

【 评价方法学 】

啮齿类动物骨髓微核试验规范化方法介绍及背景数据采集

文海若¹, 宋捷¹, 毛志慧¹, 郭建², 王欣¹, 胡燕平¹

1. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

2. 首都医科大学附属北京同仁医院急诊科, 北京 100730

摘要: 啮齿类动物骨髓微核试验 (*in vivo* Mammalian Bone Marrow Micronucleus Test) 是临床前药物遗传毒性研究标准组合试验之一, 在医学、公共卫生、食品和药物安全性评价等领域有巨大应用前景。在 GLP 条件下确立标准化试验方法和条件, 积累一定的背景数据范围, 可有效确保试验系统的可靠性, 为数据分析提供有力依据。以国家药物安全评价监测中心 2007—2015 年开展的小鼠及大鼠骨髓微核试验背景数据采集为例, 介绍啮齿类动物骨髓微核试验规范化采集方法。

关键词: 骨髓微核试验; 背景数据; 遗传毒性; 染色体断裂; 环磷酰胺

中图分类号: R965.2

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376 (2017) 05-0638-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.05.010

Standardized methods for bone marrow micronucleus test in rodents and historical data collection

WEN Hai-ruo¹, SONG Jie¹, MAO Zhi-hui¹, GUO Jian², WANG Xin¹, HU Yan-ping¹

1. Beijing Key Laboratory, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

2. Emergency Department, Beijing Tongren Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100730, China

Abstract: *In vivo* Mammalian Bone Marrow Micronucleus Test is included in the standard battery genotoxicity testing, with great application prospects in medicine, public health, food and drug safety evaluation fields. Establishing standardized experimental methods and conditions in GLP condition and accumulating a certain range of background data could effectively ensure the reliability of the test system, and also provide strong basis to support the experimental data. We herein summarized the background data of mouse and rat bone marrow micronucleus tests performed from 2007 to 2015, to expound the standardized data collection method for rodent animal bone marrow micronucleus test.

Key words: bone marrow micronucleus test, background data, genetic toxicity, chromosome breakage, cyclophosphamide

DNA 和染色体断裂被认为是癌症发生的主要分子机制^[1], 微核 (micronucleus, MN) 作为重要的染色体断裂或有丝分裂异常的生物标志物, 可由染色体诱裂剂 (clastogen) 导致的染色体无着丝粒片段构成, 也可由非整倍体诱发剂 (aneugen) 所导致的细胞分裂后期纺锤体牵引分离时落后的染色体形成^[2]。国际癌症研究机构 (The International Agency for Research on Cancer, IARC) 将导致人类肿瘤的化合物分为 4 类^[3], 啮齿类动物骨髓微核试验 (*in*

vivo Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test) 对 1 类 (对人体致癌)、2A 类 (可能对人体致癌, 致癌可能性高) 和 2B 类 (可能对人体致癌, 致癌可能性低) 化合物的检出率分别为 68.6%、54.5% 和 45.6%。如果将微核实验结果与化合物结构—活性关系的信息整合, 对上述 3 类化合物的阳性检出率可达 90.5%、65.2% 和 60.0%, 且微核实验阳性率与致癌性强弱呈正相关趋势^[4]。目前微核试验广泛用于药物、食品添加剂、化妆品、放射线、环境诱变

收稿日期: 2016-05-05

基金项目: 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金课题 (2014C1), 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2015ZX09501004-002)

作者简介: 文海若, 副研究员, 研究方向为药物遗传毒理学。E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

