研究进展

Pig-a 基因突变试验研究进展

郑丹丹,秦美蓉,王晓炜,王　平*

(深圳市药品检验研究院,深圳市药品质量标准研究重点实验室,深圳　518057)

【摘要】 建立灵敏可靠的遗传毒性试验方法是全面充分评价化学物质致突变性的必要保障。近年来,一种基于 Pig-a 基因的新型基因突变试验成为研究热点,该方法具有灵敏度高,成本低,与其他遗传毒性试验整合潜力高,减少动物使用等优点,有望成为未来评估体内基因突变的新方法。本文就 Pig-a 基因突变试验的研究与应用进展进行综述。

【关键词】 Pig-a 基因;Pig-a 基因突变试验

【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2018) 08-0135-06

doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.08.024

Research advances for Pig-a gene mutation assay

ZHENG Dandan, QIN Meirong, WANG Xiaowei, WANG Ping*

(Shenzhen Institute for Drug Control, Shenzhen Key Laboratory of Drug Quality Standard Research, Shenzhen 518057, China)

【Abstract】 It is important to establish sensitive and reliable method for genotoxicity tests for evaluating the potential mutagenicity of chemicals. In recent years, a new in vivo genotoxicity test based on Pig-a gene mutation has been developed and recognized to be useful for regulatory safety assessment because of its potential for clinical translation, its remarkable sensitivity to mutagenic agents, its relatively low cost, and its potential for integration with other in vivo tests as well as for reducing animal use. This paper mainly reviews the application and development of the Pig-a gene mutation assay.

【Keywords】 Pig-a gene; Pig-a gene mutation assay

致突变物对人类健康影响重大,其与肿瘤、动脉粥样硬化和糖尿病等基因相关疾病及遗传疾病的发生密切相关。在药物开发的早期阶段,充分调查化学物质的致突变性,准确对其危害及风险进行识别和评估至关重要。遗传毒性试验的目的即是检测化学物质致突变性,对新型药物、农药、香精及香料等的开发过程中化学物质的危害识别和风险评估起重要作用。因此建立灵敏可靠的遗传毒性试验方法是全面充分评价人用化学物质致突变性的必要保障。国际人用药物注册技术协调会议(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use,ICH)和经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)关于遗传毒性试验的指导原则有明确的阐述,尽量按照包括多个遗传终点、原核生物、真核生物、体内试验、体外试验、体细胞、生殖细胞等几个原则设置试验组合,尽可能全面地预测受试物的致突变性,ICH 于 2011 年 11 月批准了遗传毒性研究指导原则的修订案 S2(R1),修订了遗传毒性试验标准组合,更强调体内试验在遗传毒性检测中的重要性[1]。

[基金项目]深圳市科技计划项目(JCYJ20140418153354413)。

[作者简介]郑丹丹,药师,研究方向:生物及毒理研究。E-mail:13580591839@163.com

[通信作者]王平,博士,主任药师,研究方向:毒理及安全评价新方法研究。E-mail:wangping662@sina.com

近年来,一种基于 Pig-a 基因的基因突变试验成为研究热点,该方法基本原理是啮齿动物暴露于受试物后,Pig-a 基因突变导致细胞表面膜蛋白缺失,通过检测膜蛋白缺失的细胞频率,对化学物质致突变性进行定量分析。Pig-a 基因突变试验消耗血量少,与其他遗传毒理学试验整合的潜力高,且能在普通的动物品系中进行,相对于使用转基因动物的检测方法更节省时间、成本,同时能减少动物使用,符合动物福利及 3R 原则,是未来评价人用化学物质致突变性的重要方法。2014 年 ICH M7 指南已将该测定法描述为用于体外突变阳性结果后续试验的合适系统[2]。2015 年 5 月该方法被 OECD 批准纳入 OECD 指导原则并开始起草工作,预计 2020 年正式生效[3]。本文就 Pig-a 基因突变试验的原理、方法、应用及展望等方面进行综述。

