

细菌回复突变试验数据的结果与统计分析

姜颖，胡哲文，娄蓓蕾，冯会红，白东梅

康龙化成（北京）生物技术有限公司

2016年8月

- 遗传毒理学评估受试物对遗传物质（DNA）以及细胞遗传过程的影响，包括致突变作用、姐妹染色单体交换、程序外DNA合成、DNA链断裂等，目前研究发现表观遗传变异也可造成表型变化。
 - Genetic Toxicology is a branch of the field of toxicology that assess the effects of chemical or physical agents on the hereditary material (DNA) and on the genetic processes of the cells: Mutagenicity, Sister chromatid exchange, unscheduled DNA synthesis, DNA strand breaks etc. and now epigenetic changes which lead to altered phenotypes.
- 药物非临床安全性评价的重要内容；通过一系列试验来检测受试物是否有遗传毒性，降低临床试验受试者和药品上市后使用人群的用药风险
- 与致癌性、生殖毒性有密切联系。
- 试验中呈阳性的化合物为潜在致癌剂和/或致突变剂，即可能诱导癌和/或遗传性疾病

选项一

1) 细菌回复突变试验

2) 体外染色体畸变试验或体外微核试验或体外小鼠淋巴瘤tk试验，这三个实验可任选其中一个。

3) 体内微核试验或体内骨髓细胞染色体畸变试验；动物给药后取外周血淋巴细胞作细胞遗传学分析也可接受，但不常用。

选项二

1) 细菌回复突变试验

2) 用两种不同组织做体内遗传毒性评估，通常包含体内微核试验和另一个体内试验。第二个体内试验通常选择评估动物肝脏DNA链断裂。

细菌回复突变试验是与致癌物检测最相关的体外试验。



Bruce Nathan Ames教授
(生于1928年)

- 在Ames试验被发明之前，只能用动物实验来检测受试物的致癌性-缺点：价格昂贵，耗时耗力。用动物实验筛选大量受试物的致癌性显得不切实际。
- 1970年代发明的Ames试验-价格低廉，易于操作，用于检测致突变剂或潜在的致癌剂。
- Ames试验发明后，对已经上市产品中可能有致癌作用的受试物进行检测，结果有些染发剂被召回。从1980年之前就开始染发的妇女，1/3以上易患非霍奇金氏淋巴瘤。

- 用于检测DNA损伤引起的基因突变。通过检测受试物在测试菌株某些特殊构建的突变体上引起突变的能力，即造成菌株从组氨酸/色氨酸依赖型向原养型突变，判断受试物是否为致突变剂。
- 试验需在加和不加S9代谢活化系统条件下同时进行。
- 在培养细菌的琼脂培养基中加入痕量的组氨酸或色氨酸，允许细菌前几个小时生长，表现为背景菌苔。当加入的组氨酸/色氨酸用尽后，只有发生了突变的细菌才可以继续生长成为肉眼可见的回复突变菌落。

实验类型	培养器具	实验时间	受试物用量
标准Ames	100mm细胞培养皿	两周	400 mg
Mini-Ames	六孔细胞培养板	1周	(1) 80mg测试五个菌株 (2) 30mg测试两个菌株
Micro-Ames	24孔细胞培养板	1周	15mg
Ames II	384孔板	1周	<5mg

GLP试验用标准Ames试验。

在药物筛选早期常用的试验有Mini-Ames试验、Micro-Ames试验、Ames II试验等，特点是用药量少。

Mini/Micro Ames试验通常选择2个菌株（即TA98和TA100，可检测98%致突变剂），为了消除另外2%的可能性，可选择与标准Ames试验相同的5个菌株。

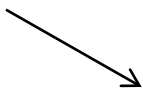
Ames II试验使用菌株TA98和混合菌株TA7001至7006，将细菌与受试物预培养及一系列稀释后，在30°C培养过夜，然后接种到含有选择性试剂5-FU及pH敏感剂溴甲酚紫的384孔上，通过紫外分光光度计检测培养基变黄的程度来判断受试物致突变性

- 1997年生效的OECD指导原则471 《细菌回复突变试验》
- 2007年中国CFDA于发布 《药物遗传毒性研究技术指导原则》
- 2010年生效的ICH S2R1，即 《人用药物遗传毒性测试和数据阐述指导原则》

