

大鼠和小鼠 *Pig-a* 基因突变试验历史背景数据采集

韩素芹^{1,2}, 姜 华¹, 叶 倩¹, 黄芝瑛², 耿兴超¹, 汪 祺^{1*}, 文海若^{1*}

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

2. 中山大学药学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 介绍大鼠及小鼠 *Pig-a* 基因突变试验方法, 并汇总国家药物安全评价监测中心2015—2022年开展的基于免疫磁珠检测法的大鼠及小鼠 *Pig-a* 基因突变试验背景数据。方法 阴性物质包括超纯水和0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na), 雄性C57BL/6J小鼠间隔24 h ig 0.5% CMC-Na, 连续7 d; 雄性SD大鼠间隔24 h ig 0.5% CMC-Na, 连续14 d; 大鼠间隔24 h ig 超纯水, 连续3 d。阳性对照为已知致细菌突变化合物, 包括 *N*-乙基-*N*-亚硝基脲(ENU, 10、40 mg·kg⁻¹)、盐酸丙卡巴肼(PCZ, 60、150 mg·kg⁻¹)、乌拉坦(EC, 300、800 mg·kg⁻¹)、*N*-亚硝基二甲胺(NDMA, 1.5 mg·kg⁻¹)、*N*-亚硝基二乙胺(NDEA, 15 mg·kg⁻¹)。小鼠间隔24 h ig ENU 40 mg·kg⁻¹, 连续3 d; 间隔24 h ig NDMA 1.5 mg·kg⁻¹、NDEA 15 mg·kg⁻¹, 连续7 d。大鼠间隔24 h ig PCZ 150 mg·kg⁻¹、EC 800 mg·kg⁻¹、ENU 40 mg·kg⁻¹, 连续3 d; 间隔24 h ig PCZ 60 mg·kg⁻¹、EC 300 mg·kg⁻¹、ENU 10 mg·kg⁻¹, 连续28 d。分别于给予受试物前, 首次给予后14、28 d采集外周血, 用流式细胞术检测大鼠红细胞表面CD59蛋白的结合情况, 结合免疫磁性计数微球技术计算网织红细胞(RETs)占总红细胞的百分率(%RET)(作为外周血毒性考察指标)、总红细胞中CD59表达为阴性细胞(RBC^{CD59-}, 即突变的总红细胞)发生率和RETs中CD59表达为阴性细胞(RET^{CD59-}, 即突变的RETs)发生率。结果 各试验%RET数值均无大幅增加。SD大鼠和C57BL/6J小鼠的阴性对照组RBC^{CD59-}和RET^{CD59-}突变率均低于5×10⁻⁶, 小鼠的背景值相对不稳定。连续3 d ig给予小鼠40 mg·kg⁻¹的ENU, RBC^{CD59-}和RET^{CD59-}发生率自给药后2周开始均大幅增加($P<0.05$), 给药后4周进一步增加($P<0.01, 0.001$); 给予小鼠NDMA后2、4周, RBC^{CD59-}发生率略有增加, 但仍在阴性背景范围内, 但RET^{CD59-}发生率在给药后第2周大幅增加($P<0.001$), 给药后第4周则大幅回落; 给予小鼠NDEA后2周, RBC^{CD59-}和RET^{CD59-}发生率均有所增加($P<0.05, 0.001$), 给药后第4周则有所降低。连续3 d ig给予大鼠40 mg·kg⁻¹ ENU, 或连续28 d ig给予大鼠10 mg·kg⁻¹ ENU, RBC^{CD59-}、RET^{CD59-}发生率自给药后第2周开始均大幅增加($P<0.001$), 给药后第4周进一步增加($P<0.001$); 连续3、28 d ig给予大鼠不同剂量的PCZ或EC后, RBC^{CD59-}和RET^{CD59-}发生率的变化趋势与ENU类似, 但EC诱发的突变细胞率低于ENU和PCZ。结论 体内 *Pig-a* 基因突变试验可在首次给药后4周内有效检出致细菌突变化合物ENU、PCZ、EC、NDMA、NDEA的致突变性。提供了大鼠和小鼠 *Pig-a* 基因突变试验的背景值范围, 为标准化试验方法的建立和研究结果的判定提供借鉴。

关键词: 大鼠; 小鼠; *Pig-a* 基因突变试验; 致突变性; 历史背景值

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 05-0944-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.05.003

Historical background data of *Pig-a* gene mutation assay in rat and mouse

HAN Suqin^{1,2}, JIANG Hua¹, YE Qian¹, HUANG Zhiying², GENG Xingchao¹, WANG Qi¹, WEN Hairuo¹

1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

2. School of Pharmaceutical Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: **Objective** The method of *Pig-a* gene mutation assay in rats and mice was introduced, and the background data based on immunomagnetic beads carried out by the National Center for Safety Evaluation of Drugs from 2015 to 2022 were summarized. **Methods** The negative substances included ultrapure water and 0.5% carboxymethyl cellulose sodium (CMC-Na). Male C57BL/6J mice received 0.5% CMC-Na at an interval of 24 h for seven consecutive days. Male SD rats were given 0.5% CMC-Na at an interval of 24 h for 14 consecutive days. Rats were given ultrapure water at an interval of 24 hours for three consecutive days.

