

· 研究进展 ·

符合中药特点的致癌风险评价方法

文海若^{1#}, 闫明^{1,2#}, 宋捷¹, 鄂蕊¹, 耿兴超¹, 胡燕平^{1*}, 王雪^{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. 中国药科大学, 南京 210009)

摘要: 如何对中药的致癌性风险作出科学而合理的评价是毒理学研究的难点之一。因中药成分和配伍的复杂性, 现有的常规遗传毒性评价方法在评价中药方面有所局限。在原有试验原理基础上开发高通量筛选方法, 以及利用新型生物标志物和基于新原理的试验技术已在中药毒性预测和评价领域显露一定的应用价值。本文聚焦适合大量成分毒性筛选及靶器官毒性评价的试验方法, 包括改良的传统试验方法、自动化检测手段、生物标志物、三维组织培养技术和计算机毒理学的引入等, 为中药致癌性评价提供借鉴思路。

关键词: 中药; 致癌性; 评价方法; 高通量; 构效分析

中图分类号: R991 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2020)07-0829-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2020.07.016

Cancer Risk Assessment Methods in Accordance with the Characteristics of Traditional Chinese Medicine

Wen Hairuo^{1#}, Yan Ming^{1,2#}, Song Jie¹, Ao Rui¹, Geng Xingchao¹, Hu Yanping^{1*}, Wang Xue^{1*} (1. National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of Beijing for Nonclinical Safety Evaluation Research of Drugs, Beijing 100176, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

Abstract: To make a scientific and reasonable assessment for the carcinogenic risk of traditional Chinese medicine (TCM) is one of the challenges in toxicology evaluation. However, conventional genotoxicity evaluation methods are limited in the evaluation of TCMs due to the complexity and the compatibility of their components. The development of high throughput screening method based on the original principles and the use of new biomarkers and techniques based on novel principles have shown certain application value in the fields of toxicity prediction and evaluation of TCMs. This article focuses on the test methods that are feasible for the toxicity screening of a large number of components and the target organ toxicity evaluation, including improved traditional test methods, automated detection methods, the introduction of biomarkers, three-dimensional tissue culture techniques and computer toxicology, etc., which shall provide references for the carcinogenicity evaluation of TCMs.

Keywords: traditional Chinese medicine; carcinogenicity; evaluation methodology; high throughput; structure-activity analysis

基金项目: 国家自然科学基金(编号 81503068), 国家“重大新药创制”科技重大专项(编号 2018ZX09201017-001)

作者简介: 文海若; 研究方向: 遗传毒理; E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

共同第一作者: 闫明; 研究方向: 遗传毒理; Email: yanming0120@sina.com

通信作者: 王雪; 研究方向: 遗传毒理; E-mail: xue_wang@nifdc.org.cn

胡燕平; 研究方向: 遗传毒理; E-mail: huer64@126.com

中药是我国文化的瑰宝和民族智慧实践的结晶,我国中药产业近10年来持续高速发展,预计2020年市场规模将达5806亿元^[1]。中药、天然药物经常作为保健品或药品用于调理机体状态或治疗慢性疾病而长期服用,但其成分复杂,许多成分毒性作用不明确,安全性尤其是长期使用引发的致癌性风险日益受到重视。近年来,存在致癌风险的中药及天然药物不乏报道并不断引发“余震”。如含有马兜铃酸的马兜铃属植物作为中药材曾广泛用于关节炎、痛风和炎症的治疗。含有马兜铃属植物的中草药和马兜铃酸分别于2000年和2008年被世界卫生组织国际癌症研究中心认为具有人类致癌性^[2]。两者均被列为I类致癌物,且Ames试验、姊妹染色体交换试验、染色体畸变试验及彗星试验等多项遗传毒性研究结果均呈阳性。有研究证实马兜铃酸的致癌机制主要与其活性代谢产物与腺嘌呤结合后形成DNA加合物,后者可进一步导致碱基置换型突变^[3]。自2004年起,我国监管部门已加强对马兜铃、寻骨风、天仙藤等含马兜铃酸的中药制剂的管理^[4]。2017年发表于《科学·转化医学》(Science Translational Medicine)杂志的题为《马兜铃酸及其衍生物与中国台湾和整个亚洲的肝癌广泛相关》(Aristolochic Acids and Their Derivatives are Widely Implicated in Liver Cancers in Taiwan and Throughout Asia)的文章再次引起社会热议,服用马兜铃酸是否与中国肝癌发病率有关受到民众高度关注。随后,2019年的一项研究中发现小鼠肝癌发生率与马兜铃酸的剂量存在正相关^[5]。

