·重大新药创制专项巡礼·

非整倍体诱导剂的检测方法及风险评估

赵田田[1],周长慧[1],王敬亭[1,2],杨紫轩[1],李嫚琪[1],常　艳[1]
(1 中国医药工业研究总院上海益诺思生物技术股份有限公司,上海 201203;
2 复旦大学药学院,上海 201203)

[摘要] 非整倍体(aneuploidy)指细胞核内染色体数不是染色体组的整倍数,包括单体、三体、四体、双三体、缺体等,与恶性肿瘤发生密切相关。非整倍体诱导剂(aneugen)指诱导子细胞染色体数目增加或减少,即导致非整倍体形成的物质。现行的遗传毒性试验指导原则要求评估化学物质诱发非整倍体的可能性,但标准的遗传毒性试验组合不包括专门评估非整倍体诱导剂的试验。微核试验结合 FISH 和 CREST 染色为染色体数目畸变提供了直接的证据;体外多终点试验和毒性追踪分析可通过 MoA 检测非整倍体诱导剂。目前对生殖细胞非整倍体诱导剂进行全面风险评估的数据较少,因此在未来有必要开展非整倍体诱导剂对生殖细胞影响的研究,并对其进行全面的风险评估,以补充这一领域数据的空缺。本文对目前哺乳动物体细胞和生殖细胞中非整倍体形成机制、检测方法、危害以及暴露后的风险评估进行综述。

[关键词] 非整倍体;非整倍体诱导剂;危害;检测方法;风险评估
[中图分类号] R994.1　　[文献标志码] A　　[文章编号] 1003-3734(2021)06-0501-06

Progress in detection and risk assessment of aneugens

ZHAO Tian-tian[1], ZHOU Chang-hui[1], WANG Jing-ting[1,2], YANG Zi-xuan[1], LI Man-qi[1], CHANG Yan[1]
(1 *China State Institute of Pharmaceutical Industry, National Shanghai Center for New Drug Safety Evaluation and Research/Shanghai InnoStar Bio-Tech Co., Ltd., Shanghai* 201203, *China*; 2 *School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai* 201203, *China*)

[**Abstract**] Aneuploidy refers to the number of chromosomes in the nucleus that is not an integral multiple of genome, including monosomy, trisomy, tetrasomy, double trisomy, nullsomy, etc., and is closely related to cancer. An aneuge is a substance that induces increase or decrease in the number of chromosomes of daughter cells, that is, a substance that leads to the formation of aneuploidy. The current guidance on genotoxicity testing requires assessment of chemicals' potential to induce aneuploidy. However, the standard battery of genotoxicity does not include an independent test designed specially for aneuploidy test. Micronucleus assay with the staining of kinetochores and FISH provides direct evidence for chromosome or genome mutations. MultiFlow and ToxTracker assays provide mechanistic information and permit genotoxins to be distinguished based on their MoA. At present, there are few data on comprehensive risk assessment of aneugens in germ cells. Therefore, in the future, it is necessary to carry out research on the effect of aneugens on germ cells and conduct a comprehensive risk assessment to supplement the gaps of data in this field. This article reviewed the scientific literature on the biological mechanisms, methods used to detect chemical aneugens, risks of aneuploidy and ramifications of exposure to chemical aneugens for human health risk assessment.

[**Key words**] aneuploidy; aneugens; hazard; detection; risk assessment

---

[基金项目] 国家"重大新药创制"科技重大专项资助项目(2018ZX09201017-008);上海市科委研发公共服务平台项目(18DZ2290100)
[作者简介] 赵田田,女,硕士研究生,主要从事遗传毒理学研究。E-mail: 652369375@qq.com。
[通讯作者] 常艳,女,博士,研究员,主要从事药物毒理学研究。联系电话:(021)50800333-208,E-mail: ychang@innostar.cn。