收稿日期: 2022-12-22

基金项目: 国家十三五“重大新药创制”专项课题(2018ZX09201017); 国家自然科学基金资助项目(81503347)

第一作者: 韩素芹, 硕士研究生, 研究方向为遗传毒理。E-mail: hansq5@mail2.sysu.edu.cn

*共同通信作者: 文海若, 研究员, 研究方向为遗传毒理。E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

汪 祺, 研究员, 研究方向为药理毒理。E-mail: sansan8251@sohu.com

Positive controls were known bacterial mutagenic compounds, including *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU, 10 and 40 mg·kg⁻¹), procabazide hydrochloride (PCZ, 60 and 150 mg·kg⁻¹), uratan (EC, 300 and 800 mg·kg⁻¹), *N*-nitrosodimethylamine (NDMA, 1.5 mg·kg⁻¹), and *N*-nitrosodiethylamine (NDEA, 15 mg·kg⁻¹). Mice were given ENU 40 mg·kg⁻¹ at an interval of 24 h for three consecutive days, and given NDMA 1.5 mg·kg⁻¹ and NDEA 15 mg·kg⁻¹ at an interval of 24 h for seven consecutive days. Rats were given PCZ 150 mg·kg⁻¹, EC 800 mg·kg⁻¹, and ENU 40 mg·kg⁻¹ at 24 hour intervals for three consecutive days, and given PCZ 60 mg·kg⁻¹, EC 300 mg·kg⁻¹, and ENU 10 mg·kg⁻¹ at 24 hour intervals for 28 consecutive days. Peripheral blood was collected before the administration of the test substance, 14 and 28 days after the first administration, and the binding of CD59 protein on the surface of rat red blood cells was detected by flow cytometry. The percentage of reticulocyte (RETs) in total red blood cells (%RET, as an indicator for peripheral blood toxicity), the incidence of CD59 expression in total red blood cells (RBC^{CD59+}, i.e. mutated total red blood cells) and the incidence of CD59 expression in RETs (RET^{CD59+}, i.e. mutated RETs) were calculated by using immunomagnetic counting microsphere technology. **Results** There was no significant increase in the %RET values for each experiment. The spontaneous RBC^{CD59+} and RET^{CD59+} mutation rates were lower than 5×10⁻⁶ in SD rats and C57BL/6J mice. The background values of mice are relatively unstable. After three consecutive days of ig administration of 40 mg·kg⁻¹ of ENU to mice, the incidence of RBC^{CD59+} and RET^{CD59+} increased significantly from two weeks after administration ($P < 0.05$), and further increased at four weeks after administration ($P < 0.01$ and 0.001). After two and four weeks of administration of NDMA to mice, the incidence of RBC^{CD59+} slightly increased, but remained within the negative background range. However, the incidence of RET^{CD59+} increased significantly ($P < 0.001$) in the second week after administration and decreased significantly in the fourth week after administration. The incidence of RBC^{CD59+} and RET^{CD59+} increased two weeks after administration of NDEA to mice ($P < 0.05$ and 0.001), but decreased four weeks after administration. The incidence of RBC^{CD59+} and RET^{CD59+} increased significantly ($P < 0.001$) after three consecutive days of ig administration of 40 mg·kg⁻¹ ENU to rats, or 28 consecutive days of ig administration of 10 mg·kg⁻¹ ENU to rats, starting from the 2nd week after administration and further increasing at the 4th week after administration. After continuous administration of different doses of PCZ or EC to rats for 3 and 28 days, the trend of changes in the incidence of RBC^{CD59+} and RET^{CD59+} was similar to that of ENU, but the mutation cell rate induced by EC was lower than that of ENU and PCZ. **Conclusion** *In vivo* *Pig-a* gene mutation assay can effectively detect the mutagenicity of bacterial mutant compounds ENU, PCZ, EC, NDMA, NDEA within four weeks after the first administration. This study provides the background value range of *Pig-a* gene mutation assay in rats and mice, which provides reference for the establishment of standardized test methods and the determination of research results.

Key words: rat; mouse; *Pig-a* gene mutation assay; mutagenicity; historical background data

磷脂酰肌醇聚糖A类(*Pig-a*)基因突变试验是1种基于流式细胞术或有限稀释克隆法的检测方法^[1]。它通过检测细胞表面糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定蛋白(如CD59和CD55等)的表达水平来考察*Pig-a*基因突变频率,从而评价受试物对生物体的致突变性。*Pig-a*基因位于X染色体上,其结构、功能和位置在不同物种之间具有高度的保守性^[2]。*Pig-a*基因编码*N*-乙酰氨基葡萄糖转移酶复合物,参与GPI的早期生物合成。该基因的单一突变即可破坏GPI的合成,导致细胞表面GPI锚定蛋白缺失^[3],因此,可以以细胞膜表面GPI锚定蛋白的表达水平作为考察致突变性的生物标志物。Bryce等^[5]和Miura等^[4]于2008年首次报道了大鼠外周血*Pig-a*基因突变试验,作为1种使用普通动物评估化合物体内致突变性的方法。除大鼠外,该方法目前已应用于小鼠^[6]、猕猴^[7]和人类^[6]外周血样本中突变率的检测。

流式细胞术是最常用的*Pig-a*基因突变检测手段。该方法利用荧光标记的单克隆抗体(如大鼠

CD59抗体、小鼠CD24抗体等)标记目标细胞表面GPI锚定蛋白的原理,对野生型细胞和突变型细胞进行区分,并使用核酸染料区分正染红细胞和网织红细胞(RETs)^[8]。通过检测外周血中红细胞、RETs的突变频率以及RETs占总红细胞的百分率(%RET),定量分析*Pig-a*基因突变频率。因体内红细胞自发*Pig-a*基因突变频率极低,为避免因大量突变频率为0的样本而降低阳性样本检测能力,每个动物和每个时间点应至少评估1×10⁶个红细胞和RETs^[8]。Dertinger等^[9]为提高检测灵敏度,在原有试验方法的基础上改进后开发了高通量免疫磁珠方法。免疫磁珠法引入了Anti-PE微珠和LS柱以滤过去除野生型细胞,引入抗血小板抗体(Anti-CD61-PE)以区分红细胞与血小板,并加入计数珠估算总细胞的数量。免疫磁珠法增加了分析样本中突变细胞的数量,缩短了样本分析时间,提高了*Pig-a*基因突变试验方法的特异性、灵敏性和检测效率。

