

流式细胞术在遗传毒性评价中的应用

唐茵茹^{1,2}, 姜华¹, 王雪¹, 汪祺^{1*}, 文海若^{1*} (1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100176; 2. 中山大学药学院, 广州 510006)

摘要: 遗传毒性是药物临床前安全性评价的重要组成部分, 随着新型化合物数量的不断增加, 建立高通量筛选方法以评价遗传毒性风险是当前药物研发人员的迫切需求。流式细胞术是一种能在短时间内对细胞进行多参数检测和分选的技术, 具有自动化、高通量、特异性强等特点, 目前已被应用于多种遗传毒性评价方法中。本文综述了流式细胞术在遗传毒性研究中的应用, 并对其在遗传毒性评价上的应用前景进行探讨。

关键词: 流式细胞术; 遗传毒性; 高通量筛选; 微核试验; *Pig-a*基因突变试验; γ H2AX试验

中图分类号: R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2022)09-1071-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2022.09.013

Application of Flow Cytometry in Genotoxicity Evaluation

Tang Yinru^{1,2}, Jiang Hua¹, Wang Xue¹, Wang Qi^{1*}, Wen Hairuo^{1*} (1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Genotoxicity is an important part of the preclinical safety evaluation of drugs. With the growing numbers of new compounds, the establishment of high-throughput screening methods to evaluate genotoxicity is an urgent need for drug developers. Flow cytometry is a technology that can perform multi-parameter detection and cell sorting in a short period of time. It has the advantages of automation, high throughput and strong specificity. It has been used in a variety of genotoxicity evaluation. In this paper, the application of flow cytometry in the study of genotoxicity is reviewed, and its application prospect in the evaluation of genotoxicity is discussed.

Keywords: flow cytometry; genotoxicity; high-throughput screening; micronucleus assay; *Pig-a* gene mutation assay; γ H2AX assay

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(编号 2018ZX09201017); 国家自然科学基金(编号 81503347)

作者简介: 唐茵茹 Tel: (010) 67876252; E-mail: tangyr3@mail2.sysu.edu.cn

通信作者: 汪祺 Tel: (010) 67095495; E-mail: sansan8251@sina.com

文海若 Tel: 13901298669; E-mail: haimowen@163.com

遗传毒性是指理化因素对细胞的遗传物质造成的损伤,主要类型包括基因突变、DNA损伤、染色体结构和数目改变,这些损伤通常与致癌性密切相关。因此,遗传毒性研究是药物临床前安全性评价中不可忽视的重要组成部分。经典的遗传毒性评价方法包括细菌回复突变试验、微核试验、彗星试验、染色体畸变试验等。然而,传统方法普遍存在通量低、耗时长、评价方式较为主观等缺点,亟待开发快速、微量、非劳动密集型的高通量筛选(High-throughput Screening, HTS)方法,用于遗传毒性筛选与评价。流式细胞术(Flow Cytometry)是其中一种广泛使用的HTS技术,可通过标记特定的生物标志物对悬浮在流体流中的细胞进行计数、检测和分选,其分析通量可达每秒50000个细胞,并能准确提供单个细胞的多种参数,包括细胞密度、大小、内部复杂性等^[1]。随着分子生物学的发展,与基因突变、染色体损伤和DNA损伤有关的生物标志物可通过荧光标定的方式进行识别,由此将遗传毒性试验方法与流式细胞术有机结合,实现遗传毒性评价的高通量化。本文对流式细胞术在遗传毒性研究中的应用现状进行综述,并探讨流式细胞术在早期遗传毒性评价中的应用前景。

