

微核实验在环境健康综合监测中的应用*

郭辰¹ 吕占禄¹ 钱岩¹ 王先良^{1**} 吴家兵² 梁豹² 王菲菲¹ 潘丽波¹ 马瑾¹ 魏永杰¹
张金良¹

¹中国环境科学研究院环境基准与风险评估国家重点实验室 北京 100012

²安徽医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生系 合肥 230032

摘要 环境健康综合监测是我国环境健康工作未来的重要发展方向之一,但现有工作只重点关注污染物成分组成,缺乏健康效应信息,微核实验作为遗传毒性检测的标准化实验,具有准确性高、操作简单等特点,适用于环境健康监测工作中.本文综述了微核实验,包括植物微核实验,动物体内、体外细胞微核实验的特点及其在环境污染物遗传毒性监测中的应用;同时对微核实验的发展和进行了综述,胞质分裂阻滞法(CBMNT)弥补了传统微核实验的不足,微核实验与荧光原位杂交技术(FISH)、抗着丝粒抗体染色方法(CREST)等检测技术的联用还可以揭示微核形成的机制,自动化检测技术的发展使微核实验结果更加快速、直观.因此,微核实验作为体外毒理学指标之一,可在明确受污染环境主要污染物组成的基础上补充污染物的健康效应等基础数据,在环境健康综合监测工作中可被广泛应用,以进一步完善该体系. 参55

关键词 环境健康综合监测;植物微核;体外微核;自动化;高内涵筛选

CLC R994.6

Micronucleus test and its application in environmental health monitoring*

GUO Chen¹, LÜ Zhanlu¹, QIAN Yan¹, WANG Xianliang^{1**}, WU Jiabing², LIANG Bao², WANG Feifei¹,
PAN Libo¹, MA Jin¹, WEI Yongjie¹ & ZHANG Jinliang¹

¹State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China

²School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

Abstract Environmental health monitoring is the future focus of environmental health research in China. Current work is mainly focused on the composition of contaminants, lacking information of health effects. Micronucleus test (MNT) is one of the standard methods to detect genetic toxicity. MNT is simple and accurate and suitable for environmental health monitoring. This paper reviewed the application of MNT in genetic toxicity monitoring of environmental contaminant including plant MNT, *in vitro* MNT and *in vivo* MNT. It also reviewed the application and advancement of MNT. CBMNT is proved to be more accurate than traditional MNT; CBMNT combined with other techniques including FISH and CREST can reveal mechanisms of micronucleus formation. The development of automation detection methods makes MNT more efficient and visualized. As an *in vitro* toxicity test, MNT can provide information of health effects of pollutants whose composition is known. Thus MNT can be broadly used in environmental health monitoring and improve this system.

Keywords environmental health monitoring; plant micronuclei; *in vitro* micronuclei; automation; high content screening

环境污染对人群健康的影响是许多国家在经济发展中面临的重大问题,世界卫生组织调查显示,全球接近1/4的疾

病负担是由暴露于不良环境所引起的,通过改善环境质量每年可减少约1 300万人的死亡^[1].我国环境健康工作起步较晚,目前我国环境监测和疾病监测系统各自独立建设,卫生系统在疾病的监测过程中并未将地理因素、环境因素等信息进行统计;环境监测工作主要关注COD等常规污染物,一些对人体健康危害较大的重金属、有机物等并未列入监测范围.此外,与人体健康相关的一些体内、体外毒理学检测指标也未列入到常规监测中.但随着环境对人群健康可产生重要影响的认识的不断深入,环境健康工作得到了广泛重视,国务院先后出台了《国家环境与健康行动计划》(2007-2015)和《国家环境保护“十二五”环境与健康工作规划》,提出了开展建立重点地区环境与健康综合监测网络的规划.环境

收稿日期 Received: 2015-01-07 接受日期 Accepted: 2015-03-12

*国家自然科学基金项目(20907047)、国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(2012CB525005)、国家环保公益性行业科研专项(201309045、201409079)和中国环境科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务专项基金(2008KYYW05)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (20907047), the National Basic Research Program of China (973 Program, 2012CB525005), the National Environmental Protection Public Welfare Science and Technology Research Program of China (201309045, 201409079), and the National Nonprofit Institute Research Grant of CRAES (2008KYYW05)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: xlwang@craes.org.cn)

健康综合监测是合理利用环境系统和卫生系统的现有监测网络,在日常监测工作中相互配合,不断充实和优化监测内容^[2-4]。在监测指标的选择上,在传统的COD、VOC等指标的基础上,还应增加对人体危害较大的重金属、化合物等物质的检测。在上述理化指标检测之外,还应增加生物毒性、遗传毒性等检测指标,将检测结果与疾病监测结果相结合,建立完善的环境健康风险管理制度。

