

大鼠 *Pig-a* 基因突变试验中 N-乙基-N-亚硝基脲和环磷酰胺量-效关系的优化

刘香梅, 李培宁, 刘冬虹, 黄宇锋, 庞增雄, 陈梓灵, 徐颖愉, 丘智峰

(广州质量监督检测研究院, 广州 511447)

【摘要】 目的 研究不同剂量的 N-乙基-N-亚硝基脲(ENU)和环磷酰胺(CP)对 SD 大鼠外周血红细胞表面锚蛋白 CD59 缺失率的影响,优化 *Pig-a* 基因突变试验检测方法。**方法** 将 SD 大鼠按体重和外周血 RBC^{CD59}- 随机分为 4 组,即溶媒对照组,CP 40 mg/kg 给药组,ENU 10 mg/kg 给药组和 ENU 40 mg/kg 给药组,每组 6 只,腹腔染毒,溶媒对照组注射 PBS 溶液。在染毒前和染毒后 7、14、21、28、42、56 d 进行称重和采血,流式检测外周血 RBC^{CD59}- 发生率。**结果** 与溶媒对照组比较,ENU 10 mg/kg 给药组和 ENU 40 mg/kg 给药组各时间点体重及体重增量差异均无显著性,CP 40 mg/kg 给药组各时间点体重及体重增量均下降($P < 0.05$)。CP 40 mg/kg 给药组给药后第 28、42 和 56 天,ENU 10 mg/kg 给药组给药后第 42、56 天,ENU 40 mg/kg 给药组给药后第 7、14、21、28、42 和 56 天外周血 RBC^{CD59}- 发生率均升高($P < 0.05$),且具有剂量反应关系。**结论** 在开展 *Pig-a* 基因突变试验中,ENU 引起大鼠外周血 RBC^{CD59}- 发生率升高效果优于 CP,且 40 mg/kg 剂量优于 10 mg/kg,检验周期 28 d 为宜。

【关键词】 *Pig-a* 基因;突变;N-乙基-N-亚硝基脲;环磷酰胺;流式;外周血红细胞 CD59 缺失率

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 02-0069-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.02.012

Optimization of the dose-effect relationship of N-ethyl-N-nitrocarbamide and cyclophosphamide in *Pig-a* gene mutation detection in rats

LIU Xiangmei, LI Peining, LIU Donghong, HUANG Yufeng, PANG Zengxiong, CHEN Ziling, XU Yingyu, QIU Zhifeng
(Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511447, China)

【Abstract】 Objective The effect of different doses of ethylnitrosourea (ENU) and cyclophosphamide (CP) on the loss rate of CD59 on peripheral blood erythrocytes was explored to optimize the detection method of *Pig-a* gene mutation. **Methods** According to the weight and loss rate of CD59 on peripheral blood erythrocytes, rats were divided into 4 groups: the control group, CP 40 mg/kg group, ENU 10 mg/kg group and ENU 40 mg/kg group ($n = 6$). The control group was injected i. p. with PBS, other groups were injected i. p. with corresponding solutions. The body weight of rats on days 0, 7, 14, 21, 28, 42 and 56 were recorded. At the same time, blood samples were collected and incubated with antibodies, and the loss rate of RBC^{CD59}- was detected by flow cytometry. **Results** Compared with the control group, at different time points, the body weight and weight gain of ENU 10 mg/kg group and ENU 40 mg/kg group had no statistically significant difference ($P > 0.05$), while those in the CP 40 mg/kg group were significantly decreased ($P < 0.05$). The loss rate of RBC^{CD59}- was significantly increased in the CP 40 mg/kg group at 28, 42 and 56 days, ENU 10 mg/kg group at 42 and 56 days, and ENU 40 mg/kg group at 7, 14, 21, 28, 42 and 56 days, ($P < 0.05$). The results showed a dose-response relationship. **Conclusions** Under the conditions of this *Pig-a* mutation detection method, ENU is

superior to CP on raising loss rate of RBC^{CD59-}, ENU 40 mg/kg is better than 10 mg/kg, and 28 days is suitable as the test period.