1 中药致癌性评价存在的问题

马兜铃酸事件凸显民众对中药致癌性风险的高度重视。然而,这不过是众多品类有毒中药的冰山一角,明确存在遗传毒性/致癌性的中药成分还包括槟榔、羌活、汉防己甲素、细辛等。而大量既是药物又是食品的中药,如决明子、何首乌、熟大黄、夏枯草等,也含有存在遗传毒性风险的成分。这些药食同源的物质的食用安全与百姓生活息息相关,需高度关注。此外,不同炮制及配伍方法对中药毒性有所影响,经不同方法炮制的中药成分和不同配伍的中药混合物的遗传毒性/致癌性如何并不明确。充分了解中药成分毒性,可有效避免药物在上市后出现严重中毒事故,因此,当前亟需加强中药的致癌性风险研究。

药物遗传毒性评价的主要目的是对受试物的潜在致癌性风险进行预测。根据《药品注册管理办法》(国家药品监督管理局令第28号)规定,处方中含有无法定标准的药材或源于无法定标准药材的有效部位,以及用于育龄人群可能对生殖系统产生影响的中药和天然药在新药申报时必须递交遗传毒性研究资料^[6]。然而现有常规遗传毒性评价方法在评价中药方面有所局限。除盐酸小檗碱外,几乎所有中药成药均为混合物,成分复杂,对结果评判产生严重影响。如待检样本中含有组氨酸成分,可造成细菌回复性突变异常增加,对Ames试验结果产生严重干扰。而大多数中药颜色较深,可造成菌落计数困难。此外,中药通常溶解度较低,体内研究时给药剂量难以达到指导原则要求;而部分中药经肝脏代谢后产生明显毒性,以骨髓为靶组织的体内微核和染色体畸变试验或难以充分评价其毒性^[7]。此外,中药成分复杂,相互干扰,毒性物质尚不明确。如有研究提示大黄经清蒸和醋蒸处理后Ames试验和彗星试验结果均降为阴性,而清炒和醋炒后对大黄的减毒效果不明显^[8]。因此,对中药组方的具体成分进行确认以及对其配伍方式的筛选十分重要。然而传统的遗传毒理学试验使用人工计数完成、需要消耗大量试剂和细胞或菌株且耗时较长,开展如此大量的筛选工作较为困难,并不适用于中药遗传毒性的早期快速筛选。从中药研发和质量控制的角度而言,中药毒性成分筛选工作浩繁,亟需开发适合中药遗传毒性的高通量筛选评价方法。

当前的遗传毒性方法学优化主要通过结合微孔法、分子生物学和荧光成像等技术,在实现成本最低化的同时,保证结果的准确率并提高工作效率。以高通量评价方法进行毒性筛选将成为中药成分开发及预测的未来发展趋势。此外,通过化学基团对单体结构毒性进行预测,从而确立毒理学相关阈值(Threshold of Toxicological Concern, TTC)或可成为复杂中药成分控制的新模式。本文将着重介绍适用于中药遗传毒性/致癌性评价的研究方法,也为其它复杂成分的药物毒性评价提供借鉴思路。

2 基因突变评价方法的高通量化

当前已有研究证实基因突变是肿瘤与癌症发生的重要分子基础,在2018年国家食品药品监督管理总局颁布的《药物遗传毒性研究技术指导原则》^[9]中,以基因为检测终点的细菌回复性突变(Ames