微核试验(Micronucleus Test, MNT)是检测受试物引起的染色体或有丝分裂器损伤的一种遗传毒性试验方法。微核的形成是由于细胞在诱变因子的作用下使染色体受到损伤,形成无着丝粒的染色体片段,或纺锤体受损的整个染色体,其在有丝分裂后期无法迁移至细胞两极,以游离的方式存在于细胞质中成为微核^[5-6]。微核试验具有操作简单、试验周期短、重复性好、可信度高等特点,在毒理学、医学、食品和环境等诸多领域有着广泛的应用,是许多国家和组织规定的药品、食品添加剂、化妆品等化学物质进行遗传毒性检测的必不可少的实验之一^[7-8]。因此,微核实验可以作为综合监测网络中的毒理学指标之一。本文综述了微核实验的最新研究进展,包括自动化微核技术的应用,可为其作为遗传毒性检测指标在综合监测中的应用提供新思路。

1 微核实验

微核技术最早由Boller和Matter等于20世纪70年代初建立,所用的对象为啮齿类动物骨髓细胞^[9];1985年,Fenech等在此基础上建立了胞质分裂阻滞法(CBMNT)微核技术,有效提高了微核试验的准确率^[10-11]。随着微核技术的不断发展,其应用不再局限于在体外哺乳类动物细胞的应用,并逐渐发展到植物领域,按照实验对象分类,现已建立了植物细胞、哺乳动物类细胞以及非哺乳动物类细胞微核试验方法。

1.1 植物微核实验

植物微核试验较常用的材料有植物花粉母细胞或根尖、茎尖细胞等,主要用于环境监测中。其中蚕豆细胞DNA含量多,染色体数目少且体积大,其根尖分生区细胞多,对环境诱变物引起的损伤较为敏感,操作方法简便、快速,灵敏度高^[12],可同时检测染色体完整性改变和染色体分离改变。该方法在国内使用已较为成熟,已被列入《生物监测技术规范(水环境部分)》,在水体、空气污染等领域应用广泛^[13]。在对浊漳河、昆明周边生活区水体遗传毒性检测中均有应用,发现检测水体的遗传毒性较大,提示接触该水可能会对人群健康产生危害^[14-15]。国外也有研究人员用大豆根尖对橄榄油加工厂排放的废水进行微核检测,结果显示10%稀释浓度的废水具有遗传毒性^[16]。

另外,上世纪70年代末建立的紫露草四分孢子期微核率计数方法也是植物微核检测中较为常用的方法,常被用于环境监测。一篇报道对使用紫露草监测空气污染致遗传毒性的作用进行研究,发现某地1997-2000年间污染区紫露草细胞微核率明显高于对照区,但2003-2005间的结果则显示两个地区的紫露草细胞微核率无显著性差异,说明空气质量得到改善^[17]。另外一篇文章对电厂周围可能被重金属、SO₂污染的土壤的遗传毒性进行研究,并与体外细胞Comet实验、Ames实

验相比较,发现部分土壤样品微核率显著高于对照组,且微核实验方法灵敏度较高、操作便捷^[18]。

其它植物细胞,如洋葱也可用于微核检测^[19]。综上所述,植物微核技术在大气污染、水污染、土壤污染以及重金属污染等引起的遗传损伤方面也具有较高的预警作用,且实际操作简单、花费低。但其不能反映出诱变剂在哺乳动物细胞内的靶分子作用方式和机制,有研究表明,动植物细胞微核检测系统对不同化合物的反应不同,这可能是由于代谢系统不同,以及对有丝分裂纺锤体破坏反应的不同^[20]。因此,植物微核检测系统可以作为环境污染物遗传毒性的预警系统,与体外微核实验、动物实验相互配合,在环境保护等方面发挥作用。

1.2 动物微核实验

动物体外细胞微核试验可使用的细胞较为广泛,如骨髓细胞、肝细胞、淋巴细胞等细胞均可被使用。经济合作与发展组织在其487号指南中,对化合物的体外哺乳细胞微核试验进行了规范,除可使用原代人体外周血淋巴细胞外,许多啮齿动物细胞系例如中国仓鼠卵巢细胞CHO、中国仓鼠肺细胞CHL、中国仓鼠成纤维细胞V79及L5178Y小鼠淋巴瘤细胞等,以及人类细胞系如TK6人淋巴母细胞等也均被大量实验证实其有效性^[21]。

使用较为成熟的方法目前有啮齿类动物或人类外周血淋巴细胞微核试验、骨髓嗜多染红细胞微核试验。人外周血淋巴细胞(PBL)微核率检测近年来作为癌症早期诊断的生物标志物的相关研究成为热点。癌症的早期检出对患者的预后治疗具有重要意义,而基因组失稳可能是癌症早期形成的分子病理学步骤。Maffei等对PBL微核率与肠癌之间的关系进行了研究,结果发现其中肠癌患者PBL微核率显著高于肠息肉患者和对照组人群,综合其他结果,认为微核检测可以作为肠癌早期检测的生物标志物之一^[22]。