1 啮齿类动物体内微核试验

微核(Micronucleus, MN)试验用于检测受试物对细胞造成的染色体断裂或有丝分裂器损伤,是评价受试物遗传毒性的重要手段之一。红细胞微核试验原理是基于红细胞的细胞核在成熟过程中被排出,而因损伤造成的微核则滞留在细胞质中的现象,以存在微核的成熟红细胞作为染色体损伤的生物标志物^[2]。目前体内微核试验主要以哺乳动物(通常是大鼠和小鼠)的骨髓细胞或者外周血细胞为研究对象,经过采样、制片、固定、染色和显微镜阅片计数,检测细胞的微核率。根据原国家食品药品监督管理总局2018年颁布的《药物遗传毒性研究技术指导原则》(以下简称《指导原则》),体内微核试验至少设置3个剂量组,每组至少5只动物,每只动物至少计数4000个未成熟红细胞以测定未成熟红细胞的微核率^[3]。在此背景下,传统的人工阅片检测方法的缺点日益凸显,包括效率低下、微核漏检、主观因素影响等。相比之下,使用流式细胞术的体内微核检测方法每秒能分析数千个

细胞,极大提高了检测效率;同时可以避免专业知识掌握情况、经验差异等人为主观因素的影响,提高数据的客观性和可靠性。近年来,国内实验室利用吖啶橙(Ardine Orange, AO)与细胞中的DNA和RNA结合后能发出不同颜色的荧光的特性,开发了基于骨髓细胞的流式细胞术微核检测方法。刘仕杰^[4]等对基于流式细胞术的大鼠和小鼠骨髓嗜多染红细胞微核检测方法与人工作阅片结果进行比较,结果未见差异。然而,开展骨髓细胞的体内微核试验需将动物处死,单次采样,基于外周血细胞的体内微核试验方法则具有可多次采样的优点,应用价值更高。

早期的基于外周血细胞体内微核流式细胞术检测方法是应用RNA荧光染料噻唑橙将其与成熟红细胞区分,再用DNA特异性荧光染料Hoechst 33342识别含有微核的细胞,利用该方法可以快速大量地检测到网织红细胞中的微核率,但由于Hoechst 33342需要紫外光激发,而配备紫外激发光的双激光流式细胞仪相对罕见,所以该技术没有得到广泛的应用^[5]。因此,研究人员在评价指标中增加了网织红细胞的表面抗原CD71和血小板表面抗原CD61,以排除成熟红细胞和血小板的干扰^[6]。简而言之,这种方法将细胞置于抗CD71-异硫氰酸荧光素(Fluorescein Isothiocyanate, FITC)、抗CD61-藻红蛋白(Pphycoerythrin, PE)和RNA酶孵育足够时间后,再加入碘化丙锭(Propidium Iodide, PI)以标记微核,即可用于流式细胞术分析。该三色标记方法只需单激光流式细胞仪,且荧光染料-抗体偶联物的选择具有较大的灵活性,适用性广泛,实验室间的联合验证也证明其可重复性,目前已被遗传毒性研究广泛采用。但三色标记方法仍然存在一定的局限性,该方法需要破裂红细胞,降解RNA,程序较为复杂;此外,破裂细胞膜可能会导致细胞损伤,而RNA降解不均匀也会严重影响实验结果的准确性。Chen等^[7]开发的CD71-FITC和深红葱醌5(Deep Red Anthraquinone 5, DRAQ5)双染色法在一定程度上可以克服上述缺点。DRAQ5是一种DNA荧光染料,且具有良好的膜通透性,从而可以省略降解RNA和破裂细胞膜的步骤。此外,CD71-FITC与DRAQ5的荧光光谱没有重叠,无需进行荧光补偿。利用该双染色法检测大鼠外周血的MN率,结果与人工阅片有良好的一致性。

值得注意的是,在红细胞的发育过程中,最后一次细胞分裂完成后5~10 h内细胞核被排出细胞,10~30 h内RNA丢失形成正染红细胞,网织红细胞表面抗原CD71在网织红细胞从骨髓进入外周血后的24 h内消失^[8]。因此,骨髓微核试验应该在给药后18~24 h内进行采样,而外周血微核试验应在24~48 h内进行采样。用外周血代替骨髓有几个明显的优势,如只需用少量血液即可进行分析,并实现对同一动物的动态监测;可以将微核试验整合到一般毒性试验中,减少试验成本的同时又符合3R原则,即替代(Replacement)、减少(Reduction)、优化(Refinement)。基于流式细胞术的检测方法可以在短时间内检测大量细胞,避免了脾脏对微核细胞清除作用所导致的假阴性结果。

