

文章编号:1004 - 616X(2002)04 - 0243 - 04

·方法与技术·

## 新药遗传毒性评价方法的研究现状和发展趋势

张天宝

(第二军医大学卫生毒理学教研室, 上海 200433)

**【摘要】**本文扼要比较了各国新药遗传毒性测试方案,介绍了目前新药遗传毒性测试方法的研究现状和今后有发展潜力的几种高通量筛选方法。

**【关键词】**药物; 安全性评价; 遗传毒性

中图分类号:R99

文献标识码:A

遗传毒性试验作为新药安全性评价的一个内容始于 70 年代后期,实施 20 多年来,对于保障人类健康、促进医药工业的发展无疑都发挥了重要作用。近十几年来随着相关领域特别是分子生物学的发展和人们对遗传毒性认识的深入,遗传毒性测试评价方法也正在经历巨大的变化。本文试图扼要概述目前该领域的研究动向,分析今后可能的发展趋势。

### 1 现行各国遗传毒性测试方案的比较

由于没有单独一个遗传毒性试验方法可检测所有的遗传毒性终点,因此,药物和其他化学物遗传毒性的评价大多采用组合试验的方法。现行各国制订的遗传毒性试验方案从选择的试验项目来看比较近似(见表 1),但具体方案有所不同<sup>1,2</sup>。

表 1. 一些国家遗传毒性试验的项目

试验项目	日本	欧共体	加拿大	中国
微生物回复突变试验	+	+	+	+
哺乳动物培养细胞染色体畸变试验	+	+	+	+
啮齿动物微核试验	+	+	+	+
体外真核细胞基因突变试验	+	-	±	

(+)必需做 (-)视情况而定 (-)未要求

日本的评价方案中,微生物回复突变试验既可采用沙门氏菌也可采用大肠杆菌致突变试验,而欧共体和中国都只规定了沙门氏菌致突变试验;欧共体和中国还提出了备选试验(哺乳动物细胞或酵母菌基因突变试验),而日本和加拿大则无。

英国的评价方案分 3 个阶段。第 1 阶段采用细

菌基因突变试验和体外细胞染色体畸变试验。如果该受试物接触人群广泛或持久而难以避免,同时如果有 1 个或 1 个以上试验呈阳性结果则进入第 2 阶段:加骨髓细胞遗传学试验。如果体外试验呈阳性而骨髓细胞遗传学试验结果为阴性,则需加体内试验,最常采用为体内-体外 UDS 试验。第 3 阶段重点评价对生殖细胞遗传毒性的危害。

美国 FDA 尽管未要求特殊的组合试验,但新药评审时仍需提供有关研究资料。据对美国 14 家主要药物公司的调查,其采用的试验项目情况见表 2<sup>2</sup>。

表 2. 美国 14 家制药公司采用的试验项目调查结果

试 验	公 司 数
微生物致突变	14
沙门氏菌	14
大肠杆菌	10
DNA 损伤修复	8
体外 UDS	7
碱性洗脱	1
哺乳动物细胞致突变	12
CHO hgp <sub>r</sub> t	7
V <sub>79</sub> hgp <sub>r</sub> t	2
小鼠淋巴瘤细胞 L5178 Y tk	3
CHO AS52 GPT	1
体外染色体畸变	13
CHO/V <sub>79</sub>	9
人淋巴细胞	4
大鼠淋巴细胞	2
体内染色体畸变	5
体内微核试验	10
体外 SCE	1
BALB/C 3T3 转化	1

收稿日期:2000-12-05; 修订日期:2002-07-23

作者简介:张天宝(1956-),男,浙江省浦江人,教授,博士,研究方向为分子毒理学。

德国采用的标准化组合试验包括 5 个试验,德国联邦药物和医疗设备研究所对 1990~1997 年期间登记的 335 种新药的遗传毒性测试结果见表<sup>3</sup>。

表 3. 德国 1990~1997 年 335 种新药遗传毒性测试结果

试验系统	受试药物数	阳性药物数	阳性率(%)
细菌回复突变试验	298	23	7.7
小鼠淋巴瘤细胞 tk 试验	104	28	26.9
hprt 试验	162	6	3.7
体外染色体畸变试验	266	77	28.9
体内骨髓细胞遗传学试验	283	19	6.7

另外,ICH(1997)提出标准组合试验<sup>3</sup>,即细菌基因突变试验(采用 Ames 试验或大肠杆菌回复突变试验),哺乳动物细胞(CHO,CHL 或 V<sub>79</sub>)体外染色体

损伤试验或小鼠淋巴瘤细胞 tk 试验和啮齿动物造血细胞体内染色体损伤试验(染色体畸变或微核试验)。其中供选择或已接受的哺乳动物细胞基因突变试验为 CHO 试验、V<sub>79</sub>/(HPR)试验、CHOAS52/GPT 试验、人体类淋巴细胞 tk 试验。

