育,细胞毒淋巴细胞(CTLs)识别靶细胞并出现增殖。5 天后收集致敏 CTLs,与放射性标记的<sup>51</sup>Cr-P815 肥大细胞瘤细胞共同孵育,此时 CTLs 获得记忆,识别 P815 肥大细胞瘤细胞上的 MHC I 型抗原,并将其溶解,放射性核素释放到培养液中。反应结束时吸出培养液,测定放射性强度,与对照组比较可反映 CTLs 活性。

DTH 试验先用某种抗原致敏,再用相同抗原作皮肤试验,观察局部出现以红肿为特征的迟发型超敏反应,方法简便易行。可以用二硝基氟苯(DNFB)等小分子半抗原,也可以用从病原体中提取的生物抗原,如结核菌素、麻风菌素等,后者又可以帮助诊断某些病原微生物感染。致敏和激发的方法可采用局部皮肤涂抹或皮内注射。

检测淋巴细胞增殖功能一般选用不同有丝分裂原刺激体外培养的淋巴细胞,然后观察淋巴细胞的增殖情况。细菌脂多糖(LPS)主要刺激 B 细胞,植物血凝素(PHA)和刀豆素(ConA)主要刺激 T 细胞。观察淋巴细胞增殖有形态学法、放射性核素掺入法和比色法。形态学法是在显微镜下计数转化细胞,仪器要求低,操作简便,但客观性差;放射性核素法采用<sup>3</sup>H-TdR 掺入,液闪仪定量,客观性好,方法成熟,但有一定的设备要求,且要接触放射线;比色法根据活细胞能代谢染料四甲基偶氮唑盐(MIT),产生紫色的甲臞(formazan),可通过比色定量,客观性和灵敏度都比较理想,是目前国内常用的方法。此外,也可以观察淋巴细胞对抗原(抗 CD3 + IL-2)或异种抗原刺激的增殖反应,后者又称为混合淋巴细胞反应(MLR)试验,常用于器官移植前的组织配型,也可以反映细胞免疫功能。

5. 宿主抵抗力试验 宿主抵抗力试验(host resistance assay)检测外源化学物对不同病原体和同种移植瘤细胞的处置能力,宿主抵抗力降低表示有免疫功能损害。一般来说,B 细胞缺损,可使机体对细菌敏感性升高;T 细胞缺损,可使机体对病毒、寄生虫、肿瘤的敏感性升高。常用的宿主抵抗力试验有细菌感染模型、病毒感染模型、寄生虫感染模型和同种移植瘤攻击模型等。几种常用模型的特点总结如表 12-8。

表 12-8 常用宿主抵抗力试验模型的特点

| 模 型   | 病 原         | 实验动物                   | 观察终点              | 宿主抵抗力            |
|-------|-------------|------------------------|-------------------|------------------|
| 细菌感染  | 李斯特菌        | B6C3F1 或 CBA 小鼠        | 动物死亡率             | 巨噬细胞、T 细胞、NK 细胞  |
|       | 链球菌         | B6C3F1 或 CBA 小鼠        | 动物死亡率             | 补体、PMN、巨噬细胞、B 细胞 |
| 病毒感染  | A2 型流感病毒    | Balb/c 小鼠              | 动物死亡率             | TCLs、抗体、补体       |
| 寄生虫感染 | 旋毛虫         | C57BL/6 小鼠 或 Wistar 大鼠 | 肌内的幼虫数            | T 细胞             |
| 同种移植瘤 | B16F10 肿瘤细胞 | C57BL/6 小鼠 或 B6C3F1    | 肺部结节数及放射性强度 cpm/肺 | NK 细胞、巨噬细胞       |
|       | PYB6 肿瘤细胞   | C57BL/6 小鼠 或 B6C3F1    | 肿瘤发生率、潜伏期、平均瘤重    | NK 细胞、巨噬细胞       |

虽然宿主抵抗力试验可以发现外源化学物的免疫毒性和毒作用机制,但一般不作首选,也不单独应用。因为可能存在一些混杂因素,可以影响病原体的生长。如半导体材料砷化镓

(GaAs), 尽管在所有免疫毒性试验中都具有免疫抑制作用, 但在李斯特菌和链球菌宿主抵抗力试验中却有保护作用。后来发现实验动物血浆中砷的浓度足以抑制这些细菌的生长。在宿主抵抗力试验中至少应该考虑以下影响因素: ① 病原体的菌株、感染能力、接种的量和接触的途径; ② 实验动物(宿主)的种属、年龄、性别和健康状态; ③ 给予病原体的时间, 即接触外源化学物之前、同时、还是之后。

### (三) 超敏反应和自身免疫反应检测

一般用被动皮肤过敏试验(PCA)、主动皮肤过敏试验(ACA)和主动全身过敏试验(ASA)检测 I 型超敏反应, 但多用于检测蛋白或多肽的致敏性, 而在检测小分子致敏原方面并没有得到充分验证。用小分子化学物处理后的动物血清, 在 PCA 或 ACA 中出现阳性反应, 提示可能有致敏性, 但阴性结果并不能排除其致敏性。小鼠皮肤给药后检测血清 IgE 和细胞因子, 并与局部淋巴结试验(LLNA)联合应用可以检测呼吸道致敏性。还可以用大鼠或豚鼠经皮肤或吸入致敏, 经吸入激发, 再用支气管容积测定或其他观察终点检测呼吸道致敏性。目前还没有预测 II 型和 III 型超敏反应的标准试验方法。在动物实验中发现蛋白或多肽类药物形成免疫复合物, 尤其当免疫复合物沉积引起病理改变时应引起重视。

检测 IV 型超敏反应最常用的是 Buecher 试验(BA)、豚鼠最大值试验(GPMT)和豚鼠迟发性皮肤超敏反应(DHR)。这些方法比较可靠, 而且与人皮肤致敏试验有良好的相关性。人类皮肤超敏反应的特点为瘙痒、红斑、水肿、丘疹、小水疱或大疱, 动物仅见红斑和水肿。

鼠局部淋巴结试验(LLNA)用于检测局部淋巴细胞增殖, 其结果与传统的豚鼠皮肤致敏试验有良好的相关性, 且比豚鼠试验有优越性, 能定量而不是主要靠主观判断, 不需要佐剂, 还可以检测带颜色的样品。

目前还没有预测药物自身免疫反应的标准方法。鼠腭窝淋巴结试验(PLNA)和其他局部淋巴结试验(LLNA)可以用来预测药物引起的自身免疫。其他还可以检测有自身免疫倾向的鼠类  $T_{H2}$  活化情况等。

## 二、检测细胞因子的方法

检测细胞因子的方法主要有生物学测定、免疫学测定、分子生物学技术和流式细胞仪

目前检测细胞因子的方法主要有生物学测定、免疫学测定、分子生物学技术和流式细胞仪等。生物学测定也叫生物活性测定, 主要根据各种细胞因子的不同生物活性检测, 如 IL-2 促进淋巴细胞增殖, TNF 杀伤肿瘤细胞, CSF 刺激造血细胞集落形成, IFN 保护细胞免受病毒攻击等。免疫学测定是目前使用最为广泛的方法, 主要利用细胞因子蛋白或多肽的抗原性, 获得特异性抗血清或单克隆抗体, 利用抗原抗体特异性反应的特性, 用免疫学技术定量检测细胞因子。其中常用的有酶联免疫吸附试验(ELISA)、放射免疫试验(RIA)和免疫印迹(immunoblot)等, 尤以 ELISA 最为常用。绝大部分常见细胞因子的 ELISA 检测试剂盒均有商品供应, 其中人和小鼠的最多。流式细胞仪检测的基本原理是用荧光标记的抗细胞因子抗体标记细胞, 在流式细胞仪上观察荧光染色细胞的数量、比例和荧光强度等。分子生物学方法可能比上述其他方法能够提供更多的信息, 更早地发现变化(转录水平)。

上述各种方法都有其优缺点(表 12-9), 没有一种是检测所有细胞因子的最佳方法。因此,

理想的方法是采用两种或两种以上方法的组合试验,可以互相弥补各自的缺点。如 RT-PCR ELISA, mRNA 先用 RT-PCR 扩增后,再用敏感的 ELISA 法检测;又如酶联免疫斑点试验(ELIS-POT),通过免疫检测和分子生物学技术的结合,可以观察单一细胞的细胞因子生成情况。

表 12-9 各种细胞因子(受体)检测方法的优缺点

| 检测方法             | 优点                                                                                            | 缺点                                                        |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| 生物学测定            | 只测定功能分子(有利于发现新的分子);敏感性高( $\leq \text{pg/ml}$ );可以检测多种细胞因子的生成或活性                               | 往往缺乏特异性;指示细胞有时可受外界影响出问题;需要细胞培养;相对耗时费力;机制研究作用不大;一般不能检测趋化因子 |
| 免疫学测定            | 快速;非特异性;不需细胞培养;容易操作;经济                                                                        | 不能检测分子的功能(无功能片段、功能突变);敏感性低于生物检测;不是所有细胞因子的试剂盒都能获得;研究机制作用有限 |
| 分子生物学方法(mRNA 水平) | 最特异的方法;可以检测单细胞水平的变化;比其他方法更早期检测细胞因子的变化(转录水平)                                                   | 一般较贵和费时;需要特殊仪器和技术;mRNA 信息不一定翻译为蛋白                         |
| 流式细胞仪            | 敏感并高度特异;可以在单细胞水平评价细胞因子的生成和作用;可以快速分析,减少细胞培养引起的假象;可以同时观察多种细胞因子;可以伴随检查其他相关分子(CD4、CD8);是研究机制的理想方法 | 需要专门的技术对结果进行精确的解释                                         |

各种细胞因子的转录一般都受某种 DNA 结合蛋白的调控,这些 DNA 结合蛋白也称为转录因子,如 NF- $\kappa$ B 参与许多细胞因子基因的转录活化,是免疫应答的关键调节因子。用分子生物学方法检测 NF- $\kappa$ B 及 I $\kappa$ B 转录水平的改变,可以在一定程度上预测外源化学物对免疫应答的潜在影响。还可以用各种转录活化因子的报告基因表达试验(reporter gene assay),筛检外源化学物对多种免疫分子转录调控因子的活化或抑制作用。

### 三、转基因动物模型

\*\*\*

转基因动物在免疫毒理学中的应用可以为外源化学物的免疫毒性检测和免疫毒作用机制研究提供重要的工具。如利用转基因技术可以建立对免疫毒物更为敏感的动物模型,用于免疫毒性的筛检和试验;通过对某个或某些目的基因的上调或下调、knock-out 或 knock-in,可以了解这些基因在免疫应答中的作用机制,或外原化学物的免疫毒作用机制;将一个或几个人的基因转入实验动物基因组,用这样的“人源化”转基因小鼠或大鼠进行免疫毒性试验,更加有利于实验结果的外推。

现在国内外已有多家研究机构和公司研究和生产各种转基因和基因敲除动物,许多模型动物已经商业化,国外一些研究结构已经建立了转基因动物目录数据库,数据库信息可以通过国际互联网查询。

值得注意的是,人工转入的基因产物与内源性基因产物蛋白或多肽分子可能存在差异,两者介导的免疫学效应也可能并不完全相同。因此,虽然转基因动物可以作为免疫毒性检测和机制研究的重要工具,但并不能完全替代用常规方法进行的免疫毒性试验。

(朱心强)

## 第一节 概 述

生殖毒理学(reproductive toxicology)是生殖医学与毒理学结合而形成的一门重要交叉学科。主要研究环境因素对生殖系统损害作用的原因、机制和后果。这些损害作用包括对生殖器官、相关的内分泌系统或妊娠结局的改变,表现为对性成熟、配子生成和转运、正常的生殖周期、性行为、生育力、妊娠、分娩和哺乳等的不良影响或依赖于生殖系统完整性的其他功能的改变。

### 一、历史

生殖毒理学的发展与人类对生殖系统损害作用的认识密切相关

伴随着20世纪工业复兴,估计有5万~6万种化学物在日常生活中使用,每年约有600多种新的化学物投入市场。迄今在美国《化学文摘》中登记的化学物质已逾2000万种。大量资料表明,许多生殖内分泌系统疾病与工业化学物有关。1950年美国霍普金斯大学医院发现,怀孕期间服用黄体酮,先后有600多名女婴出现生殖器男性化畸形;1956年用于治疗妊娠反应的反应停,1961年后出现近万例短肢畸形儿(海豹畸形);1966~1969年美国波士顿市妇产医院发现,怀孕期间服用己烯雌酚(DES)可使其子代少女患阴道透明细胞腺癌;其他研究还发现,怀孕期间服用DES,其子代男性可发生生殖器先天畸形。1968年和1978年在日本,1979年在台湾曾先后发生因多氯联苯(PCBs)污染米糠油而导致的中毒事件,中毒孕妇发生死产、早产和畸胎等。1961~1970年间,美国在侵越战争中多次使用超过允许用量13倍剂量的2,4,5-T和2,4-D脱叶剂,造成2,3,7,8-四氯二苯-p-二噁英(TCDD)的严重污染,导致妇女流产、死胎、畸胎的发生率明显增加。1976年意大利化工厂爆炸,二噁英(dioxins)污染造成3.7万人受害。1999年震惊世界的二噁英公害事件发生在比利时,鸡肉、牛奶被TCDD污染,同年夏天可口可乐在比利时的分厂生产的饮料塑料瓶又受到TCDD污染。我国建国数十年在长江流域血吸虫病流行区使用五氯酚钠灭螺,其杂质中的TCDD所造成的大面积污染及其与人群生殖危害的关系至今仍不清楚。总之,过去半个世纪震惊全球的系列中毒或灾难事件的发生,在世界范围内提高了人们对用药的安全意识,高度关注新的化学物对生殖内分泌系统或妊娠结局的不良影响,促进了与生殖内分泌系统安全相关法律的产生和研究方法指南的问世。此外,对于工作场所职业性生殖危害的了解亦

已引起人们对制定企业相关政策和法规的关注。1985年美国医学会(AMA)提出了100多种具有潜在生殖危害的化学物。

## 二、环境内分泌干扰物

自二战以来,大量的内分泌干扰化学物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)被释放到环境中,目前统称环境内分泌干扰物(environmental endocrine disruptors, EEDs)。这是一大类在环境中天然存在或污染的可模拟天然激素生理、生化作用,干扰或抑制生物体内分泌、神经和免疫系统功能,产生可逆或不可逆生物学效应的化学物。EEDs主要来源于石油、电子、塑料、涂料、农药、医药等产品和某些食品中,在造纸、冶炼、化工、垃圾处理、汽车尾气排放、吸烟和制药等过程中产生。按化学物性质,EEDs大致可分为难降解的有机卤素、农药杀虫剂、除草剂和杀真菌剂、工业化学物、人工合成雌激素、植物雌激素、重金属和植物生长调节剂;按生物学效应,EEDs主要包括雌激素和抗雌激素、雄激素和抗雄激素、孕激素和抗孕激素、甲状腺素和抗甲状腺素以及芳烃受体(AhR)类化合物。对人类和哺乳动物造成严重危害的主要有存在于环境中的12种持久性有机污染物(persistent organic pollutants, POPs)。大量研究表明,鸟和鱼类的甲状腺功能异常,鸟、鱼、贝类和哺乳动物的生育率下降,以及鱼、腹足类动物和鸟的雄性征丧失及雌性化,被认为与接触EEDs有关。在佛罗里达,雄性幼年短吻鳄暴露于三氯杀螨醇(dicofol)和DDT后可降低血清睾酮(T)水平,发生睾丸组织结构损害及小阴茎,野生雄豹的精子异常、精子密度下降和隐睾与接触汞、DDE和PCBs有关;在加拿大,雄性白鲸暴露于河水中高浓度的植物类固醇后可导致成熟年龄增大,性腺体积变小,缺乏第二性征和血清T水平下降;在英国,发现污水处理湖中有雌雄同体鱼,暴露于含有壬基酚和辛基酚乙氧基化物降解产物的河水中的雄性虹鳟,其睾丸发育障碍,作为雌激素暴露生物标志物的血清卵黄素(VTG)水平升高;在加利福尼亚,发现DDT污染与雄鸥的雌性化有关,海豚脂肪中DDT水平的升高与血清T水平的下降有关。

## 三、生殖危害

有关外源性化学物对人类生殖危害(reproductive hazards)问题的认识由来已久。在美国,男性工人职业性接触二溴氯丙烷(DBCP)可引起少精、无精及生殖细胞发育不全而导致不育。保加利亚电池厂、美国密苏里州铅矿及瑞典从事有机溶剂苯、甲苯和二甲苯行业的工人发生精子数下降、精子异常和不同程度的不育症。DES、铅、十氯酮、甲基汞及许多抗癌药已显示对男、女性生殖系统的毒性作用,并可能引起生殖细胞的遗传损伤。近年来,世界范围内就有关人类精液量、精子密度和精子数下降的报道一直存在着争议。1992年丹麦学者Carlsen等报道,在过去的50多年间,人类精液质量呈下降趋势。他们通过对来自全球20个国家(1938~1990年)近1.5万人的精液资料综合分析发现,精液量由平均3.4ml降至2.75ml,精子密度由平均 $113 \times 10^6/\text{ml}$ 降至 $66 \times 10^6/\text{ml}$ ;1999年我国张树成等也获得了相似的研究结果。他们通过对我国39个县、市(1981~1996年)近万人的精液结合分析发现,精液量由平均3.31ml降至2.97ml,精子密度由平均 $103 \times 10^6/\text{ml}$ 降至 $84 \times 10^6/\text{ml}$ ,精子活率由平均75%降至67%。此外,Carlsen等也报道了包括睾丸癌、隐睾和尿道下裂在内的泌尿生殖器异常发生率的增加,有人推测,人类男性生殖



异常发生率的升高可能与宫内雌激素(如 DES 和 DDT 等)暴露增加有关。据目前估计,美国和法国育龄夫妇不育的发生率分别为 8.4% 和 14.1%,我国约 10%~15%;30% 以上的孕妇发生早期胚胎死亡,在确诊为妊娠的孕妇中约 15% 发生自然流产,自然流产样本染色体异常的发生率高达 30%~40%;在活产儿中,约 3% 有发育缺陷,随着年龄的增长,这种发育缺陷会更为明显,我国活产儿中先天畸形的发生率为 1%~3%,据此估计,我国每年约出生近 100 万畸形儿和智力低下儿;早产发生率约 7%,足月出生儿中有 7% 为低出生体重( $\leq 2500\text{g}$ )。有关人类许多不良生殖结局的病因还知之甚少。通常,流行病学和生殖结局的研究主要集中在母方因素上。相对而言,最近才开始研究父方接触化学物的干扰作用,男性介导的发育毒性最近也得到了关注。人们日益清楚,生殖毒性涉及男女双方。

## 第二节 外源化学物对雄性生殖能力的损害作用与机制

### 一、下丘脑-垂体-睾丸轴

#### (一) 概述

下丘脑-垂体-睾丸轴(hypothalamic-pituitary-testicular axis, HPTA)在生理学上是一个精密完整的系统。睾丸功能受一系列闭合循环的反馈系统调节,包括中枢神经系统、下丘脑、垂体、睾丸内分泌和生发室。下丘脑分泌的脑肽很多,其中与生殖活动有关的是促性腺激素释放激素(GnRH)。下丘脑以上中枢神经元释放的神经递质如去甲肾上腺素和多巴胺等,可调节 GnRH 的合成并呈脉冲式释放,经下丘脑-垂体门脉系统到达腺垂体。GnRH 与腺垂体中 GnRH 受体结合,刺激腺垂体嗜碱性粒细胞合成和释放黄体生成素(LH)和卵泡刺激素(FSH)。LH[在男性也称间质细胞刺激素(ICSH)]和 FSH 经体循环到达睾丸,刺激类固醇激素如 T 和雌二醇( $E_2$ )的分泌,其对于促进和维持精子发生非常重要。GnRH 也可直接与睾丸间质细胞上的 GnRH 受体结合,抑制间质细胞合成 T。GnRH 还可刺激腺垂体嗜酸性粒细胞分泌催乳素(PRL),在男性终生维持在低水平。生理剂量 PRL 可诱导 LH 受体的产生,从而增强间质细胞对 LH 刺激的敏感性,使 T 合成增加,促进附属性器官生长发育,而大剂量 PRL 则对睾丸和附属性器官有抑制作用。T 是由睾丸合成分泌的主要类固醇激素。睾丸分泌的  $E_2$  仅占循环  $E_2$  的 25%,绝大部分的  $E_2$  源于外周 T 和雄甾烯二酮的转化,雌激素在调控 GnRH 和 LH 中起重要作用。睾丸支持细胞也合成非类固醇物质抑制素,可选择性抑制 FSH。抑制素也能局部调节精子发生。

由 HPTA 分泌的激素可通过正、负反馈信号调节睾丸功能,这些信号包括:在睾丸类固醇激素(T、 $E_2$ )作用下,抑制下丘脑 GnRH 的分泌和垂体 LH 对 GnRH 的应答;在睾丸抑制素和循环雌激素作用下,抑制垂体 FSH 释放。HPTA 存在三种水平的负反馈调节:当雄激素水平过高时,可负反馈调控下丘脑神经分泌细胞和垂体细胞,控制 GnRH、FSH 和 LH 的合成、释放(长负反馈);FSH 和 LH 水平较高时,可调节下丘脑 GnRH 的合成和释放,使垂体合成和释放 FSH 和 LH 减少(短负反馈);GnRH 过多时,GnRH 本身能调节下丘脑,使 GnRH 合成和释放减少(超负

反馈)。外源化学物或药物对此精确的调控系统所产生的任何损害作用都可导致生殖异常。

### (二) 下丘脑-垂体毒物

GnRH 激动剂(agonists)是主要干扰下丘脑-垂体轴(H/P轴)的原型物质。GnRH 同型物的特殊治疗目的是给缺乏该激素的个体提供 GnRH。GnRH 同型物对 GnRH 受体具有高度亲和力,可延长 GnRH 的循环生物半减期几分钟到几小时。短期使用 GnRH 同型物可刺激 LH 和 FSH 分泌以及睾丸 T 分泌的相应增加;长期使用则导致具有生物活性和免疫活性的 FSH 和 LH 分泌反常的减少,这可能与 GnRH 受体复合物与其胞内促进激素作用的信号转导事件解离从而导致 GnRH 的下调有关。在某些靶细胞群中,GnRH 受体的丢失可解释细胞对激素或神经递质的脱敏现象(desensitization)。大鼠实验表明,GnRH 激动剂不仅可抑制促性腺激素的分泌以及 T 生成,而且由于间质细胞中 LH 受体数目的减少使 T 的生成下降,同时由于部分阻断了间质细胞中 17-羟化酶和 17,20-碳链酶的活性而抑制了类固醇合成。

### (三) 雌激素/抗雌激素

类固醇激素在调控促性腺激素分泌中起重要作用。雄性的主要调节剂是 T,但外源性  $E_2$  可影响雄性促性腺激素的分泌,出生前暴露于外源性雌激素可改变其子代雄性生殖道的结构和功能。因此,人工合成和环境雌激素是潜在的雄性生殖毒物,主要通过影响 H/P 轴而发挥其毒性作用,也可直接对睾丸产生毒性作用。枸橼酸克罗米芬是一种人工合成的非类固醇激素三苯乙烯,是顺式和反式-克罗米芬 1:1 的混合物。这种化合物通过与雌激素受体结合发挥作用。根据所用剂量的不同,克罗米芬对内源性雌激素的作用可能是激动剂或拮抗剂。低剂量时,克罗米芬成为雌激素作用的竞争抑制剂;高剂量时则具有轻微的雌激素活性。解释克罗米芬对下丘脑-垂体-性腺轴的影响已提出两个作用机制:一是通过外周和下丘脑芳香化作用使 T 转化为  $E_2$ ,从而修饰处于下丘脑水平生殖激素的反馈调节, $E_2$  与下丘脑受体结合并抑制促性腺激素的生成;二是克罗米芬直接对垂体和(或)女性卵巢和男性睾丸产生雌激素作用。

## 二、支持细胞

\*\*\*\*\*

### (一) 概述

支持细胞(sertoli cell)在精子发生过程中起重要作用。在胚胎早期,支持细胞分泌抗米勒激素(AMH),其精确的生理作用还不清楚。青春期后,支持细胞开始分泌抑制素,有助于调节垂体 FSH。生殖细胞发育与支持细胞密切相关,支持细胞为其提供结构支持、营养素以及调节/旁分泌因子。支持细胞分泌大量的激素和(或)蛋白质。在受到化学物侵害时,这些分泌物可被用来评价支持细胞的功能。支持细胞分泌组织纤维蛋白溶酶原激活物、雄激素结合蛋白(ABP)、抑制素、AMH、转铁蛋白和其他蛋白酶。ABP 类似于血浆性类固醇-结合球蛋白(SSBG),在啮齿动物,ABP 可充当 T 和双氢睾酮(DHT)的载体。由于 FSH 的刺激作用,支持细胞可合成  $E_2$  和雌酮。正常精子发生需要支持细胞,许多影响精子发生的化学物是通过对支持细胞的影响间接发挥作

用[例如 DBCP、单乙基己基邻苯二甲酸酯(MEHP)],而不是直接作用于生殖细胞的。 $\delta$ -9-四氢大麻酚(THC)作用于生殖系统的许多部位,主要通过抑制 FSH 刺激引起的 cAMP 蓄积而发挥作用。

### (二) 支持细胞-支持细胞连接

体内有许多解剖学上的特殊屏障,内分泌系统中重要的屏障有胎盘屏障和血-睾屏障。支持细胞-支持细胞连接(sertoli-sertoli cell junctions)形成血-睾屏障(blood-testis barrier)被认为是支持细胞较为特殊的功能之一。血-睾屏障位于间质毛细血管腔和生精小管腔之间,将生精上皮分隔为含有精原细胞及早期精母细胞的基底室(basal compartment)和含有发育较完全的生精细胞的近腔室(adluminal compartment),两腔室之间介入了许多解剖上相关的特殊结构。血-睾屏障维持着两腔室一定的离子梯度,可影响或阻止化学物、药物、营养素、激素等在血液和生精小管内液体之间的自由交换。支持细胞-支持细胞间以及支持细胞-生殖细胞间的连接通常有间隙并允许物质通过,这些所谓的间隙连接在未成熟或幼小的哺乳动物睾丸中很少形成,因此这就为外源化学物渗入生精小管提供了更大的机会。某些毒物(如细胞松弛素 D、镉、顺铂、棉酚等)诱导的血-睾屏障的改变可允许一些大分子物质通过,使近腔室的组成发生变化,从而对该室的生殖细胞产生选择性损害。免疫球蛋白、碘化清蛋白以及某些小分子物质(如水、尿素等)均可通过血-睾屏障从生精小管中排出。大分子物质(如菊粉)则不能通过。脂溶性和碘化的程度是决定某一物质能否通过血-睾屏障的重要因素。已知许多因素能影响血-睾屏障的渗透性,包括输精管结扎、自体免疫性睾丸炎以及输精管切除术。

### (三) 支持细胞-生殖细胞连接

生殖细胞依靠与支持细胞的紧密连接维持早期的发育,后期迁移到外胞浆特化区发育为成熟精子,支持细胞-生殖细胞连接(sertoli-germ cell junctions)发生障碍,最终可导致生殖细胞从生精上皮释放到近腔室的数量减少,这一过程常称作生殖细胞丢失(germ cell sloughing),如果这种丢失足够严重的话,则可引起睾丸萎缩。生殖细胞丢失是许多支持细胞毒物引起的一种毒性反应,这些支持细胞毒物有 2,5-己二酮(2,5-HD)、1,3-二硝基苯(1,3-DNB)、秋水仙素和邻苯二甲酸盐类(PAEs)等。给大鼠经口一次染毒二乙基己基邻苯二甲酸酯(DEHP)的活化代谢产物单乙基己基邻苯二甲酸酯(MEHP)(2g/kg),支持细胞的波形蛋白中间丝早期快速发生萎陷,波形蛋白丝从支持细胞的核周区域朝生殖细胞附着部位的细胞膜凸出,从而把生殖细胞固定在支持细胞隐窝中。因此,中间丝的破坏可能是导致支持细胞-生殖细胞连接障碍,从而使源于生精上皮的生殖细胞丢失的机制之一。生殖细胞丢失的第二种形式被描述为脱落(shedding)或早熟生殖细胞的释放(premature release of germ cells),附睾中早熟生殖细胞的存在常常是一种可观察到的早熟生殖细胞释放的现象。毒物也可作用于支持细胞-生殖细胞界面,从而抑制精子释放(spermiation),亦可抑制源于支持细胞的细长精子细胞释放到生精小管腔内的正常生理过程。这种精子释放过程很复杂,涉及支持细胞的许多调节功能。

### (四) 细胞骨架

细胞骨架(cytoskeleton)除了的支持细胞-支持细胞连接、支持细胞-生殖细胞连接以及精子

释放方面发挥重要作用外,对支持细胞还具有许多其他功能:为支持细胞提供结构支持,维持生精上皮内的生精细胞,控制生精上皮中成熟生殖细胞的运动以及作为输送分泌囊泡到浆膜的通道。支持细胞微管对于维持生精上皮的结构和功能是非常重要的,这已通过微管破坏因子秋水仙素的实验研究得到了证实。秋水仙素引起支持细胞胞浆微管的溶解,使支持细胞留下形态不规则的稀疏的顶部凸起而没有足够的结构支持,从而导致生精上皮中大量的生殖细胞脱落。支持细胞微管的破坏也是 carbendazim 和 2,5-HD 暴露后生殖细胞丢失的主要机制。将分泌囊泡输送到许多细胞的浆膜需依赖于微管,支持细胞分泌生精管液(seminiferous tubule fluid, STF)已被证实是一种微管依赖过程,STF 为生殖细胞的生长和发育提供大量的重要因子,抑制 STF 可解释 2,5-HD 引起的急性生殖细胞丢失,2,5-HD 可干扰依赖微管的囊泡输送,从而抑制 STF 的分泌。PAEs 和秋水仙素也可抑制 STF 分泌。

### (五) 代谢/信号转导

支持细胞与生殖细胞之间存在密切的功能关系,支持细胞为生殖细胞的存活和分化提供代谢支持。支持细胞分泌的乳酸盐和丙酮酸盐是生殖细胞的能量来源,在精子发生的激素调控中可能起重要作用。测量体外毒物诱导的支持细胞乳酸盐分泌的变化可筛选支持细胞毒物。实验发现,支持细胞在与许多毒物共培养后可增加乳酸盐的分泌,这些毒物包括:1,3-DNB、乙烯乙二醇单甲酯、MEHP、铅和棉酚等。支持细胞信号转导过程中独特的成分为毒物提供了特殊的靶标。MEHP 和大麻的生理活化成分 THC 均可抑制体外培养大鼠支持细胞的 FSH 连接的信号转导,支持细胞是唯一能表达 FSH 受体的睾丸细胞。支持细胞暴露于 MEHP 可提高 GTP 抑制 FSH 诱导的 cAMP 增加的能力,这提示 MEHP 靶标处于 GTP 结合蛋白水平,GTP 结合蛋白可把 FSH 受体连接到与其相关的腺苷酸环化酶催化的亚单位上。这些实验证明,支持细胞特异性信号转导成分可作为支持细胞毒物独特的靶标。

### (六) 空泡形成

支持细胞毒物诱导的最常见的形态学改变之一是形成胞质空泡。毒物暴露后支持细胞的早期形态常用作支持细胞毒物分类的标准。空泡代表滑面内质网(SER)池增大。SER 空泡形成(vacuolization)的可能机制包括:SER 蛋白质分泌和运输的改变以及 SER 离子泵的破坏;维持 SER 的细胞骨架的改变。在生精周期第 12~14 期正常大鼠支持细胞胞质空泡的直径为 20 $\mu\text{m}$ ,暴露于 2,5-HD 可使支持细胞产生巨大空泡,直径大约 60 $\mu\text{m}$ ,主要见于生精周期的第 1、12、13 和 14 期。幼年大鼠暴露于 2-正戊基邻苯二甲酸酯可使支持细胞产生多个小空泡,使精母细胞向生精小管腔转移。

### (七) 支持细胞分裂

由于大鼠支持细胞在 14~16 天龄前分裂,所以幼年大鼠支持细胞成为睾丸毒物破坏细胞分裂的独特的靶标。成年大鼠睾丸支持细胞完全分化为非分裂细胞,每个支持细胞能维持特定数量的生殖细胞。因此,支持细胞数量的多少是决定成年物种生育率的重要因素,支持细胞数量的减少可导致生殖细胞产量的下降。许多因素可调节支持细胞分裂,包括 FSH、鸦片样肽和甲状腺素等。由于成熟支持细胞不再更新,所以支持细胞分裂期是毒物作用的机会窗口。新生儿接触

抑制支持细胞分裂的毒物可减少生精上皮中支持细胞的数量以及受影响睾丸中产生的生殖细胞数量。新生鼠染毒 DEHP 可减少其睾丸支持细胞数量。PAEs 可抑制体外培养大鼠支持细胞的 FSH 信号转导,这可能是支持细胞分裂减少的一种机制。幼年大鼠染毒可延长支持细胞分裂期,可导致成年大鼠睾丸支持细胞数量的增加。由甲状腺肿物质 6-丙基-2-硫尿嘧啶诱导的大鼠幼仔新生期短暂的甲状腺功能减退症,可导致成年大鼠睾丸体积明显增加,由于支持细胞/生殖细胞比例是恒定的,这可导致睾丸精子产量的增加。这些研究证实了毒物能改变新生期支持细胞的分裂。

### 三、间质细胞

#### (一) 概述

间质细胞(leydig cell)的主要功能是合成和分泌 T。这些细胞与睾丸血管及淋巴腔密切相关。睾丸精索动脉是弯曲的,其血流与精索静脉蔓状丛相平行但方向相反,这种解剖结构似乎促进了热源、雄激素及其他化学物的逆流交换。LH 刺激睾丸的类固醇合成。雄激素对于精子发生、附睾精子成熟、副属性器官的生长和分泌活性、躯体男性化、男性行为以及不同的代谢过程十分重要。大量不同的化学物/药物可引起间质细胞增生/肿瘤形成,这在啮齿类动物中尤其常见。例如,雄激素受体拮抗剂(如氟他胺)、 $5\alpha$ -还原酶抑制剂(如非那司提)、T 生物合成抑制剂(如西咪替丁、甲硝唑、vinclozolin 等)、芳香化酶抑制剂(如 formestane)、多巴胺激动剂(如二甲基硫麦碱)、雌激素激动/拮抗剂(如 DES、他莫昔芬等)以及 GnRH 激动剂(如亮丙瑞林等)都可以引起间质细胞增生,然而它们的作用方式截然不同。

#### (二) 直接损害间质细胞功能的化学物

1. 外源化学物 酮康唑是一种咪唑类广谱抗真菌药,是能直接改变间质细胞功能而不影响间质细胞活力的外源化学物(xenobiotic chemicals)。酮康唑可直接抑制细胞色素 P-450 胆固醇侧链裂解酶(P-450<sub>scc</sub>)和  $17\alpha$ -羟化酶/C<sub>17,20</sub> 裂解酶的活性,这是急性暴露后一种完全可逆的效应。酮康唑对间质细胞类固醇合成的这种可逆效应与酮康唑抑制 LH 刺激的 T 生成是一致的。酮康唑及其相关的咪唑衍生物可直接结合到细胞色素 P-450 上,诱导 II 型差异光谱,随着细胞色素 P-450 酶活性的抑制形成了高铁血红蛋白。许多药物、去污剂和有毒化学物可诱导细胞色素 P-450 光谱的改变,提示所有这些化学物都能通过抑制细胞色素 P-450 依赖的 T 合成而损害间质细胞功能。外源化学物直接改变间质细胞功能的许多其他机制还包括:TCDD、二乙基-7-羟香豆素磷酸盐、微管集聚和解聚抑制剂如细胞松弛素 B 和紫杉酚等抑制胆固醇运输到线粒体;phenathiazine 抑制钙调蛋白作用;乙醇降低吡啶核苷酸水平;环孢菌素抑制血红素形成。

2. 糖皮质激素 间质细胞类固醇合成与糖皮质激素(glucocorticoids)直接相关的事实在成年雄性大鼠中已得到证实,因为使用糖皮质激素(即氢化可的松)后,在血清 LH 水平没有变化的情况下即可降低血清 T 水平夜间正常的升高。研究发现,糖皮质激素与其受体作用,可负反馈调节新的糖皮质激素的合成和稳定状态时 P-450<sub>scc</sub> 的 mRNA 水平。在此过程中, $11\beta$ -羟类固醇脱氢酶通过把间质细胞中内源性糖皮质激素氧化成  $11$ -酮基型,使其不能与糖皮质激素受体结合

而失活。

3. 雄激素 T 可经短环路负反馈调控其自身的合成和分泌。T 通过反向调节新合成的  $17\alpha$ -羟化酶而抑制 cAMP 诱导的 T 生成。T 的这种效应很可能是通过雄激素 (androgens) 受体介导, 因为对于 T 的这种负效应, 米勃龙 (雄激素受体激动剂) 可以模仿, 羟基氟他胺 (雄激素受体抑制剂) 可以阻断。除了雄激素受体介导机制外, 成年大、小鼠纯化间质细胞的体外培养也被用于证实 T 诱导的氧介导的  $17\alpha$ -羟化酶蛋白衰变率的增加。通过细胞色素 P-450 酶作用产生活性氧是由于像 T (即一种假性底物) 这样的反应产物与酶结合的结果, 也就是说, T 结合到 P-450 依赖的  $17\alpha$ -羟化酶的活化部位上, 产生电流并活化分子氧, 由于羟基化作用, 所产生的高度活性氧仅在能攻击和破坏母体酶的部位释放。所有这些研究结果提示, 雄激素能改变间质细胞类固醇合成酶的合成和稳定性。

4. 雌激素 雌激素 (estrogens) 对成年大鼠间质细胞功能产生抑制效应至少存在两种不同的机制: 通过垂体抑制 LH 的释放; 直接影响睾丸类固醇合成。体内实验提示, 雌激素抑制 T 的合成和分泌是通过抑制  $17\alpha$ -羟化酶活性来实现的, 这些体内试验的睾丸效应已被证实与体外雌激素和  $17\alpha$ -羟化酶/ $C_{17,20}$  裂解酶的直接交互作用结果是一致的。除了竞争底物以便与类固醇合成酶的催化部位结合外, 雌激素也参与促性腺激素诱导的间质细胞脱敏的晚期损伤。促性腺激素诱导的这种脱敏作用被定义为第二次注射 LH 后睾丸合成和分泌 T 的能力下降。涉及 LH 受体的这种调节机制是下调和抑制类固醇合成酶的活性, 即通过  $E_2$  依赖的 28kDa 蛋白抑制 P-450sc $\alpha$ 、 $17\alpha$ -羟化酶/ $C_{17,20}$  裂解酶活性。

### (三) 间质细胞死亡

现以二甲烷乙烷磺酸酯 (EDS) 为例讨论化学物特异性杀伤间质细胞造成间质细胞功能不可逆性转变的问题。一次腹腔内注射 75 ~ 85mg/kg 的 EDS, 可选择性地杀伤成年大鼠睾丸间质细胞, 该剂量虽不影响大鼠的生长, 但可导致成熟睾丸间质细胞或生殖细胞的死亡, 或导致未成熟睾丸间质细胞的死亡 (leydig cell death) 或清除。烷化剂如丁烷二甲烷磺酸酯虽可杀伤精原细胞但不影响间质细胞, 这就更强调了 EDS 杀伤间质细胞的特异性。EDS 诱导的间质细胞功能 (LH 刺激的 T 生成) 和活力 ( $^{35}\text{S}$ -蛋氨酸掺入与 MTT 分析) 的变化, 在成熟大鼠要比未成熟大鼠明显得多。EDS 的毒性机制涉及谷胱甘肽 (GSH)。在体内, EDS 可与肽和 (或) 蛋白质共价结合形成谷胱甘肽-S-结合物, 提示细胞色素 P-450 酶活性和 (或) 胞内 GSH 可能介导 EDS 对成年大鼠间质细胞的毒效应。

### (四) 间质细胞肥大/增生

睾丸间质细胞的毒性机制是生精小管诱导的大鼠睾丸间质细胞肥大和 (或) 增生 (leydig cell hypertrophy/hyperplasia)。许多化学物可诱导生精小管损伤, 在损伤的局部区域也诱导间质细胞增大 (肥大) 和 (或) 间质细胞数量的增加 (增生)。虽然对间质细胞增生效应的准确机制还不清楚, 但对生精小管和间质细胞结构/功能之间的旁分泌关系已有所认识。有关间质细胞增生和肿瘤之间的区别目前还了解不多, 增生的间质细胞和肿瘤间质细胞在形态学上似乎是类似的, 目前尚未发现肿瘤前和肿瘤间质细胞的生化和生物标志物。

## 四、成熟精子

### (一) 概述

哺乳动物精子是高度专业化伴有独特功能的终末分化细胞。精子一旦离开生精上皮便失去与其他细胞的接触及毛细血管的支持,由于精子胞核在功能上是静止的,它们必须在没有新的蛋白质合成的情况下维持自身生存;精子一旦离开附睾就必须适应精液和女性生殖道的环境,并通过鞭毛运动和获能以满足其高能量需求。此外,相对于其他细胞而言,精子有较高的表面积与体积比,因此需要维持更大面积的细胞膜,故当精子受到损害时,其修复能力是有限的。总之,精子要比体细胞更易受到其所处环境中的化学物和氧化剂等应激因素的损害。减数分裂过程使正常染色体(二倍体)减半(单倍体)(图 13-1),每个细胞必须接受每对染色体的一个,其接受父方还是母方染色体的机会都是随机的。减数分裂期可能是化学物攻击最敏感的阶段。次级精母细胞产生精子细胞。精子细胞发育为成熟精子(mature spermatozoon)需经过一个转化期(精子形成),该过程涉及细胞核和胞浆的广泛重组:核浓缩变成精子头;线粒体浓缩成鞘位于两个中心粒之间,两个中心粒形成鞭毛或轴丝;高尔基体部分形成顶体。因此,一般将精子视为三个功能部分:胞核或 DNA 的有效载体,为受精卵提供雄性基因组;中间段和尾,将精子向卵母细胞推进并协助穿透卵母细胞外膜;顶体或卵细胞识别和穿透系统,确保受精完成。可见,精子的高度专业化特性近乎完善地与其功能相适应,即识别卵细胞并与之受精。然而,上述精子的三个功能部分均可成为生殖毒物攻击的靶标。

### (二) 精子胞核

精子胞核(sperm nucleus)结构与生殖毒理学研究领域有关是基于以下几个原因:首先,一旦精子胞核浓缩,鱼精蛋白组合到位, DNA 修复将不再可能。与较早期的生精细胞相比,晚期的精子细胞和精子对某些生殖细胞诱变剂诱导的 DNA 损伤相对敏感,这至少部分是由于其缺乏 DNA 修复能力。其次,许多对晚期精子细胞和精子 DNA 损伤的诱变剂可导致鱼精蛋白烷基化,其直接证据源于对氧化乙烯、甲基甲磺酸盐(MMS)、乙基甲磺酸盐(EMS)和丙烯酰胺的研究。鱼精蛋白的烷基化作用与这些诱变剂诱导的显性致死效应的时间过程相平行。GSH 参与这些化合物的代谢解毒过程,所以根据 GSH 的损耗可预测拮抗这些化学物的内源性防御机制。此外,晚期精子细胞/精子暴露于丙烯酰胺可诱导染色体畸变,这些畸变(双着丝点、环形、易位)与所涉及的 DNA 相关鱼精蛋白的烷基化机制是一致的。第三,附睾尾精子已形成二硫键,似乎至少要比附睾起始段和头部的精子更能拮抗物理损伤和化学改变。例如,雄性大鼠急性暴露于化疗药物环磷酰胺可明显增加着床后的丢失,这表明穿过附睾头的精子要比附睾尾的精子更易受到化学物的影响。环磷酰胺对精子胞核的特殊作用主要包括体外试验中去浓缩作用方式的改变、抑制<sup>14</sup>C-碘乙酰胺与游离巯基的结合以及 DNA 交联的诱导等。MMS 和 EMS 也具有类似的作用机制。尽管如此,即使是附睾尾成熟精子的胞核(通过鱼精蛋白二硫键获得最大的稳定性),也可能因暴露于潜在的烷化剂而受到损伤。总之,目前有关生殖细胞诱变剂的研究结果证明,无论是在雄性还是雌性生殖道,或者是体外受精过程中,精子胞核都可能成为化学诱变剂的

作用靶标。

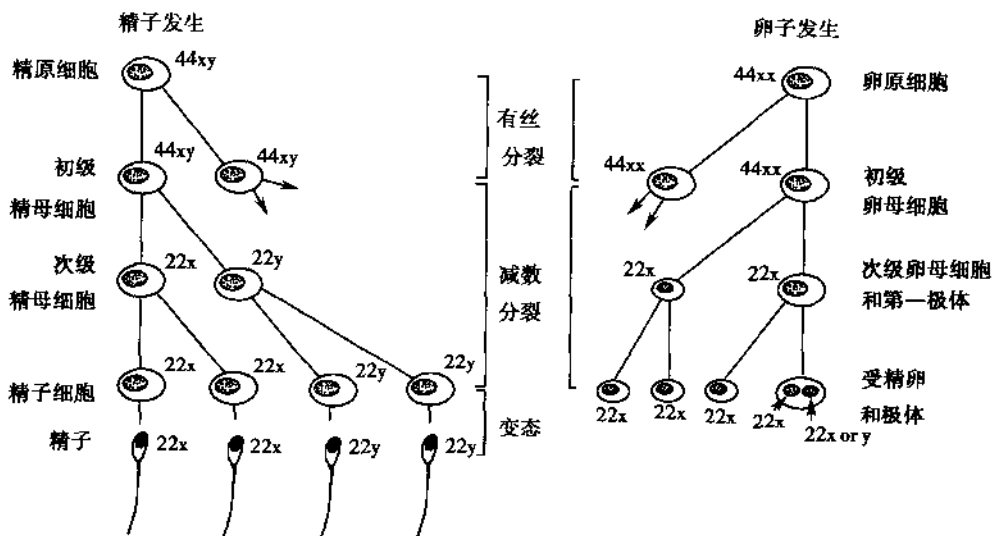


图 13-1 涉及精子发生、卵子发生、受精的细胞复制(有丝分裂)和细胞减数分裂

(引自 MJ. Thomas 和 JA. Thomas, Casarett & Doull's Toxicology, Sixth Edition, 2001, P679)

### (三) 精子运动

在生殖毒理学研究领域中,术语精子活率(sperm motility)通常是指能动精子的百分率(%)；精子运动(sperm motion)是指能动精子泳动的活力,包括运动速度和方向。精子活动直接的能量来源是ATP水解,通过动力蛋白ATP酶的催化,使精子鞭毛中毗邻的微管相互滑动,精子尾弯曲。通过精子胞浆中的糖酵解和呈螺旋状环绕在精子尾中段的线粒体中的三羧酸循环产生ATP,精子产生的大部分ATP被直接用于精子运动或产生cAMP。在附睾成熟和获能过程中,cAMP是精子运动重要的调节剂。最为广泛研究的以精子运动为直接作用靶标的毒物是 $\alpha$ -氯乙醇。这种化合物与其母体表氯醇在经口给予雄性啮齿类动物后可产生快速而可逆的抗生育效应,这与精子运动速度的变化是一致的。低剂量时, $\alpha$ -氯乙醇所产生的病理影响仅局限于精子运动,并开始作用于附睾精子；高剂量时, $\alpha$ -氯乙醇可导致输精管和(或)附睾头堵塞,这种情况的发生与继发于附睾损害后的睾丸萎缩有关。 $\alpha$ -氯乙醇和表氯醇的作用类似于6-氯-6-脱氧糖,后者具有避孕功能。许多研究结果表明,上述化合物在体外可抑制不同种属精子的糖酵解,从而抑制ATP产生。在结构和效应上类似于 $\alpha$ -氯乙醇的其他毒物还有奥硝唑、烷化剂三甲基磷酸盐(TMP)以及DBCP等。

### (四) 受精能力

获能(capacitation)是用于描述精子从附睾释放后以及在女性生殖道停留期间所发生的功能变化。获能后的精子便获得与卵母细胞成功结合的能力,同时产生顶体反应(acrosome reaction),这是受精的先决条件。顶体反应是指精子质膜与顶体外膜融合并形成水疱,导致顶体酶释放和顶体基质弥散的过程。这一过程是钙依赖的,通常因获能的精子与透明带(zona pelluci-



da)上受体的交互作用而发生。精子对脂质过氧化(LPO)引起的氧化损伤是高度敏感的,正常代谢过程中产生的活性氧簇可被自由基清除剂和抗氧化剂所清除。精子含有SOD,可将超氧化物阴离子快速转化为过氧化氢。尽管精子极少含有过氧化氢酶,但它们的确含有谷胱甘肽过氧化物酶,故能破坏过多的过氧化物。如果自由基不能很快被清除剂清除,则可诱导LPO而损害精子及其DNA结构。事实上,20世纪80~90年代,有许多研究已经集中到雄性不育中氧化应激的作用及其与衰老的潜在关系上。有趣的是,适度的氧化应激对于精子功能是有利的。例如,把葡萄糖氧化酶或过氧化氢本身加到体外获能的介质中,则可提高仓鼠精子体外顶体反应。同样,外源性过氧化氢酶也可抑制顶体反应。人精子可产生适量的超氧化物阴离子,这与精子超活化运动和获能有关,而且过氧化氢可促进人精子蛋白中酪氨酸的磷酸化作用,这种反应有助于精子获能和受精。20世纪90年代中期,人们开始关注环境暴露使人精子产生活性氧自由基(ROS)并造成氧化损伤的问题。已证实吸烟者精子中存在氧化性DNA加合物,少数毒理学研究已强调化学物暴露产生ROS与生殖毒性之间可能的关系。

### 第三节 外源化学物对雌性生殖能力的损害作用与机制

#### 一、下丘脑-垂体-卵巢轴

##### (一) 概述

卵巢功能主要受中枢神经系统和内分泌系统调节。下丘脑基底部内侧的下丘脑神经元以脉冲方式分泌GnRH,其在神经递质和神经肽的调节下经下丘脑-垂体门脉系统到达腺垂体,促进腺垂体分泌FSH和LH。LH和FSH经体循环到达卵巢,使 $E_2$ 和孕酮( $P_4$ )的分泌量增加,以刺激第二性征的发育。FSH仅对卵巢颗粒细胞(granulosa cells)起作用:增加LH受体数使LH合成增加;增强细胞色素P-450芳香酶的表达,使雌激素合成增加;促进胰岛素样生长因子(IGF)、抑制素和活化素的合成;刺激蛋白聚糖的合成;增加乳酸的合成;增加DNA、RNA和蛋白质的合成。LH可刺激卵泡膜细胞或基质细胞(theca cells)合成雄激素,它是颗粒细胞雌激素生物合成的底物;LH也可作用于颗粒细胞以开始黄体化并产生排卵;LH通过增强某些酶(能促进胆固醇动员和 $P_4$ 生物合成)的表达而提高 $P_4$ 的生成;LH还可增加纤溶酶原激活剂的生成,其可使卵泡壁变得脆弱并破裂,同时,LH可刺激卵母细胞减数分裂的恢复。 $E_2$ 和 $P_4$ 可经负反馈机制抑制GnRH的分泌: $E_2$ 可降低GnRH脉冲的幅度; $P_4$ 可减少GnRH脉冲的频率。 $E_2$ 除了对下丘脑有抑制作用外,其对垂体前叶的促性腺细胞也有刺激作用,称之为正反馈。抑制GnRH脉冲发生器的神经源性和心理因素包括:应激、 $\beta$ -内啡肽、多巴胺阻滞剂、吗啡以及 $\alpha$ -肾上腺素能阻滞剂等。