随着近年来药物新靶点的开发和基于新型药

效结构的药物设计的涌现,细菌回复突变试验结果为阳性的化合物陆续出现。*Pig-a*基因突变试验作为1项不依赖特殊模型的体内致突变性评价试验,可作为细菌回复突变试验为阳性的化合物的后续评价方法。该方法可与重复给药毒性试验和其他体内遗传毒性试验整合,并实现基因突变的动态监测,符合人用药品技术要求国际协调理事会(ICH)S2(R1)指导原则^[10]的要求。ICH M7(R1)^[11]中也指出,当细菌回复突变试验结果为阳性时,*Pig-a*基因突变试验可作为后续的方法选择。该方法已在2020年完成国际实验室间联合验证工作,且经济合作与发展组织(OECD)于2022年6月正式发布了*Pig-a*基因突变试验指导原则^[12],极大地推进了该方法的规范化。尽管目前大鼠*Pig-a*基因突变率相关的背景数据积累较多,但小鼠及其他物种的*Pig-a*基因突变检测数据还有待丰富。

药品的临床前安全性评价强调试验系统的稳定性和数据的可靠性,因此遗传毒性试验需积累背景数据,作为试验结果判断的重要依据。国内目前开展*Pig-a*基因突变试验的实验室较少,因此有必要对试验方法进行标准化并建立相关背景数据。本研究介绍大鼠及小鼠的*Pig-a*基因突变试验方法,并汇总国家药物安全评价监测中心2015—2022年开展的基于免疫磁珠检测法的大鼠及小鼠*Pig-a*基因突变试验数据,提供相关背景数据供相关研究人员参考。

1 材料

1.1 实验动物

*Pig-a*基因突变试验通常用几种常用的实验室大鼠品系进行,包括SD、Wistar和Fischer 344,对于小鼠的研究相对较少。当前国内外大多数*Pig-a*基因突变研究数据来自于雄性动物。如有证据提示某种药物在代谢或生物利用度中存在性别差异,应同时使用两性别动物进行研究。已有数据表明,就*Pig-a*基因突变试验而言两性别大鼠对化合物的反应相似^[13-14]。国家药物安全评价中心汇总来自雄性SD大鼠和雄性C57BL/6J小鼠的数据,动物5~6周龄。所有研究方案均通过国家药物安全评价监测中心实验动物福利伦理委员会的伦理审查(伦理审查编号 IACUC-2015-P014、IACUC-2020-087、IACUC-2021-072、IACUC-2022-065、IACUC-2022-K005)。

1.2 主要仪器

FACSCalibur 流式细胞仪(BD bioscience 公

司);Centrifuge5810R型高速冷冻离心机(Eppendorf公司);QuadroMACS™ Separator 免疫磁性分离架(Miltenyi公司)。

1.3 主要试剂

超纯水(MilliQ-A10超纯水机自制);羧甲基纤维素钠(CMC-Na,质量分数0.5%)、*N*-亚硝基二甲胺(NDMA,批号510166-201902,质量分数99.7%)、*N*-亚硝基二乙胺(NDEA,批号510168-201902,质量分数99.7%),均购自中国食品药品检定研究院;盐酸丙卡巴肼(PCZ,大连美仑生物技术有限公司,批号M0907A、J0506A,质量分数>95%);*N*-乙基-*N*-亚硝基脲(ENU,批号MKBR9522V、MKCD2123)、乌拉坦(EC,批号BCBL1422V、BCBP1319V,质量分数≥99%),Sigma-Aldrich公司;PE-Anti-CD24(批号1006113、0266611)、PE-Anti-CD61(批号0321269、9070778)、Anti-CD59-PE(批号3014963、4308681、5061764、8298982)、Anti-CD61-PE(批号4164574、8310876、8011602),BD Pharmingen公司。

2 方法

2.1 动物分组及给药

*Pig-a*基因突变细胞具有多剂量累积性与持久性,因此OECD建议优先采用28 d重复给药方案进行*Pig-a*基因突变试验以进行监管安全性评估。对于急性及28 d给药研究,OECD建议至少在治疗开始后28~31 d进行突变分析,鼓励在更早的时间进行采样以提供更多的信息^[8]。如果试验设置恢复期,则可以在较晚的时间点进行采样。鼓励在第一次给药前进行*Pig-a*基因突变的分析,作为基线数据,可以剔除自发突变频率异常高的动物,有利于数据选择的准确性^[15]。

平行设立阴性及阳性对照组,根据文献或前期实验室工作确定各化合物给药剂量。阴性对照包括超纯水和0.5% CMC-Na,小鼠间隔24 h给予0.5% CMC-Na,连续7 d;大鼠间隔24 h给予0.5% CMC-Na,连续14 d;大鼠间隔24 h给予超纯水,连续3 d。阳性对照为已知致细菌突变化合物,包括ENU(10、40 mg·kg⁻¹)、PCZ(60、150 mg·kg⁻¹)、EC(300、800 mg·kg⁻¹)、NDMA(1.5 mg·kg⁻¹)、NDEA(15 mg·kg⁻¹),给药方案见图1。均为ig给药,SD大鼠CMC-Na给药体积为20 mL·kg⁻¹,其余化合物给药体积为10 mL·kg⁻¹。纳入统计的动物给药前无异常临床症状和自发突变率(给药前检测值不超过文献报道的溶媒/阴性对照组背景数据范围)。