剂等对人体细胞潜在遗传学损伤的评价,在医学、公共卫生、食品和药物安全性评价等领域有巨大应用前景。

啮齿类动物骨髓微核试验是公认的检测非整倍体染色体丢失或染色体断片形成的较为简便的遗传毒性检测方法,也是临床前药物遗传毒性研究标准组合实验之一^[5]。在 GLP 条件下确立标准化实验方法和实验条件,积累一定的背景数据范围,可有效确保试验系统和数据的可靠性,为实验数据分析提供有力依据。根据我国及经济合作与发展组织 (Organization for Economic Co-operation and Development, OECD),人用药品注册技术要求国际协调会议 (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH) 等国际组织推荐的啮齿动物骨髓微核试验方法^[6-7],本研究对 2007—2015 年国家药物安全评价监测中心开展的小鼠及大鼠骨髓微核试验背景数据进行采集。

1 实验动物

骨髓微核试验通常采用健康成年大鼠和小鼠。SD 大鼠是一般毒性试验常用实验动物,可与骨髓微核试验结合开展;常用的小鼠品系包括 NIH、ICR 等,据文献报道^[8-10],NIH、ICR 品系小鼠较 C57 和昆明种更为敏感。通常化合物作用于雄性和雌性动物产生的体内微核率接近,大多数研究可只选用其中一种性别^[6]。根据实际经验,雄性动物对化合物遗传毒性较雌性动物敏感。国家药物安全评价监测中心在大多数研究中采用雄性动物,约 5~9 周龄,每组至少 6 只。如有药物体内代谢动力学数据提示,某种化合物在动物体内代谢存在明显性别差异,并因此考虑在药物的生物利用度、一般毒性结果、骨髓毒性结果上可能存在明显的性别差异,则采用两种性别动物,每组雌雄各 5 只^[6]。动物体质量差异范围应在各性别平均值 20%以内,饲养过程中应保证一定的环境(温度 20~26 °C,湿度 40%~70%,12 h 昼夜更换),在环境温度过高或过低条件下^[11],可因应激反应出现骨髓微核率升高的现象,对实验结果产生影响。研究发现微核率的升高与刺激红细胞增生有关^[12]。

2 剂量与组别设置

平行设立阴性(空白或溶媒对照)及阳性对照组。溶媒对照通常为灭菌注射用水、0.9%氯化钠注射液、羧甲基纤维素(CMC)或 CMC-Na。如供试

品溶媒为特殊溶媒,需另设阴性对照组。阳性对照物应为已知阳性致突变剂(如环磷酰胺)。此外至少设置 3 个给药剂量组,给药剂量往往需要通过预试验结果确定,预实验需设置 3~5 个剂量组,根据文献报道药物毒性确定。高剂量应产生一定骨髓毒性[嗜多染红细胞(polychromatic erythrocyte, PCE)占红细胞总数比例降低]。低毒性化合物在给药时间不超过 14 d 时推荐最高剂量为 2 000 mg/(kg·d),超过 14 d 时推荐最高剂量为 1 000 mg/(kg·d)^[5-6, 13]。

3 给药方案

不同化合物诱导体内 MN 形成的时间不同,在合适的时间窗有效捕捉微核形成的峰值,对化合物 MN 形成率的分析非常重要,MN 峰值出现时间由 MN 形成机理及化合物作用机理决定。骨髓细胞 MN 形成原理基于骨髓红系祖细胞经过数次分裂后,逐渐脱核成为成熟红细胞。红细胞脱核后早期,胞质中存在大量 RNA,从而形成 PCE。当球蛋白合成完毕后, RNA 完全分解,红细胞逐渐成熟形成正染红细胞(normochromatic erythrocyte, NCE)。致突变物作用于红系祖细胞分裂晚期最终阶段可造成染色体异常。细胞分裂终期,向两极移动的染色体由核膜包绕形成新的细胞核,残留于细胞质的染色体断片在胞浆中形成细小的微核。此后细胞质分裂形成两个子细胞,完成细胞分裂的过程。一段时间后幼稚红细胞经过脱核形成无核的红细胞,然而胞浆中的 MN 无法通过脱核排出,该细胞即携带微核的嗜多染红细胞(MNPCE)。