【Key words】 *Pig-a* gene; mutation; N-ethyl-N-nitrocarbamide; cyclophosphamide; flow cytometry; loss rate of CD59 on peripheral blood erythrocyte

Pig-a 基因位于 X 染色体上,作为管家基因,其同源基因编码区的结构和功能在人、大鼠、小鼠都有高度的保守性,该基因位点的突变可间接导致细胞表面锚蛋白(GPI-AP)的缺失,如 CD59、CD55 等,提示我们 *Pig-a* 基因突变试验可用于检测体内基因突变终点遗传毒性试验。

目前,常用的遗传毒性试验阳性物,如乙基亚硝基脲(ethylnitrosourea, ENU)、4-硝基喹啉-N-氧化物(4NQO)、环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)、苯并芘等也可作为 *Pig-a* 基因突变试验阳性物开展试验^[1-3],但是致突变的效果不同。研究发现,多能干细胞及成熟的血细胞均可发生 *Pig-a* 基因突变而导致的 GPI-AP 缺失,因此外周血是最早用于研究 *Pig-a* 基因突变,而外周血中不同细胞的受累程度不同,红细胞较少发生 GPI-AP 的自发缺失,因此可以将外周血红细胞表面 CD59 缺失率作为 *Pig-a* 基因体内突变试验检测终点^[4]。传统遗传毒性试验具有周期长、成本较高、且大多不能有效反映基因突变终点,从而造成其体外和体内试验结果的一致性也欠佳等缺陷,而利用 *Pig-a* 基因突变试验原理建立的致突变检测方法则可以解决这些问题。

本试验研究不同剂量的 ENU 和 CP 对 SD 大鼠外周血红细胞表面锚蛋白 CD59 缺失的影响,从而筛选适合于遗传毒性试验的优选阳性物及剂量,确定实验周期,以优化 *Pig-a* 基因突变试验检测方法,用于化妆品致突变性安全评价。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠,雄性 24 只,180 ~ 200 g,40 ~ 50 日龄,购自南方医科大学实验动物中心[SCXK(粤)2016-0041],伦理审查编号:2017-01-07。大鼠饲养于本单位屏障实验室[SYXK(粤)2014-0137],自由进食进水,实验室温度 20℃ ~ 26℃,湿度 40% ~ 70%。

1.2 主要试剂及仪器

ENU, CAS: 759-73-9, LOT # MKBX 4322 V, Sigma; CP, 批号: SJ0121RA14, 上海源叶生物科技有限公司; DPBS, LOT: 1546333, 2017-02, Gibco; 胎牛

血清(FBS), 批号: 141012, 杭州四季青生物工程材料有限公司。FITC Mouse Anti-Rat CD59, 货号: 550976, 批号: 4233743; PE Mouse Anti-Rat CD45 抗体, 货号: 554878, 批号: 7054649, BD 公司;

BD FACSCanto II 流式细胞仪; KDC 1044 低速离心机。

1.3 实验方法

动物经检疫合格后,将 SD 大鼠按体重和外周血 RBC^{CD59-} 随机分为 4 组,即溶媒对照组,ENU 10 mg/kg 给药组,ENU 40 mg/kg 给药组和 CP 40 mg/kg 给药组,每组 6 只。采用腹腔注射染毒,各组染毒 1 次,溶媒对照组注射 PBS 溶液。在染毒前和染毒后 7、14、28、42、56 d 进行眼眶静脉丛采血,采用乙醚麻醉,称重并采抗凝血,置于冰上保存备用。

吸取 1.5 μ L 抗凝血,加入 200 μ L 含 1% 胎牛血清的 PBS 溶液的流式管中,轻微震荡数秒。加入 2.5 μ L anti-CD45 和 1 μ L anti-CD59,轻轻转动,使抗体混合均匀,室温暗处避光孵化约 30 min。离心弃上清液,加入约 0.5 mL 含 1% 胎牛血清的 PBS 溶液,轻轻转动,上流式细胞仪检测,每个样本检测 100 万个红细胞^[5-7],分析大鼠外周血 RBC^{CD59-} 发生率。

1.4 统计学方法

实验数据经 SPSS 19.0 软件处理,计量资料以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,满足正态性和方差齐性的资料采用单因素方差分析,不满足参数检验的资料采用非参数检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 ENU 和 CP 对大鼠体重的影响