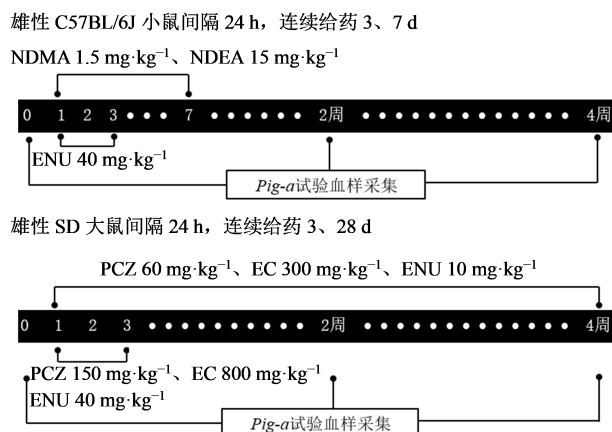


图1 阳性对照试验流程

Fig. 1 Positive control test process

2.2 症状观察

给药期间每天上午和下午对所有动物进行隔笼观察,内容包括动物是否死亡、濒死、活动状况、外观及被毛、有无外伤、粪便情况等。

2.3 血样采集

于给药前和首次给药后2、4周进行采血。动物自尾静脉(大鼠)或眼内眦(小鼠)采血,每次每只动物100~200 μL , $\text{K}_2\text{-EDTA}$ 抗凝。采血时需使用异氟烷吸入法麻醉,采血后棉球按压止血。末次采血前无需禁食过夜,自由饮水。末次采血后以二氧化碳吸入法实施安乐死。

血样暂时于2~8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存备用,5 d内用于检测及复测。每次检测需取抗凝血约80 μL 。用流式细胞术检测大鼠红细胞表面CD59蛋白的结合情况,结合免疫磁性计数微球技术计算%RET(作为外周血毒性考察指标)、总红细胞中CD59表达为阴性细胞($\text{RBC}^{\text{CD59-}}$,即突变的总红细胞)发生率和RETs中CD59表达为阴性细胞($\text{RET}^{\text{CD59-}}$,即突变的RETs)发生率。

2.4 样品制备与检测

本研究收录数据均使用高通量免疫磁珠法检测。吸取抗凝血80 μL ,加入100 μL 1%的肝素钠溶液,缓缓加入至3 mL淋巴细胞分离液液面上,800 $\times g$ 室温离心20 min;弃上清,加入150 μL 冰冷PBS溶液(不含FBS)重悬,将细胞悬液全部转移至含5 mL PBS溶液(含2% FBS,使用前于冰上或2~8 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存)的15 mL离心管中,240 $\times g$ 室温离心10 min;弃上清,加入150 μL 冰冷PBS溶液(不含FBS)重悬。转移160 μL 样品至含100 μL CD61/CD59抗体工作液中,2~8 $^{\circ}\text{C}$ 、避光孵育30 min。取1管来自溶媒对照组的细胞悬液不经抗体标记,2~

8 $^{\circ}\text{C}$ 保存,此为ICS Part A样品。孵育结束后,全部转移至含2% FBS的冰冷PBS溶液的离心管中,以340 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心5 min。弃上清,加入100 μL Anti-PE偶联磁珠并吹匀,2~8 $^{\circ}\text{C}$ 、避光孵育30 min。孵育完成后,向细胞悬液加入10 mL冰冷含2% FBS的PBS溶液,以340 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心5 min。弃上清,加入1 mL冰冷含2% FBS的PBS溶液重悬,吸取10 μL 转移至含990 μL 核酸染料和计数微球混合工作液的流式管中混匀,此为柱前样品。将ICS Part A样品重悬,吸取5 μL 加入至含有500 μL 核酸染料和计数微球混合工作液的流式管中混匀。同时将柱前样品与ICS Part A样品在37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,避光孵育15 min;孵育完成后置于2~8 $^{\circ}\text{C}$ 、避光保存至少5 min,在3 h内上流式分析。取一溶媒对照组的样品作为ICS Part B样品。搭建免疫磁性分离磁力架,洗涤工作液润洗,吸取1 mL细胞悬液上柱分离,收集滤出液。待细胞悬液全部进入分选柱后,快速加入5 mL含2% FBS的PBS溶液洗涤分选柱,用同一离心管收集洗出液,800 $\times g$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 离心5 min。弃上清,向细胞悬液加入300 μL 核酸染料和计数微球混合工作液,全部转移至流式管中,室温、避光孵育15 min。孵育完成后于2~8 $^{\circ}\text{C}$ 、避光保存至少5 min,在3 h内上流式分析,此为柱后样品。取相等体积(各200 μL)模板调试组分A、B充分混合,吹打均匀,建立分析模板并进行柱前/后样品检测,高速上样,每份柱前样品分析1 000个计数微球时停止。每份柱后样品尽可能分析全部细胞悬液。

2.5 数据分析

计算各组%RET、 $\text{RBC}^{\text{CD59-}}$ 和 $\text{RET}^{\text{CD59-}}$ 发生率的 $\bar{x} \pm s$ 。