1 试验原理

1.1 Pig-a 基因

磷脂酰肌醇聚糖 A 类(Pig-a)基因(人类和其他灵长类动物为 PIG-A;大小鼠为 Pig-a)位于染色体 Xp22.1 上,全长约 17 kb,共有 6 个外显子[4]。对 Pig-a 基因的研究源于阵发性睡眠性血红蛋白尿症(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH)。PNH 是一种获得性造血干细胞缺陷性疾病,其特征在于溶血性贫血[5]。研究发现,在造血干细胞中,糖基磷脂酰肌醇(GPI)获得性缺陷会导致 PNH[6]。GPI 用于锚定各类真核蛋白质至细胞膜上,对膜表面蛋白的表达至关重要[7]。Nishimura 等[8]分析了 146 例 PNH 患者,发现导致 GPI 缺陷的基因突变类型均在 Pig-a 基因座内。Rosse 等[9]研究表明,在已检测的 PNH 患者血细胞中,发现都有 Pig-a 基因突变导致 GPI 锚定蛋白(GPI-APs)部分或全部缺失的现象。这表明,Pig-a 基因突变可能会导致 GPI 缺陷从而导致 GPI-APs 表达障碍,最终出现 PNH 症状。后证实,Pig-a 基因参与 GPI 生物合成的第一步。GPI 在内质网中合成,第一步合成是在 N-乙酰葡糖胺(GlcNAc)转移酶的催化下,将 GlcNAc 从 UDP-GlcNAc 转移到磷脂酰肌醇(PI)中,生成 GlcNAc-PI[10]。GPI 生物合成中的第一步需要 Pig-a 基因编码 GlcNAc 转移酶的催化亚基,同时还需要基因 Pig-h 和 Pig-c 的参与,上述任意一个基因的突变都能导致该反应的完全缺陷[11]。

GPI 整个合成过程中约有二十几个基因参与,参与第一步合成的基因还有 Pig-c、Pig-h 等。理论上涉及 GPI 合成的任何一个基因突变都可能导致 GPI 缺陷,然而,所有其他基因都位于常染色体上,必须发生两个等位基因的突变才能导致 GPI 缺陷,而这是非常罕见的。由于人类在胚胎发育中,两条 X 染色体的一条发生了随机灭活,因此 X 连锁的 Pig-a 基因只需单一突变足以诱导 GPI 缺陷[12]。所以,GPI 缺陷表型通常归因于 Pig-a 基因突变。Miura 等[13]对 GPI 缺陷型大鼠淋巴细胞中的 Pig-a 基因进行了测序,并证明在这种情况下,GPI 缺陷表型实际上等同于突变体基因型。此外 Kawagoe 等[14]还证实 X 染色体上基因的结构、功能和位置存在高度的种间保守性。这意味着采用 Pig-a 基因突变试验进行化学物遗传毒性评价,有利于将动物试验结果外推于人。

1.2 Pig-a 基因突变试验

1999 年,Araten 等[15]首次提出了 Pig-a 基因可作为体内基因突变试验的报告基因。2008 年 Bryce 和 Miura 等[16-17]使用 Pig-a 作为突变报告基因成功建立啮齿动物 Pig-a 基因突变试验方法,并证明在阳性剂处理的啮齿动物中 Pig-a 基因突变表型的红细胞增加。后在美国国立卫生研究院及美国环境健康科学院(NIH-NIEHS)的资金支持下,日本环境诱变剂学会(J-EMS),美国食品药品监督管理局(FDA)和国际生命科学研究院健康与环境科学研究所(ILSI-HESI)等组织对方法进行优化,得到能分析更多总红细胞(RBC)和网织红细胞(RET)的先进方法,增强了方法的灵敏度[18]。