美国于2006年完成了基于流式细胞术的大鼠外周血微核试验的实验室间联合验证,我国也于2014完成了联合验证,验证结果提示,使用流式细胞术检测的外周血中网织红细胞微核率的结果与人工阅片检测骨髓中嗜多染红细胞微核率的结果具有良好的相关性^[9]。目前经过充分验证的基于流式细胞术的体内微核试验方法已经得到ICH S2 (R1)、经合组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)的TG 474《哺乳动物红细胞微核试验》以及《指导原则》的认可;其中OECD建议在使用CD71标记网织红细胞时,最高剂量组的网织红细胞亚群比例高于对照组的5%即可。但因流式细胞仪和相应的抗体及试剂盒成本较高,当前该方法在国内并未得到广泛应用。

2 体外培养细胞微核试验

体外细胞微核试验是一种检测细胞有丝分裂期间形成的微核来预测受试物潜在遗传毒性风险的评价系统,在不同细胞类型中具有广泛适用性,包括CHL细胞、CHO细胞、TK6细胞、人外周血淋巴细胞等。当前常用的体外细胞微核试验检测方法是胞质分裂阻断法,即使用细胞松弛素B阻断细胞质的分裂,识别并分析其中仅分裂一次的双核细胞微核率^[10]。然而,细胞松弛素B具有一定的细胞毒性,影响细胞活力;细胞松弛素B会干扰多倍体的形成,导致难以判断潜在的多倍体诱导剂毒性^[10]。此外,该方法对操作及阅片的要求较高,如制片时

容易低渗过度,导致细胞膜完全破裂;样本容易析出结晶形成黑点,影响阅片;阅片时难以区分相邻的两个细胞核是否在同一细胞中。因此,无需使用细胞松弛素B且能对微核进行自动识别及分析的流式细胞术检测方法是当前研究的热点之一。流式细胞术的方法最初由Nüsse和Kramer^[11]建立,即在裂解细胞外膜后使用多种核酸染料进行染色,继而根据相关的DNA染料的荧光强度区分正常的细胞核及MN。然而,早期的检测方法存在无法区分MN和细胞碎片的缺点。

Litron Labs^[12]使用双染料持续染色方法将MN与凋亡和坏死细胞的染色质区分,同时引入计数珠对细胞毒性进行评估以控制假阳性率,从而建立了稳定可靠的流式体外微核检测方法。在该方法中,先将完整的细胞与EMA(Ethidium Monoazide Bromide)一起孵育。EMA是一种核酸,能穿过坏死和晚期凋亡细胞的受损细胞膜,并在后续的光活化步骤中与细胞的DNA进行共价结合,从而标记坏死或凋亡细胞。在EMA染色后,加入裂解液裂解细胞,同时加入核酸染料SYTOX[®] Green,以标记所有的DNA。通过检测不同的荧光,可以区分健康细胞的染色质(EMA⁻/SYTOX⁺)和坏死及凋亡细胞染色质(EMA⁺/SYTOX⁻),从而提高结果的准确性。这种方法已经被证明能与常规镜检结果形成良好的一致性。细胞毒性是影响哺乳动物细胞遗传毒性试验中假阳性率的重要因素之一^[13]。因此,通过将计数珠添加到待测定样本中(例如在接种细胞时添加到培养基中),可以确定每个样本的核-珠比,用于计算相对存活率,相对存活率 $\geq 50\%$ 可认为排除过度细胞毒性带来的假阳性结果^[13]。此外,EMA⁺的百分比也可作为细胞毒性检测的另一个终点,该值可用于确定测定的有效性(例如对照组具有特征性的EMA⁺百分比),识别细胞毒性过大的受试物浓度^[14]。