大部分内容是一致的，但在关于实验是否需要重复问题上有所不同。

- CFDA指导原则要求无论实验结果如何 **都应重复** 试验。
- OECD指导原则471：明显阳性反应结果没有必要重复试验，**可疑阳性结果应修改适当试验条件后重复，而阴性结果若没有充足理由应重复。**
- ICH S2R1指出根据制药行业经验当**采用标准实验设计**时，若实验结果为**明显阴性或阳性，没有必要重复** 试验。

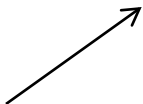
受试物



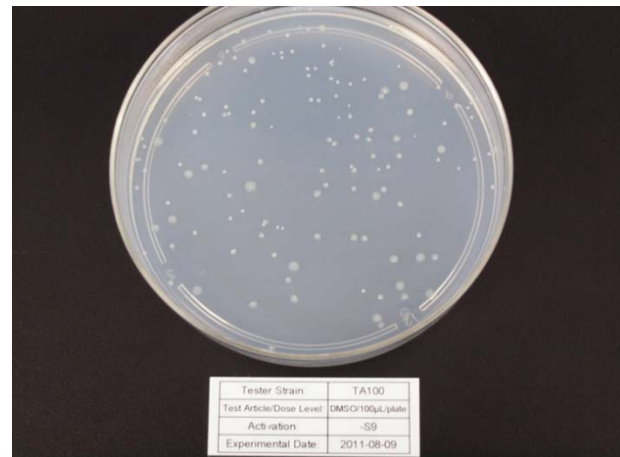
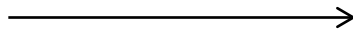
菌液



S9混合物/PBS



浇到平板，孵育
48-72小时



应选择至少5种菌株。

- TA1535
- TA1537或TA97或TA97a
- TA98
- TA100
- WP2 uvrA或WP2 uvrA (pKM101) 或TA102

每种菌株在编码组氨酸/色氨酸生物合成的操纵子上有不同的突变。

国外较多实验室选用WP2，而国内使用TA102较多

菌株	氨基酸标记物			其它相关突变		
	突变基因	突变类型	主要基因靶点	膜突变	DNA修复	
TA1535	<i>hisG46</i>	碱基置换	GC	rfa	uvrB	-
TA1537	<i>hisC3076</i>	移码	GC	rfa	uvrB	-
TA97	<i>hisD6630</i>	移码	GC	rfa	uvrB	pKM101
TA97a	<i>hisD6631</i>	移码	GC	rfa	uvrB	pKM101
TA98	<i>hisD3052</i>	移码	GC	rfa	uvrB	pKM101
TA100	<i>hisG46</i>	碱基置换	GC	rfa	uvrB	pKM101
WP2 uvrA	<i>trpE</i>	碱基置换	AT	-	uvrA	-
WP2 uvrA (pKM101)	<i>trpE</i>	碱基置换	AT	-	uvrA	pKM101
TA102	<i>hisG428</i>	碱基置换	AT	rfa	+	pKM101 pAQ1

- Rfa膜突变的存在增加了细胞膜对大分子化学物质的通透性。
- uvrB-菌株的切除修复功能有缺陷，菌株无法切除DNA加合物，使得这些菌株对大量致突变剂的致突变性和细菌毒性敏感。
- 质粒pKM101上含有muc⁺基因，参与DNA损伤诱导的DNA修复途径，在给予细菌抵抗致突变剂的细菌毒性同时，提高了易突变性。含有质粒pKM101的菌株自发回复突变菌落数较高。
- TA1537、TA97和TA97a均含有胞嘧啶的重复序列，位于相应的组氨酸靶位点内的突变敏感部位，它们对导致这些移码热点中碱基缺失的移码诱变剂的敏感性相似。

- TA98和TA100对大部分致突变剂敏感（有数据显示这两个菌株检测阳性的致突变剂占98%，因而在前期筛选试验中可只检测这两个菌株）。
- 羟基蒽醌类化合物仅可被菌株TA1537检测
- 氧化型突变剂、DNA交联剂及联氨仅可被含有AT位点突变的菌株TA102、WP2 uvrA、 WP2 uvrA (pKM101)检测
- 菌株TA1535与TA100都在hisG46基因位点发生碱基置换型突变，不同点仅是TA100含有pKM101质粒，从而增加突变敏感性。但是专家组通过大量数据显示，在已知的659种致突变剂中约5%受试物仅可被TA1535检测出，而不是TA100。如乙醛肟。

