

## 遗传毒性早期快速评价方法

武元峰, 栾 洋, 戚新明, 任 进\*

中国科学院上海药物研究所药物安全评价研究中心, 上海 201203

**摘 要:** 遗传毒性评价是药物安全性评价的重要组成部分。如何早期、快速地获得药物可能的毒性反应数据, 是当前遗传毒理学领域的研究热点之一。介绍几种目前应用比较广泛或有较好应用前景的早期、快速的遗传毒性评价方法, 包括 Ames II 试验、Gadd45 GreenScreen 试验、高通量体外彗星试验和流式细胞术检测微核试验, 主要围绕这些方法的基本原理、简要操作流程、预测毒性的可信度以及与传统方法相比的优缺点等展开。同时简要介绍计算机辅助毒性预测模型以及基因芯片技术在遗传毒性评价中的应用。

**关键词:** 遗传毒性; 安全性评价; Ames II 试验; Gadd45 GreenScreen 试验; 高通量彗星试验

**中图分类号:** R965.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2011)04-0244-07

## Advance in study on early and rapid assays of genotoxicity

WU Yuan-feng, LUAN Yang, QI Xin-ming, REN Jin

Center for Drug Safety Evaluation and Research, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China

**Abstract:** Genotoxicity assessment is an important component of drug safety evaluation. Recently, how to obtain the data of potential side effects rapidly in early phase of drug research is one of the hot points in genetic toxicology. This review summarized several prospective approaches including Ames II test, Gadd45 GreenScreen test, high-throughput *in vitro* comet test, and micronucleus test using flow cytometry, and their principles, brief procedure, validation, advantages, and potential problems. Additionally, this review gave a brief introduction of computer-assisted toxicity prediction model and application of microarray in genotoxicity evaluation.

**Key words:** genotoxicity; safety evaluation; Ames II test; Gadd45 GreenScreen test; high-throughput *in vitro* comet test

保证药物的安全性是新药研发的重要任务。遗传毒性评价因其可以预测药物的致突变性或致癌性而越来越受重视。目前人用药品注册技术要求国际协调会(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH)发布的用于药物非临床安全性评价的标准遗传毒性组合试验包括细菌致突变试验(如 Ames 试验)、体外哺乳动物细胞试验(可选, 如小鼠淋巴瘤 *Tk* 基因突变试验或体外染色体畸变试验等)和哺乳动物体内试验(如体内微核试验、彗星试验等), 但这些传统遗传毒性试验并不适用于早期快速筛选。在药物研发阶段及早并快速地获得药物的毒性反应数据, 可以降低药物的研发成本, 缩短研发周期。因此, 研究者采用

各种新技术, 致力于开发可以早期、快速评价药物遗传毒性的新方法。

### 1 Ames II 试验(Ames 波动试验)

Ames 试验是遗传毒性评价的经典方法之一。但传统 Ames 试验需要 5~6 种菌株(TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537), 实验过程涉及到培养大量的琼脂平板以及繁复的平板菌落计数等, 耗费实验材料多, 费时费力, 且受试化合物用量大。这些问题使传统的 Ames 试验无法成为一种可高通量地用于早期筛选的评价方法。基于此, Gee 等<sup>[1]</sup>通过开发新的菌株, 并改进传统 Ames 试验方法, 开发出新的 Ames 试验, 即 Ames II 试验, 又称 Ames 波动试验。

#### 1.1 基本原理

收稿日期: 2011-06-03

基金项目: 国家自然科学基金(20807045/B070701); 国家科技重大专项“重大新药创制”(2008ZX09305-007, 2009ZX09501-033, 2009ZX09301-001)

作者简介: 武元峰(1985—), 博士研究生, 研究方向为药物毒理学。Tel: (021)20231000-1303 E-mail: yfwu\_045@yahoo.com.cn

\*通讯作者 任 进, 研究员, 研究方向为药物毒理学。Tel: (021)20231972 E-mail: jren@mail.shnc.ac.cn

菌株方面, Gee 等<sup>[1]</sup>开发的 6 种沙门氏菌株 (TA7001~TA7006) 在组氨酸合成操纵子上各有一个独特的点突变, 这 6 种点突变 (T:A→C:G、T:A→A:T、T:A→G:C、C:G→T:A、C:G→A:T、C:G→G:C) 包含了所有点突变的可能性, 将 6 种菌株混合在一起 (TAmix), 即能够检测出所有可以诱发点突变的化合物。再配合一种传统 Ames 试验中采用的菌株 TA98 (该菌株用于检测移码突变), Ames II 试验只要采用 TAmix 和 TA98 就可以检测出可以诱发点突变和移码突变的化合物。

