

大鼠体内碱性彗星试验中阳性药环磷酰胺和甲基磺酸乙酯给药周期的筛选研究[△]

李丽丽^{1,2*}, 杨林^{1,2}, 谢锋¹, 辛艳飞¹, 张升¹, 陈娇婷^{1,2}, 宣尧仙¹, 由振强^{1#} (1.浙江省医学科学院安全性评价研究中心, 杭州 310013; 2.浙江工业大学长三角绿色制药协同创新中心, 杭州 310014)

中图分类号 R99;R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)23-3198-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.23.07

摘要 目的:筛选大鼠体内碱性彗星试验中阳性药环磷酰胺(CP)和甲基磺酸乙酯(EMS)的给药周期。方法:将SD大鼠随机分为空白对照组、CP组(40 mg/kg,腹腔注射)和EMS组(100 mg/kg,灌胃),每组9只,每24 h给药1次,连续给药4次。分别于第2、3、4次给药后3 h(即首次给药后27、51、75 h)各组随机选取3只大鼠,处死并收集肝和胃样本,经过制备单细胞悬液、制片、裂解、解链、电泳及染色后,使用Comet Assay IV彗星试验数据分析系统进行分析,以彗星尾部DNA百分比(Tail DNA%)、尾长(TL)和尾矩(TM)为评价指标,筛选最佳给药周期。结果:空白对照组大鼠3个检测时间点肝和胃的Tail DNA%、TL、TM差异均无统计学意义($P>0.05$),表明彗星试验体系比较稳定。与空白对照组比较,CP组和EMS组大鼠3个检测时间点肝和胃的Tail DNA%、TL(27 h的胃除外)、TM均明显升高($P<0.05$)。其中,CP组大鼠3个检测时间点肝的Tail DNA%、TL、TM差异均无统计学意义($P>0.05$),胃的Tail DNA%、TL均在给药51 h时最大,TM随给药时间的延长而升高;EMS组大鼠肝的Tail DNA%、胃和肝的TM均随给药时间的延长而升高。EMS组大鼠胃的Tail DNA%、肝和胃的TL均在给药51 h时最大。结论:在进行体内碱性彗星试验时,建议CP和EMS的给药周期是每24 h给药1次,连续给药3次。

关键词 体内碱性彗星试验;环磷酰胺;甲基磺酸乙酯;给药周期;大鼠

Screening of the Dosing Period of Positive Drug Cyclophosphamide and Ethyl Methanesulfonate in Alkaline Comet Assay of Rats *in vivo*

LI Lili^{1,2}, YANG Lin^{1,2}, XIE Feng¹, XIN Yanfei¹, ZHANG Sheng¹, CHEN Jiaoting^{1,2}, XUAN Yaoxian¹, YOU Zhenqiang¹ (1.Center of Safety Evaluation, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China; 2.Collaborative Innovation Center of Yangtze River Delta Region Green Pharmaceuticals, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To screen the dosing period of positive drug cyclophosphamide (CP) and ethyl methanesulfonate (EMS) in alkaline comet assay of rats *in vivo*. **METHODS:** SD rats were randomly divided into blank control group, CP group (40 mg/kg, i.p.) and EMS group (100 mg/kg, i.g.), 9 rats in each group, every 24 h, for consecutive 4 times. 3 h after secondary, third and fourth medication (27, 51, 75 h after first medication), 3 rats were randomly selected and sacrificed in each group. Liver and stomach samples were collected. After single cell suspension preparation, production, lysis, chain breaking, electrophoresis and dyeing, the evaluation indicators, including tail DNA%, tail length (TL) and tail moment (TM), Comet Assay IV comet assay data analysis system was used to screen the optimal dosing period. **RESULTS:** There was no statistical significance in Tail DNA%, TL and TM of liver and stomach in blank control group at 3 test time points ($P>0.05$), indicating that the comet assay system was stable. Tail DNA%, TL (except for stomach at 27 h) and TM of liver and stomach in CP and EMS groups were increased significantly, compared with blank control group ($P<0.05$). There was no statistical significance in Tail DNA%, TL and TM of liver in CP group at the three test time points ($P>0.05$), tail DNA% and TL of stomach in CP group were maximal at 51 h. TM was increased with dosing period. Tail DNA% of liver in EMS group, TM of stomach and liver were increased with dosing period. Tail DNA% of the stomach, TL of liver and stomach were the highest at 51 h in EMS group. **CONCLUSIONS:** During *in vivo* alkaline comet assay, it is recommended that CP and EMS be administered once every 24 h and three times continuously.