一个多世纪前,西奥多·博维里将海胆胚胎中的染色体数目异常与基因组的异常发育联系在一起;此外,他还假设染色体数目异常可能会导致细胞以不可控制的方式生长,并成为恶性肿瘤产生的种子[1]。染色体数目异常不仅会严重影响细胞内基因的表达,还会造成细胞代谢失调和器官功能障碍[2]。染色体数目异常改变了我们对基因组的固有看法,并发现了疾病、衰老、生育和物种进化与基因组变化之间的密切关联[3-4]。目前,研究者普遍认为非整倍体是人类肿瘤产生和发展过程中不可或缺的一部分。第七届遗传毒性试验国际研讨会(International Workshops on Genotoxicity Testing,IWGT)审查和评估了非整倍体对人类健康的风险,成果包括:① 非整倍体检测的机制和方法[5]。② 生殖细胞非整倍体的诱导及其与遗传病的关系[6]。③ 非整倍体在致癌过程中的作用[7]。该成果也涉及药物暴露对人体造成的非整倍体相关内容。尽管非整倍体在体细胞疾病和遗传性疾病中扮演了很重要的角色,但是有关药物诱导非整倍体形成机制和检测方法的系统研究并不多见。本文主要对体细胞和生殖细胞中非整倍体的检测方法、危害及遗传毒理学风险评估进行综述。

1 非整倍体的概念及形成机制

遗传毒性(genetic toxicity)指对基因组的毒性,对基因组的毒作用可引起致突变性及其他各种不同效应。基因突变、染色体畸变及染色体数目改变是遗传毒理学家主要关注的 3 类遗传学损伤。在细胞分裂过程中,如果染色体分离出现障碍,就会出现染色体数目异常包括非整倍体和整倍体。染色体数目异常是以二倍体细胞为标准进行命名的。整倍体是以染色体组为单位的增减,如单倍体、三倍体、四倍体等,三倍体以上称为多倍体。非整倍体是指细胞核内染色体数不是染色体组的整倍数,包括单体、三体、四体、双三体、缺体等。非整倍体诱导剂指能诱导子细胞染色体数目增加或减少,即导致非整倍体形成的物质[8]。非整倍性(aneugenicity)反映了化学物质诱导非整倍体形成的能力。

非整倍体形成的主要原因是有丝分裂或减数分裂过程中染色体未分离和分离滞后,使染色体分布错误。有文献[9]推测,非整倍体形成机制为控制细胞分裂过程出错,如姐妹染色单体的结合缺陷、染色体的两性连接(merotelic attachment)、动粒-微管相互作用的高度稳定、微管蛋白解聚、端粒功能失调、有丝分裂检查点缺陷和“有丝分裂滑移(mitotic slippage)”、胞质未分裂或病毒诱导的细胞融合等。有文献[10]表明,染色质的表观遗传变化,特别是着丝粒的表观遗传变化也可能导致染色体的错误分离。

在生殖细胞分裂过程中,第 1 次减数分裂染色体分离的分子机制较为独特,与化学诱导非整倍体减数分裂的潜在靶点密切相关。生殖细胞染色体分离错误的原因包括:联会复合体(synaptonemal complex)缺乏和同源重组错误、着丝粒与姐妹染色单体之间的结合力丧失、减数分裂纺锤体的形成、纺锤体装配检查点(SAC)蛋白组成差异[8]。2017 年,Capalbo 等[11]提出人类卵母细胞染色体错误分离的新机制:在减数分裂Ⅰ期而不是减数分裂Ⅱ期同源染色体中姐妹染色单体的较早分离,易导致第 1 次或第 2 次减数分裂错误;卵母细胞比精子细胞和体细胞对非整倍体诱导剂敏感性更高。

2 非整倍体诱导剂的检测方法

目前遗传毒性试验指导原则要求评估化合物诱导非整倍体的能力[12]。然而,现有标准中遗传毒性试验组合不包括专门评估非整倍体诱导剂的试验。下文对非整倍体的多种检测方法进行概述,为未来指导原则的修订提供参考。

2.1 微核试验

体内和体外微核(micronucleus,MN)试验都可以检测非整倍体诱导剂。体外哺乳动物细胞 MN 试验(OECD TG487)[13]可检测受试物对染色体或纺锤体的损害能力,是监管机构推荐的遗传毒性标准试验组合之一。Michael Fenech 开发的胞质分裂阻滞微核试验(cytokinesis-block micronucleus assay,CBMN)已沿用半个多世纪,该传统微核试验与 CREST 抗体免疫荧光染色法(简称 CREST 染色法)或荧光原位杂交(标记着丝粒)试验(fluorescence in situ hybridization,FISH)[14]相结合,可判定 MN 是由染色体片段还是整条染色体丢失引起的,成功地区分了非整倍体诱导剂和染色体断裂剂。另有研究发现,在 MN 检测中引入端粒和着丝粒染色(简称 TC 染色),端粒的标记可以更详细地区分染色体断裂剂(仅含端粒信号的 MN)和非整倍体诱导剂(含端粒和着丝粒信号的 MN)[15]。