实验方法方面<sup>[2]</sup>, Ames II 试验摒弃了传统试验所用的固态琼脂平板培养方法, 而采用液态微孔板培养方法。即在微孔板中进行受试物和菌株的孵育, 利用培养基中的特殊指示剂溴甲酚紫, 当孔中有回复突变的菌株生长, 使培养基 pH 值降低时, 该指示剂由紫色变为黄色。利用酶标仪在特定波长进行扫描, 可记录培养基为黄色孔的数量, 也即反应出受试物的致突变性。全过程可以全自动由机器完成, 真正实现了高通量化。

## 1.2 简要操作流程

将受试物和 TAmix 或 TA98 菌株在 24 孔板中进行孵育, 37 °C 振荡 90 min 后, 每孔的混合物平均分到 384 孔板中的 48 个孔中, 37 °C 继续孵育 48 h。酶标仪读取  $A_{462}$ , 计算每个样本 48 孔中黄色孔

的数量, 与阴性对照的自发突变相比后, 得出每个样本的突变频率。

## 1.3 方法确证

Gee 等<sup>[2]</sup>首先对该方法进行了确证, 测试了 30 种已知化合物, 与美国国家毒理学计划 (National Toxicology Program, NTP) 数据库中已有的传统 Ames 试验结果对比, 发现两种方法得到的结果一致性达到 88%。

另外, 来自多家制药企业和政府组织的研究人员进行了国际多实验室的 Ames II 确证<sup>[3]</sup>。两种方法得到的结果不仅具有高度一致性 (84.2%), 且不同实验室之间的结果可重复性也达到了 89.5%。

最近, Kamber 等<sup>[4]</sup>利用 Ames II 试验测试了更多化合物 (71 种), 以 NTP 数据库中传统 Ames 试验结构为参照, 在 4 个方面将 Ames II 试验与传统 Ames 试验进行了更全面的对比, 包括试验结果的一致性、诱导突变谱的一致性、阳性结果是否需要 S9 以及在预测啮齿类致癌性方面的相关性。与之前的对比结果相类似, 两种方法在上述 4 个方面也基本保持一致。

## 1.4 优点

Ames II 试验由于上述在菌株以及实验方法上的改进, 具有自发突变率低、受试物消耗少以及可以高通量化等优点, 见表 1。

表 1 Ames II 试验的优点  
Table 1 Advantages of Ames II experiment test

| 项 目    | 传统 Ames 试验        | Ames II 试验  | Ames II 优点 |
|--------|-------------------|-------------|------------|
| 菌株     | TA97, TA98, TA100 | TAmix, TA98 | 菌株自发突变率低   |
| 培养方法   | 培养皿               | 微孔板         | 受试物消耗少     |
| 突变鉴定方法 | 人工计数克隆            | pH 指示剂      | 能够实验高通量    |

## 1.5 问题和展望

目前 Ames II 试验中所用菌株只有 TA98 是 ICH 指导原则中的指定菌株, 而 TA7001~TA7006 菌株并不在 ICH 指导原则范围内。这使得 Ames II 试验在常规遗传毒性检测上受到了限制。不过最近已有人将 TA100、TA1535、TA1537 菌株和大肠杆菌的 2 个菌株 (wp2 uvrA 和 wp2 [pKM101]) 纳入了 Ames II 试验<sup>[4]</sup>, 这使得 Ames II 试验能够符合 ICH 指导原则, 有望应用于常规遗传毒性评价。

## 2 GreenScreen HC Gadd45a-GFP 遗传毒性检测试验

目前已建立的体外哺乳动物细胞试验, 如小鼠

淋巴瘤 *Tk* 基因突变试验、体外染色体畸变试验等, 在预测受试物的致癌性方面, 虽然具有很高的敏感性, 但特异性却很低<sup>[5-7]</sup>。这种高频率的假阳性事件一方面迫使人们花费大量的时间和精力对此结果做出合理的科学解释, 另一方面使得很多可能很有前景的候选新药无辜被否定。于是研究人员致力于开发特异性更高的体外哺乳动物遗传毒性试验, Hastwell 等<sup>[8]</sup>开发的 GreenScreen HC Gadd45a-GFP 试验正是此类方法的一种。