KEYWORDS Alkaline comet assay *in vivo*; Cyclophosphamide; Ethyl methanesulfonate; Dosing period; Rats

[△] 基金项目:浙江省基础公益研究计划项目(No.LQY18H160001);浙江省科技计划项目(No.2016F30009)

* 硕士研究生。研究方向:药理学。电话:0571-87568012。E-mail:15205807862@163.com

通信作者:副研究员,硕士。研究方向:分子毒理学。电话:0571-87568012。E-mail:youzq1979@163.com

彗星试验(Comet assay),又称单细胞凝胶电泳试验(Single cell gel electrophoresis assay),是一种快速、简单、可视化、灵敏的试验技术,可以直接测量和分析体内外细胞的核DNA损伤^[1-2]。彗星试验被广泛应用于遗传毒性试验、人体生物监测和生态遗传毒理学等研究中^[3]。

彗星试验又分为中性彗星试验(Neutral comet assay)和碱性彗星试验(Alkaline comet assay),中性彗星试验常用于检测双链断裂的DNA损伤,碱性彗星试验则更敏感,用于检测包括单链和双链断裂的少量的DNA损伤。环磷酰胺(Cyclophosphamide,CP)与甲基磺酸乙酯(Ethyl methanesulfonate,EMS)是遗传毒性常见的阳性药物,其中CP是一种广谱抗肿瘤药,常用于治疗白血病^[4]、血管炎^[5]等;EMS是一种重要的突变诱导剂,可诱导动物^[6]、植物^[7-8]以及微生物^[9]发生突变,且常存在于需要使用含有甲磺酰基团的化学合成过程中,已报道其具有基因毒性^[10]。但是CP和EMS在药理与毒理试验中作为阳性药物的给药周期并没有相关标准及文献供研究者进行参考。故本研究以CP和EMS为阳性药物,运用碱性彗星试验进行大鼠体内实验,基于大鼠的肝细胞和胃细胞,筛选体内碱性彗星试验的给药周期。

1 材料

1.1 仪器

CometAssay[®]ES彗星试验电泳系统(美国Trevigen公司);Comet Assay IV彗星试验数据分析系统(英国Instem公司);Nikon ECLIPSE E600荧光显微镜(日本Nikon公司)。

1.2 药品与试剂

CP、EMS对照品(美国Sigma-Aldrich公司,批号:101767552、BCBS6100V,纯度:≥95%);CometAssay[®]彗星试验试剂盒(美国Trevigen公司,批号:39280D17);SYBR[®]Green荧光染液(美国Invitrogen公司,批号:20170418);其他生化试剂均为国产分析纯。

1.3 动物

SPF级SD大鼠27只,♂,7~9周龄,体质量为(200±20)g,购自浙江省医学科学院,动物生产许可证号为SCXK-(浙)2014-001,动物质量合格证编号为1710100007。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 500 mmol/L 乙二胺四乙酸(EDTA) 取80 mL dH₂O,约2 g氢氧化钠(NaOH),14.6 g EDTA,调pH至8.0后,加入dH₂O定容至100 mL。

2.1.1 组织细胞切碎液 取500 mmol/L EDTA 2 mL至48 mL无钙、镁,无酚红的磷酸盐缓冲液(PBS)中,使用前加入5.6 mL二甲亚砜(DMSO)溶液,4℃预冷。

2.1.3 碱性解链溶液(pH>13) 取NaOH 0.4 g、200 mmol/L EDTA 250 μL,加dH₂O定容至50 mL。

2.1.4 碱性电泳缓冲液 NaOH 8 g,500 mmol/L EDTA 2 mL,NaOH溶解后加dH₂O定容至1 L,存放于4℃。

2.1.5 1 mol/L 三羟甲基氨基甲烷-盐酸溶液(Tris-HCl溶液) 取Tris 12.12 g,dH₂O 80 mL,浓HCl 5~6 mL,调pH至7.5后,加入dH₂O定容至100 mL。