阳性对照组的 $\text{RBC}^{\text{CD59-}}$ 和 $\text{RET}^{\text{CD59-}}$ 发生率与溶媒对照组相比存在显著性差异($P < 0.05$)则试验成立。如果结果符合以下3个标准,则认为阳性:①至少1个给药组的 $\text{RBC}^{\text{CD59-}}$ 和 $\text{RET}^{\text{CD59-}}$ 发生率与溶媒对照组相比存在统计学意义上的显著性差异;②组间突变率存在剂量相关趋势,剂量相关趋势使用二分类Logistic回归分析方法分析;③给药组的 $\text{RBC}^{\text{CD59-}}$ 和 $\text{RET}^{\text{CD59-}}$ 发生率超过文献报道的溶媒/阴性对照组背景数据范围(即二者均值超过 1×10^{-4})。

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用GraphPad Prism 8.0.2进行统计学分析,相同条件下不同时间点的数据使用Student's *t*-test进行比较。

3 结果

3.1 已知不致突变化合物

C57BL/6J小鼠和SD大鼠给予已知不致突变化合物后的 *Pig-a* 基因突变背景值见表1。连续7 d ig 给予 C57BL/6J 小鼠 0.5% CMC-Na, 至给予后4周, %RET 和 RBC^{CD59-} 发生率数值无明显改变, 但 RET^{CD59-} 发生率数值有所升高, 可见小鼠的背景值相对不稳定。连续14 d ig 给予 SD 大鼠 0.5% CMC-Na, 或连续3 d ig 给予 SD 大鼠超纯水, 至给予后4周, %RET 和 RBC^{CD59-}、RET^{CD59-} 发生率均无明显增加, 上述变化与文献报道的结果一致^[16]。

3.2 已知致细菌突变化合物

C57BL/6J小鼠和SD大鼠给予已知致细菌突变化合物后的 *Pig-a* 基因突变背景值见表2。连续3 d ig 给予 C57BL/6J 小鼠 40 mg·kg⁻¹ 的 ENU, 至给予后4周, %RET 数值无大幅增加, 但 RBC^{CD59-} 和 RET^{CD59-} 发生率自给药后2周开始均大幅增加 ($P < 0.05$), 给药后4周进一步增加 ($P < 0.01, 0.001$), 上述变化符合预期。连续7 d ig 给予 C57BL/6J 小鼠 1.5 mg·kg⁻¹ NDMA 或 15 mg·kg⁻¹ NDEA 后, 至给予后4周, %RET 数值无大幅增加。给予 NDMA 后2、4周, RBC^{CD59-} 发生率略有增加, 但仍在阴性背景范围内, 但 RET^{CD59-} 发生率在给药后第2周大幅增加 [增加至 $(40.32 \pm 19.27) \times 10^{-6}$, $P < 0.001$], 给药后第4周则大幅回落 [降低至 $(9.08 \pm 3.28) \times 10^{-6}$, $P < 0.001$]。给予 NDEA 后2周, RBC^{CD59-} 和 RET^{CD59-} 发生率均有所增加 [分别增加至 $(7.63 \pm 3.91) \times 10^{-6}$ 和 $(89.50 \pm 15.71) \times 10^{-6}$, $P < 0.05, 0.001$], 给药后第4周则有所降低 [降低至 $(1.37 \pm 0.90) \times 10^{-6}$ 和 $(8.83 \pm 0.55) \times 10^{-6}$]。上述变化可能与 *N*-亚硝胺化合物在小鼠体内的代谢特征有关。

连续3 d ig 给予 SD 大鼠 40 mg·kg⁻¹ ENU, 或连续28 d ig 给予 SD 大鼠 10 mg·kg⁻¹ ENU, 至给予后4周, %RET 未见大幅增加, 但 RBC^{CD59-}、RET^{CD59-} 发生率自给药后第2周开始均大幅增加 ($P < 0.001$), 给

药后第4周进一步增加 ($P < 0.001$), 变化趋势符合预期。连续3 d 及28 d ig 给予 SD 大鼠不同剂量的 PCZ 或 EC 后, %RET、RBC^{CD59-} 和 RET^{CD59-} 发生率的变化趋势与 ENU 类似, 但 EC 诱发的突变细胞率低于 ENU 和 PCZ。%RET 在给药前后无显著性变化, 但仍是药物骨髓遗传毒性的主要参考指标。当 %RET 数值过大时, *Pig-a* 基因突变试验结果如偏高则可能与骨髓毒性过大有关, 建议降低剂量设置。

此外, ENU、PCZ 和 EC 剂量较高时, 尽管给药时间较短 (仅3 d) 诱发的 RBC^{CD59-} 发生率与较低剂量时28 d 给药相当或更高; 然而长期重复给药的累积效应则可通过 RET^{CD59-} 发生率增加而体现。上述现象与 RBC 和 RET 体内形成的生理过程有关。大鼠外周血 RET 占红细胞总数的比例较低, 且在数天内即可完成代谢更新; 而外周血中成熟红细胞非常丰富, 寿命约为2个月^[17]。因此, 给药后通常可较早地检出突变 RET, 随后数值可随 RET 体内代谢而降低。相反, 突变的 RBC 的增加趋势较为缓慢而持久。

4 讨论

本研究收集了2015—2022年国家药物安全评价监测中心开展的雄性SD大鼠和雄性C57BL/6J小鼠 *Pig-a* 基因突变试验背景数据, 包括常用溶媒 (阴性) 对照 (0.5% CMC-Na、超纯水)、阳性对照 (ENU) 以及致细菌突变化合物 (NDMA、NDEA、PCZ、EC), 并根据不同动物品系、给予物质和浓度、给药时间分别进行汇总和统计。结果表明, SD 大鼠和 C57BL/6J 小鼠的自发 RBC^{CD59-} 和 RET^{CD59-} 突变率 (给药前) 均低于 5×10^{-6} 。体内 *Pig-a* 基因突变试验可在首次给药后4周内有效检出致细菌突变化合物 ENU、PCZ、EC、NDMA、NDEA 的致突变性。