与溶媒对照组比较,ENU 10 mg/kg 给药组和 ENU 40 mg/kg 给药组各时间点体重及体重增量均无明显影响($P > 0.05$),CP 40 mg/kg 给药组给药后时间点体重及体重增量均下降($P < 0.05$)。说明 ENU 10 mg/kg 和 40 mg/kg 剂量对大鼠体重没有影响,而 40 mg/kg 剂量的 CP 可降低大鼠体重。结果见表 1、图 1。

表 1 ENU 和 CP 对各时间点大鼠体重的影响结果($\bar{x} \pm s, n = 6$)
Tab.1 Effect of ENU and CP on the body weight of rats at different time points

组别 Groups	体重(g) Body weight							
	试验前 Day 0	给药后 第 7 天 Day 7	给药后 第 14 天 Day 14	给药后 第 21 天 Day 21	给药后 第 28 天 Day 28	给药后 第 42 天 Day 42	给药后 第 56 天 Day 56	体重增量 Weight increment
溶媒对照组 Control group	216. 41 ± 10. 86	293. 23 ± 14. 02	341. 84 ± 19. 92	381. 82 ± 17. 01	415. 29 ± 21. 07	472. 05 ± 17. 26	499. 63 ± 16. 90	283. 22 ± 14. 74
CP 40 mg/kg 给药组 CP 40 mg/kg group	208. 58 ± 6. 30	258. 52 ± 14. 56 *	297. 57 ± 19. 75 *	337. 03 ± 23. 87 *	356. 10 ± 26. 59 *	364. 28 ± 33. 82 **	377. 07 ± 59. 16 *	168. 48 ± 63. 95 *
ENU 10 mg/kg 给药组 ENU 10 mg/kg group	215. 57 ± 8. 31	279. 75 ± 14. 52	323. 25 ± 23. 78	366. 32 ± 33. 61	391. 63 ± 37. 29	446. 05 ± 48. 75	480. 55 ± 57. 20	264. 98 ± 51. 78
ENU 40 mg/kg 给药组 ENU 40 mg/kg group	206. 02 ± 14. 39	273. 07 ± 24. 46	323. 08 ± 34. 01	371. 10 ± 40. 72	394. 70 ± 39. 53	446. 50 ± 50. 32	479. 73 ± 54. 13	273. 72 ± 44. 65

注:与溶媒对照组比较, * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$.

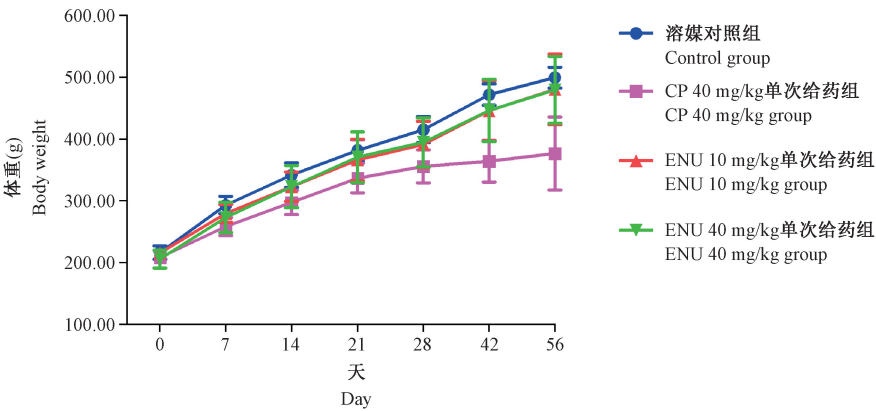


图 1 ENU 和 CP 对各时间点大鼠体重的影响结果
Fig.1 Effect of ENU and CP on the body weight of rats at different time points

2.2 ENU 和 CP 对大鼠外周血 RBC^{CD59-} 发生率的影响

与溶媒对照组比较,CP 40 mg/kg 给药组给药后第 28、42 和 56 天,ENU 10 mg/kg 给药组给药后第 42、56 天,ENU 40 mg/kg 给药组给药后第 7、14、21、28、42 和 56 天外周血 RBC^{CD59-} 发生率均升高($P < 0. 05$)。与 ENU 10 mg/kg 给药组比较,ENU 40 mg/kg 给药组给药后第 7、21、28、42 和 56 天外周血 RBC^{CD59-} 发生率均升高($P < 0. 05$)。结果见表 2、图 2。

