

体内彗星实验联合微核实验检测化合物的遗传毒性

王欣*,王晨,宋捷,李波[#](中国食品药品检定研究院,北京 100050)

中图分类号 R965;R394.6

文献标志码 A

文章编号 1001-0408(2014)33-3107-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.33.11

摘要 目的:考察体内彗星实验联合微核实验检测化合物遗传毒性的可行性。方法:以阳性化合物 *N*-乙基-*N*-亚硝基脲为模型药物,取♂大鼠随机分为空白对照组和给药组[40 mg/(kg·d)],每组5只,灌胃给药3次,末次给药后3 h处死大鼠。进行彗星实验,收集大鼠外周血、肝、胃、睾丸组织经前处理制备成单细胞凝胶玻片进行电泳,使用Komet 6.0软件分析单细胞显微图像,每种组织分析100个细胞(胃组织50个细胞),计算尾部DNA百分含量。进行微核实验,收集大鼠骨髓细胞进行涂片,计数2 000个嗜多染红细胞(PCE)中含微核细胞(MNPCE)的数目及嗜多染红细胞微核率。结果:与空白对照组比较,模型药物可使大鼠外周血淋巴、肝、胃、睾丸细胞组织的尾部DNA百分含量明显增加($P<0.05$),并可使大鼠骨髓嗜多染红细胞微核率明显升高($P<0.05$)。结论:彗星实验可用于动物体内多种脏器遗传毒性的检测;微核实验可用于动物骨髓细胞的遗传毒性检测。

关键词 彗星实验;微核实验;遗传毒性;大鼠;*N*-乙基-*N*-亚硝基脲

Detection of Chemical Genotoxicity with Comet Assay Combined with Micronucleus Test *in vivo*

WANG Xin, WANG Chen, SONG Jie, LI Bo (National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the feasibility of chemical genotoxicity with comet assay combined with micronucleus test. METHODS: Using positive compound *N*-ethyl-*N*-nitrosourea as model, male rats were randomized into blank control group and medication group [40 mg/(kg·d)], with 5 rats in each group. They were given medicine three times intragastrically, and then sacrificed 3 h after last medication. For comet assay, peripheral blood, liver, stomach and testis of rats were collected to prepare single cell gel slides for electrophoresis. Komet 6.0 software was used to analyze electrophoretic images; each animal collected 100 cells per tissue (except for stomach 50 cells), and the percentage of tail DNA was calculated. For micronucleus test, bone marrow cells were collected to smear and count the number of MNPCE from 2 000 PCE of one animal. RESULTS: Compared with blank control group, the percentage of tail DNA increased significantly in peripheral blood, liver, stomach and testis of rats with model drug ($P<0.05$), and the rate of micronucleus in PCE increased significantly with model drug ($P<0.05$). CONCLUSIONS: Comet assay can be used to detect the genotoxicity of many organs; micronucleus test is suitable for the detection of the genotoxicity of marrow cells.

KEYWORDS Comet assay; Micronucleus test; Genotoxicity; Rats; *N*-ethyl-*N*-nitrosourea

人用药物注册技术要求国际协调会(International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH)在对药物遗传毒性研究技术指导原则的最新修订草案ICH S2(R1)中建议:体内研究增加大鼠肝细胞彗星实验作为第二遗传终点。而以往只要求微核实验一项遗传终点。并且,还建议将这两项遗传终点通过联合形式在一次实验中完成检测,或者通过整合形式融入28 d反复给药毒性研究中检测^[1]。两项实验原理不同:彗星实验可以直接检测到DNA损伤,包括单/双链损伤、碱性不稳定位点、交联等多种类型;微核实验是检测药物致染色体结构损伤和非整倍性改变。前者为基因水平,后者为染色体水平^[2]。将两项实验结合是一种完善和补充,可以更全面地评价药物体内遗传毒性^[3]。本研究中,笔者采用联合实验方法,考察阳性化合物 *N*-乙基-*N*-亚硝基脲(*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, ENU)的体内遗传毒性。对于彗星实验,检测了多种脏器细胞

而不仅局限于《毒理学安全性评价标准操作规程指南》要求的肝细胞,以探索该方法更广泛的应用范围^[4]。

1 材料

1.1 仪器

DYCP-31F型电泳仪和DYY-6C电泳仪电源(北京市六一仪器厂);石蜡切片伸展器(日本樱花公司);NTS-1300恒温振荡水槽(东京理化器械株式会社);Komet 6.0图像分析系统(英国安道尔科技有限公司);Nikon eclipse 80i荧光显微镜(日本尼康公司);HB-RO超纯水机(杭州惠邦净水设备有限公司)。