遗传毒性测试国际工作组(IWGT)Pig-a 工作小组在 2013 年报告中提出体内大鼠 Pig-a 测定法可在监管毒理学中发挥重要作用,但也指出一些数据缺口。后各实验室进行多次 Pig-a 试验,填补了 IWGT 提出的数据缺口。Kenyon 等[19]测试了可能通过干扰红细胞生成而出现阳性反应的化学物质,结果表明再生造血不会干扰 Pig-a 基因突变的测定结果。Stankowski 等[20]将 Pig-a 基因突变试验、微核试验、染色体畸变试验以及彗星试验整合到 28 d 大鼠毒性试验。Bemis 等[21]通过区分遗传毒性致癌物氨基甲酸乙酯和结构相似的非遗传毒性化学物氨基甲酸甲酯来评估大鼠 Pig-a 检测法的特异性,结果表明 Pig-a 检测法具有区分遗传毒性和非遗传毒性的价值。Labash 等[22]通过对比雄性和雌性大鼠的自发突变频率,以及比较使用 N-乙基-N-亚硝基脲(ENU)诱导后两种性别大鼠的反应,证明雄性和雌性大鼠同样适用于 Pig-a 检测。Godin-Ethier 等[23]对方法在实验室内的重现性、变异性和血液储存稳定性进行评估,结论是大鼠 Pig-a 测定法是可靠的。

Roberts 等[24]采用一次性给药以及相同累积剂量重复给药两种方案评估了 4-硝基喹啉-1-氧化物(4NQO)诱导 Pig-a 突变型的结果表明,重复给药方案在 Pig-a 测定中产生更有效的反应。

通过 DNA 测序分析验证突变体是“真的”Pig-a 基因突变体,对于突变频率的确定至关重要。该验证已在大鼠 CD48 缺陷的 T 细胞中,通过流式细胞术分选突变细胞和扩增单细胞的 Pig-a 基因测序得以进行[25]。Revollo 等[26]将随机 DNA 标识符(mutation analysis with random DNA identifiers, MARDI)应用于 DMBA(dimethylbenz(a)anthracene)处理的大鼠的 CD48 缺陷型 T 细胞的异质库的 Pig-a cDNA 分析中,结果 MARDI 检测到几乎所有先前通过克隆分析鉴定的 Pig-a 突变。

2　实验方法

2.1　流式细胞术法

使用流式细胞术对外周血 Pig-a 基因突变进行检测的方法目前主要有两种,北美和欧洲最常用的方法是使用试剂盒 In Vivo MutaFlow® (Litron Labs),其原理是:首先通过分离液去除白细胞,然后用带荧光标记且能与 GPI-APs 结合的抗体(如大鼠为抗 CD59 抗体)孵育细胞。野生型红细胞由于细胞膜表面 GPI-APs 正常表达,因此能够与抗体结合而带有荧光标记,突变型细胞因表面缺乏 GPI-APs 不与抗体结合不带有荧光标记。使用流式细胞仪进行检测,即可通过荧光信号的强弱区分识别野生型红细胞及突变型红细胞。同时使用带有荧光的核酸染液进行孵育,即可区分 NCE(normochromatic erythrocyte)及 RET(reticulocyte)。通过磁性分选来特异性地减少样品中的野生型细胞,可有效评估更多的 RBC(erythrocyte)和 RET,减少测量时间,降低测量误差[27]。另外,日本有实验室使用荧光抗体 HIS49(大鼠)检测红细胞;荧光抗 CD59 抗体(大鼠)检测 GPI 锚定标记,同时转铁蛋白受体(CD71)作为 RET 的标记。一项比较两种方法的研究结果发现产生了类似的 Pig-a 突变频率[28]。

流式细胞术法检测只需要少量血量,对动物只是微创,符合动物福利的要求,且能进行多次采血,可使用同一组动物进行长期研究。由于使用的是普通啮齿动物,相对于转基因小鼠基因突变试验以及 Hprt 基因突变试验成本更低,检测时间短,适用于常规检测。采用流式细胞术法还可以将 Pig-a 基因突变试验整合到 28 d 大鼠毒性试验中,节省动物和成本,符合 3R 原则。与此同时,通过流式细胞术分选突变细胞和 Pig-a 基因测序能对突变体进行确证,这对于突变频率的确定至关重要。但流式细胞术法对适用 Pig-a 检测的组织有一定的限制。例如,样品必须制备单细胞悬液,并且细胞不能经过任何可能改变细胞表面膜蛋白的处理(如蛋白水解消化)等。目前,这两个要求限制了 Pig-a 测定法只能在造血组织中应用。