因为传统微核试验需要人工阅片及评分,存在主观性偏差且效率低等缺点,所以针对这些不足,Wilde 等[16]发现了一种基于 OECD TG 487 的半自动检测 MN 和动粒阳性(k^+)MN 的图像分析技术,

极大提高了阅片效率及准确率。该方法使用细胞松弛素 B(Cyto B)处理 V79 细胞,同时用核反染抗体和抗动粒抗体标记细胞核(包括 MN)和动粒,荧光显微镜和配套软件自动化识别双核或多核细胞并区分动粒阳性 MN(即 k^+MN)和动粒阴性 MN(即 k^-MN),其判断标准是 k^+MN≥53.8% 的化合物被归类为非整倍体诱导剂。目前成熟使用的自动化高通量 MN 分析系统还包括流式细胞术 MicroFlow®、基于图像分析的 Metafer™ 系统和 ImageStreamX® MK II(ISX)[17]等。这些新的技术相比人工评分具有很多优势:① 可研究剂量-反应关系。② 可以增加样本量,从而减小统计误差。③ 没有人为偏差导致评分主观性和实验员间的差异。④ 可用于早期毒性筛选。⑤ 可在整个剂量范围内区分致断裂剂和非整倍体诱导剂的可能性。

2.2 作用方式(mode of action,MoA)分析

近年来很多试验室致力于基于 MoA 区分遗传毒性物质的研究。目前遗传毒理工作者正在对以下方法进行优化和验证。

2.2.1 体外多终点试验 体外多终点试验通过流式检测多种遗传毒性生物标志物的表达,包括 γ-H2AX、p53 蛋白、H3 组蛋白的磷酸化、多倍体等。目前 Litron 实验室开发了商用试剂盒 MultiFlow®体外多终点试验试剂盒,用于检测染色体断裂剂和非整倍体诱导剂。该试验具有以下特点:① 可实现高通量和自动化检测,且化合物用量低。② 提供 DNA 损伤和细胞毒性等有效信息。③ 可根据 MoA 检测非整倍体诱导剂。γH2AX 和早期 p53 预示染色体断裂剂,非整倍体诱导剂的特征是磷酸组蛋白 H3 增加、晚期 p53 和多倍体化[18]。Litron 联合其他实验室开展了体外多终点试验的实验室间评价,提出全球评价因子(global evaluation factors, GEFs)来评价试验数据。在体外多终点试验里,每个生物标志物都有相应的截止值(cut-of values),根据超过截止值的标志物组合来识别染色体断裂剂和非整倍体诱导剂 MoA,联合验证结果表明该方法准确度 >90%。此外,机器学习方法(machine learning,ML)也适用于多生物标志物的评价,如逻辑回归、随机森林或神经网络算法可预测染色体断裂剂和非整倍体诱导剂 MoA[19]。目前,综合 ML 和 GEFs 2 种评价方法,建立了数据分层分析系统[20]。体外多终点试验不仅能快速有效识别非整倍体诱导剂和染色体断裂剂,还可提供用于现代风险评估的 MoA、分子靶点和毒性潜能信息。

2.2.2 毒性追踪分析(ToxTracker assay) ToxTracker 分析是由 6 个不同基因的报告细胞系组成的毒性追踪分析系统。报告细胞系是使用细菌人工染色体(BAC)创建的,该染色体包含完整的生物标记基因,包括确保绿色荧光蛋白(GFP)报告生理调节的启动子和调节元件,用于识别特定细胞信号通路的激活,可在一个试验中检测候选化合物的生物反应性,提供多种潜在致癌性信息[21]。当该细胞系暴露于不同类别的致癌物时,特定的生物标记基因被优先激活,从而识别出不同作用机制的潜在致癌物[22]。小鼠胚胎干细胞(mES)报告细胞系与 GFP 结合,使这些生物标记基因的激活状态得以确定。