目前国际 *Pig-a* 基因突变数据库收录了60种化合物的大鼠试验数据和17种化合物的小鼠试验数据, 来自小鼠的相关数据严重不足。也有观点认为小鼠 *Pig-a* 基因突变试验方法不够稳定。OECD 的

表1 已知不致突变化合物 *Pig-a* 基因突变试验背景数据 ($\bar{x} \pm s, n=5-11$)

动物品系	化合物	浓度/给药时间 % (间隔24h)	RBC ^{CD59-} 发生率/($\times 10^{-6}$)			RET ^{CD59-} 发生率/($\times 10^{-6}$)			%RET/%		
			给药前	给药后2周	给药后4周	给药前	给药后2周	给药后4周	给药前	给药后2周	给药后4周
C57BL/6J小鼠	CMC-Na	0.5 连续7 d	0.58±0.23	0.90±0.30	0.90±0.36	2.06±1.94	6.01±11.53	8.54±4.18	4.36±1.62	2.70±0.68	2.72±0.81
SD大鼠	CMC-Na	0.5 连续14 d	4.62±2.84	4.02±3.90	4.57±4.05	2.08±0.83	2.67±4.79	3.88±2.18	5.92±0.87	3.82±0.37	2.67±0.24
	超纯水	— 连续3 d	3.39±1.85	1.68±0.81	3.58±3.28	2.08±1.07	3.88±3.04	6.73±3.14	5.73±1.59	5.62±0.73	2.66±0.49

表2 已知致细菌突变化合物 *Pig-a* 基因突变试验背景数据 ($\bar{x} \pm s, n=5 \sim 12$)Table 2 Background data of *Pig-a* gene mutation assay of known bacterial mutagenic compounds ($\bar{x} \pm s, n=5 \sim 12$)

动物品系	组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	给药时间 (间隔 24 h)	RBC ^{CD59} -发生率/(×10 ⁻⁶)		
				给药前	给药后 2 周	给药后 4 周
C57BL/6J 小鼠	ENU	40	连续 3 d	1.98±1.06	85.20±63.53*	497.84±218.61***
	NDMA	1.5	连续 7 d	0.94±0.47	2.52±0.84**	2.16±2.44
	NDEA	15	连续 7 d	2.30±1.30	7.63±3.91*	1.37±0.90
SD 大鼠	ENU	40	连续 3 d	0.25±0.08	94.45±11.83***	136.50±11.42***
		10	连续 28 d	0.40±0.33	38.08±7.46***	93.80±6.92***
	PCZ	150	连续 3 d	1.92±0.97	58.00±26.40**	105.88±71.22**
		60	连续 28 d	0.50±0.45	16.20±2.57***	143.06±32.64***
	EC	800	连续 3 d	0.88±0.84	6.92±1.20***	9.48±0.90***
		300	连续 28 d	0.32±0.18	4.68±2.10**	8.30±2.59***
动物品系	组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	给药时间/ (间隔 24 h)	RET ^{CD59} -发生率/(×10 ⁻⁶)		
				给药前	给药后 2 周	给药后 4 周
C57BL/6J 小鼠	ENU	40	连续 3 d	6.00±5.75	105.01±61.73*	622.98±397.54**
	NDMA	1.5	连续 7 d	1.30±0.93	40.32±19.27***	9.08±3.28***
	NDEA	15	连续 7 d	4.32±3.49	89.50±15.71***	8.83±0.55*
SD 大鼠	ENU	40	连续 3 d	1.20±0.28	303.27±68.95***	235.21±29.98***
		10	连续 28 d	1.25±0.88	224.85±52.52***	372.27±39.86***
	PCZ	150	连续 3 d	2.12±0.95	204.14±123.96**	140.84±184.22
		60	连续 28 d	1.92±0.34	120.86±13.49**	313.10±93.13***
	EC	800	连续 3 d	1.28±0.64	24.46±7.41***	13.74±9.50**
		300	连续 28 d	1.04±0.68	19.32±9.55*	35.26±12.12***
动物品系	组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	给药时间/ (间隔 24 h)	%RET/%		
				给药前	给药后 2 周	给药后 4 周
C57BL/6J 小鼠	ENU	40	连续 3 d	1.54±0.24	6.78±1.45***	2.71±0.87
	NDMA	1.5	连续 7 d	4.40±3.06	1.72±0.28	2.24±0.15
	NDEA	15	连续 7 d	3.26±5.73	3.87±0.68*	3.60±0.55*
SD 大鼠	ENU	40	连续 3 d	10.25±2.04	5.37±0.44***	3.05±0.23***
		10	连续 28 d	7.08±1.08	5.23±1.08**	2.72±0.44***
	PCZ	150	连续 3 d	10.24±1.23	7.84±1.15*	4.90±1.54***
		60	连续 28 d	9.08±1.74	4.86±0.69***	4.62±1.53***
	EC	800	连续 3 d	10.58±0.98	6.74±0.86***	2.94±0.49***
		300	连续 28 d	7.08±0.88	4.86±1.00**	3.06±0.47***

与给药前比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs before administration