2.1.6 Tris-EDTA缓冲溶液(TE缓冲溶液) 取1 mL 1

mol/L Tris-HCl,200 μL 500 mmol/L EDTA,加入dH₂O定容至100 mL。

2.1.7 CP溶液和EMS溶液 均用生理盐水作为溶剂将CP和EMS配制成所需浓度的溶液。

2.2 分组与给药

将大鼠随机分成3组,分别为空白对照组、CP组和EMS组,每组9只。CP组大鼠腹腔注射CP溶液,给药剂量为40 mg/kg;EMS组大鼠灌胃EMS溶液,给药剂量为100 mg/kg;空白对照组大鼠灌胃生理盐水,给药体积为10 mL/kg。3组大鼠每隔24 h给药1次,连续给药4次,其中CP和EMS的剂量为药物遗传毒理学研究中阳性药物的常用剂量^[11],分别于第2、3、4次给药后3 h,即首次给药后27、51、75 h,每组随机抽取3只大鼠,灌胃1%戊巴比妥钠溶液进行麻醉,放血处死,解剖并收集肝、胃样本。

2.3 单细胞悬液的制备

2.3.1 肝单细胞悬液 用10 mL注射器从大鼠肝门静脉缓慢推注预冷的生理盐水直至肝脏鼓起发白,剪下左侧肝叶一小块组织(1 mm×2 mm),每只大鼠剪切组织块大小应尽量保持一致。将剪下的组织块放入预冷的切碎液中反复清洗除去残留血液。将洗净的肝组织块放入5 mL离心管内,加入3 mL切碎液,用眼科剪适当剪碎组织块以释放细胞,静置5 min。用1 mL移液器轻轻吹打数十次后过筛(孔径40 μm),保留上清液。用预冷的切碎液调整上清液中的肝细胞浓度为1×10⁸个/mL用于制片。

2.3.2 胃单细胞悬液 沿胃大弯将胃剪开,用预冷的生理盐水清洗胃部。胃表面上皮用塑料刮板刮几次后用冷的切碎液充分冲洗。用塑料刮板轻轻刮胃黏膜5次以上释放细胞。随后用3 mL切碎液将刮下的细胞制成单细胞悬浮液,用1 mL枪轻轻吹打数十次后过筛(孔径40 μm),保留上清液。用预冷的切碎液调整上清液中的胃细胞浓度为1×10⁸个/mL用于制片。

2.4 制片

在沸水烧杯中溶化琼脂糖5 min。溶化后,将琼脂糖放入37℃水浴中至少20 min使其冷却。以1:10(V/V)的比例将单细胞悬浮液与溶化的琼脂糖混合在1.5 mL离心管中,吹打均匀后立即吸取50 μL至载玻片的样品区域中,确保样品区域的完整覆盖。将载玻片平放在4℃的黑暗中(冰箱)10 min。当载玻片样品区域的边缘出现一个0.5 mm的清晰的环时,表示制片完成,可进行下一步操作。

2.5 裂解、解链及电泳

将载玻片置于4℃的裂解液[裂解液使用前加入10:1(V/V)的DMSO]中浸泡30~60 min。裂解结束后将载玻片浸入新鲜制备的碱性解链液中,pH>13,在室温下浸泡20 min。在此期间,将电泳仪在冰箱内降温20

min。解链完成后,在电泳仪内加入约850 mL的4℃碱性电泳缓冲液,将载玻片放入电泳载玻台上(载玻片标签与黑色阴极相邻),并用载玻台覆盖层覆盖。在冷却槽内放入冰袋。CometAssay[®]ES彗星试验电泳系统电源设置为21 V/cm,电泳时间为30 min。

2.6 染色及观察

电泳结束后,将载玻片在4℃的dH₂O中轻轻浸泡2次,每次5 min,然后在70%乙醇中浸泡脱水5 min。然后将载玻片在37℃下干燥10~15 min。SYBR[®]Green荧光染料用TE缓冲溶液稀释20倍,用移液枪取100 μL稀释后的荧光染料均匀铺到每个干燥的琼脂糖上,并在室温下避光染色30 min。染色结束后,轻轻敲打载玻片除去多余的荧光染料,并在水中简单浸泡。在37℃下完全干燥后,置于波长为450~490 nm的荧光显微镜下观察。