使用流式细胞术检测体外微核时,除微核率外,还能获得细胞相对存活率、凋亡/坏死比率、亚二倍核率、细胞周期、遗传毒性作用方式等多个参数^[13]。与常规人工阅片的显微镜检测方法相比,流式微核的检测方法可以避免人为主观因素的影响,提高数据的客观性和可靠性;同时,通过采用相同的质控标准和调整PMT电压以控制对照组G1期细胞核的荧光信号通道及强度这两种方

法,降低实验室内或实验室间各种因素所导致的测量误差,提高结果的真实性和可重复性。此外,传统镜检方法通常分析1000~2000个细胞,而流式细胞术能在2~3 min内检测至少5000个细胞,极大地提高了检测效率,节约检测成本,为化合物的高通量筛选提供可能。目前Litron Labs的方法已经在L5178Y、TK6、WIL-2-NS、CHO-K1、V79、WTK-1和HepG2细胞系中得到验证^[13-14]。其中p53基因完整的TK6细胞对抗氧化剂诱导的染色体损伤比较敏感,p53基因突变的WTK-1细胞对甲磺酸乙酯和丝裂霉素C等直接作用的遗传毒性化合物更敏感,CHO-K1细胞检测非整倍体诱导剂的灵敏度和特异性更好。2007年,国外4家实验室使用6种不同的受试物完成了基于L5178Y细胞的流式细胞术体外微核试验的联合验证,其结果表明同一种受试物对L5178Y细胞的毒性及微核率的影响在不同实验室间具有良好的一致性^[15]。欧红梅等^[16]在2015年首次于国内建立并验证了流式细胞术检测CHO-K1细胞微核率的检测方法,结果提示该方法在有或无S9条件下对8种遗传毒物均表现出良好的灵敏度和特异性。与体内微核试验相似,经过充分验证的基于流式细胞术的体外微核试验方法已经得到ICH、OECD以及《指导原则》的认可。由于基于流式细胞术的体外微核Swim方法无需使用细胞松弛素B,OECD建议使用细胞相对增加率(Relative Increase in Cell Count, RICC)和相对细胞倍增数(Relative Population Doubling, RPD)以控制最高剂量的细胞毒性。

3 啮齿类动物外周血*Pig-a*基因突变试验

磷脂酰肌醇聚糖A类(Phosphatidylinositol Glycan, Class A; *Pig-a*)基因是一个位于X染色体上的单拷贝基因,在物种间高度保守,该基因突变将导致细胞表面缺乏糖基磷脂酰肌醇(Glycosylphosphatidylinositol, GPI)及相应的锚定蛋白(如CD59、CD52、CD48、CD55),可以作为基因突变的报告基因^[17]。通过流式细胞术对细胞进行荧光标记和分析,可以检测到GPI锚定蛋白的表达缺失,作为*Pig-a*基因突变的指标。目前体内*Pig-a*基因突变检测常用外周血细胞、红细胞、白细胞或骨髓细胞,因为血液样本容易获得且无需经过消化等特殊处理。

在早期的研究中,Bryce等^[18]利用抗CD59-藻红

蛋白(Phycoerythrin, PE)识别大鼠外周血中GPI锚定蛋白缺陷的红细胞。由于突变细胞频率较低,为了得到可靠的结果需要分析数百万个细胞,每个样本上样时间可达20 min。后来在该方法的基础上,研究人员又增加了免疫磁性分离的步骤以富集目标细胞群。Dertinger等^[19]在进行大鼠外周血细胞*Pig-a*基因突变试验时,先用淋巴细胞分离液去除白细胞和血小板,再将样品与抗CD59-PE(标记野生型红细胞)和抗CD61-PE(标记残余的血小板)一起孵育,然后与抗PE磁性微珠和计数珠混合,并于Miltenyi LS磁性色谱柱中洗脱,带有PE标记的野生型红细胞被色谱柱吸附,从而达到富集*Pig-a*突变体(CD59⁻)的目的。洗脱液用核酸染料SYTO 13染色,区分成熟红细胞和网织红细胞。检测同样数量级的细胞,增加免疫磁性分离步骤能将分析时间缩短至7 min,显著提高分析效率。