Test) 和小鼠淋巴瘤 *tk* 基因突变试验 (Mouse Lymphoma Assay, MLA) 仍是药物遗传毒性评价标准试验组合的重要组成部分。然而, 传统方法在中药评价中存在不足之处。如, 大部分中药受试物为混合物, 检测样本中可能含有色氨酸或组氨酸, 对 Ames 试验结果产生影响。又如, 部分中药成分颜色较深, 可对琼脂及菌落染色, 从而对计数结果的准确性产生一定影响。随着近年来分子生物技术的革新, 新型基因突变检测方法也陆续步入评价领域, 使高通量基因突变评价成为可能。高通量筛选 (High Throughput Screening) 技术即针对一种或多种毒性作用终点同时评价多种化合物毒性风险的试验方法, 通常会引入新的试验体系或应用新兴生物标志物。例如, 使用微孔板开展的 Ames 试验, 如 mini-Ames (6孔板) 和 micro-Ames (24孔板) 的试验在不改变原先试验体系的前提下尽可能减少受试物的用量, 前者与标准平皿 Ames 试验结果的一致性可达 95%^[10]。此外, 基于 96孔板和 384孔板液态培养及显色的“Ames波动试验”和 Ames II 也有一定应用。该方法利用菌落大量生长时改变培养基 pH 值, 从而可通过显色剂识别是否存在大量菌落突变, 省去了平板制作和菌落计数等步骤, 可用于药物早期筛选。Kamber 等比较 71 种化合物研究数据发现, Ames II 与标准平皿 Ames 试验的评价结果一致性高达 84%^[11]。课题组使用鼠伤寒沙门氏菌 TA98 及 TA100 开展 Ames 波动试验发现大黄素及芫花素均可诱导 TA100 的回复突变率升高^[12]。

X 染色体上的 *Pig-a* 基因完整情况与红细胞表面多种锚链蛋白 (CD48、CD55、CD59 等) 的表达密不可分。故可以利用荧光抗体识别及流式细胞分类的方式检测是否存在基因突变。使用正常动物外周血开展的体内 *Pig-a* 基因突变试验, 已应用于药物安全性评价, 因可与多种体内毒性评价研究结合开展, 获得更多的与致癌性及毒性有关的数据, 在今后具有较高的应用价值。实验室间联合验证就 41 项化合物的大鼠体内 *Pig-a* 基因突变试验结果进行比较, 证明其灵敏性和特异性俱佳^[13]。然而体内 *Pig-a* 试验的时间成本及动物使用使其难以成为大量药物筛选的优先选项。近年来, 国内外多家实验室纷纷使用哺乳动物细胞系开展的体外 *Pig-a* 基因突变试验, 作为 Ames 试验结果不明确时的后续选择^[14-16]。不同细胞系的选择与自发突变率有关。如,

TK6 细胞本身存在 *Pig-l* 基因的缺失, 其 GPI (-) 自发突变率背景值远高于 L5178Y 细胞^[15-16]。当前体外 *Pig-a* 试验尚无标准化评价方法, 在其正式纳入常规遗传毒性试验组合之前, 大量验证工作尚待完成。

3 染色体及 DNA 损伤评价的优化

体内及体外微核试验是深受研究者喜爱的一类评价方法, 已在遗传毒性检测领域得到广泛应用^[17]。该研究利用细胞分裂过程中形成的独立于主核的染色单体或染色体断片 (即微核) 来评估受试物的潜在致染色体损伤能力, 微核形成率可用于对受试物的潜在致癌风险作预测。而如何从传统阅片中解放出来, 实现高通量自动化检测, 是中药遗传毒性筛选方法开发的关注点。当前, 基于流式细胞术的外周血微核试验已在我国完成实验室间联合验证并列于新版《药物遗传毒性研究技术指导原则》^[9], Litron 实验室继而开发体外流式微核试验盒用于大规模毒性筛查。上述自动化的检测技术与人工阅片结果比对后认为相关性良好^[18-19]。

因微核试验不受核型限制, 可使用多种来源的细胞系开展针对微核、核芽、核质桥等多种与染色体损伤有关的生物标志物的体外微核细胞组研究^[20]。体内评价时更可就肝、肾等毒性作用靶点开展微核试验, 就代谢产物毒性进行深入分析^[21]。

体内代谢对毒性的影响是中药毒性研究的关注点之一。随着组织工程技术的迅猛发展, 三维 (Three-dimension, 3D) 肝细胞多细胞聚球体模型构建已较为成熟。3D 组织模型可实现长期给药, 并在 2 周内保持较高的白蛋白分泌水平和肝药酶活性, 其毒性评价结果较二维培养体系与体内结果更为接近。如使用 3D HepaRG 细胞培养模型开展彗星试验评价何首乌醇提物的毒性, 结果发现何首乌醇提物的致 DNA 损伤风险经 3D 肝培养模型培养后有所减弱, 可能与细胞的二相代谢有关^[22]。