2.7 碱性彗星试验结果的收集

本试验使用Comet Assay IV彗星试验数据分析系统对观察到的细胞进行分析评分,并采用彗星尾部DNA百分比(Tail DNA%)、尾长(彗星头部末端到彗星尾末端的距离,TL)和尾矩(尾长与尾部DNA百分比的乘积, TM)作为评价指标。每只大鼠的肝、胃分别随机分析150个细胞。

2.8 统计学分析

试验数据采用SPSS 22.0软件进行统计分析。数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

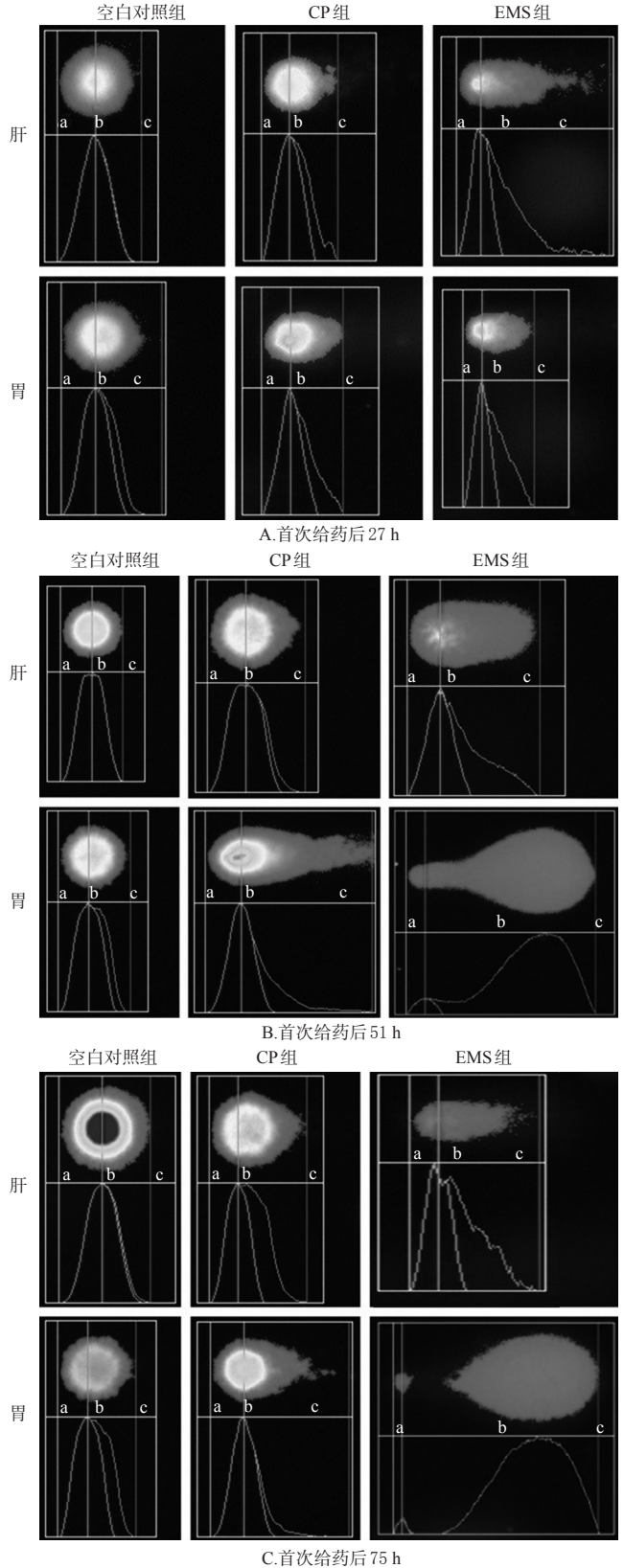
3组大鼠不同给药时间的彗星试验典型图见图1。

3.1 肝和胃的Tail DNA%

空白对照组大鼠3个检测时间点Tail DNA%差异无统计学意义($P > 0.05$),说明试验体系比较稳定。与空白对照组比较,CP组和EMS组大鼠3个检测时间点肝和胃的Tail DNA%均明显升高($P < 0.05$)。其中CP组大鼠3个检测时间点间肝的Tail DNA%差异无统计学意义($P > 0.05$),胃的Tail DNA%在51 h时最大;EMS组大鼠肝的Tail DNA%随给药时间的延长而升高,胃的Tail DNA%也在51 h时最大。说明CP和EMS首次给药后51 h的Tail DNA%最敏感。3组大鼠肝和胃中的Tail DNA%的测定结果见表1。