##### (二) 下丘脑-垂体毒物

参与下丘脑调控促性腺激素的主要儿茶酚胺通路是肾上腺素能的和多巴胺能的。与排卵前

LH 和 FSH 升高有关的促性腺激素峰型分泌受去甲肾上腺素能药物的控制以及多巴胺、去甲肾上腺素和肾上腺素的刺激,这些儿茶酚胺可刺激 GnRH 的释放,从而调节 LH 和 FSH 的分泌和释放。 $\alpha$ -肾上腺素能受体介导儿茶酚胺对 GnRH 释放的刺激效应: $\alpha$ -受体拮抗剂(例如苯氧苄胺和酚妥拉明)可阻断 LH 分泌; $\alpha$ -受体激动剂(例如可乐定)可促进 LH 分泌。越来越多的证据表明,内源性类鸦片肽也可通过降低机体对 LH 和 FSH 峰的抑制作用而参与 GnRH 的分泌。外源性吗啡或类鸦片肽可抑制 LH 的分泌,而类鸦片肽受体阻滞剂纳洛酮可增加 LH 峰的高度。类鸦片肽介导神经内分泌功能的机制可能与其影响生物胺的分泌即减少多巴胺的转换及降低去甲肾上腺素的浓度有关。

表 13-1 对雌性生殖过程产生不良影响的化学物

| 一般机制                | 潜在作用                  | 化学物举例                                                                                     |
|---------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| 改变青春期、<br>动情周期/月经周期 | 影响卵巢功能和下丘脑/垂<br>体反馈调节 | 乙醇、 <i>o,p'</i> -DDT、异黄酮                                                                  |
| 损害排卵                | 改变内分泌信号               | <i>o,p'</i> -DDT、开蓬                                                                       |
| 改变交配行为              | 内分泌调节                 | $\beta$ -内啡肽、纳洛酮                                                                          |
| 改变配子/胚胎转运           | 输卵管动力改变               | $P_4$ 、DES、<br>雌激素、甲氧氯                                                                    |
| 影响子宫内膜环境            | 子宫收缩增加                | 前列腺素(PGF <sub>2<math>\alpha</math></sub> 、PGE <sub>1</sub> 、<br>PGE <sub>2</sub> )、RU 486 |
| 卵巢毒性/卵母细胞<br>破坏/闭锁  | 模拟天然激素结构              | 雌激素、DDT、甲氧氯、开蓬、<br>EGME                                                                   |
|                     | 一般化学反应                | 烷化剂、化疗药物(泼尼松、长春新碱、<br>长春碱、6-巯基嘌呤、辐射、甲氨蝶呤、阿<br>霉素)、乙醇、多环芳烃、环磷酸胺                            |
| 改变类固醇激素合成           | 抑制类固醇合成酶<br>活性        | 氨鲁米特、3-甲氧基联苯胺、雌激素、阿<br>扎斯丁、达那唑、螺内酯环氧司坦、爱波<br>司坦、三唑杀真菌剂                                    |
| 抗类固醇激素作用            | 抑制类固醇激素活性             | 克罗米芬、西咪替丁、螺内酯环氧司坦、<br>类鸦片肽                                                                |
| 抑制促性腺激素             | 下丘脑水平改变               | 大麻(8-9-四氢大麻酚)                                                                             |
| 改变母体行为/哺乳           | 下丘脑水平改变               | 安定药                                                                                       |
| 损害哺乳                | 催乳素水平改变               | 安定药                                                                                       |

(引自 AW. Hayes, Principles and Methods of Toxicology, Fourth Edition, 2001, p1313)

许多药剂可通过改变儿茶酚胺的合成、释放、受体活化以及重摄取而影响其水平。抑制 CNS 活性的药剂有麻醉剂、止痛剂、镇静剂和安定等;激发 CNS 活性的药剂有抗抑郁剂、兴奋剂和致幻剂等。滥用药物可破坏 H/P 系统,从而导致生殖功能紊乱。大麻及其主要精神活性成分 THC 可抑制啮齿类和灵长类动物 FSH、LH、PRL 和 T 的分泌,减轻性器官的重量,破坏动情周期并延

长性发育；当灵长类动物血清 THC 水平达到人常规使用大麻的水平时，可出现月经周期紊乱并抑制排卵。THC 的这种抗生育毒性可通过使用 GnRH 而得到恢复，表明 THC 引起的这种损害主要发生在 H/P 系统。在人类麻醉药成瘾者中的生殖功能障碍，临床表现主要是性欲和性能力下降、月经不规则以及不育，这与 H/P 功能改变有关。镇静-催眠剂巴比土酸盐可抑制动物 LH 和 FSH 的释放，从而降低类固醇激素水平，使用 GnRH 可恢复 LH 的分泌和排卵功能，表明其作用靶标是下丘脑。有关外源化学物对雌性生殖过程的不良影响见表 13-1。

### (三) 雌激素/抗雌激素

类固醇激素在调节垂体前叶功能中具有重要作用。环境雌激素也可修饰这种对下丘脑和垂体正常的反馈影响。大脑和垂体中都富含类固醇激素受体，具有雌激素、孕激素或雄激素活性的外源化学物，也能通过干扰内源性类固醇激素对其受体的作用而影响下丘脑-垂体对性腺功能的调控。研究发现，甲氧氯和十氯酮可改变这些组织中雌激素和孕激素受体的数量。用十氯酮处理观察到下丘脑和垂体中神经肽浓度的改变与雌激素引起的改变相似，表明雌激素对该神经肽的作用是影响中枢调节的机制。同样，由于十氯酮可导致卵巢切除的雌性动物血清 LH 水平下降、PRL 水平升高以及阴道角质化，所以有理由认为该类化学物破坏生殖功能与其是一种弱雌激素物质有关。

在大鼠和其他啮齿类动物中，新生儿暴露于雌激素活性物质可刺激子宫生长和阴道的提前开放，这是雌激素作用的两个特征性反应指标，可用于预测成年后持续动情综合征和生殖道异常。生殖雌激素（如  $E_2$ 、雌三醇和雌酮）、非生理雌激素（如 DES、开蓬、 $\alpha, \beta$ -DIT 和甲氧氯）以及三苯乙烯（如纳洛西丁、它莫昔芬和克罗米芬）可诱导大鼠产生上述反应。进一步研究发现，妊娠期使用雌激素可引起雌性灵长类动物雄性化行为特征，而使用 DES 则导致月经周期紊乱和生育力下降。有趣的是，甲氧氯和 DES 对垂体重量可产生相反的作用。虽然这两种化合物都可增加垂体中 PRL 浓度并促进 PRL 的释放，但增加 DES 剂量则可引起垂体重量的逐渐增加，而甲氧氯却使垂体重量显著下降，表明这两种类雌激素化合物对垂体和（或）下丘脑-垂体轴有不同的作用。

## 二、卵泡发育

\*\*\*

卵泡是卵巢的功能单位，卵巢卵泡由 3 种细胞组成：生殖细胞（或卵母细胞）、颗粒细胞和膜（内分泌）细胞。这三种细胞的生长、成熟与分化对成熟卵子的排出和黄体的形成都很重要。卵泡发育经历原始卵泡（primordial follicle）、初级卵泡（primary follicle）、次级卵泡（secondary follicle）和成熟卵泡（mature follicle）四个阶段。卵泡生命历程中三个易受损伤的阶段是：卵泡发育特殊阶段的卵原细胞和颗粒细胞的有丝分裂；卵原细胞减数分裂形成卵母细胞；颗粒细胞和膜细胞分化，从而对 LH 峰及排卵作出反应。

### (一) 原始卵泡

进行增殖的生殖细胞叫做卵原细胞（oogonia），生殖细胞一旦开始减数分裂即为卵母细胞（oocytes）。停滞在第一次减数分裂双线期阶段的卵母细胞和一层颗粒细胞以及基底膜共同构成

原始卵泡。处于休止期的原始卵泡组成原始卵泡池,接触毒物会损耗原始卵泡池,从而改变生殖功能。完全损耗原始卵泡池的毒物可引起永久性不育和卵巢早衰。接触卵巢毒物后原始卵泡的破坏可能经历数周、数月或数年后都不会被发现。香烟烟雾中的多环芳烃类化合物、类似环磷酰胺的化疗药物、农药以及电离辐射均可破坏大鼠、小鼠和人类的原始卵泡。

### (二) 初级卵泡

原始卵泡发育为初级卵泡涉及以下结构上的变化:卵母细胞体积增大、透明带的形成以及颗粒细胞由梭形转变为立方形。破坏透明带的毒物可损害颗粒细胞与卵母细胞之间进行信息交流和物质交换的能力,从而引起初级卵泡的破坏。颗粒细胞经有丝分裂活动由梭形转变为立方形,这种有丝分裂活动的增加可导致颗粒细胞数的增加。抑制颗粒细胞有丝分裂活动的化学物可损害颗粒细胞增殖的能力,从而损害卵泡的生长发育。相反,促进颗粒细胞有丝分裂和增殖能力的化学物则可引起卵泡过度生长(如卵巢肿瘤)。破坏初级卵泡的毒物往往引起不育,3-甲基胆蒽和苯并(a)芘等化学物可破坏初级卵泡。

### (三) 次级卵泡

当初级卵泡发育为次级卵泡时,包裹卵母细胞的颗粒细胞层数急剧增加,次级卵泡也获得形态不同的各层细胞(膜细胞)。膜细胞与卵泡相邻形成内膜层,而这些细胞又被另一层细胞包裹形成外膜层。成熟的内膜细胞可产生类固醇和生长因子,而外膜细胞本质上是成纤维细胞性的,可能起到一定的保护作用。在类固醇形成过程中,内膜细胞合成和分泌雄激素,雄激素然后从膜细胞被转运到颗粒细胞,在芳香酶的作用下转变为雌激素。膜细胞层一旦形成就可被血管中成分渗入,获得血液供应的次级卵泡将营养素、激素和生长因子输送到非血管化的颗粒细胞层,这些因子为颗粒细胞增殖和生长所必需。如膜细胞层大量血管化则可使得膜细胞对血液中毒物特别敏感,从而改变次级卵泡生成类固醇激素以及将营养素、激素和生长因子输送到颗粒细胞的能力,最终由于生殖系统的紊乱而使生殖能力遭到破坏。已知许多毒物如 DEHP、环磷酰胺、3-甲基胆蒽和二甲基苯并蒽可损耗卵巢中次级卵泡的数量,加速卵泡闭锁(atresia)的生殖过程是其机制之一。某些化学物导致卵泡闭锁可能与其抑制膜细胞(合成雄甾烯二酮)和颗粒细胞(合成 $E_2$ )功能,降低 FSH 和 LH 受体数目或这些受体与腺苷酸环化酶的偶联作用(芳香化酶、P450<sub>scc</sub>及前列腺素合成酶活性被抑制),以及加速或诱导颗粒细胞的程序性细胞死亡(PCD)有关,其结果是引起卵巢早衰、闭经乃至不育。

### (四) 成熟卵泡

次级卵泡发育为成熟卵泡时含大量卵泡液,其主要成分包括 LH、FSH、PRL、PG、雌激素、雄激素、 $P_4$ 、雌激素和孕激素血清结合蛋白、软骨素样物质、硫酸肝素以及蛋白水解酶、淀粉酶、胶原酶、透明质酸酶等。关于影响成熟卵泡的毒物类型及其毒作用机制方面的资料还很有限。已知某些化学药物和 PAEs 可破坏成熟卵泡,其主要机制可能是改变了成熟卵泡的生化过程或抑制了卵母细胞释放和成熟的能力。

### 三、卵母细胞

#### (一) 排卵障碍

由垂体分泌至血循环的 LH 可激发卵巢内一系列变化,使卵泡破裂和一个或多个成熟卵子的释放达到高峰。化学暴露对排卵的不良影响可能包括一种或多种卵巢功能的改变,这种不良影响可能完全发生在卵巢内,干扰局部胶原酶的代谢;也可能涉及卵巢的代谢变化,干扰下丘脑-垂体轴,抑制类固醇合成的反馈调节,影响 LH 峰的出现,从而阻遏成熟卵母细胞的释放。

1. 类固醇合成(steroidogenesis) 对性腺类固醇激素生成或活化过程的干扰可抑制排卵。下丘脑和垂体对  $E_2$ 、 $P_4$  以及卵巢周期中排卵时达到最高峰的 LH 分泌波的反馈作用均可作出应答反应。氨基苯乙哌啶酮或氰酮可抑制类固醇合成,从而阻断排卵。在动物发情间期染毒具有抗真菌活性的三唑,可抑制颗粒细胞芳香酶活性( $E_2$  合成减少),导致成年大鼠排卵阻遏。杀虫剂鱼藤酮是一种线粒体氧化抑制剂,在促性腺激素释放时给未成年大鼠腹膜内注射鱼藤酮可阻断排卵,卵巢细胞色素氧化酶活化和线粒体  $P_4$  生成显著下降。甲状腺素治疗可逆转排卵障碍(ovulatory disturbances),可能与其刺激线粒体氧化和  $P_4$  合成有关。

2. 卵巢血管改变 在成熟卵泡,LH 分泌峰是激发卵巢脉管系统标志性变化的开始,人 hCG 也可诱导这种反应,其特征是血管舒张、血液成分和血管渗透性增加,血液外渗入周围毛细血管基质,许多因子参与了这种血管改变。称作血管内皮生长/渗透性因子(MEG/PF)的二聚体蛋白可引起卵泡破裂,因为它是血管渗透性的强刺激剂,而且继促性腺激素刺激后在卵巢中被表达。发情前期皮下注射镉也可导致大鼠和仓鼠卵巢的血管损伤从而阻断排卵,而其他时段注射则不会改变卵母细胞的释放,表明这种短期抗排卵作用与阻断 LH 峰有关,而不是直接改变性腺功能。

3. 纤溶酶原激活剂(plasminogen activator, PA) 卵母细胞从囊状卵泡或成熟卵泡中释出必须通过若干胶原层,包括表面上皮下的基底层和颗粒层,此时卵巢毛细血管渗透性增加,基底层变得不连续,成熟卵泡面对的外部区域由于蛋白水解而变薄,此过程包括纤溶酶原激活变为纤溶酶以及胶原酶对胶原的裂解。PA 是一种丝氨酸蛋白水解酶,可刺激纤溶酶原转变为有活性的蛋白水解酶——纤溶酶,该酶可能参与胶原酶前体的激活。大鼠卵巢颗粒细胞中纤溶酶的水平可发生周期性变化,发情前期达高峰,促性腺激素刺激后可升高。采用反式-氨基环己醇羧酸抑制纤溶酶活性,至少可部分阻断排卵。在大鼠灌注的卵巢中加入人工合成的胶原酶抑制剂 SC44463,可抑制 LH 刺激下的排卵,再次证实了胶原裂解对卵泡破裂的重要性。

4. 前列腺素(prostaglandins, PG) 血管渗透性与纤溶酶原激活剂的活性都受到 PG 的调节。PG 的生成是卵泡破裂前过程中重要的中间体。兔、大鼠和灵长类动物给予前列腺素  $E_2\alpha$  ( $PGE_2\alpha$ ) 或  $F_2\alpha$  ( $PGF_2\alpha$ ) 可诱导排卵,而静脉、腹膜下或卵泡内注射 PG 合成抑制剂吲哚美辛则可阻断排卵。成熟卵泡的破裂与局部炎症反应有关,这与 PG 在介入炎症反应中的作用是一致的。因此某些抗炎物质可阻断排卵。许多非类固醇化合物(如二氯芬酸、非诺洛芬、尼氟灭酸、托美丁、保泰松等)的抗排卵效应和某些类固醇物质(如泼尼松龙、地塞米松)排卵抑制作用的缺乏,与其在特异性炎症模型中的抗炎能力呈正相关。蛋白激酶 C(PKC) 也参与刺激了  $PGE_2\alpha$  和

PGF<sub>2</sub>α的合成。给予PKC激活剂佛波酯能诱导垂体切除后大鼠的卵泡破裂,而给予PKC抑制剂甲基哌嗪则可阻断事先注射促性腺激素后大鼠的排卵。

5. 细胞活素(cytokines) 是一组分子多肽类物质,属于巨噬细胞炎性蛋白,是免疫系统中高度机动的蛋白介质,由除巨噬细胞外的其他细胞合成,能刺激多种不同类型细胞的增生和分化。参与调节排卵过程的细胞活素大多是白介素(尤其是IL-1)和肿瘤坏死因子 $\gamma$ -α(TNF-α)。IL-1能刺激PG的合成并诱导与卵泡相邻的卵泡外细胞NO的合成,与组胺和PG一起共同调节排卵前早期卵巢的血管舒张和卵泡充血。NO抑制剂氨基胍可阻断排卵,而NO生发剂硝普钠则可逆转氨基胍对卵母细胞释放的抑制作用。TNF-α是卵巢类固醇合成的调节因子,体外试验显示可增加发情前期大鼠卵巢膜细胞P<sub>4</sub>的合成。TNF-α也可刺激PGE<sub>2</sub>α和PGF<sub>2</sub>α的合成。

## (二) 卵母细胞毒性

包裹在成熟卵泡内发育完全的卵母细胞是具有独特特征的高度专业化的细胞,是生殖毒物作用的靶细胞。排卵后,卵母细胞有一个短暂的受精窗口期(window period of fertilizability),此时染色体浓缩、DNA修复或RNA和蛋白质合成能力受到限制。因此,窗口期卵母细胞的成熟和受精过程极易受到外源化学物的侵害,造成纺锤体的结构和功能异常、DNA损伤和染色体畸变、以及细胞周期紊乱等。

1. 纺锤体结构和功能异常 众所周知,啮齿类动物在围受精期内急性染毒纺锤体毒物秋水仙素,可诱导异常合子(zygotes)的形成并导致不良妊娠结局。合子异常包括:由于第二极体分离失败或多精入卵而形成三倍体;非整倍体或异常染色体成分;原核数量异常改变。同样,在减数分裂I期,中国仓鼠或小鼠用秋水仙素处理可导致减数分裂阻滞或卵母细胞减数分裂II期形成非整倍体,并存在剂量和时间的依赖性。据此推测上述效应因减数分裂期纺锤体破坏所致。纺锤体破坏的直接证据来自体外实验:诺卡达唑体外暴露诱导了微管蛋白的解聚和卵母细胞减数分裂I期染色体的分散以及减数分裂II期非整倍体的形成,体外受精过程中,在卵母细胞减数分裂II期给予诺卡达唑导致了纺锤体的溶解并伴有染色体的簇性分散;雌性仓鼠和小鼠在其卵母细胞成熟期(纺锤体形成)体内染毒卡苯达唑,可导致卵母细胞减数分裂II期非整倍体的形成,雌性仓鼠在受精期(减数分裂II期)给予卡苯达唑也引起合子非整倍体的形成。许多实验性或环境化学物包括金属类物质,都可诱导小鼠卵母细胞非整倍体的形成,而且大多数都是通过破坏纺锤体的结构和功能发挥作用的。

2. 染色体畸变 许多诱变剂对生殖细胞可产生毒效应,显性致死试验可用于检测雌、雄生殖细胞的诱变性。繁殖前0.5~3.5天染毒,许多化学物显示对雌性小鼠可引起显性致死效应(吸收胎增加,存活胎减少),但在雄性小鼠精子发生期的任何时段染毒均不会产生该效应,这些化学物包括DNA插入剂阿霉素、抗血吸虫药海葱酮、抗生素博来霉素和交联剂顺铂等。对形成合子的第一次有丝分裂中期的染色体分析证实,这些化学物可诱导染色体畸变,且合子转移试验排除了母体毒性诱导的可能性。某些活性化学物如丙烯酰胺和氧化乙烯也是合子的靶标毒物,对雌、雄动物均可产生显性致死效应。

3. 氧化性损伤 GSH是胞内主要的游离巯基,在保护细胞免受氧化应激损伤中起重要作用。GSH在卵巢中的浓度相对较高,成熟卵母细胞中的含量显著高于非成熟卵母细胞。卵母细胞中的GSH对于精卵融合后不久激发精子染色质分散具有重要意义。体外卵母细胞染毒特异

性的、可逆的 GSH 氧化剂二酰胺,可导致精子染色质分散的可逆性抑制以及减数分裂期纺锤体过早的溶解。对体外染毒二酰胺的卵母细胞中氧化还原型谷胱甘肽(GSSG)含量的分析结果显示,当 GSH:GSSG 比例明显下降时可出现上述毒效应。这些研究结果表明,能产生氧化应激的化学物既可损伤精子染色质的生理过程,又可阻断受精卵减数分裂的完成。

4. 干扰细胞周期 精子与卵母细胞卵黄囊的融合可激发胞内钙的释放并启动级联反应,包括卵母细胞皮质颗粒的胞外分泌以及激活卵母细胞减数分裂的再启动,皮质颗粒的胞外分泌对卵母细胞阻滞多精入卵十分关键。如果化学物诱导的卵母细胞发生排卵前老化,则可改变激素对排卵的控制,使防止多精入卵的天然机制遭到破坏。同样,能改变钙渗透性(如离子载体)或细胞信号(如 PKA 或 PKC 抑制剂)的实验性化学物,可导致卵母细胞的非正常激活。6-二甲氨基嘌呤可通过对促卵母细胞成熟因子的快速抑制而诱导卵母细胞的异常激活。这种细胞周期的快速位移干预了卵母细胞的两个主要功能:减数分裂的完成和精子核的解聚。

## 第四节 外源化学物对生殖能力影响的检测与评价

### 一、雄性生殖能力检测与评价

#### (一) 雄性生殖毒性检测方法

许多试验已被推荐或用于评价雄性生殖毒性(表 13-2),多个细胞位点或生殖过程对于外源化学物和(或)药物的作用很敏感。雄性生殖毒性的特异性观察终点主要包括:睾丸、附睾、精囊、前列腺和垂体等器官的重量,大体检查和组织病理学观测,精子数量(计数)和质量(形态、活率)评价,交配时雄性动物爬上、插入、射精等性行为,GnRH、LH、FSH、T、E<sub>2</sub>、PRL 等激素水平,睾丸下降、包皮分离、精子生成量、肛门-生殖器间距和外生殖器结构等。与雄性生殖系统相关的许多内分泌和生化反应的干扰作用,很少在一次暴露于某种(些)毒物后发生。因此,检测雄性生殖毒性很可能需要持续多重暴露。大多数试验都是损伤性的,因而仅限于动物而通常不能用于人。

用于评价雄性生殖系统不同参数的敏感性有很大的不同,许多标准的生殖毒性试验程序既有优点也有局限性。睾丸重量是一项快速的定量指标,但这种测量没有精子计数敏感,而且容易受到水浸渗的影响(水肿)。对于正常的雄性来说,每个睾丸每天产生的精子数量很大程度上取决于睾丸的大小。许多哺乳动物每日精子生成量与其睾丸大小相关。虽然生育率综合了所有的生殖功能,但它作为一项指标是很不敏感的。然而,采用连续系列交配试验(serial mating studies)以评价精子细胞生物学状态的生育研究,无论是对于显性致死突变还是对于雄性生殖能力,都一直是一项很有用的试验。虽然睾丸组织学不太客观也不特别定量,但它可提供有关靶细胞形态学的信息。对于生精小管的组织学评价可了解细胞的完整性并提供有关生精过程的信息。通过评价雄激素水平,有助于判断间质细胞功能;通过测定 ABP 水平,则可评价支持细胞功能。

为评价睾丸损伤,生精小管分期十分重要,如果检测到损害,则一定要确定损害的特性。

例如,支持细胞损害常通过细胞间或细胞内空泡来确认,或通过基底支持细胞胞质肿胀确定。生殖细胞的变性和坏死可根据正常的核固缩标准和胞质嗜酸性粒细胞增多来确定。对睾丸组织学的某些定量评价包括测量生精小管直径、精母细胞或圆形精子细胞的数量。因此,评价某化学物质是否对精子发生产生有害作用主要有两个方法:睾丸形态学评价和精子发生的功能评价。

表 13-2 雄性生殖毒性检测方法

|                 |                     |
|-----------------|---------------------|
| 睾丸              | 内分泌                 |
| 原位大小            | 黄体生成素               |
| 重量              | 卵泡刺激素               |
| 精子细胞储量          | 睾酮                  |
| 大体与组织学评价        | 促性腺激素释放激素           |
| 非功能性生精小管(%)     |                     |
| 具有精子的生精小管(%)    | 生育率                 |
| 生精小管直径          | 暴露率;妊娠率             |
| 细线期精母细胞计数       | 每个孕妇(或怀孕动物)的胚胎数或产仔数 |
|                 | 胚胎成活率;黄体数           |
| 附睾              | 2 细胞卵~8 细胞卵         |
| 重量及组织学          | 每卵精子数               |
| 附睾体精子数          |                     |
| 附睾尾精子活力(%)      | 体外试验                |
| 附睾尾大体精子形态学(%)   | 介质中精子孵育             |
| 附睾尾详细精子形态学(%)   | 仓鼠卵穿透试验             |
| 生化分析            |                     |
| 附属性腺            | 需要考虑的其他试验           |
| 组织学             | 睾丸密度张力测量            |
| 比重测定(重量分析)      | 睾丸定性组织学             |
|                 | 精子释放循环周期            |
|                 | 睾丸定量组织学             |
| 精液              |                     |
| 总体积             | 精子活率                |
| 无凝胶体积           | 时间—暴露照相术            |
| 精子浓度            | 多重—暴露照相术            |
| 精子总数/射精         | 显微电视照相术             |
| 精子总数/禁欲日        | 显微电视照相术             |
| 肉眼观察精子活率(%)     | 精子膜特征               |
| 录像磁带上精子活率(%和速率) | 精子代谢评价              |
| 大体精子形态学         | 精子中荧光 Y 小体          |
| 详细精子形态学         | 流式细胞术检测精子           |
|                 | 人精子原核核型             |
|                 | 宫颈粘液穿透试验            |

(引自 MJ. Thomas 和 JA. Thomas, Casarett & Doull's Toxicology, Sixth Edition, 2001)



## (二) 精液分析与精子评价

精液分析可作为评价睾丸和睾丸后器官功能的指标。采用人工鞘可从许多实验动物和家养动物中收集精液。电射精技术和化学诱导射精也被用来收集精液标本。为了保证有关睾丸功能结论的有效性,必须进行多次射精定量和定性特征的分析。由于精液的形成受到附性腺、睾丸和附睾的共同影响,因此只有用一次射精的精子总数估计精子生成量才是可靠的。为计算每次射精的精子总数,需要测量射精体积、精子密度和精液特征,必须考虑在此过程中可能发生的误差来源。

精子评价的重要参数包括精子计数、形态学及其活率,可通过采集射精和附睾尾精子标本进行分析。精子形态学研究主要是观测精子头和鞭毛的异常改变,精子头畸形发生率的增加可反映生殖细胞的致突变性,但并非所有致突变物都能诱导精子头异常。许多外源化学物可选择性地影响精子活率并降低生育率,许多研究已把检测精子活率作为生殖毒性观察终点。近年来在精子分析的自动化方面取得了很大进展,计算机辅助精子分析(CASA)系统可用于精子形态、生理、活率和鞭毛的分析。CASA 可使我们通过造影术或显微技术观察分析数字化的静态和动态的精子图像。精子染色体结构分析(SCSA)可用于检测毒物诱导的精子核和膜的完整性以及精子线粒体活性,分析精子的染色质结构异常和DNA损伤,评价精子的正常发育状态和受精能力,并可预测人的不育情况。检测人和啮齿类动物精子DNA损伤的其他方法还有COMET试验、TUNEL试验以及氧化性DNA加合物测定。检测精子非整倍体和染色体断裂的新方法FISH亦已用于精子评价。流式细胞术(FCM)分析可用于评价睾丸特殊的细胞群,这种技术具有能同时评价以细胞-细胞为基础的多种特征的优点,能快速分辨不同细胞类型的相互关联或特性。细胞大小和形状、胞质颗粒和色素沉着、表面抗原、凝集素结合、DNA/RNA和染色质结构的测量都是可用于评价的体内、外参数。

## (三) 雄激素及其受体

雄激素受体(AR)属于类固醇/核受体超家族成员,所有成员具有基本的和功能的同源性。尽管AR和其他类固醇激素受体之间具有同源性,但AR的作用有高度特异性。AR由三个功能区构成,AR天然存在的两个主要配体是T和DHT。AR作为一种磷蛋白存在于不同类型的细胞中。T和DHT的AR也已被用于评价不同性腺毒物的作用。许多二价金属离子能抑制啮齿类动物前列腺中雄激素-受体结合。除了能干扰雄激素结合的重金属外,DDT及其主要代谢产物p,p'-DDE也是潜在的AR拮抗剂,不仅能抑制雄激素与AR结合,而且能抑制雄激素诱导的转录活性,从而影响雄性生殖。

## (四) 睾丸功能研究

人们一直致力于研究所谓的睾丸标志酶以期作为性腺细胞分化是否正常的指标。至少有八种酶的作用已被研究并作为性腺毒性的预测指标:透明质酸酶(H)、乳酸脱氢酶同工酶-X(LDH-X)、山梨醇脱氢酶(SDH)、 $\alpha$ -甘油磷酸脱氢酶(GPDH)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(C6PDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(G3PDH)和异柠檬酸脱氢酶(ICDH)。支持细胞的许多分泌物对于评价雄性生殖功能具有某些潜在的价值。在这些分泌物中,ABP作为检测性腺损伤的潜在指标可能是最受关注的。支持细胞和转铁蛋白可能受到类似调节剂(如FSH、胰岛素)的影响。间质细胞培养也可考虑作为评价性腺内分泌功能的潜在指标。猪间质细胞培养可用于区分

类固醇合成的特异性和非特异性抑制剂。和支持细胞一样,间质细胞也能分泌多种蛋白、肽类和其他一些物质。睾丸含有不同的神经肽和生长因子,包括 LHRH、TRH、POMC、缩宫素、血管紧张素胺及一些肽类前体,这些因子中有许多参与睾丸的自分泌和旁分泌调节。

## 二、雌性生殖能力检测与评价

### (一) 雌性生殖毒性检测方法

对雌性哺乳动物生殖过程的评价要比雄性复杂得多。雌性生殖过程包括卵子发生、排卵、性发育、性交、配子及合子转运、受精和孕体着床。所有这些过程或事件都为化学物和药物的干扰作用提供了潜在的机会。对雌性生殖道干扰作用的毒理学评价与致畸和致突变评价的试验方法相互重叠显然是不足为奇的。发育毒性观察终点主要包括 I 型和 II 型改变:前者表现为同窝仔活产数减少、死产数增加、同窝仔存活率下降、吸收胎数增加和畸胎儿数增加等;后者表现为出生体重下降、出生后存活率下降、出生后生长发育和生育能力下降以及发育迟缓胎儿数增加等。大体病理学和组织病理学对生殖能力评价很重要,光镜和电镜在观察卵巢和垂体的超微结构方面同样很有价值。与雄性一样,评价雌性生殖系统也有许多有用的试验(表 13-3)。

表 13-3 雌性生殖毒性检测方法

|               |                          |
|---------------|--------------------------|
| 体重            | 输卵管                      |
| 卵巢            | 组织学                      |
| 脏器重量          | 配子转运                     |
| 组织学           | 受精                       |
| 卵母细胞数         | 早期胚胎转移                   |
| 卵泡闭锁率         | 子宫                       |
| 卵泡类固醇生成       | 细胞学和组织学                  |
| 卵泡成熟          | 宫腔液分析                    |
| 卵母细胞成熟        | (外源化学物,蛋白质)              |
| 排卵            | 蜕膜反应                     |
| 黄体功能          | 功能障碍性出血                  |
| 下丘脑           | 子宫颈/外阴/阴道                |
| 组织学           | 细胞学                      |
| 神经递质、神经调节剂和神经 | 组织学                      |
| 激素合成与释放的改变    | 粘液生成量                    |
| 垂体            | 粘液质量(精子穿透试验)             |
| 组织学           | 生育率                      |
| 营养激素合成与释放的改变  | 暴露率:妊娠率                  |
| 内分泌           | 每个孕妇(怀孕动物)的胚胎数           |
| 促性腺激素         | 或产仔数                     |
| 绒毛膜促性腺激素水平    | 胚胎存活率;黄体数                |
| 雌激素和孕酮        | 着床率;黄体数                  |
|               | 2 细胞卵~8 细胞卵              |
|               | 体外试验                     |
|               | 应用超排卵的卵子与化学物共培养或处理组雌性动物的 |
|               | 卵子进行体外受精                 |

(引自 MJ. Thomas 和 JA. Thomas, Casarett & Doull's Toxicology, Sixth Edition, 2001)

(二) 一代和多代生殖毒性(或繁殖)试验

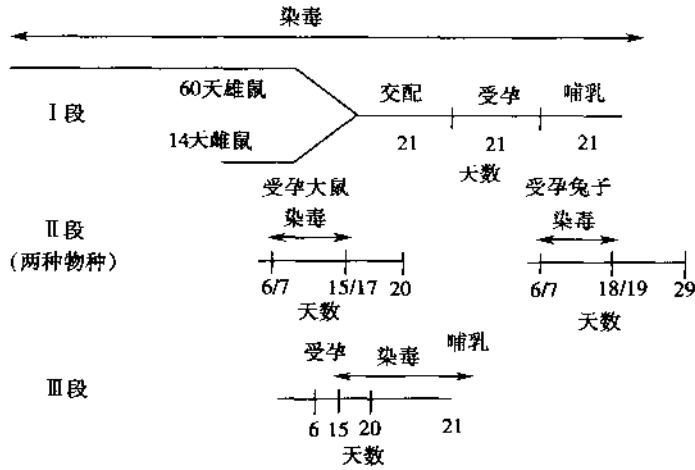


图 13-2 III段生殖毒性试验-FDA

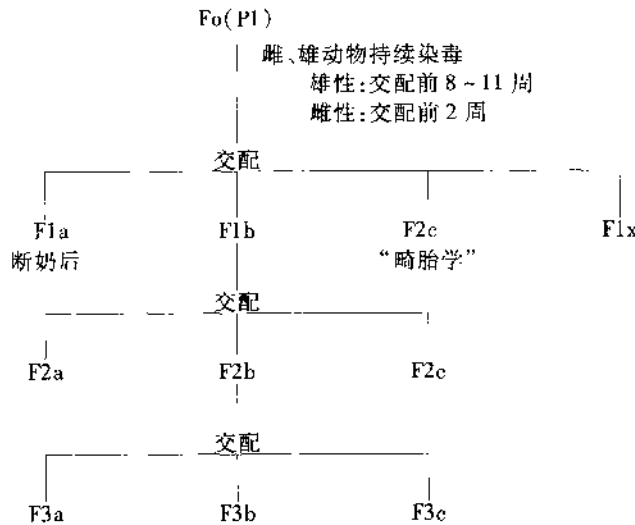


图 13-3 大鼠三代(多代)生殖毒性试验

要研究人类反复接触的外源化学物(如农药、食品添加剂、EEDs)对生殖系统的影响,仅仅做三段生殖毒性试验(图 13-2)是不够的,还应进行多代生殖毒性试验。将各段试验联合成一代或多代生殖毒性试验(Single-generation or multigeneration test of reproductive toxicity)可代替分开进行的每段试验。一代生殖毒性试验是指亲代(F0代或P代)动物直接染毒受试物,仔一代(F1)在宫内和哺乳期接触受试物,其交配仅在P代间进行,主要评价受试物对P代青春期前后和成年动物亚慢性暴露的影响;两代(多代)生殖毒性试验是指仔代(如F1和F2)从怀孕到出生前的宫内持续暴露和断奶前的持续暴露,即P代直接染毒受试物,F1代既有直接接触,也有经母体

的间接接触,仔二代(F<sub>2</sub>)在宫内和哺乳期接触受试物,其交配在P代间和F<sub>1</sub>代间进行,主要评价从染毒到发育全过程受试物对生殖功能的影响。多代生殖毒性试验见图13-3。

### (三) 雌激素及其受体

大鼠、小鼠和人的雌激素受体(ER)有ER $\alpha$ 和ER $\beta$ 两个亚型,它们在C末端配体结合区和N末端反式激活区不同。ER在支持细胞、间质细胞、附睾和附属性器官中都有表达。ER $\beta$ 在支持细胞和大多数生殖细胞中有表达。这两类细胞中芳香化酶活性的存在提示雌激素可能参与精子发生的调节。ER $\beta$ 在啮齿类动物和人的睾丸中有表达。ER $\alpha$ 定位于胚胎和成年啮齿类动物睾丸间质细胞的核中。

雌激素和T的生物学活性通过定位于特异性靶细胞核中的高亲和力受体发挥作用。这种雌激素和T的受体属于核蛋白超级大家族的成员。核激素受体是单一的多肽,形成分散的功能区(A~F区)。可以理解,类固醇激素(如雌激素)受体的激活可调节特异性基因的转录活性,从而调节类固醇激素经典的或基因组的作用。然而,并非所有的类固醇作用都可用这种经典的类固醇-靶细胞交互作用模型来解释。相反,细胞表面产生信号的类固醇激素受体被认为是非经典的、非基因组的类固醇作用。在生殖系统许多类型的细胞中,雌激素发挥的早期生理作用太快,以致于未通过基因组序列激活后的调节。涉及非基因组类固醇作用的信号转导机制尤其在精子中得到证实,Ca<sup>2+</sup>可能是大多数类固醇非基因组作用的第二信使。非基因组和基因组很可能会产生协同作用,从而使得作用快速开始并持续很长时间。

血清雌激素水平或对靶器官的雌激素效应是评价卵泡正常功能的指标。组织和器官的反应包括未成熟大鼠阴道开口时间、子宫重量、子宫内膜形态学变化和(或)血清FSH和LH水平。颗粒细胞培养技术为评价化学物抑制细胞增殖和(或)雌激素合成的能力提供了直接筛选模型。E<sub>2</sub>的生物合成及其通过卵巢代谢为雌酮和雌三醇,是评价生殖过程的另一指标。这些类固醇激素在外周组织中的分解代谢是肝脏的重要功能。核和胞质中的雌激素/P<sub>4</sub>在毒理学研究中有重要用途。由于某些化学物(如DDT和其他有机氯农药)可竞争性结合E<sub>2</sub>及P<sub>4</sub>受体并可能改变他们的分子构象,故这些受体显得尤为重要。

### (四) 卵巢功能研究

1. 卵子发生与卵泡形成 直接评价受试化学物对卵子发生和(或)卵泡形成影响的方法包括对卵母细胞的组织学检查和(或)卵泡数的测定。化学物对卵子发生的影响也可通过检测生育率进行间接评价。其他的有关动物卵巢毒性的间接检查包括阴道开放时间、生殖退化开始的时间和总的生殖能力。形态学检查能够定量评价始基生殖细胞数、干细胞迁移、卵原细胞增殖和尿生殖脊发育。体外试验技术可用于评价始基生殖细胞增殖、迁移、卵巢分化和卵泡形成。连续的卵母细胞计数可以监测实验动物卵母细胞和(或)卵泡破坏情况,该方法是定量评价化学物对卵母细胞和(或)卵泡作用的可靠手段。根据实验动物<sup>3</sup>H-胸核苷的摄入、卵巢对促性腺激素的反应和卵泡动力学,可分析卵泡的生长情况,这些方法可鉴定对卵泡生长的直接和间接作用,也可鉴定药物和其他对卵子有毒性作用的环境化学物。

2. 排卵、受精与着床 不同哺乳动物物种间排卵是有差异的。某些动物在交配时排卵(如兔子),而其他物种(如人和类人猿)排卵是一个激素依赖性的周期性过程。许多类固醇和非类

固醇样物质可干扰排卵的神经内分泌过程。在啮齿类动物的动情周期,其排卵一般间隔4~5天。动情期间排卵可采用阴道上皮角化法快速检测。大鼠动情周期分为四个阶段(动情前期、动情期、动情后期和间情期),并可通过阴道细胞学检查得到确认。

化学物和药物都可影响受精和着床过程。生殖细胞的形成、成熟和联会构成了一个复杂的生理事件,这一过程对外来物质十分敏感。取自不同哺乳类动物(包括人)的精子和卵子,也可在体外完成受精过程。妊娠是对生育能力最好的评价,这是成功地用于研究有关内分泌毒性的重要指标。用大鼠进行的交配试验是判断总生殖能力的基本方法。

### 三、生殖能力综合评价

#### (一) 实验设计指导原则

多年来,研究者们一直努力于实验方法的标准化。模拟人群暴露的测试程序有两个不同的途径:其一是基于仅在妊娠的某个阶段才可更快地建立起某种化学物/药物对生殖系统的特殊损伤模型;其二是针对某些有长期暴露可能的化合物设计的,而且要考虑多代生殖毒性试验的染毒浓度。为统一生殖毒性试验指导原则,近年来研究者们已做出了多种努力。评价生殖和发育毒性试验的指导原则见表13-4。该表虽然没有提供交配程序、F1交配,二次交配及其他实验设计条件的具体实施方案,但在不同管理机构间具有类似性。美国食品与药品管理局(FDA)的生殖毒性试验指导原则与环境保护署(EPA)及经济合作与发展组织(OECD)是一致的。目前尚缺乏国际协调会议(ICH)的一些指导原则。虽然这些指导原则会随着科学技术的发展要被定期修订,但FDA的红皮书II已将多代生殖毒性试验从3代调整为2代,繁殖的窝数/代数也已从2减为1,新增了对动情周期、阴道开口时间及包皮分离时间的观测,增加了对组织病理学尤其是对幼仔检测的数量。

表13-4 生殖毒性试验指导原则的比较

|      | 美国 FDA<br>(1993)     | 美国 EPA<br>(1996)     | OECD<br>(1996)       | ICH<br>(美国 FDA, 1994)           |
|------|----------------------|----------------------|----------------------|---------------------------------|
| 繁殖代数 | 2代,1窝/代              | 2代                   | 2代                   | 2代                              |
| 动物种属 | 啮齿类动物                | 大鼠(首选)               | 大鼠(首选)               | 大鼠(首选)                          |
| 动物周龄 | 5~9周                 | 5~9周                 | 6~9周                 |                                 |
| 动物数  | 雌、雄各30只              | 至少有20只妊娠             | 至少有20只妊娠             | 充分满足试验需要                        |
| 染毒剂量 | 至少3个剂量水平             | 至少3个剂量水平             | 至少3个剂量水平             | 至少3个剂量水平                        |
| 染毒途径 | 混入饲料(首选)或饮水中由动物摄取,灌胃 | 混入饲料(首选)或饮水中由动物摄取,灌胃 | 混入饲料(首选)或饮水中由动物摄取,灌胃 | 根据预期人的用法而定                      |
| 染毒方案 | 交配前8~11周,整个交配期和妊娠期   | 交配前10周;交配期和妊娠期持续给药   | 交配前10周;交配期和妊娠期持续给药   | 交配前、交配期和植入期处理雌、雄动物;其他处理方案根据需要而定 |

## (二) 生殖危险度评价方案

FDA 和 EPA 制定了外源化学物和药物的生殖危险度评价方案。FDA 把有关发育、生育率和一般生殖毒性试验 3 个不同方案(即三段生殖毒性试验)列入药物研究的指导原则中:一段:生育率和雌、雄性生殖功能研究(生育率与早期胚胎发育毒性试验),主要评价受试物对配子的发育与成熟、交配行为、受精、孕体着床前和着床期的有害影响,即对 A 期(交配前至妊娠期)和 B 期(妊娠至着床期)生殖功能的评价;二段:发育毒理学和畸胎学研究(胚胎-胎儿毒性试验或致畸试验),主要评价受试物对胚胎发育与主要器官形成、胎儿和器官生长发育的有害影响,即对 C 期(着床至硬腭闭合期)和 D 期(硬腭闭合至怀孕末期)生殖功能的评价;三段:围产期和出生后毒性试验(出生前后发育毒性试验),主要评价受试物对胚胎与胎儿的生长发育、断奶前后子代的生长发育直至成熟的有害影响,即对 C 期、D 期、E 期(出生至断奶期)和 F 期(断奶至性成熟期)生殖功能的评价。

20 世纪 80 年代初,美国国家毒理学研究规划(NTP)中采纳了连续繁殖生育率评价(FACB)方案。FACB 方案被设计用于缩减生殖毒性试验的时间,但仍然能提供与来自其他试验系统的可比较的资料。FACB 方案每组所用试验动物增多,总体上提高了统计学分析的把握度。由于生育率是生殖毒性评价极其重要的指标,也是生殖系统评价中最不敏感的指标之一,因此这种对提高统计学分析把握度的微妙改进是有重要意义的。毒理学研究,尤其是涉及精液分析和生育率评价的试验设计,必须重视统计学上的把握度问题。

生殖毒性试验扩展为多代生殖毒性试验,很难科学合理地付诸实施。虽然 FDA 的分段试验对评价生殖毒性或安全性都具有非常重要的意义,而且多代生殖毒性试验在试验费用的合理开支上也有其非常科学的优点,然而,为了改进所获得的毒理学信息,目前的多代生殖毒性试验方案需要修订。FDA 的生殖毒性试验指导原则要求对每一种新药进行临床前动物试验,该试验要根据女性使用该药的方式而定。依据药物潜在的危险性(如 A 类,未证实对人有发育毒性,D 或 X 类,证实可致出生缺陷),FDA 进一步将药物分为 5 种不同水平。

## (三) 影响人类生育率的危险因素

多数人都暴露于大量的化学物中,这些化学物对人类的生殖能力可能是有害的。实验室研究已经证实很多化学物都有生殖危害。尽管由动物实验资料外推到人不够精确,但许多化学物已显示出对人类生殖过程的有害效应。这些化学物包括药物、尤其是类固醇激素和化疗药物、金属和微量元素、农药、食品添加剂和污染物、工业化学物以及消费品等。

人类男性对环境和职业性毒物比其他哺乳动物敏感,生殖危害和危险性已促使某些职业制订了保护性政策。自报道杀真菌剂 DBCP 对睾丸的损伤效应以来,后再次证实男性生殖系统对 DBCP 职业性暴露较为敏感。论证人类暴露于职业性化学物与生殖系统改变的直接相关性是相当困难的。缺乏这种相关性证据的一个非常复杂的因素是,正常生殖过程很少在最佳的生理状态下进行。值得注意的是慢性病可能对性腺功能造成不利的影晌。许多系统的疾病可以减少精子发生,包括甲状腺毒症、甲状腺功能减退症、肾衰、流行性腮腺炎和局限性回肠炎。许多非激素类疾病同样可减少血清中 T 及促性腺激素的含量。衰老、营养缺乏和肥胖都能影响生育率。因此,患有内分泌或非内分泌疾病都可影响男性生育率。多种因素可以影响女性生殖系统的正常

状态,生理的、社会的和心理的因素都和月经周期的紊乱有关,如年龄、极端体重、肝病、甲状腺功能障碍、宫内节育器、紧张、锻炼及婚姻状态等。

#### (四) 环境流行病学研究

仅以动物实验结果来预测人的情况仍存在某种不确定性。如果这些实验结果是来自多个种属尤其是灵长类动物,并且流行病学研究有助于对实验室数据加以证实,那么这种不确定性可以有所减小。尽管哺乳动物对药物和(或)化学物的反应有普遍的相似性,但在某些方面仍有显著的差异,不同种属的这些差异主要归因于毒物动力学,尤其是生物转化。根据高效的动物模型结果我们可以预测更多的信息。给予实验动物定量的药物研究以外推人的确切治疗量比将动物模拟暴露于某化学物来推测人的环境暴露要容易得多。职业暴露水平很难精确评价,环境污染水平甚至更难证实。通常都是多种化学物的混合暴露,个体不可能知道他们所接触的所有化学物。因此,单一化学物的作用很难评估,其因果关系几乎难以确立。

流行病学研究在因果关系的建立中显得越来越重要。流行病学研究和危险度评价是密不可分的。生殖监测是检测内分泌过程的重要基础。通过准确地检测工人对工业/环境毒物的暴露情况,可以建立更为安全的作业条件。如果某一人群已经暴露于某种化学物或一定范围内使用了某种化学物,那么流行病学研究可用于证实暴露对生殖的影响。普遍认为,是否科学地选择对照人群是影响职业环境对生殖有害效应研究的重要因素。流行病学研究设计包括回顾性和前瞻性收集资料。流行病学研究要考虑的统计学问题包括把握度、样本量、显著性水平及其意义的大小。

(王心如)

## 第一节 概 述

神经系统是机体情感、思维、运动、神经内分泌功能、免疫功能及循环功能调节的中心。中枢神经系统是接受来自周围神经系统、内分泌系统和免疫系统的信息,然后整合这些信息并且调节这些输入信息的系统。神经系统在全身生理调控方面发挥着主要作用,实际上所有生理功能均受神经系统影响或控制。其他系统(如循环和生殖系统)可为神经系统提供信息,后者反过来再控制前者的功能活动。神经系统还能整合不同器官系统的各种功能。因此,神经功能障碍所造成的危害远远超出了神经系统本身,而其他系统功能失调反过来也会改变神经系统的功能。

神经系统有其自身的结构特点。除了神经元以外,中枢神经系统包含血-脑脊液屏障(blood-brain barrier, BBB),而外周神经系统存在血-神经屏障(blood-nerve barrier, BNB)系统,这些结构在神经组织代谢调控方面具有重要作用。神经细胞骨架结构(包括神经细胞中的微管和神经丝)不再简单地被看作为支持细胞结构的细胞器。这些结构对维持神经细胞的功能和生存至关重要。许多神经毒物如重金属和有机溶剂都可破坏这些结构,引起神经系统各种退行性和功能性变化。过去人们一直认为胶质细胞的功能是支持作用,其中星形细胞起连接支撑和损伤后的瘢痕形成的作用,而少突细胞在中枢神经系统参与轴突髓鞘的形成。目前认为,神经星形胶质细胞与神经代谢、修复和神经元损伤密切相关。

人类最早认识可引起机体神经系统损伤的神经毒物,主要是动植物中的天然毒素,如箭毒、蛇毒。到公元前370年古希腊时代,希波克拉底医生开始认识到昏迷、惊厥和严重腹绞痛与接触高浓度铅有关。大量食入鹰嘴豆可产生一种中枢运动系统疾病——山豆中毒(lathyrism),这种疾病最初特征表现为痉挛性步态和深肌腱反射亢进,进一步出现巴彬斯基反射症状,最终下肢功能丧失。19世纪工业革命以后,随着工业的发展,环境化学物引起的神经系统损伤的事件也越来越多。仅从1900~2000年间,由于环境化学物引起的神经系统损伤的大事件大约出现30余起(不包括战争使用的战争毒剂),约15万余人中毒,数万人死亡。最严重的一起是发生在1930年北美洲的三邻甲苯磷酸酯(TOCP)中毒,导致约10万人患周围神经病,5000余人瘫痪。不仅如此,而且引起神经系统损伤的化学物的种类也越来越广,由最早认识的铅毒物,增加到锰、铊、汞、有机铅、有机汞、有机锡、有机氯、有机磷、有机溶剂等数千种。这些化学物不仅可特异地





而,外源性的化学物引起的神经毒性是损伤机体神经系统的主要因素,污染环境后会持续存在于我们的生产和生活环境中。环境中的神经毒物多种多样,品类繁多,以下仅列举了有神经毒性证据的部分化学物,随着化学物质合成的大量增加,环境中的神经毒物还将越来越多。

现有的神经毒物如按理化性质、用途可分为:

#### 1. 金属类

(1) 重金属及其化合物:铅、汞、砷、镉。

(2) 非必需金属及其化合物:铝、镉、锡、铊、镍、锂、钡、铍、铋、金。

(3) 必需金属及其化合物:铬、铜、铁、镁、锰、钴、钾、硒、锌。

#### 2. 溶剂类

(1) 脂肪族烃类:烷烃、烯烃、炔烃、汽油。

(2) 脂肪族环烃类:松节油、环丙烷、环丁烷、正己烷。

(3) 芳香族烃类:苯、苯乙烯、甲苯、二甲苯、联苯、萘、蒽、二硝基苯、三硝基甲苯、二苯胺、染料。

(4) 卤化物:四氯化碳、氯仿、氯丁二烯、三氯苯、氯乙烯、三氯乙烯、四氯乙烯、二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、氯丹、氯苯、对-二氯苯、氯甲烷、1,2-二氯乙烷、多氯联苯、三碘甲烷。

