体外微核试验结合荧光原位杂交技术检测非整倍体诱导剂的研究

崔文腾[1,2]，周长慧[2]，方雅励[2,3]，卢言新[2]，常　艳[1,2]*

（1. 中国医药工业研究总院，上海 201203；2. 上海益诺思生物技术股份有限公司，上海 201203；3. 复旦大学药学院，上海 201203）

摘要：通过微核（MN）试验结合荧光原位杂交（FISH）技术，建立了一种高效检测化学物质非整倍体诱导能力的方法。以小鼠淋巴瘤细胞 L5178Y tk+/－和人淋巴母细胞 TK6 为模型，分析了秋水仙碱、长春新碱和丝裂霉素 C 的遗传毒性效应。结果显示，秋水仙碱和长春新碱诱导的微核中含着丝粒信号的比例为 70.2%和 50.5%以上，表明这些药物主要通过染色体丢失机制诱发非整倍体；而丝裂霉素 C 诱导的微核有 85.9%缺乏着丝粒信号，证实其通过染色体断裂发挥作用。该方法通过整合细胞水平（MN 试验，微核率）和分子水平（FISH，着丝粒检测），实现了对非整倍体诱导剂和 DNA 断裂剂的精准鉴别。该多维度检测体系显著提升了遗传毒性机制判定的准确性，在药物安全性评价、环境毒理评估及临床诊断等领域具有重要的应用价值。

关键词：非整倍体诱导剂；微核试验；荧光原位杂交技术；秋水仙碱；长春新碱；丝裂霉素 C；遗传毒性

中图分类号：R96；Q26　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2025)07-0937-08

引用：崔文腾, 周长慧, 方雅励, 等. 体外微核试验结合荧光原位杂交技术检测非整倍体诱导剂的研究[J]. 中国医药工业杂志, 2025, **56**(7): 937-944. DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2025.07.013

In vitro Micronucleus Test Combined with FISH Technology for Detecting Aneuploidy-inducing Agents

CUI Wenteng[1,2], ZHOU Changhui[2], FANG Yali[2,3], LU Yanxin[2], CHANG Yan[1,2]*

(*1. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203; 2. Shanghai InnoStar Bio-Tech Co., Ltd., Shanghai 200043; 3. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: An efficient method was established for detecting the potential aneugenic activity of chemical substances by combining the micronucleus (MN) test with fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technology. Using mouse lymphoma cells (L5178Y tk+/－) and human lymphoblastoid cells (TK6) as models, the genotoxic effects of colchicine, vincristine, and mitomycin C were analyzed. The results showed that more than 70.2% and 50.5% of the micronuclei induced by colchicine and vincristine contained centromeric signals, respectively, indicating that these drugs mainly induced aneuploidy through the mechanism of chromosome loss. In contrast, 85.9% of the micronuclei induced by mitomycin C lacked centromeric signals, confirming that it acted through chromosome breakage. By integrating cellular-level (MN test, formation rate) and molecular-level (FISH, centromere detection) analyses, this method enabled precise discrimination between aneugens and DNA clastogens. This multi-dimensional detection system could significantly improve the accuracy of genotoxicity mechanism determination and hold important application values in fields such as drug safety evaluation, environmental toxicological assessment, and clinical diagnosis.

Key Words: aneuploidy-inducing agent; micronucleus test; fluorescence *in situ* hybridization technique; colchicine; vincristine; mitomycin C; genotoxicity

人体中最常见的染色体异常是非整倍性染色体异常[1]。非整倍体是指细胞内染色体数目异常的状态，具体表现为细胞内的染色体总数不是正常二倍体细胞染色体数目的整倍数[2]。这种异常广泛存在于多种生物过程中，与众多人类疾病的发生、发展密切相关。据统计[3]，有10%～30%的怀孕和超过50%的着床前胚胎携带数字染色体异常，而超过90%的非整倍体妊娠会导致自然流产。同时，非整倍体存在于70%～90%的实体肿瘤和50%的造血系统恶性肿瘤中，在人类恶性肿瘤的发生、发展进程中扮演着极为重要的角色[4]，被认为是恶性肿瘤的标志。因此，有必要进一步加强对非整倍体诱导药物的机制研究，并确定非整倍体在肿瘤前事件和早期/晚期肿瘤中的作用。

