

SD大鼠灌胃盐酸丙卡巴肼与乌拉坦的多脏器碱性彗星实验研究[△]

文海若*,陈高峰,任璐,毛志慧,宋捷,汪祺*(中国食品药品检定研究院,北京 100050)

中图分类号 R965;R979.1;R394.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)01-0026-05

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.01.06

摘要 目的:通过碱性彗星实验评价盐酸丙卡巴肼(PCZ)和乌拉坦(EC)对大鼠不同脏器的DNA损伤效应,验证多脏器碱性彗星实验的可行性。方法:取30只SD大鼠按体质量随机分成6组,每组5只,分别为阴性对照组(超纯水)、PCZ 75 mg/kg组、PCZ 150 mg/kg组、EC 400 mg/kg组、EC 800 mg/kg组以及阳性对照组(*N*-乙基-*N*-亚硝基脲,40 mg/kg)。大鼠连续灌胃给药4 d,实验期间观察其临床症状并记录体质量,末次给药后3 h内处死大鼠,称肝、肾、肺质量,收集肝、肾、肺及外周血淋巴细胞,制备成单细胞悬液进行碱性彗星实验。样本分别经裂解、解旋、电泳、染色等步骤后,使用Komet 6.0软件进行图像分析尾DNA含量百分率(尾DNA%)、尾距。结果:与阴性对照组比较,PCZ 75、150 mg/kg组和阳性对照组大鼠给药4 d后体质量和肝、肾质量均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),EC 800 mg/kg组大鼠给药4 d后仅体质量明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其余差异均无统计学意义($P>0.05$)。与阴性对照组比较,PCZ 75、150 mg/kg组和阳性对照组大鼠肝、肾、肺和外周血淋巴细胞的尾DNA%和尾距均明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其中PCZ对肝、肺的影响程度更明显;EC 800 mg/kg组大鼠肝、肾和外周血淋巴细胞的尾DNA%和尾距均明显增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$),EC 400 mg/kg组大鼠仅肾组织的尾DNA%和尾距明显增加($P<0.05$)。结论:PCZ诱导的细胞DNA损伤较强,肝和肺是其遗传毒性作用的易感器官;EC诱导的细胞DNA损伤相对较弱,肾是其遗传毒性作用最敏感的器官。

关键词 碱性彗星实验;体内遗传毒性;盐酸丙卡巴肼;乌拉坦;SD大鼠

Study of Alkaline Comet Assay at Various Tissues in SD Rats with Intragastric Administration of Procarbazine Hydrochloride and Ethyl Carbamate

WEN Hairuo, CHEN Gaofeng, REN Lu, MAO Zhihui, SONG Jie, WANG Qi (National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To evaluate the DNA damage response of procarbazine hydrochloride (PCZ) and ethyl carbamate (EC) to different tissues in rats by performing alkaline comet assay, to validate the feasibility of alkaline comet assay of various tissues. METHODS: Totally 30 SD rats were randomly divided into 6 groups according to body weight, with 5 rats in each group, such as negative control group (hyperpure water), PCZ 75 mg/kg group, PCZ 150 mg/kg group, EC 400 mg/kg group, EC 800 mg/kg group, positive control group (*N*-ethyl-*N*-nitrosourea 40 mg/kg). Those rats were given relevant medicine intragastrically for 4 d; clinical symptoms of rats were observed and body weight was recorded during experiment. Within 3 h after last medication, the rats were sacrificed; liver, renal and lung weight were weighed; liver, kidney, lung and peripheral blood lymphocytes were collected. The single cell suspension was prepared to perform alkaline comet assay. After lysis, unwind, electrophoresis and dying, tail DNA% and tail distance of samples were analyzed by Komet 6.0 software. RESULTS: Compared with negative control group, body weight, liver and renal weight of rats were decreased significantly in PCZ 75 mg/kg group, PCZ 150 mg/kg group and positive control group 4 d after medication ($P<0.05$ or $P<0.01$). Body weight of rats were decreased significantly in EC 800 mg/kg 4 d after medication ($P<0.05$ or $P<0.01$); there was no statistical significance ($P>0.05$). Compared with negative control group, tail DNA% and tail distance in liver, kidney and peripheral blood lymphocytes were increased significantly in PCZ 75 mg/kg group, PCZ 150 mg/kg group and positive control group ($P<0.05$ or $P<0.01$); PCZ showed more significant effects on liver and lung. Tail DNA% and tail distance of liver, kidney and peripheral blood lymphocytes were increased significantly in EC 800 mg/kg group ($P<0.05$ or $P<0.01$), and tail DNA% and tail distance of renal tissue was increased significantly in EC 400 mg/kg group ($P<0.05$). CONCLUSIONS: PCZ induced stronger DNA damage; liver and lung are the major genotoxicity target of PCZ. EC-induced DNA damage is relatively weak, and kidney is the most sensitive organ for EC-induced genotoxicity.