(5) 醇类:乙醇、甲醇、1-丙醇、异丙醇、乙二醇、丙二醇、二乙二醇、丁醇、环己醇、二丙酮乙醇、2,5-己烷二醇。

(6) 酚类:甲酚、六氯酚。

(7) 其他:石油蒸馏物、甲醛、丙酮、甲基丁酮、丙烯酰胺、环氧化合物、烷基苯乙烯聚合物、乙酯、醋酸丁酯、醋酸戊酯、甲基乙酯、苯胺、松油脂、三甲酚磷酸酯、1-甲基-4-苯基-1,2,3,6 四氢吡啶、兴奋性氨基酸、磷酸三邻甲苯酯。

3. 气体类 一氧化碳、氰化氢、硫化氢、二硫化碳、燃烧产物、汽车尾气、氨、氮氧化物。

4. 农药类 有机磷类、拟除虫菊酯、有机氯(开蓬、DDT)。

5. 药物 鸦片、可卡因、巴比妥、地西洋、阿霉素、长春新碱、链霉素、奎宁。

6. 天然毒素 蛇毒、蝎毒、蓖麻子蛋白。

如按毒作用靶器官分类,可分为:

1. 神经细胞毒物 汞和汞化合物、锰、铝、谷氨酸、氰化物、铅、1-甲基-4-苯基-1,2,3,6 四氢吡啶(MPTP)。

2. 神经髓鞘毒物 六氯酚、三甲基锡、铅、砷。

3. 神经轴索毒物 正己烷、二硫化碳、taxol、长春新碱、丙烯酰胺、氯丙烯、除虫菊酯。

4. 神经递质毒物 尼古丁、有机磷化合物、氨基甲酸酯类杀虫剂、可卡因、兴奋性氨基酸、苯丙胺。

## 二、神经系统对外源化学物的毒性反应

神经毒性(neurotoxicity)是指外源性的物理、化学或生物因素引起的生物体神经系统功能或结构损害的能力。

神经系统对外来化学物的反应是外来化学物毒作用的结果。根据机体神经系统的不同反应

可粗略地把神经系统损伤分为结构改变、功能改变和行为改变。

1. 结构改变指神经毒物作用后神经组织的细胞、轴索、髓鞘及细胞内超微结构发生的病理改变。可分为缺氧性损害和毒物特异性损害。

(1) 缺氧性损害: 中枢神经系统对缺氧最为敏感, 很多毒物可通过引起大脑缺氧而导致大脑器质性损伤。单纯性使大脑缺氧可见吸入高浓度的二氧化碳、氮气、甲烷等气体; 神经肌肉阻断剂箭毒碱引起的呼吸肌麻痹; 一氧化碳、亚硝酸盐、苯的氨基和硝基化合物等亲血红蛋白毒物使红细胞携氧能力损失等。细胞毒性缺氧是指供氧、供血充足但细胞能量代谢过程被阻断。这类缺氧可见于氰化物、叠氮化物、二硝基苯酚、丙二腈等中毒。缺血性缺氧是由于供血不足导致的缺氧。能引起心脏骤停的毒物或急性中毒合并心力衰竭时均可发生缺血性缺氧, 导致神经细胞损伤。

缺氧时神经细胞的损伤过程可分为两个阶段: 第一阶段是细胞浆内容物的肿胀, 先是溶酶体, 然后是线粒体肿胀和高尔基复合体破裂; 第二阶段是胞浆皱缩, 虎斑小体消失, 核固缩和核仁模糊。中毒引起的缺氧经及时抢救, 预后较好。如缺氧较久, 可引起急性中毒性脑病或后遗症。

(2) 毒物特异性损害: 毒物特异性损害可见中枢系统特异性损害、周围神经系统特异性损害和中枢周围混合型损伤。铅中毒可引起智力低下、铅中毒性脑病; 汞及其有机化合物可导致情绪不稳定、易激动、思维紊乱、震颤、弱视、听力丧失、共济失调、瘫痪等; MPTP(1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶) 是合成二醋吗啡的副产品, 它可引起一种不可逆的类似帕金森病的症状; 接触锰会产生类似帕金森氏病和运动障碍; 孕期使用可卡因的妇女, 其婴儿神经系统对外界刺激的反应和其他认知能力均有下降; 孕妇大量饮酒会使她们的子代产生颅面畸形和智力低下。兴奋性氨基酸等神经递质类毒物、铝、有机溶剂等也均可引起中枢神经系统损伤。

周围神经系统特异性损害的毒物有有机磷、丙烯酰胺、正己烷、氯乙烯、铅、砷、二硫化碳、TOCP 等。临床表现均有不同程度的感觉和运动功能障碍, 可出现四肢远端麻木、疼痛、烧灼感或其他感觉异常, 继而显示四肢远端感觉减退或消失, 呈典型的手套和袜套样分布。运动障碍表现为不同程度的下运动神经元瘫痪, 有肌力减退甚至完全瘫痪, 运动障碍, 肌肉萎缩以四肢远端明显, 深反射减弱或消失。有些有机磷化合物急性中毒一周后可出现周围神经损伤, 又称迟发性神经毒性(OPIDN)。铊、砷、铅中毒与有机磷相似, 是急性中毒损伤效应; 而正己烷、二硫化碳等有机溶剂引起的周围神经损伤, 多因长期反复接触, 起病隐匿, 神经变性呈渐进性效应。

二硫化碳除引起周围神经损伤外, 还可引起中枢损伤, 可出现精神失常和震颤; 除二硫化碳以外, 能引起中枢周围混合型损伤的神经毒物还有铅、汞等。

2. 功能改变是在神经毒物引起神经细胞的结构和生化改变的基础上而引起感觉、运动功能紊乱。感觉、运动功能紊乱可通过临床检查、肌电图、感觉和运动神经传导速度进行确定。

3. 行为改变是中枢神经系统的综合功能改变。神经毒物可引起脑的各种精神活动能力改变, 如抽象思维、记忆与学习、情绪表现、觉醒状态、感觉的感受能力、注意力等的改变。由于这些精神活动能力改变, 从而出现各种精神障碍或行为缺陷。这些改变涉及大脑网状结构、基底核、边缘系统和大脑皮层等结构。由于这些结构受累, 导致意识丧失、学习记忆下降、兴奋或抑制、情绪性格等改变。这些改变可以用行为毒理学的方法去检查。

行为的改变多被认为是神经系统毒性作用的较敏感的指征。在神经系统器质性病变发生之前, 中枢神经系统的综合功能就可发生改变, 表现出众多的行为异常。国际上一些发达国家已经应用行为学的方法去判断神经毒性, 并根据行为的改变, 制订卫生法规和卫生标准。

### 三、神经毒性作用特点

化学毒物对神经系统的作用多种多样。神经毒性可发生于生命周期中从受孕到老年的任何阶段。根据神经系统的结构特点,神经毒性作用特点可有:

1. 神经毒性表现可随年龄的增长有所不同。如发育中的神经系统由于血-脑脊液屏障没有发育完全,则在婴幼儿期接触铅,可易发生中毒性铅性脑病。而在成人接触铅,由于血-脑脊液屏障发育完全,则不易发生中毒性铅性脑病,而易损伤周围神经系统。

2. 神经系统中的神经元自身不能增殖,一旦受到损伤,它们是不能再生的。因此,神经系统的损伤常常是持续存在的。

3. 有些神经细胞最初是过量存在的,因此对损伤具有一定的缓冲作用,神经细胞少量损失不会影响神经功能和行为活动。这种细胞过量存在的结果可能会使毒物的作用呈现一个阈值,或呈现非线性的剂量-反应关系。

4. 由于在后半生神经细胞的减少和神经系统的其他改变,神经毒性可以随着年龄衰老逐步增强。神经毒物接触与年龄相关性细胞损失之间的相互作用也许可能解释某些迟发性神经毒性表现。如果几种过程(如化学损伤、正常老龄化和细胞死亡)同时发生,那就很难区分引起功能损害的单一原因。潜伏毒性将使确定接触与效应因果联系变得困难,对量化的剂量-反应关系就更加困难。

5. 神经毒性反应的表现可能是进行性的,轻微的功能损伤也可能变得异常严重。这种情况下,很难确定损伤的起始时刻。对许多生物学指标来说,区分一般性变化和损害机体健康的界限并不清楚。轻微的改变也许成为接触的标志物,中等强度的变化也可能是疾病发生前的信号,而较大程度的改变就可能表示疾病的发生。

6. 某些物质特别是各种药物在不同剂量下,神经系统可产生不同的反应。三环抗抑郁药在低剂量下具有良好的治疗作用,但在高剂量下则产生威胁生命的抗胆碱能效应;抗肿瘤药顺铂是一种有效的化疗药物,但能引起中毒性神经疾病;此外,精神抑郁药可产生运动失调;而某些抗菌药可引起失聪和平衡功能丧失。

7. 化学物质的联合接触会产生相互作用。一般人群均有机会接触存在于食物、化妆品、日用化学品、空气、水和药物中具有神经毒性的各种化学物质,这些联合接触会使某些抗生素引起的个体失聪损害逐渐加重,职业性和环境接触溶剂混合物也会产生累积性毒性效应。接触天然存在的神经毒素(如某些鱼和植物毒素)是另一方面的问题。

### 第三节 神经毒性作用机制

阐明神经毒性作用机制一直是神经毒理学家一生孜孜不倦的追求。然而,由于神经系统的复杂性和神经毒物的多样性,以使大多神经毒物的毒作用机制没有研究清楚。随着科学技术的发展,对毒作用机制的认识也从以前的整体水平进入分子水平。以下介绍的几个方面的神经毒作用机制,仅是众多研究的一部分。

## 一、神经递质与神经毒性

神经递质释放依赖于许多生物化学和电学活动的协调作用,不仅与突触前神经元的动作电位有关,还包括钙动员和突触前神经末梢递质储存囊泡与质膜的融合、融合后囊泡中的神经递质被释放到突触间隙、与突触后膜上高度特异性受体结合将化学信息再转换成电信号或调控其他神经化学活动等系列活动。

毒物可以通过干扰递质合成酶活性或递质前体物质的利用影响神经递质合成;可以通过影响囊泡中神经递质的储存或释放、影响神经递质灭活及清除(重摄取或递质分解酶)、干扰神经递质与受体作用或毒物本身直接与受体结合等作用影响神经系统正常功能。

如有机磷和氨基甲酸酯类杀虫剂选择性抑制乙酰胆碱酯酶活性,从而抑制乙酰胆碱递质的灭活,造成突触间隙大量乙酰胆碱递质堆积,过度刺激突触后膜上的相应受体,使突触后神经元正常活动受到影响,产生一系列中毒症状。

黑寡妇毒素(latrotoxin)是最强的脊椎动物神经递质释放激动剂之一,它可引起囊泡内的神经递质暴发性非特异释放,随之破坏神经末梢。另一些化合物如脱氧麻黄碱、苯丙胺、麻黄碱、苯丙胺衍生物、甲基汞等,增加儿茶酚胺类递质释放。但这效果被认为是继发于钙稳态的改变。萝芙藤植物碱利血平能进入特定的单胺神经元内破坏存储机制而引起神经递质大量的释放,随后发生长期的耗竭。另一方面,可卡因和它的同类物通过抑制多巴胺和其他单胺的突触重吸收提高突触间隙多巴胺递质浓度。乙醇也影响儿茶酚胺类递质释放、吸收和代谢,并刺激GABA活性。后者可能与乙醇直接刺激GABA受体有关。慢性乙醇摄入已经证明与低单胺氧化酶(MAO)活性有关,并在重复摄入的酗酒者血液中发现多巴胺水平逐步增高。大脑多巴胺水平增加已被假设与乙醇成瘾、戒断妄想和生理依赖有关。

肉毒中毒是抑制递质的释放。肉毒毒素阻断神经肌肉接头处的神经递质乙酰胆碱的释放,引起迟缓性瘫痪。破伤风毒素则阻断脊髓抑制性神经元产生的氨基酸类神经递质释放,导致肌肉强直,进一步发展为致死性僵硬和痉挛性抽搐。一些动物毒素如 $\beta$ -金环蛇毒素( $\beta$ -bungarotoxin)作用于突触前通过特异的减少递质的释放以阻断神经肌肉传递从而致使运动终板对神经刺激不起反应。

## 二、通道与神经毒性

### (一) $\text{Na}^+$ 通道

河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)是来自河豚鱼卵巢和肝脏中的一种化合物。它能阻断 $\text{Na}^+$ 通道电导的升高,并通过这种作用破坏动作电位的形成。石房蛤毒素(saxitoxin)及其相关化合物像河豚毒素一样阻断神经膜上的 $\text{Na}^+$ 通道。

拟除虫菊酯类杀虫剂和DDT,虽然它们的化学结构并不相同,但其神经毒作用却十分相似,主要是干扰 $\text{Na}^+$ 通道的功能。拟除虫菊酯根据化学结构分为 $\alpha$ 位不含氰基的I型和含氰基的II型。虽然它们引起哺乳动物中毒的症状有所差异,但是两者都以同样的方式干扰 $\text{Na}^+$ 通道的门控机制。应用神经细胞电压钳和膜片钳技术研究表明,它们主要引起神经元电压门控 $\text{Na}^+$ 通道关闭延迟,神

神经元反复持续去极化造成神经系统的过度兴奋,表现为运动失调、惊厥抽搐、震颤、易激惹和手足舞蹈综合征等。某些临床治疗药物如局部麻醉药普鲁卡因和可卡因对  $\text{Na}^+$  通道和  $\text{K}^+$  通道均有阻断作用。阻断  $\text{Na}^+$  通道引起神经传导性障碍,是局部麻醉药作用的分子基础。

## (二) $\text{Ca}^{2+}$ 通道

$\text{Ca}^{2+}$  通道在神经和肌肉活动中(包括神经递质和激素释放、动作电位的生成和兴奋收缩偶联等)发挥着各种重要作用,因此是许多治疗药物、神经毒素和神经毒物的潜在作用靶部位。传统上将电压依赖性  $\text{Ca}^{2+}$  通道分为四型,即 T-型、L-型、N-型和 P-型。

T-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道有两个生理学特征,即它们在去极化时处于失活状态而在较大的负电位时开放(低电压活化通道)。该类通道分布较广,包括神经成细胞瘤细胞、背根神经节神经元、内分泌细胞、心肌细胞和血管平滑肌细胞。N-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道在去极化时也维持失活状态,但是比 T-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道缓慢,它们在较小的负电位时被激活(高电压活化通道)。它们可能参与神经递质的释放和其他神经元功能。L-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道在去极化时失活不明显,在较小的负电位时被激活(高电压活化通道),存在于各类细胞包括成神经细胞、背根神经节神经元、心肌细胞、血管平滑肌细胞和内分泌细胞,其生理学作用不甚明了,但可能包括肌细胞兴奋-收缩偶联,神经递质和激素的释放以及兴奋性调节。P-型钙通道最早是在浦氏细胞中发现的,为高电压激活通道。

杀虫剂胺菊酯阻断成神经细胞瘤细胞和窦房结细胞的 T-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道。辛醇选择性阻断下橄榄体神经元 T-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道,在成神经细胞瘤细胞则阻断 T-型和 L-型两类  $\text{Ca}^{2+}$  通道。其他非特异阻断 T-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道的物质包括乙醇和多价阳离子如  $\text{La}^{3+}$ 、 $\text{Pb}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$ 、 $\text{Ni}^{2+}$  和  $\text{Co}^{2+}$ 。铅是一种较强的 N-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道非选择性阻断化学物。

目前发现许多化学物质可阻断 L-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道,包括苯烷基胺类(如维拉帕米)、双氢吡啶类(如尼非地平、尼莫地平 and 尼群地平)等。苯二氮䓬类安定药物、苯巴比妥类药物、乙醇、多价阳离子以及氯丙嗪等也可以非选择性地阻断 L-型  $\text{Ca}^{2+}$  通道。

## 三、受体信号转导与神经毒性

### (一) 受体

受体可被看作是能与毒物发生高亲和性反应并产生特殊效应的大分子。毒物分子可模拟内源性配基,引起激动剂样作用;其次,毒物分子可能结合于受体,但并不引起激活效应,而是阻断内源性配基的作用(即拮抗作用);第三,毒物可能对受体产生变构效应。如有些毒物不是结合于内源性配基的同一位点,而是结合于生物大分子的相邻部位,这种作用可引起构象变化而影响受体与神经递质的结合。

谷氨酸是一种兴奋性神经递质,突触后结合导致去极化或兴奋性效应。因此,由谷氨酸传递的神经毒性被称为兴奋性毒性(excitotoxicity)。谷氨酸受体在 CNS 有两种类型:离子性谷氨酸受体和代谢性谷氨酸受体。离子性谷氨酸受体包括卡因酸(kainic acid)受体、N-甲基-D-天冬氨酸(N-methyl-D-aspartate, NMDA)受体和 AMPA 受体。兴奋性毒性主要由 NMDA 受体介导。代谢性谷氨酸受体的作用还存在争议,不同的报道认为此受体分别与兴奋性毒性的诱导和兴奋性

毒性的保护作用相联系。

NMDA 受体是  $\text{Ca}^{2+}$  通道复合体中能与谷氨酸、NMDA 和其他某些化合物结合的部位,这一结合位点能调节通道的活性。内源性谷氨酸的释放,突触吸收机制障碍或者外源性 NMDA 或谷氨酸的应用均可能导致 NMDA 受体的过度刺激,使大量的  $\text{Ca}^{2+}$  通过  $\text{Ca}^{2+}$  通道进入神经元内,使稳态失衡,引起细胞继发性改变。离子失衡可导致急剧的  $\text{Na}^+$  和  $\text{Cl}^-$  内流,产生高渗并最终发生细胞坏死。另外, $\text{Ca}^{2+}$  过多可使线粒体内过多的  $\text{Ca}^{2+}$  聚集,氧化磷酸化被解偶联,导致 ATP 的合成降低和线粒体氧自由基的释放。同时升高的胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  将影响多种  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性蛋白激酶,包括蛋白水解酶和 NO 合成酶(NOS),活化的 NOS 将增加神经元内 NO 水平,NO 与超氧自由基相互作用生成高浓度反应性过氧亚硝酸盐。过氧亚硝酸盐与酪氨酸残基相互作用而改变这些蛋白激酶,并使这些激酶进一步消耗 NAD 和(或)ATP。当 ATP 进一步耗尽时,线粒体上的渗透性转移孔(permeability transition pores)开放,引起线粒体膜电位进一步崩溃以及细胞色素 c 的释放。细胞色素 c 被认为是凋亡信号起始的重要启动促进剂,引发 caspases 酶的活化,细胞骨架蛋白水解以及核降解。

## (二) 信号转导因子

神经毒物除了可以影响受体以外,还可以影响细胞内信号转导系统中的信号转导因子如  $\text{Ca}^{2+}$ 、肌醇磷酸酯(inositol phospholipids)、蛋白激酶等。

受体特异激动剂可刺激肌醇磷酸酯代谢,这种降解与刺激细胞胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  浓度升高有关。当一种激动剂与其受体(如胆碱能毒蕈碱  $\text{M}_1$  或  $\text{M}_3$  受体、 $\alpha_1$ -肾上腺能受体或代谢型兴奋性氨基酸受体)结合后,激活磷酸肌醇酶(磷脂酶 C),将磷酸肌醇 4,5-二磷酸酯( $\text{PIP}_2$ )水解成 1,4,5-三磷酸肌醇( $\text{IP}_3$ )和 1,2-二酰基甘油(DAG),GTP 结合蛋白将受体偶联于磷脂酶 C。

细胞内质网和近年提出的细胞器钙小体(calciosome)膜上特异性可饱和结合位点与  $\text{IP}_3$  结合,可引起胞浆  $\text{Ca}^{2+}$  动员。在磷酸酶作用下, $\text{IP}_3$  脱磷酸逐步生成肌醇 1,4-二磷酸酯( $\text{IP}_2$ )、肌醇 1-磷酸酯( $\text{IP}_1$ )和肌醇。后一步反应是由  $\text{IP}_1$  磷酸酶催化的,该过程可被锂离子抑制,这种效应可能是锂盐抗躁狂作用的原因。

兴奋性氨基酸神经毒性与  $\text{Ca}^{2+}$  有关,去除胞外  $\text{Ca}^{2+}$  可阻止神经毒性发生。越来越多的研究证实, $\text{Ca}^{2+}$  在多种化学物神经毒性中发挥着重要作用。神经毒物可引起胞内  $\text{Ca}^{2+}$  依赖机制破坏,造成胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平持续增高。虽然胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  短暂增高对细胞正常功能必不可少,但是持续升高却会导致蛋白酶、磷脂酶和内切酶活化,引起蛋白、磷脂和 DNA 损伤,而且还会启动耗能代偿机制,导致与功能有关的系统破坏。多种神经毒物可引起胞内  $\text{Ca}^{2+}$  水平升高,除兴奋性氨基酸外还包括汞、甲基汞、三乙基铅、三甲基锡、某些有机磷杀虫剂、氰化物和拟除虫菊酯类杀虫剂等。

毒物引起胞内  $\text{Ca}^{2+}$  升高的机制有几种。在细胞膜水平包括  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase 或  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase 抑制、 $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$  交换通路障碍、非特异性膜损伤、受体活化和细胞膜去极化。在线粒体水平,神经毒物可引起膜损伤、抑制  $\text{Ca}^{2+}$  单向泵、抑制呼吸过程或氧化磷酸化解偶联。任何干扰内质网肌醇磷酸酯作用的因素也会引起钙稳态改变。其他钙调控机制还包括钙调蛋白(CaM),许多重金属可抑制 CaM 活化  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase。胞内游离  $\text{Ca}^{2+}$  升高还会通过 CaM 依赖性通路诱导即早反应基因(如 *c-fos* 和 *c-myc*)快速而短暂表达。即早反应基因 *c-fos* 的表达被认为是神经毒性

的潜在标记。有机氯杀虫剂林丹可引起大脑皮层和海马 *c-fos* 的表达,并具有剂量效应关系,而两种非致惊厥类林丹异构体却不能诱导 *c-fos* 表达,提示 *c-fos* 表达可能与林丹诱发惊厥有关。已知癫痫活动也与 *c-fos* 短暂诱导有关。虽然林丹这种作用的分子机制还不清楚,但是可能与胞内  $Ca^{2+}$  升高有关。另外,接触内烯酰胺的大鼠脑组织也发现 *c-fos* 和 *c-jun* 表达增加。

NO 除介入谷氨酸神经传导外,还介入谷氨酸的神经毒性。Dawson 等用培养的胎鼠大脑皮层神经元检测了 NMDA 的神经毒性。将 NMDA 加入培养液中 5min 后就有 90% 的神经元死亡。培养中观察到 NOS 的选择性特异抑制剂硝基精氨酸可阻断 NMDA 的神经毒性,从培养基中去除精氨酸同样可以保护细胞。而且,可捕获 NO 自由基的血红蛋白也能抑制兴奋性氨基酸的这种毒性效应,表明谷氨酸作用于 NMDA 受体而引发的神经毒性是由 NO 介导。

#### 四、神经胶质细胞与神经毒性

神经组织包括神经元和神经胶质细胞成分。神经胶质细胞的数量约为神经元的 10 倍,而从体积上来看,两者所占比例近似相等。胶质细胞直径约为  $8 \sim 10 \mu\text{m}$ ,与最小的神经细胞大小相近。

外周神经系统胶质细胞包括神经节细胞周围的卫星细胞和形成神经纤维髓鞘的施旺细胞,中枢神经系统胶质细胞有星形胶质细胞、少突胶质细胞、小胶质细胞和室管膜细胞等。

现认为星形胶质细胞在许多神经毒性损伤中既有防御作用又有促进作用。例如,在中枢神经系统谷氨酸稳态研究中,星形胶质细胞在兴奋性神经递质谷氨酸代谢中具有重要作用。研究表明,缺血或其他因素造成人脑损伤的部分原因是由于谷氨酸过度释放或重摄取减少,活化兴奋性氨基酸受体,引起某些细胞的死亡。而星形胶质细胞与谷氨酸代谢密切相关,具有高亲和性谷氨酸递质摄取系统,它们可通过谷氨酸重摄取或经谷氨酰胺合成酶催化作用将谷氨酸代谢为谷氨酰胺,调节控制细胞外谷氨酸水平。

星形胶质细胞还可直接引起中枢神经系统损伤。星形胶质细胞中的谷氨酸-谷氨酰胺通路是脑组织中谷氨酸递质的微型储备库。星形胶质细胞肿胀会引起递质(如谷氨酸、天门冬氨酸、牛磺酸和其他一些氨基酸)释放。星形胶质细胞肿胀的病理改变可见于创伤性脑水肿、长时间缺氧、高碳酸血症、急性缺氧、实验性脑损伤、脑缺血、低甘油血症和肝性脑病。在星形胶质细胞原代培养体系中加入  $10^{-5} \text{mol/L}$  氯化甲基汞后,可观察到由于细胞肿胀而引起的氨基酸(谷氨酸和天门冬氨酸)外流。而几种阴离子转运阻断剂如 AITS 和速尿可使外流逆转。 $10^{-5} \text{mol/L}$  三甲锡也可增加星形胶质细胞谷氨酸和天门冬氨酸的释放。

星形细胞还在许多退行性神经疾病发生中发挥作用,Huntington 病就与中枢神经系统喹啉酸水平升高有关。喹啉酸是色氨酸的正常代谢产物,可特异性作用于 NMDA 受体,引起神经元兴奋。在高剂量下特别是在海马内注射后,喹啉酸可引起惊厥和神经退行性改变,酷似人类颞叶癫痫改变。喹啉酸的合成酶和喹啉酸的降解酶主要存在于星形细胞。这两种酶活性的异常改变或这些物质释放增加或摄取减少都会造成喹啉酸在细胞外液的过剩,引起特异性神经元死亡。喹啉酸的过度堆积会作用于突触前受体引起兴奋性递质释放,这些递质或喹啉酸本身与靶细胞 NMDA 受体结合就会引起神经元退行性改变,产生类似 Huntington 病的临床表现。

近年来的研究表明,星形胶质细胞具有参与中枢神经系统免疫反应的能力。将活性 T 细胞引入神经组织后,中枢神经系统可产生为抗病毒所必需的局部炎性反应因子。用 B 细胞有丝分



裂素脂多糖处理新生小鼠原代培养星形胶质细胞后,星形胶质细胞可分泌出白细胞介素-1(IL-1)。脑内IL-1的合成被认为是脑内T细胞活化的必要条件,主要是因为IL-1促进IL-2生成以及T细胞上IL-2受体的表达。

## 五、细胞骨架与神经毒性

细胞骨架是轴浆运输本身所固有的结构成分,也是一个易感位点。一个比较明显的例子是当使用抗肿瘤药物长春新碱(vincristine)治疗白血病或淋巴瘤时可并发感觉运动性神经病。这种生物碱可与微管结合作为有丝分裂中纺锤体的抑制剂而发挥作用。在实验中这种与微管结合的作用也能导致轴浆转运的抑制并且能解释发生于人类的神经病。另一种与细胞骨架相互作用的化合物是秋水仙碱,它曾用于临床治疗痛风以及实验中作为一种有丝分裂毒物。秋水仙碱是CNS毒素,因为它能阻止微管形成,微管是轴浆转运系统所依赖的。这种化合物所固有的外周毒性与血-脑脊液屏障阻止植物碱内流的能力相联合降低了它的中枢效应。

神经丝是细胞骨架的另一种结构成分,现被认为是环境中几种神经毒物的靶位点。暴露于丙烯酰胺、二硫化碳、正己烷等神经毒物可导致神经元和轴突内神经丝的局部聚集。聚集可能位于细胞体中或位于轴突的近端、中间或远端区域。在有髓鞘的轴突中神经丝的聚集通常发生在郎飞结旁,并且能导致轴突肿胀。这些毒物具有共同的引起多部位神经丝聚集的特征表明它们可能具有相同的作用机制。

多种能引起轴突神经丝聚集的毒物可与蛋白质起共价交联反应,其中包括和神经丝蛋白反应。基于这种观察,一种“统一”的假说被提出来以解释这类神经病的发病机制。简单地说,这种假说认为某些化合物可引起特异的神经丝蛋白的共价交联的改变,这些改变被推测可以使细胞骨架不稳定。随着神经丝的改变增加,它们最终变得不能被转运而产生聚集。

正己烷在体内和体外均可和蛋白质赖氨酸的 $\epsilon$ -氨基部分反应而产生吡咯加合物,可以产生继发的自动氧化交联反应。人们推测这种神经丝的吡咯衍生物和继发神经丝交联反应是正己烷神经病中的起始反应。尽管这种机制受到挑战,但许多正己烷的研究支持这种机制。

丙烯酰胺可以破坏轴浆运输,但是 一些研究者认为轴浆运输的破坏可能是继发于其他轴突损害,比如特异的抑制糖酵解的酶或破坏轴突的修复机制。丙烯酰胺曾表现出与轴浆转运系统的一种重要成分——细胞骨架蛋白特异的结合。几个研究曾尝试着确定这些干扰对神经传递的效应。

## 第四节 神经系统和行为毒理学研究方法与评价

神经系统的复杂性使人们很难准确指出一种化合物何时并且是否已经对神经系统引起了损伤。人们曾认为,人类的活动产生的环境化学物应该对神经系统损伤负责。但事实上,自然界是神经毒物丰富的源泉,这些毒物已经成为临床上有效的药物,由植物、动物和微生物引起的神经毒物在民间医药上已有着传统的应用。“天然的”并不意味着这些物质对机体不具有潜在的毒性影响。因此神经毒性的评价和检测已经成为一个重要的公共健康问题。

在过去,病理学研究提供了最初的、单一的描述毒物效应的方法。利用组织的常规制备和不

同的染色方法,如 Golgi 和其他金属浸渗、嗜碱性尼氏体染色、Weiger 髓鞘方法等,与生物学知识的联合应用已经提供了许多有关神经毒物的证据。随后,电镜的应用提供了一个新的研究方向。

随着现代免疫组化方法、放射自显影方法、细胞化学方法和分子生物学方法的发展,对细胞内的小分子、蛋白质和核酸进行定位和定量已成为可能。新的方法已允许甚至对于整个机体进行更为敏感的功能性研究。这类方法一个实用的例子是 MPTP 诱导的神经毒性。经典的方法,人们要等到可以得到来自于 MPTP 中毒的个人的死后的组织。这些研究将包括神经化学(纹状体、黑质末端区域的多巴胺数量降低)、生物化学(与多巴胺相关的酶的相对活性如何)和神经病理学(黑质含有黑色素的神经元丢失)。现在,人们除对以上问题进行研究外,还可以对这些组织提出更为深入细致的问题,比如什么类型的细胞受影响并且以什么方式受影响(如特定标记的细胞丢失,或在存活的细胞中出现代偿性改变)等。然而,正是这些,使探察活体组织的能力有了极大的改变。在体外,人们可以建立特定类型的细胞系,利用电生理学方法、图像和分子终点法来阐明神经毒理学机制。这些方法随着化学采样(如体内微透析、电化学及荧光化学)和非侵入成像(PET、SPECT 和 MRI)的发展,通常也可以扩展到体内。由此,人们可得出多巴胺载体蛋白的密度(多巴胺由突触内吸收的位点)与多巴胺神经元的密度比例。因此,利用对多巴胺载体特异的 PET 或 SPECT 放射配体可以评估出 PD、MPTP 中毒等病人中黑质多巴胺神经元受损害的程度。

作为这些方法的补充,一组以行为学为终点的方法也被用于反映神经毒性。测定行为的方法作为神经系统功能的敏感测量方法,也是反映神经系统整合的输出情况。行为方法多是运用运动行为和一组被称作功能观测组合的试验来进行。在这些检测终点的改变对于评价毒物引起的广泛的、综合的行为学改变是有益的。有针对人体的学习记忆、人体运动协调、注意力集中的组合;从实验毒理学方面,则以实验动物为观察对象,观察分析实验动物在接触外来化学物之后的应答性行为。目前所用方法以条件反射方法为基础,在试验前先经过训练,使实验动物建立获得性行为。有对动物的学习记忆的组合;有观察动物的运动、活动组合;也有超过 24 种参数组成的总的功能观测组合,其中包括:水平、垂直和总的活动,痉挛、震颤、刻板(重复的)行为、呼吸方式、步态、排尿、应激反应、竖毛反应、瞳孔大小和对光反应、流涎、过多的发声、流泪、握力、肌张力等。分析在小剂量长期外来化合物作用下,这些条件反射的潜伏期和反应幅度等变化,以评定该外来化学物对机体的毒性效应。尽管这是反映毒性的一种具有说服力的方法,但是还有一些内在的困难,包括剂量选择和所用的动物。

功能观测组合通常能提供神经毒物作用机制的重要线索。如果一种毒物最初影响一种神经元系统(如使用特定递质的神经元),它通常像已知的治疗性药物一样引起可以预期的改变。最著名的例子可能是有机磷杀虫剂。它可以引起胆碱能刺激样症状(瞳孔散大、流涎、排尿等)。已知这是因为乙酰胆碱酯酶抑制/失活而导致的突触内乙酰胆碱浓度升高而引起的。

神经毒理学的研究方法很多,可以说任何研究神经科学的方法如神经生物学、神经生理学、神经生化学、神经病理学、神经药理学、分子神经生物学等方法都适用于研究神经毒理学。以下仅对行为学方法作简要介绍。

## 一、动物神经系统疾病模型

动物神经系统疾病模型是研究疾病发生、发展的重要手段。神经系统疾病种类很多,但比较

动物神经系统疾病模型是研究疾病发生、发展的重要手段。神经系统疾病种类很多,但比较



勒成人智力量表(Wechsler adult intelligence scale)。

Benton 视觉保留试验、Bourdon-Wiersma 试验、对称画试验主要测定视觉感知的能力; Mira 试验、手提转速度试验和反应时间试验主要测定肢体的反应能力和活动功能; 韦克斯勒记忆量表和韦克斯勒成人智力量表主要测试人的认知和记忆的能力。

FIOH 测试组合中之 Benton 视觉保留、手提转速度及反应时间等项测试与 WHO-NCTB 测试组合项目相同。

韦克斯勒记忆量表包括经历、时间及空间记忆、数字顺序关系、逻辑记忆、数字广度、视觉再生及联想记忆共 7 个分测验。受试者进行每一分测验按规定方法记分,即原始分,再转化为量表分,总量表分再转化为记忆商(MQ),以评价记忆水平。

韦克斯勒成人智力量表包括语言量表及操作量表。语言量表包括文字的,即常识、理解、算术、相似性、词汇及数字广度 6 个分测验。操作量表包括非文字的,即数字译码、图画补缺、积木图案、图片排列、图像组合共 5 个分测验。记分方法与韦克斯勒记忆量表相似,最后转化为语言智商、操作智商和总智商,评价受试者的智力水平。

2. WHO-NCTB 测试组合 WHO 选定的神经行为核心测试组合(neurobehavioral core test battery, NCTB)包括 7 个试验,它们分别是情绪状态(protoile of mood states, POMS)试验、手提转速度试验、目标瞄准追击试验(aiming)、简单反应时间试验(simple reaction time)、数字译码试验(digit symbol)、视觉保留试验(benton visual retention)和数字广度试验(digit span)。

3. NES 方法 神经行为评价系统(neurobehavioral evaluation system, NES)是 1986 年 Letz 和 Baker 提出一组利用计算机进行测试的测试组合。

NES 方法包括 5 方面共 17 项试验,有心理活动、感知能力、记忆及学习、认知能力和情感 5 个方面。心理活动方面包括数字译码试验、眼-手协调(hand-eye coordinatiion)试验、简单反应时间试验、连续操作试验(continuous performance test)、指叩(finger tapping)试验;感知能力(perceptual ability)方面用图案比较(pattern comparison)试验测试;记忆及学习(memory and learning)能力方面包括数字广度试验、联想学习(paired-associate learning)试验、联想回忆(paired-associate recall)试验、视觉保留试验、图像记忆(pattern memory)试验、记忆扫描(memory scanning)试验和系列数字学习(serial digit learning)试验;认知(cognitive)能力方面包括词汇(vocabulary)测试、横向加法(horizontal addition)试验和注意力调转(switching attention)试验;情感(affect)包括情绪状态试验。

### 三、学习和记忆功能测试

\*\*\*\*\*

#### (一) 人体试验

韦克斯勒记忆量表(Wechsler memory scale)、韦克斯勒成人智力量表(Wechsler adult intelligence scale)和临床记忆量表主要用来测试人的认知和记忆的能力。一般分为听觉记忆测试和视觉记忆测试。内容主要包括数字广度试验、数字译码试验、视觉保留试验、联想学习试验、联想回忆试验、图像记忆试验、记忆扫描试验和系列数字学习试验等。

1. 数字广度试验 取自韦克斯勒成人智力量表,反映即时听觉、记忆及注意力集中的能力。先向受试者读一组数字,然后要求受试者根据听到的数字组合进行倒序复述,按正确复述出序列

数打分,每一序列评1分。根据得分评价。

2. 指向记忆 与数字广度试验相似,也反映即时听觉、记忆及注意力集中的能力。包括两组内容,每组24个词,每词由2~3个字组成,以1s的速度读出,两个词之间间隔2s,其中有12个词属于同一类别,即为指向词;另12个混在其中相类似的词,为非指向词。要求受试者记忆指定的同类别词(如水果)。24个词随机排列,用录音机放送,每组词全部放送完毕后,要求受试者立即回忆,说出要求记忆的一类词(不一定要按放送的顺序回忆)。主试者在记录纸上按顺序用数字记在相应词下面的方格内,并记录总的反应时间。允许回忆时间不超过2min。

3. 联想学习 同数字广度试验相似,反映即时听觉、记忆及注意力集中的能力。每套有12对2个字组成的词构成量表,其中容易的(成对联想词间有逻辑联系)与困难的(成对联想词间无逻辑联系)成对词各6对。容易联想包括反义词(如困难-容易)、同类词(如太阳-月亮)和从属词(如牲口-牛马)各两对;困难联想包括具体-具体(如西瓜-衣服)、抽象-具体(如勇敢-电灯)和抽象-抽象(如光明-服从)成对词各两对。用以检查对不同成对词的记忆情况。以每对词3s的速度读出,两对词之间间隔2s,12对词随机排列,用录音机放送,共放送三遍,即受试者有三次学习机会,但每遍词放送的顺序不同。每放送一遍后,主试者念每对词的前面一个词(即刺激词),要求受试者答出后面一个词来(即反应词),主试者将结果记录在相应格内。

4. 数字译码试验 取自韦克斯勒成人智力量表,可测试视觉感知、记忆、模拟学习及手部反应的能力。测试工具为测试表,表列有数字及与数字相联系的符号。测试时,先向受试者展示1~9数字及其相对应的符号,时间是20s;然后在表内的示例行中试填,时间是20s;继之受试者在表的空格内依次逐一填上相应的译码。全部测试历时90s,每正确填写1格得1分。根据得分进行评价。

5. 视觉保留试验 反映大脑几何图形组织和即时视觉记忆能力。用测试图,先向受试者展示一张几何图形,持续10s,然后展示4张图形,其中一张与原展示图形相同。要求受试者在10s之内认出哪一张与原图相同,每正确认出一图打1分。根据认出的得分评价。

6. 图像自由回忆 同视觉保留试验,反映大脑对图形的即时视觉记忆能力。包括2组画有物体的图片材料,每组15张,所画的物体都是人们常见的、熟悉的和易于辨认的东西,如日用品、交通工具等。每张图片呈现4s,图片间间隔2s,图片顺序随机排列。15张图片呈现完毕后,要求受试者立即回忆说出所记得的图片内容(不一定要按刺激呈现的顺序回忆)。主试者按受试者回忆的顺序,将所记得的图片在记录纸上按顺序用数字记在相应图片名称下的方格内,并记录总的反应时间。如果受试者说出的是图片中没有的内容(称为添加性错误),则写在记录纸上该图片系列后面的空格内。反应时从主试者说“现在请您回答”算起,直到回忆结束。允许回忆时间不超过2min。当第一组图片受试者回忆结束后,间隔5s,再重复一遍指导语,然后呈现第二组图片,方法同前。

7. 无意义图形再认 同视觉保留试验。包括20张目标刺激图片,40张再认刺激图片(目标刺激图片20张,相似混同刺激图片20张)。目标刺激为5种形式的无意义图形,即曲线封闭、直线封闭、曲线直线、曲线不封闭、直线不封闭。每种各4张,共20张。测验时,先给受试者分别呈现20张目标刺激图片,每张呈现3s,相隔3s,要求受试者记住这些目标刺激。然后,随机呈现40张再认刺激图片,图片随机排列,要求受试者将与目标刺激图片完全相同的图片辨认出来,根据辨认结果评分。

8. 人像特点联系回忆 同视觉保留试验,反映大脑对图形的即时视觉记忆能力。包括6张黑白人面像图片。按随机顺序排列每张人像分别呈现9s,间隔3s,在呈现的同时,告诉被测验者每张图片上的人像的姓名、职业和爱好等特点,重复2遍,并要求被测验者记住人像及特点之间的联系。然后再以另一顺序呈现这些图片,让被测验者立即说出人像的姓名、职业和爱好等特点。

记忆量表都有各自的记分方法。根据这些分值,计算出总量表分;然后按照不同的年龄组的总量表分的等值记忆商数换算表,即可查得记忆商数(MQ)。这就作为衡量人的记忆水平的指标。

## (二) 动物试验

毒物对动物记忆力的影响,可以作为毒物是否引起大脑皮质功能障碍的客观指标。目前一般采用动物迷路试验来观察毒物对记忆力的影响,这也是条件反射实验方法的一种。迷路试验方法甚多,一类系与防御运动反射相结合,另一类系与食饵运动反射相结合。

1. 小鼠Y型迷宫实验 是在一个Y型盒内,分安全区和电击区。给小鼠电击刺激,迫使它逃避并获得迅速找到安全区的记忆力。通过实验了解毒物对动物记忆力的影响。Y型盒分3个相等的臂,盒臂可用木制或塑料等绝缘材料制成,盒底铺设导电用的铜丝(直径1mm左右),其间隔3~5mm。甲臂的一端底部不铺设铜丝,称为安全区。在丙臂一端设有一闸门,内为电击前放置小鼠的起步点。实验时将鼠放在起步点,使适应环境1min。打开闸门并按动电钮,给鼠以电击刺激。根据鼠的反应而调节电压,以能引起鼠奔跑逃避为度。鼠在奔逃中,窜到无电击的安全区,让鼠在此停留10s,以巩固记忆。然后将鼠从安全区取出,放回起步点休息1min。再给第2次电击,鼠又可逃至安全区。如此反复训练,以鼠从丙臂直接进入安全区的反应称为“正确”,如进入乙臂再进入安全区,或进入乙臂又返回丙臂再进入安全区皆为“错误”。直至鼠在连续10次电击中有9次“正确”,为训练成功。给训练成功的鼠染毒后,再进行上述测验。观察染毒前后记忆力变化情况,以评价毒物对记忆力的影响。

2. 小鼠跳台实验 末次给毒物后次日(或一次给毒物后1h)开始训练。将动物放入反应箱内(台上、台下)适应环境3min,然后将动物放置反应箱内的铜栅上,立即通以36V的交流电。动物受到电击,其正常反应是跳回平台(绝缘体),以躲避伤害性刺激。多数动物可能再次或多次跳至铜栅上,受到电击又迅速跳回平台上。训练一次后,将动物放在反应箱内的平台上,记录5min内各鼠跳下平台的错误次数和第一次跳下平台的潜伏期,以此作为学习成绩(记忆获得)。24或48h后进行重测验,将小鼠放在平台上,记录各鼠第一次跳下平台的潜伏期、各鼠3min内电击次数和受电击的动物数总数,同时计算出出现错误反应的动物的百分率(受电击的动物数占该组动物总数的百分率)(记忆巩固)。停止训练5天后(包括第5天)可以在不同的时间进行一次或多次记忆消退实验(记忆再现,方法同重测验)。若染毒组与对照组比较,潜伏期、错误次数或跳下平台的动物数差异有显著性,表明毒物引起动物记忆力改变。

3. 小鼠避暗实验 利用小鼠嗜暗的习性设计一个装置,一半是暗室,一半是明室,中间有一小洞相连。暗室底部铺有通电的铜栅,并与一计时器相连,计时器可自动记录潜伏期的时间。小鼠进入暗室即受到电击,计时自动停止。末次染毒后次日(或一次染毒后1h)开始训练。实验时将小鼠面部背向洞口放入明室,同时启动计时器。动物穿过洞口进入暗室受到电击,计时器自动



试验、目标瞄准追击试验、简单反应时间试验为测试人体的运动功能。

1. 手提转速度试验 测试手部操作敏捷度及眼-手快速协调的能力。测试器材为一木板(或有机玻璃板),板上横向排列12个方孔,纵向排列4个方孔,总计48个孔。孔中嵌进一底方上圆的小栓,栓子漆为半白半黑色。受试者用利手(如右手)及非利手(如左手)分别在30s内,以尽快速度从孔中取出栓子,然后快速将栓子水平提转180°,再插入原孔中。分别记录利手及非利手两次正确提转数之和,作为评价依据。

2. 目标瞄准追击试验 为测试手部运动速度及准确能力。测试工具为一测试图,图上有60个约1mm直径的圆圈。用铅笔在60s内尽可能快速地在圆圈内打点,但打点不能触及圆圈的边,共测两次,计算两次正确打点数和错误打点数的总和,根据打点数的总和进行评价。

3. 简单反应时间试验 测定视觉感知及手部运动反应时间。试验包括视觉及运动两种功能成分。现一般用Terry 84型简单反应时测定仪测定。方法是受试者见到测试仪上信号红灯闪亮时,以尽快速度按相应开关,使红灯熄灭。信号红灯不定时闪亮,受试者看到红灯闪亮就马上关掉相应的开关,如此在规定的时间内反复多次。记录仪可自动记录出正确反应的次数、错误与漏失反应的次数。根据记录求出平均反应时间与标准差、最快反应速度等。

## (二) 动物试验

对动物的运动功能测试可包括动物的体格发育,如体重、张耳、出牙、开眼、睾丸下降、阴道张开等;动物的反射及感觉功能如平面翻正;神经运动协调如空中翻正;听觉、视觉、嗅觉、痛觉;躯体感觉运动如断崖回避、负趋地性;运动发育如转体;耐力如前肢悬挂、爬绳;神经肌肉成熟如转棒、游泳、足展开;活动度如开阔场地、踏轮等。

1. 活动度测定 此种方法很少能应用于人。自主的活动度在啮齿类动物主要用于药理及行为毒理。单一活动度测试现已能进行定量评价。现在最常用的方法是按照美国EPA的纲要进行评价。此方法为在一特定环境装有定位的红外线光束,记录动物于固定的时间内活动时切断光束的数次。它可监测垂直的及水平位的动物活动次数,每10min测1次,计3次,合计30min。正常的啮齿类动物典型表现为活动度逐渐减少。其他有用迷路装置(如8字型迷宫)。

2. 运动协调功能测试 可包括转棒实验、游泳耐力实验、倒挂网格实验、后肢撑力实验等实验。

(1) 转棒实验:是根据小鼠跌落转棒时的转速或某一转速时跌落转棒的时间,来反映动物神经肌肉协调能力。若染毒组跌落转棒时的转速或时间明显小于对照组,且差异有显著性,表明毒物对运动功能有影响。

(2) 游泳耐力实验:是选用成年小鼠,末次染毒30min后,置小鼠在游泳箱中游泳。记录小鼠自游泳开始沉入水底的时间,作为小鼠游泳时间。游泳时间的长短可以反应动物运动耐力的程度。若染毒组游泳时间明显小于对照组,且差异有显著性,表明毒物对运动功能有影响。

(3) 倒挂网格实验:选用小鼠或大鼠,用大小为50cm×50cm、网孔大小为1cm<sup>2</sup>的金属网格,将网格平举,距地面1m高处,将动物平放在网格上。然后将网格翻转180°,使动物倒挂在网格上,同时按下秒表计时。根据动物从网格上摔下的时间判断动物神经系统受损和肌力情况。若染毒组明显小于对照组,且差异有显著性,表明毒物对运动功能有影响。

(4) 后肢撑力实验:是通过测定大鼠落地后后爪间的距离的变化,了解大鼠给予神经毒物后



后肢运动神经损伤情况。导致后肢瘫痪时,从高空落下后肢不能支撑。根据对照组和处理组的结果进行统计分析。

3. 痛觉测定 可用于了解毒物对中枢神经系统的兴奋和抑制或麻醉作用的程度,也可揭示某些毒物(如二硫化碳)引起周围神经损害而使某些区域的皮肤痛觉过敏、减退或消失的程度。痛觉测定方法甚多,比较常用的有小鼠“热板”法、大鼠鼠尾热刺激法、兔扬爪和缩肢反应测定法等,此外还有化学、机械和电刺激方法,均引起实验动物对疼痛的反应。根据刺激强度、反应时间、反应强度三个指标来分析痛觉程度。

(谢克勤)

## 第一节 概 述

随着工业化生产的发展以及环境污染的日益加重,人类经呼吸道接触外源化学物的机会也越来越多,其后果一是直接损伤呼吸道和肺,另一方面也可经呼吸道吸收到达其他组织或器官,引起全身损害;同时,经其他途径进入机体的外源化学物也可到达肺,引起肺的损伤。肺不仅仅是气体交换的器官,它对内、外源化学物的代谢以及对外源化学物的防御起着十分重要的作用,所以肺的损伤不仅仅是呼吸功能的损伤,也与全身的损害有关。呼吸毒理学是研究外源化学物对呼吸系统的损害作用,探讨检测方法以及阐述损害机制的毒理学分支,对呼吸毒理学的研究,有助于对中毒的诊断、治疗、预防以及中毒机制的探讨。

### 一、呼吸系统的结构与功能

呼吸系统的结构与功能

#### (一) 结构与功能

呼吸系统可以简单地分为三个部分:即鼻咽部、气管、支气管部和肺。

1. 鼻咽部 包括鼻甲、会厌、声门、咽部和喉部,是吸入空气的入口,也是外源化学物进入机体的第一道屏障。其中鼻孔和鼻腔能够通过鼻毛的屏障和过滤作用阻挡并清除大的颗粒物质,同时也对吸入的气体进行温度和湿度的调节。许多外源化学物,尤其是水溶性好的气态化学物,都把鼻腔作为靶器官,损伤其粘膜上皮和鳞状上皮。喉部也是吸入性毒物攻击的主要目标之一,使喉部上皮组织损伤后变性、增生,严重时有渗出性溃疡形成。

2. 气管、支气管部 气管、支气管部起始于气管的前端,终止于支气管的末端。其主要功能是把吸入的气体运输到肺部,同时也具有气体加热和湿润的功能。覆盖在气管、支气管上的粘膜杯状细胞与纤毛柱状细胞具有保护防御功能,依靠粘膜不停地向口腔方向的蠕动,把沉积在气管、支气管上的颗粒推向咽部,通过吞咽或咳出而从呼吸系统清除。外源化学物对气管、支气管的损伤主要涉及其上皮的变性、坏死和支气管平滑肌的反射性收缩引起的气道阻力增加,许多具有刺激性的外源化学物均具有此种作用。

3. 肺 肺由呼吸性支气管、肺泡管和肺泡组成。肺泡是肺气体交换的功能单位,氧气通过肺泡上皮和内皮毛细血管膜从吸入的空气中扩散到血液后进入红细胞,在红细胞中与血红蛋白结合,然后运输到全身;同时二氧化碳也通过这种方式从体内排出。肺的巨噬细胞及上皮细胞还具有吞噬、清除异物和保护肺的功能。外源化学物对这些细胞的损伤将直接影响肺的功能。