3.2 肝和胃的TL

空白对照组大鼠3个检测时间点TL差异无统计学意义($P > 0.05$),说明试验体系比较稳定。与空白对照组比较,CP组和EMS组大鼠除了首次给药后27 h胃的TL差异无统计学意义外($P > 0.05$),其余检测时间点肝和胃的TL均明显升高($P < 0.05$)。其中,CP组大鼠3个检测时间点间肝的TL差异无统计学意义($P > 0.05$),胃的TL在51 h时最大;EMS组大鼠肝和胃的TL均在51 h



注:a.彗星头起始位置;b.彗星头中间位置;c.彗星尾末端
Note: a. initial position of comet head; b. middle position of comet head; c. end of comet tail

图1 不同给药时间后3组大鼠肝和胃的彗星试验典型图
Fig 1 Typical comet assay plot of liver and stomach in rats of 3 groups after different administration time

时最大。说明CP和EMS首次给药后51 h的TL最敏感。3组大鼠肝和胃中的TL的测定结果见表2。

表1 给药不同时间后3组大鼠肝和胃中的Tail DNA%的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 1 Results of Tail DNA% of liver and stomach in rats of 3 groups after different administration time($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

组别	27 h		51 h		75 h	
	肝	胃	肝	胃	肝	胃
空白对照组	2.24±0.82	3.28±1.21	2.84±1.42	2.97±2.51	2.56±1.86	3.54±2.73
CP组	25.58±9.39*	24.23±6.76*	24.57±12.25*	53.63±15.27**	22.77±8.40*	46.20±20.59**
EMS组	45.58±5.01*	38.22±12.15*	51.76±10.02*	98.22±2.24**	77.31±10.27** ^Δ	82.64±9.42** ^Δ

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,与同组27 h比较,[#] $P<0.05$,与同组51 h比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. blank control group,* $P<0.05$; vs. at 27 h of same group,[#] $P<0.05$; vs. at 51 h of same group,^Δ $P<0.05$

表2 给药不同时间后3组大鼠肝和胃中的TL值的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3, \mu\text{m}$)

Tab 2 Results of TL of liver and stomach in rats of 3 groups after different administration time($\bar{x} \pm s, n=3, \mu\text{m}$)

组别	27 h		51 h		75 h	
	肝	胃	肝	胃	肝	胃
空白对照组	2.38±0.60	2.25±0.58	2.62±0.41	2.38±0.29	2.56±0.32	2.43±0.36
CP组	3.51±1.21*	2.09±0.61	3.70±0.76*	5.99±2.60**	4.03±1.83*	3.81±1.36** ^Δ
EMS组	4.52±0.32*	2.30±0.68	5.20±1.38**	8.90±5.24**	3.82±1.63 ^Δ	7.52±3.42** ^Δ

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,与同组27 h比较,[#] $P<0.05$,与同组51 h比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. blank control group,* $P<0.05$; vs. at 27 h of same group,[#] $P<0.05$; vs. at 51 h of same group,^Δ $P<0.05$

3.3 肝和胃的TM

空白对照组大鼠3个检测时间点TL差异无统计学意义($P>0.05$),说明试验体系比较稳定。与空白对照组比较,CP和EMS组大鼠3个检测时间点肝和胃的TM均明显升高($P<0.05$)。其中,CP组大鼠3个检测时间点间肝的TM差异无统计学意义($P>0.05$),胃的TM随给药时间的延长而升高;EMS组大鼠肝和胃的TM均随给药时间的延长而升高。3组大鼠肝和胃中的TM的测定结果见表3。

4 讨论

遗传毒性研究是药物非临床安全性评价的重要内容,在我国国家食品药品监督管理局(CFDA)于2007年颁布的《药物遗传毒性研究技术指导原则》中,推荐的标准组合为一项体外细菌基因突变试验、一项采用哺乳动物细胞进行的体外染色体损伤评估试验,或体外小鼠淋巴瘤TK基因突变试验、一项采用啮齿类动物造血细胞进行的体内染色体损伤试验。近年来随着对遗传毒性认识的不断提高,遗传毒性新技术和新方法得到完善与发展,并积累了大量的数据,如体外微核试验、体内彗