KEYWORDS Alkaline comet assay; *in vivo* genotoxicity; Procarbazine hydrochloride; Ethyl carbamate; SD rats

[△]基金项目:国家重大科技专项课题(No.2015-ZX09501004-002);
国家自然科学基金资助项目(No.81503347)

*副研究员,博士。研究方向:遗传毒理。电话:010-67876252。
E-mail:wenhairuo@nifdc.org.cn

#通信作者:副研究员,博士。研究方向:药理毒理。电话:
010-67095495。E-mail:sansan8251@sohu.com

彗星实验(Comet assay),又称单细胞凝胶电泳实验(Single cell gel electrophoresis, SCGE),是在个体细胞水平上检测DNA单链或双链断裂的实验方法。该方法最初由 Ostling 和 Johansson 于1984年建立,之后经 Singh 等在1988年改进^[1]。因损伤的DNA与完整的DNA电泳

时的迁移速率不同,损伤的DNA经电泳后可形成“彗星”样结构,故可通过凝胶电泳来区分是否存在DNA链断裂,彗星实验也因此得名。碱性电泳液(pH>13.0)条件下开展的彗星实验同时兼顾了DNA单链和双链断裂及碱性不稳定点(当检测样本中存在脱嘌呤或脱嘧啶位点时,可在强碱条件下转换为DNA断裂)的检测^[2]。彗星实验不依赖于特殊细胞表型或动物模型,可利用外周血、肝、肾、肺、胃黏膜、膀胱、精子等多种组织开展,因此可针对药物蓄积部位及靶器官研究受试物对DNA断裂的影响^[3]。由于DNA断裂多在给药后短期内出现,且DNA单链断裂是可修复的,因此在末次给药和损伤评估之间的检测窗较短,但对短时间内诱发的DNA损伤也较为敏感。体内彗星实验的主要优势是可以较为灵敏地预测药物的体内遗传毒性作用靶器官,弥补常规遗传毒性组合实验中实验体系的局限性。

本研究使用的盐酸丙卡巴肼(Procarbazine hydrochloride, PCZ)属于肼类衍生物,经体内代谢活化后生成能够与DNA反应的烷基化活性基团(甲基重氮离子),从而促进诱导DNA加合物O-6-甲基鸟嘌呤(O-6-meG)生成,在临床上用于霍奇金淋巴瘤和神经胶质瘤等的治疗^[4];乌拉坦(Ethyl carbamate, EC),又称尿烷(Urethane),在体内可诱导DNA加合物7-(2-氧乙基)鸟嘌呤的生成,曾用于镇静、催眠和慢性白血病及多发性骨髓瘤的治疗^[5]。有研究显示,PCZ和EC均存在一定的脏器毒性^[4-6],并需通过体内细胞色素酶P₄₅₀(CYP2E1和羧酸酯同工水解酶A代谢促进DNA加合物的生成来产生遗传毒性效应^[7]。本研究采用体内碱性彗星实验,针对肝、肾、肺和外周血淋巴细胞,对PCZ和EC可能产生的体内DNA致断裂作用及其靶器官进行评价。

1 材料

1.1 仪器

NTS-1300 恒温振荡水槽(东京理化器械株式会社);DYCP-31F 电泳仪和DYY-6C 电泳仪电源(北京市六一仪器厂);Nikon eclipse 80i 荧光显微镜(日本尼康公司);Komet 6.0 图像分析系统(英国安道尔科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