## (二) 呼吸系统的细胞组成与功能

1. 鼻腔内细胞 在鼻腔,其内壁排列的是特殊的上皮。前庭是复层鳞状上皮;前室是无纤毛的柱状上皮、有纤毛的复层呼吸上皮和嗅觉上皮。鼻上皮细胞具有代谢外来化学物的能力,已有研究证明一些动物的鼻腔细胞中含有细胞色素 P-450 同工酶 1A1、2B1 和 4B1。

2. 气管和支气管细胞 气管和支气管的粘膜细胞现已发现有十几种,但主要的是纤毛上皮细胞和两种无纤毛上皮细胞(粘液细胞和浆细胞)。纤毛细胞是气管、支气管的主要细胞,其外形为柱状,插入基底细胞之间,固着于基膜上。电镜下见到大鼠的纤毛细胞的纤毛顶端有一些爪样突出物,它们可以抓住上面的粘液滴使之向喉部运动。纤毛细胞不稳定,在外源化学物的作用下,其超微结构极易发生改变。粘液细胞分泌呼吸道粘液,这种粘液由含 80% 糖的糖蛋白所组成,可以粘附污染物和细胞碎片。浆细胞分泌能溶解粘液的液体。呼吸道纤毛在中枢系统的控制下把粘液持续同步地向咽部转运,进而通过吞咽或咳出将其从呼吸系统清除。此外,粘液层还具有抗氧化、中和酸和清除自由基的功能,因而具有保护呼吸道上皮细胞的功能。此外,气管和支气管还含有小颗粒细胞、神经上皮小体,具有分泌功能,可以调节肺循环和气管、支气管平滑肌的张力。

3. 呼吸性细支气管细胞 呼吸性细支气管位于终末支气管的末端,管壁上有肺泡的开口。其上皮细胞称为 Clara 细胞,此种细胞内富含丰富的滑面内质网,含有大量的细胞色素 P-450 酶系,具有较强的代谢外源化学物的能力。

4. 肺细胞 肺具有四十多种不同的细胞,每种细胞功能不同,但都可作为外源化学物作用的靶,但经过试验研究观察,呼吸系统毒物作用的靶细胞主要有几种。

(1) I 型肺泡上皮细胞(type I alveolar cell):细胞呈圆形,胞浆少,细胞器简单,故代谢相对不活泼。肺泡表面大约 90% 的面积由此种细胞覆盖,其功能是为肺泡提供一个完整而薄的表面,使气体易于通过。这种细胞极易受损,且受损后不能恢复。

(2) II 型肺泡上皮细胞(type II alveolar cell):散在于 I 型肺泡上皮细胞之间,向肺泡腔突起,游离面有散在的微绒毛。此型肺泡上皮细胞含有发达的内质网、线粒体和高尔基复合体以及丰富的游离核蛋白体。内质网含有各种酶系统,如微粒体混合功能氧化酶系(MFOS),具有代谢外源性化学物的能力;线粒体所含有的催化氧化磷酸化过程的酶系,具有氧化供能作用。II 型肺泡上皮细胞胞浆内含有有一种称为嗜铁性板层小体的结构,其内含有磷脂、粘多糖和蛋白质,可以形成肺泡表面活性物质。当 I 型肺泡上皮细胞受到毒物作用而发生破坏脱落时,II 型肺泡上皮细胞可以分化转变为 I 型肺泡上皮细胞,一般在 I 型肺泡上皮细胞受损后 48 ~ 96h,这种转变即可完成,其后果是造成气血屏障的增厚,致使气体弥散功能发生障碍。

(3) 肺泡巨噬细胞:存在于肺泡腔或肺泡隔上,是一类体积较大、外型不规则的细胞。胞浆内含有较发达的滑面内质网,高尔基复合体和线粒体也较丰富。这种细胞具有吞噬作用,在肺泡

的颗粒清除中起着重要的作用。

## 二、呼吸系统毒物

外源化学物可经过两条途径到达肺:一是直接经呼吸道进入,可对呼吸系统产生损害作用,亦可作用于全身其他组织或器官;另一条途径是经呼吸道以外的途径吸收,再随血循环到达肺,引起肺的损伤。不管从哪种途径进入,呼吸毒理学关心的是毒物对呼吸系统的损伤情况,而对全身其他组织和器官的作用则不在本节讨论。

### (一) 呼吸系统毒物常见形态

1. 气体和蒸气 是呼吸系统毒物常见形态,通常是经呼吸道吸收进入体内。吸收与气体本身的生理化学特性(如浓度、水溶性和分配系数)和呼吸道的生理特性(如气流、组织灌注情况以及局部代谢情况)有关。气体和蒸气的吸收方式是简单扩散,高水溶性的气体或蒸气可在鼻腔直接被吸收,比如氟化氢气体可在鼻腔完全吸收;相反,低水溶性的气体或蒸气,在上呼吸道不能很好地吸收,但可被下呼吸道所吸收,如  $\text{NO}_2$  气体。

2. 气溶胶 气溶胶粒子的沉积受其本身物理/化学特性以及由其本身的大小、形状、密度决定的空气动力学的影响,还和生物体呼吸道的解剖特点以及呼吸方式有关,这两方面因素决定气溶胶粒子沉降的部位和数量。

空气动力学直径小于  $10\mu\text{m}$  的气溶胶称为可吸入颗粒。目前范围在  $0.1\mu\text{m}$  到  $1\mu\text{m}$  的细微粒子(fine particles)和小于  $0.1\mu\text{m}$  超细微粒子(ultrafine particles, UFP)对人类健康的影响越来越引起人们的关注。UFP 是物质在高温过程中形成的,比如焊接过程中金属的氧化燃烧。其特征是粒子小,单位质量的表面积很大,粒子碰撞可形成链状聚集以维持其稳定性,例如煤烟。研究发现,超细微粒子比粗粒子对肺部的损伤要大得多。

3. 纤维 纤维是一种特殊的气溶胶,按其来源可分为自然来源的、人工合成的无机纤维和人工合成的有机纤维三种。以往由于纤维的低溶解性和低化学反应性,认为它的毒性很低,但现在已经公认的某些纤维可以导致人肺间皮瘤的发生和肺的纤维化。影响纤维肺毒性有三个方面的因素,即:纤维的大小、纤维的稳定性以及进入体内纤维的剂量。三个方面中尤其值得重视的是纤维的大小(包括长度和直径),它是决定纤维沉降数量和部位的关键因素。一般认为纤维的长度大于  $200\mu\text{m}$ 、直径大于  $3\mu\text{m}$  则不能进入肺深部。此外纤维的密度、形状以及分散度等也会影响到纤维沉积的部位和数量。

### (二) 常见的呼吸系统毒物

呼吸系统毒物按其来源可分为来源于空气的和来源于血液的两种。

1. 空气来源的呼吸系统毒物 是指经呼吸道进入呼吸系统的毒物,常见的有:

(1) 石棉(asbestos):石棉是以纤维形式存在的硅酸盐矿物质,常见的有温石棉、青石棉、闪石等。接触石棉纤维的职业常见于采矿业、建筑业及造船业。接触石棉引起人类三种类型的肺病,即石棉沉着病、肺癌和恶性间皮瘤。石棉沉着病的病理学特点是肺泡壁胶原渗出增多(纤维化),有石棉纤维出现,呈游离状态或被蛋白类物质包裹(石棉小体)。恶性间皮瘤是发生于脏胸

膜和壁胸膜表层的细胞的肿瘤,在人类比较罕见,但与接触石棉有直接关系。不同的石棉类型致人类和动物间皮瘤有些差异。动物以温石棉易致肺间皮瘤;而在人类则闪石更容易些。接触石棉所致的损害一方面取决于石棉纤维的长度,2 $\mu\text{m}$ 的纤维可能引起石棉沉着病,5 $\mu\text{m}$ 的则引起间皮瘤,而超过10 $\mu\text{m}$ 的纤维才能引起肺癌;另一方面,石棉纤维的直径也起着重要的作用。直径超过3 $\mu\text{m}$ 的纤维不易穿透肺到达肺外组织,只有直径小于0.5 $\mu\text{m}$ 的纤维才有可能通过淋巴管转移到其他器官如胸膜表面,形成间皮瘤。肺巨噬细胞的吞噬作用在与石棉相关的肺疾病的发生中也起着重要的作用。石棉纤维一旦在肺中沉积,就可被肺巨噬细胞吞噬,其中短的纤维被彻底消化并经粘膜纤毛的摆动而清除;而较长的纤维不能被彻底消化,巨噬细胞则不能离开肺泡。但巨噬细胞被石棉纤维激活后可释放淋巴因子和生长因子,进而诱导免疫活性细胞或者刺激胶原蛋白的生成,最后这些与石棉相关的肺部疾病的炎性以及一系列相关的变化最终导致致癌过程的引发(一些活性分子导致的DNA损伤)和促长(肺细胞转化的增加)过程。石棉纤维表面特性也是其毒性机制的一个重要部分。离体细胞发生与石棉相关的损伤时,超氧化物歧化酶和自由基清除剂具有保护作用,说明活性氧的产生和脂质过氧化作用是石棉毒作用的重要机制,石棉表面的离子与氧发生反应形成过氧化氢和高活性的羟基,也与石棉的毒性有关。

(2) 硅(silicon):硅在自然界中主要以二氧化硅的形式存在。二氧化硅是地壳中的主要成分,其晶体是以硅原子为中心的四面体,其3种主要的异构体是石英、鳞石英和方石英。二氧化硅可引起人类的急性和慢性硅沉着病,前者发生在相对较短的时间内(一般是几个月到几年),接触空气中较高浓度的较小粒子(通常是小于5 $\mu\text{m}$ )。患者表现为呼吸困难加重、发热、咳嗽和体重减轻,并很快发展为呼吸衰竭,通常在一、二年内死亡;后者有一个较长的潜伏期,常常是超过十年。不典型性硅沉着病几乎没有什么症状,即使X线片已证实患有硅沉着病,但仅在肺功能检查中有轻微的改变,其主要改变是肺纤维结节的形成和肺气肿。二氧化硅致硅沉着病除与其本身的四面体结构有关外,粒子的大小和浓度也是影响其致病性的主要因素。人类的研究结果表明,最具致病性的粒子大小大约在1 $\mu\text{m}$ (在0.5~3 $\mu\text{m}$ 之间变化);而在动物(大鼠、仓鼠)相应的值应为1 $\mu\text{m}$ 至2 $\mu\text{m}$ (在0.5~5 $\mu\text{m}$ 之间变化)。动物实验中,动物暴露的硅尘浓度和肺组织学变化的强度和速度有直接的关系。在硅所致的慢性硅沉着病过程中,巨噬细胞起着很重要的作用,其对硅的摄入导致其释放细胞因子和其他物质,最后致成纤维细胞复制和(或)增加胶原蛋白的合成速度,在这一过程中,是巨噬细胞的作用还是其他炎性细胞的作用还不清楚。

(3) 萘(naphthalene):萘存在于焦油和石油中,是合成苯二甲酸酐、胺甲萘、2-萘酚以及制革剂的前体,用途非常广泛。污染的空气、香烟烟雾中也含有萘。萘可引起小鼠支气管上皮细胞的广泛性坏死,但在大鼠和仓鼠却没有坏死的发生,这种种属的差异性产生的原因在于其代谢的不同。

(4) 氧(oxygen):氧毒性是由一些还原氧化产物引起的,如超氧阴离子自由基、过氧化氢、羟基自由基、过氧化亚硝酸盐以及单线态氧等。氧所致的肺损伤的病理学表现为坏死性细支气管炎、成纤维细胞增生、支气管鳞状上皮细胞化生和肺泡管的破坏。动物暴露于95%~100%的氧,会发生弥漫性肺损伤;呼吸膜毛细管也发生广泛的损伤,I型肺泡上皮细胞和毛细管内皮细胞发生坏死性改变。毛细管的损伤引起蛋白分泌液的渗漏、血液成分渗到肺泡中、细胞残骸形成透明膜和蛋白液的渗出是肺氧毒性的特征性表现。

职业吸人性毒物的作用部位和引起的肺疾病,见表15-1。

表 15-1 职业吸入性毒物的作用部位和引起的肺疾病

| 毒物     | 常见病               | 急性作用                    | 慢性作用                                            |
|--------|-------------------|-------------------------|-------------------------------------------------|
| 石棉     | 石棉沉着病             |                         | 纤维化,胸膜钙化,肺癌,胸膜间皮瘤                               |
| 铝尘     | 铝尘肺               | 咳嗽,气短                   | 间质纤维化                                           |
| 铝磨料    | 包削工肺,金刚砂熔铸工肺,铁钒土肺 | 肺泡水肿                    | 间质纤维化,肺气肿                                       |
| 氨      |                   | 上呼吸道和下呼吸道刺激症,肺水肿        | 慢性支气管炎                                          |
| 砷      |                   | 支气管炎                    | 肺癌,支气管炎,喉炎                                      |
| 铍      | 铍中毒               | 严重肺水肿,肺炎                | 纤维化,进行性呼吸困难,间质肉芽肿,肺心病                           |
| 氧化镉    |                   | 咳嗽,肺炎                   | 肺气肿,肺心病                                         |
| 钨钼铋碳化物 |                   | 支气管上皮增生和肥大              | 支气管外周和血管外周纤维化                                   |
| 氯      |                   | 咳嗽,咯血,呼吸困难,气管支气管炎,支气管肺炎 |                                                 |
| 铬(六价)  |                   | 鼻部刺激症状,支气管炎             | 肺癌,纤维化                                          |
| 煤尘     | 尘肺                |                         | 纤维化                                             |
| 焦炉逸出物  |                   |                         | 支气管肺癌                                           |
| 棉尘     | 棉尘肺               | 胸部紧张,气喘,呼吸困难            | 肺功能减退,慢性支气管炎                                    |
| 氟化氢    |                   | 呼吸道刺激,出血性肺水肿            |                                                 |
| 氧化铁    | 铁肺病;银修整肺;赤铁矿肺;焊接肺 | 咳嗽                      | 银修整肺:胸膜下及血管外周巨噬细胞聚集;赤铁矿肺:弥散性纤维化样肺尘埃沉着病;焊接肺:支气管炎 |
| 异氰酸盐   |                   | 气道刺激症状,咳嗽,呼吸困难          | 哮喘,肺功能减退                                        |
| 白陶土    | 白陶土肺              |                         | 纤维化                                             |
| 锰      | 锰肺                | 急性肺炎,经常是致命的             | 复发肺炎,锰中毒                                        |
| 镍      |                   | 肺水肿,迟发两天                | 鼻腔和肺的鳞状细胞癌                                      |
| 氮氧化物   |                   | 肺充血和水肿                  | 闭塞性细支气管炎                                        |
| 臭氧     |                   | 肺水肿                     | 纤维化                                             |
| 光气     |                   | 水肿                      | 支气管炎,纤维化                                        |
| 过氯乙烯   |                   | 水肿                      | 肺癌和肝癌                                           |
| 硅      | 硅沉着病、肺尘埃沉着病       | 速发型硅沉着病                 | 纤维化,矽肺结核                                        |
| 二氧化硫   |                   | 支气管收缩,咳嗽,胸部紧张           | 慢性支气管炎                                          |
| 滑石     | 滑石粉症              |                         | 纤维化                                             |
| 锡      | 锡粉症               |                         | X线片见大面积阴影,没有临床表现                                |
| 矾      |                   | 气道刺激症状,产生粘液             | 慢性支气管炎                                          |

2. 血液来源的呼吸系统毒物 是指由呼吸系统以外的途径进入机体,然后经血液到达肺的毒物,又称呼吸道外肺毒物,常见的有:

(1) 百草枯(paraquat):百草枯属双吡啶类化合物,是一种使用广泛的除草剂,人摄入后可引起广泛的肺损伤。百草枯所致肺损害的主要特征是弥漫性间质和肺泡内的纤维化。最初的损伤是 I 型肺泡上皮细胞和 II 型肺泡上皮细胞的普遍坏死,随后是肺泡间质成纤维细胞的广泛增生和肺泡的大量萎陷。百草枯通过体内的多胺系统摄取并在肺细胞中蓄积,它进入细胞后就不断地从其氧化型向还原型循环,同时产生大量的活性氧,此过程需 NADPH 参与并使肺细胞内大量的 NADPH 被消耗掉,这是百草枯肺毒性的可能机制。

(2) 抗肿瘤药物(anticancer agents):许多抗肿瘤药物具有肺损伤的作用,较为常见的有以下几种。①农吉利碱(monocrotaline),又叫野百合碱,它是一种吡咯啉碱,可致肝细胞坏死和肝静脉阻塞而表现出肝脏毒性。肝脏在 24h 就能完成对农吉利碱的代谢。它会引起迟发型的肺损伤。农吉利碱在肝脏通过细胞色素 P-450 3A 代谢成为活性很高的吡咯,它是一种双功能烷化剂。其中一部分吡咯与谷胱甘肽或半胱氨酸形成共轭化合物而减毒;另一部分从肝脏释放并由红细胞转运到其他器官如肺,可能还有肾脏,引起内皮细胞的损伤。其非损伤的特征是毛细血管内皮细胞增生引起毛细血管网重构,动脉血管增厚,微血栓形成,最后毛细血管阻塞引起肺动脉高压和右心室肥大。②博来霉素(bleomycin),是几种结构相似的混合物,在癌症的化学治疗中使用广泛。它是所有抗癌药中几乎是惟一不影响骨髓的药物,但其严重的毒性是引起肺纤维化,甚至可以致死。损伤的后果为毛细血管上皮细胞和 I 型肺泡上皮细胞的坏死、出血和形成水肿;II 型肺泡上皮细胞的迟发性增生,最后导致肺泡壁增厚发生纤维化。在许多组织中,博来霉素靠博来霉素水解酶来灭活,但肺中该酶活性低,博来霉素不能有效被灭活,致使其刺激肺合成胶原蛋白增加,它还可以与二价铁和分子氧结合,形成自由基,损伤 DNA。还有一些抗肿瘤药如环磷酰胺、白消安、丝裂霉素 C 和甲氨蝶呤等均可致肺损伤和肺纤维化。

(3) 阳离子双亲和性药物(cationic amphiphilic drugs, CADs):这些结构相似的称为阳离子双亲和性药物的物质可引起肺的脂质沉积,如抗心率失常药物胺碘酮和食欲抑制药对氯苯丁胺,这类药物能与肺磷脂结合成难降解的复合物,抑制磷脂酶 A 和磷脂酶 B,使脂质在肺沉积。

其他,如丁基羟基甲苯(butyl hydroxy toluene, BHT)、有机磷农药所含的杂质三烷基磷酸硫酸盐(trialkyl phosphoric mercaptide)、甘薯黑疤霉醇等呋喃类物质,均可由呼吸系统以外的途径进入人体,然后经血液到达肺,引起肺毒性。

## 第二节 呼吸系统对外源化学物的毒性反应

外源性化学物质不管是从那种途径进入肺,均可引起呼吸系统的损伤,最后干扰肺的功能。由于肺也存在代谢毒物的酶系统,因此同样存在着毒物在肺的代谢活化作用。经代谢活化的活性代谢产物,一方面可以与肺细胞的生物大分子发生共价结合,导致急、慢性损伤,如坏死、纤维化及肿瘤等;另一方面,肺毒物代谢可以产生自由基,自由基引发肺细胞膜的脂质过氧化,进而损伤细胞的结构和功能。一般情况下,呼吸系统毒物首先损害 I 型肺泡细胞,然后再由 II 型肺泡细胞分化增生替代 I 型肺泡细胞,从而表现出各种各样的病理学改变如坏死、水肿、纤维化等等。

## 一、急性损伤

### (一) 鼻及上呼吸道损伤

某些刺激性气体如甲醛、氨、氯气等水溶性气体,极易被鼻、鼻窦以及气管、支气管粘膜中含水分的粘液吸收,并与其中的蛋白质、多糖物质结合,破坏粘液—纤毛的机制,表现出明显的局部刺激症状。轻者为鼻、咽喉的刺激症状,出现支气管痉挛、呛咳、粘膜充血和肿胀;重者发生肺水肿,导致呼吸困难。

### (二) 肺水肿

中毒性肺水肿是指肺损伤后的急性渗出,使呼吸膜(由肺泡上皮细胞、间质细胞、毛细血管内皮细胞和毛细血管基膜组成的血-气屏障)增厚,致使肺间质和实质有过量水分滞留。肺水肿(pulmonary edema)改变了通气-血流关系,限制氧气和二氧化碳的交换,几乎所有的肺毒物对肺的急性损害都可引起肺水肿,因此说肺水肿是肺急性损伤的标志。

中毒性肺水肿的后果不仅仅是导致肺结构和功能的急性改变,而且水肿消除后的一些后果也不容忽视。肺水肿时,肺间质和肺泡的渗出是通过纤维化来消除的,这对肺来说是利弊各半。

### (三) 坏死

机体吸入呼吸系统毒物后,尤其是吸入量大或吸入的毒物毒性强,可引起气管组织的坏死(necrosis)。其机制在于毒物本身或其代谢产物可与呼吸系统的大分子物质发生共价结合。例如空气污染物3-甲基呋可在体内经活化成为烷化剂,并与气管组织蛋白发生共价结合,最后导致气管组织的坏死。

## 二、变态反应

外源性化学物如某些粉尘、工业毒物(如甲苯二异氰酸酯、苯二胺)可引起变态反应,一般认为这是外源性化学物与血或肺中的蛋白质结合形成完全抗原后,进而刺激抗体产生。抗原抗体发生免疫反应的结果,使支气管痉挛而引发过敏性哮喘。另外吸入真菌产生的过敏性肺炎,吸入某些植物粉尘产生的类似的肺部疾病以及吸入金属铍产生的肺肉芽肿均属于变态反应。

## 三、慢性损伤

### (一) 肺纤维化

肺纤维化(lung fibrosis)在临床上也称特发性肺纤维化(或病原不明的纤维肺泡炎),后期所见的是间质纤维化,其特点是肺泡间质染色的胶原纤维数量增多,其生化指标是胶原蛋白数量增加。



毒物引起的肺纤维化与慢性间质性纤维化相似,但与成人或婴儿呼吸窘迫征更相似。不仅在肺泡间隙中见有过量的胶原蛋白,而且在肺泡管和呼吸性细支气管中也可见到,但为什么胶原蛋白会在肺泡管和呼吸性细支气管中出现,机制不清。哺乳动物正常肺组织中至少有19种不同类型的胶原蛋白,但有两种胶原蛋白在肺组织中占主要地位,那就是I型胶原蛋白和II型胶原蛋白。正常情况下两种胶原蛋白的比例约为2:1,毒物所致肺纤维化和呼吸窘迫综合征患者两者比例升高。

## (二) 肺气肿

肺气肿(emphysema)是指终末细支气管管腔异常增大,并伴有腔壁的破坏性改变而无明显纤维化的一种病理状态。吸烟和其他毒物均可引起人类的肺气肿,但主要是吸烟。毒物引起肺气肿的一个显著特征是反复发生的严重炎症,特别是涉及白细胞释放的蛋白水解酶参与的肺泡炎。毒物引起肺气肿的机制很复杂,一般认为与肺的中性粒细胞(或肺泡巨噬细胞)的弹性蛋白酶破坏肺的弹力蛋白有关。毒物引起炎性细胞的流入,使肺的中性粒细胞中弹性蛋白酶增加,进而是更多的弹性蛋白受到破坏;另外某些外源性化学物引起肺弹性蛋白合成障碍也是肺气肿形成的机制之一。

## (三) 哮喘

哮喘(asthma)是由于摄入某种哮喘源或其他不明因素所引起的大气道狭窄,临床表现为反复发作的气短。它与肺纤维化有相同的病理组织学表现。其发病机制也可能与肺纤维化相同,尤其是在炎性细胞及其分泌的细胞因子和生长因子的作用方面,不赘述。

## (四) 肺癌

很多呼吸系统毒物可以引起肺癌(lung cancer)的发生。流行病学研究表明,吸烟与肺癌有关。现在估计肺癌约有80%~90%是由吸烟引起的,中度吸烟者患肺癌的危险是不吸烟者的10倍,重度吸烟者患肺癌的危险是不吸烟者的20倍,戒烟可以减少患肺癌的危险。除吸烟外,现已确认石棉纤维和某些金属如铍、镉、铬、镍、砷等能引起呼吸道癌症;氡气是人类肺癌的确认致癌物;甲醛是人类呼吸道可能致癌物;硅、人造纤维和焊接烟尘是可疑致癌物,它们之间还存在着协同作用;至于臭氧、二氧化氮、二氧化硫以及发电厂、柴油机、汽车等的废气,要接触多大剂量才可能引起一般人群发生肺癌,尚需进一步讨论。关于化学毒物致肺癌目前研究的比较多也比较明确的是多环芳烃类,以B(a)P为例:B(a)P在肺内MFOS作用下,形成B(a)P-4,5环氧化物和B(a)P-7,8环氧化物,进一步在环氧化物水化酶的作用下生成B(a)P-4,5-二羟二醇和B(a)P-7,8-二羟二醇,后者在细胞色素P-450的作用下形成B(a)P-7,8-二羟-9,10环氧化物,此种环氧化物比其他的环氧化物的致突变致瘤活性更强,可以和核酸中的鸟嘌呤和腺嘌呤结合,产生DNA损伤而引起突变和致癌作用。

值得注意的是,肺癌一般原发于气管支气管的上皮细胞,但周围型肺癌中的腺癌也明显增加。与肺癌相比,上呼吸道癌症并不常见,鼻部的恶性肿瘤常见于动物实验中。鼠类肺部的肿瘤大多发生于肺泡II型细胞或细支气管的Clara细胞,一般呈良性腺瘤,但能发展成为腺癌并侵入淋巴管和血管。大鼠暴露于空气中的致癌物时发生的肺部肿瘤主要为周围型腺癌和鳞状细胞

癌,但有时会出现上皮组织围绕包裹一些角蛋白形成团块,可以挤压或进入肺实质。有些病理学家把这样的病损结构归为真正的肿瘤;而有些病理学家则认为只是充满角蛋白的包裹。把这种病损归类为肿瘤很重要,因为在接触像炭黑、钛白以及人造纤维等未确定致癌物的动物长期试验中经常能见到这种病理损害。

## 四、肺损伤的适应

哺乳动物的肺接触外源性化学物以后,一方面利用自己独特的机械防御功能(如沉积、吞噬、转运和清除功能)进行自我保护外,肺细胞具有很强的增殖与组织修复功能,同时肺细胞中丰富的代谢酶系统也可通过代谢活动消除肺毒物及其产生的具有损伤作用的活性代谢物,从而表现出肺对外源性化学物的适应与耐受。

### (一) 细胞的增殖与修复

一般成人的肺部在正常情况下几乎没有细胞的死亡和被替代。当肺部发生毒性损伤时,肺实质能有效地进行自我修复,表现为Ⅰ型肺泡上皮细胞损伤后,Ⅱ型肺泡上皮细胞增殖,最后转变为Ⅰ型肺泡上皮细胞,使损伤得到修复。当呼吸道损伤时细支气管 Clara 细胞也增殖、分裂;血细胞如白细胞从肺泡毛细血管向肺泡腔的迁移也能激发有丝分裂使细胞增殖;肺泡的其他细胞如毛细血管内皮细胞、间质细胞和巨噬细胞也增殖。虽然成纤维细胞的过度增殖可引起肺部疾病,但肺看起来还是正常的。总之,肺具有很强的自我修复能力,可以处理许多环境当中的肺毒物。

### (二) 代谢防御

不论外来化学物以何种途径进入肺,都可以通过肺微粒体混合功能氧化酶代谢,对某些化学物来讲,是使之活化;对某些来讲,可以灭活。如肺中多环芳烃代谢产物可在谷胱甘肽-S-转移酶作用下使谷胱甘肽与之结合,从而组织其与 DNA 的结合而表现出抗突变、抗癌活性;肺中的环氧化物水解酶也可催化环氧化物的水解作用;肺还可以通过甲基化作用解毒,比如某些酚类和胺类物质,可在肺中通过甲基转移酶的作用生成甲基化产物,经尿液排出体外。

肺除通过结合、转移等作用消除体内外来化学物或其代谢产物外,还可以通过其自身所具备的抗氧化酶和抗氧化物质消除肺毒物在肺中所产生的活性氧,阻止肺细胞脂质过氧化物的发生,从而达到防御外来化学物对肺的损伤的目的。例如动物接触氧、臭氧、二氧化氮或百草枯时,肺中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、谷胱甘肽-S-转移酶的活性都升高。前者的升高,可使磷酸戊糖旁路代谢增加,生成大量的 NADPH 和 GSH;后者的升高,可降低肺细胞中的过氧化氢水平,减少活性氧自由基的形成,同时也使肺中已经产生的膜脂质氢过氧化物还原为羟基酸,减少过氧化物在肺中的积聚。另外在某些中毒性肺损伤的动物试验中,还可见到超氧化物歧化酶的升高,这无疑也是机体通过代谢防御肺毒物所致氧化损伤的重要保护反应。

### 第三节 肺损伤机制

外源化学物对肺的损伤一般通过三个方面的机制来完成,即:①任何途径来源的外源化学物进入肺,在肺内代谢酶的作用下活化为具有高度活性的代谢产物,这些代谢产物损伤肺;②经肺外吸收的外源化学物在肝脏内被肝微粒体酶代谢为活性代谢产物,后者经血液循环到肺引起肺损伤;③外源化学物在肺内的反复氧化-还原,消耗掉大量的细胞辅助因子如 NADPH,同时还能产生大量的活性氧族,一方面诱发肺细胞膜的脂质过氧化作用,另一方面也破坏了肺的抗氧化保护机制,此即肺的氧化负荷所致的损伤机制。由上面可见,肺毒物不论以哪种机制损伤肺,但归根结底是对肺内各种细胞的损害以及由于细胞损害所致细胞因子产生的影响,下面分别予以讨论。

#### 一、肺血管内皮和上皮细胞损伤

##### (一) 血管内皮细胞损伤

血管内皮细胞是肺毒物的重要损害部位之一,但现在还没有发现血管内皮细胞本身对外源化学物具有生物转化的能力。例如生物碱吡咯里西啶在肝脏中被代谢为生物活性极强的吡咯,再由血液带到肺,对血管内皮细胞造成损伤。另外毛细血管内皮细胞的损伤还和呼吸道的神经反射有关系,比如浓的氯气或氯化氢气体,可以通过嗅神经的反射或者缺氧的机制,致毛细血管内皮细胞损伤,可使动物发生猝死,病理检查可见严重的肺水肿。

##### (二) 上皮细胞损伤

1. 气管支气管的纤毛上皮细胞损伤 纤毛上皮细胞是气管支气管的主要细胞,它与粘液一起清除进入肺内的颗粒物质。纤毛上皮细胞是一种不稳定的细胞,在肺毒物的作用下,其超微结构发生明显的变化,使粘液-纤毛清除机制受到破坏,引起呼吸道的损伤。

2. 呼吸细支气管的 Clara 细胞损伤 Clara 细胞滑面内质网丰富,内含大量的细胞色素 P-450 系统,具有很强的对外源化学物代谢活化的能力,对某些肺毒物也非常敏感,也可能是某些致癌物代谢活化的重要部位,是其代谢活化成为终致癌物,或其本身就是这些终致癌物的靶,例如某些亚硝基衍生物可诱发起源于 Clara 细胞的肺肿瘤。

3. 肺泡上皮 I 型和 II 型细胞 I 型肺泡上皮细胞有大量的毒物靶部位,极易受到肺毒物的伤害,且不能修复。当 I 型上皮细胞受损时,II 型肺泡上皮细胞可进行分化增殖,变为 I 型肺泡上皮,这个过程一般在 I 型肺泡上皮受损后 48 ~ 96h 完成。

#### 二、巨噬细胞损伤

由于肺泡不存在分泌粘液的细胞和纤毛上皮细胞,所以肺泡巨噬细胞在肺泡颗粒性外来化

学物的清除中起着非常重要的作用,它通过吞噬和运动将颗粒或纤维状外来化学物运到终末细支气管,然后通过支气管或气管的粘液纤毛运动排出肺或转到淋巴系统或进入间质。

有些物质如石棉纤维或二氧化硅,被肺泡巨噬细胞吞噬不完全,还导致细胞膜的损伤,这样巨噬细胞分泌的溶酶体酶直接进入肺泡,引起肺泡的损害。巨噬细胞的吞噬作用可使其活化释放炎性介质如巨噬细胞和中性粒细胞的趋化因子前列腺素、引起平滑肌收缩和血管通透性增强的血小板活化因子、促进成纤维细胞和胶原蛋白产生的生长因子以及其他各种细胞因子如肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和 $IL-1$ ,调节炎性反应过程。巨噬细胞不能有效地清除颗粒的后果使肺出现“灰尘负载”现象,致使间质吸收颗粒增加、因摄取颗粒而肿胀的巨噬细胞数目增加、慢性炎症、肺泡细胞的过度增生,最后导致肺泡炎、肉芽肿、肺纤维化和肿瘤。一旦由于肺内大量的颗粒使巨噬细胞的吞噬功能下降,即使颗粒不具备细胞毒性,也会使巨噬细胞的移动性下降,导致其清除率下降和释放一些生物活性物质,总体效应是扩大炎性反应并导致肺组织的严重损害。

### 三、肺表面活性物质破坏

肺表面活性物质位于肺泡内壁的气-液界面之间,具有降低肺表面张力,使回缩压下降,防止肺泡萎缩的作用,同时对保护肺泡内的巨噬细胞也有一定作用。肺表面活性物质的厚度可达200nm,由不饱和脂肪酸、脂蛋白和磷脂组成,其主要成分为二软脂酰卵磷脂。肺毒物可以破坏肺泡表面活性物质,使肺泡内液体表面张力增加,肺泡壁的通透性增加,血液成分进入肺泡,引起肺水肿。

外源化学物通过两种途径破坏肺表面活性物质。一是各种腐蚀性气体,直接破坏肺表面活性物质;二是外源化学物引起的脂质过氧化作用或合成表面活性物质的II型肺泡上皮细胞受损使之合成减少所致。此外肺内脂质代谢障碍可间接影响肺表面活性物质的合成。

### 四、细胞因子在肺损伤中的作用

细胞因子是一些低分子量的蛋白质,它们通过与靶细胞膜受体的交互作用来管理细胞间的通讯,因而在维持细胞机体内环境方面起着信使作用。一般情况下,低水平细胞因子在体内的正常表达,在细胞的增殖、分化以及组织的完整性方面起着非常重要的作用。某些可以调节细胞因子水平的物质可以严重地影响机体对肺毒物得到反应结果。按细胞因子对肺内环境稳定的效应,Driscoll等把细胞因子分成三类:第一类是启动细胞因子,如肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和白介素-1;第二类是募集细胞因子,如趋化因子,可由肺上皮细胞、II型肺泡上皮细胞、成纤维细胞和肺泡巨噬细胞分泌,负责支配特定炎性细胞的募集和肿瘤坏死因子 $\alpha$ 和白介素-1;第三类称为溶解细胞因子,如生长因子 $\alpha$ 、生长因子 $\beta$ 、白细胞介素-4、白细胞介素-6和白细胞介素-10。可以缓解成纤维细胞的增殖和胶原蛋白的产生。已有证据表明,细胞因子通过调节炎性细胞的募集、成纤维细胞和上皮细胞的增殖、组织的修复而在肺毒物所致的肺纤维化的病理生理过程中起着重要的作用。

## 第四节 呼吸毒理学研究方法

呼吸毒理学研究呼吸系统暴露于外来化学物后的变化,包括对呼吸道的刺激、行为的变化、肺及呼吸道的病理改变、肿瘤的形成、死亡的发生以及发生这些改变的机制。根据研究目的的不同,可采用不同的研究方法。

### 一、整体试验

#### (一) 动物模型

动物品种的选择在呼吸毒理学的研究中非常重要,目前还没有说哪种动物能够完全替代人类对呼吸系统毒物的反应,每一个品种都有其各自的优点和不足,按照使用的顺序,经常用于呼吸毒理学的动物是大鼠、小鼠、豚鼠和仓鼠。

大鼠对慢性炎症、肺纤维化以及由不可溶的非细胞毒性颗粒物所引起的肺癌比较敏感,但对纤维诱导的肺间皮瘤不敏感,除此以外,大鼠还是比较满意的短期和长期吸入研究模型。豚鼠在呼吸道致敏的研究中使用较多,而由于其含有丰富的气管平滑肌,常被用做哮喘模型,来研究气道的高反应性和气管收缩。仓鼠对呼吸道有较强的抵抗力,而肿瘤的自发率则相对较低,但对纤维诱导的肺间皮瘤敏感,而对其他肺部肿瘤则没有大鼠敏感。

#### (二) 染毒系统

吸入染毒系统应包括气体发生系统、空气稀释和传输系统、染毒容器(染毒柜)、气体采样和分析系统、排气/洗涤系统。最简单的可能只有一个染毒柜(罐)。

#### (三) 染毒模式

按照毒物的输入方式,可将吸入染毒分为静式吸入染毒和动式吸入染毒两种形式。

按照动物接触毒物的方式,又可将染毒模式分为全身接触染毒、头部或仅鼻部接触染毒、气管注入3种。

1. 全身接触染毒 使动物整个身体都置于含有一定浓度毒物的环境中,动物可在其中自由活动。这种染毒方式与人接触呼吸系统毒物的方式相似,但由于动物梳理皮毛的习惯可致经口摄入;整体动物置于染毒柜中,由于皮肤的粘附,可使毒物经皮吸收,故存在交叉接触问题,试验时应予以考虑。

2. 头部或鼻部接触染毒 此种染毒方式仅呼吸道接触毒物(只有头部或仅鼻部接触)。其优点是使用毒物的量低,特别适用于测量高毒性或难于获得的化学物,减少了受试物的污染,简化了试验后的处理过程。

3. 气管注入染毒 是把受试物直接经气管注入肺或气管腔。按操作方法的不同又分为:气管滴入、气管插管、气管造口染毒、气管吹入等。但其共同点都是避开了上呼吸道,仅使肺或下呼

吸道接触毒物。优点是方法经济、使用毒物少、剂量准确便于控制；不足之处是和人实际接触毒物的条件和方式相差太远，对动物的机械损伤较大，不适用于常规使用。

#### (四) 染毒剂量

呼吸道染毒的剂量与其他途径染毒的剂量有所不同。经呼吸道染毒进入动物体内的量与毒物在吸入气中的浓度和动物与毒物接触的时间的长短有关，此时剂量的表达应为毒物在吸入气中的浓度(C)和动物接触含毒空气的时间(t)的乘积。理论上讲，只要毒物的浓度C与接触时间t的乘积一定，则引起的毒效应强度就应该相同。但实际情况远非如此，当接触毒物的浓度C极小时，无论动物与其接触的时间t有多长，都不会发生毒性反应。所以实际工作中常常是在接触时间固定的情况下，改变接触的浓度来观察动物经呼吸道接触毒物所产生的毒效应。

上述的剂量(或浓度)实际是动物接触的外剂量，而非真正进入机体的量，即所谓的内剂量。呼吸毒理学中毒物进入机体的内剂量与受试物的气态浓度、染毒时间、个体的呼吸量和呼吸频率以及在体内的沉积率有关。写成公式可以表示为： $D = E_d V_m CT$ 。式中D指沉积量(吸入的内剂量，单位mg)； $E_d$ 为受试物在呼吸道中的沉积率； $V_m$ 为动物每分钟呼出气体量(单位L/min)；C为受试物的浓度(单位mg/L)；T为染毒时间(单位min)。由上述公式可以看到，吸入的内剂量具有动物种属和受试化学物质的特异性。现在也有人利用生物标志物(如DNA加合物)和生理基础药物动力学模型(physiologically based pharmacokinetics model, PBPK)来评价经呼吸道染毒的内剂量。

由于整体染毒的剂量(浓度)常随染毒的时间而发生变化，所以必须以适当的间隔采集染毒柜(罐)中的气体进行分析，以确定动物实际接触的毒物的浓度。

#### (五) 观察指标

除观察动物的中毒症状、体重变化等一般指标外，还应观察如下指标：

1. 呼吸功能 尽管肺功能实验在动物毒理学中很少应用，但它是评价呼吸系统吸入外源化学物所致损害的非常有用的手段。呼吸系统的主要功能是气体交换，当受到外源化学物作用时，首先发生改变的是呼吸功能，而呼吸功能的改变往往要先于形态学的改变，所以是比较灵敏的指标。研究人和试验动物呼吸功能的指标很多，比较常用的有如下几类：

(1)呼吸频率：某些刺激性气体可以改变人或受试动物的呼吸频率，使其加快或降低。例如水溶性低的臭氧和二氧化氮可以引起肺部的刺激，使呼吸加快而表现为每分钟通气量下降；而高度水溶性的氨、氯和甲醛引起上呼吸道的刺激，使呼吸频率减慢。利用此点可以鉴别呼吸毒物作用的部位是上呼吸道还是肺的深部。

(2)肺通气阻力和肺的顺应性：当由于外源化学物的作用导致呼吸道狭窄、粘液分泌过多或呼吸道粘膜肿胀时，常常表现为肺通气阻力的增加。肺的顺应性是表示肺弹性的指标，当外源化学物致肺纤维化、肺不张、肺水肿、肺表面活性物质减少时，可使肺的顺应性降低；而肺气肿由于失去了支持性的结缔组织，则顺应性增加。肺的顺应性一般以单位胸腔压力下肺容量的改变来表示。其测定方法有负压测定法、正压测定法等。

(3)血气分析：氧气和二氧化碳在肺泡-毛细血管膜上的有效交换是肺的基本功能，此功能的紊乱可作为呼吸损伤的一种标记。虽然它是一个相对比较灵敏的指标，但动物试验发现，只有发

生严重的阻塞或限制性肺改变才表现出气体交换功能的变化。因为一氧化碳与血红蛋白的亲合力是氧与血红蛋白亲和力的250倍,因而测定一氧化碳的弥散量更灵敏。此项检测在人和动物中都比较容易进行,因而被广泛地应用于呼吸毒理学的研究中。

2. 形态学指标 机体吸入毒物后可引起许多形态学方面的变化,在大体和镜下都可以见到急、慢性的病理学改变。所要注意的是要观察全面,不仅限于肺,要对鼻、喉、主气道也进行细致的检查,因为某些呼吸毒物主要作用在上呼吸道,而对远端气道或肺则没有作用。

呼吸道组织的石蜡切片可以满足常规的组织病理学观察,但要正确观察区分气管和肺泡内的不同类型细胞以及观察 Clara 细胞细胞质的改变时,则需约  $1\mu\text{m}$  的塑料或环氧树脂切片;而要观察 I 型肺泡上皮细胞或毛细血管内皮细胞的退行性改变或坏死则需要透射电子显微镜。

此外,免疫组织化学、原位杂交和流式细胞分析等方法也广泛应用于呼吸毒理学的研究中,这些方法对确定肺组织中某些酶的解剖定位、对特殊的基因表达产物的研究以及对肺部细胞群的分离和鉴别均有重要的意义。

## 二、支气管肺泡灌洗

\*\*\*\*\*

### (一) 概念及用途

支气管肺泡灌洗(bronchoalveolar lavage, BAL)是用等渗的盐溶液冲洗和灌注气管与肺泡区表面的过程,是一种采集支气管和肺泡表皮脱落细胞和液体的方法。通过对支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar lavage fluids, BALF)细胞组成和功能特点以及生化参数的分析,可以对支气管肺泡区的炎性反应的存在进行检测,以判断疾病的进展情况并阐明其病理机制。

### (二) 方法简介

BAL 可以在体内或离体的肺内进行。对于小动物如大、小鼠,可以对全肺进行多次灌注,将几次的灌注液混合用于分析。对于大动物或人,可用气管镜对一个肺叶进行灌洗,灌洗液以密闭导管引出。如要获得大量的细胞,必须反复灌洗,同时要避免灌洗液中可能含有的钙、镁离子。

### (三) 支气管肺泡灌洗液分析

1. 细胞 对 BALF 的分析主要是分析巨噬细胞和单核细胞(及其吞噬能力),多核白细胞以及淋巴细胞。其中巨噬细胞在正常的动物 BALF 中占 95% ~ 100%; 淋巴细胞是来自大动物如人体中的较小成分,在啮齿类动物 BALF 中很少发现; 多核白细胞与炎症反应过程有关,而在正常肺中很难发现。

2. 蛋白 正常动物 BALF 中只有少量的蛋白(主要是清蛋白)和低水平的酶活性(如  $\beta$ -葡萄糖醛酸糖苷酶、酸性磷酸酶、乳酸脱氢酶)。当呼吸系统表皮和(或)内皮细胞膜损伤时,导致血清流入呼吸道,蛋白增加; 受损时巨噬细胞释放溶酶体酶、酸性磷酸酶和  $\beta$ -葡萄糖醛酸糖苷酶,使其含量增加; 如果呼吸系统吸入的是不溶性的颗粒,则巨噬细胞被活化,细胞膜吞噬不溶颗粒,释放活性氧和细胞因子等。

#### (四) 支气管肺泡灌洗的优缺点

支气管肺泡灌洗的优点,主要有:①可以直接应用于人体,比较正常志愿者和患者(中毒者)的数据;②能检测到机体吸入毒物早期细胞和生化学的改变,与传统的非形态测定法相比,BAL是对肺的定量测定;③由于BAL主要作用在支气管肺的表面,不会引起呼吸道的局部损伤,其所反应的是支气管肺泡部位的所有的炎性改变。缺点为:①BAL在人体不能作为常规手段来使用;②某些测定参数的增加或减少有时还不能真正从毒理学理论上作出明确的解释。

### 三、离体试验

体外试验多数用于研究肺损伤的机制,以下系统比较常用。

#### (一) 肺灌流

肺灌流(perfused lung)可分为离体灌流(isolated perfusion)和原位灌流(in situ perfusion)两种方式。前者是将肺切下移出体外灌流;后者是将肺保留在胸腔内灌流。具体方法是通过肺动脉向肺灌流血液或血液替代物,同时肺主动通气(通过正压作用产生节律性充气-放气循环)或被动通气(将肺悬挂在一个“人造胸廓”中,产生负压)。毒物可以加到灌流液或吸入气中,反复灌流肺可检测毒物的代谢率或肺的代谢活性。

#### (二) 肺切片与显微切割

肺切片是将肺实质或气道切片,然后使其在培养基中培养,毒物可加入其中,观察毒物在肺中的吸收与代谢情况。

显微切割利用显微方法从肺组织中剥离小支气管和终末细支气管,以保持气道的独立,然后通过形态学方法和生化方法研究毒物对小气道细胞的影响。

#### (三) 离体细胞培养

细胞培养技术在呼吸毒理学中被广泛地应用。目前已经分离出了许多种类型的肺原代细胞。肺巨噬细胞很容易从人或动物支气管肺泡灌洗液中得到,可在体外检测其功能;肺经消化和分离,可得到纯化的Ⅱ型肺泡上皮细胞、Ⅰ型肺泡上皮、Clara细胞及神经上皮细胞。而且还建立了许多来源于人或动物的肺肿瘤细胞系,用于呼吸毒理学的研究。

(李百祥)



## 第一节 概 述

肝脏毒理学(toxicology of the liver)是利用毒理学的基本方法和技术,研究外源化学物对肝的损害作用特点及其机制的学科,它是靶器官毒理学的一个重要研究领域。许多化学物质包括有的医用药物对肝可造成不同程度不同类型的损害。19世纪后期,科学家发现暴露黄磷(yellow phosphorus)后可导致脂质在肝内的沉积。在20世纪40年代初,有人用动物实验对肿凡纳明(arsphenamine)、四氯化碳、氯仿等化学物质引起的肝损害进行了研究。实验结果表明,肝损害的程度与类型不仅依赖于接触化学物质的种类,而且依赖于暴露化学物质的时间长短。肝细胞内的脂质蓄积(lipid accumulation)、肝细胞坏死(cellular necrosis)、肝胆功能障碍(hepatobiliary dysfunction)常见于急性接触化学毒物,而肝硬化(cirrhosis)或瘤样改变(neoplastic changes)常见于慢性接触化学毒物。肝细胞形态与功能的改变并非由单一的毒作用机制造成,不同的生化毒作用机制可以导致相同的肝毒性(hepatotoxicity)终点。肝损伤有的是可逆的,有的是不可逆的。肝损伤发生的频率与严重程度可因不同动物物种存在较大差异。在毒理学研究领域,为了区别于病毒性肝炎,近年来将化学物引起的各种急性和慢性肝损害统称为化学性肝损害(chemically induced liver injury)。

肝是人体内最大的实质性器官,成人的肝重量约占体重的3%左右。肝表面覆以致密结缔组织被膜,内含丰富的弹性纤维。肝的基本结构单位有两种划分方法:一种是经典肝小叶(classic hepatic lobule),在门管区,结缔组织随肝的血管和胆管的分支伸入肝实质(hepatic parenchyma),构成肝支架,并把肝分隔成许多肝小叶。它是1833年Kiernan在观察猪肝提出的肝基本结构单位,目前描述病理性肝损伤仍采用肝小叶的概念。肝小叶由肝细胞板、血窦、毛细胆管、中央静脉和门管区等组成。末端肝小静脉(terminal hepatic venule)即中央静脉(central vein)位于肝小叶中央,门管区(portal space)即小叶间门静脉、肝动脉、胆管等,位于肝小叶周围,一个肝小叶单位呈六角形。另一种是肝腺泡(liver acinus),它是1954年Rappaport等人研究肝微循环与肝病理和再生关系提出来的肝最小基本单位。他们利用血管灌注和胆管灌注法,证明一个经典肝小叶的血液来自周围几个终末血管,一个肝小叶分泌的胆汁也汇入几个胆管。因此认为经典肝小叶并不是肝的最小功能单位。最小功能单位应该是肝腺泡。肝腺泡单位是以相邻门管区三联

分支终末支为中轴,两侧以中央静脉为界。肝腺泡内的血流从中轴流向外周,根据血流方向和获得营养物质的先后将1个肝腺泡分为3个相对的循环带。在接近中轴血管的部分为I带,此带肝细胞能优先获得富余氧气和营养成分的新鲜血液供应,细胞代谢活跃,再生能力强。在接近中央静脉的外侧部分为III带,I带和III带之间为II带。III带肝细胞获得的血液供应是继I带和II带之后,血液成分已发生改变,肝细胞对某些有害物质的毒作用较敏感,易发生病理损害,肝细胞的再生能力较差。但后来研究发现,在肝腺泡内的肝实质细胞的功能特性并不依存于供血梯度。因此有人提出了“代谢区带化(metabolic zonation)”概念即肝腺泡内不同区带酶的分布与代谢活性存在差异,如呼吸酶活性在I带特别高;细胞色素P-450依赖性酶系在III带含量特别丰富;某些NADPH依赖性酶系在III带含量较多,而在I带较少;葡萄糖激酶和丙酮酸激酶在III带活性比I带高2~3倍,是糖酵解的主要区域;磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶、果糖1,6-双磷酸和葡萄糖6-磷酸酶在I带的活性显著高于III带,是糖异生的主要区域。化学毒物引起肝特定区域的损害,可能与代谢酶分布差异有关。以上两种肝最小基本结构单位的划分并不矛盾,两者从不同角度阐明了肝组织结构和功能的关系。

肝细胞由肝实质性细胞(parenchyma cells)即肝细胞(hepatocytes)和非实质性细胞(nonparenchyma cells)组成,前者约占60%,后者约占40%,其中非实质性细胞包括内皮细胞、枯否细胞(Kupffer细胞)、贮脂细胞(亦称Ito细胞)、大颗粒淋巴细胞、胆管上皮细胞、成纤维细胞等。肝细胞是组成肝最主要的细胞,它是一种高分化的细胞,功能复杂,在电镜下可观察到多种细胞器和包含物,由于肝细胞是肝的主要代谢细胞,因此毒理学实验中常用肝细胞作研究材料。