表3 给药不同时间后3组大鼠肝和胃中的TM值的测定结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 3 Results of TM of liver and stomach in rats of 3 groups after different administration time($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	27 h		51 h		75 h	
	肝	胃	肝	胃	肝	胃
空白对照组	0.04±0.02	0.04±0.03	0.03±0.02	0.04±0.02	0.03±0.02	0.04±0.02
CP组	0.33±0.14*	0.25±0.09*	0.28±0.12*	0.89±0.76**	0.35±0.23*	3.05±1.63** ^Δ
EMS组	0.69±0.11*	0.36±0.12*	1.27±0.51**	3.98±2.31**	2.69±0.74** ^Δ	4.52±2.42**

注:与空白对照组比较,* $P<0.05$,与同组27 h比较,[#] $P<0.05$,与同组51 h比较,^Δ $P<0.05$

Note: vs. blank control group,* $P<0.05$; vs. at 27 h of same group,[#] $P<0.05$; vs. at 51 h of same group,^Δ $P<0.05$

星试验、转基因模型。同时,体外哺乳动物细胞试验假阳性率过高的情况引起了广泛的关注^[12-14]。鉴于上述原因,国际人用药品注册技术协调会议(ICH)遗传毒性指导委员会于2006年6月启动遗传毒性指导原则的修订工作,并于2011年11月正式修订完成,并推荐给欧盟、美国和日本采纳和使用。为了保证药物遗传毒性研究的准确性和可靠性,我国CFDA参照ICH、美国食品和药物管理局(FDA)、经济合作与发展组织(OECD)相关遗传毒性指导原则于2018年3月颁布了新的药物遗传毒性研究技术指导原则。新指导原则推荐的标准组合增加了可选性,体内彗星试验是其推荐的一项体内实验,该方法是一项可以直接检测核DNA损伤的敏感实验方法,可以检测DNA单/双链损伤、碱性不稳定位点、DNA交联等多种损伤类型,因此该实验方法是研究突变修饰和遗传性改变的有效手段。

前期已有研究人员利用EMS和CP建立体内彗星试验的方法^[11,15-16],其主要是对EMS和CP诱导的DNA损伤的剂量进行探讨。CP是常用的遗传毒性评价的阳性药物,在体内实验给药途径一般为腹腔注射,但大部分药物的给药方式为口服给药,为保证给药方式的一致性,本研究还选取了口服药物EMS作为遗传毒理学评价的阳性药物。本研究参考前期研究的EMS和CP剂量,就二者给药周期对彗星试验结果的影响进行研究。根据《药物遗传毒性研究技术指导原则》要求,彗星试验结果的评价指标为彗星Tail DNA%、TL和TM,其中以Tail DNA%为主。本研究也对彗星试验的Tail DNA%、TL和TM进行了分析,在3个时间点的检测中,空白对照组大鼠的Tail DNA%、TL和TM均处于一个比较稳定的数值,说明彗星试验系统比较稳定。EMS和CP诱导的DNA损伤均能通过彗星Tail DNA%、TL和TM进行反映,其中以Tail DNA%和TM最敏感,在3个检测时间点中均明显高于空白对照组,而TL在首次给药后27 h胃的检测中与空白对照组差异无统计学意义。OECD建议将Tail DNA%作为彗星试验最主要参数,其他参数

可作为参考,因此在今后的彗星试验的分析过程中建议以彗星 Tail DNA % 作为主要的评价指标,TL 和 TM 作为补充指标。

在本研究中,笔者选取了胃和肝作为彗星试验检测的靶器官,其中肝是药物在体内代谢的主要靶器官,而在进行药物安全性评价过程中,口服给药是最常见的给药方式,因此选取胃(与药物接触的主要器官)作为口服给药的检测靶器官。研究结果显示,胃和肝均是比较敏感的靶器官,且在 EMS 和 CP 首次给药后 51 h 和 75 h 胃的 Tail DNA %、TL 和 TM 比肝更敏感。在给药后的检测点中,笔者选取了首次给药后 27、51、75 h 进行分析,结果显示,在首次给药后以 51 h 的结果灵敏度和彗星图片的清晰度最佳。日本替代方法验证中心(JaCVAM)联合验证结果表明,连续 3 d 给药能更灵敏地检测化合物遗传毒性作用,故一般选择给药周期为 3 d^[17],OECD 还推荐将体内彗星试验整合到亚慢性毒性实验中,以减少动物的使用。本研究结果同样表明连续给药 3 次后检测效果最佳。