目前该方法已经通过联合验证阶段,OECD体内*Pig-a*基因突变试验指南也在制定中。Shemansky等^[20]创立了体内*Pig-a*基因突变检测数据库,收录了90多个受试物在大鼠或小鼠中进行的*Pig-a*基因突变试验结果,将来也会增加来自其他物种的数据(包括人类),以提供OECD制定指南所需的回顾性验证报告和详细审查文件。Dertinger等^[21]从实验室设施设备、每个剂量组动物数量、给药时间、采血计划和统计分析等方面总结了开展啮齿动物体内*Pig-a*基因突变试验最佳的方法,为OECD指南的制定提供有力支持。

4 体外培养细胞*Pig-a*基因突变试验

此外,更符合3R原则的体外*Pig-a*基因突变试验也在不断完善中。与体内*Pig-a*基因突变试验类似,体外*Pig-a*基因突变试验也是通过将特定的GPI锚定蛋白抗体与样品一起孵育后用流式细胞术区分野生型和突变型细胞。目前文献中报道的能作为靶蛋白的包括人类细胞的CD55和CD59,小鼠细胞的CD90.2,常用的细胞系为TK6细胞和L5178Y细胞^[17]。Krüger等^[22]利用CD55-PE和CD59-PE检测甲磺酸乙酯、4-硝基喹啉1-氧化物和UV-C照射对TK6细胞GPI表达状态的影响,其结果显示TK6细胞的GPI缺失具有剂量-效应关系和显著的统计学差异,提示体外*Pig-a*基因突变试验具有成为体外遗传毒性评价新方法的潜力。然而,由于TK6细胞中也存在与*Pig-a*类似的单拷贝基因*Pig-1*,因此TK6

细胞GPI自发突变的背景较高,在检测前需要清除突变细胞降低背景值^[23]。David等^[24]利用CD90.2-PE和CD45-APC建立及验证了基于L5178Y细胞的体外*Pig-a*基因突变试验。与TK6细胞相比,L5178Y细胞自发突变背景较低,突变体表达期为8天(TK6细胞为10天),在检测成本及效率上具有一定的优势。王亚楠等^[25]首次于国内建立并验证了基于L5178Y细胞的体外*Pig-a*基因突变试验方法,其结果提示,在有或无S9条件下该方法均能有效检测致突变剂,具有较高的灵敏度、特异性和可靠性。

然而,基于抗体的检测方法通常费用昂贵,处理步骤较为复杂,且难以避免非特异性标记,某些细胞系可能还无法获得合适的抗体。因此,Tian等^[26]利用慢病毒转染构建能表达人工GPI锚定荧光蛋白GPI-GFP和GPI-mCherry的TK6细胞,细胞内存在功能完整的GPI锚合成途径时,细胞表面能成功检测到GFP和mCherry的荧光信号;而当*Pig-a*基因发生突变时,细胞表面缺乏GPI、GPI-GFP和GPI-mCherry,将被降解或分泌到细胞外而无法被仪器检测到。体外*Pig-a*基因突变试验目前尚处于前期探索阶段,仍然需要使用更多的化合物和细胞系开展进一步的研究,同时开展实验室间的联合验证以证明方法的可转移性,也有助于体外*Pig-a*基因突变试验方法的完善和推广。