全面评价化学品的遗传毒性潜力，需要评估其诱导基因突变和染色体结构（致染色体断裂活性）和染色体数目（非整倍体活性）畸变的能力。为了规范遗传毒性评估，ICH发布了ICH S2(R1)指南《人用药物遗传毒性试验和结果分析指导原则》[5]，为遗传毒性试验提供了标准化的策略和方法，以全面评估化学品的遗传毒性潜力。本研究参考该指南，采用体外微核（micronucleus，MN）试验与荧光原位杂交（fluorescence *in situ* hybridization，FISH）技术，通过检测微核中是否含有着丝粒信号，区分染色体断裂剂和非整倍体诱导剂，从而更全面地评价化学品的遗传毒性潜力。

体外哺乳动物细胞MN测试（OECD指南487）[6]是在染色体水平评估DNA损伤的推荐方法之一。MN由在细胞分裂期间滞后的无着丝粒片段或整个染色体形成[7]，测量该指标可反映染色体丢失和染色体断裂的情况[8]。与标准染色体畸变测定相比，体外MN检测的评分更简单、快速，且由于增加了样本量，统计能力更强，因此被认为是评估非整倍体诱导剂的标准方法[1]。

FISH通过在完整的中期或间期细胞内杂交互补的荧光标记的探针序列，使特定的细胞或染色体位点中的限定核酸序列可视化，从而进行染色体损伤、基因定位、临床诊断、分子毒理学和跨物种染色体同源性等分析，也越来越多地被用于遗传毒理学研究，用于检测化学和物理试剂在体外和体内诱导的染色体损伤。FISH通常应用于标准细胞遗传学样本制备的显微镜载玻片，也可用于福尔马林固定的组织、血液或骨髓涂片以及直接固定的细胞或其他核分离物的载玻片[9]。FISH与胞质分裂阻断微核测定法［cytokinesis-block micronucleus(CBMN) assay，基于体外细胞松弛素B干扰细胞分裂产生微核的原理］[10]相结合，使用泛染色体探针可确定MN是由染色体片段还是整个染色体丢失引起的，因而可区分非整倍体诱导剂和致裂剂[11]，在遗传毒理学研究中得到了广泛应用。二者结合，有望实现从细胞水平到分子层面的多维度精准检测，为非整倍体诱导剂的研究开拓新的路径，对于深入理解遗传毒性机制、保障人类健康具有重要意义。

CBMN测试与FISH的组合可表征MN中是否含有着丝粒[12]，从而区分染色体断裂剂和非整倍体诱导剂（图1），并确定特定染色体和染色体片段在MN形成中的参与情况[13]。FISH被认为是彗星试验和MN测定的有效补充手段，同时使用这些方法将能够提高鉴定遗传毒物的准确度，更好地了解所涉及的生物机制。

1　仪器与试药

CKX53型荧光显微镜（日本Olympus公司）；MS205DU型电子天平（瑞士Mettler Toledo公司）。

小鼠泛着丝粒探针（批号MCF-8595-C）、人泛着丝粒探针（批号HCC-8767-C）均购于安诺伦（北京）生物科技有限公司；RPMI Medium 1640完全培养基（1×，批号2931422）、青霉素-链霉素（批号2585647）、L-谷氨酰胺（100×，批号2836550）、0.25%胰酶-EDTA（批号2914428）均购于美国Gibco公司；磷酸盐缓冲液（PBS，北京索莱宝科技有限公司，批号2309009）；丙酮酸钠（100×，武汉普诺赛生命科技有限公司，批号WH3624F231）；20×SSC Buffer（美国Thermo

收稿日期：2025-02-18
基金项目：国家发展改革委支持先进制造业和现代服务业发展专项
作者简介：崔文腾，女，硕士研究生，专业方向：遗传毒性研究。
通信作者：常　艳，女，研究员，博士生导师，从事药物毒理学研究。E-mail：ychang@innostar.cn

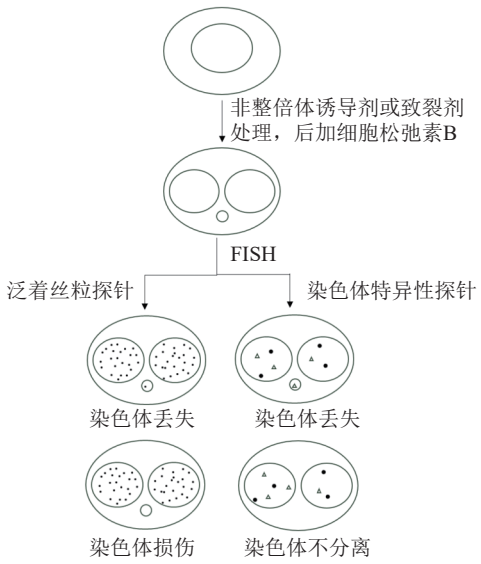


图 1 CBMN 试验结合 FISH 检测区分染色体丢失和不分离的示意图

Fig.1 Schematic Diagram of CBMN Assay Combined with FISH for Detection to Distinguish Chromosome Loss and Non-Disjunction