1.2 药品与试剂

ENU(Sigma-aldrich化学试剂公司,批号:119K175,纯度:98%);琼脂糖(北京市普京康利科技有限公司,批号:111860,纯度:99%);低熔点琼脂糖(北京欣经科生物技术有限公司,批号:060M1486V,纯度:98%);戊巴比妥钠(德国默克公司,批号:F20140816,纯度:99%);超纯水为实验室自制。

1.3 动物

Sprague Dawley大鼠10只,SPF级,成年♂,体质量180~210 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,动物合格证号:SCXK(京)2007-0001。

* 助理研究员,硕士。研究方向:体内毒理学。电话:010-67876252。E-mail: wangxin-26@nifdc.org.cn

[#] 通信作者:研究员,博士。研究方向:新药临床前安全性。电话:010-67095791。E-mail: libo@nifdc.org.cn

2 方法

2.1 溶液的配制

2.1.1 细胞裂解液。取146.1 g氯化钠、37.2 g乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)、1.2 g三羟甲基氨基甲烷(Tris)、12 g NaOH溶解于适量超纯水中,NaOH调pH至10.0,定容至890 ml,临用前加入1%聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)和10%二甲亚砜(DMSO),即得。

2.1.2 切碎液。取7.45 g EDTA-2Na溶解于900 ml无钙、镁、酚红的Hank's液,调pH至7.5,临用前加入10% DMSO,即得。

2.1.3 电泳缓冲液。取12 g NaOH和0.372 g EDTA-2Na溶解于1 L超纯水中,调pH>13.0,即得。

2.1.4 中和液。取0.2 mol/L Tris-HCl溶液,调pH至7.4,加染液(20 μ g/ml吖啶橙溶液)即得。

2.2 分组与给药

取大鼠随机分为空白对照组和给药组,每组5只。空白对照组大鼠灌胃给予生理氯化钠溶液;给药组大鼠灌胃给予ENU 40 mg/(kg·d),给药体积为2 ml/kg。共给药3次,前2次给药间隔为24 h,第3次给药间隔为21 h,末次给药后3 h腹腔注射4.5%戊巴比妥钠溶液进行麻醉,解剖并收集组织样本,之后放血处死。

2.3 彗星实验样本采集

(1)血液:每只大鼠从腹主动脉采血200 μ l,移入肝素化采血管,反转振摇防止凝血,放入碎冰盒内备用。(2)肝组织:剪断大鼠腹主动脉,自肝门静脉缓慢推注冰冷的生理氯化钠溶液直至肝脏鼓起发白,剪下左侧一小片肝叶组织,放入试管中并加入切碎液,剪碎组织以释放细胞,然后放入冰盒内备用。(3)胃组织:剪下大鼠胃腺组织,洗净,放入一试管中,加入适量切碎液预孵30 min,取出组织,用刀片轻刮内壁2次,弃掉表层胃黏膜细胞,再用刀片轻刮胃内壁数次,加适量切碎液将刮下的内壁细胞转移入另一试管中以释放细胞,然后放入冰盒内备用。(4)睾丸:摘取大鼠左侧睾丸,加入适量切碎液,剪碎以释放细胞,然后放入冰盒内备用。

2.4 微核实验样本采集

摘取大鼠单侧股骨,剪断两端开放骨髓腔;吸取2 ml胎牛血清,用注射器针头从股骨中冲洗骨髓至试管中,反复抽吸注射器针头吹打骨髓细胞悬液,备用。

2.5 标本制作与观察

参照文献^[5-6]彗星实验方法,通过细胞裂解,DNA碱性解旋、电泳、中和、脱水制备大鼠血淋巴、肝、胃、睾丸的单细胞凝胶玻片,参照文献^[7-8]微核实验方法涂片,染色后,在400倍荧光显微镜下观察并拍照。

2.6 数据分析与统计学处理

(1)彗星实验:使用Komet 6.0图像分析系统分析单细胞图像,使用尾部DNA百分含量(Tail DNA%)表示实验结果^[9]。对于不同组织样本,每只大鼠除胃组织分析50个细胞外,其余组织分析100个细胞,计算尾部DNA百分含量,用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用SPSS 13.0统计软件进行 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。(2)微核实验:每只大鼠计数2 000个嗜多染红细胞(PCE)中含微核细胞(MNPCE)的数目,以嗜多染红细胞微核率表示实验结果^[7-8],采用SPSS 13.0统计软件进行泊松分布检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 彗星实验观察结果