骨髓嗜多染红细胞(PCE)微核试验在化合物遗传毒性体内检测中应用较广。Wilmer等用该方法研究了三氯乙烯(TCE)蒸汽对于CD大鼠遗传毒性的影响,在 5×10^{-3} TCE暴露条件下,3只大鼠在未达到暴露时间前即死亡,其余大鼠在暴露6 h后检测了PCE微核率,但并未发现显著变化^[23]。 α -鹅膏蕈碱(α -amanitin)是蘑菇中主要的有毒物质, Marciniak等通过动物实验检测了其毒性,其中PCE微核结果显示在受试剂量下微核率显著增加,证实 α -鹅膏蕈碱具有遗传毒性^[24]。

除了哺乳动物细胞外,鱼类外周血红细胞也被用于微核实验。鱼类血细胞是有核细胞,在环境监测中应用较多,尤其是水体遗传毒性监测中。但对于不同鱼样本,微核率相差较大^[25]。用池塘鲤鱼(*Channa punctatus*)和金鱼(*Carassius auratus*)对砷在水中的遗传毒性进行研究,发现在饮用水标准中规定的砷浓度下,两种鱼类血细胞微核率显著增加,显示出一定的遗传毒性,但微核率检测敏感度在鱼类中具有个体特异性^[26]。与哺乳动物不同,鱼类是变温动物,其细胞分裂的周期并不固定,而是随温度的变化而变化,因此,鱼类应用于微核研究仍有一些不确定因素^[27]。

综上所述,动物细胞、植物细胞微核实验在环境遗传毒性检测,化合物、药物毒理学研究,肿瘤研究等方面具有实际的应用,已逐渐成为遗传毒性检测不可替代的实验方法。

2 微核实验技术在环境健康监测方面的应用

随着微核技术的广泛应用,其检测方法也不断发展,传统微核实验无法分辨分裂细胞与未分裂细胞,无法解决不同细胞在不同培养环境下其分裂周期不同造成的实验误差.细胞分裂阻滞微核分析法(CBMNT)是在传统微核实验的基础上建立的,解决了不同细胞分裂不同步的问题,使微核实验结果灵敏度更高,并实现了微核实验标准化流程的建立^[28];同时,分子生物学的发展为微核技术的发展提供了新的平台,与荧光原位杂交试验(FISH)方法、DNA探针与抗着丝粒抗体染色(CREST)方法以及高通量自动化检测技术等方法的联合使用,使得微核实验可以进一步明确其损伤机理、微核来源,并极大地提高检测效率.

2.1 细胞分裂阻滞法微核实验(CBMNT)

在哺乳动物细胞中,微核的形成需要细胞经过有丝分裂过程,CBMNT是利用细胞松弛素B(Cyto-B)不影响细胞核分裂,但会阻断胞质分裂的作用.加入cyto-B可使经有丝分裂的细胞变为双核细胞,该方法可同时获得受试物诱导的双核细胞率和双核细胞微核率,说明受试物对细胞周期和遗传毒性的影响^[29].如今CBMNT法依然是检测微核的经典方法,其准确性和重复性得到了一致认可,并发展成为能够同时检测微核、核质桥、核芽突、单核/双核细胞比例、凋亡细胞、坏死细胞等一系列指标的技术^[30].近几年,CBMNT法在环境污染对人体遗传毒性的检测中使用较多.Chinde等通过comet实验、微核试验等研究了200位铅酸蓄电池回收和制造业工人PBL微核率、口腔上皮细胞(BECs)的微核率,并与200位空白对照人员进行对比,发现实验组人员PBL和BECs中微核率均显著高于对照组,说明污染环境对人群遗传毒性的影响值得注意^[31].另外一项研究调查了空气中的甲醛对人体健康的危害,41名身体健康的志愿者每天暴露于随机变化浓度的甲醛中4 h,共5 d;并需进行共4次,每次15 min的自行车练习.微核实验检测了实验组外周血细胞和脱落鼻腔黏膜细胞(取自暴露结束数周之后),但检测结果未发现可吸入甲醛会造成人体遗传毒性^[32].

2.2 荧光原位杂交技术(FISH)

荧光原位杂交技术(FISH)于20世纪80年代诞生,其基本原理是用已知标记的单链核酸为探针,按照碱基互补的原则,与待检材料中的单链核酸进行特异性结合,形成可被检测的杂交双链核酸,通过该方法可以判断微核来源.在完成微核实验的制片染色等过程之后,可继续进行FISH实验,将待测样品与标记了荧光信号的DNA探针进行原位杂交,判断出微核成型原因:染色体断裂或整条染色体丢失.一般常用的探针有3种:染色体特异重复序列探针;全染色体或染色体区域特异性探针;特异性位置探针^[33-35].Balajec等使用多彩FISH技术研究了电离辐射对人淋巴细胞微核形成的影响,结果显示随着 γ 射线辐射剂量的增加,细胞微核率增加^[36].实验中使用了多种荧光的染色体探针,获得了6个不同的荧光图像,说明电离辐射引起的微核来自于多条染色体碎片;且某些探针的检出率明显更高,对于进一步深入理解电离

辐射对染色体的损伤作用机制有所启示.FISH法虽然结果可靠、灵敏度高,但其花费也较高,不适宜用于广泛筛查.