Pig-a 试验指导原则同样适用于小鼠,但在设计小鼠研究时,应考虑到基于小鼠试验的几个特点,包括小鼠相对于大鼠的低循环血量以及小鼠造血系统稳态重新建立的时间^[12]。Olsen 等^[6]研究发现,大鼠和小鼠的突变动力学以及突变持久性存在差异。小鼠给予 ENU 后, RBC 和 RET 中突变细胞出现的峰值早于大鼠。小鼠 RBC 的突变率通常在达峰之后缓慢下降,而在大鼠 RBC 突变率峰值可持续长达 6 个月。因此,开展体内 *Pig-a* 基因突变试验时,需充分考虑到突变诱导的动力学以及突变细胞的选择,从而确定适宜的给药方案及捕获突变率的最佳时间点。

此外,动物种属也可影响检测背景值。哺乳动

物外周血 *Pig-a* 基因自发突变背景值通常低于 5×10^{-6} 。然而,因存在遗传背景差异,自发突变背景值可能有所偏差。研究表明,基因组不稳定的动物的 *Pig-a* 基因突变率较高^[18]。故建议在检疫期对动物进行 *Pig-a* 基因突变背景值筛选,根据检测结果确定入组动物,从而得到更为准确、可靠的试验结果。

然而, *Pig-a* 基因突变试验在基因突变检测方面也有一定局限。该方法只限于检测暴露于骨髓红系细胞的突变,但对仅在其他组织中具有强诱变作用物质的敏感性不佳。化合物在骨髓中的暴露量、暴露时间等因素均会影响 *Pig-a* 试验结果的敏感性。已有研究表明, *Pig-a* 基因突变试验对依托泊苷、羟脲、叠氮嘧啶等致断裂剂不敏感^[19],这可能与

Pig-a 基因的失活主要是小的基因内突变,如移码突变或碱基置换,对于导致基因组DNA大量缺失的化合物不敏感。课题组前期研究发现,光泽汀和大黄素均可在细菌回复突变试验中呈阳性,但小鼠 *Pig-a* 因突变试验结果为阴性^[20-21],其原因可能由于体内 *Pig-a* 基因突变试验对弱阳性致突变剂不够敏感^[22],也与化合物在外周血中含量较低有关。此外,课题组利用大鼠和小鼠对雷公藤甲素进行 *Pig-a* 基因突变研究,结果均未见 *Pig-a* 基因突变率的上升^[23-24]。因雷公藤甲素自身结构较大,其遗传毒性作用机制主要是导致染色体损伤^[25-26],而非移码突变或碱基置换等小的基因内突变有关。目前指导原则建议 *Pig-a* 基因突变试验应尽量与重复给药毒性试验结合,给药时长建议达到14 d以上,以避免因短期暴露不充分导致的假阴性结果。

综上所述,*Pig-a* 基因突变试验作为一项体内基因突变试验具有试验周期短,符合3R原则等优势。*Pig-a* 基因突变试验使用内源性哺乳动物基因作为体细胞基因突变的报告因子,而不是检测DNA损伤、非遗传染色体变化或细菌转基因突变,在检测与人体有关的致突变物质中具有较好的专属性。Dobo等^[17]和Gocke等^[27]研究发现,*Pig-a* 基因突变试验可在较低作用剂量下检出突变的累积效应。OECD专家强烈建议采用该检测方法作为现有体内遗传毒理学检测方法的补充^[8]。本研究提供了大鼠和小鼠 *Pig-a* 基因突变试验的背景值范围,为标准化试验方法的建立和研究结果的判定提供借鉴。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 陈高峰,王亚楠,王丹,等. *Pig-a* 基因突变试验研究进展 [J]. 癌变·畸变·突变, 2019, 31(6): 492-497.
Chen G F, Wang Y N, Wang D, et al. Research progress on mutation test of *Pig-a* gene [J]. Carcinog Teratog Mutagen, 2019, 31(6): 492-497.
- [2] Kawagoe K, Takeda J, Endo Y, et al. Molecular cloning of murine *pig-a*, a gene for GPI-anchor biosynthesis, and demonstration of interspecies conservation of its structure, function, and genetic locus [J]. Genomics, 1994, 23(3): 566-574.
- [3] Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, et al. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the *PIG-a* gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria [J]. Cell, 1993, 73(4): 703-711.
- [4] Miura D, Dobrovolsky V N, Kasahara Y, et al. Development of an *in vivo* gene mutation assay using the endogenous *Pig-a* gene: I. Flow cytometric detection of CD59-negative peripheral red blood cells and CD48-negative spleen T-cells from the rat [J]. Environ Mol Mutagen, 2008, 49(8): 614-621.
- [5] Bryce S M, Bemis J C, Dertinger S D. *In vivo* mutation assay based on the endogenous *Pig-a* locus [J]. Environ Mol Mutagen, 2008, 49(4): 256-264.
- [6] Olsen A K, Dertinger S D, Krüger C T, et al. The *pig-a* gene mutation assay in mice and human cells: A review [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2017, 121(Suppl 3): 78-92.
- [7] Dobrovolsky V N, Shaddock J G, Mittelstaedt R A, et al. Evaluation of *Macaca mulatta* as a model for genotoxicity studies [J]. Mutat Res, 2009, 673(1): 21-28.
- [8] OECD. The *in vivo* erythrocyte *pig-a* gene mutation assay - part 1 - detailed review paper and retrospective performance assessment.[EB/OL]. (2020-06-16)[2022-12-21]. <https://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/series-testing-assessment-publications-number.htm>.
- [9] Dertinger S D, Bryce S M, Phonethepswath S, et al. When pigs fly: Immunomagnetic separation facilitates rapid determination of *Pig-a* mutant frequency by flow cytometric analysis [J]. Mutat Res, 2011, 721(2): 163-170.
- [10] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Guidance on Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2 (R1) (Step 4 version) [EB/OL]. (2017-05-31) [2022-12-21]. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf.
- [11] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Assessment and control of DNA reactive (mutagenic) impurities in pharmaceuticals to limit potential carcinogenic risk M7(R1) [EB/OL]. (2017-07-21) [2022-12-21]. https://www.ema.europa.eu/documents/scientific-guideline/ich-guideline-m7r1-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit_en.pdf.
- [12] OECD. Test no. 470: mammalian erythrocyte *pig-a* gene mutation assay [EB/OL]. (2022-06-30) [2022-12-21]. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-470-mammalian-erythrocyte-pig-a-gene-mutation-assay_4faea90e-en;jsessionid=dBhn54MRqxNRbv7GH8kJ-ou3I5M20JdGQH4OVI7K.ip-10-240-5-189.
- [13] Labash C, Avlasevich S L, Carlson K, et al. Comparison of male versus female responses in the *Pig-a* mutation