3 讨论

随着科学研究的发展,如何最大限度减少实验

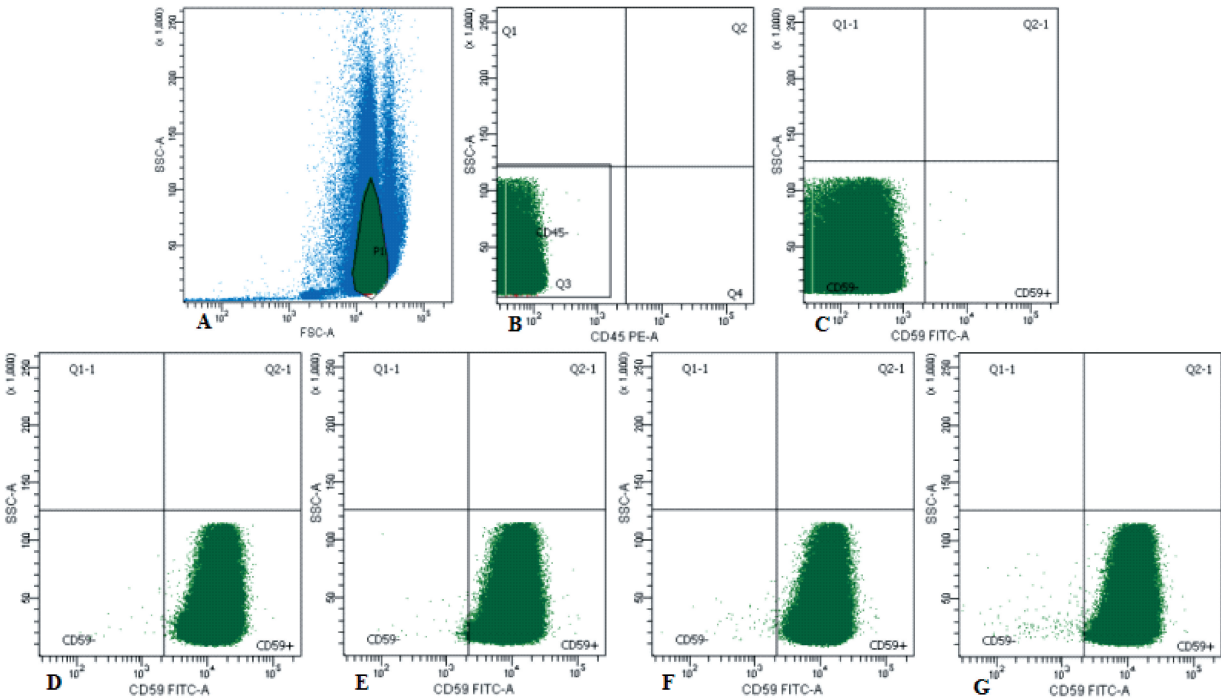
动物的使用数量,快速又准确的得出遗传基因的改变是现阶段研究的重点。在 *Pig-a* 基因突变检测方法建立的过程中,国内外研究发现,*Pig-a* 基因突变成外周血红细胞表面 CD59 的缺失是一个逐渐累积的过程,这对检测有微弱遗传毒性的物质是一种很有意义的方法。目前的研究主要集中在阳性诱变剂 ENU、4NOQ、EMS 等的筛选、检测指标的种类及相关性等方面。而 CP 作为传统遗传毒性试验检测方法中最常见的阳性致突变剂,在 *Pig-a* 基因突变试验中研究却甚少。本试验主要研究 CP 传统遗传毒性试验常用剂量 40 mg/kg 和同剂量下的 ENU,以 ENU 10 mg/kg 剂量,于给药后第 7 ~ 56 天对外周血 RBC^{CD59-} 发生率的影响。

表 2 ENU 和 CP 对各时间点大鼠外周血 RBC^{CD59-} 发生率的影响结果($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab.2 Effect of ENU and CP on the loss rate of RBC^{CD59-} at different time points