2.3 抗着丝粒抗体染色方法(CREST)

抗着丝粒抗体可与染色体着丝粒蛋白特异性结合,与微核实验相结合,可特异性标记有着丝粒的微核,从而鉴别非整倍体毒性.早期CREST法在微核检测中的应用较多,如有机磷、有机氯农药的遗传毒性及损伤机制研究^[37];以CREST法检测微核率作为环境污染对啮齿类动物遗传毒性检测的生物标志物^[38]以及电离辐射对细胞损伤作用的影响等^[39].CREST法的优势在于可以在一定程度上阐明染色体断裂机制,但只能检测染色体丢失形成的非整倍体,使其应用受到了限制;但与FISH法相比,CREST染色法更加简便和经济.

2.4 自动化检测方法

微核实验虽然简单、准确且易操作,但实验结果仍需要人工阅片计算微核数,工作量较大且容易出现人为误差.微核技术在很多领域已被列为常规实验,环境健康综合监测要以微核为常规检测指标之一,其工作量较大.因此研究自动化高通量的微核检测方法成为研究人员的亟待解决的技术关键.现有的自动化检测方法包括利用流式细胞术、激光扫描仪以及计算机图像分析系统等.

2.4.1 流式细胞术(FCM) FCM应用于微核检测时,需对细胞内核物质进行荧光染色,但由于微核与主核其组成相同仅大小不同,荧光染色并不能将二者区分开,因此早期FCM在微核中的应用受到限制,仅用于检测无核细胞的微核率.随着FCM的不断发展,其开始用于有核细胞的微核检测,利用的是微核是主核大小1/3-1/16的特点将其进行区分.但直接对整个细胞进行染色之后利用该方法进行检测往往准确性较差,故现在常用的方法是用物理或化学方法裂解细胞,使细胞核、微核释放出来,之后再行流式细胞术检测.但该方法仍然存在一定的弊端:凋亡小体中含有DNA,因而容易在实验中检测到假阳性信号;另外,FCM对实验操作的要求较高,要求过程中尽量避免由于外力导致的机械损伤等.最后,该方法所得到的结果是相对于细胞核数量的微核率,不能将微核率与实际细胞相关联^[40-41].Cammerer等报道了用流式细胞术检测了非整倍体诱变剂(秋水仙碱、长春花碱、长春新碱)和染色体断裂剂(环磷酰胺)对小鼠网织红细胞微核率的影响,结果显示几种非整倍体诱变剂致小鼠微核增加,且呈现出非线性的剂量效应关系,而环磷酰胺作用后微核增加与剂量之间显示出线性剂量关系;同时该实验还同时使用了FISH技术与流式细胞术相结合,探究3种非整倍体诱变剂诱导的微核来源^[42].

2.4.2 激光细胞仪方法(LSC) 激光细胞仪(LSC)是一种基于显微镜技术的细胞荧光测量仪,LSC法可弥补FCM的一些不足,其工作原理同样是给细胞进行荧光染色,然后上机进行荧光扫描,不仅可获得DNA含量等参数,同时还可获得图像,进行肉眼验证.对于贴壁细胞,进行LSC检测无需对细胞进行消化等前处理,可直接进行染色.另外,配备了多波长激光发射器、高动态范围荧光接收装备的LSC可以实现对细胞内或细胞核内多参数的同时测定,如细胞质面积、核面积、细胞核DNA含量、微核密度甚至蛋白含量等,在微核实验中,多荧光有利于区分双核细胞,得到精确地双核细胞

微核含量;此外,LSC法检测速度较快,一般10 min即可检查5 000个细胞,已成为常规微核实验方法^[43-44]。LSC既可用于致癌物致的小鼠体外红细胞、人口腔上皮细胞微核检测中,也可用于多种体外培养肿瘤细胞,如乳腺癌细胞MCF-7、早幼粒白血病细胞HL-60和淋巴瘤细胞U-937等细胞的微核检测中,且与传统镜检方法比较具有较好的一致性^[45-46]。

2.4.3 高内涵筛选系统(HCS) HCS具有强大的图像分析功能,通过自带的内置软件分析系统,可以对不同荧光染色的图像进行分析从而得到有效数据,其在药物筛选、毒性测定等方面应用广泛。在体外微核实验中,HCS系统能自动分辨双核细胞和微核,并进行统计,可极大地节省工作量,并且减少人工阅片的误差^[47]。