肝具有多种生理生化功能,它可作为消化腺分泌胆汁促进肠道脂肪和脂质的消化和吸收;它具有内分泌腺作用,能合成清蛋白、纤维蛋白原、凝血酶原、纤维蛋白原以及多种载脂蛋白等,释放入血液,影响和调节机体的各种生理活动;它是体内最大的物质代谢与生物转化器官,体内糖、脂类、蛋白质、维生素、激素等物质代谢主要在肝,由于肝富含代谢转化酶,它参与许多化学物质包括营养物质、药物与化学毒物的氧化、还原与结合反应过程;肝内有极其丰富的血窦,是人体内最大的贮血器官之一,血窦内含大量的巨噬细胞,能吞噬和清除血液中的异物。胚胎期的肝有造血功能,正常成年人的肝不参与造血,但在某些病理情况下,肝可恢复一定的造血能力。

在机体内肝具有特殊的解剖位置和生理生化特性,肝最易作为外来化学物的毒作用靶器官。化学物质无论从何种途径进入机体,均可通过血液循环达到肝,尤其从消化道吸收的毒物,在进入血液循环以前毒物首先与肝接触。肝作为化学毒物的生物转化器官,在一定条件下,化学毒物极易对肝造成损害作用。

## 第二节 肝 毒 物

人类环境中许多化学毒物在一定的剂量水平可对肝造成损害作用。凡是能引起肝损害的化学物质均可称肝毒物(hepatotoxicant)。

## 一、肝毒物分类

肝毒物的种类很多,根据肝毒物对肝的毒作用机制可将肝毒物分为体质依赖性肝毒物和真性肝毒物(表 16-1)。体质依赖性肝毒物多见于药物,其肝损伤主要表现为肝细胞坏死与胆汁淤积。毒物常在具有特异体质(idiosyncrasy)如存在某种遗传特异性或处于某种特殊生理状态的机体中发生毒作用,潜伏期长短不一,其损害作用不易通过动物实验模型复制,亦无剂量依赖性。真性肝毒物在接触人群中发生率高,肝损害程度一般有剂量-效应或剂量-反应关系,潜伏期短,造成的肝损害能在动物实验模型中复制,根据真性肝毒物毒作用机制,可分为直接肝毒物和间接肝毒物:①直接肝毒物:是指直接作用于肝细胞膜、细胞器膜或生物大分子的化学毒物,这类肝毒物导致膜脂质过氧化、膜蛋白质变性,使膜结构破坏,最后肝细胞死亡,如  $\text{CCl}_4$ 、 $\text{CHCl}_3$ 、四溴化碳、四氯乙烷、碘仿等;②间接肝毒物:指进入肝细胞内具有干扰细胞酶活性从而导致细胞内物质代谢紊乱的化学毒物或指经代谢转化后其代谢产物能与细胞内生物大分子结合,使细胞功能发生改变的化学毒物。例如乙硫氨酸等肝毒物可通过抑制脂蛋白合成酶从而减少脂蛋白的合成,使甘油三酯不能从肝细胞排出,导致肝组织脂肪变性;乙醇可诱导甘油三酯合成酶的增加,使甘油三酯合成增多,从而导致肝组织脂肪变性;又如黄曲霉毒素经生物转化后的代谢产物能与肝细胞内 DNA 发生共价结合,可诱发肝细胞癌变。另外,乙醛可与肝细胞蛋白质发生共价结合,形成一种乙醛-蛋白质结合物,后者可作为一种新的抗原,引发肝细胞免疫毒性反应。大多数间接肝毒物都具有细胞毒性,但有的间接肝毒物如同化胆固醇、避孕药等并不直接损害肝细胞,但可选择性地干扰胆汁的排出,引起胆汁淤积。

表 16-1 肝毒物按毒作用机制分类

| 肝毒物类别     | 发生率 | 实验复制 | 剂量依赖性 | 组织学表现     | 毒物实例                             |
|-----------|-----|------|-------|-----------|----------------------------------|
| 体质依赖性肝毒物: |     |      |       |           |                                  |
| 过敏反应      | 低   | —    | —     | 胆汁淤积、细胞坏死 | 磺胺、氟烷                            |
| 代谢异常      | 低   | —    | —     | 胆汁淤积、细胞坏死 | 异烟碱、异丙嗪                          |
| 真性肝毒物:    |     |      |       |           |                                  |
| 直接肝毒物     | 高   | +    | +     | 细胞坏死、脂肪变性 | $\text{CCl}_4$ 、 $\text{CHCl}_3$ |
| 间接肝毒物     | 高   | +    | +     | 脂肪变性、细胞坏死 | 乙硫氨酸、乙醇                          |

另外还可根据肝毒物的化学性质分为无机肝毒物和有机肝毒物两类,前者有:砷、铬、镉、汞、铅、铍、锰、铜、铋以及四氯化碳等。后者有天然生物毒素如黄曲霉毒素、萆孢菌素、细菌内毒素与外毒素以及毒蕈毒素等和人工合成的医用有机药物与化学物如氯丙嗪、保泰松、氟烷、卤代烷类、硝基烷、酚、偶氮化合物等。

## 二、肝毒物接触方式

人在生产环境与日常生活环境中均可接触到肝毒物。其接触方式可根据肝毒物存在的特点可分为以下三种:

1. 食物性接触 有些肝毒物存在于食物中,通过摄食方式进入人体。常见于污染性食品如被黄曲霉毒素污染的食品或含自然生物毒素如毒蕈毒素的食品或食品本身如酒类的过量长期使用等。在食物性接触方式的肝损害中,乙醇性肝损害居于第一位。据推测,全世界约有1500万~2000万人酗酒,其中约有10%~20%的人发生不同程度的肝损害。

2. 药物性接触 由于过量和超期服用某些医用药物如四环素和异烟肼可引起肝损害,或由于机体本身存在特异体质如有些人服用磺胺可引起过敏性肝损害。临床上许多药物可引起肝损害(表16-2)。据有关资料报道,药物性肝损害占药物不良反应的10%~15%,居第三位。其中以急性药物性肝损害最为常见,如药物性肝炎、药物性脂肪肝、药物性胆汁淤滞症等。如未能及时发现或停用对肝有损害的药物,超期服用亦可造成慢性药物性肝损害。

表16-2 临床上常见的药物性肝毒物

| 药物种类  | 药物性肝毒物              |
|-------|---------------------|
| 麻醉药   | 氟烷、甲氧氟烷、氯仿          |
| 解热镇痛药 | 水杨酸盐、醋氨酚、非那西丁       |
| 抗菌药物  | 两性霉素B、四环素、磺胺药       |
| 抗结核药  | 利福平、异烟肼             |
| 神经精神药 | 可卡因、氯丙嗪、苯妥因、三环素抗抑郁药 |
| 抗肿瘤药  | 环磷酰胺、卡氮芥、巯嘌呤        |
| 中草药   | 黄药子、壮骨关节丸、雷公藤       |
| 其他    | 乙醇、降糖药、毒蕈等          |

3. 环境性接触 在生产环境或实验室工作如长期接触黄磷、四氯化碳、联苯胺、亚甲基双苯胺、吡啶、硝基芳族化合物、酚及其衍生物有害化学物等可导致肝损害。

### 第三节 肝对外源化学物的毒性反应与机制

肝对外源化学物的毒性反应依赖于化学物性质、受损细胞群种类、接触剂量与方式等。化学性肝损伤按其损伤发生的快慢可分为急性肝损伤与慢性肝损伤。急性肝损伤(acute liver injury)一般是短期接触较大剂量肝毒物或肝功能不全时接触某种肝毒物引起,病理改变常见于肝细胞坏死、脂肪变性、胆汁淤积等。慢性肝损伤(chronic liver injury)可因长期接触低剂量肝毒物引起,也可由一次急性坏死引起的后遗症,病理改变包括纤维化、硬变、癌变等。

1. 脂肪变性 正常肝脂质含量<肝重量的5%。肝细胞内脂肪的来源有三个方面:①从食物中摄取,食物中脂肪在小肠内分解成脂肪酸和甘油,被小肠粘膜上皮吸收,与蛋白结合,以乳糜微粒形式进入肝;②脂库动员,脂肪组织中甘油三酯在酯酶作用下,分解成游离脂肪酸入血,进入肝;③肝细胞自身合成。肝内脂肪去路有:①氧化供能;②与蛋白结合,合成脂蛋白运出肝;③与脂类、蛋白质结合,成为结构脂质,留在肝内。

肝受到某些化学毒物作用后,肝发生脂肪变性(steatosis),肝内脂肪含量增加,出现脂肪肝(fatty liver)。光镜下检查可发现含有过多脂肪的肝细胞,脂肪以脂滴的形式在细胞质中呈圆形空泡。根据脂肪空泡大小可将脂肪变性分为两类,一类是小泡性脂肪变性,在细胞质中充满微小脂滴,细胞核不受挤压;另一类是大泡性脂肪变性,细胞质中的脂滴较大,肝细胞核常被脂滴推向一侧。

化学毒物引起肝脂肪变性的机制有:①脂肪酸氧化减少,许多肝毒物如 $\text{CCl}_4$ 、乙醇、丙戊酸钠等可通过损害线粒体膜,使线粒体肿胀,导致脂肪酸 $\beta$ -氧化降低,在线粒体未被氧化的脂肪酸

可酯化为甘油三酯,并以脂质小滴形式堆积于细胞质中;有的化学物如乙硫氨酸则可竞争地与ATP发生共价结合,使ATP耗竭,影响甘油三酯氧化与分泌过程,使甘油三酯蓄积于肝;②甘油三酯合成增加,如异丙嗪、巴比妥类药物引起的脂肪变性等;③运脂蛋白合成减少,如四环素、甲氨蝶呤等能抑制运脂蛋白的合成,从而使甘油三酯从肝细胞排出减少,导致脂肪变性;④肝外游离脂肪酸入肝过多,如DDT、尼古丁、肼类等化学毒物可通过刺激垂体-肾上腺,导致脂肪组织释放游离脂肪酸过多地进入肝。脂肪变性是肝急性暴露化学毒物的一种常见毒性反应。脂肪变性病理学损伤具有多样化,有的化学毒物如丙戊酸、吡咯芬与抗病毒药 fialuridine 等可引起严重的脂肪变性,并可产生肝细胞坏死;有的化学毒物如乙硫氨酸(ethionine),嘌呤霉素(puromycin)和放线菌酮(cycloheximide)等生物毒素诱导的脂肪变性一般是可逆的,对肝细胞不产生致死性损害。

2. 肝细胞死亡 化学毒物引起肝细胞死亡有两种情况,一种是细胞坏死(necrosis),另一种是细胞凋亡(apoptosis)。细胞坏死是一种肝细胞的被动病死过程,可把它描述为“细胞他杀”,即直接由化学毒物或其他外来因素引起的细胞死亡。细胞形态学上主要表现为核与线粒体肿胀、染色质块状凝聚、胞浆出现空泡、细胞膜破裂,并伴有炎症反应。细胞凋亡亦称程序性细胞死亡(programmed cell death),是机体为了维持自身组织中细胞生成与细胞消亡的平衡,所出现的一种细胞基因指导下的主动自我消亡过程,即通过细胞自身基因控制,使生理上一些不需要的细胞如衰老的或受损的细胞能自动有序地清除,可描述为“细胞自杀”。主要表现细胞收缩、相邻细胞膜融合、染色质向核膜凝缩、内质网肿胀、凋亡小体形成,但没有炎症反应。据有关资料报道,细胞坏死的细胞DNA呈随机裂解,而细胞凋亡的细胞DNA呈180~200bp及其倍数降解。许多化学性肝毒物可加快或抑制细胞凋亡过程,例如,给小鼠腹腔注射镉,剂量为5~60 $\mu\text{mol/kg}$ 体重,肝细胞凋亡增加,并呈剂量-反应关系;而萘苯丁酸(nafenopin)可抑制大鼠肝细胞凋亡。细胞凋亡目前可通过凋亡小体的电镜观察、ELISA法、TUNET反应以及流式细胞分析技术等进行检测。而细胞坏死可通过测定坏死细胞所释放入血液的酶如丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)等来评价。细胞凋亡仅仅涉及分散的单个细胞,而细胞坏死影响的是肝小叶的大部分区域。现已证明不同化学毒物引起肝坏死(hepatic necrosis)的区域不同,多数化学毒物引起肝小叶中央区坏死,如 $\text{CCl}_4$ 、氟烷(halothane)等卤代烃。少数化学毒物可引起周边区坏死,如甲基丙烯酸(methacrylic acid)。有的化学毒物,如恩盖酮(ngaione),可引起中间区坏死。引起肝大片性坏死者,主要是某些医用药物。体质依赖性肝毒物一般引起多灶性弥漫性肝坏死。虽然肝坏死是一种严重的细胞毒性损伤,但由于肝的再生能力很强,其损伤并不具有致命性。

化学毒物引起肝细胞死亡的可能机制有:①肝细胞膜脂质过氧化,如 $\text{CCl}_4$ 等化学毒物在细胞色素P-450系统作用下,产生三氯甲烷自由基,后者可使细胞质膜或亚细胞结构膜脂质发生过氧化,引起膜通透性增加,最终导致细胞死亡;②毒物及其代谢产物与生物大分子发生结合,如 $\text{CCl}_4$ 体内产生的三氯甲烷自由基可与生物大分子如蛋白质和不饱和脂质发生共价结合,使生物大分子功能丧失,导致细胞死亡;③影响肝细胞呼吸链中酶蛋白的合成,由于肝线粒体DNA(mtDNA)编码电子传递链所需的酶蛋白,化学毒物如碱基类似药物 fialuridine 可插入mtDNA链中,使其错误编码呼吸链中酶蛋白,或终止其酶蛋白合成,导致肝细胞呼吸链中酶蛋白的合成发生障碍、肝细胞内呼吸停止、细胞死亡;④由于细胞膜脂质过氧化,钙稳态失调,引起肝细胞死亡;⑤通过消耗谷胱甘肽(GSH)损伤肝细胞,GSH是一种具有重要解毒功能的三肽物质,与化

学毒物或其代谢产物相结合,形成硫醚氨酸,经胆汁或尿液排出。GSH 还可参与消除游离自由基作用。化学毒物如  $\text{CCl}_4$  染毒,GSH 急剧耗竭,导致毒物中间代谢产物与生物大分子发生共价结合,引起肝细胞死亡。

3. 胆汁瘀积 胆汁瘀积(cholestasis)较脂肪肝和肝坏死少见,它常常是肝对化学毒物的一种急性毒性反应,其出现频率较脂肪肝与肝细胞坏死低,有时可伴有轻微的胆道炎症和肝细胞坏死。胆汁瘀积常常表现为胆汁形成减少,胆汁分泌与排泄受阻;胆汁中的正常成分特别是胆盐和胆红素在血清中含量增加。当胆红素在胆道中排泄发生障碍时,胆红素在皮肤和眼睛中沉积,产生黄疸。同时胆红素可从尿液中排出,使尿液呈黄色或深褐色。磺溴酞钠(bromsulphalein, BSP)可用于评价胆道排泄功能。胆汁瘀积常常出现超微结构的改变,如胆小管的肿胀、胆管与胆小管中胆栓(bile plugs)的形成等。当胆汁瘀积损害肝实质时,可伴有肝细胞肿胀、肝细胞死亡和炎症。引起胆汁瘀积的化学物质有医用药物如红霉素、氯丙嗪、1,1-二氯乙烯(1,1-Dichloroethylene)、雌激素(estrogens)等和天然生物毒素如鬼笔[毒]环肽(phalloidin)、环孢菌素 A(cyclosporin A)以及某些合成化学物如  $\alpha$ -萘基异硫氰酸盐等。

引起胆汁瘀积的作用机制可能有以下几方面:①损伤肝细胞膜的功能,如慢性给予雌激素,可使胆固醇乙酰辅酶 A 转乙酰酶活性升高,导致细胞质膜胆固醇酯的堆积,影响肝窦状隙膜的流动性与  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATP 酶活性,使胆汁流降低,胆小管分泌减少;②胆管壁上皮细胞通透性降低,如氯丙嗪的代谢产物可损害胆小管上皮细胞,使胆汁流降低,发生胆汁瘀积;③化学物在胆管内沉淀,胆栓形成,阻塞胆管,胆汁排泄障碍,胆汁瘀积。

4. 肝窦状隙损害 窦状隙是肝窦内皮细胞与肝细胞之间的狭小间隙,亦称 Disse 间隙,实际上是一种伴有许多小孔并具有高度通透性的特殊毛细管。窦状间隙的阻塞或扩张、肝窦内皮细胞壁的进行性损害可影响窦状隙功能的完整性。某些药物如同化类固醇类(anabolic steroids)、达那唑(danazol)、硫唑嘌呤等可以使肝窦扩张;有些植物毒素如双卞基异喹啉类生物碱(pyrrrolizidine alkaloid)以及某些化学物如氯乙烯、砷制剂等可对窦状隙上皮细胞壁产生进行性损害,导致窦状隙内皮间隙的屏障功能丧失,使血液充满肝窦间隙,出现紫癜性肝炎(peliosis hepatitis)。

5. 肝纤维化与肝硬化 肝硬化(cirrhosis)是慢性进行性肝损伤的最后阶段,常常具有致命性和不可逆性。它主要表现为广泛的纤维组织蓄积,特别是胶原纤维。纤维化可以发展到中央静脉、肝门束或 Disse 间隙中间,窦间隙纤维化使物质从窦状隙扩散受到限制。化学性肝毒物的反复作用可导致纤维瘢痕代替受损的肝细胞。由于纤维蛋白的沉着,纤维瘢痕的连接可破坏肝的系统结构。当肝被纤维瘢痕分隔成小结节时,纤维化已发展成为肝硬化,最后导致肝功能衰竭。肝硬化一旦发生是不可逆的,严重影响生存。它常常是反复接触毒物所引起,例如,Geubel 等人报道(1991)每天给予病人高剂量维生素 A(100,000IU/d),连续 7 年,可发生肝硬变。又如经常饮酒者,肝硬化的危险性显著高于非饮酒者。

肝纤维化的可能机制有:①肝细胞死后,细胞被分解、吸收,成纤维细胞增生,合成胶原增多,胶原沉积形成纤维化;②肝细胞受损后,激活 Ito 细胞,细胞内脂滴减少甚至消失,内质网增多增大,胞内微丝增多,并产生原纤维,在细胞膜下出现平滑肌丝,Ito 细胞变成肌成纤维细胞(myofibroblast),最后成为成纤维细胞,胶原合成增多。在慢性乙醇中毒性肝硬变、四氯化碳中毒肝硬变的实验动物肝内,Ito 细胞 DNA 复制及增殖功能增强,细胞数量增多,肝内纤维增生。所以有人认为 Ito 细胞是一种特殊状态的成纤维细胞,能使肝发生纤维增生性病变。引起肝纤维

化与肝硬变的化学毒物很多,其中有些已得到流行病学调查证明(表 16-3)。

表 16-3 能引起肝纤维化与肝硬变的化学毒物

| 接触方式  | 常见化学毒物                                                          |
|-------|-----------------------------------------------------------------|
| 食物性接触 | 黄曲霉毒素、多氯联苯、乙醇、红色青霉毒素等                                           |
| 药物性接触 | 甲氨蝶呤、辛可芬、 $\alpha$ -甲基多巴、异烟碱、硝基咪喃<br>苯妥因、硫唑嘌呤、维生素 A、L-巯基嘌呤、砷制剂等 |
| 职业性接触 | DDT、氯仿、二氯化乙烯、三硝基甲苯、氯乙烯、四氯<br>乙烷、四氯化碳、溴苯等                        |

6. 肝癌变 化学性物质诱导的肿瘤包括由肝细胞、胆管上皮细胞的肿瘤或罕见的高度恶性的窦状隙细胞血管肉瘤等。肝细胞肿瘤与摄入雄性激素药物以及食品中黄曲霉毒素污染有密切关系。慢性肝炎可增加黄曲霉毒素的致癌性,流行病学前瞻性调查表明,慢性乙型肝炎患者接触黄曲霉毒素发生肝细胞癌的危险性要比无慢性乙型肝炎者高 3 倍。血管肉瘤与职业性暴露氯乙烯与砷有关。另外,二氧化钍(thorotrast)能引起多种肝肿瘤,二氧化钍曾被用作放射性造影剂,进入体内后可蓄积于枯否细胞,生物半衰期较长。在 1920~1950 年期间曾有 2,500 万余人使用过该造影剂。Andersson 等入(1992)调查发现二氧化钍接触者引起胆道和胆囊癌症、肝癌的危险性分别为无接触二氧化钍人群的 14 倍、100 倍以上。另外乙硫氨酸、四氯化碳也可诱发肝恶性肿瘤。

## 第四节 化学性肝损伤的检测与评价

肝是化学毒物在体内进行生物转化的重要器官。许多化学毒物及其代谢产物容易对肝产生毒作用,导致肝生理生化功能紊乱与组织病理学改变。

在检测化学毒物诱发肝损害时,采用科学的实验设计和敏感的检测方法,不但能够评价化学毒物导致肝损害的程度,而且还能评价肝损害的性质。评价化学毒物引起肝损害的方法有两大类,一类是体内试验(in vivo tests)即整体动物实验,另一类是体外试验(in vitro tests)。体内试验方法是给肝毒物给予受试动物,然后处死动物或在动物存活的情况下进行各种生物检测,如动物染毒后的血清酶学分析、肝排泄与分泌功能测定、肝化学组成分析以及肝损害的组织病理学检查等。体外试验是指采用某种实验技术从动物机体分离出肝、肝细胞或肝细胞的亚细胞结构,让其在体外与肝毒物接触一定时间,然后进行各种检测,如动物的离体肝灌注试验、肝细胞原代培养与肝细胞毒性试验、肝匀浆毒物代谢试验等。

### 一、肝损伤的体内试验评价

肝损伤的体内试验评价(evaluation of hepatic injury in vivo)采用整体动物试验。在肝毒理学实验中,不论是急性或慢性动物实验或化学性肝损伤动物模型试验,最常用的受试动物为大鼠和小鼠,其次为仓鼠、豚鼠、兔、狗等。但选择动物时,要考虑所选动物对受试肝毒物的敏感性,如豚鼠对

氯二丁烯肝毒性的敏感性高于大鼠。敏感动物种类可通过查阅文献或预试验确定。动物染毒应尽量选择与人接触化学毒物相同的途径。由于吸入染毒相对麻烦,常用腹腔注射与经口途径染毒等。整体动物试验由于能较为全面反映化学毒物对人体的毒作用,并能长期动态观察生物机体对毒物的反应,故可用于肝毒物的危险度评价。实验性肝损伤的体内试验检测方法有几类:

1. 血清酶学检测 20世纪30~40年代期间,在发现血清碱性磷酸酶和胆碱酯酶活性的正常水平后,血清酶学方法被引入肝损伤检测。20世纪50年代发现组织损伤时,血清转氨酶活性增加。后来证实,肝损伤时血清中许多酶的活性异常。其基本的原理在于肝损伤时,肝酶(hepatic enzymes)释放到血液中。因此,检测血液肝酶的活性是目前肝毒性研究中最有用的工具之一。根据血清酶对不同类型肝损伤的特殊性与敏感性,可将血清酶分为四组(表16-4):第一组酶在血清中活性增高能较好地反映胆汁瘀积型肝损伤,如碱性磷酸酶(ALP)、5'-核苷酸酶(5'-NT)与 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶( $\gamma$ -GT)。第二组酶能敏感地反映细胞毒性肝损伤,根据酶在其他部位的存在,它可被进一步分为三类:A类为肝内外组织细胞中均可存在,如天冬氨酸氨基转移酶(AST)亦称谷草转氨酶(GOT)、乳酸脱氢酶(LDH)、苹果酸脱氢酶(MDH);B类主要存在于肝,如丙氨酸氨基转移酶(ALT)亦称谷丙转氨酶(GPT)、谷氨酸脱氢酶(GDH);C类几乎只存在于肝内,如鸟氨酸氨基甲酰转移酶(OCT)、山梨醇脱氢酶(SDH)。后者在研究未知肝毒性化学毒物时更具有特别的意义。血清GPT、GOT两种氨基转移酶也可反映肝外器官如心脏、肌肉或肾脏等组织损伤,而OCT、SDH在血清中的活性增加较能可靠地反映肝损伤。第三组酶对肝损伤相对不敏感,而对肝外器官组织细胞损伤敏感,如肌酐磷酸激酶(CPK)。第四组酶与前三种酶相反,肝细胞损伤时酶活性降低,如胆碱酯酶(ChE)。

表 16-4 实验性肝损伤血清酶活性变化

| 酶类组别 | 血清酶                      | 胆汁瘀积肝损伤 | 细胞毒性肝损伤 | 肝外器官损伤 |
|------|--------------------------|---------|---------|--------|
| I    | ALP, 5'-NT, $\gamma$ -GT | +++     | +       | ±      |
| II-A | GOT, LDH, MDH            | +       | +++     | ++     |
| II-B | GPT, GDH                 | +       | +++     | +      |
| II-C | OCT, SDH                 | +       | +++     | ±      |
| III  | CPK                      | 正常      | 正常      | +      |
| IV   | ChE                      | 正常      | 下降      | ±      |

谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)由于其检测方法较为简便和敏感,至今仍是应用最广的肝损害检测指标。值得注意的是:①不同种系动物肝中酶活性可存在明显差异。如四氯化碳染毒,血清GOT活性几乎在所有哺乳动物中增加,血清GPT活性仅在大鼠中明显增加,在其他物种动物中含量甚少;②不同类型肝损伤酶活性敏感性不同。如GPT是一种肝细胞质酶,实验性肝细胞坏死时其酶活性增加,但肝脂肪变性时不敏感;③用血清转氨酶活性指标来评价某种未知毒物对肝损害时,需同时测定OCT、SDH等具有肝特异性的酶活性,以排除由于肝外脏器官组织受损引起的血清转氨酶增高的可能性;④用血清酶评价肝损害时存在局限性,有时酶活性增高是由于细胞膜通透性改变,并非细胞坏死引起,例如某些化学毒物引起缺氧时,也伴有血清酶含量增高,此时易误认为是毒物对肝细胞的化学性损害。相反,某些肝毒物引起的损害,不一定伴有血清酶活性改变,如乙硫氨酸、磷等。因此,用血清酶学指标评价化学毒物的肝毒性时,应



同时进行组织学检查,才能得出肯定的结论。另外,尽管血清酶活性改变并不等于肝病理损害,但有人报道,氯仿、对乙酰氨基酚(acetaminophen)引起的肝细胞坏死的严重程度(以受损肝细胞百分率表示)与AST活性增高呈显著的正相关性。

鸟氨酸氨基甲酰转移酶(OCT)主要存在于肝细胞线粒体中,是肝素合成中重要的催化酶之一,正常情况下血清及其他组织含量较少。人体患有急慢性肝疾病时,血清中OCT水平显著增高。实验性诱导的肝损伤,动物血清OCT活性增加要比血清转氨酶显著。国外资料报道,用四氯化碳、溴化二氨甲苯菲啶、萘孢菌素使牛、羊发生中毒时,血清OCT活性和GDH、AST一样是肝损伤的敏感指标,但用铀酰硝酸盐(uranyl nitrate)处理上述动物,血清OCT活性在正常水平。若选用大鼠做实验,无论为何种受试肝毒物,血清OCT是一个有用的肝损伤检测指标,CCl<sub>4</sub>处理大鼠时,血清OCT活性与受试物呈明显的剂量-反应关系,并且在光学显微镜检查无明显肝损伤的剂量水平,血清OCT活性比正常水平高6倍。

山梨醇脱氢酶(SDH)是一种细胞质酶,对肝损伤具有专一性,其血清酶活性的增加是评价肝细胞损伤较为敏感的指标之一。国外有人研究了CCl<sub>4</sub>中毒大鼠的血清中9种酶即山梨醇脱氢酶(SDH)、异柠檬酸脱氢酶(ICDH)、果糖-1,6-醛缩酶(F-1,6-ALD)、谷丙转氨酶(GPT)、谷草转氨酶(GOT)、乙醇脱氢酶(ADH)、6-磷酸二葡萄糖苷酶(6-PDG)、乳酸脱氢酶(LDH)、苹果酸脱氢酶(MDH)的活性,发现SDH最为敏感。

碱性磷酸酶(ALP)主要存于肾皮质、小肠粘膜、骨与胎盘中,肝中含量相对较低。在肝,ALP分布是不均匀的,在肝小叶的周边区相对较高,其次为中间区与中央区。在肝细胞内主要定位于核仁和高尔基复合体,细胞膜表面也有。ALP在胆小管上皮细胞含量较为丰富,所以它是胆管疾患的良好指标。能使血清ALP活性升高的肝胆疾患:胆管阻塞(胆汁瘀积)、胆小管肝炎、原发性胆汁性肝硬化与浸润性肝疾患。在毒理实验时,苯巴比妥、狄氏剂、糖皮质激素、二苯基乙内酰胺与氯乙烯可使动物的血清ALP活性升高。必要时可进行ALP同工酶测定,共有6种:ALP<sub>1</sub>、ALP<sub>2</sub>来自于不同肝疾病,ALP<sub>3</sub>、ALP<sub>4</sub>、ALP<sub>5</sub>、ALP<sub>6</sub>分别来自于骨骼、胎盘、小肠与结肠等。

乳酸脱氢酶同工酶(LDH)是一组催化相同反应的细胞质酶。目前发现有5种同工酶即LDH<sub>1</sub>、LDH<sub>2</sub>、LDH<sub>3</sub>、LDH<sub>4</sub>、LDH<sub>5</sub>。它们广泛存在于哺乳动物的各种器官组织中,血清LDH活性及其同工酶种类可用于检测化学毒物毒作用的靶器官。有人用大鼠做实验,发现肝或肾脏损害引起的血清LDH同工酶活性变化明显不同。肝损害时血清LDH<sub>5</sub>活性明显增加,而肾脏损害时血清LDH<sub>1</sub>和LDH<sub>2</sub>明显增加。例如CCl<sub>4</sub>、二乙醇胺、硫代乙酰胺中毒的大鼠,肝损害严重,血清LDH<sub>5</sub>活性明显增加;而肾脏毒物氯化汞染毒,血清LDH<sub>1</sub>和LDH<sub>2</sub>明显增加。

2. 肝排泄功能检测 进入体循环的化学物质可经肝以原形或者在肝细胞内转化后排泄。根据胆汁/血浆浓度比可将随胆汁分泌的化合物分为A、B、C三类。A类物质包括钠、钾、氯离子以及葡萄糖,这些物质的胆汁/血浆浓度比约为1。B类物质包括胆汁盐、胆红素、溴磺酞钠(bromsulphalein, BSP)和许多外源化学物,其胆汁/血浆浓度比大于1,通常在10~1000之间。C类物质是一些大分子物质,如菊粉、磷脂、粘蛋白和清蛋白,其胆汁/血浆浓度比小于1。胆汁/血浆浓度比越大的物质越易通过胆汁分泌和排泄。B类物质对于定量检测肝损伤具有特殊价值。B类物质随胆汁分泌的过程涉及多个转运系统即有机酸转运系统如胆红素和BSP的分泌、有机碱转运系统如乙基溴化普鲁卡因酰胺(PAEB)、中性有机分子转运系统如哇巴因。除此以外还有

一种与分泌金属如铅有关的转运系统。最常用于检测肝损伤的方法有血清磺溴酞钠(BSP)排泄试验和靛青绿(indocyanine green, ICG)试验。肝功能衰竭时 BSP 和 ICG 从血中消失时间延长, 通过测定血浆 BSP 的清除率可评价肝功能损伤的程度。

BSP 属于胆汁分泌的 B 类物质, 这种阴离子酞染料已广泛用于评价人和实验动物的肝功能。静脉注射后, BSP 出现于血液中, 它从体循环的消失速率取决于肝的摄取。BSP 从血浆中的清除具有饱和性, 因此选择 BSP 的适宜剂量是非常重要的。通常小剂量可在体内快速消除, 在一定剂量范围内清除量随剂量增加而增加, 但 BSP 达到最大转运极限时, 清除量不再增加即呈转运饱和。如离体大鼠肝灌注试验发现, 分别给予 5, 10, 20mg BSP, 其肝消除呈相同的指数速率清除; 当 BSP 给予量大于 30~40mg 时, 清除量达到饱和。不同动物对 BSP 的清除率有很大差别。有实验资料表明, 大鼠、兔的 BSP 清除率约为  $1\text{mg}/(\text{min} \cdot \text{kg})$  体重, 而狗约为  $0.2\text{mg}/(\text{min} \cdot \text{kg})$  体重。用于检测肝功能的 BSP 排泄试验, 其 BSP 选用剂量应因实验动物而异。剂量应适当超过 BSP 清除极限量。一般兔、狗、大鼠的 BSP 剂量分别为  $75\text{mg}/\text{kg}$ 、 $15\text{mg}/\text{kg}$ 、 $50\text{mg}/\text{kg}$  体重。小鼠则因品系各异, 一般介于  $75\sim 100\text{mg}/\text{kg}$  体重。适宜的 BSP 剂量一般应为正常动物 30min 残留 2%~3% 量为宜。BSP 排泄试验是肝功能中较为敏感的指标, 它反映胆汁淤积性肝损伤比反映实质细胞性肝损伤更为敏感。但值得注意的是某些外来因素可干扰 BSP 的分泌与排泄, 如肝微粒体酶诱导剂苯巴比妥能大大加快 BSP 的排泄。

靛青绿(ICG)在敏感性和特异性方面大致与 BSP 相似。它有以下特性: ①ICG 进入血液后很快并完全与血浆蛋白(主要是清蛋白)结合; ②大约 97% 给予量在胆汁中以原形存在; ③不从尿液中排泄; ④其分泌排泄不受肝外因素影响; ⑤无刺激与过敏作用; ⑥血浆中清除率与 BSP 相似。ICG 排泄试验通常作 BSP 排泄试验的补充试验。用狗做试验, ICG 血浆清除量随时间变化通常在 30~60min 时间内呈指数曲线, 每分钟清除量与给予量呈负相关, ICG 分泌到胆汁的最大速率约为  $0.4\text{mg}/(\text{min} \cdot \text{kg})$  体重, 胆红素、玫瑰红、BSP 能干扰 ICG 的分泌。不同实验动物 ICG 的生物半衰期( $T_{1/2}$ )与每分钟清除量(%)不同(表 16-5)。

### 3. 肝化学组成成分改变的检测 检

测肝化学组成成分的改变可以定量地评价肝损伤的程度, 并可有利于阐明化学毒物产生肝损伤的机制。最常用于评价肝损伤的肝化学组成成分有: ①甘油三酯(triglyceride, TG); 产生肝损伤的化学物质也可引起肝实质细胞内脂肪(主要是 TG)的异常蓄积, 一般认为 TG 的蓄积是由于肝实质细胞 TG 的合成速率增加或 TG 释放到体循环的速率减低引起。来自于体循环的非酯化脂肪酸(NEFAs)在肝中有两条主要的出路: 其一是在线粒体进行  $\beta$ -氧化产生能量; 其二是合成

表 16-5 不同动物 ICG 血浆清除率

| ICG 剂量(mg/kg) | $T_{1/2}$ (min) | 每分钟清除量(%) |
|---------------|-----------------|-----------|
| 大鼠:           |                 |           |
| 4             | 2.5             | 28        |
| 8             | 4.0             | 17        |
| 16            | 6.5             | 11        |
| 32            | 8.5             | 8         |
| 64            | 18.0            | 4         |
| 兔:            |                 |           |
| 8             | 1.5             | 46        |
| 16            | 3.5             | 20        |
| 32            | 7.0             | 10        |
| 狗:            |                 |           |
| 1             | 7.0             | 10        |
| 2             | 17.0            | 4         |
| 4             | 30.0            | 2         |

摘自 A. Wallace Hayes. Principles and Methods of Toxicology, 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Taylor & Francis, 2001; p1157

脂质特别是 TG、磷脂、胆固醇酯以及糖脂等。合成的脂质用于构建肝细胞膜或从肝再分泌到血液中。而许多肝毒物如  $\text{CCl}_4$ 、乙硫氨酸、磷、嘌呤霉素、四环素等在大鼠体内可通过阻碍肝 TG 分泌到血液中,导致脂肪肝形成。另外,极低密度脂蛋白(VLDL)是转运内源性 TG 的主要载体,有些肝毒物如  $\text{CCl}_4$ 、乙硫氨酸可使 VLDL 合成减低,从而使 TG 从肝运出发生障碍,导致 TG 在肝中蓄积。由于目前所知的血清酶与肝酶对肝脂肪变性不敏感,因而肝 TG 含量的测定已成为评价肝脂肪变性的常规指标。②葡萄糖 6 磷酸酶(glucose-6-phosphatase, G-6-P):G-6-P 是肝的特异性酶,其活性与肝细胞内质网的完整性有关。有的肝毒物如  $\text{CCl}_4$  可使内质网脂质发生过氧化,导致 G-6-P 活性明显降低。③肝胶原(hepatic collagen, HC):肝胶原蓄积是纤维化的基础,隔膜纤维化是实验性肝硬化的主要特征。许多肝毒物如  $\text{CCl}_4$  和乙醇可诱导肝纤维化与肝硬化。有人报道,每周给受试大鼠  $\text{CCl}_4$  染毒 2 次,持续 7~12 周,肝硬化便可形成。Ito 细胞在肝胶原形成中起重要作用。从纤维化肝中分离出来的 Ito 细胞的 I、III 和 IV 型前胶原的 mRNA 水平显著高于正常细胞。4-羟基-L-脯氨酸(简称羟脯氨酸)仅在胶原中有高的含量,所以肝羟脯氨酸含量是评价肝组织纤维化的一个标志物。肝羟脯氨酸含量与肝纤维化程度早明显剂量-效应关系。有人用灌饲法给大鼠反复染毒  $\text{CCl}_4$  以观察其对肝羟脯氨酸含量的影响,发现染毒时间越长肝胶原含量越高(图 16-1)。

④脂质过氧化产物:有些肝毒物如  $\text{CCl}_4$  可使肝细胞膜或细胞器膜发生脂质过氧化。可通过检测肝脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量来评价化学毒物对肝的氧化损伤程度。⑤肝毒物及其代谢产物与肝细胞生物大分子共价结合:虽然脂质过氧化在化学毒物造成肝损伤方面起重要作用,但不能解释肝损伤的全部毒作用机制。许多药物与化学物如对乙酰氨基酚、呋喃苯氨酸、1,1-二氯乙烯、三氯乙烯、溴苯、二甲基亚硝酸胺等产生肝损伤时并不显示脂质过氧化。这些肝毒物在肝微粒体混合功能氧化酶(microsomal mixed function oxidase, MFO)的作用下转变为具有高度反应性的亲电子代谢产物,后者与肝细胞生物大分子如 DNA、RNA、蛋白质、脂质发生共价结合,诱发肝细胞损伤,甚至可使肝细胞恶变,导致肝肿瘤。目前检测 DNA 加合物的方法很多,如 $^{32}\text{P}$ -后标记法、免疫学方法、荧光测定法、碱洗脱法等。肝细胞 DNA 加合物的检测对评价某些化学毒物引起的肝损伤具有重要意义。

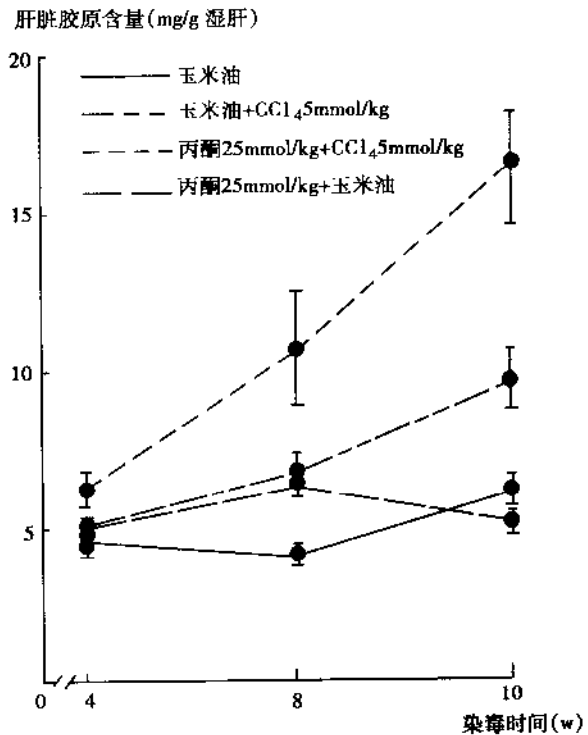


图 16-1 四氯化碳与丙酮诱导肝胶原的时间-效应关系

(引自《principles and methods of toxicology》。  
A. Wallace Hayes, Philadelphia, 2001)

4. 肝组织病理学检查 在肝毒理学的整体动物实验研究中,肝的组织病理学检查是评价化学毒物造成肝损伤的重要手段之一。常用的检查方法有:

(1)一般检查:整体动物实验结束,解剖受试动物,肉眼观察肝颜色和外观,可发现脂肪肝与肝硬化等改变。肝的脏器系数是一个较为敏感的观察指标,如 DA 1627 这种化学物,当用  $250\mu\text{g}/(\text{kg}\cdot\text{d})$  染毒时,肝的脏器系数都明显增加,但未见任何明显组织学改变。直至  $1000\text{mg}/\text{kg}$  时,才发现脂肪变性。

(2)光镜检查:光镜检查是确定肝损害的传统方法,通过光镜可发现肝细胞坏死、肿胀、脂肪空泡、细胞癌变以及肝组织纤维化、结节性增生等许多种病理学改变。因此,光镜观察仍是化学性肝损害最重要的检测手段之一。有时光镜检查是较为敏感的检测方法,如有人报道  $\text{CCl}_4$ 、 $\text{HgCl}_2$  等化学毒物引起肝组织病理学改变的剂量低于引起血清酶活性改变的剂量。

(3)电镜检查:电镜检查能提供肝细胞早期损伤的形态学改变依据,鉴别光镜下所难于发现的各种亚细胞结构的精细变化,结合生化检查结果,能为研究化学性肝损伤机制提供依据。在化学毒物引起的各种亚细胞结构改变中,以内质网出现的改变最早。粗面内质网损害则表现为核糖体脱落。线粒体受损时可表现肿胀,外膜相对扩张,内外膜空隙增大,嵴缩短甚至消失。其他的亚细胞结构改变还有溶酶体膜受损,细胞核致密与固缩,高尔基氏体断裂及空泡化,肝糖原颗粒解聚、减少及消失,过氧化小体增加等。

## 二、肝损伤的体外试验评价

肝损伤的体外试验评价(evaluation of hepatic injury in vitro)是在没有肝外因素影响下来评价化学毒物引起肝损伤,用于肝毒性筛选和机制研究。体外试验包括离体灌流肝试验、肝细胞毒性试验、原代肝细胞培养试验、肝匀浆试验以及肝切片孵育等。这类试验突出的缺点是没有考虑生物机体对毒物的整体反应性,因而体外试验结果外推到人存在较大距离。

1. 离体灌流肝实验 离体灌流肝(isolated perfused liver, IPL)实验是介于整体动物试验与肝切片孵育试验之间的体外试验,能广泛用于各种肝毒物的体外研究。它是运用体外肝灌流技术,在保持肝组织结构完整的条件下,研究毒物对肝生物合成功能、物质代谢、转运与排泄等过程的影响。也可用来研究某些药物对肝的损害作用,如用体外肝灌流方法证明红霉素等化学毒物干扰胆汁排泄和 BSP 廓清。离体灌流肝实验的优点是可保持肝的完整性,化学毒物随灌流液进入肝细胞的途径接近生理状态。缺点是结果的重现性差;同时由于离体灌流肝实验是在动物手术情况下进行的,因此仅局限于化学毒物对肝的急性损害研究。

2. 肝匀浆试验 肝匀浆用于毒物代谢、蛋白合成能力及脂质过氧化作用等研究。缺点在于失去了正常存在的细胞内各细胞器之间的生理调节。制作肝匀浆的匀浆器一般采用玻璃或聚四氟乙烯制成,匀浆棒与匀浆管管壁之间的间隙为  $0.25\sim 0.50\text{mm}$ ,匀浆速度为  $1000\sim 2000\text{rpm}$  之间。试验介质液与试验条件根据试验目的而定。

3. 肝薄片孵育试验 近几年来大鼠肝薄片(precision-cut liver slice)孵育技术得到改进后被用于检测肝损害,特别是被用来观察毒物对肝细胞膜的损伤和对脂质分泌功能的抑制作用。但由于物质通过介质转移到细胞内必须依赖于被动扩散,其扩散速率与物质迁移距离的平方成反比,因此肝薄片要薄,否则会影响实验结果。

4. 原代肝细胞培养试验 将新鲜分离的肝细胞放入适当的培养基中培养,可用于检测化学毒物对肝细胞的毒性试验研究。原代肝细胞在毒理学试验中有两个主要用途:其一是它可作为外加的代谢系统即与 S9 一样,与代谢缺乏的靶细胞进行复合培养时,能帮助检测化学毒物是否具有代谢活化作用。其二是它直接作为毒作用靶细胞,检测化学毒物对肝细胞的各种损害作用如遗传毒作用等。有资料表明,新鲜分离的肝细胞培养 1~2 天后,转化外来化合物的酶活性开始降低,因此肝细胞毒性试验一般应在培养 2 天内完成。若在含激素的无血清培养基中,肝细胞的生物转化酶活性可在几天内维持较高水平。值得提出的是,试验中许多因素如培养基成分组成、氧气含量、细胞密度以及复合培养的靶细胞类型等均可影响肝细胞的生存能力,最终影响试验结果。

(钟才高)

## 第一节 概 述

肾脏毒理学(toxicology of the kidney)是靶器官毒理学的一个重要研究领域,是利用毒理学的基本方法和技术,研究外源化学物对肾的损害作用特点及其机制的学科。

### 一、肾是毒物的重要靶器官

肾的结构和功能都极为复杂,它的正常运转是保证机体内稳态的重要条件,肾在排泄废物、调节细胞外液容量、电解质和酸碱平衡上起了很重要的作用,也参与一些激素的合成和释放,如肾素和红细胞生成素,以及维生素D的活化。毒物不但直接影响肾功能,同时也间接影响全身生理功能。肾有较强的代偿功能和多种解毒功能。所以,从毒理学角度上,肾是毒物重要的靶器官之一。

### 二、引起肾毒性的化学物

引起肾毒性的化学物很多,主要有以下几类。

1. 金属和类金属 镉、铋、锂、汞、铊、金、镓、铟、铅、镍、铬、铈、硅、砷及砷化氢等。
2. 有机溶剂 卤代烃类(溴二氯甲烷、四氯化碳、氯仿、二溴氯丙烷、1,2-二溴乙烷、1,2-二氯乙烷、环氯丁二烯、戊氯乙烷、三氯乙烯、四氯乙烯、四氟乙烯等)、芳香烃类(甲苯、二甲苯、三甲苯、乙苯、联苯等)、脂肪烃类(汽油、煤油、柴油等)、脂环烃类(润滑油、松节油、环己烷等)
3. 农药 五氯苯酚、百草枯、敌草快、氯丹、甲醚菊酯、氟乙酰胺等。
4. 生物毒物 黄曲霉素B、洁霉素、细菌内毒素、蛇毒等。
5. 药物 庆大霉素、万古霉素、头孢菌素、甘露醇、丝裂霉素、非那西丁等。
6. 其他毒物 苯酚、乙烯二乙二醇、二乙烯乙二醇、乙醛、环氧丙烷、腈化物、亚硝酸胺等。

### 三、肾对毒物的易感性

肾的解剖和生理特性决定了它对毒物的易感性。虽然两肾重量还不到体重的1%,但为了维持肾的功能,需要大量的氧和营养物质,20%~25%的心脏静息每搏输出量进入肾,1/3的血浆经肾滤过。由此肾尤其是肾小管对能造成细胞窒息的因素特别敏感,如血压降低(休克)、血容量下降(大出血)。皮质接受了肾总血流量的94%,大量的化学物可随血流到达肾皮质。化学物重吸收后在肾小管中被浓缩,使某些在血浆里无毒的化学物在肾小管内达到有毒的浓度水平;肾小球滤过的毒物在肾小管内不断的浓缩,使一些相对不可溶的化学物在肾小管的管腔内沉积而引起阻塞,进而产生急性肾衰竭;加之许多有机物能在皮质中活化转运。髓质与皮质相比,经髓质的血流量低得多,到达髓质的化学物与代谢物也相对少。但是髓质中的逆流机制能使化学物在髓质中浓缩,肾乳头中化学物浓度可高出血浆中化学物浓度几倍。化学物在肾中浓缩后可直接或经代谢作用于肾细胞。直接作用可干扰重要代谢过程如抑制线粒体功能或抑制能量代谢酶的功能。在肾中化学物(或是在其他脏器中代谢的代谢产物)可转化成活性基团,与蛋白质发生共价结合或启动脂质过氧化,造成细胞损伤。肾中外源性化学物代谢酶(如P-450,谷胱甘肽转硫酶)比肝脏中少。但是肾细胞的异源性,使酶在肾不同节段中有很大差异,所以往往在一些节段中肾酶的作用有较强的活性。另外化学物通过不同节段时,可以进行不同的代谢过程。所以肾的损伤部位既代表了化学物蓄积的部位,也代表了这些活化化学物的酶的定位。

## 第二节 肾结构与功能的生物学基础

肾是实质器官。外层为皮质,内层为髓质。髓质由肾锥体组成,开口于肾小盏,肾小盏合成肾盂,肾盂向下逐渐缩小续于输尿管。肾单位(nephron)是肾结构和功能的基本单位,它与集合管共同完成泌尿功能。每个肾单位由肾小体和肾小管组成。肾的血液供应十分丰富。肾基本生理功能包括排泄废物、调节体液及酸碱平衡、分泌激素。其结果是维持机体的内环境稳定,保证新陈代谢正常进行。

### 一、肾小球的滤过功能

肾小球的滤过功能

肾小球(毛细血管球)和肾小囊组成肾小体,构成肾单位的一部分。肾小球的滤过是形成尿液的第一个环节。当血液流过肾小球毛细血管网时,血浆中的水和小分子溶质,包括少量的分子量较小的血浆蛋白,通过滤膜滤到肾小囊的囊腔内,形成滤液(原尿)。除了不含血细胞和血浆蛋白质外,其余成分和血浆中相同。滤过膜的超微结构由三层组成:①内层为毛细血管的内皮细胞层,可见大量的圆形孔,对血浆蛋白几乎不起屏障作用;②中间为非细胞性的基膜层,是由微纤维织成的网状结构,水及部分溶质可以通过,但限制大分子的血浆蛋白质滤出,是滤过膜中主要的屏障;③外层是肾小囊皮细胞,由突起的足细胞构成,足突间有裂隙,称为裂孔,裂孔上有一薄层裂孔膜,是滤过膜的最后一道屏障。滤过膜的屏障作用由两部分组成:①机械性屏障:

分子直径小于2nm(一般分子量小于70,000)的物质可自由通过肾小球滤过膜,随着分子直径的增大,通过滤过膜的能力减小,机械屏障的大小与滤过膜上的孔径大小以及构型有关;②电荷屏障:正常情况下,血浆清蛋白不能通过肾小球滤过膜,而与清蛋白分子直径相同的中性右旋糖酐则易通过。在某些病理状态下,滤过膜上的负电荷消失,使大量清蛋白经滤过膜滤出,形成蛋白尿。

有效滤过压(effective filtration pressure)由3种力组成,根据3种力作用方向的不同,可列出下式:

肾小球有效滤过压 = 肾小球毛细血管血压 - (血浆胶体渗透压 + 囊内压)

肾小球的滤过量大小可用肾小球滤过率(glomerular filtration rate, GFR)表示,单位时间内两肾生成的滤液量称为肾小球滤过率。肾小球滤过功能在肾的排泄功能中占有重要位置,肾小球滤过率是衡量肾功能的重要指标。若一物质能全部经肾小球滤过,肾小管对其不吸收、不排泄,则其清除率可反映肾小球的滤过率,如菊粉、肌酐等。

决定肾小球滤过作用的因素主要有三方面:滤过膜通透性是滤过的结构基础;有效滤过压是滤过的动力;肾血浆流量(renal plasma flow, RPF)是滤过的物质基础。