微管蛋白结合的非整倍体诱导剂可通过评估 Bscl 2GFP 和 Rtkn GFP 遗传毒性报告细胞系诱导基因表达产物的多少进行识别。有文献报道,直接 DNA 损伤剂(如顺铂、依托泊苷、丝裂霉素 C 和阿霉素)在约 8 h 后诱导 *Bscl 2GFP* 和 *Rtkn GFP* 报告基因,而微管蛋白结合的非整倍体诱导剂(如秋水酰胺、诺考达唑、长春瑞滨和紫杉醇)在更长的时间(约 12 h)后主要激活 *Rtkn-GFP* 报告基因。因此,通过比较 *Bscl2-GFP* 和 *Rtkn-GFP* 报告基因的差异诱导,ToxTracker 可区分直接 DNA 损伤剂和非 DNA 反应性非整倍体诱导剂。

2.3 非整倍体作用机制相关事件的检测

2.3.1 微管聚合试验与极光激酶 B(AURKB)选择性测定 微管蛋白聚合试验作为一个后续的机制研究方法,为非整倍体诱导剂的作用机制提供数据支撑。

极光激酶 A(aurora kinase A, AURKA)或极光激酶 B(aurora kinase B, AURKB)分析是使用涉及放射性标记的 ATP 的分离酶来测量底物磷酸化抑制的一种常用方法。然而,细胞激酶选择性分析方法可将这些体外生物化学选择性数据转换成细胞背景下的数据进行分析。AURKA 和 AURKB 分析常用的生物标志物为 pLATS2(Ser 83)和 pH3(Ser 28, Ser 10),用于有丝分裂细胞的定量成像[23]或流式细胞术分析。

2.3.2 基于 MultiFlow 的分层生物测定和数据分析方法 基于 MultiFlow 的分层生物测定和数据分析方法可在一个试验中阐明非整倍体诱导剂最常见的分子靶点:微管蛋白不稳定,微管蛋白稳定,抑制有丝分裂激酶[24]。该方法使用一种标记活细胞微管

蛋白的探针 488 紫杉醇,可选择性与微管蛋白结合。488 紫杉醇相关荧光的变化与微管蛋白结合物增加,微管蛋白稳定剂减少有关。细胞核和染色体用核酸染料染色,并用抗 p-H3 和 Ki-67 的荧光抗体标记。基于 488 紫杉醇荧光和 p-H3: Ki-67 比值的无监督层次聚类(unsupervised hierarchical clustering)可清楚地区分具有不同分子机制的化合物。此外,通过留一交叉验证法(leave-one-out cross-validation),基于人工神经网络的分类算法可以有效地预测分子靶点。总之,基于 488 紫杉醇、p-H3 和 Ki-67 分层生物测定和数据分析方法,是一种常见非整倍体诱导剂分子靶点的可靠检测方法。

2.4 生殖细胞非整倍体的检测方法

2.4.1 减数分裂细胞和合子的细胞遗传学分析 通过分析减数分裂中期细胞和合子中期染色体计数情况,可用来研究雄性和雌性生殖细胞中非整倍体的诱导。染色体计数可在标准 DNA 染色后进行,如 Giemsa 或醋酸睾丸素和 DAPI,或与特定染色体的染色体涂片探针(chromosome painting probes)杂交。此外,还有鉴定着丝粒和提高染色体计数准确性的方法,包括 C 带(C-banding)和荧光着丝粒标记。

由于该方法容易造成染色体的人为丢失,因此人们通常通过确定超倍体细胞中期染色体数量的变化来评估化学物质诱导非整倍体的能力。为了提高细胞遗传学研究中染色体丢失后评估的可靠性,人们提出了几种方法,包括在固定过程中保持细胞膜的完整性,同时分析卵子及极体中的染色体。然而,大多数关于化学诱导生殖细胞非整倍体研究中使用的方法不能区分真正的染色体丢失和由于技术偏差(technical artefacts)造成的染色体丢失。

2.4.2 精子荧光原位杂交 20 世纪 90 年代,荧光原位杂交开始用于计数人类、小鼠和大鼠等哺乳动物精子染色体含量测定,逐步发展出针对每条染色体的 DNA 探针。随后,在人类和小鼠中都开发了一些方法,将针对特定染色体的单个探针与针对同一染色体的多个探针结合起来,以允许同时检测染色体数量和结构异常。精子荧光原位杂交提供了一种分析几千个精子相对快速的方法,能够检测少量样本对精子非整倍体诱导的微小影响。