综上所述,在对药物进行体内碱性彗星试验时,建议阳性药 CP 和 EMS 的给药周期是每 24 h 给药 1 次,连续给药 3 次。

参考文献

[1] TICE RR, AGURELL E, ANDERSON D, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2000, 35(3): 206-221.

[2] MARCINIAK B, LOPACZYNSKA D, FERENC T. Evaluation of the genotoxicity of alpha-amanitin in mice bone marrow cells[J]. *Toxicol*, 2017. DOI: 10.1016/j.toxicol.2017.07.005.

[3] COLLINS AR. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(2): 794-800.

[4] MAURO FR, CARELLA AM, MOLICA S, et al. Fludarabine, cyclophosphamide and lenalidomide in patients with relapsed/refractory chronic lymphocytic leukemia. A multicenter phase I - II GIMEMA trial[J]. *Leuk Lymphoma*, 2017, 58(7): 1640-1647.

[5] FAUCI AS, KATZ P, HAYNES BF, et al. Cyclophosphamide therapy of severe systemic necrotizing vasculitis[J]. *N Engl J Med*, 1979, 301(5): 235-238.

[6] CATTANACH BM, POLLARD CE, ISAACSON JH. Ethyl methanesulfonate-induced chromosome breakage in the mouse[J]. *Mutat Res*, 1968, 6(2): 297-307.

[7] SHIRASAWA K, HIRAKAWA H, NUNOME T, et al. Genome-wide survey of artificial mutations induced by ethyl methanesulfonate and gamma rays in tomato[J]. *Plant Biotechnol J*, 2016, 14(1): 51-60.

[8] MISHRA A, SINGH A, SHARMA M, et al. Development of EMS-induced mutation population for amylose and resistant starch variation in bread wheat (*Triticum aestivum*) and identification of candidate genes responsible for amylose variation[J]. *BMC Plant Biol*, 2016, 16(1): 217.

[9] PAWAR N, PANCHAL S, KAWLE D, et al. Evaluation of genotoxic and modulatory effects of *Nyctanthes arbor-tristis* calyx extract and the isolated crocin in Ames' assay[J]. *Nat Prod Res*, 2017. DOI: 10.1080/14786419.2017.

[10] Giordani A, Kobel W, Gally HU. Overall impact of the regulatory requirements for genotoxic impurities on the drug development process[J]. *Eur J Pharm Sci*, 2011, 43(1): 1-15.

[11] 王欣,王雪,宋捷,等.大鼠体内彗星试验方法的建立与应用研究[J]. *药物评价研究*, 2012, 35(1): 6-9.

[12] KIRKLAND D, ARDEMA M, MULLER L, et al. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens II. Further analysis of mammalian cell results, relative predictivity and tumour profiles[J]. *Mutat Res*, 2006, 608(1): 29-42.

[13] 周长慧,王征,涂宏刚,等. OECD 遗传毒性最新修订指导原则的解析[J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(18): 2052-2059.

[14] 张铭,黄芳华,周长慧,等. ICH 遗传毒性指导原则 S2 (R1) 修订要点及相关背景介绍[J]. *中国新药杂志*, 2013, 22(2): 146-149.

[15] 韩天娇,周长慧,常艳.体内碱性彗星试验与微核试验联合测定甲磺酸乙酯遗传毒性方法的建立[J]. *癌变 畸变 突变*, 2016, 28(4): 277-280.

[16] 王欣,王晨,宋捷,等.体内彗星实验联合微核实验检测化合物的遗传毒性[J]. *中国药房*, 2014, 25(33): 3107-3109.

[17] BURLINSON B, TICE RR, SPEIT G, et al. Fourth international workgroup on genotoxicity testing: results of the in vivo comet assay workgroup[J]. *Mutat Res*, 2007, 627(1): 31-35.

(收稿日期:2018-06-03 修回日期:2018-09-27)

(编辑:邹丽娟)