Fisher 公司，批号 2955954）；细胞松弛素 B（Cyt-B，批号 309958）、胃蛋白酶（批号 BCCJ5199）、核糖核酸酶（RNase，批号 74954120）均购于德国 Merck 公司；长春新碱（美国 MCE 公司，含量为 10 mmol/L 的 DMSO 溶液，1 mL）；秋水仙碱（批号 K2303167）、丝裂霉素 C（批号 C2429862）、氯化钾（规格 500 g，优级纯，批号 I2314216）、甲酰胺（含量 99%，批号 E23231375）、甲醇（含量≥ 99.9%，批号 J2326470）、乙酸（分析纯，批号 A2416094）、4',6- 二脒基 -2- 苯基吲哚（4',6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）染液均购于阿拉丁试剂（上海）有限公司；无水乙醇、丙酮为分析纯，水为纯化水；小鼠淋巴瘤细胞（L5178Y tk+/－细胞，以下简称 L5178Y 细胞）和人淋巴母细胞（TK6 细胞）均由上海益诺思生物技术股份有限公司馈赠。

2 方法与结果

2.1 细胞培养

将 L5178Y 细胞以每 1 mL 1×10^5 个细胞的密度悬浮培养，培养基为含 10%马血清、1%双抗、1.8%丙酮酸钠（100×）的 RPMI 1640 培养基，每个 T25 培养瓶中加入培养基 5 mL。培养 2 ～ 3 d 后，取细胞悬液 5 mL，离心（100×*g*）5 min，加入 RPMI 1640 完全培养基 1 mL 重悬，根据每个浓度 200 万个细胞数目进行传代。取 TK6 细胞以 1×10^5 个细胞的密度接种于 T25 培养瓶，于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养，培养基为含 10%胎牛血清、2% L- 谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基，每 2 ～ 3 d 换液 1 次。细胞于 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中培养，当达到对数生长期（80%～ 90%汇合时），进行传代，用于后续试验。

2.2 溶液配制

Cyt-B 贮备液：称取 Cyt-B 2 mg 溶于去离子水 0.5 mL 中，配成 4 mg/mL 的溶液。临用前新鲜配制，配后在 2 ～ 8 ℃条件下保存，放置时间不超过 8 h。

氯化钾低渗液：称取氯化钾 5.6 g，置玻璃瓶中，完全溶于去离子水 1 000 mL 中，分装至 50 mL 离心管中并做好标识，室温保存，有效期 3 个月。

固定液：取甲醇与乙酸，按体积比 3 ∶ 1 轻轻搅拌混匀。混合完成后，将固定液转移至标记好的储存瓶中，在室温、避光的条件下保存，有效期 6 个月。

2×SSC：将 20×SSC 与去离子水按体积比 1 ∶ 9 充分混匀，室温条件下保存，有效期 6 个月。

变性缓冲液：将甲酰胺和 2×SSC 缓冲液按体积比 7 ∶ 3 混合，搅匀后分装，于 2 ～ 8 ℃保存。

胃蛋白酶原液（1 mg/mL）：称取胃蛋白酶 3 mg 于玻璃瓶中，加入蒸馏水 3 mL，轻轻振荡溶解，调至 pH 酸性，于 2 ～ 8 ℃短暂保存，用于后续工作液制备。

胃蛋白酶工作液：取胃蛋白酶原液 5 μL，与 10 mmol/L 盐酸 1 mL 混匀，于 2 ～ 8 ℃避光保存，现用现配。

2.3 CBMN 试验

取 TK6 细胞和 L5178Y 细胞培养 24 h，用新鲜培养基替换生长培养基，根据文献[7,14—17]加入不同浓度的秋水仙碱、长春新碱和丝裂霉素 C 处理 3 h 后，将细胞与 Cyt-B 一起孵育 20 h。在收获前 1 h，使细胞恢复，以改善细胞形态和 MN 评分。收获的细胞用低渗溶液（0.075 mol/L 氯化钾溶液）处理。然后