2.2　有限稀释克隆法

气单胞菌溶素原是由细菌性病原体嗜水气单胞菌分泌的毒素。气单胞菌溶素原释放后通过蛋白水解激活形成气单胞菌溶素,后者结合敏感细胞后低聚,插入细胞膜并形成破坏渗透性屏障的离散通道从而杀死靶细胞[29]。Diep 等[30]证明,对气单胞菌溶素敏感的细胞共同特征是细胞表面都含有 GPI 锚。Brodsky 等[31]发现 PNH 血细胞(红细胞,淋巴细胞和粒细胞)对气单胞菌溶素的细胞毒性作用具有抗性,且暴露于气单胞菌溶液的 PNH 细胞的裂解百分比与通过流式细胞术测定的样品中 $CD59^+$ 细胞的百分比平行。Abrami 等[32]发现气单胞菌溶素原在细胞表面与 GPI 结合后被蛋白水解成气单胞菌溶素,其最终形成跨膜孔并引起细胞死亡。2008 年,Miura 等[13]基于上述原理建立了通过使用气单胞菌溶素原及 cDNA 测序对大鼠脾淋巴 T 细胞 Pig-a 基因突变进行检测的方法,即有限稀释克隆法。该法原理是:使用气单胞菌溶素原作为选择剂,气单胞菌溶素原能与 GPI APs 结合水解产生气单胞菌溶素,后者导致细胞膜破损,细胞死亡。而 Pig-a 基因突变细胞由于 GPI APs 表达缺陷,不与气单胞菌溶素原结合,从而得以存活,在 96 孔板内长成集落。

有限稀释克隆法能够直观地鉴别突变细胞,获得的突变细胞集落还可进行更进一步的研究。但该方法需要对细胞进行培养,较流式细胞术法耗时较长,且与其他试验的整合能力较差。现使用该方法进行 Pig-a 基因突变检测的试验较少。

3　应用进展

2008 年,HESI 的遗传毒理学技术工作小组成立了 Pig-a 工作小组,致力于方法的进一步优化。在 NIH-NIEHS 的基金支持下,由 Litron Labs 和 ILSI-HESI 的科学家联合制定统一的实验方案,对 Pig-a 测定法进行国际联合验证。该验证计划由美国国家毒理学研究中心、辉瑞、雅培、诺华和拜耳制药等 14 个不同机构组织的实验室参与,统一采用 Litron Labs 提供的试剂盒(大鼠品系和流式细胞仪由实验

室自行决定),检测 41 个试剂,验证该方法的灵敏度和重复性。验证实验分四个阶段[33-38]。第Ⅰ阶段为参加方法验证实验室的信息收集,第Ⅱ阶段为参加验证的 14 个实验室用相同剂量的 ENU 及试剂盒检测突变表型 RBC^{CD59-} RET^{CD59-} 发生率,并与 Litron Labs 数据进行比对[33]。第Ⅲ阶段采用 28 天重复剂量设计,使用 ENU[34], DMBA[35], N-甲基-N-亚硝基脲[36], BaP[37] 和 4-NQO[38] 等试剂进行试验,每个试剂至少有两个实验室参与验证。第Ⅳ阶段主要是对弱致突变剂和非致突变剂进行测试,增加实验系统对弱致突变剂和非致突变剂的灵敏度以及结果可信度。验证第Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ阶段的报告现已发表,初步证明 Pig-a 基因突变试验具有良好的灵敏度、可靠性和重现性,还建立了通过免疫磁性分离技术增加样品可评估细胞量的方法[39]。第Ⅳ阶段研究也已获得进展,现部分工作已被公布[25, 40-41]。国内仅中国医药工业研究总院的国家上海新药安评中心参与该验证计划,评价了 ENU、三聚氰胺、5-氟尿嘧啶(5-FU)和 4NQO 四种不同遗传毒性作用机制化合物在 SD 大鼠体内微核试验和 Pig-a 基因突变试验中的遗传毒性,并作为国际联合验证结果的一部分总结于 IWGT 对 Pig-a 试验的总结报告中[42]。