4 遗传毒性评价生物标志物的应用

生物标志物一直以来是毒性早期预测及筛选的开发重点。旨在开发高通量替代方法的美国联邦政府主导的 21 世纪毒理学计划 (Toxicology in the 21st Century, Tox21), 已利用多种与 DNA 损伤有关的基因及报告基因建立多种新型遗传毒性评价方法, 并取得重大进展。作为第一个被发现的 p53 调控的基因, GADD45a 基因在调控细胞周期及 DNA 的

修复损伤、细胞凋亡方面起着至关重要的作用^[23]。GADD45a基因的表达与绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)的表达密切相关。该方法通过检测GFP的荧光强度反映GADD45a基因的表达从而评价受试物的细胞毒性和遗传毒性。Louise Birrell等采用GreenScreen HC检测方法评价62种化合物的潜在致癌性,其结果与文献报道符合率超九成^[24]。课题组前期开展GreenScreen HC试验发现芫花素浓度为62.5 μM时细胞表达的GADD45a-GFP荧光强度超过阈值,存在遗传毒性风险^[12]。近年来,跃入人们眼帘的高通量遗传毒性检测体系层出不穷。如表达量受DNA损伤调控的ATAD5蛋白已成为热门的遗传毒性生物标志物,已有研究构建ATAD5荧光酶报告基因对4000余种化合物的细胞毒性及DNA损伤风险进行评估^[25]。又如,构建缺乏DNA修复蛋白REV3或Ku70/RAD54的鸡淋巴瘤DT40细胞DNA损伤修复高通量评价平台^[26]。该方法利用其细胞周期短且无G1/S期的特点,提高检测结果的敏感性,现已通过Tox21项目对上万种化合物完成筛选。此外,DNA双链断裂的生物标志物γ-H2AX,可通过免疫荧光技术标记后在荧光显微镜下或流式细胞术评价DNA损伤程度^[27]。Litron实验室已制备结合γ-H2AX、p53基因及多聚ADP-核糖聚合酶(Poly ADP-ribose Polymerase, PARP)等多种与细胞增殖、凋亡相关的生物标志物的试剂盒,并使用84种化合物初步验证其灵敏性和一致性超过90%^[28]。课题组首次将标记γ-H2AX应用于DNA交联效应亦获成功^[29]。

5 非遗传毒性致癌性高通量筛选

非遗传毒性致癌性的检测长期以来是致癌性预测的盲点。相当多的非遗传毒性化学物质在长期动物试验中显示出致癌,却在致突变和DNA损伤试验中呈阴性结果,从而无法通过常规的遗传毒性试验检出其致癌性。而体内致癌试验周期长且需消耗大量人力物力,开展体外细胞转化试验(Cell Transformation Assay, CTA)是目前最佳的体外致癌模型替代方案。该方法已用于农药、兽药、环境污染、化妆品等的检测^[30-31],在区分遗传毒性或非遗传毒性致癌物、解释体外遗传毒性结果、研究受试物在肿瘤的启动阶段和促进阶段的作用机制等方面独具优势。Berwald和Sachs^[32]于1963年首次使用叙利亚地鼠胚胎细胞(Syria Hamster Embryo

Cell, SHE)建立CTA试验模型,随后Aaronson和Todaro^[33]于1968年在此基础上使用小鼠胚胎细胞建立体外的小鼠细胞转化试验,后者以转化灶的形成数量作为细胞转化检测终点。人源CTA被认为是检测人类致癌物的最优选择,但因受细胞来源问题未能广泛开展。

自1974年Lasne等首次将肿瘤的多阶段理论应用于体外细胞转化试验后,Sasaki等在BALB/c 3T3细胞转化试验的基础上进一步提出了两阶段转化试验模型,实现同一试验体系内同时检出遗传毒性致癌物和非遗传毒性致癌物^[34]。欧洲替代方法验证中心(ECVAM)在2012年推荐了以BALB/c 3T3(clone A31-1-1)为基础的两阶段细胞转化试验方法的标准化方法^[35]。基于Bhas 42细胞的两阶段细胞转化试验作为新兴的一种致癌物体外检测手段,可高度模拟动物体内肿瘤发生发展的过程,具有灵敏度高、试验周期短、转化率高等优点^[36-37]。CTA对于尚未实施致癌试验的化合物或常规遗传毒性试验方法不适用的化合物的早期致癌性预测方面有重大意义。如我中心已使用双氧水法优化Bhas 42 CTA实现高通量法读孔,并用于评价木黄酮的非遗传毒性致癌性风险^[37]。其最重大的价值是对非遗传毒性致癌物进行鉴别,并提供低剂量条件下化合物的遗传毒性作用机制,以验证阈值下遗传毒性化合物的特征。目前Bhas 42细胞转化试验作为最有前景的体内致癌试验替代方法,尚未在国内普及。该试验方法对细胞状态、操作时间点均有严格限定,非常有必要在推广的同时进行试验方法的标准化,并利用多种已知阳性剂和无致癌性物质(盲法)对试验方法进行规范化,积累试验背景数据,验证试验体系的可靠性。此外,因体外模型缺乏体内代谢活化系统,易于产生假阳性或假阴性结果。为更好模拟体内药物代谢及作用条件,可在标准化高通量试验方法的基础上对给药及培养方式进行优化。