PCZ 原料药(大连美仑生物技术有限公司,批号:J0506A,纯度:≥98%);EC 对照品(批号:BCBP1319V,纯度:≥99%)、*N*-乙基-*N*-亚硝基脲(ENU,批号:SLBF6373V,纯度:≥99%)和乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na,批号:SLBK2568V,纯度:≥99.0%)均购自美国Sigma-Aldrich公司;超纯水[ddH₂O,自制,以MilliQ-A10超纯水机生产(121℃,15 min 高压灭菌,4℃冰箱保存)];Trevigen Comet Assay[®] Kit 彗星检测试剂盒(美国Trevigen公司,批号:4250-050-K);HBSS-Hank's 平衡盐溶液(无钙、镁离子)和磷酸盐缓冲液(PBS,无钙、镁离子)购自美国Cell-

gro公司;SYBR 绿色 I 核苷酸胶体染料[美国Invitrogen公司,使用时按1:10 000 溶解于二甲基亚砜(DMSO)中]。

1.3 动物

SPF 级 Sprague Dawley (SD) 大鼠 30 只, ♂, 给药时 6~7 周龄, 体质量 190~230 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 实验动物生产许可证号为 SCXK(京)2016-0011。大鼠在恒温(20~26℃)、恒湿(40%~70%)条件下明暗周期 12 h/12 h 饲养, 饲养密度为每笼 2~3 只, 全价颗粒饲料喂养, 自由摄食和饮水。本研究方案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。

2 方法

2.1 分组与给药

取检疫期结束后大鼠 30 只, 采用 TOXSTAT 2006 数据统计分析软件, 根据体质量按分层随机化法分为阴性对照组(超纯水)、PCZ 75 mg/kg 组、PCZ 150 mg/kg 组、EC 400 mg/kg 组、EC 800 mg/kg 组以及阳性对照组(ENU, 40 mg/kg), 每组 5 只, 分组时大鼠个体体质量差异不得大于平均体质量的±20%。PCZ 和 EC 的给药剂量根据前期剂量范围探索预实验结果确定, 其中最大剂量为大鼠连续 3 d 给药的最大耐受剂量, 且符合《OECD 啮齿动物 28 天重复剂量经口毒性研究》^[8]对重复给药毒性实验最大耐受剂量的要求。另外, ENU 作为遗传毒性阳性对照品, 3 d 给药研究的最大耐受剂量为 40 mg/kg^[9], 即为本实验的给药剂量。各组大鼠给药前未禁食过夜, 每天灌胃给药 1 次, 给药体积为 10 mL/kg, 连续给药 4 d, 两次给药间隔均为 24 h。

2.2 临床症状与体质量

给药期间每天上午和下午隔笼观察所有大鼠活动状态、濒死情况、存活情况、外观及毛色、有无外伤、粪便情况等。首次给药前及给药 4 d 后称大鼠体质量。

2.3 脏器处理

所有大鼠于首次给药后 72~75 h 腹腔注射 4.5% 戊巴比妥钠(麻醉剂量为 45 mg/kg), 麻醉后从腹腔后大静脉进行采血 50 μL, 放入肝素化采血管, 反复振荡防止凝血, 放冰盒内备用; 完全放血处死后, 剥离肝、肾(双侧)、肺, 迅速称质量。留取大鼠肝左叶中间部分约 10 mm³ 组织, 备用; 单侧肾, 弃去包膜, 沿皮质大弯中心处取约 10 mm³ 组织, 备用; 右肺上叶部分取约 10 mm³ 组织, 备用。

2.4 碱性彗星实验

将肝、肾、肺组织放入预冷的切碎液中反复刷洗后放入 5 mL 离心管内, 加入 3 mL 预冷的切碎液, 用剪刀剪碎组织(约 100 次)以释放细胞, 制成单细胞悬液, 然后轻轻吹打约 15 次后, 放冰盒内备用。肝、肾、肺的单细胞悬液, 用含 20 mmol/L EDTA-2Na 的 HBSS 溶液(pH 7.5)调整密度至 2×10⁵ 个/mL 左右, 再与凝胶以 1:10 比例混合

后铺片。另取大鼠采血管中外周血,直接与凝胶以1:15比例混合后铺片。经制片、裂解、解旋、电泳、中和、脱水等步骤后分别制成肝、肾、肺、外周血的单细胞凝胶标本⁹⁾。所有标本使用SYBR绿I核苷酸胶体染料(1:10 000)染色,并在放大倍数为200~400倍的荧光显微镜下拍照。使用Komet 6.0彗星图像分析软件进行分析,每只大鼠至少分析100个细胞中“刺猬细胞”的数量及100个彗星细胞的细胞核彗星拖尾情况。计算每组大鼠平均“刺猬细胞”数、尾DNA百分含量(尾DNA%)和尾距的中位数平均值。