大多数化合物给药后 24~30 h 内即可观察到 MN 形成,而需经肝脏代谢活化的遗传毒性化合物(如二甲苯基苯蒽)诱发微核形成的时间较晚,干扰细胞有丝分裂的化合物(如秋水仙素)则较早诱发 MN 形成^[14]。通常单纯型断裂剂,如阿糖胞苷诱导的 MN 出现时间更接近于出现染色体异常的时间(约单次给药后 24 h 左右)。而非单纯型断裂剂,如 MMC,在诱导染色体断裂之外还可导致染色体交换率增加,这类断裂剂诱导的微核出现的峰值则有所延迟(单次给药后 48 h 左右)^[15]。从 MN 形成机理推断,诱导染色体异常需要 2 d 以上,也就是在首次给药 72 h 后出现 MN 的化合物非常少见,国家药物安全评价监测中心当前采取连续 2 d 给药,单次取材的方法可检出绝大多数微核试验阳性的化合物^[16-17]。

根据指导原则可采用单次给药(含 24 h 内多次

给药)或重复给药方式^[5-6]。受试物给药途径应尽可能与临床拟用途径相同,阴性对照物必须与受试物给药途径一致,阳性对照物的给药途径可不同于受试物。以环磷酰胺为阳性对照品时,通常采用ip给药,给药剂量为40 mg/kg^[16-17,18]。ip给药是环磷酰胺较为敏感的给药方式,且操作便捷。

4 采样时间

如单次给药,需设至少2个采样点,骨髓采样时间应在给药后24~48 h。第一个采样点至少包括3个剂量组,第二个采样点可仅包括高剂量组。如重复给药,可只采样1次,骨髓采样时间在末次给药后18~24 h。国家药物安全评价监测中心结合文献报道及实际经验^[16-17],采用间隔24 h重复给药2

次,末次给药后18~24 h取样的方法,阳性对照品环磷酰胺仅单次给药。前期研究发现1次性ip环磷酰胺后微核率峰值在24 h左右出现,之后有所下降^[19]。

5 镜检

每只动物需要①至少计数200个骨髓红细胞确定PCE与NCE占红细胞总数的比例;②至少计数2000个PCE以判断MNPCE。非整倍体毒剂诱导的环形微核率显著高于染色体断裂剂,肾形微核率有增高趋势但不显著,而圆形微核率则显著低于后者^[20]。

6 溶媒(阴性)对照值及阳性对照值的背景值制作

根据指导原则,溶媒(阴性)对照值及阳性对照值的微核数在文献报道或实验室背景数据范围内是试验成立的条件之一^[5-6]。如表1、2所示,收集

表1 国家药物安全评价监测中心啮齿类动物骨髓微核试验阴性对照背景值($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 12$)

Table 1 Background value of negative control of bone marrow micronucleus test in rodents in National Center for Safety Evaluation of Drugs ($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 12$)

动物品系	阴性对照	浓度/%	给药方式	给药时间	雌性		雄性	
					PCE/200N	MN	PCE/200N	MN
ICR 小鼠	ddH ₂ O	/	ig	间隔 24 h 连续 2 次	106.6±10.1	1.40±1.55	89.40±4.2	1.30±2.45
	NaCl 注射液	0.90			110.4±12.7	4.12±2.15	121.3±21.9	4.20±2.13
	0.5% CMC	0.50			/	/	97.9±9.5	2.08±1.51
	1% CMC-Na	1.00			/	/	98.0±4.1	1.42±1.66
SD 大鼠	ddH ₂ O	/	ig	间隔 24 h 连续 2 次	/	/	101.9±13.3	1.95±1.04
	NaCl 注射液	0.90			/	/	106.0±2.6	0.90±2.55

给药体积均为10 mL/kg;因通常仅使用单性别(雄性)动物,“/”表示未积累足够的雌性动物数据用于统计

Dosing volume was 10 mL/kg; as a result of use of only single sex (male) animals, “/” indicates that no sufficient female data was collected for statistical purposes

表2 国家药物安全评价监测中心啮齿类动物骨髓微核试验阳性对照背景值($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 12$)