- assay [J]. *Mutagenesis*, 2015, 30(3): 349-357.
- [14] Labash C, Carlson K, Avlasevich S L, et al. Induction of *Pig-a* mutant erythrocytes in male and female rats exposed to 1, 3-propane sultone, ethyl carbamate, or thiotepa [J]. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2015, 782: 24-29.
- [15] Dertinger S D, Bhalli J A, Roberts D J, et al. Recommendations for conducting the rodent erythrocyte *Pig-a* assay: A report from the HESI GTTC *Pig-a* Workgroup [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2021, 62(3): 227-237.
- [16] Dobrovolsky V N, Miura D, Heflich R H, et al. The *in vivo Pig-a* gene mutation assay, a potential tool for regulatory safety assessment [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2010, 51(8/9): 825-835.
- [17] Dobo K L, Fiedler R D, Gunther W C, et al. Defining EMS and ENU dose-response relationships using the *Pig-a* mutation assay in rats [J]. *Mutat Res/Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2011, 725(1/2): 13-21.
- [18] Byrne M, Bennett R L, Cheng X D, et al. Progressive genomic instability in the Nup98-Ho_vD13 model of MDS correlates with loss of the *PIG-a* gene product [J]. *Neoplasia*, 2014, 16(8): 627-633.
- [19] Dertinger S D, Avlasevich S L, Torous D K, et al. 3Rs friendly study designs facilitate rat liver and blood micronucleus assays and *Pig-a* gene mutation assessments: Proof-of-concept with 13 reference chemicals [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2019, 60(8): 704-739.
- [20] 闫明, 王雪, 秦超, 等. 光泽汀体内遗传毒性风险评价 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(7): 1248-1254.
- Yan M, Wang X, Qin C, et al. Risk assessment of *in vivo* genotoxicity of lucidin [J]. *Drug Eval Res*, 2022, 45(7): 1248-1254.
- [21] 文海若, 王亚楠, 姜华, 等. 大黄素体内遗传毒性风险评价 [J]. *中国药物警戒*, 2022, 19(6): 635-640
- Wen H R, Wang Y N, Jiang H, et al. *In vivo* genotoxic risk assessment of emodin [J]. *Chin J Pharmacovigil*, 2022, 19(6): 635-640
- [22] Bhalli J A, Shaddock J G, Pearce M G, et al. Sensitivity of the *Pig-a* assay for detecting gene mutation in rats exposed acutely to strong clastogens [J]. *Mutagenesis*, 2013, 28(4): 447-455.
- [23] 邓媛元, 蒲江, 张海洲, 等. *Pig-a* 基因突变方法检测盐酸甲基苄肼和雷公藤甲素的遗传毒性 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013, 27(3): 606.
- Deng Y Y, Pu J, Zang H C, et al. Genetic toxicity of methylbenzyl hydrazine hydrochloride and triptolide was detected by *Pig-a* gene mutation assay [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2013, 27(3): 606.
- [24] 王亚楠, 闫明, 汪祺, 等. 雷公藤甲素致 L5178Y 细胞及小鼠 *Pig-a* 基因突变风险评价 [J]. *中国现代中药*, 2020, 22(10): 1630-1637.
- Wang Y N, Yan M, Wang Q, et al. Risk assessment of *Pig-a* gene mutation risk on L5178Y cell and mice induced by triptolide [J]. *Mod Chin Med*, 2020, 22(10): 1630-1637.
- [25] 文海若, 淡墨, 齐乃松, 等. 多细胞系胞质分裂阻滞微核细胞组学试验法的建立与应用 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2015, 27(4): 304-308.
- Wen H R, Dan M, Qi N S, et al. Cytokinesis-block micronucleus cytomic test establishment in multiple mammalian cell lines [J]. *Carcinog Teratog Mutagen*, 2015, 27(4): 304-308.
- [26] 淡墨, 文海若, 闻镍, 等. 甘草酸二铵对雷公藤甲素诱导肠通透增强及染色体损伤的保护作用 [J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(7): 750-754, 770.
- Dan M, Wen H R, Wen N, et al. Protective effects of diammonium glycyrrhizinate on permeability increasing and chromosome breakage induced by triptolide [J]. *Chin J New Drugs*, 2015, 24(7): 750-754, 770.
- [27] Gocke E, Ballantyne M, Whitwell J, et al. MNT and MutaMouse studies to define the *in vivo* dose response relations of the genotoxicity of EMS and ENU [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 190(3): 286-297.

[责任编辑 兰新新]