- 水：水溶性化合物
- 二甲基亚砜（DMSO）：无水溶性化合物首选
- 乙醇（95%）
- 丙酮
- 不常用溶媒：设立平行阴性对照

菌株	±S9	阳性药	给药剂量
TA98, TA100, TA1535, TA1537			3 µg/皿
TA97a, TA102, WP2 uvrA, WP2 uvrA (pKM101)	加S9	2-氨基蒽	20 µg/皿
TA98		2-硝基苄	10 µg/皿
TA100, TA1535		叠氮钠	1.2 µg/皿
TA97a, TA1537		ICR-191吡啶突变剂	1 µg/皿
TA102	不加S9	丝裂霉素C	1 µg/皿
WP2 uvrA		N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍	5 µg/皿
WP2 uvrA (pKM101)		N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍	1 µg/皿

- 设计一

先进行剂量探索实验(2个菌株)，然后细菌回复突变主实验（5个菌株）-以下以此试验设计为例，且选用菌株为TA98、TA100、TA1535、TA1537和WP2 uvrA

- 设计二

先进行初次回复突变实验（5个菌株），然后进行确证细菌回复突变实验（5个菌株，不同时间）

- 设计三

同一天进行两次回复突变实验（5个菌株）

- 指导原则上限剂量：5 mg/平皿或5 μ L/平皿（受试物为液体时）；
- 当受试物易溶但有细胞毒性时，应以产生明显毒性的剂量作为测试的最高剂量；
- 当受试物溶解度不佳，且没有细胞毒性时，应检测一个或多个含有沉淀的剂量；
- 当受试物溶解度不佳，但是可以看到剂量相关性的细胞毒性或诱变性时，则应以产生明显细胞毒性的剂量作为测试的最高剂量；
- 至少5个可供分析的剂量，且至少3个剂量应无细胞毒性或只有轻微毒性

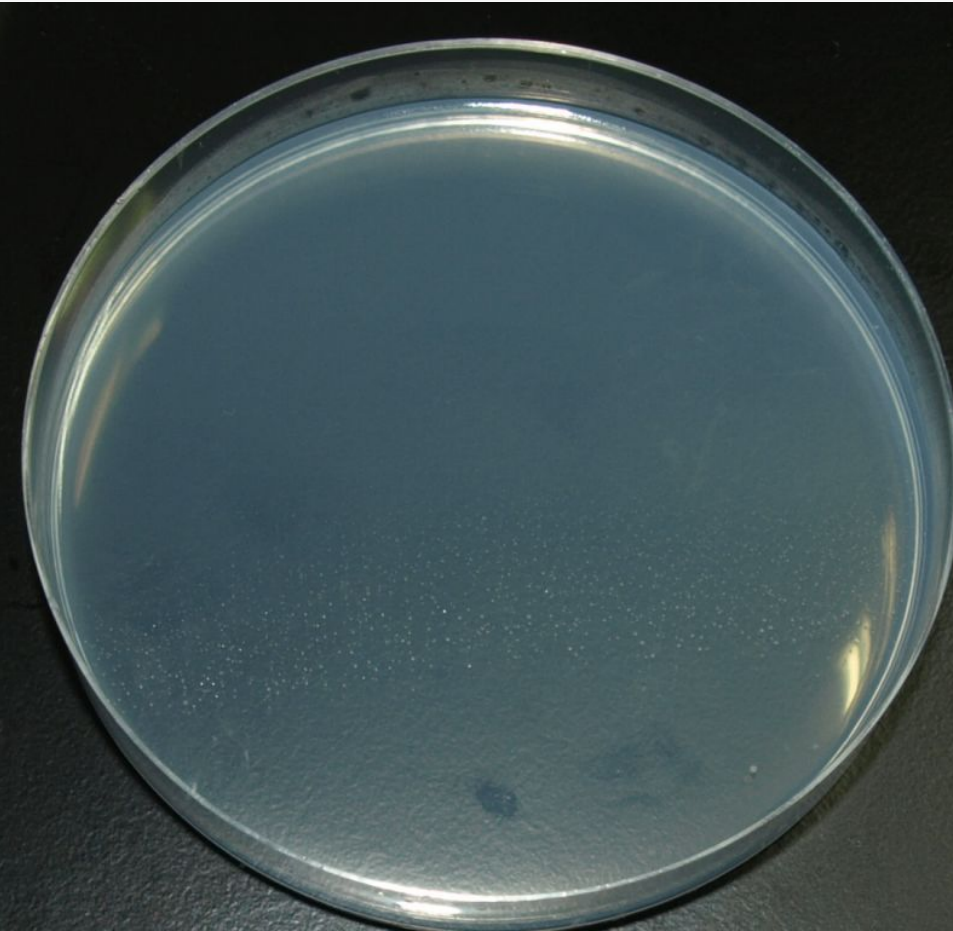
- 测试菌株为沙门氏菌TA100、大肠杆菌WP2uvrA
- 剂量水平，至少8个剂量，间距2-3.16倍，例如1.582， 5， 15.82， 50， 158.2， 500， 1582， 5000微克每皿
- 每个剂量单块平皿
- 结果需评估细菌毒性以及受试物沉淀情况。
- 为细菌回复突变主试验选择合适的剂量和间距。