## 2 遗传毒性试验方法的研究现状

一个试验组合的基本要求是能对 DNA 损伤和损伤固定的危害性作出鉴定。问题是体外遗传毒性试验可能鉴定一种化合物的遗传毒性潜力,但不能鉴定真正的危害性。通过添加体内试验可能更接近遗传毒性危害性鉴定的目标。然而,采用极端高剂量和一次给药的体内细胞遗传学试验可能并不充分。为此,ICH 要求进行额外试验以确保危害性鉴定是充分可靠的。这些试验包括对 DNA 加合物、DNA 链断裂和 DNA 修复或重组的测定。然而,即使这些试验导致遗传毒性物质明确的鉴定,也不能对人的危险度进行定量,既不能评价高剂量效应外推到低剂量时的效应,也不能确定从实验动物外推到人危险度时的不肯定因素。现行常用试验方法的优缺点比较见表<sup>4</sup>。

表 4. 现行常用试验方法的优缺点

试验系统	优 点	缺 点
细菌回复突变	遗传毒性试验的“奠基石” 有效(相对快速的测试) 经济 所用菌株对某些特异类型突变敏感 已经几次修订并充分评价 已有大量测试结果的数据	不能检测哺乳动物细胞染色体断裂,即诱发染色体突变 有毒物质常常产生小菌落的本底,可能误认为阳性结果
小鼠淋巴瘤细胞试验	可检测基因和染色体突变 对啮齿动物致癌性有很高的预测性 对试验的特征已有充分认识 比体外染色体畸变试验更有效、更经济	需仔细依附一个特定的方案 比细菌回复突变试验昂贵和耗时 只能间接的评价染色体畸变
体外染色体畸变	可直接直观的观察染色体事件,得到有关细胞周期效应的信息 与小鼠淋巴瘤细胞试验比较,其与某些实验室的专家评价结果更一致	需专门的知识 较小鼠淋巴瘤细胞试验主观 如果未在暴露受试物后的适当时间采集细胞可能得到假阴性结果
体内染色体畸变	可直接直观的观察染色体事件,得到有关细胞周期效应的信息 历史上第一个发展起来的遗传毒理学试验 可得到有关体内代谢效应的信息	需特殊的专门知识 较微核试验主观 较微核试验昂贵和耗时 采样时间对确保可靠结果非常关键
微核试验	比体内染色体畸变试验更快捷、价廉,较少主观性与体内染色体畸变试验相比需更少的专门知识 可得到有关体内代谢效应的信息	不能像体外染色体畸变试验那样直观地反映染色体的所有效应 仅有较少的细胞周期效应信息

对遗传毒性危险度评价来说,研究潜在致突变剂对生殖细胞的效应是必需的。但目前试验方案中均未包括此类试验,主要是现有试验方法太复杂、费力、费钱。如小鼠特异位点试验,每次试验需数千只动物,一般实验室难以实施。

近年来,遗传毒性试验的方法学研究主要从两方面着手。

2.1 现行试验方法的标准化 对现行试验方法进行评价、修订,加以完善,特别在标准化方面,如对微核试验、生殖细胞突变试验、Ames 试验、染色体畸变试验等开展国际性或区域性(如欧共体)协作研究,以评价实验室间和实验室内的误差,规范操作程序。国际环境诱变剂学会组织专家分别于 1993 和 1999 年召开遗传毒性实验程序国际研讨会,对常用毒性实验方法进行了两次较全面的修订<sup>6,7</sup>。一些机构对试验指南进行了修订,如 OECD 推荐的 Ames 试验的菌株为 TA1535、TA1537 或 TA97a、TA98、TA100、大肠杆菌 WP2uvA 或 WP2uvA (p KM101) TA102; 鉴于 Gen-Tox 评述了 600 余种化学物的 L5178 Y 小鼠淋巴瘤细胞突变试验结果,发现对啮齿动物致癌性化学物的预测性超过 90%, OECD 和 ICH 等机构将小鼠淋巴瘤细胞突变试验列入其指南中<sup>4,5</sup>。