将细胞加至固定液中，置 37 ℃水浴中保温 30 min，上述固定操作重复 3 次，滴片用于后续 FISH 试验。

2.4 FISH 试验

2.4.1 玻片预处理

上述 CBMN 试验所制得的载玻片分别通过 70％、90％、100％乙醇脱水处理 2 min，然后在 65 ℃烘烤 15 min；冷却后，将载玻片转移到丙酮中浸泡 10 min，晾干载玻片，在 2×SSC+RNase（100 μg/mL）中 37 ℃孵育 1 h。用 2×SSC 缓冲液洗涤 5 min，后在 PBS 中洗涤 5 min。在加湿的载玻片室中，将胃蛋白酶工作液 200 μL 加在玻片上，并用封口膜覆盖，于室温放置 2 ～ 3 min。在 PBS 中洗涤载玻片 5 min，再通过系列体积分数乙醇脱水 3 min 并晾干。在 70 ℃条件下，将玻片上的染色体在含 70％甲酰胺的 2×SSC 缓冲液中变性 2 min。随后浸入冰 70％乙醇中，通过系列体积分数乙醇脱水。

2.4.2 探针的制备和应用

将探针加热至 37 ℃，静置 5 min，后将探针在 85 ℃变性 10 min，立即置冰上冷却，随后将探针置玻片上，在 37 ℃加湿室中杂交约 16 h。

2.4.3 杂交后清洗

移除盖玻片，在 37 ℃的 2×SSC 缓冲液中清洗 5 min。后在 50％甲酰胺 /2×SSC 缓冲液中，于 37 ℃清洗玻片 2 次，每次 5 min。在 2×SSC 缓冲液中，清洗玻片 2 次，每次 5 min。

2.4.4 DAPI 反染

在暗处用 DAPI 复染玻片 10 min，后用 PBS 清洗样本 2 ～ 3 次，每次 5 min。

2.4.5 CBMN 鉴定和荧光显微镜观察

用显微镜观察处理后的细胞玻片，识别并计数双核细胞和微核。双核细胞的鉴定标准为：具有 2 个完整细胞核的细胞；微核的鉴定标准为：在细胞核外，大小小于主细胞核 1/3，与主细胞核染色质密度一致的小染色体结构。

对于 FISH 分析，用具有荧光设备的显微镜对玻片进行评分。检查具有完整细胞质的双核细胞中存在的 MN 是否存在 1 个或多个着丝粒点，并将其分类为含着丝粒（阳性，C+）和不含着丝粒（阴性，C–）。

在荧光显微镜成像研究中，分别于紫光和绿光激发下对样本进行拍摄。紫光激发用于呈现经特定荧光染料（如 DAPI，可与 DNA 结合，在紫光激发下发出蓝色荧光）标记的细胞结构，如细胞核；而绿光激发则用于显示由对应荧光探针（如在 FISH 技术中针对特定染色体区域的标记探针，在绿光激发下产生绿色荧光）标记的目标物。

2.4.6 数据分析

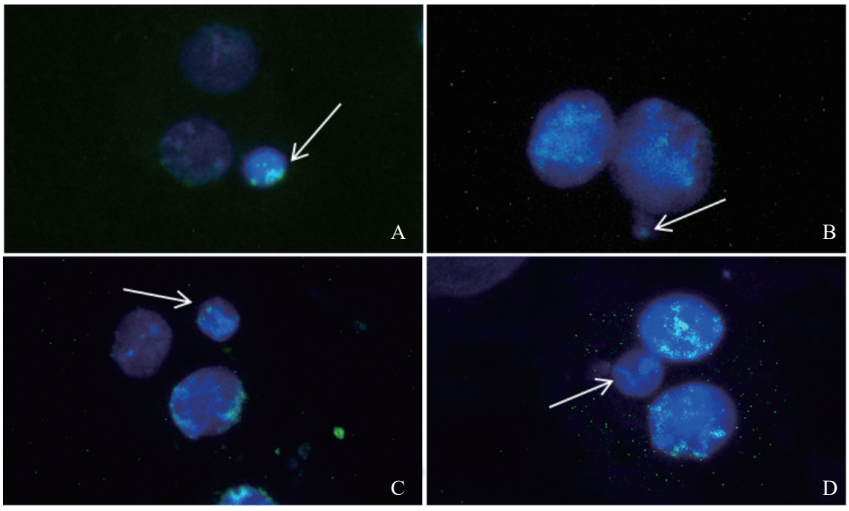
对已完成 DAPI 染色的玻片进行编码，并在 40 倍放大倍率下盲法评分。对每个试验点的 1 000 个双核细胞（每个载玻片 500 个，每个浓度组观察 2 个载玻片）进行评分，重复 3 次。使用 GraphPad Prism8、Microsoft Excel 2019 软件对数据进行统计学分析，试验结果由 3 次独立重复试验获得，组间采用单因素方差分析进行数据统计，$P \leqslant 0.05$ 表示差异具有显著性。表 1、表 2 所示“观察到双核微核平均数”为 3 次独立重复试验结果的均值。对于 FISH 分析，用荧光显微镜对玻片进行评分。