- 根据剂量探索试验选择合适的剂量（细菌毒性、沉淀、上限剂量）
- 测试菌株选择TA98、TA100、TA1535、TA1537和WP2 uvrA
- 剂量水平，至少5个剂量，其中至少3个剂量应无毒性或只有轻微毒性
- 评估细菌毒性和沉淀情况。

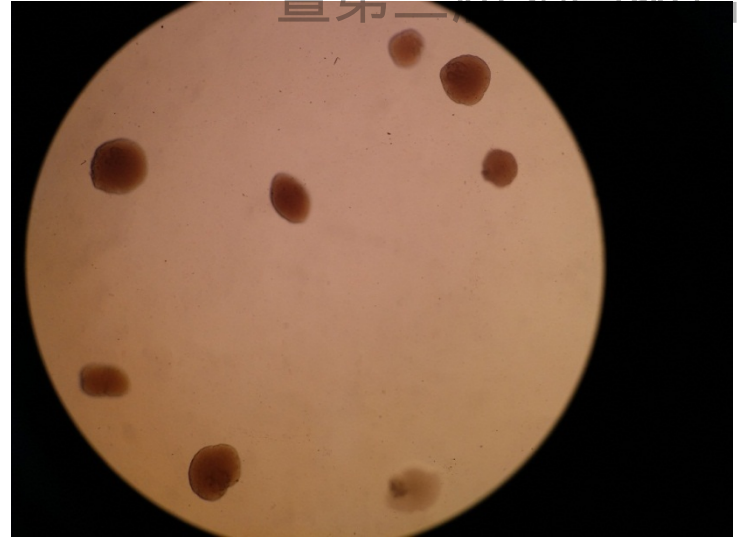
- 回复突变菌落数与溶剂对照组相比，减少50%以上，且具有剂量效应关系
- 背景菌苔的显著减少

代码	定义	背景菌苔特性
1	正常	健康的菌苔
2	轻度减少	与溶剂对照组相比较，显而易见可以观察到微菌落菌苔变稀疏，且微菌落个头增大
3	中度减少	与溶剂对照组相比较，可见明显稀疏的微菌落菌苔，且微菌落个头增大
4	极端减少	与溶剂对照组相比较，可见极端稀疏的微菌落菌苔，且微菌落个头增大
5	缺失	完全没有任何微菌落菌苔
6	沉淀物使菌苔模糊	由于供试品沉淀物的存在而不能精确评估背景菌苔
SP	轻度沉淀	在平皿中肉眼可见少许沉淀物，但不影响计数回复突变菌落
MP	中度沉淀	在平皿中肉眼可见沉淀物的数量不影响计数回复突变菌落，但需手工计数
HP	严重沉淀	在平皿中出现大量肉眼可见的沉淀，即使用手工计数也很困难。
任何一个浓度出现3-5的情况均认为是明显的细胞毒性		