## 2.1 基本原理

Gadd45 基因 (Growth arrest and DNA damage inducible genes) 是生长抑制和 DNA 损伤诱导家族

的一员,是一种细胞增殖的负调控因子。它通过与增殖细胞核抗原(PCNA)、细胞周期蛋白抑制因子 p21<sup>WAF1/Cip1</sup>、细胞周期蛋白激酶 Cdc2 和组蛋白等结合而发挥 DNA 修复、细胞周期检查点调控和诱导细胞凋亡等功能<sup>[9]</sup>。许多研究表明,多种遗传毒性物质,包括苯并芘、依托泊苷、丝裂霉素 C、顺铂、紫杉醇和过氧化氢等,都可以诱导 Gadd45 基因的表达上调。Hastwell 等<sup>[8]</sup>利用这一特点,将 Gadd45 基因的启动子与绿色荧光蛋白(GFP)基因融合,构建了一个报告基因表达载体。将此载体转入人淋巴瘤 Tk6 细胞中,用受试物处理细胞,通过检测细胞中的绿色荧光强度,间接反映受试物的遗传毒性。

## 2.2 简要操作流程

将受试物与稳定转染报告基因载体的 Tk6 细胞在 96 孔板中孵育。孵育 24 和 48 h 后,利用酶标仪在激发波长 485 nm 处读取荧光值,620 nm 处读取吸光度值。吸光度值用来指示受试物处理后的细胞生长和存活状况,将荧光值除以吸光度值,即得到每个细胞的平均荧光值。若受试物在某个浓度范围内能够使细胞产生大于对照组 1.5 倍的平均荧光强度,且同时细胞毒性不超过 70%,则认为该受试物的遗传毒性结果为阳性。

## 2.3 方法确证

Hastwell 等<sup>[8]</sup>利用 Gadd45a-GFP 试验测试了 75 种已知的遗传毒性和非遗传毒性化合物,并将试验结果与这些化合物的其他遗传毒性试验结果相比较,包括 Ames 试验、小鼠淋巴瘤试验、染色体畸变试验、啮齿动物体内微核试验和致癌试验。结果表明,绝大部分遗传毒性化合物都可以诱导 GFP 荧光强度的增加,且具有良好的剂量反应关系。与标准遗传毒性组合试验结果相比,Gadd45a-GFP 试验有 100%的特异性和 63%的敏感性。由于体外哺乳动物试验具有较高的假阳性率,故 63%的敏感性并不能说明 Gadd45a-GFP 试验敏感性不高。在预测致癌性方面,Gadd45a-GFP 试验的特异性和敏感性分别高达 100%和 95%。此外,来自于 4 个实验室的研究人员对 Gadd45a-GFP 试验进行了不同实验室之间的可重复性验证<sup>[10]</sup>,可重复性高达 92%。

## 2.4 优点

与其他体外哺乳动物细胞遗传毒性试验相比,Gadd45a-GFP 试验具有更高的特异性,同时其敏感性与现有试验方法相当,弥补了 Ames 试验特异性高但敏感性低的弱点。同时,Gadd45a-GFP 试验

方法可以高通量化,更适合在药物研发的早期筛选中应用。

## 2.5 问题和展望

Gadd45a-GFP 试验方法测试的大多是不需要代谢活化的遗传毒性物质。由于 S9 成分本身具有荧光,这使得利用 Gadd45a-GFP 试验来评价需要代谢活化的受试物遗传毒性时受到一些限制。不过,最近 Jagger 等<sup>[11]</sup>开发出一种基于流式细胞技术的 Gadd45a-GFP 试验。该试验利用流式细胞技术独特的设门方法可将药物自发荧光或 S9 荧光与 GFP 荧光区分开来,同时在流式细胞仪上连接一个 96 孔板适配器,可以直接在 96 孔板中吸取样品进行检测,该方法使得利用 Gadd45a-GFP 试验在 S9 存在情况下快速评价受试物的遗传毒性成为可能。