Table 2 Background value of positive control of bone marrow micronucleus test in rodents in National Center for Safety Evaluation of Drugs ($\bar{x} \pm s, n = 5 \sim 12$)

动物品系	阳性对照	给药剂量/(mg·kg ⁻¹)	给药方式	给药时间	雌性		雄性	
					PCE/200N	MN	PCE/200N	MN
ICR 小鼠	环磷酰胺	50	ip	单次	86.7±7.3	49.50±15.67	95.4±6.8	67.62±11.81
		40		单次	87.3±16.1	21.03±12.71	81.3±12.5	30.20±15.58
		10	ig	间隔 24 h, 连续 3 次	/	/	104.0±5.0	31.40±6.17
		20	ig	间隔 24 h, 连续 3 次	/	/	102.8±8.3	63.89±6.76
SD 大鼠	环磷酰胺	40	ig	间隔 24 h, 连续 3 次	/	/	99.2±7.0	76.82±16.23
		40	ip	单次	96.3±5.8	21.13±5.54	/	/
		40	ig	间隔 24 h, 连续 3 次	/	/	101.5±8.6	9.92±3.88
		200	ig	间隔 24 h, 连续 3 次	/	/	105.6±3.2	16.00±3.52

给药体积均为10 mL/kg;因通常仅使用单性别(雄性)动物,“/”表示未积累足够的雌性动物数据用于统计

Dosing volume was 10 mL/kg; as a result of use of only single sex (male) animals, “/” indicates that no sufficient female data was collected for statistical purposes

2007—2015 年在国家药物安全评价监测中心开展 0.5%CMC、1% CMC-Na) 和阳性对照品 (如环磷酸胺、*N*-乙基-*N*-亚硝基脲、甲基磺酸乙酯) 数据, 的 ICR 小鼠及 SD 大鼠骨髓微核试验中常用溶媒(阴性) 对照品 (灭菌注射用水、0.9%氯化钠注射液、分别汇总为啮齿类动物骨髓微核背景值。根据不同动物品系、给予物质和浓度、给药方式及使用动物性别不同进行分别汇总和统计, 所有数值均来自 5~12 次独立研究。其中阴性对照品背景值均在文献报道自发突变率范围之内^[8-10]。如检测供试品时获得的阴性或阳性对照值偏离背景数据管理值, 则此次试验数据不可靠, 不予以采用。需查找原因后重复开展试验。

7 小结

为了系统的建立一套骨髓微核试验背景数据, 首先需根据相关指导原则^[5-6]和国家药物安全评价监测中心的具体情况制定相应的标准操作规程。在设计实验方案时, 除考虑化合物的特殊性外, 尽量在每次实验中使用相同的已知的阴 (阳) 性对照, 阳性对照的给药方式、给药剂量也应尽量保持一致。给药/取材时间点的设计尽量保持统一, 并应可以捕获大多数化合物诱发微核出现的峰值。选择动物时, 应尽量使用相同品系和周龄的小鼠或大鼠开展实验。此外需对相关实验人员进行系统的培训, 保证每次制片、染色和镜检计数标准的一致性。研究负责人需对每次的研究数据进行认真复核。每次获得的阴性对照和阳性对照的结果均应在文献报道的范围之内^[6]。

体内实验设计因具体情况而异, 而实验条件对数据产生不同影响。骨髓微核试验背景数据采集时需定期针对不同实验条件进行分类汇总, 如动物品系、阴性/阳性对照、给药方式、动物性别等。OECD 指导原则^[6]建议最好可以积累多于 10 次研究的阴性背景值作为历史对照数据, 以便对化合物的是否具有遗传毒性进行判断。否则也需要根据现有数据建立背景值范围。

综上所述, 保证适宜的试验条件和动物品系, 选择合理的采样时间点及微核镜检计数标准, 对所有采集数据进行适当的分类汇总, 是进行准确的实验室背景数据采集的关键。只有不断积累并建立准确的实验背景数据, 才能保障实验结果的可靠性。这对于开展临床前新药遗传毒性研究, 评价药物是否存在潜在遗传毒性是极为重要的。