3 非整倍体的危害

在正常细胞中,一个有效的监测系统会对异常染色体的存在作出反应,使该细胞死亡或诱导细胞衰老,以阻止细胞复制。在癌细胞中,非整倍体也与基因组不稳定性有关,表现为细胞突变增多或染色体不稳定性。事实上,非整倍体可能直接导致基因组不稳定[25]。

在分子水平上,对小鼠模型中编码与染色体分离有关基因编码的蛋白质(如 Mad2,Bub1 和 CenpE)有遗传缺陷时则显示非整倍体增加,提示在某些情况下肿瘤易感性增加。在细胞水平上,非整倍体的主要危害包括[26]:① 抑制细胞增殖,细胞适应性降低、机体发育减缓。② 蛋白质组改变导致能量负荷增加、代谢能力改变、药物敏感性增加和细胞衰老。③ 增殖率降低,以增强非整倍体细胞适应和进化能力。④ DNA 复制所需蛋白质水平失衡,基因组不稳定。⑤ 细胞死亡。⑥ 分化改变。

胚胎细胞中非整倍体形成主要是由生殖细胞或受精早期分裂周期错误所致。现有数据证明[9],生殖细胞和早期胚胎的非整倍体是导致人类不孕和自然流产的重要原因,它还与先天畸形、智力低下、发病率和后代死亡率有关,并且是活产中观察到的最常见的染色体畸变。此外,生殖细胞非整倍体在胚胎发育早期通常导致合子胚死亡,这与生殖毒性有关。在人类中,约 0.3% 的新生儿是非整倍体,但配子和胚胎中自发错误可能相当频繁,从自然流产获得的数据表明,这些事件与非整倍体相关的约 35%。大多数人类非整倍体胚胎死于胚胎-胎儿发育阶段,死亡时间取决于受影响的染色体。非整倍体中只有少量常染色体(13,18 和 21)的三体性能够足月妊娠,其中唐氏综合征或 21 三体综合征最常见,出生率为 1/720。然而,约 80% 的受唐氏综合征影响的胚胎会自然流产。X 染色体单体是唯一能产生可存活后代的单染色体。非整倍体会导致严重的发育、神经和生殖缺陷,对个人、家庭和社会带来巨大的情感、医疗和经济负担[6]。

在人类恶性肿瘤中,非整倍体的程度和种类在不同的肿瘤类型之间有很大的差异;非整倍体细胞的致瘤性取决于丢失或获得特定染色体的基因含量,以及抑癌基因与癌基因的平衡[7]。目前非整倍体是致癌的原因还是后果尚未被科学家阐明,但非整倍体被认为是恶性肿瘤的标志,其复杂的作用机制有待人们进一步的研究。

4 非整倍体危害的风险评估

哺乳动物细胞遗传学方法检测非整倍体诱导剂有一定的局限性:染色体畸变试验不能可靠地检测到染色体丢失;体外和体内微核试验也不是针对非

整倍体诱导剂的专项试验;遗传毒性标准试验组合中只要求以微核率为终点,只有在有必要进行非整倍体风险评估的情况下,才需要进一步评价微核阳性化合物的非整倍体诱导能力,如使用着丝粒特异性染色可用于检测含有全染色体的微核指示染色体丢失。一般认为,非整倍体的诱导能力具有阈值,并且可定义一个剂量水平,低于该剂量水平就不会产生非整倍体效应,可通过已知的非整倍体剂靶分子——微管蛋白或和极光激酶(不涉及与 DNA 的直接作用)的相关试验来确定该阈值。因此,在风险评估时,主要应考虑微核试验的剂量-反应关系,尤其是动粒阳性微核的比例,从而确认非整倍体机制是否是导致微核增加的主要原因。如果化合物导致染色体丢失或染色体不分离,可能需要进一步的机制证据。到目前为止尚不清楚这 2 种机制的出发点是否存在实质性差异。此外,体细胞中检测到的非整倍体诱导剂有可能对生殖细胞产生影响。只有少数情况,如药物说明书中提到对生殖细胞没有影响时,才需要进行令人信服的试验。