2.2 建立了某些新的试验方法 近几年发展了许多新方法<sup>6~14</sup>: 体内或体外的单细胞凝胶电泳试验(彗星试验),可检测不同细胞(如皮肤角质细胞、鼻呼吸和嗅觉细胞、精母细胞和卵母细胞等)少量细胞的 DNA 链断裂,方法快速简便。荧光原位杂交(FISH)和引物原位 DNA 合成法(PRINS),可检测特异染色体、着丝粒和端粒以及感兴趣的某个区段的染色体畸变,包括易位、数目异常。FISH 技术可用于检测生殖细胞的非整倍体。今后彗星试验和 FISH 技术通过特异的 DNA 探针可联合用于检测选择性序列、区段和染色体的 DNA 损伤。反向限制位点突变(iRSM)分析试验,该方法是基于致突变作用可使一个突变位点转化成另一限制性位点,从而通过检测某些由于 DNA 序列改变导致产生新的限制性酶位点而快速筛选遗传毒性。转基因动物突变检测系统,可在整体状态下检测基因突变,比较不同组织(包括生殖腺)的突变率,确定靶器官,对诱发的遗传改变作精确分析等。不同基因的转基因小鼠和 Knockout 小鼠的应用也为阐明致突变和致癌的分子机制提供了可能。这些方法的一个重要优点是灵敏度高,可观察低剂量下的遗传毒性,从而更符合人体的实际情

况。转基因细胞试验系统,将代谢酶基因转入哺乳动物细胞,如 MCL 细胞系表达 5 种主要类型的 cyp450 酶,可用于测试基因突变、微核等遗传毒性终点;GPTAS52 哺乳动物致突变系统,包括了细菌的 GPT 基因,可用于测试基因突变。转基因细菌,将 N-乙酰转移酶、硝基还原酶、细胞色素 p450 等参与致突变物活化的基因导入细菌或酵母致突变实验菌株,构成细菌或酵母突变测试系统。特别是导入人体的代谢酶基因模拟人体的代谢情况。

上述新方法吸收了分子生物学等相关学科的理论和技术,与原实验方法相比有明显的长处,特别是在遗传毒性机制研究上。但这些新方法要纳入药物安全性评价还需进一步做验证实验。

### 3 发展趋势

随着新药研究方法学与技术的飞速发展,今后药物设计者与毒理学家的关系将更加密切,毒理学将更早阶段的介入新药研制过程中。由于往往可能要求毒理学家对候选药物的毒性作出快速的判断,甚至是对成批药物进行筛选鉴定,因此,今后的一个主要发展趋势是发展高通量的测试方法(high throughput testing)。下面简要介绍有发展潜力的主要方法。

3.1 新的 Ames 试验(Ames 试验)<sup>17</sup> 1994 年 Ames 建立了一套 6 个鼠伤寒沙门氏菌株(TA7001—TA7006),可鉴定 6 种碱基对置换突变,每一菌株携带一专一的组氨酸生物合成操纵子的错义突变。除组氨酸突变外,这些菌株还携带了不同的可增强靶组氨酸突变的附加特性,包括具有 SOS 可诱导的 *mur-cAB* 系统的 R 因子 p KM101、*uvrB* 切除修复组分的缺失、*rfa* 突变。这些菌株的自发回变率相当低(约 10 个回复突变子/皿),检测各种致突变物的敏感性相当于 TA100、TA102 和 TA104 菌株。试验在 96 或 384 微孔玻板上进行,在培养基中加入 pH 指示剂。当回复突变的菌株生长时,培养基 pH 改变,pH 指示剂由红变黄,通过分光光度计测定。该试验在不需序列分析情况下即可鉴定突变谱。

3.2 哺乳动物细胞的高通量测试 已有几种手段可筛选哺乳动物细胞的 DNA 损伤。

3.2.1 ML-1 人骨髓白血病细胞系统<sup>18</sup> 已知哺乳动物 DNA 损伤可诱导与细胞生长停滞和凋亡有关的基因。抑癌基因 p53 和凋亡抑制基因 bcl-2 两者之间可调节显性癌基因的效应(功能拮抗)。显性癌基因对抗性或敏感性的效应取决于 p53 和 bcl-2 两者之

间的平衡,而 DNA 损伤的后果是 p53 表达激活和 bcl-2 表达失活,从而引起细胞生长的停滞和凋亡的诱发。ML-1 人骨髓白血病细胞暴露于 DNA 损伤剂可诱导各种基因表达产物的剧烈改变,包括 p53 (野生型)、mcl1 (涉及细胞分化的 bcl-2 家族基因)、G1 细胞期生长阻滞 (p53 突变的后果)、DNA 损伤可诱导基因 (如 GADP45) 表达增加,也可导致 bcl-2 (抗凋亡基因) 表达降低。这些改变通常作为早期事件出现,如 mcl1 mRNA 水平在暴露于 DNA 损伤剂 4 h 内就迅速增加,但持续短暂,在 24 h 内又恢复到基线水平。

3.2.2 遗传报告基因检测法<sup>19</sup> 利用细胞对 DNA 损伤剂反应的转录原理可以用于 DNA 损伤的检测。通常以融合基因的应用为基础,以报告基因的表达改变为终点,分析受试物对相关基因表达的诱导作用。转染的融合基因通常由外源性化学物反应性蛋白的结合部位或增强子序列、启动子序列以及指导报告分子合成的序列 (报告基因的编码区) 相连而成。将嵌合的报告基因构建体导入适当细胞后,用受试物处理,通过测定细胞或培养液中报告基因的表达水平或活性作出评价。如有两种 CAT 实验,采用人结肠癌的细胞系 (RKO) DNA 损伤实验和人肝细胞系 (Hep G2) 的细胞应激实验。也可将报告基因导入细菌构成测试系统,如将荧光酶基因 (Lux gene) 引入 TA98 和 TA100 菌株中,使两菌株获得发光性状,可用发光强度反映回复突变的细菌数。