给药组大鼠的外周血淋巴、肝、胃、睾丸组织细胞中均能观察到明显的彗星拖尾现象,DNA碎片在电场的作用下迁移离开彗头而形成扫尾,而空白对照组的各组织细胞中均未见拖尾现象。在肝、胃、睾丸组织单细胞凝胶玻片中,还观察到一些凋亡细胞,以胃组织细胞最多。这类细胞图像一般彗头很小或者消失,彗尾很长,彗尾呈椭圆或者纺锤形^[9]。凋亡细胞不进行计数和统计分析。出现凋亡细胞的原因推测是研究中制备的脏器种类较多,导致每类样本的采集和处理步骤耗时较长,细胞在外因的作用下损伤严重而启动凋亡程序,并非药物导致。由于胃组织细胞的制备过程更加复杂,所以出现凋亡细胞数目最多,故研究中胃组织只观察分析50个细胞。给药组胃组织凋亡细胞电泳图见图1,各组大鼠脏器细胞电泳图见图2。

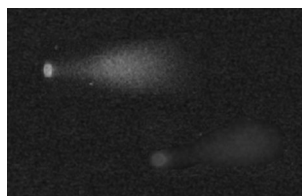
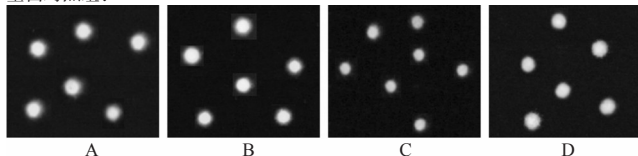


图1 给药组大鼠胃组织凋亡细胞电泳图($\times 400$)

Fig 1 Electrophoresis image of gastric apoptotic cells in medication group($\times 400$)

空白对照组:



给药组:

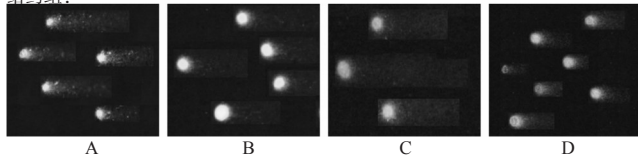


图2 各组大鼠脏器细胞电泳图($\times 400$)

A.外周血;B.肝;C.胃;D.睾丸

Fig 2 Electrophoresis image of cells in those organs of rats in each group($\times 400$)

A. peripheral blood; B. liver; C. stomach; D. testis

3.2 彗星实验DNA含量结果

与空白对照组比较,给药组大鼠外周血淋巴、肝、胃、睾丸组织的尾部DNA百分含量明显增加($P < 0.05$),表明ENU可对外周血淋巴、肝、胃、睾丸4种组织产生显著的DNA损伤,结果见表1。

3.3 微核实验结果

与空白对照组比较,给药组大鼠骨髓嗜多染红细胞微核率明显升高($P < 0.05$),表明ENU可诱导大鼠骨髓微核发生,对大鼠骨髓细胞分化成熟产生影响,结果见表2。

4 讨论

ENU是一种烷化剂,造成DNA损伤的机制明确,是方法

表1 各组大鼠脏器组织的尾部DNA百分含量比较

Fig 1 Comparison of the content percentage of tail DNA in tissues of rats in each group

组别	外周血淋巴细胞, %		肝细胞, %		胃细胞, %		睾丸细胞, %	
	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差
空白对照组	2.32	2.741	3.01	3.269	3.21	3.450	4.75	5.986
	2.20	2.988	2.86	2.231	3.14	3.692	4.32	5.361
	2.97	3.562	2.78	3.056	3.32	3.658	3.76	4.165
	3.15	3.412	3.58	4.215	2.98	3.357	3.54	4.329
	2.54	2.722	2.86	3.036	2.87	3.172	3.53	3.894
$\bar{x} \pm s$	2.64 ± 0.411		3.02 ± 0.325		3.10 ± 0.180		3.98 ± 0.537	
给药组	14.22	10.158	22.92	13.342	23.14	21.692	30.26	27.130
	22.78	8.656	20.18	9.563	17.88	15.217	33.15	30.392
	18.12	12.394	23.46	14.281	15.83	17.661	28.42	30.776
	20.45	10.771	19.11	10.032	19.49	19.732	27.19	29.238
	23.62	10.549	27.52	13.203	17.20	15.292	35.67	32.156
$\bar{x} \pm s$	19.84 ± 3.803*		22.64 ± 3.281*		18.71 ± 2.806*		30.94 ± 3.469*	