## 二、肾吸收和分泌

肾小球滤过液约99%被肾小管和集合管重吸收,只有约1%被排出体外。不仅如此,滤过液中的葡萄糖可全部被肾小管重吸收回血;钠、尿素等被不同程度地重吸收,肌酐、尿酸和K<sup>+</sup>等还被肾小管分泌入管腔中。

人的两个肾每天生成的肾小球滤过液达180L,而终尿仅为1.5L左右。这表明滤过液中约99%被肾小管和集合管重吸收,只有约1%被排出体外。不仅如此,滤过液中的葡萄糖可全部被肾小管重吸收回血;钠、尿素等被不同程度地重吸收,肌酐、尿酸和K<sup>+</sup>等还被肾小管分泌入管腔中。

肾小管和集合管的转运包括重吸收和分泌。重吸收是指物质从肾小管液中转运至血液中,而分泌是指上皮细胞将本身产生的物质或血液中的物质转运至肾小管腔内。肾小球滤过液进入肾小管后称为小管液。

物质通过细胞的转运包括被动转运和主动转运。被动转运是指溶质顺电化学梯度通过肾小管上皮细胞的过程。水的渗透压之差是水的运动力。水从渗透压低一侧通过细胞膜进入渗透压高一侧。主动转运是指溶质逆电化学梯度通过肾小管上皮细胞的过程。主动转运需要消耗能量,根据主动转运过程中能量来源的不同,分为原发性主动转运和继发性主动转运。

血浆中所含某一物质小部分经肾小球滤过,不被肾小管重吸收,而且血中剩余部分又可全部由肾小管分泌,使这一物质通过肾后几乎全部排出,那么它的清除率既代表肾血浆流量(RPF),又可反映肾小管的分泌功能,如对氨基马尿酸、碘锐特、酚红和青霉素等。某物质经肾小球滤过后,完全被肾小管重吸收,其清除值等于0,例如葡萄糖。在血浆浓度接近肾糖阈时,利用清除值公式,可计算出滤液中被重吸收的葡萄糖量即肾小管葡萄糖最大重吸收量(TMG),用以反映近端肾小管的重吸收功能。

肾清除率(renal clearance, RC)是肾在单位时间内(每分钟)将多少毫升血浆中的某物质清除出去。以公式表示如下:

$$C = UV/P$$

C—清除率(ml/min); V—每分钟尿量(ml/min); U—尿中测定物质的浓度(mmol/L); P—血



中测定物质的浓度 (mmol/L)。

### 三、逆流放大系统和尿液浓缩机制

肾小球滤过液中只有不到 1% 成为尿液 (除非在多尿情况下), 余下的都被重吸收了。尿液浓缩过程十分复杂, 依靠 (至少部分依靠) 逆流放大系统在内髓质形成较大的渗透梯度来实现。高渗透性是由髓袢和集合管对水和离子不同的渗透性的结果。髓袢升支粗段被认为有一个活性机制可以把氯和钠从管腔转运至肾间质, 但是它不通透水, 造成这段肾小管的渗透性降低, 成为稀释段。另一方面降支可允许水分子随意进出, 不包括钠离子。间质的高离子浓度将水排出降支, 又反过来提高髓袢的渗透压, 通过尿素和其他渗质离开集合管穿过肾间质进入升支增大渗透压, 从而在髓质形成再循环。

集合管通过控制重吸收的水量来调节终尿的浓度。通过 ADH 能刺激单核苷酸腺苷 (cAMP) 合成所调节水, 也增加管壁细胞对水的通透性。渗透性物质使水分通过基底膜从细胞中转运至高渗的间质。在 ADH 存在的情况下, 集合管几乎是不通透的, 水分很少被重吸收。间质的渗透梯度主要由远曲小管升支有效地将水移除而维持, 远曲小管升支比其降支的有效吸收半径更大, 大约多出 2 倍。逆流交换是与起源于皮质肾单位的髓袢紧密相关的, 逆流交换提供了一个重要的屏障带, 可以加速溶质的吸收和溶剂从内髓质的排出, 因而能维持肾间质的高渗性。

### 四、肾中外源化学物的生物转化

肾具有转化外源化学物的能力。一般认为, 在肝脏中存在的代谢酶基本上在肾亦可出现, 但含量相对较低。如细胞色素 P450 在肾皮质中含量为 0.16nmol/mg 蛋白左右, 相当于肝脏的 1/5。但肾中细胞色素 P450 与肝脏并不相同, 肾中的细胞色素 P450 经连二亚硫酸盐 (dithionite) 还原后与 CO 的复合物最高吸收峰为 452 ~ 454nm, 与肝脏中细胞色素 P450 的 450nm 有所区别。肾中也含有多种代谢酶类, 例如 N-脱甲基酶类、芳烃羟化酶类、7-乙氧基香豆素-O-脱乙酰酶、UDP-葡萄糖醛酸转移酶、磺基转移酶、硝基氧化酶类、硫氧化酶类 (sulfoxidase)、环氧化物水化酶以及谷胱甘肽转移酶类等。

许多外源化学物可在肾中进行代谢转化, 如苯甲酸可在肾中经线粒体甘氨酸-N-酰基转移酶 (glycine-N-acyltransferase) 催化形成尿酸。但肾对外源化学物的代谢转化具有两方面作用: 一方面, 某些外源化学物在肾进行代谢转化过程中可形成对肾具有损害作用的代谢物, 主要是一些肾毒物, 例如氯仿可经代谢活化形成光气 (phosgene); 对乙酰氨基酚 (acetaminophen, 醋胺酚) 在肾中可能被代谢转化, 经脱乙酰反应形成对氨基酚 (paminophenol); 大量对乙酰氨基酚进入机体时, 可引起肾坏死。溴苯 (bromobenzene) 在肾中可经代谢转化形成邻溴苯酚, 可降低肾中谷胱甘肽含量, 造成肾坏死。另一方面肾的代谢转化具有在肝外代谢中的解毒作用, 由于肾中含有催化葡萄糖醛酸结合、硫酸结合和谷胱甘肽结合的酶类, 借此可消除或减少这些肾毒物对肾的损害, 多数物质经过肾内的代谢降解毒性下降。

### 第三节 中毒性肾损伤的部位与类型

许多外来化合物通过各种途径进入体内,对肾产生直接或间接毒性。肾性毒物在肾组织都有主要的作用部位,表现为毒物对肾毒作用的选择性。抗生素常作用于肾近曲小管,免疫复合物往往在肾小球,氟在亨利襻和集合管,解热镇痛药在髓质和肾乳头。这种选择性原因尚不是很清楚,可能与血流、毒物的理化性质、转运、蓄积和靶部位结合能力有关。近年来许多学者认为,这种选择性可能与外来化合物对肾小球的损伤、肾细胞因子和生长因子的分泌、外来化合物在肾的生物转化和膜转运等因素有关。

#### 一、肾小球损伤

虽然肾小球是肾最先接触毒物的部位,但很少毒物能引起肾小球结构的损伤。肾小球的损伤主要是小球膜上的一些成分与毒物间相互作用的结果,如庆大霉素造成肾小球滤过率的减少是由于氨基糖苷的阳离子和内皮细胞的阴离子部位的静电相互作用,改变了肾小球的带电状态,影响了内皮细胞滤膜的大小与数目。有些毒物可以直接损伤肾小球上皮细胞和肾小球毛细血管膜。免疫复合物可以掺入到小球内部与补体相结合。毒物也可以作为半抗原,与小球蛋白相结合成为全抗原,从而刺激抗体的产生。抗体与细胞表面抗原结合,在小球中形成免疫沉积物。

#### 二、肾近曲小管损伤

近端小管只存在于肾的皮质区和近皮质区。解剖上,近端小管可分为近曲小管和一部分直而短的降支,继续延伸为髓袢降支。还可再根据许多形态学和功能上的特性细分为三段: $S_1$ 、 $S_2$ 和 $S_3$ 。近端小管在保持体内电解质平衡中起着决定性的作用,控制钠和氯从肾小管腔到管周毛细血管包括非特异性的电生理梯度和选择性的活性转运机制。水是根据离子的渗透效应而分布的,同时由蛋白质和粘多糖共同存在所产生的流体静力压推动水从上皮细胞流至间质组织,流入毛细血管腔。从肾小管囊腔流出的蛋白质在近端小管又被重吸收,这是通过刷状缘微绒毛的吞饮作用进入肾小管上皮细胞的。这些吞饮形成的囊泡继而相互融和,形成充满蛋白质的液泡,又与吞噬体融和,这样蛋白质的消化产物最终被运输至毛细血管系统或被用于细胞代谢过程。另外还有一些其他的吸收和分泌机制,包括葡萄糖的重吸收和酸性碱性有机物的分泌等同相转运过程。

肾近曲小管是肾性毒物引起肾损伤最常见的部位,主要与毒物在近曲小管内选择性蓄积有关,近曲小管与远曲小管相比,上皮细胞不够紧密,毒物更易渗入到近曲小管细胞内。更重要的是有机离子、低分子量蛋白、多肽、谷胱甘肽结合物和金属都集中在近曲小管内,并在此处发生转运和蓄积。毒物在肾中的转运和蓄积是毒物引起肾毒性的必要条件,还可能取决于细胞靶部位的反应能力。此外,细胞色素 P-450 和胱氨酸结合  $\beta$ -溶酶的活性也是增加肾近曲小管易感性的一个因素,这两个酶主要在肾近曲小管内催化毒物代谢转化,而在肾单位的其他部位几乎无此作

用。有些毒物需要由这些酶活化,如氯仿需要细胞色素 P-450,卤烷 S-结合物需要胱氨酸结合  $\beta$ -溶酶。

### 三、髓袢、远曲小管及集合管损伤

肾髓质与肾皮质无论是在大体上还是在微观水平都不尽相同。可分为外髓质和内髓质两部分,外髓质是由髓袢降支细段和升支粗段、集合管、远曲小管和密集的毛细血管网所组成,内髓质的游离端被称作肾乳头,包括髓袢细支、集合管、远曲小管和较稀疏的毛细血管网。充填这些结构间隙的是间质细胞和粘多糖的底物。集合管以肾直小管围绕肾乳头尖端的方式终止。

肾髓袢在解剖上短髓袢不超过外髓质,近端小管和粗的升支则密集于肾皮质,但在髓质,降支主要与远曲小管升支相连而升支则与集合管相连。髓袢升支降支与血管网之间的联系、或与集合管之间的联系为水和溶质进行逆流交换提供了多维系统。集合管明显的分成三部分,分别位于肾皮质、外髓质和内髓质。这三部分对水和溶质的渗透性不同。

远端小管将髓袢升支粗段连接到起源于肾皮质的集合管部分。远端小管的功能主要是离子和水的重吸收,与近曲小管相比,化学物造成其他一些片段的损伤较少见,主要表现为浓缩和酸化能力受损,而造成多尿的机制也不尽相同。顺铂在引起髓袢和集合管的浓缩功能损伤,造成对抗利尿激素的耐受。

### 四、肾疾病分类

肾的疾病分类可以依据临床表现,病理改变或病因学来确定。基本方法是按肾主要的解剖结构(如肾小球、肾小管、间质、血管),与重要的临床综合征联系起来。肾毒物可能具有多个靶部位,损伤表现可有多种临床综合征。

1. 免疫介导肾小球疾病 免疫介导的肾小球肾炎可能是由于循环的抗体与肾小球结构抗原或是非肾小球抗原相作用所产生的沉积物所导致(例如被肾小球基底膜阴离子所固定的阳离子蛋白)。另外,肾小球损伤可能也是循环免疫复合物沉着的结果。两种主要的抗体介导肾小球肾炎的形式是抗-GBM 介导的疾病和膜状肾小球肾炎疾病(或免疫复合物类型介导的肾小球肾炎)。前一种疾病的特征是在肾小球基底膜上存在有 IgG 的沉着。而后一种疾病可能是抗原和循环抗体的沉着所造成的。膜状肾小球肾炎的特征是在肾小球基底膜上存在有颗粒状的 IgG 沉着。另外一些药物例如非类固醇药和锂盐也可能导致肾小球微小改变的肾病综合征。

有许多潜在的环境毒物、药物,与这种类型的肾小球肾炎有关。如金、汞、D-青霉胺、非类固醇类抗炎剂和二乙酰吗啡。另外有一些药物可能导致类似于狼疮综合征的免疫复合物肾小球肾炎(例如盐酸胍苯哒嗪、甲基苄胍和二苯基乙内酰脲)。

2. 直接肾小球损伤 药物或化学物的直接毒性可能会导致肾小球的损伤,但不常见。金和硅能够沉着于肾小球系膜细胞中,这种沉着反应可能是肾小球细胞和炎症细胞扩散的一种反应。肾小球膜的损伤可能转变为肾小球渗透性的改变。肾小球膜收缩致使肾小球毛细管变小变窄,从而降低肾小球滤过率。肾小球的损伤同样可能是由于纤维沉着所导致的。纤维蛋白沉着可以从本质上通过多种途径导致损害肾小球,包括阻塞肾小球毛细管、干预渗透反应或对于肾小球系

膜细胞的直接毒性作用。

3. 急性肾小管损伤 毒物产生的急性肾小管损伤是直接细胞毒性的结果。它们可能会由于小管细胞的坏死而有所变化,导致急性肾衰竭。接近于小管衬里细胞的损伤可以通过被这些细胞正常重吸收的物质的排泄增加而显示。这些物质如葡萄糖、氨基酸、磷酸盐、钠。小管损伤延伸至末梢部分小管的损伤,伴随着肾功能的丧失:酸性尿液和维持水、电解质平衡。肾小球的影响可能伴随着小管毒性,如果这种过程持续,就可能导致慢性间质性肾病,例如:铅和镉的毒性。

4. 急性间质性肾炎 急性间质性肾炎(AIN)的发生可能是一种对于多种药物的免疫变应性或是细胞介导的免疫反应,特别是青霉素以及它的衍生物(例如:甲氧苯青霉素、利尿剂、非类固醇类消炎药、金盐和职业性汞暴露)。包括体液免疫反应以及细胞免疫反应都被涉及。在大多数的急性间质性肾炎病例中没有发现免疫反应物。最显著的特点是单核细胞和嗜酸性粒细胞的细胞渗透间隙组织的现象。大多数的淋巴细胞是T细胞,而绝大多数的是 $T_H$ 细胞(辅助/诱导细胞),小部分的组成是 $T_S$ 细胞(抑制/细胞毒型细胞)。

5. 慢性间质性肾炎(CIN) CIN与急性肾病相比通常很少。以单核细胞的渗透、显著的间质纤维化和小管萎缩为主要特征。

## 第四节 肾的毒性作用机制

### 一、细胞死亡

细胞死亡是生物体在发育过程中或受到外界因素刺激时,细胞发生的一种程序性死亡过程。

肾细胞损伤最终导致细胞死亡,可以是坏死,也可以是凋亡,两者在形态和生理上有很大的差别。凋亡是一个有严密调控的过程,往往影响散布的个别细胞,细胞保持完整而细胞容积减少,最终细胞变成小碎片,并被毗邻的细胞和吞噬细胞所吞噬,无炎症反应。坏死常累及一大团细胞,细胞肿胀,容积增大,细胞破裂,内容物溢出,伴有炎症。一般肾性毒作用都是由细胞坏死而引起细胞死亡。

### 二、活性中间代谢产物

活性中间代谢产物是毒物在体内经生物转化后形成的具有生物活性的物质。

毒物引起细胞损伤可有不同的机制,有些毒物能直接与细胞大分子相结合而造成毒作用,如汞和细胞的巯基相结合。但有些化学物本身并无毒性,只有生物转化成活性中间代谢产物才有毒性。生物活性中间代谢产物如烷化剂,是亲电子物质,可以与细胞成分相结合。如乙酰氨基酚和氯仿在小鼠肾内通过P-450的作用代谢为活性中间代谢产物N-乙酰-邻-苯喹啉胺和光气。活性中间代谢产物和靶细胞大分子共价结合,影响大分子的正常生物活性,而造成细胞损伤。毒物也可以通过增加活性氧类(reactive oxygen species, ROS),如超氧化物阴离子自由基( $O_2^-$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )和羟基自由基(OH),诱导氧化应激。ROS可以和一些细胞成分反应诱发毒性,如脂

质过氧化,影响细胞膜的流动性、酶的活力、膜的通透性和转运能力;通过氧化靶蛋白的巯基或氨基使细胞酶失活;诱导 DNA 链或染色体断裂。这些都可以造成细胞损伤和死亡。

### 三、细胞容积和离子内稳态

细胞容积和离子内稳态有密切联系,对于肾小管上皮的重吸收也至为重要。毒物一般都是通过与细胞膜作用,增加离子通透性和抑制能量产生而影响细胞容积和离子内稳态。正常情况下膜的转运可维持细胞内离子的平衡和跨膜离子运动,ATP 的失代偿可以抑制膜的转运。随着 ATP 的耗竭,钠钾 ATP 酶活性受抑制,引起钾外流,钠氯内流,细胞肿胀,最终细胞溶解。

### 四、细胞骨架和细胞极性

毒物可以引起一些早期膜完整性的变化,如刷状缘的丧失,浆膜变性和细胞极性的改变。这可能与毒物诱发的细胞骨架改变有关。近曲小管有明显的极性,在毒物作用下,由于能量代谢紊乱,骨架的重排,导致近曲小管的极性破坏。

### 五、钙的内稳态

钙作为第二信使在很多细胞功能中起到了很重要的作用。钙离子在肾细胞内的分布很复杂,它不但可以与大分子相结合,也可存在亚细胞房室中。最重要的细胞钙调节库是胞浆中的游离钙离子,浓度大约是 100nmol,依靠存在于浆膜和内质网上的各种泵和通道,克服细胞内外的浓度梯度(1:10 000),维持胞浆内游离钙离子的水平。另外的 50%~60% 从肾小球中滤过的钙由肾近曲小管重吸收,大量钙进入细胞以维持胞浆内钙离子水平。细胞内游离钙水平的升高能活化一些钙离子依赖性酶,如磷脂酶和蛋白酶造成细胞骨架和一些与收缩有关成分的功能。

## 第五节 肾损害的检测与评价

单独使用体内或体外的方法研究化学物的毒性是不能解决需要回答的所有问题。肾毒性评价的整体性方法也要求与离体研究相结合。不仅用不同种系的动物,也要结合人群临床及流行病学研究。

### 一、整体实验

肾是动物的主要排泄器官之一,尿液中各种物质排泄的量在生理情况下,是较为恒定的,如果排泄量过多或过少往往表示肾功能异常。同时结合血液生化的改变,可以得到初步的评价。值得注意的是,在反映尿中某物质的含量时,以 24h 尿中的含量最理想,因尿量的多少受饮水量的多少影响较大,只测定一次随机尿样中物质的含量,不太能反映真实的情况,在收集 24h 尿量

有困难时,一般用尿肌酐来校正尿量。

1. 肾浓缩-稀释试验 反映肾浓缩功能。在生理情况下,限制饮水则远曲小管及集合管对水分的重吸收增多,尿量减少,比重上升,大量饮水则尿量增多而比重下降。如果远曲小管及集合管的重吸收功能障碍,可导致肾浓缩-稀释功能下降或丧失。此项功能测定一般先做浓缩试验,再做稀释试验,两项试验的间隔时间需 24h。对人体做试验时,在禁水一定时间后,尿比重应在 1.020 以上,而稀释试验至少应有一次尿液比重低于 1.003。如果某种化学物引起尿量增多伴尿比重下降,提示肾浓缩功能受到损害,可能是由于血管升压素分泌不足或释放障碍。动物实验中,尤其对于小动物,因尿量少不便测定尿比重,可粗略地用尿量来反映其浓缩能力。

## 2. 尿成分的改变

(1) 尿蛋白:生理情况下,尿蛋白的来源是原尿中未被肾小管完全吸收的少量小分子蛋白质、部分来自肾小管脱落的细胞等。若尿中以大分子蛋白(如清蛋白)为主或出现大量蛋白质,提示肾小球的选择性滤过功能障碍或结构不完整;若以小分子蛋白(常见的如 $\beta_2$ -微球蛋白和视黄醇结合蛋白)为主,则提示损伤部位主要在近曲小管,但要除外血中小分子蛋白异常增高的可能性。因此,在有条件的情况下,在测蛋白含量的同时最好测定蛋白的分子量。此外,不同动物间尿蛋白的排泄量可相差很大,实验组和对照组动物间的比较很重要。

(2) 尿糖:生理情况下,原尿中葡萄糖的浓度未超过肾阈时,能被肾小管全部吸收。因此,如果血糖不高而出现尿中葡萄糖浓度增高,提示肾小管功能障碍。

(3) 尿酶:正常情况下尿酶主要来自于:①血浆中的酶,一般分子量低(80,000)经肾小球滤过后,其中极少数未被肾小管吸收,可在尿中检出;②肾单位各部分细胞的脱落、溶解,尤其是富含酶的肾小管上皮细胞,这是尿酶的主要来源;③泌尿道上皮细胞内含的酶。

尿酶是肾损害早期和敏感的指标之一。不同的酶来自于肾的不同部位,可以作为肾损害的标记酶。碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)和 $\gamma$ -谷氨酰转移酶( $\gamma$ -glutamyl transferase,  $\gamma$ -GT)活性增高,是刷状缘受到损害的标记酶。而其他的一些酶,如乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)和谷氨酸脱氢酶(glutamate dehydrogenase, GDH)分别存在于细胞浆和线粒体,如果它们的活性增高则提示可能有广泛的细胞损伤。值得注意的是,在化学性损害时,由于细胞内的酶大部分在早期即排出,尿酶常常是一过性的,因此如果没有尿酶增高并不一定表示没有肾损害,在急性肾损害比肾损害更有用。

肾酶分布存在相当大的种属差异。一般而言,大鼠肾酶分布较接近人类,宜作尿酶研究的首选动物。在收集尿样时必须注意防止粪便污染,因为有些酶(如 ALP、LDH 等)在粪便中的活性比尿酶高得多。尿液须在低温下(4℃)收集和贮存,有条件时最好在分析之前要进行透析,以除去抑制物。

3. 肾小球滤过率测定 肾小球滤过率(glomerular filtration rate, GFR)可直接通过测定菊糖(inulin)或内生肌酐(creatinine)清除率来反应,也可间接地用测定血中肌酐或血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)来反应。

(1) 菊糖清除试验:菊糖是一种多糖,分子量为 5200,它能从肾小球滤过,但不被肾小管重吸收或分泌,在体内既不与血浆蛋白结合,又不被机体代谢,是测定 GFR 较好的方法。试验时由静脉注射后,收集一定时间内的尿液,然后测定血浆和尿中菊糖浓度,按下式计算菊糖清除率。



2. 离体灌注肾小管技术 离体灌注肾小管技术(isolated perfused tubule)就是将肾小管分离出来后,再进行灌注试验。这项技术最复杂和困难的是肾小管的制备,需在显微镜下人工完成,最好的动物是兔子,微量加样器用于灌注。分离出的肾小管基本保持其正常的生理功能,在药理学和毒理学中都有广泛的应用。

3. 其他 离体肾灌注、原代肾细胞培养、亚细胞器分离以及建立肾细胞株等方法都已较成熟,在肾毒理学中得到应用。

体外研究方法具有实验周期短、一个模型可以用于测试多种化学物、免去动物饲养的麻烦等优点,但也有它的缺陷。例如,新鲜制备的离体灌注肾、肾切片、肾小管和细胞等虽然在功能上与整体类似,但在体外存活的时间只有2~24h。与此相反,肾原代或细胞株存活时间可达2周以上,但在功能上与整体情况下的功能相似性方面不如上述的几项技术,在肾毒性测试时根据情况选用(图17-1)。

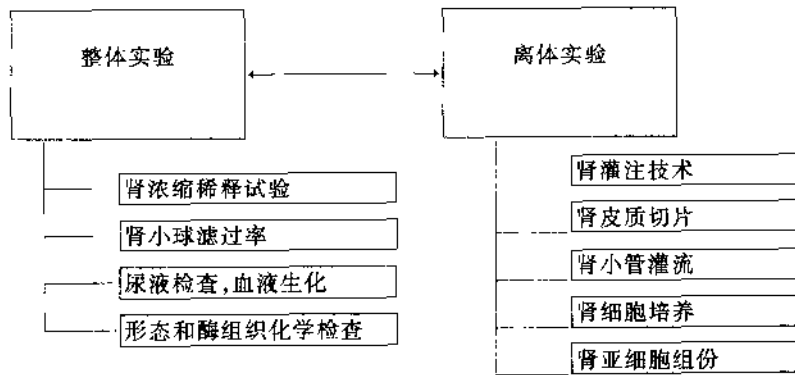


图 17-1 肾毒性筛检流程图

## 第六节 几种常见的肾性毒物

### 一、汞

\*\*\*\*\*

环境中存在元素汞(蒸气)、无机汞盐和有机汞化合物。元素汞进入人体在红细胞和组织中迅速氧化成无机汞,在组织中无机汞和元素汞的分布是一样的。由于汞对巯基的特殊亲和力,血液中的无机汞都与细胞清蛋白和其他含巯基的蛋白及谷胱甘肽和胱氨酸结合。

肾是无机汞蓄积的主要靶器官,近曲小管的 $S_3$ 节段是毒性始发部位,随着剂量和接触时限的增加也可累及到 $S_1$ 和 $S_2$ 节段。肾对汞的摄取很快,接触非中毒剂量的无机汞,其中50%的汞在几小时内就可以在肾中发现。由于无机汞均呈结合状态,肾近曲小管摄取汞可能涉及刷状缘 $\gamma$ -谷氨酰胺转肽酶的活性和基底膜有机阳离子转运系统。

无机汞引起的急性肾毒性,一般在接触后24~48h内,产生近曲小管坏死和急性肾衰竭,尿



中刷状缘酶的增加可作为氯化汞造成肾功能不全的早期生物标志物,如碱性磷酸酶和 $\gamma$ -谷氨酰胺转氨酶。而随小管损伤的发展,某些细胞酶,也可在尿中增加,如乳酸脱氢酶和天门冬氨酸转氨酶。肾小管电解质和水的重吸收减少,使尿糖、氨基酸、清蛋白和其他蛋白排泄增加,随着肾近曲小管功能的损伤,肾小球滤过率也相应降低。给大鼠氯化高汞后6h,肾小球滤过率降低35%,12h和24h分别降低到32%和16%。这种肾小球滤过率降低是由于肾小球、肾小管损伤和血管收缩的结果。如果肾功能不是损伤得太严重,剩余的肾小管细胞可以增殖,肾功能也可恢复。在细胞水平上,汞与巯基相结合起了重要的作用,特别是线粒体形态和功能的改变,也是氯化高汞引起肾小管损伤的早期表现。有实验表明,慢性无机汞接触可产生抗肾小球基底膜抗体,并有免疫复合物的形成,引起免疫反应性膜性肾小球肾炎。

## 二、镉

慢性接触镉的主要途径是食物和吸烟,可引起肾毒性。职业人群也可吸入含镉粉尘和烟尘。镉的生物半衰期长达十年或几十年,可在体内长期蓄积,体内负荷的50%蓄积在肾。镉对近曲小管的损伤,主要在 $S_1$ 和 $S_2$ 节段,引起糖尿、氨基酸尿、尿钙和尿酶增加。进而可发展成慢性间质性肾炎。作为人类镉肾毒性的早期预测生物标志物,可用尿镉、钙、氨基酸、清蛋白、 $\beta_2$ -微球蛋白、NAG和视结合蛋白等。有人建议尿镉浓度在成人男性工人中大于 $5\mu\text{mol}/\text{mmol}$ 肌酐,而普通居民大于 $2\mu\text{mol}/\text{mmol}$ 肌酐就应考虑为肾小管损伤。

在镉肾毒性中金属硫蛋白起到了很重要的作用。金属硫蛋白是富含胱氨酸,能与金属结合的低分子量蛋白,对镉有特殊的亲和力,并能被金属诱导合成。镉进入人体后在血液里与清蛋白相结合,在肝脏中诱导金属硫蛋白的合成,并与镉结合成镉金属硫蛋白。由于其分子量低,故很易经肾小球滤过,在肾近曲小管内被重吸收。在近曲小管细胞中,主要在溶酶体中降解为游离镉离子和金属硫蛋白,若肾小管细胞内没有足够的金属硫蛋白与游离的镉离子相结合,游离的镉离子就能在细胞内对损伤敏感的部位产生毒作用,这可能是镉引起慢性肾损害的原因。

## 三、氯仿

氯仿引起的肾毒性有很大的种属差异,有的种属比较敏感。主要的靶细胞是肾近曲小管,无肾小球和远曲小管的损害,肾毒作用表现为蛋白尿、糖尿和血尿素氮升高。氯仿引起的肾毒性主要由于它通过肾细胞色素P-450代谢形成活性中间代谢物,后者与细胞大分子的亲核基团共价结合。细胞色素P-450将氯仿生物转化成不稳定的三氯甲烷,释放出HCl并形成光气。光气能与水反应产生HCl和 $\text{CO}_2$ ,并与2个分子的谷胱甘肽反应产生二硫碳酸谷胱甘肽,从而造成肾近曲小管的损伤。氯仿毒性的性别差异是不同性别的细胞色素P-450同工酶差异所造成的,而这些同工酶在氯仿造成的肾毒性中起了很重要的作用。

## 四、四氟乙烯

四氟乙烯在肝脏中由GSH-S-转移酶代谢成1,1,2,2-四氟乙烯谷胱甘肽,随胆汁分泌到胆囊

和小肠,降解成胱氨酸-S-结合物,最后通过有机阴离子转运系统和钠非依赖性转运系统转运到肾,作为胞浆和线粒体中胱氨酸结合物 $\beta$ 溶酶的底物,分解产生氨、丙酮酸和活化巯基,后者能与细胞大分子共价结合。这种胱氨酸结合物与肾细胞蛋白的再结合和肾毒性密切相关。造成的损害形态学上以肾近曲小管坏死为特征,主要影响 $S_3$ 节段功能,引起糖尿、蛋白尿和尿酶增加。在细胞死亡前,还有脂质过氧化物的形成。

## 五、溴化苯

※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※※

溴化苯除了有肝脏毒性外,还有肾毒性。与卤烷类毒物一样,引起肾毒性与其生物转化有关。溴化苯经肝细胞色素 P-450 氧化成溴化酚,并进一步氧化成溴化氢醌(BHQ),再与谷胱甘肽相结合,形成二谷胱甘肽结合物。这种结合物的肾毒性比溴化苯要大上千倍,造成 $S_3$ 节段形态学的改变和尿糖、尿蛋白和尿酶的增加。它也是 $\gamma$ 谷氨酰胺转氨酶的底物,最终可转化成胱氨酸和 BHQ 与 N-乙酰胱氨酸的结合物。

(金秦虞)

## 心血管毒理学

### 第一节 概 述

#### 一、心血管毒理学概念

心血管疾病属于人类重大疾病,严重威胁着人类健康与生命。随着医学模式的转变,传染病的发病率和死亡率在逐渐下降,而心血管疾病发病率和死亡率却呈上升趋势。在我国,心血管疾病居慢性疾病死因顺位的前列,发病率约为 115/10 万人,已超过日本和法国等发达国家。心血管疾病的防治已成为各国政府和医学界面临的一个重大课题。

目前心血管疾病的防治尚有许多需要解决的问题。首先,大量具有心血管毒性的环境毒物和工业毒物进入环境,增加了人群暴露机会和患心血管疾病的可能性,而我们对这些心血管毒物的毒性及其作用机制的了解和研究很少。其次,现在临床使用的许多药物,包括一些用于心血管疾病治疗的药物,本身就具有心血管毒性。如何科学合理地使用这些药物以及开发心血管毒副作用小的药物已成为一个新的课题。另外,随着医疗手段的进步和医药产品的开发,每年都有大量的新药研发、生产和投入临床使用,这些新药以及新疗法的使用也都涉及毒理学安全性评价的问题,上述问题为心血管毒理学提出了更为艰巨的任务,也开辟了更广阔的发展空间。

心血管毒理学(cardiovascular toxicology)是研究心血管毒物对心血管系统的毒性作用及其毒作用机制的学科。心血管毒理学是毒理学的重要组成部分,是一个边缘和交叉学科。心血管毒理学近十年来发展迅速。在心血管毒理学的研究工作中,除了毒理学本身的技术和方法外,大量采用了电生理、心功能学、生物化学、免疫学、细胞生物学、分子生物学、流行病学以及医学影像学技术和方法,尤其是流式细胞技术、激光共聚焦扫描显微技术、多普勒超声和磁共振技术、免疫细胞化学技术以及分子杂交技术的应用为心血管毒性的研究工作提供了强有力的工具。胚胎心肌细胞原代培养、全胚胎培养和各种心血管疾病动物模型及转基因动物模型成为心血管毒理学重要的实验模型。心血管毒理学研究的深入和技术方法的完善,使阐明毒物对心血管系统的毒性作用及其机制,采取有效的拮抗及预防措施,降低毒物对心血管的毒性作用及心血管疾病发病率成为可能。

## 二、心血管系统构成及特点

心血管系统包括心脏和由动脉、静脉及毛细血管组成的脉管系统。心血管系统重要的生理功能在于维持机体血液循环,将营养物质、氧气和其他生物活性物质运送到全身各组织及细胞,并将外来化合物及体内代谢产物通过血液循环排出体外,保证机体内环境稳定和生理功能正常。

心肌细胞是心脏的基本功能单位,心肌细胞主要由肌纤维构成,有1个或多个细胞核,并含有丰富的线粒体,其他细胞器包括肌质网、溶酶体、高尔基复合体、糖原颗粒和细胞基质。心肌具有收缩功能的单位是肌原纤维,每条肌原纤维由许多粗、细肌丝按一定方式排列而成,粗肌丝由肌球蛋白组成,细肌丝由肌动蛋白组成。心肌细胞是心脏的主要细胞类型,约占所有心脏细胞的25%,在非心肌细胞当中,以成纤维细胞为主,占非心肌细胞的90%,此外还包括普肯耶细胞和结缔组织细胞。

血管的一般构造可分为内膜、中膜和外膜。内膜很薄,由附着于基膜的单层内皮细胞和亚内皮细胞构成;中膜最厚,由多层环状或螺旋状的平滑肌与弹性纤维及胶原蛋白交互构成,在大动脉以弹性纤维为主,中、小动脉以平滑肌为主;外膜主要由纤维结缔组织构成,包括纤维细胞、胶原蛋白、弹性蛋白和粘多糖。静脉中膜弹力纤维和平滑肌较少,因而管壁较薄。毛细血管管壁极薄,主要由附着于基膜的内皮细胞构成,基膜外有很薄的一层结缔组织。

## 第二节 毒物对心脏和血管的毒性作用

心血管毒物指具有心血管毒性并可能引发心血管系统损伤和导致心血管疾病的物质的总称。心血管毒物的种类很多,根据其来源可分为环境心血管毒物、工业心血管毒物、药物、具有心血管毒性的内源性物质和天然物质。

### 一、心血管毒物对心脏的毒性作用

心血管毒物对心脏的毒性作用,即心脏毒理学,是毒理学的一个重要分支。

心血管毒物可以引起心血管系统复杂的生物效应,导致心律失常、传导阻滞、心肌肥大、缺血性心脏病、心肌及血管细胞凋亡、坏死和心力衰竭等一系列功能和器质性改变。心血管毒物的心脏毒性及损伤过程见图18-1。

心血管毒物短时间作用引起心脏的早期反应是生化改变,如心肌酶活性变化和能量代谢以及离子稳态改变,并可导致心律失常。一般心律失常是可以恢复的,并经常作为其他类型心功能紊乱的并发症出现。心肌轻度损伤可能修复,心肌细胞发生结构和功能的适应性改变,严重的损伤则可导致心肌细胞死亡。

心血管毒物的持续作用可以激活转录因子,引发心肌细胞的一系列细胞及分子调控事件。通过肥大基因激活和转录因子上调可以引起心肌肥大,非生理状态心肌肥大在初期属于心脏对心血管毒物作用产生的心功能改变的代偿反应,这时心肌损伤是可逆性的;如果心血管毒物持续作用,心脏会出现生理、生化、形态及功能的一系列的改变,导致以心肌细胞凋亡和坏死为形

态学特征的心肌细胞死亡。

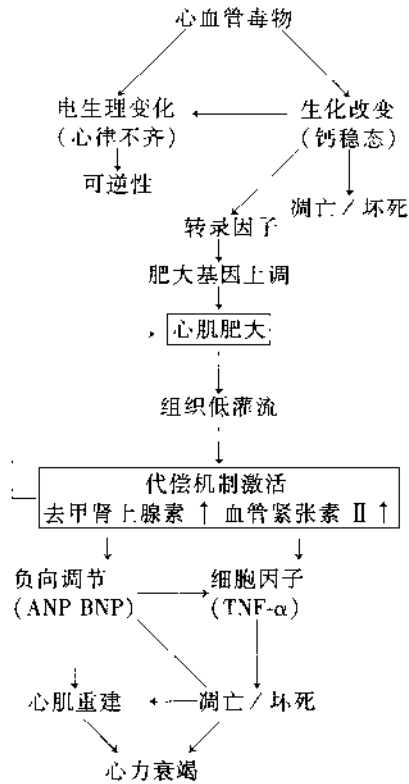


图 18-1 心血管毒物致心脏损伤示意图

凋亡和坏死这两种细胞死亡形式可同时出现在心肌组织和培养细胞中,两种细胞死亡类型的激发事件可能是共同的,出现哪种死亡形式取决于毒物的作用强度和作用时间。凋亡是受基因调控的程序性死亡,如果凋亡程序在下游的某个控制点被终止或毒物作用强度很大,细胞死亡形式可能由凋亡转为坏死。细胞凋亡是一个能量依赖过程,ATP 浓度是决定凋亡和坏死转换的关键因素。心肌缺血引起心肌细胞 ATP 的明显减少和最终的耗竭。心肌细胞中 ATP 的耗竭超过 ATP 总量的 70% 将引起凋亡转向坏死。

### (一) 环境及工业心血管毒物引起的心脏毒性

环境及工业心血管毒物来源于环境和工业生产过程,目前对这类心血管毒物了解不多,有些毒物的心血管毒性作用是通过流行病学调查确定的,毒物有效成分、剂量-效应关系和毒作用机制不十分清楚。环境及工业心血管毒物毒性效应及可能机制见表 18-1。

空气污染物与心脏毒性的关系逐渐受到重视。流行病学调查和动物实验均有证据表明,暴露于空气污染中的颗粒物质会增加心血管疾病的发病率和死亡率。美国的一项回顾性流行病学调查分析了 1979 年到 2000 年期间全美 500 000 例死亡资料,发现细颗粒物( $PM_{2.5}$ )每增加  $10\mu\text{g}/\text{m}^3$ ,人群全死因死亡率每年增加 6%,心肺疾病的死亡率增加 9%;而粗颗粒物每增加

表 18-1 环境及工业心血管毒物的一般毒性效应

| 毒物种类 | 毒性效应                     | 可能机制                                           |
|------|--------------------------|------------------------------------------------|
| 悬浮颗粒 | 心律失常; 心律↓<br>ST段改变; 心肌梗死 | 内皮素↑<br>CRP↑                                   |
| 尼古丁  | 心肌梗死; 心率↑                | 氧化应激                                           |
| 多环芳烃 | 心肌细胞死亡                   | 基因突变; DNA加合物<br>细胞转化; 细胞坏死                     |
| 电离辐射 | 心肌损伤                     | DNA损伤                                          |
| 丙烯醛  | 细胞凋亡; 细胞坏死               | 线粒体损伤; 膜完整性破坏<br>氧化应激                          |
| 一氧化碳 | 心肌梗死; 心动过速; 传导阻滞         | 线粒体损伤; 氧化磷酸化                                   |
| 重金属  |                          |                                                |
| 镉    | 心肌肥大; 传导↓; 心肌收缩力↓        | 细胞凋亡; 离子稳态改变                                   |
| 钴    | 心肌细胞损伤                   | 与Ca <sup>2+</sup> 竞争结合                         |
| 铅    | 心律不齐; 心肌收缩力↓; 退行性改变      | 与生物大分子形成复合物                                    |
| 砷    | 心肌缺血; T波倒置; QT间期延长       |                                                |
| 农药   | 传导障碍; 心律不齐; 心肌细胞死亡       | 酶活性抑制; 乙酰胆碱堆积细胞坏死                              |
| 臭氧   | 心肌细胞死亡                   | 氧化损伤                                           |
| 含铅汽油 | 心肌坏死; 纤维变性               | 影响膜完整性; 线粒体损伤                                  |
| 亚硝酸盐 | 心律失常; 心肌缺血               | 氧化损伤                                           |
| 有机溶剂 | 心律失常; 猝死                 | 副交感神经活性↓; 离子稳态改变<br>肾上腺素敏感性↑                   |
| 卤代烃类 | 心律失常; 负向肌力效应<br>心排量↓     | 副交感神经活性↓; 离子稳态改变<br>肾上腺素敏感性↑; 冠脉血流改变           |
| 酮类   | 心律失常                     | 副交感神经活性↓; 离子稳态改变<br>肾上腺素敏感性↑                   |
| 氯气   | 传导阻滞; 脂肪纤维化变性            | 氧化损伤; 抑制酶活性                                    |
| 乙醇   | 心律失常; (急性)传导↓; (慢性)心肌病   | [Ca <sup>2+</sup> ]稳态改变; 氧化应激<br>蛋白合成抑制; 线粒体损伤 |
| 氟乙酰胺 | 心律失常; 心肌坏死               | 干扰线粒体氧化磷酸化                                     |
| 氯甲烷  | 心动过速; ST段下降              | 干扰甲基化                                          |
| 甲烷   | 心动过速; 传导↓; 心肌缺氧          | 机制不详                                           |
| 硫化氢  | 迟发性心肌梗死; 心肌损伤            | 心肌酶谱改变; 其他机制?                                  |
| 二硫化碳 | 冠心病?                     | 机制不详                                           |

10 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ , 人群全死因死亡率增加 0.51%, 心肺疾病死亡率增加 0.68%。因此, 研究结论认为, 长期暴露于细颗粒物是引起心肺疾病的一个重要环境危险因素。此外, 流行病学研究还表明心血管系统受损的患者对细颗粒污染物引起的心脏毒性更为敏感。对患有冠状动脉疾病的患者进行的定群研究结果显示, 暴露于高浓度的环境细颗粒污染物 2 天后, 患者运动中心肌缺血发生的危险性显著增高, 这表明心肌缺血可能是空气污染物心脏毒性的一个潜在机制。

颗粒污染物引起的心脏毒性效应可体现在心电图的改变上, 包括心律失常、心率减慢和 ST 段改变。一些研究报道了颗粒污染物与心肌梗死存在相关关系。德国的一项研究分析了空气污

染物和成年男子的 C-反应性蛋白(CRP)水平的关系,确认了 CRP 水平的增高与空气污染物中粗颗粒物和硫氧化物的浓度的相关性,认为空气污染物可导致心脏疾病危险性增加。应用大鼠模型的研究显示,发生急性心肌梗死时动物对细颗粒物的心脏毒性作用更为敏感,细颗粒物引起血清内皮素增加和急性心肌梗死发生,导致心脏内皮素受体上调。这一结果提示,内皮素系统的上调很可能与颗粒污染物引起的心脏毒性有关。

乙醇暴露或过量摄入可引起心肌损伤。乙醇的心脏毒性可分为急性和慢性中毒两种。乙醇急性中毒出现负向传导效应(传导下降)和心室纤颤阈值降低。长期或慢性暴露主要引起心律失常,慢性酒精摄入导致心肌结构和功能异常以及与充血性心力衰竭症状类似的酒精性心肌病。

研究认为,与乙醇摄入有关的心肌损伤主要是由其代谢产物乙醛造成的。心肌细胞中缺乏将乙醇代谢转化为乙醛的乙醇脱氢酶,乙醇损伤肝脏并产生大量乙醛,这些乙醛可转运至心脏,对心肌产生毒性效应。乙醛对心肌的直接效应包括抑制蛋白合成、影响线粒体呼吸及干扰肌动蛋白与肌球蛋白连接。酒精性心肌病的影响因素较多,包括慢性酒精消耗、营养不良、吸烟、系统性高血压及饮料添加剂等。酒精性心肌病的确切机制仍未确定。一般认为,一定条件下乙醇单独作用或多因素联合作用可导致酒精性心肌病。

乙醇代谢产生的活性代谢产物可导致心肌细胞脂质过氧化或细胞及细胞膜蛋白巯基氧化。用维生素 E 预处理啮齿动物,可阻止血浆中乳酸脱氢酶同工酶增加,减轻心肌超微结构的损伤。由于维生素 E 是一种抗氧化剂及自由基清除剂,提示乙醇产生的心脏损害是由其代谢产生的自由基所引起的。乙醇可增加黄嘌呤脱氢酶向黄嘌呤氧化酶的转化,黄嘌呤氧化酶是一种产生超氧化物阴离子的酶,可增强鼠心肌超氧化物 acyl-CoA 氧化酶和过氧化氢酶的活性,这两种酶可增加过氧化氢及乙醛的产生,可使心肌细胞发生脂质过氧化损伤。

## (二) 药物引起的心脏毒性

引起心脏毒性的药物很多,其中有些是心血管治疗药物,这些药物使用不当或长期使用都可能造成心肌损害,药物引起的心脏毒性及可能机制见表 18-2。下面以抗病毒药物为例介绍药物的心脏毒性。

表 18-2 具有心血管毒性药物的一般毒性效应

| 毒物种类                    | 损伤效应                                                                        | 可能机制                                                                                  |
|-------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| 抗心律失常药物                 | 传导速率↓; 早期心律失常<br>心动过缓; 传导阻滞<br>动作电位间期↑; QT 间期延长<br>AV 传导↓; 负向肌力效应<br>负变时性效应 | Na <sup>+</sup> 通道阻滞<br>K <sup>+</sup> 通道阻滞<br>[Ca <sup>2+</sup> ] 通道阻滞<br>β-肾上腺素受体阻滞 |
| 影响肌收缩力药物<br>及相关药物       | 影响动作电位延续时间; AV 传导↓<br>拟副交感神经效应剂(低剂量)<br>拟交感神经效应剂(高剂量)                       | 抑制 Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATP 酶<br>[Ca <sup>2+</sup> ] ↑                    |
| [Ca <sup>2+</sup> ] 致敏剂 | 舒张功能↓; 早期心律失常                                                               | [Ca <sup>2+</sup> ] 敏感性↑; 抑制磷酸二酯酶; 抑制黄嘌呤氧化                                            |

续表

| 毒物种类   | 损伤效应                                                                                                             | 可能机制                                                                                                 |
|--------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 儿茶酚胺类  | 心动过速; 心肌细胞死亡                                                                                                     | $\beta_1$ -肾上腺素受体活化<br>冠状血管收缩; 线粒体功能障碍<br>氧化应激反应; 细胞凋亡                                               |
| 支气管扩张药 | 心动过速                                                                                                             | $\beta_1$ -肾上腺素受体非选择性活化                                                                              |
| 抗肿瘤药物  | 心肌病<br>心力衰竭                                                                                                      | 改变离子稳态; 氧化应激反应<br>冠状血管痉挛; 细胞凋亡<br>线粒体损伤                                                              |
| 抗菌药    | 负向肌力效应; 动作电位持续时间 $\uparrow$<br>QT 间期延长; 早期心律失常                                                                   | $[Ca^{2+}]$ ;<br>$K^+$ 通道阻滞                                                                          |
| 抗真菌药   | 负向肌力效应; 早期心律失常<br>传导阻滞                                                                                           | $Ca^{2+}$ 通道阻滞; 膜通透性 $\uparrow$<br>$Na^+$ 通道阻滞                                                       |
| 抗病毒药物  | 心肌病                                                                                                              | 冠状血管痉挛?; 线粒体损伤(抑制线粒体 DNA 聚合酶、抑制线粒体 DNA 合成和线粒体 ATP 合成)                                                |
| 中枢神经药物 | ST 段升高; QT 间期延长<br>传导阻滞; 早期心律失常<br>心动过缓; 抗胆碱能效应<br>心房纤颤; 负向肌力效应<br>ST 段降低                                        | 改变离子稳态<br>$Na^+$ 通道阻滞<br>$K^+$ 通道阻滞<br>$Ca^{2+}$ 通道阻滞                                                |
| 麻醉剂    | 负向肌力效应; 心排血量 $\downarrow$<br>早期心律失常; 传导速率 $\downarrow$<br>心脏传导阻滞; 心肌细胞坏死<br>拟交感神经效应; 兴奋性 $\downarrow$<br>缺血/心肌梗死 | $Ca^{2+}$ 通道阻滞; 改变 $Ca^{2+}$ 稳态<br>$Na^+$ 通道阻滞; 冠状血管痉挛<br>氧化应激反应; 线粒体损伤<br>$\beta$ -肾上腺素能受体敏感性增加细胞凋亡 |
| 抗组胺药   | 动作电位延续时间 $\uparrow$ ; QT 间期延长; 早期心律失常                                                                            | $K^+$ 通道阻滞                                                                                           |
| 免疫抑制剂  | 心肌病; 心力衰竭                                                                                                        | 改变 $Ca^{2+}$ 稳态                                                                                      |

抗病毒药物可诱导产生心脏毒性。齐多夫定(zidovudine, AZT)是一种广泛应用的抗病毒药物,可以引起成年患者心肌肥大。近年来采用高效抗逆转录病毒疗法(HAART)治疗艾滋病,显著提高了艾滋病患者的存活率,但同时带来了药物不良反应这一重要问题。标准的 HAART 治疗方案是用两种核苷逆转录酶抑制剂(NRTI)和一种蛋白酶抑制剂(PI)或一种非核苷逆转录酶抑制剂(NNRTI)联合作用。单纯 NRTI(如 AZT)已经能够引起心脏毒性,HAART 联合治疗方案更增加了心脏毒性。

有人检测了 18 名 AIDS 患者的心脏,其中有 5 例有心肌病。在 HIV 心肌病的心肌细胞检测到活性 Caspase-9、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和 Fas 配体,这些结果表明,HIV 心肌病患者体内的凋亡途径通过线粒体介导和死亡受体调控机制被激活,从而导致心肌细胞死亡。这一研究为 HIV 心肌病在细胞水平上提出了新的认识。究竟是 HIV 还是 HAART 亦或 2 者的联合作用导致了心肌细胞凋亡,尚须进一步研究。

采用 LP-BM5 鼠白血病逆转录病毒感染建立的鼠艾滋病模型进行的研究表明,AIDS 鼠同对



照组相比,缺血再灌注后出现左侧冠状动脉下行阻塞,左心室出现较大范围的坏死。采用8周龄半合子转基因 AIDS 小鼠(NL4-3 $\Delta$ gag/pol),分别给予10天和35天 HAART 治疗,然后进行超声心动、分子标记物和生化指标检测。结果显示,治疗35天后,转基因小鼠左心室体积增大,心房利钠因子的 mRNA 水平增加,肌质  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶的 mRNA 水平降低,血浆乳酸盐浓度也明显增高。病理和超微结构检查发现,心肌细胞发生颗粒性改变以及线粒体肿胀。治疗10天的小鼠只发现有心房利钠因子 mRNA 水平的增加。但对对照组的野生型小鼠治疗10天或35天后,均未引起任何病理、生物、分子及形态学上的改变。这一研究表明,HAART 治疗能够导致转基因 AIDS 小鼠产生心肌病,AIDS 与 HAART 的联合作用可能是导致心脏毒性的关键所在。

对于 HAART 引起的心脏毒性的研究中多数都报道了线粒体的损伤,AZT 就具有类似子线粒体 DNA 聚合酶的非竞争性抑制剂的作用。提示 HAART 心脏毒性可能是药物作用于线粒体造成的。此外,相关作用机制还涉及活性氧类物质(ROS)的产生及其介导的信号传导通路的改变。

### (三) 内源性物质和天然物质引起的心脏毒性

具有心血管毒性的内源性物质和天然物质主要包括类固醇激素、人工合成的类激素、细胞因子和动物毒素及植物毒素等物质。内源性物质和天然物质引起的心脏毒性效应和可能机制见表18-3。