3.2.3 基因芯片技术<sup>20</sup> 该技术可以用于细胞、细菌、动物和人体组织测试,既可测试基因表达的改变,也可检测基因突变。它不仅准确地确定突变位点和突变类型,更重要的是它的快速高效是目前其他方法所无法比拟的,它可以同时检测多个基因乃至整个基因组的所有突变,是传统的突变检测技术的一大突破。此外,利用 96 孔板的高通量慧星试验和利用胚胎干细胞的体外模型系统检测遗传毒性 (点突变、染色体畸变和 SCE 等) 等方法也有巨大的发展潜力。

参考文献:

1 袁伯俊,王治乔. 新药临床前安全性评价与实践 M. 北京:军事医学科学出版社,1997. 63 ~ 77.  
 2 Derelanko MJ, Hollinger MA. CRC Handbook of Toxicology M. Boca Raton: CRC Press, 1997, 337 ~ 355.  
 3 Muller L, Kikuchi Y, Probst G, et al. ICH Harmonised guidances

on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact J. *Mutat Res*, 1999, 436: 195 ~ 225.  
 4 Mitchell AD. *In vitro* genetic testing, in: *In Vitro Toxicology M*. Second ed. Edited by Gad SC, New York: Taylor and Francis, 2000. 94 ~ 127.  
 5 Storer RD, Kraynak AR, Mckelvey TW, et al. The mouse lymphoma L5178 Y TK/ TK cell line is heterozygous for a codon 170 mutation in the p53 tumor suppressor gene J. *Environ Mol Mutagen*, 1996, 27 (S27): 66.  
 6 Galloway SM. Report of the international workshop on standardization of genotoxicity test procedures J. *Mutat Res*, 1994, 312 (3): 195 ~ 318.  
 7 Kirkland DJ. The international workshop on genotoxicity test procedures J. *Environ Mol Mutagen*, 2000, 35 (3): 159 ~ 263.  
 8 Dearfield KL, Benz RD. Can the new genetic toxicology tests be used for regulatory safety decisions? J. *Environ Mol Mutagen*, 1999, 33: 91 ~ 93.  
 9 Kramer PJ. Genetic toxicology J. *J Pharm Pharmacol*, 1998, 50: 395 ~ 405.  
 10 Waterman MR, Jenkins CM, Pikuleva I. Genetically engineered bacterial cells and applications J. *Toxicol Lett*, 1995, 82/ 83: 807 ~ 813.  
 11 Pompon D, Perret A, Ballamine A, et al. Genetically engineered yeast cells and their applications J. *Toxicol Lett*, 1995, 82/ 83: 815 ~ 822.  
 12 Doehmer J, Schneider A, Fassbender M, et al. Genetically engineered mammalian cells and applications J. *Toxicol Lett*, 1995, 82/ 83: 823 ~ 827.  
 13 Gatt H, Bartsch I, Czich A, et al. *Salmonella* strains and mammalian cells genetically engineered for expression of sulfotransferases J. *Toxicol Lett*, 1995, 82/ 83: 829 ~ 834.  
 14 Elespuru RK. Future approaches to genetic toxicology risk assessment J. *Mutat Res*, 1996, 365: 191 ~ 204.  
 15 Guengerich FP, Gillam EMJ, Shimada T. New applications of bacterial systems to problems in toxicology J. *Crit Rev Toxicol*, 1996, 26 (5): 551 ~ 583.  
 16 Josephy PD, Gruz P, Nohmi T. Recent advances in the construction of bacterial genotoxicity assays J. *Mutat Res*, 1997, 386: 1 ~ 23.  
 17 Gee P, Maron DM, Ames BN. Detection and classification of mutagens: a set of base-specific *Salmonella* tester strains J. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 11 606 ~ 11 610.  
 18 Zhan Q, Bieszezad CK, Bae I, et al. Induction of BCL-2 family member MCL 1 as an early response to DNA damage J. *Oncogenesis*. 1997, 14: 1 031 ~ 1 039.  
 19 尹学均, 郑玉新. 遗传报道基因检测法及其在毒理学上的应用 J. *国外医学 分子生物学分册*, 2000, 22 (4): 248 ~ 252.  
 20 张天宝. 基因芯片及其在医学研究中的意义 J. *第二军医大学学报*, 2000, 21 (1): 91 ~ 94.