2.5 数据处理

数据图和统计结果采用GraphPad Prism 7软件进行处理。各组大鼠体质量、脏器质量、血清生化指标、彗星实验结果均以 $\bar{x} \pm s$ 的形式列出。其中体质量、脏器质量和彗星实验结果采用单因素方差分析对组间数据进行检验。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 临床症状与体质量变化

实验期间,各组大鼠临床症状均未见明显异常。与阴性对照组比较,PCZ 75、150 mg/kg组大鼠给药4 d后体质量明显降低($P < 0.01$),自身体质量变化幅度约分别为-0.4%、-5.8%;EC 800 mg/kg组和阳性对照组大鼠给药4 d后体质量也明显降低($P < 0.05$),EC 800 mg/kg组大鼠自身体质量变化幅度约为-1.1%。各组大鼠的体质量变化见表1。

3.2 脏器质量变化

与阴性对照组比较,PCZ 75、150 mg/kg组大鼠给药4 d后的肝、肾质量均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);阳性对照组大鼠给药4 d后的肝质量明显降低($P < 0.05$),其他差异均无统计学意义($P > 0.05$)。各组大鼠的肝、肾、肺质量变化见表2。

3.3 彗星实验结果

表1 各组大鼠的体质量变化($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 1 Changes of body weight of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	给药前体质量,g	给药4 d后体质量,g
阴性对照组	206.1±13.5	239.0±15.5
PCZ 75 mg/kg组	204.6±9.9	203.6±18.4**
PCZ 150 mg/kg组	205.2±7.8	193.3±13.8**
EC 400 mg/kg组	214.9±9.8	229.2±13.0
EC 800 mg/kg组	213.2±8.8	210.9±12.6*
阳性对照组	213.6±9.9	221.6±10.8*

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. negative control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

表2 各组大鼠的肝、肾、肺质量变化($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 2 Changes of liver, renal and lung weight of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	肝质量,g	肾质量,g	肺质量,g
阴性对照组	11.100±1.297	2.157±0.178	1.560±0.313
PCZ 75 mg/kg组	8.677±0.781**	1.895±0.116*	1.365±0.149
PCZ 150 mg/kg组	8.641±1.004**	1.939±0.116*	1.317±0.055
EC 400 mg/kg组	11.057±0.962	2.129±0.137	1.490±0.072
EC 800 mg/kg组	9.828±0.442	2.008±0.156	1.295±0.113
阳性对照组	9.355±0.665*	2.002±0.178	1.446±10.8

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. negative control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

彗星实验可以较为敏感地捕捉到受试物对细胞DNA的损伤作用,因此在体内遗传毒性研究中可在早期有效检出较弱的遗传毒性化合物,并有助于对肿瘤靶向脏器进行预测。与阴性对照组比较,PCZ 75、150 mg/kg组和阳性对照组大鼠肝、肾、肺和外周血淋巴细胞的尾DNA%和尾距均明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中PCZ对肝、肺的影响程度更明显;EC 800 mg/kg组大鼠肝、肾和外周血淋巴细胞的尾DNA%和尾距均明显增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),EC 400 mg/kg组大鼠仅肾细胞的尾DNA%和尾距明显增加($P < 0.05$)。各组大鼠不同组织的彗星试验结果见表3,彗星试验图见图1(低剂量组图略)。

表3 各组大鼠不同组织细胞的彗星试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Tab 3 Results of comet assay of different tissues cells of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	肝细胞		肾细胞		肺细胞		淋巴细胞	
	尾DNA%, %	尾距	尾DNA%, %	尾距	尾DNA%, %	尾距	尾DNA%, %	尾距
阴性对照组	4.86±0.49	0.34±0.08	3.52±0.41	0.37±0.05	5.35±0.08	0.54±0.27	1.99±0.38	0.17±0.04
PCZ 75 mg/kg组	24.49±5.81**	4.30±1.53**	16.71±3.00**	2.29±0.41**	23.88±3.36**	5.59±0.77**	9.08±1.21**	0.89±0.09**
PCZ 150 mg/kg组	39.60±10.59**	6.56±2.29**	21.23±5.61**	4.12±0.77**	42.08±7.44**	10.25±1.90**	13.60±0.37**	1.53±0.08**
EC 400 mg/kg组	6.31±1.31	0.46±0.12	9.33±2.54*	1.21±0.42*	6.99±0.95	1.07±0.12	2.43±0.41	0.20±0.04
EC 800 mg/kg组	7.28±0.53*	1.03±0.14**	9.51±1.39**	1.33±0.32**	7.81±1.14	1.06±0.15	3.13±0.41**	0.30±0.05**
阳性对照组	12.69±1.47**	0.55±0.14*	10.53±1.57**	0.63±0.15*	12.75±1.98**	2.06±0.53**	8.07±0.81**	0.70±0.09**