表 18-3 内源性物质和天然物质的一般毒性效应

| 毒物种类                   | 损伤效应                                      | 可能机制                                                                                         |
|------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 雌激素                    |                                           |                                                                                              |
| 天然雌激素                  | QTc 间期延长?                                 | $\text{K}^+$ 通道性别差异表达?                                                                       |
| 合成雌激素                  | 心脏保护作用?                                   | 抗凋亡; 抗氧化; $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻滞?<br>$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶活性 $\uparrow$ ? |
| 非甾体雌激素                 |                                           | 其他机制?                                                                                        |
| 孕激素                    | 增强可卡因毒性?                                  | 机制不详                                                                                         |
| 雄激素                    | 心肌梗死; 心肌肥大                                | 线粒体损伤; [ $\text{Ca}^{2+}$ ] 稳态改变其他机制?                                                        |
| 糖皮质激素                  | 心肌肥大; 心肌纤维化                               | 胶原蛋白表达增加; 其他机制?                                                                              |
| 盐皮质激素                  | 心肌纤维化; 心力衰竭                               | 胶原蛋白表达增加; 其他机制?                                                                              |
| 甲状腺激素                  | 心悸; 正向肌力效应; 心排血量 $\uparrow$<br>心肌肥大; 心律失常 | [ $\text{Ca}^{2+}$ ] 稳态改变                                                                    |
| 细胞因子                   |                                           |                                                                                              |
| 白细胞介素-1 $\beta$ , 2, 6 | 负向肌力效应; 心肌细胞死亡                            | NO 合成酶表达增加; 细胞凋亡                                                                             |
| 干扰素 $\gamma$           | 心肌病; 心律失常                                 | NO 合成酶表达增加; 离子稳态改变                                                                           |
| 肿瘤坏死因子- $\alpha$       | 负向肌力效应; 心肌细胞死亡                            | NO 合成酶表达增加; 细胞凋亡<br>鞘氨醇增加; [ $\text{Ca}^{2+}$ ] 一过性降低                                        |

1. 类固醇激素 类固醇和相关激素包括雌激素、孕酮、雄激素和肾上腺皮质激素。心肌存在类固醇激素受体,因此,心脏是类固醇作用的靶器官之一。大量研究通过放射自显影技术、放

射配体分析、免疫印迹和逆转录酶链式反应等方法证实了心肌细胞中雌激素( $\alpha$ 和 $\beta$ )、雄激素、孕酮、盐皮质激素和糖皮质激素受体的表达,甲状腺激素受体也在心肌组织中被发现。研究已证实心肌组织能分泌类固醇激素,尽管合成量比其他组织低得多。类固醇及相关激素受体属于转录因子超家族。这些激素主要通过影响基因转录而发挥作用。然而,最近有证据表明类固醇及类固醇受体复合物可能通过非基因调控途径发挥作用,包括改变生长或死亡的信号通路,对膜结合生长因子受体的调节作用,以及改变离子通道功能。

2. 细胞因子 细胞因子(cytokines)是一类在细胞和体液免疫应答中具有多种重要功能的蛋白质。目前已发现100多种不同的细胞因子,这些细胞因子可被分为前炎症细胞因子、抗炎症细胞因子和心脏保护因子。前炎症细胞因子包括肿瘤坏死因子 $\gamma$ - $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-6、IL-8和趋化因子如MCP-1、MIP-1 $\alpha$ 和RANTES。抗炎症细胞因子包括IL-4、IL-10、IL-13和转化生长因子(TGF- $\beta$ )。心脏保护因子包括可以抑制心肌细胞凋亡的心肌营养因子(cardiotrophin-1, CT-1)和白血病抑制因子(LIF)。

3. 白细胞介素-1 $\beta$  白细胞介素-1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ )可以降低肌收缩力并且导致心肌细胞凋亡。IL-1 $\beta$ 对心肌细胞的影响可能是通过诱导氮氧化物合成酶和(或)增加氮氧化物产生来调节。氮氧化物合成酶的诱导与心肌收缩力降低有关,通过鸟苷环化酶活化,使cGMP增加,电子转运受抑制,使活性蛋白巯基发生亚硝化反应或产生活性氧,造成心肌细胞损伤。总的说对IL-1 $\beta$ 诱导心脏毒性的作用机制了解不多,除了IL-1 $\beta$ 的直接作用外,IL-1 $\beta$ 诱导心肌细胞编码IL-6的mRNA的表达,通过IL-6也可造成心肌细胞损伤。

4. 肿瘤坏死因子 $\alpha$  肿瘤坏死因子 $\alpha$ (tumor necrosis factor -  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )可以诱导包括心肌细胞在内的靶细胞凋亡。但是TNF- $\alpha$ 诱导心肌细胞凋亡的机制并不完全清楚,例如, TNF- $\alpha$ 可增加心肌细胞的神经酰胺和鞘氨醇产物,鞘氨醇暴露也会导致细胞凋亡。TNF- $\alpha$ 还可能通过增加鞘氨醇降低心肌细胞的收缩力,体现出与鞘氨醇类似的作用。TNF- $\alpha$ 也可诱导心肌细胞表达IL-6,进而对心肌细胞功能造成不利影响。

5. 其他细胞因子 IL-6可能通过诱导氮氧化物合成酶表达和增加氮氧化物产物导致心肌细胞收缩力降低。IL-2能够降低心脏力学功能和代谢效率,这些心脏损伤效应可能与氮氧化物合成和 $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$ 交换有关。干扰素可导致心律失常、扩张性心肌病和心肌缺血。IL-1 $\beta$ 和干扰素 $\gamma$ 协同作用可引起心脏氮氧化物形成,导致心肌细胞中Bax表达和心肌细胞凋亡。

6. 动物和植物毒素 动植物毒素含有心血管毒性成分,并可对心血管系统造成损伤。动物毒素包括蛇毒以及蜘蛛、蝎子和某些海洋生物所含有的毒素;植物毒素包括洋地黄、夹竹桃和附子等植物所含有的毒素。

## 二、心血管毒物对血管的毒性作用

环境和工业血管毒物包括胺基胺类、重金属类、硝基芳香类化合物、多环芳烃类化合物、一氧化碳、二氧化硫、丁二烯、氮氧化物、臭氧等。具有血管毒性的药物包括拟交感神经胺类、精神类药物、抗肿瘤药物、非甾体类镇痛抗炎药物、口服避孕药、放射性药物、磷酸二酯酶抑制剂等。具有血管毒性的天然物质和内源性物质包括细菌内毒素、T-2毒素、同型半胱氨酸、联氨安息香酸和维生素D等。常见血管毒物的毒性效应详见表18-4和表18-5。

表 18-4 环境及工业毒物的血管毒性

| 毒物种类             | 血管效应                               | 相关疾病           |
|------------------|------------------------------------|----------------|
| 丙烯腈              | 平滑肌细胞损伤; 大动脉平滑肌内膜增生                | 动脉粥样硬化         |
| $\beta$ -氨基丙腈    | 血管结缔组织损伤; 大动脉的损伤<br>动脉粥样硬化; 动脉瘤    |                |
| 砷                | 出血; 水肿; 肺内毛细血管通透性增加                | 肺水肿            |
| 丁二烯              | 多脏器血管肉瘤                            |                |
| 氮甲酰基胍            | 肺血管肿瘤                              | 癌症             |
| 二硫化碳             | 眼底及视网膜微血管受损<br>直接损伤内皮细胞; 动脉粥样硬化    | 冠脉疾病<br>动脉粥样硬化 |
| 氯代苯氧型除草剂         |                                    | 高血压            |
| 二甲基亚硝胺           | 肝脏血运减慢; 出血; 坏死                     | 静脉阻塞           |
| 二硝基甲苯            | ?                                  | ?              |
| 4-氟-10-甲基-12-苯基萘 | 肺动脉损伤; 冠状动脉损伤                      |                |
| 甘油               | 强烈收缩肾血管                            | 急性肾衰           |
| 氯化氢              | 出血; 肺水肿                            | 肺水肿            |
| 百草枯              | 肺、脑血管损伤                            | 脑紫癜            |
| 多环芳香烃            | 血管平滑肌增生                            | 动脉粥样硬化         |
| 吡咯烷类生物碱          | 肺血管炎; 平滑肌细胞血管损伤<br>肝脏中结缔组织的内皮及血管增生 | 肺动脉高压<br>肝静脉阻塞 |
| 有机磷杀虫剂           | ?                                  | 脑动脉硬化          |
| 氯乙烯              | 门静脉高压; 肝血管瘤                        | 癌症             |
| 汽车尾气             | 大脑半球的出血及梗死; 主动脉粥样硬化                | 动脉粥样硬化         |
| 一氧化碳             | 内膜损伤; 水肿; 动脉粥样硬化                   | 动脉粥样硬化         |
| 氮氧化物             | 小动脉内皮细胞空泡形成<br>肺泡毛细血管膜增厚、水肿        | 肺水肿            |
| 臭氧               | 肺动脉损伤                              | 肺水肿            |

表 18-5 药物及其相关毒物的血管毒性

| 毒物种类        | 血管效应                                                                            | 相关疾病                     |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|
| 抗生素/抗有丝分裂药物 | 肺内皮细胞的损害; 胃肠道出血<br>持续的肾血管狭窄; 门静脉血栓形成                                            | 肾功能衰竭                    |
| 血管活性药物      | 视网膜血管痉挛; 冠状动脉痉挛阻塞<br>血管痉挛(伴中度萎缩)                                                | 散在动脉损伤<br>血栓导致周围组织<br>坏死 |
|             | 外周动脉血栓(高脂血症的大鼠)<br>门静脉内皮细胞损伤<br>血管内膜增生; 冠状动脉老化<br>改变主动脉内皮细胞的结构<br>微绒毛增加; 内皮细胞受损 | 参与血栓形成<br>冠状动脉疾病<br>血管舒张 |
| 代谢药物        | 微血管的损伤                                                                          | 糖尿病; 失明                  |
| 抗凝血药物       | 脊柱水肿; 硬膜下水肿; 脉管炎                                                                | 顽固性出血                    |

续表

| 毒物种类      | 血管效应                                          | 相关疾病   |
|-----------|-----------------------------------------------|--------|
| 氰基丙烯酸酯胶粘剂 | 肉芽增生及瘢痕形成; 血管坏死<br>血管壁退行性变、血栓                 |        |
| 其他        |                                               |        |
| 富马酸氨苯唑啉   | 肺动脉内膜、中膜增厚                                    | 肺动脉高压  |
| 阿司匹林      | 内皮损伤; 胃糜烂<br>小血管闭塞; 局部缺血梗死                    |        |
| 胆固醇       | 动脉损伤                                          | 动脉粥样硬化 |
| 高半胱氨酸     | 血管的脆性增加; 内皮丢失<br>促进粥样斑中的平滑肌细胞增生               | 动脉粥样硬化 |
| 口服避孕药     | 脑及外周血管的血栓形成                                   | 血栓栓塞症  |
| 青霉胺       | 结缔组织的血管损伤-血管壁基质损伤<br>肾小球免疫复合物沉积<br>抑制血管结缔组织合成 | 肾小球肾炎  |
| 血栓素       | 末端脑血管收缩                                       | 脑血管缺血  |

### (一) 环境及工业心血管毒物引起的血管毒性

动物实验证实某些芳香族化合物是引起和(或)促进动脉粥样硬化过程的血管毒物。关于芳香族化合物毒性的研究多集中于多环芳烃,尤其是苯并(a)芘。苯并芘和7,12-二甲基苯并[a]蒽可引起鸟类的动脉粥样硬化。致动脉粥样硬化作用涉及细胞色素P-450介导前体化合物转化为有毒代谢中间产物,这些化合物的生物转化主要发生在主动脉平滑肌。动物实验发现Ah-反应小鼠比Ah-抗性小鼠的动脉粥样硬化易感性高,另外主动脉芳烃羟化酶与鸟类动脉粥样硬化易感性水平有关。近来研究表明了CYP1B1是人类和啮齿类动物血管细胞中表达的主要细胞色素P-450的同工酶。

苯并(a)芘在动脉粥样硬化易感和抗性动物物种的主动脉平滑肌细胞中影响PKC信号传导。其他芳香族化合物,如2,3,7,8-四氯二苯-P-二氧萘也能产生抑制PKC的作用,但机制有所不同。在培养的主动脉平滑肌细胞中观察到姐妹染色体交换、基因突变和DNA的程序外合成,提示苯并(a)芘的血管毒性可能是由遗传损伤和细胞生长抑制造成的。苯并(a)芘还可影响细胞周期调控、基因表达、抗氧化防御机制和基因组稳定性。总之,苯并(a)芘通过芳香烃受体介导的通路增强生长相关基因转录,与PKC相互作用及PKC失活,母体化合物转为可与DNA共价结合形成DNA加合物的代谢产物等多种机制引起平滑肌细胞增殖。

心血管毒物可以通过损伤内皮细胞和(或)中层平滑肌细胞导致或加重动脉粥样硬化,有些化学物如丙烯醛、丁二烯、环磷酸胺、重金属和半胱氨酸已被定为内皮毒物。大量动物实验证实动脉内皮细胞损伤可加快动脉粥样硬化过程,人和动物的高胆固醇饮食引起血浆脂蛋白增高,损伤内皮细胞,导致平滑肌细胞增殖。最近有证据表明LDL的氧化形式与血脂蛋白过多导致动脉粥样硬化有关。动脉粥样硬化也可以是中层平滑肌细胞受损的结果,丙烯胺、苯并(a)芘,二硝基甲苯和胍已被定为平滑肌细胞毒物。细胞增殖也许是一小部分细胞中的再生修复或基因交换

的结果,毒物会使平滑肌细胞处于遗传改变状态,暴露于趋化因子和促生长因子而引起损伤;或者突变引起平滑肌细胞中生长因子改变,导致生长自分泌刺激。从人类粥样动脉硬化斑中分离的 DNA 可以使 NIH3T3 细胞恶变,使裸鼠产生肿瘤,提示动脉粥样硬化细胞有细胞转化潜力。

## (二) 药物引起的血管毒性

某些治疗药物如抗菌剂和抗凝剂具有心血管毒性,可引起过敏反应和脉管炎,甚至通过损伤大血管引起出血。在某些急性中毒中可以见到药物引起的毛细血管损伤导致斑点性出血。由药物引起的凝血机制的改变增加了出血发生的可能。药物可通过使血小板聚集,粘附性增强,凝血因子增多或活性增强导致动脉和静脉中栓塞形成。可以通过影响抗凝血原Ⅲ(口服避孕类固醇)或抑制纤维蛋白分解(皮质甾类、含汞制剂)导致栓塞。静脉瘀血可促进静脉栓塞发展。静脉注射兴奋剂可以产生内皮损伤和导致多部位的栓塞。部分血栓可能会脱落并随血液流动,在比最初血管直径小的部位可再度栓塞,造成损伤的程度取决于栓塞部位,严重栓塞可以导致死亡。

## 第三节 心血管毒物的毒作用机制

### 一、心脏毒性的一般机制

心血管毒物种类繁多,所致心血管系统的损伤效应也很复杂,不同的心血管毒物毒作用机制不尽相同,心脏毒性的一般机制及产生的细胞毒性效应见表 18-6。

表 18-6 心脏毒性一般机制

| 一般机制                                         | 细胞效应                                                                               | 器官改变                      |
|----------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
| 干扰离子内环境稳态                                    |                                                                                    |                           |
| 抑制 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶 | $[\text{Ca}^{2+}] \uparrow$ ; 传导速率 $\downarrow$                                    | 正向肌力效应; 心律失常              |
| $\text{Na}^+$ 通道阻滞                           | $\text{Na}^+$ 通道活性 $\downarrow$ ; 传导速率 $\downarrow$                                | 心律失常                      |
| $\text{K}^+$ 通道阻滞                            | $\text{K}^+$ 通道活性 $\downarrow$ ; 复极化 $\downarrow$ ;<br>动作电位延续时间 $\uparrow$         | 心律失常                      |
| $\text{Ca}^{2+}$ 通道阻滞                        | L-型 $\text{Ca}^{2+}$ 通道活性 $\downarrow$ ; 诱导 $\text{Ca}^{2+}$ 释放 AV 传导 $\downarrow$ | 负向肌力效应; 心动过缓<br>负变时性效应    |
| 冠状血流改变                                       |                                                                                    |                           |
| 冠状血管收缩或闭塞                                    | 缺血(ATP 耗竭, 细胞内酸中毒)                                                                 | 心肌梗死; 心肌重建;<br>心肌细胞死亡(坏死) |
| 缺血/再灌注损伤                                     | 氧化应激反应 $\text{Ca}^{2+} \uparrow$ ; 细胞 pH 改变                                        | 心肌细胞死亡                    |
| 氧化应激反应                                       | 过氧化作用; 线粒体功能障碍; DNA 损伤;<br>$[\text{Ca}^{2+}]$ 稳态改变                                 | 心肌细胞死亡                    |

续表

| 一般机制    | 细胞效应                                        | 器官改变   |
|---------|---------------------------------------------|--------|
| 细胞器功能紊乱 |                                             |        |
| 肌纤维膜损伤  | 改变膜完整性                                      | 心肌细胞死亡 |
| 肌质网功能紊乱 | 改变 $[Ca^{2+}]$ 稳态                           | 心肌细胞死亡 |
| 线粒体损伤   | ATP 酶耗竭; 细胞色素 C 释放;<br>改变线粒体 $[Ca^{2+}]$ 稳态 | 心肌细胞死亡 |
| 细胞凋亡    | 细胞皱缩; 肌纤维出胞; 染色质凝聚<br>膜磷脂再分布; DNA 断裂        | 心肌细胞死亡 |
| 增生改变    | 细胞肿胀; 肌纤维出胞; 染色质凝聚; 线粒体<br>肿胀               | 心肌细胞死亡 |

从现有研究工作来看,心脏毒性的一般机制涉及以下方面:

1. 影响离子稳态 心肌动作电位和兴奋-收缩偶联依赖于离子通道活性(ion channel activity)和离子稳态,任何心血管毒物只要能够影响离子转运和离子稳态(ion homeostasis),都可造成心血管的毒性和损伤。

2. 冠状动脉血流改变 心血管毒物能诱发冠状动脉的痉挛、狭窄并引起冠状动脉血流改变(altered coronary blood flow),造成心肌缺血及缺氧,心肌细胞代谢异常,最终导致缺血性心脏病。

3. 缺血-再灌注损伤 心肌缺血导致心肌细胞酸中毒、氧化磷酸化障碍和 ATP 衰竭,持续的心肌缺血再灌注(ischemia-reperfusion injury)会导致组织继发性损伤,损伤作用与氧自由基形成、 $Ca^{2+}$  过负荷、pH 值改变及线粒体氧化磷酸化过程有关。

4. 心肌肥大 心肌细胞属于终末分化细胞,随机体发育过程心肌细胞可出现生理性肥大。在心血管毒物作用下,心肌肥大(heart hypertrophy)基因可过度表达,造成病理性心肌肥大,使心肌细胞受损,诱发肥大性心脏病。

5. 氧化应激 心肌细胞在生理及病理性情况下均有活性氧产生,正常生理状态下体内抗氧化机制可以及时清除自由基,防止氧化损伤。心血管毒物能够造成机体氧化-抗氧化过程失衡,诱发脂质过氧化反应,造成心肌细胞的氧化损伤。

6. 细胞凋亡与坏死 细胞凋亡与坏死(apoptosis and necrosis)是心肌损伤过程中常见的细胞结局,这两种细胞死亡形式的作用机制及调控途径不同,形态学特征也易于鉴别,但在细胞损伤过程中往往同时出现。细胞凋亡的调控至少包括死亡受体调控和线粒体介导的凋亡调控两种途径。

7. 线粒体损伤 心脏属高耗能器官,含有丰富线粒体。心血管毒物可以造成线粒体结构及功能改变,影响细胞呼吸链电子传递,使氧化磷酸化异常,细胞能量代谢障碍。代谢过程中产生的活性氧可以造成细胞氧化应激。另外,经线粒体途径可以导致细胞凋亡及坏死。

## 二、心肌适应

\*\*\*\*\*

心肌适应是心肌在结构和功能上发生适应性改变的过程,也称心肌重建(remodeling)。在心

肌成熟过程中,心肌适应有益于心脏满足机体不断增加的需求。如果短期内暴露于环境心血管毒物,心肌重建过程可能是适应性的,但对长期暴露却适应不良,最终导致心肌功能紊乱。心肌重建的主要特征是与心室形态变化相联系的心肌细胞质量增大以及代偿修复过程中的心肌形态功能改变。

另外,有学者提出了心肌预适应(preconditioning, PC)的概念,即预先给予心肌某种适度的刺激(如短暂缺血或机械刺激等),可使心肌对随后受到的更强的有害刺激产生耐受性或适应性。研究证实,心肌预适应可引起腺苷、缓激肽、去甲肾上腺素、血管紧张素Ⅱ、内啡肽、内皮素等多种内源性物质及细胞因子释放,通过与G蛋白偶联的相关受体的作用,可激活PKC,通过PKC途径活化即早基因,启动机体抗损伤及保护机制。

### 三、心脏毒性的分子机制

环境心血管毒物对心肌最为严重的损伤是凋亡和坏死导致的心肌细胞死亡。心肌细胞像其他细胞一样,存在细胞死亡程序和固有的死亡机制,心血管毒物可以激活这些程序。同时,机体具有损伤修复和保护机制,心血管毒物在激活死亡程序的同时也会启动机体保护机制。因此,死亡机制和机体保护机制的作用与平衡决定细胞结局。心血管损伤效应的可能作用机制及调控途径见图18-2。

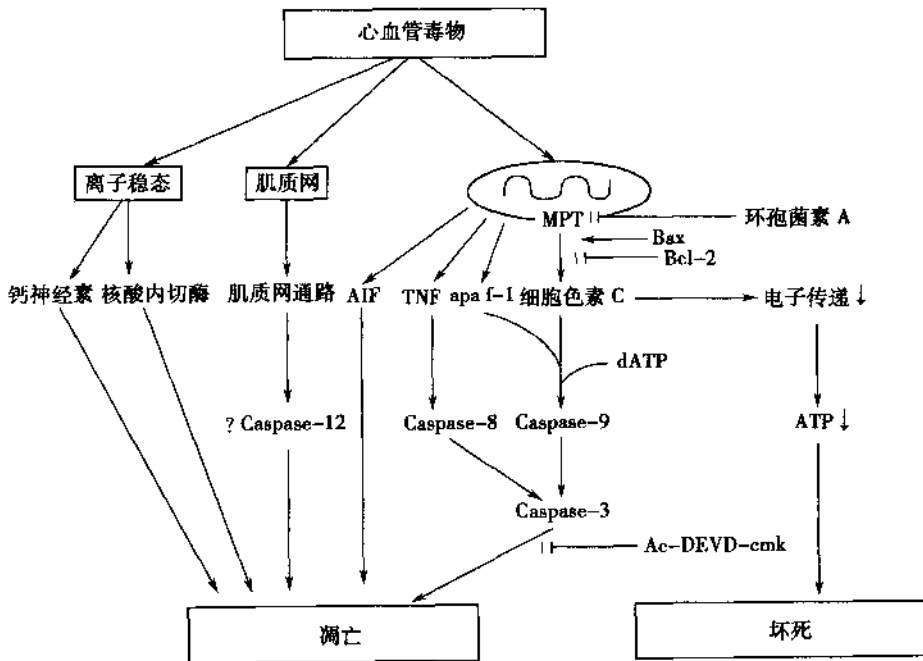


图18-2 心血管毒物损伤效应的可能作用机制及调控途径

#### (一) 心肌肥大

心血管毒物作用引起最早的心肌形态学改变是心肌肥大。虽然肥大反应最初是一个增加心

脏输出的代偿性机制,但持续的肥大能引起扩张性心肌病、心力衰竭和猝死。心血管毒物作用引起心肌细胞分子层面的一系列改变,包括胚胎心脏基因上调、诱导即早基因表达、蛋白质合成增加和细胞增大,这些反应共同引起心肌肥大。参与心肌肥大的转录因子包括活化蛋白-1(AP-1)、转录增强因子-1(TEF-1)、血清反应因子(SRF)、活化T细胞核因子(NFATs)和GATA4,这些转录因子作用于信号传导通路并调控肥大基因表达。

## (二) 心肌结构和功能改变的分子基础

$\beta$ -MHC 和  $\alpha$  骨骼肌肌动蛋白基因表达程序重调与心肌肥大有关。通过这些分子调控过程引起心肌细胞中肌纤维和线粒体数目增多、细胞形态增大、心室壁增厚和心肌肥大,继而造成组织低灌注,导致机体代偿机制如交感神经系统和肾素-血管紧张素系统的激活。

机体神经体液的代偿反应机制激活负向调节激素,如心钠素(ANP)和B型利钠肽(BNP)。ANP和BNP的长期表达使心肌细胞功能紊乱、凋亡和细胞缺失,引起心肌损伤甚至心力衰竭。在胚胎发育阶段ANP基因在心房和心室都有表达,但是在出生后不久心室的表达下调。心房成熟心肌细胞成为ANP的主要合成部位。在心肌出现病理性重建时,心室细胞ANP重新出现表达。近期研究证实ANP是引起心肌凋亡的因子,在心力衰竭的形成过程中凋亡起到关键作用。因此,ANP的血清浓度在实验上和临床上被作为监测心力衰竭的重要指标。

## (三) 蛋白激酶C与心肌信号通路

PKC(protein kinase C)和PKC信号传导通路是心血管毒物中研究较多的问题之一,研究证实心血管毒物可经PKC信号传导通路导致心肌肥大和心力衰竭。PKC激活后,细胞增殖或凋亡与下游的调控事件有关。PKC活化可使G蛋白磷酸化,蛋白活性因磷酸化而下调,cAMP水平升高,即早基因活化,从而启动凋亡程序。PKC活化也可使某些转录因子如NF- $\kappa$ B磷酸化,NF- $\kappa$ B可从与其抑制剂IKB形成的复合物中分离并进入核内,激活转录过程,通过对细胞增殖相关基因的调控使细胞增殖。目前认为,cAMP反应途径(CRE)、TPA反应途径(TRE)和血清反应途径(SRE)及细胞周期调控相关的转录因子参与了对基因表达的调控。PKC和MAPK<sub>5</sub>(mitogen activated protein kinase)在心肌细胞凋亡信号传导中的确切作用仍不清楚。研究发现心血管毒性刺激如阿霉素、I/R损伤和ROS损伤可以活化MAPK<sub>5</sub>,ERK1/2活化可能是心肌细胞的一种保护机制,JUK/SAPK和P<sup>38</sup>MAPK<sub>5</sub>的活化则促进心肌细胞凋亡。

## (四) 心肌细胞死亡的线粒体调控途径

线粒体是心肌细胞凋亡的重要调控途径。线粒体外膜存在Bcl-2蛋白家族,包括前凋亡蛋白(Bax、Bad、Bak)和抗凋亡蛋白(Bcl-2、Mcl-1、Bcl-X<sub>1</sub>)。生理条件下心肌细胞大量表达Bcl-2及其他抗凋亡蛋白,如果Bax表达上调则细胞可能进入凋亡程序。心肌细胞死亡及其调控过程与线粒体结构功能改变有关,细胞色素C和Caspase-3等因子可被心血管毒物激活,通过氧化应激介导信号传导通路引起心肌细胞死亡。

心肌细胞在毒物作用下发生线粒体的渗透性转变(mitochondrial permeability transition, MPT)。MPT的发生可能是短暂的,但能迅速变成不可逆过程并伴有线粒体稳态丧失和线粒体



高度肿胀。线粒体肿胀能引起外膜破裂,将膜内的蛋白质及细胞色素 C 释放到胞质中。另一个引起线粒体细胞色素 C 释放的可能机制是 Bcl-2 家族的一个前凋亡蛋白 Bax 的作用。在氧化应激条件下 Bax 在包括心脏在内的许多器官过表达, Bax 由胞质向线粒体转移定位,在线粒体外膜上形成小孔,但保持内膜的完整性,这种机制说明 Bax 介导的细胞色素 C 释放是 MPT 非依赖的。在心肌凋亡中,细胞色素 C 从线粒体释放到胞质是一个关键的起始步骤。细胞色素 C 与凋亡蛋白酶激活因子-1(Apaf-1)、Caspase-9 及 ATP 聚合,随后激活 Caspase-9 和 Caspase-3,启动凋亡级联反应,最后导致多聚 ADP 核糖聚合酶(PARP)和蛋白激酶 C- $\delta$ (PKC- $\delta$ )失活。

### (五) 心肌死亡信号中的细胞因子

心肌细胞既是细胞因子的来源也是它的靶细胞。IL-1、IL-2 和  $\gamma$  干扰素能诱导包括心肌细胞在内的靶细胞产生 TNF。在慢性心力衰竭中 TNF- $\alpha$  和 Fas 配体的血清浓度升高,因此, TNF- $\alpha$  和 Fas 配体可作为慢性心力衰竭的生物标志。TNF- $\alpha$  最重要的作用是诱导心肌细胞凋亡, TNF- $\alpha$  诱导的心肌凋亡通路由 TNF 受体(TNFR1 和 TNFR2)所介导。这些受体的激活引起 Caspase-8 的激活,线粒体向核聚集并释放细胞色素 C,引起线粒体膜电位丧失、细胞皱缩和核浓缩,最终导致细胞凋亡。此外, Caspase-8 能直接激活 Caspase-3,引起细胞凋亡。

IL-6 是一个多功能的细胞因子,介导免疫和炎症性反应。在有心力衰竭的病人中观察到了血清 IL-6 浓度升高。一个新的 IL-6 受体家族成员心肌营养因子-1 最近克隆成功。心肌营养因子-1 具有神经生长因子的作用,并且也能引起心脏肌细胞肥大。心肌营养因子-1 在体外条件下可以抑制细胞因子诱导的凋亡,而在心肌病理状态下的作用仍有待研究。

内皮素-1 在心肌病形成过程中具有重要作用。它产生于心脏的内皮细胞、心内膜和肌细胞等多种类型细胞。心肌中内皮素-1 的限制表达被认为是对应激的适应性反应,可提高心肌收缩力和增加肌细胞蛋白合成率。然而,内皮素-1 的过表达通过产生局部血管痉挛、肌细胞崩解和增加心肌纤维化使心肌适应不良。在大鼠模型中,心肌梗死伴有内皮素-1 高表达,利用特异性拮抗物(BQ-123)对内皮素 A 受体的选择性抑制可提高这些动物的存活率。

### (六) 心脏毒性中钙的作用

研究表明, Ras、MAPK 和 PKC 信号通路在心肌对肥大性刺激的反应中具有重要作用。所有这些信号传导通路都与细胞内  $Ca^{2+}$  浓度和肌肉收缩力的增加有关。钙在心肌肥大反应中的可能调控作用是通过肥大性刺激(如血管紧张素 II)引起细胞内钙增高及钙神经素激活,通过钙神经素激活引发一系列反应,包括 NFAT<sub>3</sub> 的去磷酸和移位到核内,在核内与 GATA<sub>4</sub> 相互作用。钙神经素也可能通过 NFAT 非依赖的机制调节心肌肥大。

### (七) 氧化应激与有丝分裂原激活蛋白激酶

氧化应激和 MAPK 与心肌重建有关。在 MAPK 家族中,有关 P<sup>38</sup>MAPK 在心肌凋亡中作用的研究较多。P<sup>38</sup>MAPK 是 MAPK 超家族中一个应激反应亚族。这个亚家族包括 P<sup>38</sup> $\alpha$ 、P<sup>38</sup> $\beta$ 、P<sup>38</sup> $\gamma$  和 P<sup>38</sup> $\delta$ 。近期研究证实了 P<sup>38</sup>作为一个重要的信号分子群在多种细胞类型中介导环境应激反应。在非心脏细胞中, P<sup>38</sup>MAPK 在对内毒素、细胞因子、机械力和化学损害的反应中引起基因表达、形态学改变和细胞死亡。在心脏细胞中,已有报道 P<sup>38</sup>MAPK 在缺血再灌注处理的的心脏中与凋亡

的发生有关。P<sup>38</sup>MAPK 的激活与应激条件下产生的活性氧积累有关。

#### (八) 凋亡的肌质网通路

凋亡的肌质网通路最近才被提出。定位于内质网(ER)的 Caspase-12 被 ER 应激激活。ER 应激包括内质网钙稳态破坏和 ER 中过多蛋白质蓄积。Caspase-12 缺陷小鼠对 ER 应激引起的凋亡具有抗性。因此,认为是由 Caspase-12 介导 ER 特异性凋亡通路。这条通路对心肌细胞的影响有待深入研究。

### 四、血管毒性的一般机制

从血管毒物的生物转运角度来看,无论何种暴露方式,在到达靶部位之前都要先接触血管细胞,这样使血管细胞极易成为靶细胞而遭受毒物的损害,流行病学调查及实验室研究也证实了血管毒物与动脉粥样硬化及其相关心血管疾病发病率及死亡率有关。

血管毒性可涉及多种细胞和细胞成分的相互作用,并在形态、代谢和基因水平表现出来。毒性损伤一般从血管腔到血管壁深层,内皮细胞是第一层细胞屏障,这种位置使内皮细胞更易受到损害。血管毒物可引起内皮细胞中层平滑肌细胞和(或)外膜或纤维细胞的损伤。血管毒性反应受以下因素影响:①细胞外基质蛋白;②凝血因子;③调节血管功能的激素和生长因素;④血浆脂蛋白。

血管毒性的机制包括:①膜的结构和功能的变化引起血管反应性改变;②毒物暴露可能造成氧化应激,导致基因调节机制、抗氧化损伤机制紊乱以及稳态丧失,从而产生血管毒性;③血管特异性毒物的生物活化;④血管细胞中毒物选择性蓄积。不同的血管毒物常涉及不同机制,也可能多种机制并行,但血管细胞的生长和分化调节通常是血管毒性的观测终点。

血管对某些血管毒物的选择性蓄积是引起血管毒性的一个重要因素,目前对血管毒物选择性蓄积的机制尚不清楚。已有多种血管毒物成分在动脉粥样硬化灶中被确认。血管毒性的产生是血管毒物与血管细胞及非血管细胞如单核细胞、T 细胞相互作用的结果,在此过程中血浆脂蛋白、胞外基质蛋白、凝血因子、免疫复合物、激素及细胞因子具有重要作用,所涉及的信号传导及分子调控过程有待深入研究。

## 第四节 心血管毒性的检测与评价

心血管毒理学的研究方法可分为人群研究和实验研究两类。人群研究主要采用循证医学和流行病学的理论和方法,研究心血管毒物暴露与心血管疾病的关系,观察暴露人群发病率和死亡率变化,进行归因分析及危险性评价。心血管毒理学试验可以体内和体外两种方式进行。体内试验结果能够反映毒物作用在机体整体、器官、组织、细胞和生物大分子水平产生的毒性效应。采用心血管疾病动物模型和转基因动物模型进行的体内试验,会从特定的疾病和基因的角度获取重要信息,对确定心血管毒性效应和研究毒作用机制是不可缺少的手段。由于心肌细胞的分化和增殖能力十分有限,心血管毒理学试验大量采用了体外试验的方法,对了解心肌细胞形态、

功能变化,信号传导过程及基因调控过程很有帮助,但由于是离体条件,实验结论需要考虑生理条件下的诸多影响因素并加以验证。全胚胎培养方法不属于严格意义上的体内和体外试验方法,一定程度上具备了两者的特点,在心血管毒理学研究尤其是心肌细胞和心脏发育研究方面会有更广泛的应用。

## 一、心血管毒理学实验模型

心血管毒理学实验模型包括动物模型、全胚胎培养模型和细胞(系)模型。选择并建立适当的实验模型是开展心血管毒理学研究工作的前提。

### (一) 实验动物模型

动物模型可分为一般实验的动物模型、动物病理模型和转基因动物模型。心血管毒理学常用的一般实验动物模型包括哺乳类、啮齿类动物。选择实验动物要考虑受试动物的代谢过程要尽量与人类接近;动物应易获得且成本较低;模型动物对受试毒物反应的个体差异要小,以及对所观测的毒性效应指标有较高的敏感性。要注意不同实验动物模型对特定疾病的反应性差异和某些心血管毒物可在特定类型的细胞中选择性蓄积。

动物病理模型是根据研究需要,采用外科、药物或其他化学物处理方法,使受试动物心血管系统形成特定的病理改变所得到的动物模型。动物病理模型主要用来研究心血管毒物对特定病理改变的影响、毒性效应之间的关系、影响因素、干预措施的效果评价以及毒作用机制和拮抗机制。

在心血管毒理学研究中使用转基因动物模型,主要研究导入基因对心血管毒性及调控过程的影响,敲除某个特定基因引起的效应改变,从而确定基因功能,探讨心血管毒作用分子机制。转基因动物模型常采用小鼠,此外,也有采用大鼠或其他动物制作的转基因动物模型。

在心血管毒理学研究当中还涉及心肌基因的转导。基因转导有别于一般意义的基因转染和转基因技术中的基因导入,它主要是利用直接注射和转移载体将外源基因导入受试动物。基因转导的优点是操作简单、成本较低,缺点是直接注射造成心肌损伤,导入基因的表达量有限。采用转移载体的转导应考虑载体的靶向性和在心脏的特异表达。鉴于心肌细胞终末分化的特点,心肌基因转导在转基因研究及基因治疗中将具有实际意义。

### (二) 全胚胎培养模型

全胚胎培养模型是将动物处于器官形成期的胚胎在离体条件下进行多气体动态培养,目前多采用大鼠胚胎进行全胚胎培养。这种实验模型同时具有体外试验和体内试验的一些特性,既可从细胞角度研究胚胎心肌细胞的毒性反应,又可观察毒物对心血管系统发育的影响。但由于培养介质和体外培养的限制以及胚胎阶段机体许多系统和器官发育未成熟及功能不完善,全胚胎培养的实验结论可能有别于体内试验,尤其是成熟动物的体内实验。尽管如此,全胚胎培养模型仍不失为比较适合心肌细胞特性的实验模型。

### (三) 细胞(系)实验模型

在心血管毒理相关研究中大量使用细胞(系)作为实验模型。细胞(系)模型包括成熟心肌

培养、胚胎心肌原代培养、血管平滑肌培养和其他相关细胞(系)培养,需要说明的是,心肌细胞具有终末分化的特点,它的增殖分化能力十分有限,尽管有些心肌细胞可以传代并具有心脏的表型,但是到目前为止还没有心肌细胞系。培养的成熟心肌细胞一直被用作体外试验模型,但由于其保存时间短,细胞结构有别于在体内心肌细胞而受到许多限制。目前用于成熟心肌细胞培养的方法有去分化法和快速吸附法。去分化法培养的心肌细胞可保存数周到数月,但心肌结构发生改变,且培养需要血清,血清中的细胞因子对心肌细胞的影响不易控制。快速吸附法培养细胞能存活14天,且能保持心肌细胞的柱状、纹状形态。如何保证培养的成熟心肌细胞与在体成熟心肌细胞生物学特性的一致性,是成熟心肌细胞模型使用的关键。

胚胎心肌细胞是心血管毒理学研究中最常用的心肌细胞实验模型。胚胎心肌细胞具有在体心肌细胞的大部分特性,又具有一定的增殖能力,主要用来研究心血管毒物对心肌毒性效应和作用机制。由于胚胎心肌细胞是处于特殊发育阶段的心肌细胞,胚胎心肌细胞表现的毒性效应并不能完全等同于在体成熟心肌细胞对毒物的反应。

## 二、形态学和功能学检测与评价

心血管毒物作用可引起心血管系统中脏器、组织、细胞及生物大分子的一系列形态和功能改变。检测和评价这些形态和功能变化对了解心血管毒物毒性,确定毒物与损伤效应及心血管疾病的关系,探讨毒作用机制十分重要,对心血管毒性的拮抗和心血管病的有效防治也具有理论意义。

心血管毒性的形态学检测包括组织病理学方法、免疫组织化学方法、分子杂交方法、图像分析技术和激光共聚焦扫描显微技术。组织病理学方法可对毒物造成的心脏血管损伤进行光镜下的病理分析,也可采用电镜对心脏血管组织及其亚细胞结构进行超微结构观察。利用免疫组织化学方法可对心脏血管细胞中的抗原抗体反应进行检测。分子杂交以及原位杂交方法可以证实样品组织和细胞中特异性DNA或RNA序列的存在。图像分析技术可采集心血管系统损伤的形态学数据并加以量化处理。激光共聚焦扫描显微技术则可对心脏和血管细胞进行活细胞动态观察,三维断层扫描与重组以及DNA、RNA、抗原、抗体、酶等生物大分子在细胞内的定性、定量和定位分析。

心血管毒性的功能学检测包括心血管功能检测和相关细胞功能检测。心血管功能检测可采用心电图、心电向量图、心阻抗血流图、超声心动图及磁共振技术进行。同时,可利用生物化学和细胞生物学及分子生物学技术对心血管损伤出现的敏感、特异的生物标志物进行检测。细胞功能的检测可从细胞、亚细胞及分子层面进行,比如细胞膜结构功能的改变、酶活性变化、线粒体等细胞器的功能改变、细胞氧化损伤、细胞凋亡和坏死、DNA损伤与修复、基因结构功能改变、信号传导过程及分子调控过程等。心血管毒性的形态学检测和功能学检测是相互联系的,细胞形态学的改变可能体现出功能变化,如心肌细胞凋亡和坏死可采用形态学方法检测,但实质是反映心肌细胞功能的改变。反之,心肌细胞损伤后某些生物标志物如ANP在血中含量的变化,也可反映心肌梗死的形态学和病理学改变。

(孙志伟)



### (一) 表皮

表皮约占皮肤全层的5%，起源于外胚层。根据细胞特征，可分为5~6层(图19-1)：①基底层：基底层的角质形成细胞代谢活跃，具有分裂能力，不断上移分化形成其他几层。②棘突层：与基底层相邻，细胞之间以桥粒连系，相似棘，故称为棘突层。细胞内含板层颗粒，这些颗粒和细胞膜融合，释出中性脂，形成表皮屏障。③颗粒层：棘突层之上是颗粒层，细胞内含角质透明蛋白(keratohyalin)和多核糖体(polyribosomes)。颗粒层是表皮最上层的活性(viable)细胞。④中间带：该层将颗粒层和透明层分开，中间带细胞可能含有代谢外源化学物质的酶，但无合成蛋白质的能力。⑤透明层：掌跖部位明显可见透明层，其他身体部位此层不易区分。⑥角质层：位于表皮最上方，细胞无核，失去代谢活性，细胞内主要成分是角蛋白(keratin)和硬蛋白(链间靠二硫键和氢键维系)。这些细胞间的连接逐渐断裂，不断脱落。

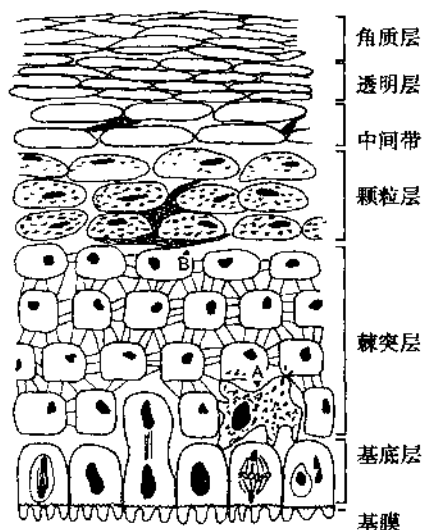


图19-1 表皮全层 A = 黑色素细胞；  
B = 朗格汉斯细胞

角质形成细胞分化过程中，大小和形状也发生了变化：基底层细胞呈立方形，直径约 $5\mu\text{m}$ 。其他层细胞逐渐伸长变扁。角质层细胞呈扁平状(鳞状上皮)，长径约 $30\mu\text{m}$ 。基底层呈乳头样，增加了皮肤活性层的面积，为其上层细胞的更新提供了较大的储备。表皮细胞不断增生、分化、移动和脱落，其更新(turnover)周期约为15~70天，随解剖部位而异，如人手掌的更新周期32~36天，前臂腹侧面约58天。

表皮还含两种树突状细胞，即黑色素细胞(melanocyte)和朗格汉斯细胞(Langerhans cell)。每平方米正常皮肤含460~1000个树突状细胞。黑色素细胞起源于胚胎神经脊细胞，与基底层紧密相邻。它产生的黑色素借助其树突被转运至多个基底层角质形成细胞内，是人体黑色素的主要来源。朗格汉斯细胞来自骨髓。该细胞膜表面表达Ia(免疫识别)抗原和IgG和C3受体，能摄取小分子的非脂物质，变态反应部位朗格汉斯细胞数目明显增加。这些细胞内含有代谢外源性化合物的酶，一些代谢产物可能引发变态接触性皮炎。

### (二) 真皮

基膜将表皮和真皮分开。表皮和真皮分别通过胚根和结缔组织纤维附着于基膜。附着部位称为边缘层(marginal layer)，过碘酸希夫(periodic acid schiff)染色反应阳性。附着部位偶尔会出现断裂。表皮剥脱(exfoliative)时可见大的断裂。

真皮约占皮肤全层的95%，起源于中胚层，分为两层。和表皮乳头部相邻的凹凸状真皮结缔组织被称为真皮乳头(papillary dermis)。乳头层的下方是网质层(reticular dermis)。两层均含有纤维，乳头层的纤维较细。网质层含粗大的胶原纤维束，尤其在血管和皮肤附属器周边更为明显。无定形基质填充于结缔组织纤维之间。基质由蛋白质和葡糖胺聚糖(glycosaminoglycans)组

成。基质成分来源于成纤维细胞和血浆。纤维束和基质是皮肤韧性弹性的物质基础。

除软骨和骨,真皮几乎含所有的组织类型。皮肤的附属腺包括外分泌汗腺、皮脂腺和毛囊。真皮还分布有特殊感觉神经细胞末端、脂肪小叶、移居的白细胞和肥大细胞。肥大细胞大多分布于血管、皮肤附属器和神经周围,似乎和一些炎症反应机制有关。肥大细胞颗粒中含组胺、肝素和血管活性物质。IgE 结合物、激活的血清成分和一些酶可刺激肥大细胞,使其脱颗粒释放介质。这些介质释放同时伴随花生四烯酸代谢产物等炎性介质的形成。

真皮的下方是皮下组织,即脂肪组织层。皮下组织厚度因性别、年龄、饮食和部位有很大差别。皮肤的血液供应来自皮下组织。

人和动物的皮肤存在很大的差异。最大的差异是皮毛,人类的皮毛已退化,除头发、胡须和腋毛等,人体大多部位毛细软而短,兽类皮肤毛极多。低等哺乳动物,每根毛干可含几个毛囊,大毛囊起自网质层,附属的小毛囊起自真皮乳头部位。人皮脂腺的密度  $100 \sim 900/\text{cm}^2$  不等;低等哺乳动物皮脂腺分布较均衡。人汗液主要由外泌汗腺分泌;顶浆分泌是动物汗液的主要分泌形式。顶浆分泌汗液偏碱,故动物皮肤表面 pH 值略高于人。有报道不同物种肥大细胞颗粒物成分不完全相同,所以对炎性介质的敏感性存在差异。

## 二、皮肤的功能

### (一) 屏障功能

外来物引起皮肤损伤和全身中毒,需经过表皮层的弥散、穿透作用以及真皮的吸收作用。外来物吸收量的多少,除了同它的理化性质有关外,还同表皮的屏障功能以及真皮的血流量有关。一般认为外来物进人体内需穿过皮肤的三道屏障。

1. 表面膜 皮肤表面有一层膜,由甘油三酯、磷脂、胆固醇酯、皮脂腺分泌的物质和汗腺分泌的盐分组成。此膜的 pH 正常范围  $4.4 \sim 5.6$ ,呈酸性,它几乎可穿透皮肤全层。对水溶性的化学物质有一定的阻滞作用,由于角质细胞不断脱离与新生,被阻滞的化学物质也随之脱落。

2. 表皮屏障 主要由角质层下部和透明层组成。角质层由多层角化细胞组成,越向下排列越密。角质细胞膜较厚(约  $150\text{Å}$ ),外来物穿透较困难,角质层底部细胞间隙狭窄,而且间隙中有板状脂类和细胞间桥。角质细胞内又充满纵横交错的  $\alpha$  角蛋白丝和无定型的基质(主要为透明角蛋白)。这就构成了表皮的穿透屏障。

3. 真表皮交界 即边缘层部位,主要由硬蛋白、糖蛋白和粘多糖蛋白构成。对外来物具有选择屏障作用。

### (二) 皮肤吸收(吸收功能)

皮肤虽然有重要的屏障作用,但许多物质仍可缓慢穿透皮肤。当角质层破损(如鳞癣、擦伤或胶布剥脱角质层),皮肤通透性差的物质透皮性明显增加。表皮的活性细胞层(颗粒层、棘突层和基底层)允许疏水性的物质通过细胞膜;水溶性的物质可弥散入细胞内液。穿透皮肤进入真皮的物质很容易吸收进入血循环。

皮肤吸收率是估计皮肤暴露物危害的重要指标。通过对大量药物、农药和污染物的结构-穿

透关系的研究得出以下皮肤穿透公式： $\text{Log } P_{\text{sw}} = C_1 - C_2(MW) + C_3 \text{Log} K_{\text{ow}}$   $P_{\text{sw}} =$  皮肤穿透； $C_1$ 、 $C_2$ 、 $C_3 =$  经验常数； $K_{\text{ow}} =$  辛醇-水分配系数。此公式描述了某物质进出角质层速率相等的稳态情况。由于疏水性强的物质进入棘层缓慢，虽然外部的暴露已终止，但被该暴露物饱和的角质层相当于储蓄库，能在相对长时间向体内释放暴露物。

不同部位表皮的弥散速率不等，在稳态情况下通透性增强的顺序为：脚底部 < 手掌 < 阴囊 < 前额 < 腹部。一些物质可经皮肤附属器进入机体，附属器的相对面积仅占皮肤总面积的0.1% ~ 1%，可忽略不计。但在穿透的初始，角质层的渗透缓慢，皮肤附属器的相对直接的传输在短期暴露中无疑起了重要的作用，另外，皮脂腺还可能成为一些脂溶性药物的储存库。

### (三) 生物转化

皮肤(主要是表皮和皮脂腺)含有酶系统，可进行酶促生化反应。正常情况皮肤 I 相反应的酶仅相当于肝脏 I 相反应酶的 2%，但诱导后其活性明显增加。例如，用苯并(a)芘处理新生大鼠的表皮，皮肤芳香羟化酶的活性增加了 20%。TCDD、多环芳烃、多氯联苯、天然煤焦油(用于皮肤治疗)等可诱导表皮中 P-4501A1 的活性。已发现皮肤中含有多种 P-450，如 P-4502B12 和 2B19 参与花生四烯酸代谢，P-450 酶活性存在明显的物种差异可能和信号传递有关。小鼠皮肤乙氧基香豆素脱乙基酶的活性比人高 20 倍，这可以解释为什么乙氧基香豆素穿透人的皮肤和其他动物(小鼠、豚鼠和猪)的代谢速率不同。

人和啮齿类动物皮肤可测到多种形式的 II 相代谢反应的酶，如环氧化物酶和 UDP-葡萄糖酰基转移酶等。一般来说，这些酶活性比肝脏的相应酶活性低得多，但也有例外，皮肤醌还原酶相对活性就比较高。谷胱甘肽转移酶还促进谷胱甘肽和花生四烯酸脂氧化物(arachidonate lipooxygenation)的反应，产生皮肤过敏(anaphylaxis)和炎性趋化(chemotaxis)反应介质。

除了 I 相和 II 相反应的酶，人皮肤还含其他的酶类。角质层细胞之间的类脂中存在酶催化活性(如蛋白水解酶、酯酶、糖苷酶和磷酸酯酶)，这些酶和脂类均来自板层体。这些酶的催化活性对穿透皮肤的物质有重要的影响。例如，水杨酸甲酯(methyl salicylate)容易弥散通过表皮，经代谢后在真皮中测到其酯化水杨酸盐。