目前,Pig-a 基因突变试验还可在以下方面开展工作[43]:①进一步确认 Pig-a 基因突变型与 GPI 缺陷表型之间的关系;②分析甲基化/去甲基化对测定性能的影响;③对更多非致突变剂进行测试,尤其是通过不同机制干扰红细胞生成的试剂;④检查长时间给药(如 90 d)对测定性能的影响;⑤使用大鼠以外(如人,小鼠,狗,猪等)的实验动物建立方法;⑥建立使用其他血细胞(如 T 淋巴细胞和粒细胞)的方法;⑦探索 Pig-a 测定法在测量固体组织(例如肝脏)细胞突变的实用性;⑧开发体外细胞测定法;⑨探索测定法用于测量生殖细胞中的突变等。

4 展望

迄今为止,大鼠已作为 Pig-a 法一种关键的啮齿动物模型,用于监管毒理学研究。然而,Pig-a 基因突变试验能否在小鼠模型中成功应用至关重要,因为小鼠在毒理学中也发挥着非常重要的作用。Phonethepswath 等[44]将 CD-1 小鼠暴露于 DMBA 和 ENU,结果显示 RET 和 RBC 中检测到明显的 Pig-a 基因突变,结论是 Pig-a 检测可以有效地应用于小鼠。Bhalli 等[45]使用不同品系的 C57BL/6 小鼠暴露于 ENU 进行 Pig-a 检测,结果显示 RET 和 RBC 中检测到明显的 Pig-a 基因突变。后有研究使用小鼠 Pig-a 法测试了几种多环芳烃(PAH),其中 DMBA 和苯并[a]芘(benzopyrene, BaP)检测到明显的 Pig-a 基因突变。而 BaP 的诱变效应在几种品系小鼠不同暴露途径下是显著的,包括在 Muta™ 小鼠模型中灌胃给药 28 d;在 *Gptδ* 小鼠中单次灌胃给药;在 C57BL/6 野生型和 DNA 修复缺陷型小鼠中腹腔注射 3 d;在 CD-1 小鼠中灌胃给药 3 d[44,46-50]。这表明,对于典型的致突变剂 PAHs DMBA 和 BaP,小鼠 Pig-a 基因突变测定能够揭示其遗传毒性潜力。目前基于小鼠进行的 Pig-a 检测数据相对较少,需要使用更多致突变剂、弱致突变剂及非致突变剂进行试验来更进一步表征 Pig-a 检测法在小鼠中的灵敏度。

Pig-a 基因在哺乳动物中具有高度的保守性,也为人群中开展 Pig-a 基因突变检查以及转化毒理学研究提供了可能。Dobrovolsky 等[51]研究表明 PIG-A 测定可用于检测人体内的体细胞突变。Dertinger 等[52]研究表明可使用基于啮齿动物的标记和分析方案对人类 PIG-A 突变表型细胞频率进行有效和可靠的评估。Cao 等[53]对人类的自发突变频率(MF)、男女性 MF 对比、MF 和年龄之间的相关性、MF 在吸烟者和非吸烟者之间的差异以及个体差异等进行了研究,为人类 PIG-A 测定法的建立提供了基础数据。

此外,检测生殖细胞中的突变可能会成为 Pig-a 测定法重要的应用方向之一。Ji 等[54]应用 Pig-a 测定法对大鼠附睾精子进行生殖细胞诱变性评估,结果和预期频率之间达到良好的一致性,认为大鼠表皮精子 Pig-a 检测是评估生殖细胞致突变性的有希望的方法。

5 小结

GPI 生物合成途径在大多数哺乳动物物种中是保守的,包括小鼠、大鼠、猴以及人类等。在人类和实验动物中评估 Pig-a 基因突变的能力,意味着可在动物模型中测试人类对潜在致突变剂的反应。此外,人类 PIG-A 测定可能在临床环境中具有价值,在实验动物中进行的 Pig-a 测定可为体内内源性突变提供参考。例如,Pig-a 和 PIG-A 测定可用于监测基因毒性化合物的长期毒性[55],有助于评估继发性恶性肿瘤发生的可能性。此外,PIG-A 测定还可用于流行病学研究,用于监测暴露于潜在不利环境中的人群的健康状况(突变累积)。