评估遗传突变危害和风险的政策和实践是国际监管机构遗传毒性测试战略的一部分。但目前只有经济合作与发展组织(OECD)的指南涉及生殖细胞中期的细胞遗传学分析。OECD TG483 涵盖精原细胞中期染色体畸变的检测,可用于测量雄性生殖细胞非整倍体[27]。然而,该方法对非整倍体的检测并不完善。最近 OECD 公布了 AOP 116,它描述了女性生殖细胞中导致后代非整倍体的事件,并概述了与微管蛋白结合的化学物质导致微管解聚、纺锤体解体、染色体排列改变、分离和非整倍体产生的生物学关系[28]。AOP 框架在遗传毒理学中是优先的,应特别关注 2 个 MIE,与微管蛋白和 AURA B 的催化结构域的化学结合;AOP 将分子起始事件与体细胞非整倍体和多倍体联系起来,为探索非整倍体与恶性肿瘤发生和遗传性疾病等不良事件的相关性提供了基础[7]。

5 展望

非整倍体诱导剂对人类健康的危害很大。在过去的 20 年里,欧洲在化学暴露诱发非整倍体的风险评估方面取得很大进展[9],研究重点是避免非整倍体诱导剂的危害。对于非整倍体诱导剂检测,主要有 MN 伴随 FISH 和 CREST、体外多终点试验和毒性追踪分析等。子细胞 MN 的动粒染色为染色体或基因组突变提供了直接证据,微核试验结合 CREST 染色或 FISH 应用广泛,在区分染色体丢失和染色体不分离方面也很有价值,且该方法已纳入指导原则。与仅适用于人类或小鼠着丝粒探针的 FISH 技术相比较,CREST 染色可应用于不同物种,显示出普遍的适用性,而且随着微核自动化技术的发展,CREST 染色结合经典微核试验来检测非整倍体诱导剂会更加快速和简便。基于体外多终点试验的研究不仅可以实现基于 MoA 实现非整倍体诱导剂的检测,还可用于作用机制的研究。毒性追踪分析是一种新的基于 GFP 的 mES 报告细胞系以识别特定细胞信号通路的激活,目前开展这项研究的实验室不多,还有很大的研究和验证空间。虽然这些生物标志物可以预测染色体或基因组的遗传变化,但仅应用于筛选候选药物,若应用于监管层面还需要大量的数据验证。定义非整倍体诱导剂阈值可用基准剂量法(benchmark dose, BMD)的置信下限来定义人体暴露限值[29],AOP 也可用于遗传毒理学中风险评估。对机制的理解以及基于阈值的剂量-反应关系是目前用于非整倍体诱导剂的人类风险评估方法的基础。

IWGT 强调了非整倍体对人类健康的重要性,且目前对生殖细胞非整倍体诱导剂进行全面风险评估的数据较少。因此有必要筛选出非整倍体诱导剂,并对其进行全面的风险评估;同时有必要开展非整倍体诱导剂对生殖细胞影响的研究,以补充这一领域数据的空缺。

[参 考 文 献]

[1] BOVERI T. Concerning the origin of malignant tumours by Theodor Boveri. Translated and annotated by Henry Harris[J]. *J Cell Sci*, 2008, 121(Suppl 1): S1 - S84.

[2] SANTAGUIDA S, AMON A. Short-and long-term effects of chromosome mis-segregation and aneuploidy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2015, 16(8): 473 - 485.

[3] NAYLOR RM, VAN DEURSEN JM. Aneuploidy in cancer and aging[J]. *Annu Rev Genet*, 2016, 50: 45 - 66.

[4] SANSREGRET L, SWANTON C. The role of aneuploidy in cancer evolution[J]. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2017, 7(1). DOI:10.1101/cshperspect.a028373.

[5] LYNCH AM, EASTMOND D, ELHAJOUJI A, *et al*. Targets and mechanisms of chemically induced aneuploidy. Part 1 of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases[J]. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*, 2019, 847: 403025.

[6] PACCHIEROTTI F, MASUMURA K, EASTMOND DA, *et al*. Chemically induced aneuploidy in germ cells. Part II of the report of the 2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases[J]. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*, 2019, 848: 403023.