2.5 双核微核的观察结果

在荧光显微镜成像研究中，紫光激发用于呈现 DAPI 标记的细胞核和微核；而蓝光、绿光激发则用于显示小鼠泛着丝粒探针、人泛着丝粒探针标记的染色体。利用 Image J 软件（版本 1.8.0）进行图像合成。

含微核的双核 L5178Y 细胞和 TK6 细胞的荧光成像照片分别如图 2、图 3 所示。图 2 是荧光显微镜下的双核 L5178Y 细胞，蓝色部分为主要的细胞核，小于双主核的蓝色部分为微核，主核散布着许多由小鼠泛着丝粒探针杂交的绿色（FITC）荧光点。其中，图 2A、2B、2C 中箭头指示的区域显示了微核内的绿色荧光信号，表明微核内含有整条含着丝粒的染色体，而图 D 中的微核未含有绿色荧光信号，表明该微核不含整条的染色体。

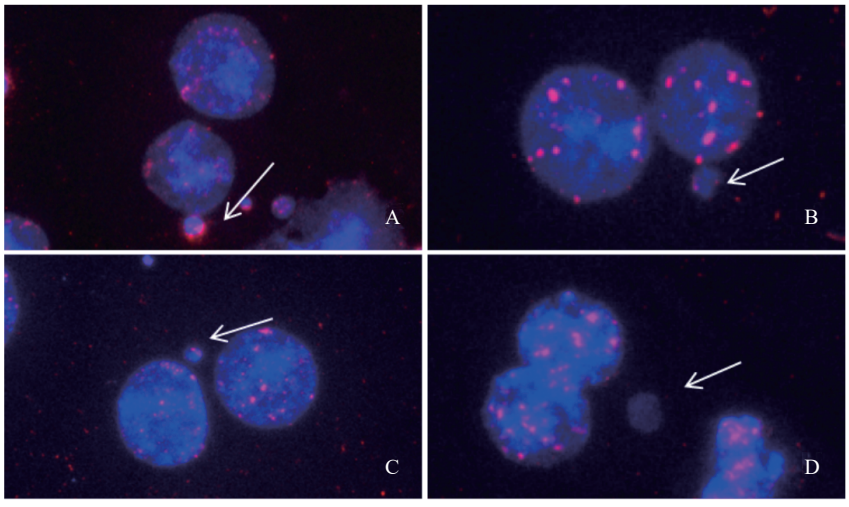
图 3 是荧光显微镜下的双核 TK6 细胞，蓝色部分为主要的细胞核，小于双主核的蓝色部分为微核，主核散布着许多泛着丝粒探针杂交的橙红色（CY3）荧光点。其中，图 3A、3B、3C 箭头指示的区域显示了微核内橙红色的荧光信号，表明微核内含有整条含着丝粒的染色体，而图 3D 中的微核未含有橙红



A、B、C—有 C+ 信号的双核淋巴细胞，箭头指向的微核中含有着丝粒荧光点；D—有 C– 信号的双核淋巴细胞，箭头指向的微核中不含着丝粒荧光点。

图 2 含双核微核的 L5178Y 细胞

Fig.2 Binucleated L5178Y Cells Containing Micronuclei



A、B、C—有 C+ 信号的双核淋巴细胞，箭头指向的微核中含有着丝粒荧光点；D—有 C– 信号的双核淋巴细胞，箭头指向的微核中不含着丝粒荧光点。

图 3 含双核微核的 TK6 细胞

Fig.3 Binucleated TK6 Cells Containing Micronuclei

色的荧光信号，表明该微核不含整条的染色体。

2.6 双核微核的统计结果

秋水仙碱、长春新碱和丝裂霉素 C 在 L5178Y 和 TK6 细胞中诱导 MN 的能力如表 1 和表 2 所示，展示了不同剂量的非整倍体诱导剂对 L5178Y 和 TK6 细胞中双核微核的诱导效果。在 L5178Y 细胞中，随着秋水仙碱和长春新碱剂量的增加，观察到的双核微核平均数均显著上升（$P \leqslant 0.05$）；秋水仙碱在质量浓度 12.5 ng/mL 和 50.0 ng/mL 时，平均微核率达到 0.9%，在质量浓度为 50.0 ng/mL 时，含着丝粒的微核率达到 88.9%；长春新碱在 10 ng/mL 时，平均微核率达到 10.1%，在 5.0 ng/mL 时，含着丝粒的微核率高达 94%。致裂剂丝裂霉素 C 在不同剂量下的微核诱导效果也表现出良好的阳性反应，均有显