注:与阴性对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

Note: vs. negative control group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$

本研究结果显示,连续灌胃给药4 d,PCZ 75或150 mg/kg均可导致其肝细胞、肾细胞、肺细胞和外周血淋巴细胞的细胞核完整性受到严重破坏。而EC诱导的细胞DNA损伤相对较弱,肾是其遗传毒性作用最敏感的

器官。

4 讨论

本研究对SD大鼠连续4 d灌胃PCZ或EC,虽然临床症状无明显异常,但两者对大鼠体质量增长均有一定的

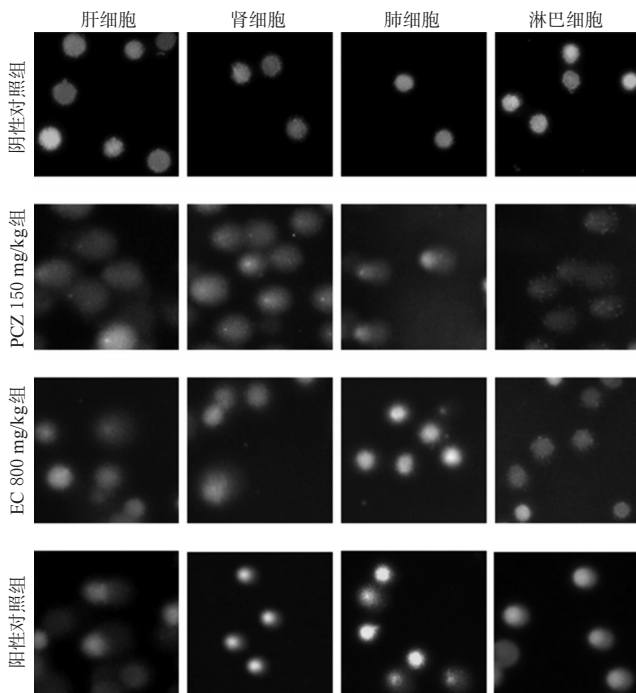


图1 各组大鼠不同组织细胞彗星试验图(×200)

Fig 1 Plot of comet assay of different tissues cells of rats in each group(×200)

抑制作用,其中灌胃PCZ的大鼠肝、肾质量也明显降低。在本实验给药剂量下,PCZ和EC对SD大鼠均有一定的毒性,且PCZ的毒性更为严重。实验结果与临床报道的副作用基本一致^[3,10]。

PCZ和EC均曾经作为抗肿瘤药物应用于临床^[11-12],但因其体内致癌风险如今已较少使用。如,PCZ可诱导急性继发性非淋巴细胞白血病^[11],EC可诱导肺癌和肝癌的形成^[6,13]。PCZ和EC均需经体内代谢后生成可与DNA反应的活性基团后,才可通过干扰遗传物质的合成来发挥致癌潜能^[17]。尽管两者在体外遗传毒性研究中多表现为阳性结果^[14-15],但包括本课题组在内的大量体内研究均提示两者的遗传毒性实验(包括Pig-a基因突变实验、外周血微核实验、骨髓微核实验等)结果呈阴性^[16-18],有必要对该类化合物进行体内遗传毒性研究。

有研究报道,重复静脉给予PCZ可诱导以LacZ基因为报告基因的Muta小鼠肺、脾、肝和骨髓产生组织特异性致突变和致断裂性效应^[19]。体内彗星实验有助于对药物体内遗传毒性易感组织进行判断,本研究使用PCZ与EC来验证该方法用于评价组织靶向性时的可靠性。结果发现,PCZ可诱导大鼠肝、肾、肺和外周血淋巴细胞的细胞DNA结构发生严重损伤,PCZ 75 mg/kg组大鼠的尾DNA%约为阴性对照组的4~5倍,PCZ 150 mg/kg组大鼠的尾DNA%约为阴性对照组的6~9倍,其中肝和肺的受损程度较为突出,可以推测肝和肺是PCZ遗传毒性作用的易感器官。相比之下,EC则属于弱遗传毒性化合物。Stankowshi LF等^[20]研究发现,EC在SD