参考文献

- [1] 曹 佳, 林 真, 余争平. 微核试验: 原理、方法及其在人群监测和毒性评价中的应用 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2000, 1-2.
- [2] Kang S H, Kwon J Y, Lee J K, et al. Recent advances in *in vivo* genotoxicity testing: prediction of carcinogenic potential using comet and micronucleus assay in animal models [J]. J Cancer Prev, 2013, 18(4): 277-288.
- [3] Pearce N, Blair A, Vineis P, et al. IARC monographs: 40 years of evaluating carcinogenic hazards to humans [J]. Environ Health Perspect, 2015, 123(6): 507-514.
- [4] Morita T, Asano N, Awogi T, et al. Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (groups 1, 2A and 2B) the summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS MMS. Collaborative Study of the Micronucleus Group Test. Mammalian Mutagenicity Study Group [J]. Mutat Res, 1997, 389(1): 3-122.
- [5] 药物遗传毒性研究技术指导原则课题研究组. 药物遗传毒性研究技术指导原则 [S]. 2007.
- [6] OECD Guideline for the Testing of Chemicals TG474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test [S]. 2014.
- [7] ICH Steering Committee. Harmonized tripartite guideline, S2B: A standard battery for genotoxicity testing of pharmaceuticals [S]. 1997.
- [8] 尚兰琴, 徐厚恩, 李正云, 等. 不同品系小鼠骨髓多染红细胞微核率比较 [J]. 北京医科大学学报, 1994(3): 180.
- [9] 刘爱华, 林世英. 不同品系小鼠微核诱导率的比较 [J]. 毒理学杂志, 1990(1): 30-31.
- [10] Abrevaya X C, Carballo M A, Mudry M D. The bone marrow micronucleus test and metronidazole genotoxicity in different strains of mice (*Mus musculus*) [J]. Genet mol biol, 2007, 30(4): 1139-1143.
- [11] Tweats D J, Blakey D, Heflich R H, et al. Report of the IWGT working group on strategies and interpretation of regulatory *in vivo* tests I. Increases in micronucleated bone marrow cells in rodents that do not indicate genotoxic hazards [J]. Mutat Res, 2007, 627(1): 78-91.
- [12] Hirai O, Miyamae Y, Fujino Y, et al. Prior bleeding enhances the sensitivity of the *in vivo* micronucleus test [J]. Mutat Res, 1991, 264(3): 109-14.
- [13] Soeteman-Hernández L G, Johnson G E, Slob W. Estimating the carcinogenic potency of chemicals from the *in vivo* micronucleus test [J]. Mutagenesis, 2016, 31(3): 347-358.
- [14] Doherty A T, Wilson A, Chocian K, et al. Genotoxins

(下转第 647 页)

这不利于确定阈值。借鉴于 ICH Q1E 方法和同系数模型的对比,当真实模型是同系数模型时,假设阈值的设定应使有 60% 的几率取平均值。因此,阈值可以设定在模拟经验分布的 60% 分位数。当 $s=1$ 时,阈值应为 ≤ 1.30 ; 当 $s=0.5$ 时,阈值应为 ≤ 1.17 。真实随机干扰的强度越大,应设定的阈值越高。然而,真实的随机干扰强度是不可知的。即便运用本文中的模拟方法,通过设置不同的真实随机干扰强度,并找到对应的阈值,制成表格。在真实随机干扰强度不可知的情况下,只能用样本估计的干扰强度寻找对应阈值,这显然将引入不可预测的误差,阈值控制的通过几率可能高于或低于预期。因而,这样的操作不严谨。如果不用比率,而选用最大最小估计值间的绝对差异来描述 3 批次统计分析结果的差异,这个难题仍然存在。