6 计算机毒理学在中药遗传毒性预测中的应用

计算机毒理学已成为海量化合物毒性预测的首选方法,并应用于杂质的遗传毒性评价。中药同样存在单体化合物众多,而毒性研究资料匮乏的情况。当前已提出中草药单体成分可参照杂质的评价模式,通过母核及基团结构关系,利用已知毒性数

据库预测其毒性风险的评价思路^[38]。国内已有中药化学成分数据库包括中科院上海有机化学研究所的物质毒性数据库、中科院过程工程研究所的中药化学数据库及中国中医科学院的中国中药化学成分数据库。然而上述数据库多为化学性质信息,毒理学数据寥寥。国外数据库,如以研究数据为基础的毒性预测软件Derek Nexus (Version 6.0.1, Lhasa Limited, UK)则主要收录国外文献报道数据,而二萜类等明确肝肾毒性的中药单体无相关文献支持。

高雅等^[39]将近千种中草药根据化学结构分为糖苷类、醌类、苯丙素类、黄酮类、萜类、甾体类、生物碱类等,并以欧洲化学品管理局联合研究中心 (Joint Research Centre of European Chemicals Bureau) 开发的毒性预测平台Toxtree就其遗传毒

性和致癌风险进行预测,发现共有255种具有遗传毒性致癌性警示结构,141种含有非遗传毒性致癌性警示结构,四分之一含Ames试验阳性警示结构,四分之三含啮齿类动物微核试验警示结构(表1)。其中,苯丙素类、黄酮类、萜类、生物碱类及醌类多为Ames试验阳性警示结构;苯丙素类、黄酮类、生物碱和萜类则多有啮齿类动物微核试验阳性警示结构^[39]。可见,大量中药单体结构存在遗传毒性风险,但因研究数据匮乏导致某一类含有类似结构的化合物通常得到相同的预测结果,对细致结构差异的毒性差异缺乏区分,难以获得准确的预测结果。研究者应就某类含相同警示结构的单体开展系统的毒性研究,从而更为准确地推断结构与毒性之间的关联,为计算机毒性预测提供更准确且更有价值的信息。

表1 药物遗传毒性评价常用方法及高通量化情况

遗传毒性试验方法	分类	高通量	使用器材	OECD指导原则	我国应用情况
Ames 试验	标准平皿 Ames 试验	否	10 cm 平皿	TG471	GLP 安评
	微孔板 Ames 试验	否	6 孔板 /24 孔板	无	药物初筛
	波动 Ames 或 AmesII	是	96 孔板 /384 孔板	无	科研
MLA	/	是	96 孔板	TG490	GLP 安评
染色体畸变试验	哺乳动物细胞	否	玻片	TG473	GLP 安评
	骨髓细胞	否	玻片	TG475	GLP 安评
微核试验	骨髓	否	玻片	TG474	GLP 安评
	外周血	是	流式	TG474	GLP 安评
	永生化细胞	可以	玻片 / 流式 / 高内涵	TG487	GLP 安评
	肝细胞	否	玻片	无	科研
彗星试验	啮齿类动物	否	玻片	TG489	完成 III 阶段联合验证
	永生化细胞	否	玻片	TG489	科研
Pig-a 基因突变试验	外周血	是	流式	无	科研
	体外	是	流式	无	科研