大鼠重复给药15 d和28 d后可分别诱导外周血淋巴细胞及肝细胞彗星实验出现阳性结果。转基因小鼠致癌研究结果提示,EC可诱导肺细胞、肝细胞、骨髓细胞和脾脏细胞突变率显著升高约2倍,以及骨髓细胞微核率升高约8倍^[21]。美国环保署(EPA)和世界卫生组织国际癌症研究机构(IARC)也指出肾损伤和肝损伤是人类短期暴露于EC的主要风险^[22]。本研究结果显示,连续4 d灌胃SD大鼠400 mg/kg的EC可诱导其肾细胞出现DNA损伤;在800 mg/kg剂量下,肝、肾和外周血淋巴细胞均出现一定的DNA损伤,但受损程度明显低于PCZ 150 mg/kg剂量组。此外,400、800 mg/kg的EC均未能诱导SD大鼠肺细胞核结构出现严重拖尾,提示在当前研究体系中,肾对EC体内代谢产物遗传毒性最敏感,肺则最不敏感。综上,本研究开展彗星实验对PCZ和EC的体内遗传毒性强弱和遗传毒性靶器官进行验证,结果与文献报道^[19-22]基本相符。

体内彗星实验可较为灵敏地分析受试物的遗传毒性靶器官,尤其是以染色体损伤为检测终点的体内微核实验无法检出的那些较为细小的DNA损伤。2011年人用药物注册技术要求国际协调会(ICH)在药物遗传毒性研究技术指导原则修订草案ICH S2(R1)中建议除骨髓微核实验之外,增加肝细胞彗星实验作为第二个体内遗传毒性检测终点^[23]。世界经济合作与发展组织(OECD)已于2014年颁布体内碱性彗星实验指导原则^[24],在我国于2018年新颁布的《药物遗传毒性研究技术指导原则》^[25]中也列入了该方法。当前国际上已完成肝细胞彗星实验实验室间联合验证工作^[26],我国已于2015年开展了体内彗星实验实验室间联合验证工作,验证结果将有助于体内彗星实验方法在国内安全评价领域的标准化及推广。本课题组通过使用PCZ和EC两种遗传毒性强弱不同的受试物对体内多脏器碱性彗星实验的可行性进行了验证,为该方法在国内的实施提供了数据支持。

参考文献

- [1] COLLINS AR. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014,1840(2):794-800.
- [2] NIKOLOVA T, MARINI F, KAINA B. Genotoxicity testing: comparison of the γ H2AX focus assay with the alkaline and neutral comet assays[J]. *Mutat Res*, 2017.DOI: 10.1016/j.mrgentox.2017.07.004.
- [3] 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.
- [4] KAINA B.甲基化抗肿瘤药物治疗中的DNA修复:治疗效果与健康结局[J]. *癌变·畸变·突变*, 2016,28(5):333-341.
- [5] 霍桂桃,杨艳伟,刘甦苏,等. P53~(+/-)基因敲除小鼠对尿酸致癌性验证试验的敏感性研究[J]. *药物分析杂志*,