5 γ -H2AX试验

H2AX是组蛋白H2A家族的成员,其C端尾部含有一个丝氨酸-谷氨酰胺-谷氨酸(Ser-Gln-Glu, SQE)结构,该结构从植物到人类都具有高度保守性,并在细胞发生DNA双链断裂(DNA Double Strand Break, DSB)后所激活的DNA损伤应答(DNA Damage Response, DDR)中扮演重要角色^[27]。当DSB发生的几分钟后,断裂点附近2Mb区域内H2AX的SQE结构中的丝氨酸被磷酸化,形成磷酸化的H2AX(γ -H2AX),作为DDR核心成分募集相关的DNA修复蛋白。一个DNA断裂点周围可形成多达2000个 γ -H2AX分子,当使用荧光抗体标记时,可在显微镜下观察到明显的灶点,而灶点的数量与DSB的数量具有良好的一致性,可作为DSB的生物标记物^[28]。目前 γ -H2AX的检测方法包括免疫荧光染色法、蛋白质印迹法、全细胞ELISA法和流式细胞术法。其中免疫荧光法对仪器灵敏度要求较高,且在识别和分析过程中容易受操作人员

主观因素影响,结果的可靠性和重现性有限;使用蛋白印迹法检测时,蛋白的抗体识别位点会受温度、pH等因素的影响而发生结构折叠,使得抗体无法与目标蛋白结合,从而导致假阴性结果;全细胞ELISA方法操作简便,适合高通量分析,但是成本较高;流式细胞术法可以快速分析大量细胞中的 γ -H2AX,并能提供包括细胞毒性、细胞周期扰动和非整倍体诱导在内的多种信息,更适合精准定量,且通过使用多色荧光浸染法可以同时检测多种不同细胞中的 γ -H2AX,是应用较为广泛的方法之一^[29]。

目前 γ -H2AX的流式细胞术检测方法大多以体外培养的细胞为研究对象。使用流式细胞术检测 γ -H2AX时,只需将细胞固定,并使用 γ -H2AX一抗和荧光标记的二抗或荧光标记的 γ -H2AX一抗对细胞进行染色,再经流式细胞仪分析后,可以得出每个细胞核中 γ -H2AX荧光强度的定量结果^[29]。应用流式细胞术检测 γ -H2AX的优势之一是可以多种荧光染色获得与细胞相关的额外信息。例如,使用PI染色可以提供有关细胞周期的数据,这对于表征DDR的发生时间很重要。分别使用FITC和PI对 γ -H2AX和DNA进行双染色,在细胞周期的所有阶段都能观察到 γ -H2AX增强,表明DSB的形成与细胞周期和增殖水平无关;而在S期观察到 γ -H2AX增强表明DSB可能由于DNA复制过程中复制叉崩溃所致^[30]。黄鹏程等^[31]利用荧光标记的 γ -H2AX抗体和核酸染料SYTOX Green建立了基于TK6细胞的 γ -H2AX流式细胞术检测方法,该方法对依托泊苷和环磷酰胺有较好的灵敏度。此外, γ -H2AX还能和与遗传毒性、细胞凋亡或增殖等终点相结合,如p53、PARP、磷酸化组蛋白H3等,从而对受试物的潜在毒性进行综合分析^[32]。Bryce等^[33]利用抗 γ -H2AX-Alexa Fluor[®]647标记 γ -H2AX、抗磷酸化组蛋白H3-PE标记有丝分裂细胞、抗p53-FITC识别p53的N端的转录激活结构域、RNase和PI染色提供细胞周期和多倍体的信息,将多个生物标记物整合到一个流式细胞术试验中,且结果具有良好的灵敏度和特异性,大大提高了对不同作用机制化合物的检测和筛选能力。

6 总结与展望

流式细胞术是一种能在短时间内分析大量样

品并提供多种信息参数的高通量检测方法,遗传毒性的主要评价终点,包括基因突变、染色体损伤、DNA断裂,都可以通过建立遗传物质损伤与荧光信号关联的方法被流式细胞仪所检出。目前流式细胞术已经被应用于微核试验、*Pig-a*试验和 γ -H2AX试验等遗传毒性评价方法中,是能满足日益增长的化合物遗传毒性筛选需求的有力工具。尤其通过不断优化操作步骤、开发新型荧光染料组合、建立标准操作方法,将进一步提高流式细胞术在遗传毒性评价的应用率及可靠性。