著性差异（$P \leqslant 0.05$），尤其是在 500 ng/mL 时，微核率达到 12.7%。

在 TK6 细胞中，秋水仙碱和长春新碱同样显示出剂量依赖性，平均微核率在不同质量浓度下也显著性增加（$P \leqslant 0.05$），秋水仙碱在质量浓度 12.5 ng/mL 时，平均微核率达到 4.7%，在质量浓度为 25.0 ng/mL 时，含着丝粒的微核率达到 71.4%；长春新碱在 4.0 ng/mL 时的平均微核率达到 2.3%，含着丝粒的微核率达到 95.7%。致裂剂丝裂霉素 C 在质量浓度 2.0 ng/mL 时，平均微核率达到 4.9%。

在本研究中，采用非整倍体诱导剂秋水仙碱、长春新碱和致染色体断裂剂丝裂霉素 C 作为外源化合物诱导 L5178Y 细胞和 TK6 细胞，检查具有完整细胞质的双核淋巴细胞中存在的 MN 是否存在 1 个或多个着丝粒点，并将其分类为含着丝粒 MN 和不含着丝粒 MN。对每个试验点单次总计至少 1 000 个双核细胞进行评分。结果表明，3 种受试物作用于 2 种细胞系，给药组与对照组相比平均微核率均显著增加（$P \leqslant 0.05$）。2 种非整倍体诱导剂秋水仙碱和长春新碱与对照水平相比，双核微核的发生率显著高于对照组，表明非整倍体诱导物能够有效引发细胞的微核形成，含着丝粒的微核率均出现统计学意义的显著增加。秋水仙碱作用于 L5178Y 细胞，含着丝粒的微核率在 77.8%～88.9%，作用于 TK6 细胞含着丝粒的微核率在 70.2%～71.4%；长春新碱作用于 L5178Y 细胞含着丝粒的微核率在 50.5%～94.0%，作用于 TK6 细胞含着丝粒的微核率在 88.2%～95.7%。致裂剂丝裂霉素作用于 2 种细胞系，微核率存在显著差异（$P \leqslant 0.05$），含着丝粒的微核率无统计学差异，表明 MN 可能由染色体断裂

表 1　秋水仙碱、长春新碱或丝裂霉素 C 处理 3 h 对 L5178Y 细胞的毒性和微核结果

Fig.1　Toxicity and Micronucleus Results of L5178Y Cells Treated with Colchicine, Vincristine or Mitomycin C for 3 h

物质	剂量 /(ng·mL^{-1})	细胞毒性 /%	观察到双核微核平均数 / 个	平均微核率 /%	含着丝粒的微核数 / 个	含着丝粒的微核率 /%
秋水仙碱	0	0.3	3	0.3	1	33.3
	12.5	14.4	9	0.9	7	77.8
	25.0	19.1	8	0.8	7	87.5
	50.0	23.3	9	0.9	8	88.9
长春新碱	0	0.2	4	0.4	1	25.0
	2.5	9.0	27	2.7	23	85.3
	5.0	17.1	99	9.9	93	94.0
	10.0	17.3	101	10.1	51	50.5
丝裂霉素 C	0	0.2	5	0.5	1	20.0
	125.0	6.6	104	10.4	11	10.6
	250.0	7.9	92	9.2	13	14.1
	500.0	23.2	127	12.7	6	4.7

表 2　秋水仙碱、长春新碱或丝裂霉素 C 处理 3 h 对 TK6 细胞的毒性和微核结果

Fig.2　Toxicity and Micronucleus Results of TK6 Cells Treated with Colchicine, Vincristine, or Mitomycin C for 3 h

物质	剂量 /(ng·mL^{-1})	细胞毒性 /%	观察到双核微核平均数 / 个	平均微核率 /%	含着丝粒的微核数 / 个	含着丝粒的微核率 /%
秋水仙碱	0	0.1	19	1.9	3	15.8
	12.5	2.0	47	4.7	33	70.2
	25.0	11.0	42	4.2	30	71.4
	50.0	43.0	47	4.7	33	70.2
长春新碱	0	0.1	12	1.2	2	16.7
	1.0	11.5	17	1.7	14	88.2
	2.0	37.7	22	2.2	19	86.4
	4.0	41.4	23	2.3	22	95.7
丝裂霉素 C	0	0.1	14	1.4	2	14.3
	0.5	12.1	39	3.9	2	5.1
	1.0	12.9	33	3.3	4	12.1
	2.0	23.3	49	4.9	3	6.1