[7] TWEATS D, EASTMOND DA, LYNCH AM, *et al*. Role of aneuploidy in the carcinogenic process: Part 3 of the report of the

2017 IWGT workgroup on assessing the risk of aneugens for carcinogenesis and hereditary diseases[J]. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*, 2019, 847: 403032.
[8] 周宗灿主编. 毒理学基础[M]. 第三版. 北京: 北京大学医学出版社, 2006: 209, 221.
[9] KIRSCH-VOLDERS M, PACCHIEROTTI F, PARRY EM, *et al*. Risks of aneuploidy induction from chemical exposure: twenty years of collaborative research in Europe from basic science to regulatory implications[J]. *Mutat Res*, 2019, 779: 126 - 147.
[10] GERSTEIN AC, BERMAN J. Shift and adapt: the costs and benefits of karyotype variations[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2015, 26: 130 - 136.
[11] CAPALBO A, HOFFMANN ER, CIMADOMO D, *et al*. Human female meiosis revised: new insights into the mechanisms of chromosome segregation and aneuploidies from advanced genomics and time-lapse imaging[J]. *Hum Reprod Update*, 2017, 23(6): 706 - 722.
[12] ICH. Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use-S2(R1)[S]. 2011.
[13] OECD Test 487: *In vitro* mammalian cell micronucleus test[S]. 2016.
[14] TUCKER JD. Reflections on the development and application of FISH whole chromosome painting[J]. *Mutat Res Rev Mutat Res*, 2015, 763: 2 - 14.
[15] ZAGUIA N, LAPLAGNE E, COLICCHIO B, *et al*. A new tool for genotoxic risk assessment: Reevaluation of the cytokinesis-block micronucleus assay using semi-automated scoring following telomere and centromere staining[J]. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen*, 2020, 850 - 851: 503143.
[16] WILDE S, QUEISSER N, HOLZ C, *et al*. Differentiation of aneugens and clastogens in the *in vitro* micronucleus test by kinetochore scoring using automated image analysis[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2019, 60(3): 227 - 242.
[17] RODRIGUES MA. Automation of the *in vitro* micronucleus assay using the Imagestream® imaging flow cytometer[J]. *Cytom Part A*, 2018, 93(7): 706 - 726.
[18] BRYCE SM, BERNACKI DT, BEMIS JC, *et al*. Genotoxic mode of action predictions from a multiplexed flow cytometric assay and a machine learning approach[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2016, 57(3): 171 - 189.
[19] BRYCE SM, BERNACKI DT, SMITH-ROE SL, *et al*. Investigating the generalizability of the MultiFlow® DNA damage assay and several companion machine learning models with a set of 103 diverse test chemicals[J]. *Toxicol Sci*, 2018, 162(1): 146 - 166.
[20] BRYCE SM, BERNACKI DT, BEMIS JC, *et al*. Genotoxic mode of action predictions from a multiplexed flow cytometric assay and a machine learning approach[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2016, 57(3): 171 - 189.
[21] HENDRIKS G, DERR RS, MISOVIC B, *et al*. The extended ToxTracker assay discriminates between induction of DNA damage, oxidative stress, and protein misfolding[J]. *Toxicol Sci*, 2016, 150(1): 190 - 203.
[22] HENDRIKS G, ATALLAH M, RAAMSMAN M, *et al*. Sensitive DsRed fluorescence-based reporter cell systems for genotoxicity and oxidative stress assessment[J]. *Mutat Res*, 2011, 709 - 710: 49 - 59.
[23] GROOT CD, HSIA JE, ANZOLA JV, *et al*. A cell biologist field guide to aurora kinase inhibitors[J]. *Front Oncol*, 2015, 5: 285.
[24] BERNACKI DT, BRYCE SM, BEMIS JC, *et al*. Aneugen molecular mechanism assay: proof-of-concept with 27 reference chemicals[J]. *Toxicol Sci*, 2019, 170(2): 382 - 393.
[25] LANGIE SAS, KOPPEN G, DESAULNIERS D, *et al*. Causes of genome instability: the effect of low dose chemical exposures in modern society[J]. *Carcinogenesis*, 2015, 36(Suppl 1): S61 - S88.
[26] HOLLAND AJ, CLEVELAND DW. Losing balance: the origin and impact of aneuploidy in cancer[J]. *EMBO Rep*, 2012, 13(6): 501 - 514.
[27] OECD Test 483: Mammalian spermatogonial chromosomal aberration test[S]. 2016.
[28] MARCHETTI F, MASSAROTTI A, YAUK CL, *et al*. The adverse outcome pathway (AOP) for chemical binding to tubulin in oocytes leading to aneuploid offspring[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2016, 57(2): 87 - 113.
[29] WHITE PA, JOHNSON GE. Genetic toxicology at the crossroads-from qualitative hazard evaluation to quantitative risk assessment[J]. *Mutagenesis*, 2016, 31(3): 233 - 237.

编辑:刘卓越/接受日期:2020 - 10 - 09