Cellomics ArrayScan高内涵筛选系统是由Thermo Fisher公司研发的活细胞成像系统,可实现对微核实验、彗星实验等细胞毒性检测^[48]。研究人员应用Cellomics设备对46种化合物进行了微核测试,包括8种非整倍体诱发剂、25种染色体断裂剂和13种无遗传毒性的化合物。检测结果显示,该自动化检测方法与传统镜检结果相比,敏感性为88%,特异性达到100%,阳性预测率100%,阴性预测率76%,说明该系统准确度较高,可以应用于微核常规研究中^[49]。Sun等研究了槲皮素和姜黄素的遗传毒性,并使用Cellomics ArrayScan系统对其微核诱导率进行分析,结果显示3-6 $\mu\text{mol/L}$ 的姜黄素可明显增加微核率,而槲皮素对微核的形成影响较小^[50]。国内也有研究发现,用该系统测试了8种阳性诱变剂对CHO细胞微核的影响,其中7种诱变剂显示出阳性结果,说明该系统在用于微核试验中精确度较高,且操作简单,结果由系统自动判断,耗时短^[51]。

In Cell Analyzer是由GE公司研发的HCS系统,它具有高质量激光光源,可以实现细胞3D结构成像、低丰度内源生物分子成像、蛋白共定位等。自带的数据分析软件具有微核分析等诸多功能。Shibai-Ogata等对IN Cell Analyzer在微核检测中的可信性进行了验证,测试了包括染色体断裂剂等阳性物在内的30种化合物对中国仓鼠肺细胞CHL/IU微核率的影响,并与相同条件下的镜检结果进行对比,证实该系统得到的结果与传统实验方法相比具有较高的一致性^[52]。随后,在其最新研究中,Shibai-Ogata等对经丝裂霉素C处理后的PBL和PCE的微核率进行IN Cell Analyzer自动化分析,并与镜检结果进行多次对比,结果显示自动化计数与人工计数的重复性相当,但人工计数的结果受人为主观因素影响,而自动化分析方法在分析速度以及客观性方面具有优势^[53]。

Opera和Operetta是PerkinElmer开发的共聚焦微孔板成像阅读装置,与其他几种HCS产品相比较,Opera最显著的应用领域是在亚细胞分辨率水平上的细胞筛选和基于微珠的各种筛选应用,使其在药物筛选方面有着独特的优势,此外,Opera还可检测毒性和活性、细胞信号传导和通路筛选、基因表达,以及基于微珠的均相抗原-抗体作用进行免疫化学检测。但其在微核分析中的应用见报道^[54]。

2.4.4 其它 除了对微核分析实现自动化外,Transgenomic公司专门针对微核实验前处理工作设计了一台能从培养、收获,直至制片等实现完全自动化的HANABI Harvester系列仪器,其可模拟人工操作流程,实现自动离心、分离上清、低渗

处理、固定等微核前处理步骤,且能按照试验要求进行液体预热和预冷等精确流程,实现微核全过程的自动化操作,使实验结果更加客观真实,重复性高,避免了人为误差,同时减少劳动力。实验材料方面,外周血、脐带血、骨髓等培养细胞均可用该仪器进行微核制片^[55]。

上述高通量高内涵的检测方法耗时短,一般数小时即可完成微核的拍照、计数和分析,实验一般使用微板,所需受试物少,用于环境健康综合监测中环境样品遗传毒性检测时可以节约大量人力物力。但上述仪器往往成本较高,一般实验室并不能配备,制约了其应用范围。另外,各个仪器无法与其他拍摄仪器所获得的图片兼容,如荧光显微镜或激光共聚焦显微镜拍摄到的图片无法导入其预置软件进行自动分析。若可以实现将外来图片导入,利用上述设备功能强大的分析软件进行自动化分析,将会极大缩短微核试验周期,节约成本,降低实验人为误差。

3 展望

遗传毒性检测在环境健康综合监测中具有重要意义。仅知道环境样品中各个污染物的含量已不能满足当前环境健康工作的需求,环境中污染物究竟能引起多大程度的健康损害,不仅是群众关心的问题,也同时是环保部门迫切需要了解的指标。实际环境健康工作中实现多学科分工合作,在测定污染物浓度等理化指标的基础上,加入遗传毒性、综合毒性等指标,对检测结果中毒性较大的样品还可进行某些污染物浓度的复测,这样既能确定检测区域存在的主要污染物,同时还能得到相关的毒性指标,对其引起的健康危害进行初步的评价。微核实验作为体外遗传毒性检测的经典方法之一,其准确度高、操作难度低、成本低;体外微核试验在环境样品检测中的应用条件也已经较为成熟,能够实现较大批量样品的测定,如水样经过富集等前处理后可良好的应用于体外微核实验检测其遗传毒性大小,若配合自动化检测方法,微核实验的检测效率及准确度将会极大提高,完全可以作为环境健康综合监测体系中的常规检测指标之一。同时,结合其他遗传毒性检测方法,如SOS/umu实验、彗星实验等方法,还可以探讨不同作用机制下遗传毒性的大小。在环境健康综合监测体系中加入微核实验等遗传毒性检测指标,将单一的环境污染物检测问题转变成为环境污染情况对人群健康的潜在影响,可以更好地阐释环境健康综合监测工作的意义和重要性。