虽然 Pig-a 测定目前在组织覆盖方面存在局限

性,且直接证明红细胞反应的突变基础非常困难。但是,由于 Pig-a 测定法具有与其他试验整合潜力高,较高的临床参考价值,对致突变剂反应敏感,成本相对较低,测定终点为内源性哺乳动物基因表型突变等优点,笔者认为 Pig-a 测定法未来将成为体内遗传毒理学检测的重要方法。

参考文献:

[1] ICH. Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use[S]. 2011.

[2] ICH. Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk [S]. 2014.

[3] 常艳, 周长慧, 张铭,等. 体内 Pig-a 基因突变实验的研究进展[C]. 中国毒理学会第七次全国毒理学大会暨第八届湖北科技论坛论文集,2015:113 – 114.

[4] Iida Y, Takeda J, Miyata T, et al. Characterization of genomic PIG-A gene: a gene for glycosylphosphatidylinositol-anchor biosynthesis and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria[J]. Blood, 1994,83(11):3126 – 3131.

[5] Oni SB, Osunkoya BO, Luzzatto L. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: evidence for monoclonal origin of abnormal red cells [J]. Blood, 1970, 36(2):145 – 152.

[6] Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, et al. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria[J]. Cell, 1993, 73(4):703 – 711.

[7] Ferguson MA, Williams AF. Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. Annu[J]. Annu Rev Biochem, 1998, 57: 285 – 320.

[8] Nishimura J, Murakami Y, Kinoshita T. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an acquired genetic disease[J]. Am J Hematol, 1999, 62(3):175 – 182.

[9] Rosse WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1992,178:163 – 173.

[10] Doering TL, Masterson WJ, Englund PT, et al. Biosynthesis of the glycosyl phosphatidylinositol membrane anchor of the trypanosome variant surface glycoprotein. Origin of the nonacetylated glucosamine[J]. J Biol Chem, 1989, 264(19): 11168 – 11173.

[11] Watanabe R, Inoue N, Westfall B, et al. The first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is mediated by a complex of PIG-A, PIG-H, PIG-C and GPI1[J]. EMBO J, 1998, 17(4): 877 – 885.

[12] Bessler M, Hillmen P, Longo L, et al. Genomic organization of the X-linked gene(PIG-A) that is mutated in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and of a related autosomal pseudogene mapped to 12q21[J]. Hum Mol Genet, 1994, 3(5):751 – 755.

[13] Miura D, Dobrovolsky VN, Mittelstaedt RA, et al. Development of an in vivo gene mutation assay using the endogenous Pig-A gene: II. Selection of Pig-A mutant rat spleen T-cells with proaerolysin and sequencing Pig-A cDNA from the mutants[J]. Environ Mol Mutagen,2008, 49(8):622 – 630.

[14] Kawagoe K, Takeda J, Endo Y, et al. Molecular cloning of murine Pig-a, a gene for GPI-anchor biosynthesis, and demonstration of interspecies conservation of its structure, function, and genetic locus[J]. Genomics, 1994, 23(3): 566 – 574.

[15] Araten DJ, Nafa K, Pakdeesuwan K, et al. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999, 96(9): 5209 – 5214.

[16] Bryce SM, Bemis JC, Dertinger SD. In vivo mutation assay based on the endogenous Pig-a locus. Environ[J]. Environ Mol Mutagen, 2008, 49(4): 256 – 264.

[17] Miura D, Dobrovolsky VN, Kasahara Y, et al. Development of an in vivo gene mutation assay using the endogenous Pig-A gene: I. Flow cytometric detection of CD59-negative peripheral red blood cells and CD48-negative spleen T-cells from the rat. Environ[J]. Environ Mol Mutagen,2008, 49(8): 614 – 621.