组别 Groups	外周血 RBC ^{CD59-} 发生率/ $\times 10^6$ Loss rate of RBC ^{CD59-} / $\times 10^6$						
	试验前 Day 0	给药后 第 7 天 Day 7	给药后 第 14 天 Day 14	给药后 第 21 天 Day 21	给药后 第 28 天 Day 28	给药后 第 42 天 Day 42	给药后 第 56 天 Day 56
溶媒对照组 Control group	44.70 ± 14.68	23.59 ± 6.74	22.12 ± 8.04	36.24 ± 3.03	43.07 ± 6.36	37.62 ± 7.20	41.68 ± 5.92
CP 40 mg/kg 给药组 CP 40 mg/kg group	43.92 ± 7.34	42.37 ± 8.55	31.34 ± 9.93	52.04 ± 19.79	65.31 $\pm 15.74^*$	125.41 $\pm 75.12^*$	160.41 $\pm 95.46^*$
ENU 10 mg/kg 给药组 ENU 10 mg/kg group	48.35 ± 13.27	30.61 ± 13.83	28.18 ± 15.68	33.09 ± 12.85	74.10 ± 27.62	81.75 $\pm 37.65^*$	76.02 $\pm 18.88^*$
ENU 40 mg/kg 给药组 ENU 40 mg/kg group	48.56 ± 17.72	59.44 $\pm 8.91^{**\#}$	63.04 $\pm 19.81^*$	81.80 $\pm 14.23^{**\#\#}$	223.49 $\pm 50.37^{**\#\#}$	251.96 $\pm 30.96^{**\#}$	258.77 $\pm 40.80^{**\#\#}$

注:与溶媒对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 ENU10 mg/kg 给药组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the ENU 10 mg/kg group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.



注:A:空白对照 FSC-A/SSC-A 图;B:空白对照 PE-A/SSC-A 图;C:空白对照 FITC-A/SSC-A 图;D:溶媒对照组;E:CP 40 mg/kg 给药组;F:ENU 10 mg/kg 给药组;G:ENU 40 mg/kg 给药组。

图 2 ENU 和 CP 对大鼠外周血 RBC^{CD59-} 发生率的影响结果

Note. A: FSC-A/SSC-A chart of the blank group. B: PE-A/SSC-A chart of the blank group. C: FITC-A/SSC-A chart of the blank group. D: Control group. E: CP 40 mg/kg group. F: ENU 10 mg/kg group. G: ENU 40 mg/kg group.

Fig.2 Effect of ENU and CP on the loss rate of RBC^{CD59-} at different time points

试验结果显示,CP 40 mg/kg 给药组给药后第 28 天出现阳性结果,至给药后第 56 天仍有显著性差异,检出阳性结果的时间较 ENU 时间延后,且引起大鼠体重的下降较为明显,不推荐作为该实验的阳性致突变物。ENU 40 mg/kg 给药组和 10 mg/kg 给药组分别于给药后第 7、42 天出现稳定的阳性结果,且 ENU40 mg/kg 剂量较 10 mg/kg 剂量引起外周血 RBC^{CD59-} 发生率高,但对大鼠体重没有影响。

可以得出,相同剂量下,ENU 引起大鼠外周血 RBC^{CD59-} 发生率升高效果优于 CP,且 40 mg/kg 剂量优于 10 mg/kg 剂量,检验周期以 28 d 为宜。

ENU 和 CP 作为常用烷化剂类致突变诱变剂,可直接与 DNA 发生交叉联结,干扰 DNA 和 RNA 功能,进而导致基因突变。ENU 引起外周血红细胞表面蛋白 CD59 缺失率高于 CP,猜想可能是 ENU 和 CP 对造血干细胞和有限自我更新能力的定向细胞的影响程度不同^[9]。ENU 是常用的有效的致突变剂,大量的文献报道其可引起 *Pig-a* 基因突变发生率的增加^[2,7,9-10],我们的试验结果也验证了这一结果。CP 作为常用的遗传毒性试验阳性物,Kimoto 等^[8]研究发现,连续 10 d 给予大鼠 5 mg/kg 剂量的 CP,外周血 RBC^{CD59-} 未见统计学差异,而 Walker 等^[11]研究发现给予大鼠 20 mg/kg 的 CP 8 周后,外周血 RBC^{CD59-} 是对照组的 2~3 倍,和我们的试验结果保持一致。但总的来说,CP 引起外周血 RBC^{CD59-} 效果并不明显,至少不会引起 X 染色体上 *Pig-a* 或者 *Hprt* 基因的明显突变。