## 3 高通量彗星试验

彗星试验(comet assay,即单细胞凝胶电泳试验,single cell gel electrophoresis assay)是近几年遗传毒性领域比较热门的方法,因其可以敏感地评价化合物致 DNA 损伤的作用而逐渐受到关注。同时体内彗星试验的开发还可以使研究者研究化合物在不同组织中的 DNA 损伤作用,使之在评价化合物作用的靶器官与非靶器官方面具有明显的优势。

虽然已有商业软件应用于彗星试验中,也有研究者开发出图像自动分析系统,可自动采集各种 DNA 损伤参数,但彗星试验前期的细胞处理、制胶、电泳等过程依然比较繁琐,无法满足高通量的需求。最近,Stang 等<sup>[12]</sup>利用一种特制的 96 孔板,改进了传统的彗星试验方法,使高通量检测成为可能。

### 3.1 基本原理

Stang 等<sup>[12]</sup>利用了一种特制的 96 孔板(multi chamber plate, MCP),该 96 孔板的底板可以和每个孔周围的分隔分离开,使得 96 个样本可以同时进行电泳、裂解、染色等步骤,不需要每个样本单独处理。同时利用人成纤维细胞 NHDF-p,通过摸索贴壁时间,找到一个最佳时间点,保证细胞在该时间范围内(种板后 2~4 h)既能够贴壁又可以保持基本的圆形细胞形态,这样贴壁细胞不再需要消化,可以直接在单层细胞表面制备凝胶。另外,采用荧光素二乙酸酯(fluorescein diacetate, FDA)试验方法,利用细胞内酯酶可以将 FDA 转化为荧光素的特点,通过检测荧光产物的强度来反映细胞存活情况,该试验可以整合到彗星试验之前进行,即保证了细胞存活率和彗星试验二者检测的是相同的细胞

样本。

### 3.2 简要操作流程

NHDF-p 细胞接种到 96 孔板中, 4 h 后加入受试物处理。处理完毕, 先进行细胞存活率的检测。每孔加入 FDA, 37 °C 孵育 10 min 后, 去掉 FDA, 酶标仪读取绿色荧光值。细胞存活率检测之后进行彗星试验。将 96 孔板的底板与每个孔周围的分隔分离开, 在贴有细胞的底板上铺一层 0.5% 低熔点琼脂糖凝胶, 置于 4 °C 冰箱使之凝固。之后的步骤与传统彗星试验相同, 每个样本重复 3~6 个复孔, 每孔选取 25 个细胞进行统计。

### 3.3 方法确证

Stang 等<sup>[12]</sup>首先对将细胞存活率试验整合到彗星试验中是否会影响后者的结果进行了分析。对比并没有发现有显著影响, 表明 FDA 试验可以整合到彗星试验中。然后研究者通过测试两种遗传毒性物质(甲基磺酸甲酯和过氧化氢), 将改进的高通量彗星试验与传统彗星试验的结果进行了比较后发现, 两种方法得到的结果基本一致, 没有统计学差异。此外高通量彗星试验中不同复孔间的差异很小, 说明该试验的可重复性较高。

### 3.4 优点

省时省力, 可高通量化。传统彗星试验涉及到消化细胞、铺胶等步骤, 需要逐个样本单独处理, 当样本较多时, 这些步骤比较繁琐, 且费时费力。改进的彗星试验免去了这些繁琐的步骤, 再结合专业分析软件, 一天最多可以分析多达 400 个样本。另外, 将细胞存活率检测与彗星试验整合, 可以节省试验材料、细胞、受试物等, 更重要的是在同一批细胞中获得的数据比较起来相关性更高。

### 3.5 问题和展望

由于不同细胞的贴壁时间不完全相同, 若采用其他细胞系进行高通量彗星试验, 需要再重新摸索种板和开始彗星试验之间的间隔时间, 以保证细胞既能够贴壁, 又可以维持圆形的细胞形态。

高通量彗星试验由于其简便、快速、易操作性有可能成为新药研发早期进行遗传毒性筛选的模型。但值得注意的是, 目前在这个模型上验证过的已知化合物的数目还比较少, 进行更多的不同作用机制的遗传毒性化合物的验证将使该试验结果的可靠性增强。

## 4 微核流式细胞术

哺乳动物体内微核试验能够检测染色体断裂剂

和非整倍体剂, 是一种广泛应用的遗传毒性检测方法。然而镜检费时费力, 且由于微核形成是一种频率较低的事件, 导致一些弱的染色体断裂剂和非整倍体剂被漏检。这些因素促使研究者开发可以更快、更敏感检测微核的方法, 其中就包括利用流式细胞仪进行微核检测的方法。