- 当化合物细胞毒性极大时（背景菌苔完全消失），在高剂量组中可能会出现数量众多的针尖样菌落。这些针尖样菌落不是回复突变菌落，该平皿不应计数。



肉眼观察



显微镜下观察（一个视野）

- 测试菌株必须具备完整的遗传学特性（主实验中进行基因型检测）
- 所有测试菌株必须在每个溶剂对照平皿里显示出自发回变菌落数的特征（背景历史数据）
- 阳性对照剂量组为阳性（阳性历史数据）
- 至少有3个无毒性/轻微毒性且数据有效的剂量组用于对实验结果进行分析与评判

- 阳性：

从统计学分析上看，应具有：（1）剂量效应关系；（2）回复突变菌落平均数增加，峰值大于等于对应溶媒对照组的2倍（TA98、TA100和WP2 uvrA)或3倍（TA1535和TA1537）

从生物学意义上看，应考虑（3）实验室历史数据范围

- 阴性：当不满足上面任何一条时，可判断为阴性。

- 可疑阳性：

（1）出现剂量反应关系，但是回复突变菌落数的增加值没有达到各自域值以上；或者（2）没有剂量反应增加关系，但是回复突变菌落数的增加值等于或大于各自的域值。

S9	参数	鼠伤寒沙门氏菌					大肠杆菌	
		TA98	TA100	TA1535	TA1537	TA102	WP2uvrA	Wp2uvrA (pKM101)
-	均数	17	123	13	6	253	13	170
	SD	6	32	5	3	51	3	50
	最小	5	69	3	2	183	6	82
	最大	41	208	31	19	362	23	255
+	均数	21	123	9.9	9.8	302	13	182
	SD	7	29	4	3	86	3	22
	最小	9	74	3	1	173	5	138
	最大	49	224	27	15	460	24	207

	剂量 (μg / 皿)	TA100	毒性代码 ^a	WP2-uvrA	毒性代 码 ^a
代谢活化系统: S9					
DMSO	0.1mL/皿	158	1	16	1
供试品	1.582	172	1	24	1
	5	139	1	15	1
	15.82	160	1	16	1
	50	150	1	19	1
	158.2	143	3	16	1
	500	121	4	19	1
	→ 1582	81	4	31	1
	5000	0	5	21	1
代谢活化系统: 无					
DMSO	0.1 mL / 皿	141	1	15	1
供试品	1.582	158	1	17	1
	5	128	1	13	1
	15.82	146	1	28	1
	50	130	1	17	1
	158.2	127	3	21	1
	500	151	4	12	1
	→ 1582	65	4	11	1
	5000	0	5	19	1

根据剂量探索实验的结果，为主实验选择的剂量为沙门氏菌：5、15.82、50、158.2、500、1582和5000 μg / 皿；WP2 uvrA为50、158.2、500、1582和5000 μg / 皿。