7 小结

中药及天然药物致癌性/遗传毒性评价的难点主要在于其成分及配伍的复杂性,除有必要开展海量筛选外,部分成分对试验体系也存在一定干扰。在原有试验原理基础上开发高通量评价方法,以及利用新型生物标志物和基于新兴理论的试验技术对中药毒性进行预测和评价将成为可行的解决办法。如表1所示,当前大多常见药物遗传毒性评价方法可通过结合流式细胞术、免疫荧光技术或改变培养体系以及评价指标的方法实现高通量化,部分已初步应用于中药毒性的检测与研究。大量新兴的,尤其是以生物标志物检测为主的遗传毒性试验方法将成为未来中药遗传毒性评价主要应用趋势。这些方法均处于前期研究及推广阶段,有待大量验证,新方法致与致癌试验之间的关联度亦有待长期考察。计算机毒理学本应在中药毒性评价中发挥重要作用,但苦于数据短缺,预测效力不佳。故针对某类药物,进行系统而高通量的遗传毒性评价是今后中药遗传毒性研究工作的突破口,可为中药的评价方法及毒性数据库夯实基础。深入研究中药遗传毒性及其机制无疑将为中药宝库的开发、合理用药及质量控制做出重要贡献。本文聚焦梳理更适合大量成分毒性筛选及靶器官毒性评价的试验模型,为中药致癌性评价提供借鉴思路。

参考文献:

- [1] 盛世华研. 2019-2025年中国中药行业市场调查及发展趋势研究报告[EB/OL]. (2019-04-23) [2019-10-29]. <https://wenku.baidu.com/view/b7d5910882d049649b6648d7c1c708a1294a0a00.html>.
- [2] IARC. Some Traditional Herbal Medicines, Some Mycotoxins, Naphthalene and Styrene[J]. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 2002, 82: 1-556.
- [3] Schmeiser HH, Bieler CA, Wiessler M, et al. Detection of DNA Adducts Formed by Aristolochic Acid in Renal Tissue from Patients with Chinese Herbs Nephropathy[J]. Cancer Research, 1996, 56 (9): 2025-2028.
- [4] 国家食品药品监督管理总局. 国食药监注[2004]379号关于加强广防己等6种药材及其制剂监督管理的通知[EB/OL]. (2004-08-05) [2019-10-29]. <http://samr.cfda.gov.cn/WS01/CL0844/10242.html>.
- [5] Lu ZN, Luo Q, Zhao LN, et al. The Mutational Features of Aristolochic Acid - induced Mouse and Human Liver Cancers[J]. Hepatology, 2019: doi.org/10.1002/hep.30863.
- [6] 国家药品监督管理局. 局令第28号 药品注册管理办法[EB/OL]. (2007-07-10) [2019-10-29]. http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2174/300629_9.html.
- [7] 韩佳寅, 易艳, 梁爱华, 等. 中药遗传毒性研究思路和方法[J]. 中国中药杂志, 2015, (14): 20-24.
- [8] 花胜利, 肖热风, 赖怀恩. 不同炮制方法对大黄遗传毒性减毒效果的研究[J]. 亚太传统医药, 2014, 10 (11): 27-28.
- [9] 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[EB/OL]. (2018-03-15) [2020-05-22]. <http://www.nmpa.gov.cn/WS04/CL2182/300523.html>.
- [10] 许春花, 张秀萍, 许雪萍, 等. Mini-ames与Ames试验结果一致性比较[C]//2016年第六届全国药物毒理学会论文集, 2016: 262.
- [11] Kamber M, Fluckigerisler 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.
- [12] 文海若, 宋捷, 刘倩, 等. Ames波动试验和GADD45a-GFP GreenScreen两种快速筛选方法评价大黄素和芫花素的遗传毒性[J]. 药物评价研究, 2018, 41 (5): 32-39.
- [13] Gollapudi BB, Lynch AM, Heflich RH, et al. The in Vivo Pig-a Assay: A Report of the International Workshop On Genotoxicity Testing (IWGT) Workgroup[J]. Mutat Res, 2015, 783: 23-35.
- [14] 李若婉, 周长慧, 黄鹏程, 等. 基于TK6细胞的体外PIG-A基因突变检测方法的建立[J]. 癌变·畸变·突变, 2019, 31 (3): 242-248.
- [15] Kruger CT, Fischer BM, Armant O, et al. The in Vitro PIG-A Gene Mutation Assay: Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-related Genotype-to-phenotype Relationship in TK6[J]. Arch Toxicol, 2016, 90 (7): 1729-1736.
- [16] David R, Talbot E, Allen B, et al. The Development of an in Vitro Pig-a Assay in L5178Y Cells[J]. Arch Toxicol, 2018, 92 (4): 1609-1623.
- [17] 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.