[18] Kimoto T, Chikura S, Suzuki K, et al. Further development of the rat Pig-a mutation assay: measuring rat Pig-a mutant bone marrow erythroids and a high throughput assay for mutant peripheral blood reticulocytes. Environ[J]. Environ Mol Mutagen, 2011, 52(9): 774 – 783.

[19] 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 hemolytic agent 2-butoxyethanol[J]. Mutagenesis, 2015, 30(3): 325 – 334.

[20] Stankowski LF Jr, Aardema 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] Bemis JC, Labash C, Avlasevich SL, et al. Rat Pig-a mutation assay responds to the genotoxic carcinogen ethyl carbamate but not the non-genotoxic carcinogen methyl carbamate[J]. Mutagenesis, 2015, 30(3): 343 – 347.

[22] Labash C, Avlasevich SL, Carlson K, et al. Comparison of male versus female responses in the Pig-a mutation assay[J]. Mutagenesis, 2015, 30(3): 349 – 357.

[23] Godin-Ethier J, Leroux F, Wang N, et al. Characterization of an in vivo Pig-a mutation assay for use in regulatory toxicology studies[J]. Mutagenesis, 2015, 30(3): 359 – 363.

[24] Roberts DJ, McKeon M, Xu Y, et al. Comparison of integrated genotoxicity endpoints in rats after acute and subchronic oral doses of 4-nitroquinoline-1-oxide[J]. Environ Mol Mutagen, 2016, 57(1): 17 – 27.

[25] Revollo J, Pearce MG, Petibone DM, et al. Confirmation of Pig-a mutation in flow cytrometryidentified CD48-deficient T-lymphocytes from F344 rats[J]. Mutagenesis, 2015, 30(3): 315 – 324.

[26] Revollo JR, Crabtree NM, Pearce MG, et al. Mutation analysis with random DNA identifiers (MARDI) catalogs *Pig-a* mutations in heterogeneous pools of CD48-deficient T cells derived from DMBA-treated rats[J]. Environ Mol Mutagen, 2016, 57(2): 114 – 124.

[27] Dertinger SD, Phonethepswath 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 ref-

erence compounds[J]. Toxicol Sci, 2012, 130(2):328 – 348.

[28] 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.

[29] Parker MW, van der Goot FG, Buckley JT. Aerolysin--the ins and outs of a model channel-forming toxin [J]. Mol Microbiol, 1996, 19(2), 205 – 212.

[30] Diep DB, Nelson KL, Raja SM, et al.. Glycosylphosphatidylinositol Anchors of Membrane Glycoproteins Are Binding Determinants for the Channel-forming Toxin Aerolysin[J]. J Biol Chem, 1998, 273(4): 2355 – 2360.

[31] Brodsky RA, Mukhina GL, Nelson KL, et al. Resistance of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells to the glycosylphosphatidylinositol-binding toxin aerolysin[J]. Blood, 1999, 93(5): 1749 – 1756.

[32] Abrami L, Fivaz M, Decroly E, et al. The pore-forming toxin proaerolysin is activated by furin[J]. J Biol Chem, 1998, 273(49):32656 – 32661.

[33] Dertinger SD, Phonethepswath S, Weller P, et al. International Pig-a gene mutation assay trial: evaluation of transferability across 14 laboratories[J]. Environ Mol Mutagen, 2011, 52(9): 690 – 698.

[34] 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 endpoints[J]. Environ Mol Mutagen, 2011, 52(9): 721 – 730.

[35] Shi J, Krsmanovic L, Bruce S, et al. Assessment of genotoxicity induced by 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene or diethylnitrosamine in the Piga, micronucleus and Comet assays integrated into 28-day repeat dose studies[J]. Environ Mol Mutagen, 2011, 52(9):711 – 720.

[36] Lynch AM, Giddings A, Custer L, et al. International Pig-a gene mutation assay trial (Stage III): results with N-methyl- N-nitrosourea[J]. Environ Mol Mutagen, 2011, 52(9): 699 – 710.

[37] Bhalli JA, Shaddock JG, Pearce MG, et al. Report on Stage III Pig-a mutation assays using benzo[a]pyrene, Environ [J]. Environ Mol Mutagen, 2011, 52(9): 731 – 737.