### 4.1 基本原理

利用流式细胞仪检测微核的方法最早于 1982 年就有报道<sup>[13]</sup>。该法由 Dertinger 等<sup>[14]</sup>于 1996 年开发, 在经历了研究者多年的开发和不断改进后, 是目前采用较多也进行过最多验证的方法。利用红细胞在成熟过程中主核被排出, 而微核仍滞留在胞内这一特点, 用碘化丙锭(PI)染色微核 DNA, 即可将含微核的红细胞和不含微核的红细胞分开。同时利用网织红细胞(reticulocyte, RET)细胞膜表面表达 CD71 分子(即 transferrin receptor, 转铁蛋白受体), 而成熟红细胞(normal chromatic erythrocyte, NCE)表面不表达 CD71 这一特点, 利用 FITC 标记的 CD71 抗体进行染色, 即可区分网织红细胞和成熟红细胞。使用单一激光器 488 nm 激发, FITC 发绿色荧光, 而 PI 发红色荧光, 通过双通道检测, 即可得到 4 种细胞群, 不含微核的成熟红细胞(NCE)、不含微核的网织红细胞(RET)、含微核的成熟红细胞(MN-NCE)和含微核的网织红细胞(MN-RET)。另外利用具有分选功能的流式细胞仪, 还可以将含微核的红细胞分选出来, 进一步在显微镜下镜检以确认。

由于微核生成频率比较低且组成不均一, 给流式细胞仪分析的仪器参数设置带来了困难, 同时也使不同实验室或同一样本不同时间的检测结果不具有可比性。为解决这一问题, Tometsko 等<sup>[15]</sup>于 1993 年开发了小鼠伯氏疟原虫(*Plasmodium berghei*)感染红细胞的生物模型作为流式细胞仪微核检测中的标准品。疟原虫寄生于红细胞中, 具有均一量的 DNA, 数目多, 感染率可高达 10%。利用这一模型, 可以有效地进行流式细胞仪的参数调整、荧光补偿以及分析窗口的选定等。一项在 14 个实验室开展的国际合作研究表明<sup>[16]</sup>, 以这一模型作为标准进行流式细胞仪的校正, 不同实验室和同一实验室不同时间检测的结果之间差异非常小。

### 4.2 简要操作流程

样本处理方法: 采外周血抗凝处理后, 加入-70 °C 甲醇固定细胞, 经 anti-CD71-FITC 染色, RNA

酶处理, PI 染色后, 上流式细胞仪分析。

疟原虫感染红细胞模型的建立: 小鼠经 ip 注射疟原虫病原体后, 每隔一段时间尾静脉采血, 涂在有吖啶橙的载玻片上, 镜下观察疟原虫的感染率。当感染率超过 10%, 且动物还没有出现贫血症时, 认为感染成功。此时, 处死小鼠, 采用心脏穿刺法采外周血, 抗凝处理, 甲醇固定。后面步骤同上。

#### 4.3 方法确证

流式细胞术微核检测方法建立以来, 已有多项研究将该方法与传统的显微镜检方法相比较<sup>[17-19]</sup>, 两种方法得到的结果具有高度一致性。最近 Witt 等<sup>[20]</sup>进行了一项更全面的比较研究, 在 B6C3F1 小鼠和 Fisher 344 大鼠中, 利用流式细胞术和显微镜检两种方法, 检测了 4 种遗传毒性化合物和 5 种非遗传毒性化合物诱发的骨髓和外周血的微核生成。比较发现, 在大鼠和小鼠中两种方法得到的结果之间都没有显著差异。

#### 4.4 优点

分析速度快。与传统显微镜检相比, 用流式细胞仪进行微核检测的速度可以快 40~100 倍。这大大节省了时间和人力。

敏感性高。传统镜检一般只计数 2 000 个细胞, 而由于流式细胞仪检测快速, 每个样本可以分析高达 20 000 个细胞, 这使得一些弱的染色体断裂剂或非整倍体剂可以被检测出来, 敏感性提高。