后产生的无着丝粒片段形成。本研究的结果证实了非整倍体诱导剂的遗传毒性危害。秋水仙碱和长春新碱均可诱导 L5178Y 和 TK6 细胞中 MN 数量的统计学增加；与致裂剂丝裂霉素 C 的结果对比可知，CBMN 结合 FISH 的方法可用作区分非整倍体诱导剂和染色体致裂剂。

3 讨论

MN 可由引起染色体断裂的物质诱导的无着丝粒片段产生，也可由引起非整倍性的物质引发的整个滞后染色体产生。准确识别和评估非整倍体诱导剂，对于预防相关疾病的发生起至关重要的作用。然而，传统的 MN 试验无法区分这 2 种事件。传统的非整倍体检测方法存在诸多局限性，如染色体核型分析操作烦琐、对技术人员要求高、分辨率有限；常规的分子生物学检测手段难以全面、精准地检测非整倍体相关变化。体外 MN 试验与 FISH 技术的联合应用为非整倍体诱导剂的检测带来了新的方案。体外 MN 试验能够敏锐地检测细胞内微核的形成，而 MN 的产生通常与染色体断裂、纺锤体损伤等密切相关，可作为遗传毒性的重要指示。FISH 技术是一种鉴定 MN 成分的准确技术[18]，能特异性地将荧光标记探针与染色体上的特定 DNA 序列杂交，清晰、直观地呈现染色体数目和结构的变化[10]；使用着丝粒 DNA 探针的 FISH 还可检测中期染色体和间期核上的相应染色体区域。

本研究通过将 CBMN 和 FISH 技术相结合，应用于 L5178Y 和 TK6 细胞，成功检测了非整倍体诱导物，为筛选和鉴定潜在的非整倍体诱导剂提供了强有力的工具。L5178Y 细胞源自小鼠，其遗传背景清晰且已被广泛研究。L5178Y 细胞由于 p53 功能缺失，缺失细胞保护机制，在检测非整倍体诱导剂时，更易产生染色体数目和结构的改变，且不会因 p53 介导的细胞保护机制而被抑制，从而更易被体外 MN 试验与 FISH 技术所检测到，为研究非整倍体诱导剂的作用机制以及筛选具有潜在非整倍体诱导风险的物质提供了独特的细胞模型。

TK6 细胞来源于人类淋巴细胞，能避免因物种差异导致的结果偏差，且具有正常的 p53 功能，在细胞受到非整倍体诱导剂刺激时，其检测结果能更准确地反映药物对人体正常细胞染色体的潜在影响，为药物安全性评价提供更可靠的依据。结果表明，非整倍体诱导剂秋水仙碱和长春新碱作用于细胞时可观察到 MN 上含有泛着丝粒探针的荧光点，而当细胞受到致裂剂丝裂霉素 C 作用时，染色体发生断裂，这些无着丝粒的片段在细胞有丝分裂的过程中无法被纺锤体牵引至细胞两极，从而滞留在细胞质中形成微核，所以不会有着丝粒荧光点。

MN 的出现与非整倍体的发生具有显著相关性，且 FISH 技术在识别和分析非整倍体方面展现出优越性。这一方法不仅提高了检测的灵敏度和特异性，还为理解非整倍体的诱导机制提供了新的视角。同时，使用 CBMN 试验和 FISH 可实现更高的灵敏度，更有利于研究者理解诱变剂涉及的生物学机制，以充分评估其危害，并有可能检测非整倍体诱导与致染色体断裂的阈值。另外，CBMN 和 FISH 技术的应用不仅可区分致染色体断裂和非整倍性效应，还可区分非整倍性诱导的 2 种机制：染色体丢失为 MN 或染色体不分离，会使得一个子细胞变成三体，另一个变成单体[19]。这对于进行具有阈值剂量反应类型的化合物的风险评估非常有帮助[11]。使用着丝粒和染色体特异性着丝粒探针的 FISH 已被广泛应用于遗传毒理学研究，以阐明各种致突变物的遗传毒性潜力，并检测化学试剂在体外和体内诱导的染色体损伤。在新药研发的早期筛查阶段，将候选药物作用于体外培养的细胞，利用 MN 试验检测细胞内的 MN 形成情况，可指示其是否具有潜在的遗传毒性，再采用 FISH 技术进一步分析细胞染色体，能精准确定染色体数目是否发生改变，以及特定染色体区域是否存在结构变异，从而进行优化或淘汰，避免后续巨大研发投入的浪费。在药物临床试验阶段，对临床试验受试者的细胞样本进行深入检测，不仅能及时发现药物对人体细胞的遗传毒性影响，还能通过动态监测了解药物遗传毒性的发展趋势，可从细胞和分子层面更深入地评估一些作用机制较复杂的特殊类型药物（如靶向药物）对染色体的影响，为进一步优化药物剂量或治疗方案提供重要依据，

从而在确保药物疗效的同时，最大程度地降低药物的遗传毒性风险。

未来的研究可进一步探索双核微核与不同类型非整倍体之间的关系，特别是在不同诱导因素下的表现。此外，优化 FISH 技术的探针设计和检测流程，将有助于提高检测效率和准确性。同时，结合其他分子生物学技术，深入研究非整倍体对细胞功能和生物体健康的影响，将为相关领域的研究提供更全面的解释。

参考文献：

[1] LYNCH A M, 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]. *Toxicol Environ Mutagen*, 2019, **847**: 403025.