然而传统流式细胞术仍存在一定的局限性,如无法获得细胞形态、结构、细胞器等真实的细胞图像。将高分辨率的显微镜与流式细胞术相结合的成像流式细胞术(Imaging Flow Cytometry)可以克服一些传统流式细胞术的缺点。通过使用成像流式细胞术,可以捕获来自悬浮细胞的图像,无需使用显微镜载玻片,并将完整细胞质膜和DNA含量可视化。成像流式细胞术应用在微核试验中可以克服传统流式细胞仪无法分辨细胞核芽和核质桥、无法将MN与相应的细胞对应起来等缺点,实现快速、自动地识别和量化含有和没有MN的单核、双核和多核细胞,是一种具有完全自动评分潜力的新方法^[34]。这项技术也同样被应用到 γ -H2AX试验中,能鉴别细胞中轻微量级的DNA损伤,显著提升检测的灵敏度^[29]。目前,成像流式细胞术还处于不断探索阶段,图像扫描和识别技术仍有很大的改进空间,且仪器价格相对昂贵,普及度不高。相对而言,技术成熟且普及度高的流式细胞术拥有更为广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] Zeng W, Guo L, Xu S, et al. High-throughput Screening Technology in Industrial Biotechnology[J]. Trends in Biotechnology, 2020, 38 (8): 888-906.
- [2] Elhajouji A, Stadelmann P. Micronucleus Analysis by Flow Cytometry[M].//Dhawan A, Bajpayee M. Genotoxicity Assessment. Methods in Molecular Biology. New York: Humana, 2019.
- [3] 国家食品药品监督管理总局. 药物遗传毒性研究技术指导原则[S]. 2018.
- [4] 刘仕杰, 方展强. 流式细胞仪筛选环磷酰胺诱导骨髓嗜多染红细胞微核的技术方法[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25 (3): 53-59.
- [5] 曾珠. 流式细胞术在啮齿动物微核试验中的应用[J]. 卫生研究, 2019, 48 (4): 689-692.
- [6] 周长慧, 常艳, 王征, 等. 流式细胞术在微核实验中的应用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2010, 24 (6): 548-551.
- [7] Chen Y, Huo J, Liu Y, et al. Development of a Novel Flow Cytometry-based Approach for Reticulocytes Micronucleus Test in Rat Peripheral Blood[J]. Journal of Applied Toxicology, 2021, 41 (4): 595-606.
- [8] Bowen DE, Whitwell JH, Lillford L, et al. Evaluation of a Multi-endpoint Assay in Rats, Combining the Bone-marrow Micronucleus Test, The Comet Assay and the Flow-cytometric Peripheral Blood Micronucleus Test[J]. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2011, 722 (1): 7-19.
- [9] Chang Y, Zhou C, Huang F, et al. Inter-laboratory Validation of the In-vivo Flow Cytometric Micronucleus Analysis Method (MicroFlow[®]) in China[J]. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen, 2014, 772: 6-13.
- [10] 文海若, 任璐, 罗飞亚, 等. 比较细胞松弛素A与B在胞质分裂阻断法微核试验中的应用[J]. 中国医药生物技术, 2019, 14 (2): 115-120.
- [11] N ü sse M, Kramer J. Flow Cytometric Analysis of Micronuclei Found in Cells After Irradiation[J]. Cytometry, 1984, 5 (1): 20-25.
- [12] Bryce SM, Bemis JC, Avlasevich SL, 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.
- [13] 欧红梅, 涂宏刚, 周长慧, 等. 流式细胞术在体外微核分析中的应用进展[J]. 中国新药杂志, 2014, 23 (4): 427-431.
- [14] Avlasevich S, Bryce S, De Boeck M, et al. Flow Cytometric Analysis of Micronuclei in Mammalian Cell Cultures: Past, Present and Future[J]. Mutagenesis, 2011, 26 (1): 147-152.