更加客观, 重现性好。流式细胞仪检测微核得到的结果更加客观, 减少了传统镜检的主观因素, 因此重现性更高。

#### 4.5 问题和展望

尽管 anti-CD71-FITC/PI 双染检测红细胞微核的方法已经被很多研究者进行过验证, 但仍存在一些问题, 比如含有微核的网织红细胞与血小板细胞群有重叠。Dertinger 等<sup>[21]</sup>发明了一种三色染色方法, 引入了一种新染料 anti-platelet-PE, 以区分血小板和含微核的网织红细胞。

Anti-CD71-FITC/PI 双染方法主要适用于骨髓或外周血中红细胞微核的检测, 因为红细胞本身没有主核。对于有核细胞微核的流式细胞术检测, 目前应用比较多的方法是裂解细胞, 制备主核和微核的混悬液, 经 EB 或 PI 等染色 DNA 后, 用流式细胞仪进行检测<sup>[22]</sup>。Avlasevich 等<sup>[23]</sup>利用一种可嵌入 DNA 且光照后与 DNA 发生共价结合的染料 EMA (ethidium monoazide), 可将凋亡小体和坏死染色体

断片与微核区分开来, 使得该方法具有更高的可信度。已有多项研究利用该方法在体外检测了多种遗传毒性化合物诱导的微核生成, 与镜检相比, 两种方法得到的结果具有高度一致性<sup>[23-26]</sup>。

尽管利用流式细胞仪检测微核速度有了很大提高, 但由于检测成本仍然较高 (如流式细胞仪的普及问题, anti-CD71-FITC 抗体价格较高等), 真正将该方法实现高通量化仍存在一定差距。若能通过改进方法等而降低检测成本, 该项技术将能得到更广泛的应用。

### 5 遗传毒性计算机预测模型

随着计算机技术以及组合化学的快速发展, 越来越多的基于定量构效关系 (quantitative structure-activity relationship, QSAR) 的计算机毒性预测模型被开发和建立。对于制药企业而言, 计算机毒性预测模型已成为一种非常重要的工具, 用于研发早期候选化合物的毒性快速评价。目前已经商业化的可用于遗传毒性预测的模型主要有 DEREK (deductive estimation of risk from existing knowledge)、MCASE (multiple computer automated structure evaluation)、TOPKAT (toxicity prediction by komputer assisted technology)、MDL-QSAR、COMPACT、CSGenotox 等<sup>[27-31]</sup>。

虽然计算机毒性预测模型在药物研发早期毒性筛选和评价中发挥了积极作用, 但仍存在很多问题。目前现有的预测模型敏感性和特异性都较低<sup>[29]</sup>, 尽管将几种模型联合起来应用可以提高预测的敏感性, 但由于每种模型的评判标准不完全相同, 导致可以被多种模型同时预测的化合物数量明显较少。上面提到的大部分预测模型都是依据 Ames 试验的结果建立的, 将哺乳动物遗传毒性试验的结果也纳入预测模型中, 可能会有助于提高预测的敏感性和特异性。

### 6 基因芯片技术在遗传毒性评价中的应用

近年来, 毒理基因组学 (toxicogenomics) 概念的提出为药物安全性评价带来了新的思路<sup>[32]</sup>。毒理基因组学主要是利用芯片技术检测动物或体外细胞在接受化合物刺激后基因表达谱的改变, 其理论基础是具有相似作用机制的化合物诱导相似的基因表达谱的改变。通过对已知作用机制的化合物的基因表达谱进行聚类分析, 或将待评价化合物的基因表达谱与已知作用机制的化合物进行比较, 毒理基因组学可用于寻找毒性相关的生物标志物、评价药物

安全性和了解药物的毒性作用机制。在遗传毒性方面,已有多个研究表明遗传毒性化合物和非遗传毒性化合物诱导细胞产生不同的基因表达谱,而利用这些差异表达的基因作为可能的遗传毒性生物标志物,可用于评价未知化合物的遗传毒性<sup>[33-37]</sup>。相比传统的遗传毒性试验,这种方法更为快速,且获得的信息量多,并且有助于对化合物的毒性作用机制进行深入分析。但全基因表达谱芯片成本较高,因此利用定制的低密度芯片(只选择感兴趣的基因,如差异表达的基因)进行基因表达分析在不影响结果的前提下,将大大降低芯片成本。另外,建立并完善含有多种作用机制不同的遗传毒性化合物与非遗传毒性化合物基因表达谱信息的数据库,也是毒理基因组学目前亟需解决的关键问题<sup>[38]</sup>。