[38] 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.

[39] Dertinqer SD, Heflich RH. In vivo assessment of Pig-a gene mutantion-recent developments and assay validation [J]. Environ Mol Mutagen, 2011, 52(9):681 – 684.

[40] Miura D, Dobrovolsky VN, Kimoto T, et al. Accumulation and persistence of Pig-A mutant peripheral red blood cells following treatment of rats with single and split doses of N-ethyl-N-nitrosourea[J]. Mutat Res, 2009, 677(1 – 2):86 – 92.

[41] Phonethepswath 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.

[42] 张铭,周长慧,常艳,等. 体内 Pig-a 基因突变试验高通量方法联合验证研究[J]. 癌变. 畸变. 突变,2013,25(5):392 – 395.

[43] Gollapudi BB, Lynch AM, Heflich RH, et al. The in vivo Pig-a assay: a report of the International Workshop On Genotoxicity Testing (IWGT) Workgroup[J]. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen, 2015,783:23 – 35.

[44] Phonethepswath S, Bryce SM, Bemis JC, et al. Erythrocyte-based Pig-a gene mutation assay: demonstration of cross-species potential[J]. Mutat Res, 2008, 657(2):122 – 126.

[45] Bhalli JA, Pearce MG, Dobrovolsky VN, et al. Manifestation and persistence of Pig-a mutant red blood cells in C57BL/6 mice following single and split doses of N-Ethyl-N-Nitrosourea[J]. Environ Mol Mutagen, 2011, 52(9):766 – 773.

[46] Horibata K, Ukai A, Kimoto T, et al. Evaluation of in vivo genotoxicity induced by n-ethyl-n-nitrosourea, Benzo[a]pyrene, and 4-Nitroquinoline – 1-oxide in the Pig-a and gpt assays[J]. Environ Mol Mutagen, 2013, 54(9):747 – 754.

[47] 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.

[48] Cao X, Mittelstaedt RA, Pearce MG, et al. Quantitative dose-response analysis of ethyl methanesulfonate genotoxicity in adult gpt-delta transgenic mice[J]. Environ Mol Mutagen, 2014, 55(5):385 – 399.

[49] Lemieux CL, Douglas GR, Gingerich J, et al. Simultaneous measurement of Benzo[a] pyrene-induced Pig-a and lacZ mutations, micronuclei and DNA adducts in Muta (TM) mouse[J]. Environ Mol Mutagen, 2011, 52(9):756 – 765.

[50] Graupner A, Instanes C, Dertinger SD, et al. Single cell gel electrophoresis (SCGE) and Piga mutation assay in vivo-tools for genotoxicity testing from a regulatory perspective: a study of benzo[a]pyrene in Ogg1(–/–) mice[J]. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen,2014,772:34 – 41.

[51] Dobrovolsky VN, Elespuru RK, Bigger CA, et al. Monitoring humans for somatic mutation in the endogenous PIG-a gene using red blood cells[J]. Environ Mol Mutagen, 2011, 52(9):784 – 794.

[52] Dertinger SD, Avlasevich SL, Bemis JC, et al. Human erythrocyte PIG-A assay: an easily monitored index of gene mutation requiring low volume blood samples[J]. Environ Mol Mutagen, 2015, 56(4):366 – 377.

[53] Cao Y, Yang L, Feng N, et al. A population study using the human erythrocyte *PIG-A* assay[J]. Environ Mol Mutagen, 2016, 57(8): 605 – 614.

[54] Ji Z, LeBaron MJ. Applying the erythrocyte *Pig-a* assay concept to rat epididymal sperm for germ cell mutagenicity evaluation [J]. Environ Mol Mutagen, 2017, 58(7): 485 – 493.

[55] Dobrovolsky VN, Elespuru RK, Bigger CA, et al. Monitoring humans for somatic mutation in the endogenous PIG-A gene using red blood cells[J]. Environ Mol Mutagen, 2011, 52(9): 784 – 794.

〔收稿日期〕2018 – 01 – 11