- [15] Bryce SM, Avlasevich SL, Bemis JC, et al. Interlaboratory Evaluation of A Flow Cytometric, High Content In Vitro Micronucleus Assay[J]. Mutat Res, 2008, 650 (2): 181-195.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Bryce SM, Bemis JC, Dertinger D. In Vivo Mutation Assay Based on the Endogenous *Pig-A* Locus[J]. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2008, 49 (4): 256-264.
- [19] Dertinger SD, Bryce SM, 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.
- [20] Shemansky JM, McDaniel LP, Klimas C, et al. *Pig-a* Gene Mutation Database[J]. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2019, 60 (8): 759-762.
- [21] Dertinger SD, Bhalli JA, Roberts DJ, et al. Recommendations for Conducting the Rodent Erythrocyte *Pig-a* Assay: A Report from the HESI GTTC *Pig-a* Workgroup[J]. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2021, 62 (3): 227-237.
- [22] Krüger CT, Hofmann M, Hartwig A. The In Vitro *PIG-A* Gene Mutation Assay: Mutagenicity Testing Via Flow Cytometry Based on the Glycosylphosphatidylinositol (GPI) Status of TK6 Cells[J]. Archives of Toxicology, 2015, 89 (12): 2429-2443.
- [23] 王亚楠, 文海若, 王雪. 遗传毒性基因突变评价方法的研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2019, 31 (5): 406-411.
- [24] David R, Talbot E, Allen B, et al. The Development of An in Vitro *Pig-a* Assay in L5178Y Cells[J]. Archives of Toxicology, 2018, 92 (4): 1609-1623.
- [25] 王亚楠, 王雪, 文海若. 基于L5178Y细胞的*Pig-a*基因突变试验方法学研究[J]. 药物分析杂志, 2021, 41 (1): 89-96.
- [26] Tian X, Chen Y, Nakamura J. Development of a Novel *PIG-A* Gene Mutation Assay Based on a GPI-anchored Fluorescent Protein Sensor[J]. Genes Environ, 2019, 41: 21-21.
- [27] 黄鹏程, 周长慧, 常艳. 基于 γ -H2AX生物标志物DNA遗传毒性检测方法的研究进展[J]. 中国新药杂志, 2016, 25 (4): 418-424.
- [28] Kopp B, Khoury L, Audebert M. Validation of the γ H2AX Biomarker for Genotoxicity Assessment: A Review[J]. Archives of Toxicology, 2019, 93 (8): 2103-2114.
- [29] 王丽娜, 罗志, 张立. DNA损伤及其标志物 γ -H2AX检测的研究进展[J]. 分析实验室, 2020, 39 (10): 1131-1136.
- [30] Nelson BC, Wright CW, Ibuki Y, et al. Emerging Metrology for High-throughput Nanomaterial Genotoxicology[J]. Mutagenesis, 2017, 32 (1): 215-232.
- [31] 黄鹏程, 周长慧, 李申宁, 等. 基于流式细胞术的组蛋白 γ -H2AX磷酸化检测方法的建立[J]. 癌变·畸变·突变, 2017, 29 (4): 284-288.
- [32] 文海若, 任璐, 王瑜, 等. 比较碱性彗星试验与 γ -H2AX法评价甲醛诱导的DNA交联[J]. 中国医药生物技术, 2019, 14 (1): 89-93.
- [33] Bryce SM, Bernacki DT, Bemis JC, et al. Genotoxic Mode of Action Predictions from a Multiplexed Flow Cytometric Assay and a Machine Learning Approach[J]. Environmental and Molecular Mutagenesis, 2016, 57 (3): 171-189.
- [34] Rodrigues MA, Probst CE, Zayats A, et al. The In Vitro Micronucleus Assay Using Imaging Flow Cytometry and Deep Learning[J]. NPJ Syst Biol Appl, 2021, 7 (1): 20.

(收稿日期 2022年1月5日 编辑 李亚徽)