参考文献 [References]

- 1 WHO. 10 Facts on preventing disease through healthy environments [EB/OL]. 2010 [2014.11.19]. http://www.who.int/features/factfiles/environmental_health/en/
- 2 邓爱萍. 环境与健康综合监测工作中相关问题探讨[J]. 北方环境, 2011, 23 (10): 167-168 [Deng AP. Discussion on integrated monitoring work of environment and health [J]. *Northern Environ*, 2011, 23 (10): 167-168]
- 3 范清华, 张涛, 沈红军. 典型区域环境与健康综合监测体系构建[J]. 环境科技, 2014, 27 (1): 45-48 [Fan QH, Zhang T, Shen HJ. Construction

- of environmental health monitoring framework for typical areas [J]. *Environ Sci Technol*, 2014, **27** (1): 45-48]
- 4 郭怡平. 环境与健康综合监测机制研究[J]. 法制与经济(下旬), 2014 (375): 129-130
 - 5 孔繁翔, 尹大强, 严国安. 环境生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000
 - 6 Muller WU, Kryscio A, Streffer C. Micronuclei in lymphocytes of uranium miners of the former Wismut SDAG [J]. *Cytogenet Genome Res*, 2004, **104** (1-4): 295-298
 - 7 曹佳. 微核试验[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2000
 - 8 Kirkland DJ, Henderson L, Marzin D, Müller L, Parry JM, Speit G, Tweats DJ, Williams GM. Testing strategies in mutagenicity and genetic toxicology: an appraisal of the guidelines of the European Scientific Committee for Cosmetics and Non-Food Products for the evaluation of hair dyes [J]. *Mutat Res-Gen Tox En*, 2005, **588** (2): 88-105
 - 9 龚婧婧, 黄海涛, 米其利, 倪红梅, 季秀玲, 天建华. 微核技术研究进展[J]. 生物技术通报, 2012, **16** (3): 49-56 [Gong JJ, Huang HT, Mi QL, Ni HM, Ji XL, Ao JH. Research progress on micronucleus technology [J]. *Biotechnol Bull*, 2012, **16** (3): 49-56]
 - 10 向梦龙, 敖琳, 刘晋祎, 曹佳. 胞质分裂阻滞微核细胞组学试验法的研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2012, **24** (3): 241-244
 - 11 Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay [J]. *Nat Protoc*, 2007, **2** (5): 1084-1104
 - 12 Wu L, Yi H, Yi M. Assessment of arsenic toxicity using *Allium/Vicia* root tip micronucleus assays [J]. *J Hazard Mater*, 2010, **176** (1-3): 952-956
 - 13 黄坤艳. 植物微核技术在环境污染监测中的建立与应用[J]. 北京农业, 2008, **28** (27): 14-16
 - 14 刘瑞祥, 任嘉红, 秦永燕, 刘振宇, 常惠丽. 浊漳河水体污染物对蚕豆根尖细胞的遗传毒性研究[J]. 西北植物学报, 2010, **31** (1): 150-155 [Liu RX, Ren JH, Qin YY, Liu ZY, Chang HL. Genotoxicity of pollutants in the water body of Zhuozhang river to *Vicia faba* root-tip cells [J]. *Acta Bot Bor-Occid Sin*, 2010, **31** (1): 150-155]
 - 15 熊勇, 彭文书, 赵春艳. 昆明周边部分污染水体对蚕豆根尖细胞微核率的影响[J]. 癌变·畸变·突变, 2010, **22** (1): 55-58 [Xiong Y, Peng WS, Zhao CY. Effect of the partial polluted waters around Kunming on micronucleus rate of *Vicia faba* root tip cells [J]. *Carcino Genesis Terato Genesis Mutat Genesis*, 2010, **22** (1): 55-58]
 - 16 El Hajjouji H, Pinelli E, Guisresse M, Merlina G, Revel JC, Hafidi M. Assessment of the genotoxicity of olive mill waste water (OMWW) with the *Vicia faba* micronucleus test [J]. *Mutat Res-Gen Tox En*, 2007, **634** (1-2): 25-31
 - 17 Misik M, Micieta K, Solenska M, Misikova K, Pisarcikova H, Knasmuller S. *In situ* biomonitoring of the genotoxic effects of mixed industrial emissions using the *Tradescantia micronucleus* and pollen abortion tests with wild life plants: demonstration of the efficacy of emission controls in an eastern European city [J]. *Environ Pollut*, 2007, **145** (2): 459-466
 - 18 Lah B, Vidic T, Glasencnik E, Cepeljnik T, Gorjanc G, Marinsek-Logar R. Genotoxicity evaluation of water soil leachates by Ames test, comet assay, and preliminary *Tradescantia micronucleus* assay [J]. *Environ Monit Assess*, 2008, **139** (1-3): 107-118
 - 19 Kumari M, Khan SS, Pakrashi S, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Cytogenetic and genotoxic effects of zinc oxide nanoparticles on root cells of *Allium cepa* [J]. *J Hazard Mater*, 2011, **190** (1-3): 613-621