[2] SIEGEL J J, AMON A. New insights into the troubles of aneuploidy [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2012, **28**(1): 189-214.

[3] PACCHIEROTTI F, MASUMURA K, EASTMOND D A, *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 Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2019, **848**: 403023.

[4] WILLIAMS B R, AMON A. Aneuploidy: cancer's fatal flaw? [J]. *Cancer Res*, 2009, **69**(13): 5289-5291.

[5] 黄芳华. ICH 遗传毒性标准试验组合的最新要求——ICHS2(R1) 人用药物遗传毒性试验和结果分析指导原则介绍（一）[J]. 药物评价研究 , 2009, **32**(1): 10-12.

[6] REICHSTEIN I S, KONIG M, WOJTYSIAK N, *et al*. Replacing animal-derived components in *in vitro* test guidelines OECD 455 and 487 [J]. *Sci Total Environ*, 2023, **868**: 161454.

[7] HEDDLE J A, CARRANO A V. The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by γ-irradiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments [J]. *Mutat Res*, 1977, **44**(1): 63-69.

[8] FENECH M. The *in vitro* micronucleus technique [J]. *Mutat Res*, 2000, **455**(1/2): 81-95.

[9] DECORDIER I, KIRSCH-VOLDERS M. Fluorescence in situ hybridization (FISH) technique for the micronucleus test [J]. *Genoto Asse*, 2013, **1**: 237-244.

[10] KIRSCH-VOLDERS M, PLAS G, ELHAJOUJI A, *et al*. The *in vitro* MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance [J]. *Arch Toxicol*, 2011, **85**: 873-899.

[11] CHUNG H W, KANG S J, KIM S Y. A combination of the micronucleus assay and a FISH technique for evaluation of the genotoxicity of 1,2,4-benzenetriol [J]. *Mutat Res*, 2002, **516**(1/2): 49-56.

[12] NERSEYAN A, PERRONE E, ROGGIERI P, *et al*. Cytogenetic toxicity of cycloplatam in human lymphocytes: detection by the micronucleus test and fluorescence in situ hybridization [J]. *Anti-cancer Drugs*, 2006, **17**(3): 289-295.

[13] HOVHANNISYAN G G. Fluorescence in situ hybridization in combination with the comet assay and micronucleus test in genetic toxicology [J]. *Mol Cytogenet*, 2010, **3**(1): 17.

[14] ZHANG L S, HONMA M, HAYASHI M, *et al*. A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the in vitro micronucleus test [J]. *Mutat Res*, 1995, **347**(3-4): 105-115.

[15] KIRKLAND D. Evaluation of different cytotoxic and cytostatic measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit): summary of results in the collaborative trial [J]. *Mutat Res*, 2010, **702**(2): 139-147.

[16] KIRCHNER S, ZELLER A. Comparison of different cytotoxicity measures for the *in vitro* micronucleus test (MNVit) in L5178Y tk(+/-) cells: summary of 4 compounds (mitomycin C, cyclophosphamide, colchicine and diethylstilboestrol) with clastogenic and aneugenic mode of action [J]. *Mutat Res*, 2010,**702**(2): 193-198.

[17] LORGE E, THTBAUD V, AARDEMA M J, *et al*. SFTG international collaborative study on *in vitro* micronucleus test Ⅰ. General conditions and overall conclusions of the study [J]. *Mutat Res*, 2006, **607**(1): 13-36.

[18] JIE Y M, JIA C. Chromosomal composition of micronuclei in mouse NIH 3T3 cells treated with acrylamide, extract of Tripterygium hypoglaucum (level) hutch, mitomycin C and colchicine, detected by multicolor FISH with centromeric and telomeric DNA probes [J]. *Mutagenesis*, 2001, **16**(2): 145-149.

[19] PARRY E M, PARRY J M, CORSO C, *et al*. Detection and characterization of mechanisms of action of aneugenic chemicals [J]. *Mutagenesis*, 2002, **17**(6): 509-521.