与空白对照组比较: * $P < 0.05$
vs. blank control group: * $P < 0.05$

表2 各组大鼠骨髓组织的嗜多染红细胞微核率比较

Tab 2 Comparison of the rate of micronucleus in PCE in each group

组别	嗜多染红细胞个数	微核嗜多染红细胞个数	嗜多染红细胞微核率, %
空白对照组	2 000	1	0.5
	2 000	1	0.5
	2 000	0	0.0
	2 000	1	0.5
	2 000	3	1.5
$\bar{x} \pm s$			0.6 ± 0.55
给药组	2 000	39	19.5
	2 000	43	21.5
	2 000	50	25.0
	2 000	13	6.5
	2 000	24	12.0
$\bar{x} \pm s$			16.9 ± 7.51*

与空白对照组比较: * $P < 0.05$
vs. blank control group: * $P < 0.05$

学研究中的常用工具药^[10]。研究中,应用彗星实验方法对给予该化合物处理的大鼠外周血淋巴、肝、胃、睾丸多种组织进行检测,结果均为阳性。可见,彗星实验的用途非常广泛,可依据具体实验目的、药物作用的靶器官或蓄积部位、药物代谢途径或作用的不同,选择不同的组织进行研究。

根据微核形成的动力学原理,母红细胞在骨髓中完成脱核的时间大约需要 20 h,生成的网织红细胞分泌进入外周血的时间大约需要 >30 h。因此,骨髓微核的检测时间应该在给药后约 20 h。本次研究中,微核样本的采集时间是在第 3 次给药后 3 h,距离第 2 次给药后 24 h^[7,11]。对比微核原理,第 3 次给药的剂量还不能产生微核,因此微核实验实际的药物暴露量为 80 mg/kg。但彗星实验实际的药物暴露量却是 120 mg/kg。两项指标在药物暴露量上出现了差异。若待测物的实验结果恰好为临界值,或者当一项结果为阳性一项结果为阴性时,以上暴露量的差异就会严重干扰结论的判断。因此,无论是采用联合还是整合的哪种研究方法,在兼顾药物充分暴露的前提

下,选择恰当的剂量和检测时间点都是实验设计中的核心问题^[11-12]。本次研究,笔者采用彗星实验联合微核实验的研究方法,是对 ICH 最新修订精神的初探,希望与同领域人员交流探讨,以更加合理地开展实验研究。

参考文献

[1] ICH S2 (R1). *Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use (current step 4 version)* [EB/OL]. (2011-11-09)[2014-04-13].<http://www.doc88.com/p-125261848564.html>.

[2] Dobrzynska MM, Gajowik A, Radzikowska J, et al. Genotoxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles in bone marrow cells of rats in vivo[J]. *Toxicology*, 2014, doi:10.1016/j.tox.2013.11.012.

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

[4] 范玉明, 张舒. 毒理学安全性评价标准操作规程指南[M]. 成都: 电子科技大学出版社, 2009: 924-955.

[5] Hartmann A, Aquarell E, Beevers C, et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay[J]. *Mutagenesis*, 2003, 18(1): 45.

[6] Smith CC, Adkins DJ, Martin EA, et al. Recommendations for design of the rat comet assay[J]. *Mutagenesis*, 2008, 23(3): 233.

[7] 曹佳, 林真, 余争平. 微核试验[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2000: 12-67.

[8] Schwen R, Jackson R, Proudlock R. Genotoxicity assessment of s-equal in bacterial mutation, chromosomal aberration, and rodent bone marrow micronucleus tests[J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(12): 3 481.

[9] Vasquez MZ. Recommendations for safety testing with the in vivo comet assay[J]. *Mutat Res*, 2012, 747(1): 142.

[10] Tang LL, Guerard M, Zeller A. Quantitative assessment of the dose-response of alkylating agents in DNA repair proficient and deficient ames tester strains[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2014, 55(1): 15.

[11] Bowen DE, Whitwell JH, Lillford L, et al. Evaluation of a multi-endpoints assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test[J]. *Mutat Res*, 2011, 722(1): 7.

[12] Dertinger SD, Phonethepswath 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.

(收稿日期: 2014-03-10 修回日期: 2014-05-29)