## 第三节 皮肤毒作用类型和机制

### 一、接触性皮炎

职业因素和化妆品引起的皮肤病中接触性皮炎约占 90% 以上，是严重影响接触者健康的皮肤疾患，引起两种不同的炎症反应过程：刺激性和变态反应性皮炎。这两种皮炎的临床特点很相似，难以分辨。典型的表现是直接暴露部位出现红斑(erythema)、硬结(induration)、脱屑(scaling)和囊疱(vesiculation)。病变部位活检显示淋巴细胞和嗜酸性粒细胞浸润和棘细胞层水肿(细胞间水肿)。



### (一) 刺激性皮炎

刺激性皮炎是指外源性物质直接作用的皮肤部位出现的非免疫反应。尽管刺激性皮炎属过敏反应,病变部位仍可检测到特殊的细胞因子。浓度、pH、温度、时间、反复接触和封闭等可明显影响皮炎的表现。强酸、强碱以及不稳定的化学物是最强的刺激物。

一次暴露于 pH 过高和过低的非毒性物质可立即导致不可逆的严重的结痂皮炎(scarring dermatitis)。这种急性刺激表现相似于化学烧伤被称为腐蚀反应(etching reaction)。较为多见的是:一次暴露于强刺激化学物不引起明显反应;重复暴露才会出现明显的临床改变,最终导致湿疹性皮炎,具有变态性皮炎的临床和病理生理改变;或皮肤皲裂增厚,无明显的炎性改变。诱发后两种反应的化学物称为边缘刺激物(marginal irritants)。

因为刺激反应的阈值存在明显的个体差异,考虑这种反应可能和遗传有关。同卵孪生子对如十二烷基硫酸钠和氯苄烷铵的反应比异卵孪生子更一致。面色白皙的比面色较黑的人对刺激性化学物更敏感,而性别似乎没有明显影响。

引起刺激性皮炎的病因各异,很难用一种特定的病理生理机制阐明。直接的腐蚀剂、蛋白溶解、氧化还原剂和脱水剂类刺激物主要是破坏角蛋白的超微结构或直接损伤重要的细胞大分子或亚细胞器。边缘刺激物导致的湿疹性皮炎是多种因素作用的结果,而且是在特定环境下形成的。已知不同的刺激物诱发皮炎的潜伏期不等,这不仅取决于经皮吸收的速率,而且还取决于刺激物本身。所以认为化学物质不是通过共同的炎症反应途径产生皮肤刺激。以下的研究支持这一观点:十四烷醇佛波乙酸酯(tetradecanoylphorbol acetate)是一种强刺激物(巴豆油中的主要活性成分),作用于培养的人角质形成细胞,诱导前列腺素  $E_2$  增加 10 倍。而另外的刺激物苯丙炔酸乙酯(ethyphenyl propiolate)对前列腺素  $E_2$  无诱导作用。氯苄烷铵(洁尔灭)和十二烷基磺酸钠诱导刺激性皮炎,其囊泡液中前列腺素和白细胞介素 B4 和表皮红肿损伤程度有关。这些细胞因子和类花生酸类物质(eicosanoid profile)可能是表面活性剂诱发刺激性皮炎的介质,而并非是三乙醇胺(triethanolamine)和 Tween80 的刺激介质。有研究发现十二烷基磺酸钠作用于皮肤 48h 后角质形成细胞增生,朗格汗斯细胞数目和分布无变化;相反,壬酸作用 24h 后角质形成细胞的增生减少,作用 6h 后表皮细胞出现凋亡。尤其是暴露 24h 和 48h 后,朗格汗斯细胞减少、凋亡表现的更为明显。各种刺激性皮炎可溶性粘附分子的表达无明显改变,变态反应性皮炎可溶性粘附分子明显增加。

### (二) 化学烧灼

强腐蚀性化学反应物可导致皮肤组织速发性凝固坏死,溃疡和腐烂。化学烧伤不同于刺激性皮炎,它是化学物直接损伤的结果,而不是继发于皮肤的炎性表现。除了化学物质的直接影响,坏死组织也可作为化学物质的储蓄库,导致持续的皮肤损伤或经皮吸收损伤机体。常见引起皮肤烧伤的化学物有:氨水、氧化钙、氯、环氧乙烷、盐酸、氟化氢、过氧化氢、溴甲烷、氮氧化物、磷、苯酚、氢氧化钠、甲苯二异氰酸酯等。

### (三) 变态接触性皮炎

变态反应性皮炎属迟发型(IV)过敏反应。仅少量的物质即可引发明显的反应,这点不同于

刺激性皮炎,后者反应的强度和作用物的剂量成正比。变态反应性皮炎的发病过程一般是:初次接触某种化合物致敏,随后再暴露于相同物质才引发典型的临床表现和病理学改变。变态反应性皮炎约占接触性皮炎的20%。

引发变态反应性皮炎的物质多是小分子量的半抗原,多数分子量小于1000Da,亲电子或亲水性物质。其中有的物质原型并不是半抗原,而是经皮肤的代谢转化形成的。半抗原本身不致敏,它必须穿透角质层和表皮载体蛋白结合才形成完全抗原,两者通常是共价结合。金属半抗原和表皮蛋白可形成稳定的非共价键结合物。这些结合蛋白可能是朗格汗斯细胞的表面分子,其中大多可能是HLA-DR基因编码的Ⅱ类抗原。

朗格汗斯细胞吞饮半抗原-载体蛋白复合物。朗格汗斯细胞处理抗原的过程中表型发生了变化,包括Ⅱ类分子(class Ⅱ molecules)、淋巴细胞功能相关抗原3(CD58)和转运分子[如细胞间粘附分子-1(ICAM-1)]增加。朗格汗斯细胞随之移入附近淋巴结,将处理的抗原呈交于 $T_H$ (CD4)。这些同样也携带细胞表面分子CD45RA的原始(virgin)T细胞被称为TH0细胞。朗格汗斯细胞处理抗原同时产生IL-1和IL-12,它们可刺激T细胞产生IL-2和 $\gamma$ 干扰素。IL-12可能促进TH0分化为典型的变态反应性皮炎效应细胞,此效应细胞表面携带有TH1/CD45RO。IL-2激活并促使抗原特异致敏的T细胞增生。

循环中致敏T细胞通过被激活的内皮细胞时,缓慢游出血管,在抗原暴露部位表达转运表面分子(trafficking surface molecules),如选择蛋白(selectins)和细胞间粘附分子(ICAMS),从而促进细胞外游。同时,角质形成细胞在变态反应性皮炎发病机制中也起了重要作用。它们不仅能产生大量的细胞因子[IL-1、IL-2、IL-3、血管通透因子VPF和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)],而且在一定的情况下还表达HLA-DR抗原。

表 19-1 常见的接触性变态反应原

| 来源         | 常见变态反应原                                                                                                                                                                                  |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 局部药疗法和卫生用品 | 抗生素:杆菌素、新霉素、多粘菌素、氨基葡萄糖苷、磺胺类药物<br>消毒剂:洁尔灭、甲醛、Quaternium-15、咪唑烷脒、Diazolidiny urea、乙内酰脲、methyl-chloroisothiazolone<br>药物:氨基苯甲酸乙酯、氟尿嘧啶、碘苷、维生素E、皮质甾类<br>其他:肉桂醛、乙二胺、羊毛脂、对苯二胺、丙二醇、二苯酮、香味剂、巯基乙酸盐 |
| 植物         | 松香酸、秘鲁香胶、松香、十五烷邻苯二酚、倍半萜、山慈菇甙A                                                                                                                                                            |
| 防腐剂        | 氯胺、氯己定、氯二甲酚、双氯酚、N; N-二甲氨基异丙酸、盐酸十二烷氨基乙基甘氨酸、戊二醛、六氯酚、硫柳汞、汞制剂、三苯甲烷                                                                                                                           |
| 橡胶产品       | 二苯胍、氢醌、巯基苯并噻唑、对苯二胺、间苯二酚单苯甲酸盐、苯并噻唑亚磺酰胺、二硫代氨基甲酸盐、秋兰姆                                                                                                                                       |
| 皮革制品       | 甲醛、戊二醛、重铬酸钾                                                                                                                                                                              |
| 纸制品        | 松香酸、甲醛、苯胺黑、松香、磷酸三苯酯、染料                                                                                                                                                                   |
| 粘合剂        | 双酚丙烷、氯环氧丙烷、甲醛、丙烯酸单体、氰丙烯酸盐粘合剂、环氧树脂、甲醛树脂、甲苯磺酰胺树脂、尿素甲醛树脂                                                                                                                                    |
| 金属         | 铬、钴、汞、镍                                                                                                                                                                                  |

结果产生 IL-2 和  $\gamma$  干扰素, 招募(吸引)淋巴细胞和巨噬细胞导致变态反应皮炎典型的血管和浸润改变。一旦诱发致敏, 以后接触相同的抗原就可引发上述致敏过程的相似级联反应。特异致敏的 T 细胞可大量出现在皮肤, 免疫反应非常迅速。

目前已知的变态反应原有几千种, 表 19-1 列出了常见的变态反应原及其来源。几种强致敏原的化学结构式见图 19-2。典型的非职业暴露来源包括: 局部治疗、卫生产品、橡胶制品、纺织品、表面活性剂、化妆品、胶、农药和塑料。其中几种变态反应原如镍、铬、钴和一些调味品不仅人体皮肤可能接触, 而且经常可通过消化道进入人体。食入某种物质过敏的个体, 出现皮肤反应的同时可能伴随头痛、不适、关节痛(arthralgia)的全身症状。全身接触性皮炎(systemic contact dermatitis)可出现迟发型过敏、免疫球蛋白和补体沉积于皮肤。这样的沉积可诱导继发炎症反应, 可能是皮肤水疱和结缔组织疾病的初始病理生理改变。

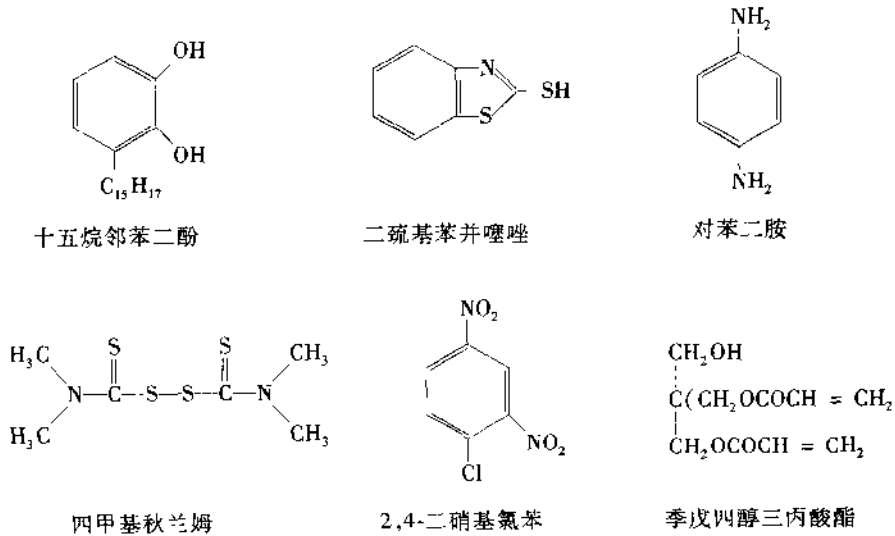


图 19-2 几种强致敏原的化学结构式

如果化学物之间含有重要的形成完全抗原的相似功能基团, 这些化学物之间可能会发生交叉反应。这就给有效控制接触性皮炎造成一定的困难, 因为避免接触已知的变应原和可能的交叉反应物质是防治的重要措施。

## 二、光毒性作用

皮肤可能会暴露于电磁光谱辐射。电磁光谱包括来自太阳的紫外线(ultraviolet, UV)、可见和红外光以及人工光源和热源。一般来讲, 达到地球的太阳辐射最能诱发皮肤改变的是 290 ~ 700nm 的紫外和可见光谱。这个范围两端的波长可被大气层过滤, 无足够的能量引起皮肤病理改变。人工辐射如 UV-C (<290nm) 或 X 线达到足够剂量可诱发明显的生理和皮肤毒理学改变。任何形式的电磁辐射诱发生物学改变, 它必须首先被吸收。皮肤表皮的厚度、发色团和含水量等均可影响光的吸收。黑色素是皮肤一个重要的发色团, 它能吸收 UV-B (290 ~ 320nm) 光谱的辐射。皮肤中其他的发色团有氨基酸和氨基酸残基如色氨酸(tryptophan)、咪唑丙烯酸(uro-

canic acid), 它们能吸收 UV-B 范围的光。从生物学角度来说, 最重要的色团是 DNA, 它的损伤对组织的结构和功能将产生持久的影响。

### (一) 电磁辐射的不良反应

皮肤暴露于电磁辐射可出现各种急慢性反应。UV 辐射后最明显的特征是红斑(发红或晒黑)。诱发红斑反应的最小剂量, 也就是最小红斑剂量(minimal erythema dose, MED)个体差异很大。皮肤血管扩张伴随炎性介质(如前列腺素 D<sub>2</sub>、E<sub>2</sub>、F<sub>2a</sub>, IL-B<sub>4</sub> 和前列腺环素 I<sub>2</sub>)的明显变化。另外, 暴露于 UVB 几小时内 IL-1 明显升高, 可能和日晒病的体征(如发热、寒战和不适)有关。IL-1 可能来自局部炎性细胞和受损的角质形成细胞。引起人皮肤红斑的最强光谱是 UV-B (290~320nm)。影响 UV 诱发损伤的环境因素有暴露时间、季节、海拔、体位、皮肤色素和前暴露(previous exposure)。到达地球的 UV-A 的量比 UV-B 高 100 倍, 然而后者诱发人体红斑作用是前者的 1000 倍。UV 晒黑皮肤, 这是黑色素细胞释放的黑色素增多或黑色素的光毒作用所致。暴露于 UV 三天内常可见皮肤变黑或色素增加, 而光毒作用出现迅速。尽管较宽的光波均可在一定的程度增加皮肤色素, 但 UV-B 的作用最强。UV-A 和可见光可迅速增加皮肤色素, 保护皮肤; 然而, 速发光毒黑变反应却无光保护作用。

UV 辐射使黑色素形成达一定的量, 可引起角质层皮肤增厚。浅肤色人种黑色素少、白化病或白斑黑色素完全缺乏。慢性暴露于辐射可诱发一些特异的皮肤改变。就 UV 光而言, 这些改变主要取决于个体皮肤色素形成的基础水平以及暴露的时间和部位。肤色较浅的个体较深肤色个体皮肤易发生慢性改变, 常发生于头、颈、手和上胸等部位。慢性暴露于 UV 可导致皮肤色素改变, 皮肤色素改变的类型主要有: 雀斑、色素减少、皱纹、毛细血管扩张、皮肤肿瘤(基底和鳞状上皮癌、恶性黑色素瘤)。慢性暴露于 UV 引起朗格汗斯细胞明显减少。慢性阳光暴露皮肤和光保护部位相比, 朗格汗斯细胞减少可达 50%。朗格汗斯细胞的减少可能导致机体免疫监视功能降低, 恶性细胞的转化几率增加。暴露于不同剂量的电离辐射可导致疾病谱发生变化。大剂量急性暴露可导致皮肤潮红、起疱、肿胀、溃疡等症状。潜伏期后或亚急性暴露可能会出现一些特征性的皮肤改变(表皮变薄、斑点、血管扩张、溃疡不愈合)。此外, 皮肤暴露于辐射后数年, 可见各种皮肤恶性肿瘤增多。

电磁辐射除具有以上毒性作用外, 对人体还有重要的生理作用。紫外线辐射可使 7-脱氢胆固醇转化为 VD<sub>3</sub> 前体。胆红素是红细胞的分解产物, 血清中浓度过高会导致神经毒性, 波长 420~490nm 的蓝光可使皮肤胆红素发生异构改变, 水溶性增强, 容易经尿排出。另外, 人们多年来利用 UV 来治疗增生皮肤病(如银屑病)。

### (二) 光敏作用

光过敏是指机体对 UV 和可见光敏感性异常, 可能是外源性或内源性因素导致的结果。正常机体可修复 UV 诱发的损伤, 但许多遗传性疾病却破坏了正常的修复能力。自身免疫性疾病红斑狼疮也有对紫外线过敏的特点。遗传或化学因素均可导致卟啉病(porphyrrias), 这是由于血红素(血红蛋白、肌红蛋白、过氧化氢酶、过氧化物酶和细胞色素的基本构件)合成酶异常, 卟啉前体或卟啉代谢产物在体内(包括皮肤)积聚的结果。这些化合物暴露于 400~410nm 波长的光能发出荧光, 而且能和细胞内大分子或分子氧反应产生毒性自由基。已知氯化芳烃(六氯联苯

和二噁英)可导致这种卟啉病。

1. 光毒性作用 全身或局部暴露于光毒性化合物可产生光毒反应。急性反应中,皮肤可在照射紫外线后数分钟至数小时内出现红斑、疱,像晒伤一样。慢性光毒反应可引起照射处色素沉着过多和皮肤变厚。UV-A (320 ~ 400nm) 最常引起此症状,UV-B 偶尔也可引起。

表 19-2 列出了常见的和光毒反应有关的物质。这些物质容易吸收紫外线而处于高能激发状态,如卟啉。这些激发态分子返回基态发生氧依赖性光动力学反应(oxygen-dependen. photodynamic reaction),激发的三重线态分子(excited triplet state molecules)将能量转移给氧,形成单线态氧(singlet oxygen),或被还原形成高反应活性自由基。这些活性产物可作用于细胞大分子而导致细胞死亡。化学损伤的结果使角质形成细胞和局部的白细胞释放各种免疫介质,进一步动员更多的炎性细胞到达皮肤损害部位,呈现出光毒性临床症状。

表 19-2 光毒性化合物

|               |              |
|---------------|--------------|
| 呋喃并香豆素〔植物〕    | 磺胺类药物        |
| 8-甲氧基补骨脂素     | 氯丙嗪          |
| 5-甲氧基补骨脂素     | 萘啶酸          |
| 三甲氧补骨脂素       | 非类固醇抗炎药      |
| 多环芳烃          | 苯恶洛芬〔消炎镇痛药〕  |
| 葱             | 戊基-O-二甲氨基苯甲酸 |
| 茺葱            | 染料           |
| 吡啶            | 伊红           |
| 非             | 吡啶橙          |
| 四环素族          | 卟啉衍生物        |
| 去甲氯四环素(广谱抗生素) | 血卟啉          |

在此主要以补骨脂素(psoralens)为例阐述光毒发病机制-非光动力学机制。补骨脂素进入细胞以非光依赖作用嵌入DNA中。随后UV-A照射激发光化学反应最终导致补骨脂素和嘧啶碱共价结合,在很大程度上抑制了DNA的合成和修复,从而出现临床上的光毒反应。植物(如菩提树和芹菜)中含有大量的补骨脂素,阳光下接触它们的果汁和叶子,接触部位会起疱,被称为植物阳光性皮炎(phytophotodermatitis)。补骨脂素诱发的光毒作用可用药物治疗。局部或口服补骨脂素可增强UVA的传递,临床上用PUVA(补骨脂素加UV-A)来治疗角质形成细胞和淋巴细胞过度增生疾病,如银屑病、湿疹和皮肤T细胞淋巴瘤。

现在人们在一些治疗上也利用了卟啉的光过敏特性。体外给予卟啉,其选择性的富集于特殊的靶器官如肿瘤组织,随后接受600~700nm的光波(吸收致敏物的光波)照射,从而产生自由基导致细胞死亡。

2. 光变态反应 与光毒作用相比,光变态反应(photoallergy)是一种真正的IV型迟发性过敏反应。光毒作用在第一次接触化学物即可发生,而光变态反应需要一个前致敏过程。局部或全身接触化学物均可诱导或激发光变态反应,局部接触引发的反应称为光接触性皮炎(photocontact dermatitis);全身接触则称为全身性光变态反应(systemic photoallergy)。全身性光变态反应是一般由于服用药物引起的。20世纪60年代四氯水杨酰苯胺和三溴水杨酰苯胺作为肥皂中的抗菌添加剂引发了上千例的光接触性皮炎,很快退出市场。光接触性皮炎和全身性光变态反应的发

病机制与前述的变态反应接触性皮炎相似,而紫外线照射在光敏化学物转化为引发变态反应的半抗原中起了重要作用。

### 三、痤疮和氯痤疮

痤疮(acne)的病因有多种,皮脂、激素、细菌、遗传和环境因素被认为是主要的影响因素。本文主要讨论由毒物引起的痤疮。

能够引起痤疮的化学物质称为致粉刺物。粉刺是痤疮的典型临床特征。粉刺顶端可以是开放的,也可能是闭合的,俗称为黑头和白头。痤疮发生过程中,可合并丘疹、脓疱、囊肿、瘢痕等病变。毛囊和皮脂腺可能渐渐被浸在皮脂中的紧密排列的角质形成细胞堵塞。开放性的粉刺(黑头)色素来自黑色素。痤疮多发生于面部、背部和上胸部,但中毒性痤疮损伤部位取决于暴露部位。

油性痤疮是由石油、煤焦油和润滑油引起的,在动物试验中和人的皮肤均可导致痤疮样改变。

氯痤疮(chloracne)是暴露于卤代多环芳烃导致的严重损坏人皮肤的痤疮之一。过去40多年来一系列的工业灾难使人们对氯痤疮物的危害有了一定的认识。1953年Ludwigshafen的一个化工厂爆炸,2,4,5-三氯苯酚泄漏;1976年意大利的Seveso一个反应釜爆炸引起二噁英(TC-DD)泄漏;1968和1979年日本和台湾分别发生多氯联苯、多氯联苯呋喃和多氯四苯污染食物油事件;1973年在美国Michigan牛饲料为多溴联苯污染。人暴露后很快就出现氯痤疮,而且脱离接触后甚至几十年仍有氯痤疮。来自这些事件的报道显示这些卤代烃化合物可能影响多器官(如消化道、中枢神经、生殖、免疫和心血管系统),关于多氯联苯和二噁英对人类的致癌作用问题也未得出最后结论。然而,氯痤疮是多氯联苯和二噁英暴露的非常可靠的指标。氯痤疮典型症状可见耳后、眼睛周围、双肩、背部和外生殖器出现粉刺和淡黄色脓疱。同时伴随多毛症、色素过度沉着、指甲棕色变、结膜炎和眼分泌物增多。由于氯痤疮化合物一般影响机体多个器官,肝和神经系统损伤时可能伴随一定的皮肤改变。氯痤疮的组织学检查可见皮脂腺单位进行性退化、皮脂腺细胞角质化以及毛囊过度角化隆出,这点有别于其他形式的痤疮。

### 四、色素异常

许多因素影响皮肤色素的形成。黑色素由酪氨酸经一系列酶促反应形成。如果指导酶合成的遗传物质错误或酪氨酸类似物干扰均可导致色素形成异常。其他如表皮的厚度和局部的血流都影响皮肤的颜色。色素过度沉着多由于黑色素生成增多或内源性或外源性色素在真皮上部沉积所致。黑色素和含铁血黄素是常见的内源性物质;外源性色素过度增多见于真皮组织金属和药物沉积。相反,黑色素丢失和黑色素细胞损伤或血管异常可导致色素沉着减少。白斑病和色素减退表示皮肤黑色素完全丢失。许多药物和化学物质能够干扰色素的正常形成和清除,对黑色素形成细胞有直接毒作用。酚和邻苯二酚是极强的化学脱色物,导致皮肤色素丢失。

## 五、肉芽肿疾病

肉芽肿疾病(granulomatous disease)指皮肤炎性肉芽肿的组织病理学改变。肉芽肿是包裹不良损伤的一种免疫反应。麻风病、结核、异物反应和自发性疾患(idiopathic illnesses)等皮肤感染疾病可见到肉芽肿病变。异物反应可能是继发于最初的刺激如滑石、二氧化硅或木屑进入真皮诱发的创伤。极少数情况,对铍、锆、钴、汞、铬和纹身染料过敏诱发了肉芽肿反应。这些肉芽肿反应的病理生理过程和发生于器官的肉芽肿如铍肺尘埃沉着病的肉芽肿并无不同。

## 六、荨麻疹

荨麻疹(urticaria)是一种常见的皮肤改变,俗称风团(hive)。发病部位表皮和浅表真皮水肿,水肿部位发红,和正常皮肤界限清楚,自觉刺痒,并有一种烧灼感。典型反应常常是暴露于某物后30~60min,皮肤出现改变。荨麻疹一般几个小时内即可退去。水肿明显的荨麻疹,即真皮深层、皮下和粘膜层下水肿可持续72h。

荨麻疹属速发I型过敏反应,主要是由肥大细胞释放的组胺和血管活性物质诱导引起的。这些活性介质可通过抗原和肥大细胞膜IgE结合的免疫或非免疫机制释放。

荨麻疹分为两种主要类型:免疫和非免疫性荨麻疹。一些常见的致病原见表19-3。非免疫性荨麻疹是最常见的类型,大多数患者首次暴露于致病原即发病。荨麻疹可能局限于某部位,也可能扩展到全身,致病原的种类、浓度以及皮肤部位影响其反应强度。非免疫性荨麻疹发病机制还不完全清楚,可能和非免疫作用释放肥大细胞介质直接作用于真皮血管壁有关。漱口剂(mouthwashes)和口香糖(chewing gum)含大量的肉桂醛以使人们口中产生刺麻清爽的好感,促进销售。浓度较高时,食者嘴唇肿胀,这是典型的接触性荨麻疹表现。丁香酚(eugenol)可竞争性抑制肉桂醛的作用。

表 19-3 致人荨麻疹的几种物质

| 免疫机制       | 非免疫机制 | 未知机制   |
|------------|-------|--------|
| 双齿鱼叉       | 阿司匹林  |        |
| 坚果         | 秘鲁香胶  | 苜蓿/苜蓿菜 |
| 杆菌肽[素]     | 苯甲酸   | 桂皮油    |
| 海鲜(蛋白质提取物) | 辣椒胡椒  | 甲醛     |
| 盘尼西林       | 肉桂醛   | 新霉素    |
| 羟基丁酸甲苯     | 二甲基亚砷 |        |

人们再次接触致病原出现的荨麻疹属免疫性荨麻疹。致病原与肥大细胞膜上特异性IgE发生反应,释放血管活性物质(组胺)引发皮肤病变(cutaneous signs)。组胺起了主要作用,其他炎性介质(前列腺素、白介素和激肽)可能影响反应的程度。免疫性荨麻疹可伴随出现其他症状,如鼻炎(rhinitis)、结膜炎(conjunctivitis)、哮喘(asthma)。所以,有学者称其为荨麻疹综合征。

食品是最常见的导致免疫性荨麻疹的原因。咽喉部位是食品致敏原的常见作用部位,好发

于遗传性致敏体质的个体。致敏原可能是某种蛋白质或蛋白质复合物。

## 七、中毒性表皮溶解坏死

中毒性表皮溶解坏死(toxic epidermal necrolysis, TEN)常由药物或化学物引起,是发生非常迅速的危及生命的皮肤病之一。表皮全层坏死脱落是其特点。表皮腐烂脱落后仅留真皮组织,这样就严重影响了热量、液体和电解质平衡。TEN与多形红斑是类同的疾病。TEN的病因还不完全清楚,但认为和免疫代谢机制有关。一项由卡马西平(解痉药)诱导的TEN研究显示淋巴细胞代谢卡马西平毒性中间体的能力降低。卡马西平是在肝脏进行代谢的,其原形未发现有淋巴细胞毒性。环氧化物水化酶和谷胱甘肽转移酶异常可能和毒物(可能是氧苯肿氧化物)的代谢机制有关。TEN发病中CD8淋巴细胞的炎性反应提示这是由卡马西平中间体诱导的细胞毒免疫介导反应。最近的研究表明氮氧化物代谢产物在TEN中有介导表皮坏死作用,再一次说明代谢免疫机制的参与。

## 八、皮肤肿瘤

### (一) 辐射

皮肤癌是人类最常见的肿瘤,约占每年诊断肿瘤的三分之一。目前皮肤癌(美国每年约50万新病例)的主要原因是日照,日光可损害表皮细胞的DNA。UV-B(290~320nm)可诱导嘧啶二聚体形成,引发关键基因的突变。P53肿瘤抑制基因是主要的靶基因,几乎所有的鳞状细胞癌的早期均可测到受损的P53基因。紫外线还有免疫抑制作用,可助肿瘤生存。皮肤癌在热带和浅肤色的白种人中发病率非常高,尤其是头、颈接受照射最强的部位。着色性干皮病的患者缺乏修复嘧啶二聚体的能力,避免阳光是预防癌前病变的最佳选择。对于正常人来说,即使阳光暴露不引起癌变,也会导致皮肤过早衰老。

电离辐射是皮肤癌的重要病因。电离辐射用于治疗多种皮肤疾患(痤疮、特应性皮炎、牛皮癣和金钱癣)和脱发,高水平的暴露导致皮肤癌危险性增加,有时可诱发皮肤萎缩(放射性皮炎),这是由于分泌弹性纤维的成纤维细胞死亡和早熟性老化的结果。

### (二) 多环芳烃

1775年英国Pott医生的著名流行病学调查表明扫烟囱接触煤烟和阴囊癌发病有关。此后,许多富含多环芳烃的物质(煤焦油、木馏油、沥青和煤烟)被认为可引发人和动物皮肤癌。多环芳烃可被多种P-450,尤其是P-450 1A1和1B1氧化,Ⅱ相结合后排除体外。但经氧化可产生亲电子环氧化物,与DNA形成加合物。环氧化物分子重排可产生酚,酚进一步氧化为醌产生活性氧,这些也是毒性亲电子物质。暴露于这些化合物的皮肤癌危险职业是户外工作,光照是另一危险因素。煤焦油结合紫外线照射可治疗严重的牛皮癣,这是利用了其毒性(减少了角质形成细胞的过度转化),然而长期应用也增加了患皮肤癌的危险性。使用较长的紫外线A和光毒物补骨脂素衍生物替代煤焦油简便了操作步骤,也避免了紫外线B的作用,但可产生DNA加合物,



也增加了皮肤癌的危险性。

### (三) 砷

长期暴露于高浓度的砷易患砷性角化(arsenical keratoses, 肿瘤前损伤)、黑脚病(内皮细胞损伤导致血液循环障碍)、皮肤鳞状上皮癌和其他器官肿瘤(膀胱、肺和肝)。三价砷很容易和巯基结合,可能抑制DNA的修复;五价砷可取代生物大分子如DNA的磷,但形成的酯不稳定。两种形式的砷可通过以上机制引发染色体断裂和基因扩增、诱导培养细胞转化和促进肿瘤的发生和发展。砷还可改变DNA甲基化、抑制角质形成细胞的分化以及增强表皮生长因子的分泌。

砷致癌作用的机制目前仍不清楚。由于致癌的危险性难以估计,所以也难以确定控制暴露水平。砷致皮肤癌大多来自过去几十年间台湾地区暴露于高砷饮用水的人群,近几年在我国、孟加拉国、印度、日本等也发现了一些高砷饮用水地区,皮肤损害比较明显。尽管暴露于高砷饮用水可致肿瘤,但关于剂量反应曲线的形状很难确定。研究表明低剂量时的致癌反应不能依据线性关系从已知的高剂量外推得出。事实上低剂量的危险性明显降低,可能有阈值存在。我国目前饮用水砷含量为 $50\mu\text{g/L}$ 。因为观察到砷中毒病人和动物尿中的单甲基和双甲基砷的确毒性非常低,所以砷的甲基化代谢产物可能是一种解毒方式。但不同物种之间砷甲基化能力存在很大差异,这说明可能存在其他的解毒途径。

## 第四节 皮肤毒理学研究方法和评价

刺激性皮炎是最常见的一种皮肤损伤,目前常用的检测方法主要有一次和多次斑贴试验,后者相似于累积刺激试验。动物的选择是很重要的问题,目前多选兔和豚鼠,对于强刺激和无刺激作用的物质用兔检测效果好,但对作用缓和的刺激物用豚鼠试验结果较准确。Criffth发现兔通常比豚鼠和人更易感,使用这两种动物评价人体反应更为合理。这些试验结果一般是通过肉眼观察皮肤炎性反应的程度,存在一定误差。近年来使用生物工程仪器,将炎性反应的视觉评价转换为测量皮肤的生物物理参数的方法。不仅能更客观准确反应炎症的程度,而且能测试到肉眼不可见的皮肤损伤参数。相信常规的试验方法与现代的生物工程仪器结合将会成为规范化的测试程序。

和刺激性皮炎一样,常用动物测试化学物的致敏性,将结果外推于人。Draize试验是将受试物注入皮内诱导其致敏性,局部反应根据临床特征分级。豚鼠最大化试验和Draize试验的不同点是第一次皮内注射受试物的同时加注弗氏完全佐剂(Freund's complete adjuvant),弗氏完全佐剂是一种分枝杆菌蛋白,以增强免疫。这种诱发试验也用于人(志愿者),但一般不主张在人体使用免疫增强剂(弗氏完全佐剂),可选用较高的诱导浓度来增强致敏性。还有一些类似的致敏试验方法,如Buehler test和Epicutaneous Maximization test。上述试验方法可成功地预测人类强致敏物的变态反应性,但不能有效测试弱变态反应原。体外测试系统有可能弥补体内试验的不足之处,如朗格汗斯细胞的激活状态试验。

皮肤致癌作用的体内研究常用大鼠和小鼠。致癌试验的方法已在有关的章节中介绍。美国FDA最近对一些局部使用药物和化妆品成分在其他物质如紫外线的诱导下可能导致或促进皮

肤肿瘤发生表示关注。尽管目前还没有流行病学资料证实这一推论,但建立一种新的常规皮肤致癌作用试验方法,探讨这种可能性很有必要。已建立许多化学致癌作用体外研究方法。常用培养的大鼠和小鼠上皮角质形成细胞,也有用人表皮细胞株,为进行体外致癌试验提供了新的重要测试工具。

近年来对于皮肤毒理学的体外试验(3R 替代试验)有了很大的发展,2000 年召开的以体外试验评价急性系统毒性国际研讨会,对皮肤刺激/腐蚀性评价和推荐了 Corrositex<sup>®</sup> 试验、EpiDerm<sup>™</sup> 试验、Episkin<sup>™</sup> 试验和大鼠皮肤经皮电阻抗(TER)试验。该研讨会对光毒性评价和推荐了体外 3T3 的中性红光毒性试验。

(裴秋玲)

# 1

## 附录一

## 主要参考书目

1. 李寿祺. 毒理学原理与方法. 第二版. 成都:四川大学出版社,2003
2. 夏世钧,吴中亮. 分子毒理学基础. 武汉:湖北科学技术出版社,2001
3. 周宗灿. 毒理学基础. 第二版. 北京:北京医科大学出版社,2000
4. 张桥. 卫生毒理学基础. 第三版. 北京:人民卫生出版社,2000
5. 李勇,张天宝. 发育毒理学研究方法和实验技术. 第一版. 北京:北京医科大学出版社,2000
6. 张铤,刘毓谷. 毒理学. 第一版. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1997
7. 刘毓谷. 卫生毒理学基础. 第二版. 北京:人民卫生出版社,1996
8. 张铤,徐厚恩. 卫生毒理学基础. 第一版. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1991
9. Klaassen CD(ed); Casarett & Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons. 6<sup>th</sup> ed. . New York;The McGraw-Hill Inc. , 2001
10. Hodgson E & Smart RC. Introduction to biochemical toxicology. John Wiley & Sons, Inc. , 2001
11. Hayes AW(ed); Principles and Methods of Toxicology, 4<sup>th</sup> ed. , Philadelphia; Taylor & Francis, 2001
12. Hans Marquardt, Siegfried G. Schäfer, Roger McClellan, Frank Wetsch. Toxicology. San DiegoAcademic Press. 1999
13. Sipes IG(ed); Comprehensive Toxicology, 1<sup>st</sup> ed. , Elsevier Science Ltd. , 1997
14. Timbrell JA. Principles of Biochemical Toxicology. 2nd ed, Taylor and Francis, 1991
15. Hodgson E & Levi PE. A textbook of modern toxicology, Appleton & Lange, 1997

## 2

## 附录二

## 英中文对照

## 英 文

## 中 文

|                                          |             |
|------------------------------------------|-------------|
| absolute lethal dose, LD <sub>100</sub>  | 绝对致死剂量      |
| acceptable risk                          | 可接受的危险度     |
| acceptable daily intake, ADI             | 每日容许摄入量     |
| accumulation                             | 蓄积作用        |
| accumulation coefficient                 | 蓄积系数        |
| active cutaneous anaphylaxis, ACA        | 主动皮肤过敏试验    |
| active systemic anaphylaxis, ASA         | 主动全身过敏试验    |
| acute liver injury                       | 急性肝损伤       |
| acute lymphatic leukemia, ALL            | 急性淋巴细胞性白血病  |
| acute myelogenous leukemia, AML          | 急性髓细胞性白血病   |
| acute non-lymphatic leukemia, ANLL       | 急性非淋巴细胞性白血病 |
| acute threshold dose, Lim <sub>ac</sub>  | 急性阈剂量       |
| acute toxic effect zone, Z <sub>ac</sub> | 急性毒作用带      |
| acute toxicity                           | 急性毒性        |
| acute toxicity classification            | 急性毒性分级      |
| acute toxicity tests                     | 急性毒性试验      |
| addition joint action                    | 相加作用        |
| adverse effects                          | 损害作用        |
| alkylating agent                         | 烷化剂         |
| allergy                                  | 变态反应        |
| altered coronary blood flow              | 冠状动脉血流改变    |
| anaphylaxis                              | 过敏反应        |
| androgen receptor, AR                    | 雄激素受体       |
| aneuploidy                               | 非整倍体        |
| antagonistic joint action                | 拮抗作用        |
| apoptosis                                | 凋亡          |
| apparent volume of distribution          | 表观分布容积      |
| autoimmunity                             | 自身免疫        |
| base substitution                        | 碱基置换        |
| behavioral toxicology                    | 行为毒理学       |

## 英文

## 中文

|                                              |                     |
|----------------------------------------------|---------------------|
| benchmark dose, BMD                          | 基准剂量                |
| bioavailability                              | 生物利用度               |
| biological half-life method                  | 生物半减期法              |
| biologically based dose-response model, BBDR | 以生物学为基础的剂量-反应模型     |
| biomarker, biological marker                 | 生物学标志               |
| biotransformation                            | 生物转化                |
| biotransportation                            | 生物转运                |
| birth defect                                 | 出生缺陷                |
| blood/gas partition coefficient              | 血/气分配系数             |
| blood-brain barrier                          | 血脑屏障                |
| blood-nerve barrier, BNB                     | 血-神经屏障              |
| bronchoalveolar lavage                       | 支气管肺泡灌洗             |
| calcium channel                              | Ca <sup>2+</sup> 通道 |
| carcinogenic potency index                   | 致癌强度指数              |
| cardiovascular toxicology                    | 心血管毒理学              |
| cell death                                   | 细胞死亡                |
| chemical carcinogen                          | 化学致癌物               |
| chemically induced liver injury              | 化学性肝损害              |
| chromosome aberration                        | 染色体畸变               |
| chronic liver injury                         | 慢性肝损伤               |
| chronic lymphatic leukemia, CLL              | 慢性淋巴细胞性白血病          |
| chronic myelogenous leukemia, CML            | 慢性髓细胞性白血病           |
| chronic threshold dose, Lim <sub>ch</sub>    | 慢性阈剂量               |
| chronic toxic effect zone, Z <sub>ch</sub>   | 慢性毒作用带              |
| chronic toxicity                             | 慢性毒性                |
| chronic toxicity tests                       | 慢性毒性试验              |
| cirrhosis                                    | 肝硬化                 |
| clinical toxicology                          | 临床毒理学               |
| colony forming unit-erythroid, CFU-E         | 红系集落形成单位            |
| colony stimulation factor, CSF               | 集落刺激因子              |
| compartment model                            | 房室模型                |
| covalent binding                             | 共价结合                |
| conventional (CV) animal                     | 普通级动物               |
| critical period                              | 致畸敏感期或致畸作用危险期       |
| cytoskeleton                                 | 细胞骨架                |
| delayed hypersensitivity response, DHR       | 迟发性皮肤超敏反应           |
| deletion                                     | 缺失                  |
| depot                                        | 储存库                 |
| dermatotoxicology                            | 皮肤毒理学               |
| descriptive toxicology                       | 描述毒理学               |
| detoxication                                 | 解毒                  |
| developmental toxicology                     | 发育毒理学               |

| 英 文                                             | 中 文         |
|-------------------------------------------------|-------------|
| developmental toxicity                          | 发育毒性        |
| DNA-protein crosslinks, DPC                     | DNA-蛋白质交联物  |
| dominant lethal test                            | 显性致死试验      |
| dose-response assessment                        | 剂量-反应关系评价   |
| dysfunction                                     | 功能障碍        |
| effective filtration pressure                   | 有效滤过压       |
| electron transfer                               | 电子转移        |
| electrophiles                                   | 亲电物         |
| embryotoxicity                                  | 胚胎毒性        |
| enterohepatic circulation                       | 肠肝循环        |
| environmental endocrine disruptors              | 环境内分泌干扰物    |
| environmental toxicology                        | 环境毒理学       |
| estimated exposure dose, EED                    | 高危人群总接触量估计值 |
| estrogen receptor, ER                           | 雌激素受体       |
| excitotoxicity                                  | 兴奋性毒性       |
| exposure assessment                             | 接触评定        |
| fetotoxicity                                    | 胎儿毒性        |
| first-order kinetics                            | 一级动力学       |
| first-pass effect                               | 首过效应        |
| fluorescence in situ hybridization, FISH        | 荧光原位杂交      |
| follicle                                        | 卵泡          |
| forensic toxicology                             | 法医毒理学       |
| free radicals                                   | 自由基         |
| functional accumulation                         | 功能蓄积        |
| gap junction intracellular communication (GJIC) | 细胞间隙连接通讯    |
| genetic load                                    | 遗传负荷        |
| genetic polymorphism                            | 遗传多态性       |
| genetic toxicology                              | 遗传毒理学       |
| glomerular filtration rate                      | 肾小球滤过率      |
| glucuronidation                                 | 葡糖醛酸结合      |
| graded dose-response relationship               | 剂量-量反应关系    |
| graded response                                 | 量反应         |
| guinea pig maximization test, GPMT              | 豚鼠最大值试验     |
| hazard identification                           | 危害认定        |
| hepatobiliary dysfunction                       | 肝胆功能障碍      |
| hepatotoxicant                                  | 肝毒物         |
| hydrogen abstraction                            | 去氢反应        |
| hydrolysis                                      | 水解作用        |
| hypersensitivity                                | 超敏反应        |
| hypothalamic-pituitary-testicular axis          | 下丘脑-垂体-睾丸轴  |
| idiosyncrasy                                    | 特异体质        |
| immunosuppression                               | 免疫抑制        |

## 英文

## 中文

|                                              |              |
|----------------------------------------------|--------------|
| immunotoxicology                             | 免疫毒理学        |
| independent action                           | 独立作用         |
| indocyanine green, ICC                       | 靛青绿          |
| initiation                                   | 引发阶段         |
| initiator                                    | 引发物          |
| interaction                                  | 交互作用         |
| interferons, IFNs                            | 干扰素          |
| interleukin                                  | 白细胞介素        |
| interleukin-2, IL-2                          | 白介素-2        |
| intitiated cell                              | 启动细胞         |
| intoxication                                 | 中毒           |
| Inversion                                    | 倒位           |
| ion homeostasis                              | 离子稳态         |
| ischemia-reperfusion injure                  | 缺血—再灌注损伤     |
| isolated perfused liver, IPL                 | 离体灌注肝        |
| lathyrism                                    | 山豆中毒         |
| latrotoxin                                   | 黑寡妇毒素        |
| leukemia                                     | 白血病          |
| Leydig cell                                  | 间质细胞         |
| limited in vivo bioassay                     | 有限动物试验       |
| linear multi-stage model                     | 线性多阶段模型      |
| lipid accumulation                           | 脂质蓄积         |
| lipid/water partition coefficient            | 脂/水分配系数      |
| lowest observed adverse effect level, LOAEL  | 观察到损害作用的最低剂量 |
| malformation                                 | 畸形           |
| margin of exposure, MOE                      | 接触界限值        |
| material accumulation                        | 物质蓄积         |
| maternal toxicity                            | 母体毒性         |
| mature spermatozoon                          | 成熟精子         |
| maximal no-effect dose, ED <sub>0</sub>      | 最大无作用剂量      |
| maximal tolerance dose, MTD, LD <sub>0</sub> | 最大耐受剂量       |
| maximum allowable concentration, MAC         | 最高容许浓度       |
| mechanistic toxicology                       | 机制毒理学        |
| median lethal dose, LD <sub>50</sub>         | 半数致死剂量       |
| metal lothionein                             | 金属硫蛋白        |
| metabolic activation                         | 代谢活化         |
| metabolism disturbance                       | 代谢紊乱         |
| methemoglobin                                | 高铁血红蛋白       |
| methemoglobinemia                            | 高铁血红蛋白血症     |
| micromass culture                            | 胚胎细胞微团培养     |
| m micronucleus test, MNT                     | 微核试验         |
| microsomal mixed function oxidase, MFO       | 微粒体混合功能氧化酶   |

| 英 文                                                            | 中 文             |
|----------------------------------------------------------------|-----------------|
| minimal effect level, MEL                                      | 最小有作用剂量         |
| minimal lethal dose, MLD, LD <sub>01</sub>                     | 最小致死剂量          |
| mismatch repair                                                | 误配修复            |
| mitochondrial permeability transition                          | 线粒体渗透性转变        |
| modifying factor, MF                                           | 修正系数            |
| mononuclear phagocyte system, MPS                              | 单核细胞系           |
| multigeneration test of reproductive toxicity                  | 多代生殖毒性试验        |
| murine local lymph node assay, LLNA                            | 局部淋巴结试验         |
| mutation                                                       | 突变              |
| myelodysplastic syndrome, MDS                                  | 骨髓增生异常综合征       |
| necrosis                                                       | 坏死              |
| neoplastic changes                                             | 瘤样改变            |
| nephrotoxicology                                               | 肾脏毒理学           |
| Neurobehavioral Core Test Battery, NCTB                        | 神经行为核心测试组合      |
| neurobehavioral toxicology                                     | 神经行为毒理学         |
| neurotoxicant                                                  | 神经毒物            |
| neurotoxicity                                                  | 神经毒性            |
| neurotoxicology                                                | 神经毒理学           |
| neurotransmitter                                               | 神经递质            |
| non-adverse effect                                             | 非损害作用           |
| noncovalent binding                                            | 非共价结合           |
| non-Hodkin's lymphoma, NHL                                     | 非霍奇金淋巴瘤         |
| noninteractive combined effects                                | 非交互作用           |
| Non-linear pharmacokinetics                                    | 非线性毒物动力学        |
| no-observed adverse effect level, NOAEL                        | 未观察到损害作用的剂量     |
| nucleophiles                                                   | 亲核物             |
| oncogene                                                       | 癌基因             |
| oral exposure                                                  | 经口染毒            |
| organ coefficient                                              | 脏器系数            |
| organophosphorus compound-induced delayed neurotoxicity, OPIDN | 迟发性神经毒性         |
| ovulatory disturbances                                         | 排卵障碍            |
| oxidative stress                                               | 氧化应激            |
| placental barrier                                              | 胎盘屏障            |
| passive cutaneous anaphylaxis, PCA                             | 被动皮肤过敏试验        |
| phase II biotransformation                                     | II 相反应          |
| phase I biotransformation                                      | I 相反应           |
| phototoxicity                                                  | 光毒性作用           |
| physiological toxicokinetics                                   | 生理毒物动力学         |
| physiologically based toxicokinetic model, PBTK                | 以生理学为基础的毒物动力学模型 |
| poison                                                         | 毒物              |
| polychromatophilic erythrocyte                                 | 嗜多染红细胞          |
| polymorphonuclear leukocytes, PMNs                             | 多形核白细胞          |



## 英文

## 中文

|                                                 |                    |
|-------------------------------------------------|--------------------|
| polyploidy                                      | 多倍体                |
| popliteal lymph node assay, PLNA                | 腓窝淋巴结试验            |
| post replication repair(PRR)                    | 复制后修复              |
| potentiation joint action                       | 加强作用               |
| preimplantation loss                            | 着床前丢失              |
| procarcinogen(Pr)                               | 前致癌物               |
| programmed cell death                           | 程序性细胞死亡            |
| promotor                                        | 促癌物                |
| proximate carcinogen(Px)                        | 近致癌物               |
| quantal dose-response relationship              | 剂量-质反应关系           |
| quantal response                                | 质反应                |
| reactive oxygen species, ROS                    | 活性氧                |
| redox-active reductants                         | 氧化还原性反应物           |
| reference dose, RID                             | 参考剂量               |
| regulatory toxicology                           | 管理毒理学              |
| regulatory toxicology                           | 管理毒理学              |
| renal clearance                                 | 肾脏清除率              |
| renal plasma flow                               | 肾血浆流量              |
| reproductive hazards                            | 生殖危害               |
| reproductive toxicology                         | 生殖毒理学              |
| risk characterization                           | 危险度特征分析            |
| risk management                                 | 危险度管理              |
| risk assessment                                 | 危险度评价              |
| safety                                          | 安全性                |
| safety factor, SF                               | 安全系数               |
| scheduled DNA synthesis                         | 程序性 DNA 合成         |
| selective toxicity                              | 选择毒性               |
| sertoli cell                                    | 支持细胞               |
| sex-linked recessive lethal test, SLRL          | 果蝇伴性隐性致死试验         |
| signal transduction                             | 信号转导               |
| single-generation test of reproductive toxicity | 一代生殖毒性试验           |
| sister-chromatid exchange, SCE                  | 姐妹染色单体交换           |
| sodium channel                                  | Na <sup>+</sup> 通道 |
| SOS repair                                      | 呼救性修复              |
| spectrum of toxic effects                       | 毒效应谱               |
| steatosis                                       | 脂肪变性               |
| subchronic toxicity                             | 亚慢性毒性              |
| subchronic toxicity tests                       | 亚慢性毒性试验            |
| synergistic effect                              | 协同作用               |
| target organ                                    | 靶器官                |
| teratogen                                       | 致畸物                |
| teratogenic effect                              | 致畸作用               |

| 英 文                                     | 中 文            |
|-----------------------------------------|----------------|
| teratogenicity                          | 致畸性            |
| tetrodotoxin, TTX                       | 河豚毒素           |
| thalidomide                             | 反应停            |
| the mouse embryonic stem cell test, EST | 小鼠胚胎干细胞试验      |
| threshold dose                          | 阈剂量            |
| threshold limit value, TLV              | 阈限值            |
| toxic effect                            | 毒作用            |
| toxic endpoint                          | 毒性终点           |
| toxication                              | 增毒             |
| toxicity                                | 毒性             |
| toxicodynamics                          | 毒物效应动力学        |
| toxicokinetics                          | 毒物动力学          |
| toxicological safety evaluation         | 毒理学安全性评价       |
| toxicology                              | 毒理学            |
| toxicology of the liver                 | 肝脏毒理学          |
| transgenic animal                       | 转基因动物          |
| translocation                           | 易位             |
| tumor necrosis factor                   | 肿瘤坏死因子         |
| tumor suppressor gene                   | 肿瘤抑制基因         |
| tumor susceptibility gene               | 肿瘤易感基因         |
| tumor, neoplasm                         | 肿瘤             |
| ultimate carcinogen, Ut                 | 终致癌物           |
| uncertainty factor, UF                  | 不确定系数          |
| variation                               | 变异             |
| virtual safe dose, VSD                  | 实际安全剂量         |
| Wechsler adult intelligence scale       | 韦克斯勒成人智力量表     |
| Wechsler memory scale                   | 韦克斯勒记忆量表       |
| whole embryo culture, WEC               | 大鼠全胚胎培养        |
| xenobiotics                             | 外源化学物          |
| $\beta$ -bungarotoxin                   | $\beta$ -金环蛇毒素 |