- 2017,32(7):1188-1195.
- [6] PRADO-CHOA MG, ABREGOREYES VH, RAMIREZ-NOGUERA P, et al. Subchronic toxicity study in rats of two new ethyl-carbamates with ixodicidal activity[J]. *Biomed Res Int*, 2014. DOI: 10.1155/2014/467105.
- [7] GOWD V, SU H, KARLOVSKY P, et al. Ethyl carbamate: an emerging food and environmental toxicant[J]. *Food Chem*, 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.12.072.
- [8] OECD. *Guidelines for the testing of chemicals No. 407: repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents*[EB/OL]. (2008-10-03) [2018-06-27]. <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/fedddocs/oced/ocedtg407-2008.pdf>.
- [9] 文海若, 毛志慧, 陈高峰, 等. SD大鼠连续灌胃给药对碱性彗星电泳和骨髓微核的影响[J]. *药物分析杂志*, 2017, 37(6): 1063-1070.
- [10] TAO ZF, WANG X, SOUERS AJ, et al. Apoptosis-inducing agents for the treatment of cancer and immune and autoimmune diseases[J]. *J Physiol*, 2017, 586(18): 4541-4557.
- [11] JUTRAS G, BELANGER K, LETARTE N, et al. Procarbazine, lomustine and vincristine toxicity in low-grade gliomas[J]. *Curr Oncol*, 2018, 25(1): e33-e39.
- [12] 陈晨, 盛云华, 王宇, 等. 乌拉坦致C57BL/6J小鼠肺腺瘤动物模型方法研究[J]. *中国药理学杂志*, 2018, 53(9): 701-706.
- [13] IGAMI T, NAKAMURAY, HIROSE T, et al. Application of a three-dimensional print of a liver in hepatectomy for small tumors invisible by intraoperative ultrasonography: preliminary experience[J]. *World J Surg*, 2014, 38(12): 3163-3166.
- [14] PARODI S, TANINGHER M, RUSSO P, et al. DNA-damaging activity in vivo and bacterial mutagenicity of sixteen aromatic amines and azo-derivatives, as related quantitatively to their carcinogenicity[J]. *Carcinogenesis*, 1981, 2(12): 1317-1326.
- [15] HUBNER P, GROUX PM, WEIBEL B, et al. Genotoxicity of ethyl carbamate (urethane) in Salmonella, yeast and human lymphoblastoid cells[J]. *Mutat Res*, 1997, 390(1/2): 11-19.
- [16] PU J, DENG Y, TAN X, et al. The in vivo Pig-a gene mutation assay is applied to study the genotoxicity of procarbazine hydrochloride in Sprague-Dawley rats[J]. *Fundam Toxicol Sci*, 2016, 3(4): 167-175.
- [17] KOUL A, ABRAHAM SK. Efficacy of crocin and safranal as protective agents against genotoxic stress induced by gamma radiation, urethane and procarbazine in mice[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2017, 37(1): 13-20.
- [18] LABASH C, AVLASEVICH SL, CARLSON K, et al. Mouse Pig-a and micronucleus assays respond to N-ethyl-N-nitrosourea, benzo[a]pyrene, and ethyl carbamate, but not pyrene or methyl carbamate[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2016, 57(1): 28-40.
- [19] SUZUKI T, ITOH S, NAKAJIMA M, et al. Target organ and time-course in the mutagenicity of five carcinogens in MutaMouse: a summary report of the second collaborative study of the transgenic mouse mutation assay by JEMS/MMS[J]. *Mutat Res*, 1999, 444(2): 259-268.
- [20] STANKOWSKI LF JR, ARADEMA MJ, LAWLOR TE, et al. Integration of Pig-a, micronucleus, chromosome aberration and comet assay endpoints in a 28-day rodent toxicity study with urethane[J]. *Mutagenesis*, 2015, 30(3): 335-342.
- [21] WILLIAMS CV, FLETCHER K, TIINWELL H, et al. Mutagenicity of ethyl carbamate to lacZ-transgenic mice[J]. *Mutagenesis*, 1998, 13(2): 133-137.
- [22] INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). *IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: some anti-thyroid and related substances, nitrofurans and industrial chemicals: volume 7*[EB/OL]. [2018-11-09]. <http://publications.iarc.fr/book-and-report-series/iarc-monographs-on-the-evaluation-of-carcinogenic-risks-to-humans/some-anti-thyroid-and-related-substances-nitrofurans-and-industrial-chemicals-1974>.
- [23] INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). *Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2(R1): step 4 version*[EB/OL]. (2011-11-09) [2018-06-27]. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf.
- [24] OECD. *Guidelines for the Testing of Chemicals No. 489: In vivo mammalian alkaline comet assay*[EB/OL]. (2014-09-26) [2018-06-27]. <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/fedddocs/oced/ocedtg489-2014.pdf>.
- [25] 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.
- [26] UNO Y, KOJIMA H, HAYASHI M. The JaCVAM-organized international validation study of the in vivo rodent alkaline comet assay[J]. *Mutat Res*, 2015. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2015.04.010.

(收稿日期: 2018-07-02 修回日期: 2018-11-13)

(编辑: 邹丽娟)