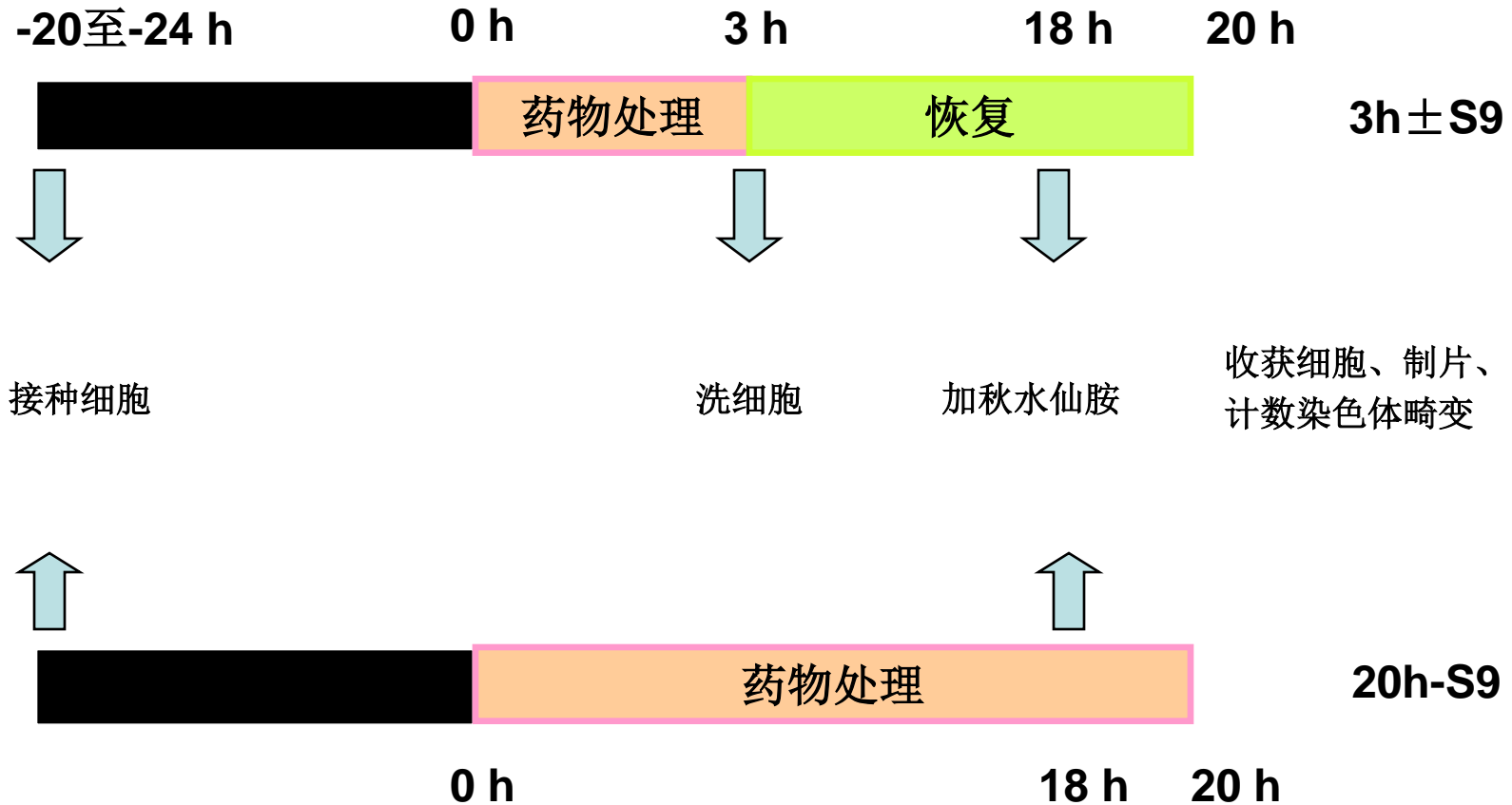
菌株	剂量 (μ g/孔)	S9 混 悬液	单个平皿回复突变 菌落数			平均菌落 数	标准差	比率	毒性代码 ^a
TA98	30	+	4	2	5	3.67	1.53	1.22	1
	60		5	1	2	2.67	2.08	0.89	1
	125		4	4	2	3.33	1.15	1.11	1
	250		6	7	9	7.33	1.53	2.44	1
	500		3	5	4	4.00	1.00	1.33	1
	1000		2	1	4	2.33	1.53	0.78	1
	溶媒		4	3	2	3.00	0.89	1.00	1
	阳性对照		16	21	20	19.00	2.65	6.33	1

上述数据为Mini Ames数据,在250 μ g/孔剂量菌株TA98上回复突变菌落增加超过2倍。但是未见剂量效应关系。判断为可疑阳性。需重复实验，重复实验结果为阴性。

菌株	剂量 ($\mu\text{g}/\text{皿}$)	S9 混 悬液	单个平皿回复突变 菌落数			平均菌落 数	标准差	比率	毒性代码 ^a
TA100	15.8	+	139	148	144	143.76	19.97	0.95	1
	50		161	179	171	169.49	8.54	1.12	1
	158		219	234	229	228.51	13.75	1.51	1
	500		239	247	246	242.13	12.22	1.60	1
	1582		265	287	274	278.45	11.81	1.84	2
	5000		225	213	235	228.50	18.56	1.51	4
	溶媒		152	152	150	151.33	1.15	1.00	1
	阳性对照		628	656	660	648.00	17.44	4.28	1

未见回复突变菌落数增加超过2倍，但是可见明显的剂量效应关系。需重复实验。在1582至5000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 之间选择几个剂量测试，如1000、2000、3000、4000、5000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 。

谢谢!