但本试验不足之处在于,未能从多方面全面评价阳性致突变物引起的大鼠外周血 *Pig-a* 基因突变,后期试验可以增加对网织红细胞表面 CD59 缺失率,网织红细胞微核率等相关指标的研究^[12],采用多指标联合评价该方法灵敏度。

在本试验条件下,综合大鼠体重和外周血 RBC^{CD59-} 发生率两个指标,我们得出 ENU 40 mg/kg 剂量引起大鼠外周血 *Pig-a* 基因突变的效果更优,采用流式细胞术方法,能够利用小样本量相对迅速地得到较为精确的结果,具有连续、动态监测等优点,该方法可以考虑应用到常规毒性研究中,用于化学物、化妆品等的急性、慢性暴露引起的遗传毒性筛查。

参考文献:

[1] Bhalli JA, Shaddock JG, Pearce MG, et al. Sensitivity of the *Pig-a* assay for detecting gene mutation in rats exposed acutely to strong clastogens [J]. *Mutagenesis*, 2013, 28(4): 447-455.

[2] Dobo KL, Fiedler RD, Gunther WC, et al. Defining EMS and ENU dose-response relationships using the *Pig-a* mutation assay in rats [J]. *Mutat Res*, 2011, 725(1-2): 13-21.

[3] Kenyon MO, Coffing SL, Ackerman JI, et al. Compensatory erythropoiesis has no impact on the outcome of the in vivo *Pig-a* mutation assay in rats following treatment with the haemolytic agent 2-butoxyethanol [J]. *Mutagenesis*, 2015, 30(3): 325-334.

[4] 邓媛媛,郭隽,王雪,等. *Pig-a* 基因突变检测方法在药物遗传毒性评价中的应用及研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2012, 21(24): 2895-2898.

[5] 邓媛元. 体内 *Pig-a* 基因突变检测方法研究 [D]. 中国食品药品检定研究院, 2012.

[6] Dertinger SD, Phonetheswath S, Avlasevich SL, et al. Efficient monitoring of in vivo *Pig-a* gene mutation and chromosomal damage: summary of 7 published studies and results from 11 new reference compounds [J]. *Toxicol Sci*, 2012, 130(2): 328-348.

[7] Dertinger SD, Phonetheswath S, Franklin D, et al. Integration of mutation and chromosomal damage endpoints into 28-day repeat dose toxicology studies [J]. *Toxicol Sci*, 2010, 115(2): 401-411.

[8] Kimoto T, Chikura S, Suzuki-Okada K, et al. Effective use of the *Pig-a* gene mutation assay for mutagenicity screening: measuring CD59-deficient red blood cells in rats treated with genotoxic chemicals [J]. *J Toxicol Sci*, 2012, 37(5): 943-955.

[9] Phonetheswath S, Franklin D, Torous DK, et al. *Pig-a* mutation: kinetics in rat erythrocytes following exposure to five prototypical mutagens [J]. *Toxicol Sci*, 2010, 114(1): 59-70.

[10] Cammerer Z, Bhalli JA, Cao X, et al. Report on stage III *Pig-a* mutation assays using N-ethyl-N-nitrosourea-comparison with other in vivo genotoxicity endpoint [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2011, 52(9): 721-730.

[11] Walker DM, Seilkop SK, Scott BR, et al. *Hprt* mutant frequencies in splenic T-cells of male F344 rats exposed by inhalation to propylene [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2004, 43(4): 265-272.

[12] Stankowski LF Jr, Roberts DJ, Chen H, et al. Integration of *Pig-a*, micronucleus, chromosome aberration, and comet assay endpoints in a 28-day rodent toxicity study with 4-nitroquinoline-1-oxide [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2011, 52(9): 738-747.

[收稿日期]2017-07-27