4 结语

ICH Q1E 给出了具体的有效期估计的方法,它满足国内药典的要求。其建议的估计方法是基于固定影响模型,存在一定的局限性。但通过模拟,该估计方法确实很可能低估真实有效期,因此有效的保护病人利益。制造方可以通过优化关键质量指标的测量方法,减小数据中的随机误差干扰来得到更靠近真实有效期的估计值。虽然国内药典的规定比起 ICH Q1E 更有弹性,允许当 3 批次统计结果分析差异较小时采用均值为最终估计值。但采取最小值是减小固定影响模型局限性的关键。再者,通过模拟,本文发现这种方法可能比国际法规更保守(更倾向于低估真实有效期),从而置制造方于不必要的劣势。另外,如何量化“统计结果分析差异”和确

定阈值也存在实际中难以操作的难题。因此,本文建议采用 ICH Q1E 方法,避免使用均值。

参考文献

- [1] Ch. P (2015) Vol IV (中国药典 2015 年版. 四部) [S]. 2015.
- [2] ICH. Quality guidelines. Stability Q1A (R2), Stability testing of new drug substances and products [EB/OL]. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1A_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf. 06 /02 /2003.
- [3] ICH. Quality guidelines. Stability Q1E, Evaluation of stability data [EB/OL]. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q1E/Step4/Q1E_Guideline.pdf. 06 /02 /2003.
- [4] Capen R, Christopher D, Forenzo P, et al. On the shelf life of pharmaceutical products [J]. AAPS PharmSciTech, 2012, 13 (3): 911-918.
- [5] Demidenko E. Mixed models: Theory and applications with R [M]. Wiley-Blackwell, 2013.
- [6] Fitzmaurice G M, Laird N M, Ware J H. Applied longitudinal anlysis [M]. Wiley-Blackwell, 2011.
- [7] Chow S C, Shao J. Estimating drug shelf-life with random batches [J]. Biometrics, 1991, 47 (3): 1071-1079.
- [8] Quinlan M, Stroup W, Schwenke J, Christopher D. Evaluating the performance of the ICH guidelines for shelf life estimation [J]. J Biopharmaceut Stat, 2014, 23 (4): 881-896.
- [9] Robert C, Casella G. Monte carlo statistical methods [M]. Springer-Verlag New York, 2004.
- [10] Liu J S. Monte carlo strategies in scientific computing [M]. Springer-Verlag New York, 2001.
- [11] (上接第 641 页)
induce binucleation in L5178Y and TK6 cells [J]. Mutat Res, 2014, 770(8):29-34.
- [15] Vlastos D, Drosopoulou E, Efthimiou I, et al. Genotoxic and antigenotoxic assessment of chios mastic oil by the *in vitro* micronucleus test on human lymphocytes and the *in vivo* wing somatic test on drosophila [J]. Plos One, 2015, 10(6): e0130498. doi: 10.1371/journal.pone.0130498. eCollection 2015.
- [16] 胡燕平, 宋 捷, 王 欣, 等. 麦冬水煎剂的遗传毒性研究 [J]. 中国中医药信息杂志, 2009, 16(7): 38-40.
- [17] 胡燕平, 王 欣, 宋 捷, 等. 五味子水煎剂的遗传毒性研究 [J]. 癌变. 畸变. 突变, 2009, 21(4): 309-312.
- [18] Nai G A, de Oliveira M C, de Oliveira Tavares G, et al. Evaluation of genotoxicity induced by repetitive administration of local anaesthetics: an experimental study in rats [J]. Rev Bras Anesthesiol, 2015, 65(1): 21-26.
- [19] 肖 凯, 李宏霞. 环磷酸胺剂量, 取样时间对小鼠骨髓微核率的影响 [J]. 癌变. 畸变. 突变, 2005, 17(6): 367-369.
- [20] 欧红梅, 周长慧, 涂宏刚, 等. 流式细胞术检测体外微核方法的验证 [J]. 中国新药杂志, 2015, 24(14): 1590-1598.