## 7 结语

虽然上述方法还存在一定的不足,需要改进和完善。但随着科技的快速发展,尤其是分子生物学领域的突飞猛进,相信人们在不断改进现有方法的同时,还会建立更多的遗传毒性早期快速评价方法。利用这些方法在药物研发早期对候选药物进行遗传毒性筛选,对降低新药研发成本和缩短研发周期具有重要意义。

## 参考文献

- [1] Gee P, Maron D M, Ames B N. Detection and classification of mutagens: a set of base-specific *Salmonella* tester strains [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(24): 11606-11610.
- [2] Gee P, Sommers C H, Melick A S, *et al.* Comparison of responses of base-specific *Salmonella* tester strains with the traditional strains for identifying mutagens: the results of a validation study [J]. *Mutat Res*, 1998, 412(2): 115-130.
- [3] Fluckiger-Isler S, Baumeister M, Braun K, *et al.* Assessment of the performance of the Ames II assay: a collaborative study with 19 coded compounds [J]. *Mutat Res*, 2004, 558(1-2): 181-197.
- [4] Kamber M, Fluckiger-Isler S, Engelhardt G, *et al.* Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity [J]. *Mutagenesis*, 2009, 24(4): 359-366.
- [5] Kirkland D, Aardema M, Henderson L, *et al.* Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity [J]. *Mutat Res*, 2005, 584(1-2): 251-256.
- [6] Kirkland D, Aardema M, Muller L, *et al.* Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens II. Further analysis of mammalian cell results, relative predictivity and tumour profiles [J]. *Mutat Res*, 2006, 608(1): 29-42.
- [7] Kirkland D, Speit G. Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo* [J]. *Mutat Res*, 2008, 654(2): 114-132.
- [8] Hastwell P W, Chai L L, Roberts K J, *et al.* High-specificity and high-sensitivity genotoxicity assessment in a human cell line: validation of the GreenScreen HC GADD45a-GFP genotoxicity assay [J]. *Mutat Res*, 2006, 607(2): 160-175.
- [9] Zhan Q. Gadd45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage [J]. *Mutat Res*, 2005, 569(1-2): 133-143.
- [10] Billinton N, Hastwell P W, Beerens D, *et al.* Inter-laboratory assessment of the GreenScreen HC GADD45a-GFP genotoxicity screening assay: an enabling study for independent validation as an alternative method [J]. *Mutat Res*, 2008, 653(1-2): 23-33.
- [11] Jagger C, Tate M, Cahill P A, *et al.* Assessment of the genotoxicity of S9-generated metabolites using the GreenScreen HC GADD45a-GFP assay. [J]. *Mutagenesis*, 2009, 24(1): 35-50.
- [12] Stang A, Witte I. Performance of the comet assay in a high-throughput version [J]. *Mutat Res*, 2009, 675(1-2): 5-10.
- [13] Hutter K J, Stohr M. Rapid detection of mutagen induced micronucleated erythrocytes by flow cytometry [J]. *Histochemistry*, 1982, 75(3): 353-362.
- [14] Dertinger S D, Torous D K, Tometsko K R. Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer [J]. *Mutat Res*, 1996, 371(3-4): 283-292.
- [15] Tometsko A M, Torous D K, Dertinger S D. Analysis of micronucleated cells by flow cytometry. 1. Achieving high resolution with a malaria model [J]. *Mutat Res*, 1993, 292(2): 129-135.
- [16] Torous D K, Hall N E, Dertinger S D, *et al.* Flow cytometric enumeration of micronucleated reticulocytes: high transferability among 14 laboratories [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2001, 38(1): 59-68.
- [17] Torous D K, Hall N E, Murante F G, *et al.* Comparative scoring of micronucleated reticulocytes in rat peripheral blood by flow cytometry and microscopy [J]. *Toxicol Sci*,