 - 20 Dimitrov BD, Gadeva PG, Benova DK, Bineva MV. Comparative genotoxicity of the herbicides Roundup, Stomp and Reglone in plant and mammalian test systems [J]. *Mutagenesis*, 2006, **21** (6): 375-382
 - 21 OECD. Test No. 487: *In vitro* mammalian cell micronucleus test, OECD guidelines for the testing of chemicals (Section 4) [M]. OECD Publishing, 2010
 - 22 Maffei F, Moraga JMZ, Angelini S, Zenesini C, Musti M, Festi D. Micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes as a biomarker for the early detection of colorectal cancer risk [J]. *Mutagenesis*, 2014, **29** (3): 221-225
 - 23 Wilmer J, Spencer P, Ball N, Bus J. Assessment of the genotoxicity of trichloroethylene in the *in vivo* micronucleus assay by inhalation exposure [J]. *Mutagenesis*, 2014, **29** (3): 209-214
 - 24 Marciniak B, Lopaczyńska D, Kowalczyk E, Skośkiewicz J, Witczak M, Majczyk M, Grabowicz W, Ferenc T. Evaluation of micronuclei in mice bone marrow and antioxidant systems in erythrocytes exposed to α -amanitin [J]. *Toxicol*, 2013, **63**: 147-153
 - 25 Obiakor M, Okonkwo J, Nnabude P, Ezeonyejiaku C. Eco-genotoxicology: micronucleus assay in fish erythrocytes as *in situ* aquatic pollution [J]. *J Anim Sci Adv*, 2012, **2** (1):123-133
 - 26 Kumar A, Kesari VP, Khan PK. Fish micronucleus assay to assess genotoxic potential of arsenic at its guideline exposure in aquatic environment [J]. *Biometals*, 2013, **26** (2): 337-346
 - 27 李谷, 程晓莉, 陈丹, 余文斌, 翟良安. 鱼微核试验筛检水体诱变物的应用与研究[J]. 水生生物学报, 2002, **26** (1): 74-81
 - 28 唐钧, 朱瑞娟, 周元陵, 金复生. 双核细胞与常规微核法在人群监护中的对比[J]. 工业卫生与职业病, 2000, **26** (4): 202-203 [Tang J, Zhu RJ, Zhou YL, Jin FS. Comparison of the routine and binucleated lymphocytes micronuclei in population monitoring [J]. *Ind Hlth Occup Dis*, 2000, **26** (4): 202-203]
 - 29 El-Zein RA, Schabath MB, Etzel CJ, Lopez MS, Franklin JD, Spitz MR. Cytokinesis-blocked micronucleus assay as a novel biomarker for lung cancer risk [J]. *Cancer Res*, 2006, **66** (12): 6449-6456
 - 30 Fenech M, Crott JW. Micronuclei, nucleoplasmic bridges and nuclear buds induced in folic acid deficient human lymphocytes-evidence for breakage-fusion-bridge cycles in the cytokinesis-block micronucleus assay [J]. *Mutat Res-Fund Mol M*, 2002, **504** (1-2): 131-136
 - 31 Chinde S, Kumari M, Devi KR, Murty US, Rahman MF, Kumari SI. Assessment of genotoxic effects of lead in occupationally exposed workers [J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2014, **21** (19): 11469-11480
 - 32 Zeller J, Neuss S, Mueller JU, Kuhner S, Holzmann K, Hogel J. Assessment of genotoxic effects and changes in gene expression in humans exposed to formaldehyde by inhalation under controlled conditions [J]. *Mutagenesis*, 2011, **26** (4): 555-561
 - 33 Bolognesi C, Landini E, Perrone E, Roggieri P. Cytogenetic biomonitoring of a floriculturist population in Italy: micronucleus analysis by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) with an all-chromosome centromeric probe [J]. *Mutat Res-Gen Tox En*, 2004, **557** (2): 109-117
 - 34 Schmitt E, Lehmann L, Metzler M, Stopper H. Hormonal and genotoxic activity of resveratrol [J]. *Toxicol Lett*, 2002, **136** (2): 133-142
 - 35 Migliore L, Di Bucchianico S, Ubaldi C. The *in vitro* micronucleus assay and FISH analysis [M]//Sierra LM, Gaivão I. Genotoxicity and DNA repair. New York: Springer, 2014: 73-102
 - 36 Balajee AS, Bertucci A, Taveras M, Brenner DJ. Multicolour FISH