- [18] 欧红梅, 周长慧, 涂宏刚, 等. 流式细胞术检测体外微核方法的建立[J]. 癌变·畸变·突变, 2015, 27(1): 39-43.
- [19] 孙立平, 李德志, 刘志谋, 等. 大鼠骨髓嗜多染红细胞微核的流式细胞仪自动化检测[J]. 癌变·畸变·突变, 2004, 16(3): 155-158.
- [20] 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.
- [21] 文海若, 宋捷, 陈高峰, 等. 体外与体内肝细胞微核检测方法研究[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(7): 787-793.
- [22] 颜玉静, 淡墨, 汪祺, 等. 基于2D和3D肝细胞模型的何首乌体外肝毒性评价[J]. 中国药物警戒, 2019, 16(7): 385-392.
- [23] Kastan MB, Zhan Q, Eldeiry WS, et al. A Mammalian Cell Cycle Checkpoint Pathway Utilizing p53 and GADD45 is Defective in Ataxia-telangiectasia[J]. Cell, 1992, 71(4): 587-597.
- [24] Birrell L, Cahill PC, Tate M, et al. GADD45a-GFP GreenScreen HC Assay Results for the ECVAM Recommended Lists of Genotoxic and Non-genotoxic Chemicals for Assessment of New Genotoxicity Tests[J]. Mutat Res, 2010, 695(1-2): 87-95.
- [25] Fox JT, Sakamuru S, Huang R, et al. High-throughput Genotoxicity Assay Identifies Antioxidants as Inducers of DNA Damage Response and Cell Death[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, 109(14): 5423-5428.
- [26] Yamamoto KN, Hirota K, Kono K, et al. Characterization of Environmental Chemicals with Potential for DNA Damage Using Isogenic DNA Repair-deficient Chicken DT40 Cell Lines[J]. Environ Mol Mutagen, 2011, 5(7): 547-561.
- [27] Watters GP, Smart J, Harvey JS, et al. H2AX Phosphorylation as A Genotoxicity Endpoint[J]. Mutat Res, 2009, 679(1-2): 50-58.
- [28] Bryce SM, Bernacki DT, Bemis JC, et al. Interlaboratory Evaluation of a Multiplexed High Information Content in Vitro Genotoxicity Assay[J]. Environ Mol Mutagen, 2017, 58(3): 146-161.
- [29] 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): 95-99.
- [30] 庞雅琴, 陈雯. 体外细胞转化试验研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2007, 19(6): 511-514.
- [31] 刘家仁, 庞永珣, 张尤恩, 等. 用细胞转化试验检测S江有机污染致癌危险性[J]. 癌变·畸变·突变, 1999, 11(4): 194-198.
- [32] Berwald Y, Sachs LEO. In Vitro Cell Transformation with Chemical Carcinogens[J]. Nature, 1963, 200(4912): 1182-1184.
- [33] Aaronson S A, Todaro G J. Basis for the Acquisition of Malignant Potential by Mouse Cells Cultivated in Vitro[J]. Science, 1968, 162(3857): 1024-1026.
- [34] Sasaki K, Umeda M, Sakai A, et al. Transformation Assay in Bhas 42 Cells: A Model Using Initiated Cells to Study Mechanisms of Carcinogenesis and Predict Carcinogenic Potential of Chemicals[J]. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2015, 33(1): 1-35.
- [35] ECVAM. EURL ECVAM Recommendation on the Cell Transformation Assay Based on the Bhas 42 Cell Line[EB/OL]. (2013-12-07) [2019-10-29]. <https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/eurl-ecvam-recommendation-on-the-cell-transformation-assay-based-on-the-bhas-42-cell-line>.
- [36] 王颖. Bhas 42细胞转化试验方法学及其应用研究[D]. 中国食品药品检定研究院, 2013.
- [37] 王颖, 蒲江, 齐乃松, 等. Bhas 42细胞转化试验高通量检测方法的建立及应用[J]. 癌变·畸变·突变, 2015, 27(4): 288-293.
- [38] 高雅, 姚碧云, 周宗灿. 中草药重要成分的QSAR预测毒性数据库的建立[J]. 毒理学杂志, 2015, 29(6): 5-7.
- [39] 高雅, 姚碧云, 周宗灿. 应用Toxtree平台预测中草药重要成分的致癌性和遗传毒性[J]. 毒理学杂志, 2016, 30(5): 329-333.

(收稿日期 2020年3月20日 编辑 王雅雯)