20小时相当于CHO细胞1.5个生长周期

- (1) 中国仓鼠卵巢细胞 (CHO)
- (2) 中国仓鼠肺成纤维细胞 (CHL)
- (3) 中国仓鼠肺成纤维细胞V79
- (4) 人外周血淋巴细胞 (HPBL)
- (5) TK6

HPBL和TK6含有P53

(1) 0.5 mg/mL或者1mM，取较低者（分子量小于200时可以适当提高最高测试浓度）

(2) 当有沉淀时，最高剂量应是可以看到清晰沉淀的最低剂量

(3) 当有细胞毒性时，最高剂量细胞毒性应在 $55 \pm 5\%$ （用细胞数计算毒性）或 $45 \pm 5\%$ 阴性（用有丝分裂指数计算毒性）。

使用Fisher's确切概率法比较给药组与相应溶媒对照组畸变细胞发生频率差异的显著性。作多重比较时，P值将经过Bonferroni调整。当 $P \leq 0.05$ 时，可认为差异具有显著性。

阳性：

- (1) 剂量效应关系；
- (2) 统计学分析
- (3) 实验室历史数据范围

阴性

可疑阳性（需通过重复试验证实）



安乐死、解剖、收集骨髓

制片、固定、染色

镜检

组别	给药处理	动物数	采集骨髓时 间点 (± 1 小时)
1	溶媒对照	5 雄/5 雌	24
2	溶媒对照	5 雄/5 雌	48
3	供试品, 低剂量	5 雄/5 雌	24
4	供试品, 中剂量	5 雄/5 雌	24
5	供试品, 高剂量	7 雄/7 雌	24
6	供试品, 高剂量	7 雄/7 雌	48
7	阳性对照	5 雄/5 雌	24

1. 实验为单次给药, 或者1天内多次给药以增加暴露量
2. 高剂量组7只动物是为了防止受试物毒性引起动物死亡, 微核分析仅分析5只。
3. 若仅采用单性别动物, 每组至少6只动物。

组别	给药处理	动物数	采集骨髓时 间点 (± 1 小时)
1	溶媒对照	5 雄/5 雌	24
2	供试品, 低剂量	5 雄/5 雌	24
3	供试品, 中剂量	5 雄/5 雌	24
4	供试品, 高剂量	7 雄/7 雌	24
5	阳性对照	5 雄/5 雌	24

1. OECD指导原则更倾向于实验为至少给药两次, 可将微核实验整合到一般毒理啮齿动物实验中。
2. 高剂量组7只动物是为了防止受试物毒性引起动物死亡, 微核分析仅分析5只。
3. 若仅采用单性别动物, 每组至少6只动物。

剂量水平:

- (1) 给药时长小于2周，**2000 mg/kg**为测试的上限剂量；若给药时长大于等于2周，**1000 mg/kg**为测试的上限剂量
- (2) 最大耐受剂量（**MTD**），即该剂量为产生一定毒性的剂量且预计高于该剂量时，以相同的给药方式，将会致死
- (3) 最大可给药剂量（**MFD**）

实验系统:

- (1) 大鼠
- (2) 小鼠

运用ANOVA方法对每个性别的供试品给药组和溶媒对照组进行分析。如果结果显著，则再运用Dunnett检测如下进行分析：将供试品各剂量组的MN-PCE水平和对应的溶媒对照组进行一一比较分析。

如果使用至少一个供试品剂量组，运用Cochran-Armitage方法对供试品的剂量相关效应进行分析。

当P值小于等于0.05时，认为有显著性差异。

(1) 阳性结果

供试品如果至少一个剂量所诱导的MN-PCE形成率，与相应的溶媒对照组相比，具有统计学意义的显著上调，并且同时具有剂量-反应趋势（若使用至少一个供试品剂量组），则可判定为阳性。

(2) 可疑结果

供试品如果满足下列任何一点，可以判定为可疑：

- 如果使用至少一个剂量组，仅一个剂量水平所诱导的MN-PCE形成率，与相应的阴性对照组相比，统计学上显著上调，但是并没有观察到剂量-反应趋势。
- 如果使用至少一个剂量组，任何剂量水平的供试品所诱导的MN-PCE形成率，与相应的阴性对照组相比，均无统计学意义的显著上调，但是却观察到显著的剂量相关上调趋势。

(3) 阴性结果

供试品如果不满足上列任何一个标准，可以判定为阴性。