- analysis of ionising radiation induced micronucleus formation in human lymphocytes [J]. *Mutagenesis*, 2014, **29** (6): 447-455
- 37 Cicchetti R, Bari M, Argentin G. Induction of micronuclei in bone marrow by two pesticides and their differentiation with CREST staining: an *in vivo* study in mice [J]. *Mutat Res-Gen Tox En*, 1999, **439** (2): 239-248
- 38 Degrassi F, Tanzarella C, Ieradi LA, Zima J, Cappai A, Lascialfari A. CREST staining of micronuclei from free-living rodents to detect environmental contamination *in situ* [J]. *Mutagenesis*, 1999, **14** (4): 391-396
- 39 Sgura A, Antoccia A, Cherubini R, Dalla Vecchia M, Tiveron P, Degrassi F. Micronuclei, CREST-positive micronuclei and cell inactivation induced in Chinese hamster cells by radiation with different quality [J]. *Int J Radiat Biol*, 2000, **76** (3): 367-374
- 40 Bryce SM, Avlasevich SL, Bemis JC, Lukamowicz M, Elhajouji A, Van Goethem F. Interlaboratory evaluation of a flow cytometric, high content *in vitro* micronucleus assay [J]. *Mutat Res-Gen Tox En*, 2008, **650** (2): 181-195
- 41 Bryce SM, Shi J, Nicolette J, Diehl M, Sonders P, Avlasevich S. High content flow cytometric micronucleus scoring method is applicable to attachment cell lines [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2010, **51** (3): 260-266
- 42 Cammerer Z, Schumacher MM, Kirsch-Volders M, Suter W, Elhajouji A. Flow cytometry peripheral blood micronucleus test *in vivo*: determination of potential thresholds for aneuploidy induced by spindle poisons [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2010, **51** (4): 278-284
- 43 Darzynkiewicz Z, Smolewski P, Holden E, Luther E, Henriksen M, Francois M. Laser scanning cytometry for automation of the micronucleus assay [J]. *Mutagenesis*, 2011, **26** (1): 153-161
- 44 Pozarowski P, Holden E, Darzynkiewicz Z. Laser scanning cytometry: Principles and applications—An update [M]//Taajtes DJ, Roth J. Cell imaging techniques. New York: Humana Press, 2013: 187-212
- 45 Styles JA, Clark H, Festing MF, Rew DA. Automation of mouse micronucleus genotoxicity assay by laser scanning cytometry [J]. *Cytometry*, 2001, **44** (2): 153-155
- 46 Smolewski P, Ruan Q, Vellon L, Darzynkiewicz Z. Micronuclei assay by laser scanning cytometry [J]. *Cytometry*, 2001, **45** (1): 19-26
- 47 Zanella F, Lorens JB, Link W. High content screening: seeing is believing [J]. *Trends Biotechnol*, 2010, **28** (5): 237-245
- 48 Giuliano KA, Haskins JR, Taylor DL. Advances in high content screening for drug discovery [J]. *Assay Drug Dev Technol*, 2003, **1** (4): 565-577
- 49 Diaz D, Scott A, Carmichael P, Shi W, Costales C. Evaluation of an automated *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells [J]. *Mutat Res-Gen Tox En*, 2007, **630** (1-2): 1-13
- 50 Sun B, Ross SM, Trask OJ, Carmichael PL, Dent M, White A. Assessing dose-dependent differences in DNA-damage, p53 response and genotoxicity for quercetin and curcumin [J]. *Toxicol In Vitro*, 2013, **27** (6): 1877-1887
- 51 周飞, 林海霞, 常艳. CHO细胞体外微核高内涵筛选方法的建立及应用[J]. 癌变·畸变·突变, 2011, **23** (1): 31-34, 7 [Zhou F, Lin HX, Chang Y. Evaluation of micronucleus with CHO cells using high throughput screening [J]. *Carcino Genesis Terato Genesis Muta Genesis*, 2011, **23** (1): 31-34, 7]
- 52 Shibai-Ogata A, Kakinuma C, Hioki T, Kasahara T. Evaluation of high-throughput screening for *in vitro* micronucleus test using fluorescence-based cell imaging [J]. *Mutagenesis*, 2011, **26** (6): 709-719
- 53 Shibai-Ogata A, Tahara H, Yamamoto Y, Fujita M, Satoh H, Yuasa A. An automated new technique for scoring the *in vivo* micronucleus assay with image analysis [J]. *Mutagenesis*, 2014, **29** (1): 63-71
- 54 PERKINELMER. Sophisticated Scoring Algorithm for Micronucleus Assays [EB/OL] [2014.11.19]. http://www.perkinelmer.com.cn/Content/ApplicationNotes/APP_SophisticatedscoringalgorithmmicronucleusOpera.pdf.
- 55 TRANSGENOMIC. HANABI Metaphase Chromosome Harvester [EB/OL] [2014.11.19]. <http://www.transgenomic.com/diagnostic-tools/cytogenetic-systems/hanabi-metaphase-chromosome-harvester>.