- 2003, 74(2): 309-314.
- [18] Torous D K, Hall N E, Illi-Love A H, *et al.* Inter-laboratory validation of a CD71-based flow cytometric method (Microflow) for the scoring of micronucleated reticulocytes in mouse peripheral blood [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2005, 45(1): 44-55.
- [19] Dertinger S D, Bishop M E, McNamee J P, *et al.* Flow cytometric analysis of micronuclei in peripheral blood reticulocytes: I. Intra- and interlaboratory comparison with microscopic scoring [J]. *Toxicol Sci*, 2006, 94(1): 83-91.
- [20] Witt K L, Livanos E, Kissling G E, *et al.* Comparison of flow cytometry- and microscopy-based methods for measuring micronucleated reticulocyte frequencies in rodents treated with nongenotoxic and genotoxic chemicals [J]. *Mutat Res*, 2008, 649(1-2): 101-113.
- [21] Dertinger S D, Camphausen K, Macgregor J T, *et al.* Three-color labeling method for flow cytometric measurement of cytogenetic damage in rodent and human blood [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2004, 44(5): 427-435.
- [22] Nusse M, Marx K. Flow cytometric analysis of micronuclei in cell cultures and human lymphocytes: advantages and disadvantages [J]. *Mutat Res*, 1997, 392(1/2): 109-15.
- [23] Avlasevich S L, Bryce S M, Cairns S E, *et al.* *In vitro* micronucleus scoring by flow cytometry: differential staining of micronuclei versus apoptotic and necrotic chromatin enhances assay reliability [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2006, 47(1): 56-66.
- [24] Bryce S M, Bemis J C, Avlasevich S L, *et al.* *In vitro* micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity [J]. *Mutat Res*, 2007, 630(1-2): 78-91.
- [25] Bryce S M, Avlasevich S L, Bemis J C, *et al.* Inter-laboratory evaluation of a flow cytometric, high content *in vitro* micronucleus assay. [J]. *Mutat Res*, 2008, 650(2): 181-195.
- [26] Shi J, Bezabhe R, Szkudlinska A. Further evaluation of a flow cytometric *in vitro* micronucleus assay in CHO-K1 cells: a reliable platform that detects micronuclei and discriminates apoptotic bodies. [J]. *Mutagenesis*, 25(1): 33-40.
- [27] Cariello N F, Wilson J D, Britt B H, *et al.* Comparison of the computer programs DEREK and TOPKAT to predict bacterial mutagenicity. Deductive Estimate of Risk from Existing Knowledge. Toxicity Prediction by Komputer Assisted Technology [J]. *Mutagenesis*, 2002, 17(4): 321-329.
- [28] Greene N. Computer systems for the prediction of toxicity: an update [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(3): 417-431.
- [29] Snyder R D, Smith M D. Computational prediction of genotoxicity: room for improvement [J]. *Drug Discov Today*, 2005, 10(16): 1119-1124.
- [30] Contrera J F, Matthews E J, Kruhlak N L, *et al.* *In silico* screening of chemicals for bacterial mutagenicity using electrotopological E-state indices and MDL QSAR software [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2005, 43(3): 313-323.
- [31] Matthews E J, Kruhlak N L, Cimino M C, *et al.* An analysis of genetic toxicity, reproductive and developmental toxicity, and carcinogenicity data: II. Identification of genotoxicants, reprotoxicants, and carcinogens using *in silico* methods [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2006, 44(2): 97-110.
- [32] Castle A L, Carver M P, Mendrick D L. Toxicogenomics: a new revolution in drug safety. [J]. *Drug Discov Today*, 2002, 7(13): 728-736.
- [33] Afshari C A, Nuwaysir E F, Barrett J C. Application of complementary DNA microarray technology to carcinogen identification, toxicology, and drug safety evaluation. [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(19): 4759-4760.
- [34] Ellinger-Ziegelbauer H, Stuart B, Wahle B, *et al.* Comparison of the expression profiles induced by genotoxic and nongenotoxic carcinogens in rat liver. [J]. *Mutat Res*, 2005, 575(1-2): 61-84.
- [35] van Delft J H, van Aken E, van Breda S G, *et al.* Discrimination of genotoxic from non-genotoxic carcinogens by gene expression profiling [J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(7): 1265-1276.
- [36] Thomas R S, Rank D R, Penn S G, *et al.* Identification of toxicologically predictive gene sets using cDNA microarrays [J]. *Mol Pharmacol*, 2001, 60(6): 1189-1194.
- [37] Seidel S D, Sparrow B R, Kan H L, *et al.* Profiles of gene expression changes in L5178Y mouse lymphoma cells treated with methyl methanesulfonate and sodium chloride [J]. *Mutagenesis*, 2004, 19(3): 195-201.
- [38] Waters M D, Fostel J M. Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects [J]. *Nat Rev Genet*, 2004, 5(12): 936-948.