

生物检定

SD 大鼠连续灌胃给药对碱性彗星电泳和骨髓微核的影响^{*}文海若¹, 毛志慧^{1,2}, 陈高峰^{1,2}, 宋捷¹, 李琛¹, 杨莹¹, 王伟凡¹, 王雪¹, 黄芝瑛²

(1. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176;

2. 中山大学药学院药物安全评价中心, 广州 510006)

摘要 目的: 开展 SD 大鼠 3 天重复经口灌胃给药毒性实验, 联合肝、肾和外周血碱性彗星电泳试验和骨髓微核试验, 并对遗传毒性试验常用的溶媒及阳性化合物进行检测和比较。通过对比相同实验条件下开展的以染色体损伤和 DNA 断裂为检测终点的组合遗传毒性试验结果, 为给药和取材时间点以及阳性剂的选择提供参考依据。方法: 雄性 SD 大鼠随机分为去离子水组、0.9% 氯化钠注射液组、玉米油组、环磷酰胺 (CPA) 10 mg·kg⁻¹ 组、环磷酰胺 (CPA) 40 mg·kg⁻¹ 组、N-乙基-N-亚硝基脲 (ENU) 40 mg·kg⁻¹ 组和甲磺酸乙酯 (EMS) 200 mg·kg⁻¹ 组, 每组 5 只。连续 3 d 灌胃给药, 实验期间记录动物临床症状和体重变化。末次给药后 3 h 处死大鼠。称量肝、肾脏器重量, 并收集肝、肾及外周血制备单细胞悬液开展多脏器碱性彗星试验。样本制片后分别经裂解、解旋、电泳、染色等步骤, 使用 Komet 6.0 软件进行图像分析; 取材同时收集骨髓细胞制作涂片, 计数 2 000 个嗜多染红细胞 (PCE) 的含微核细胞发生率。结果: 1) CPA、ENU 和 EMS 均未对动物整体产生严重的毒性作用。2) 只有 EMS 组的肝细胞、肾细胞和淋巴细胞的刺猬细胞百分率明显升高, CPA 及 ENU 对刺猬细胞百分率无明显影响。ENU 组在 3 种组织的彗尾 DNA 含量百分率及 Olive 尾矩与溶媒对照组比较为弱致 DNA 断裂作用; 而 EMS 则在 3 种组织中均显示了强致 DNA 断裂作用。3) CPA 作为经典的骨髓微核试验阳性剂, 其微核结果显示了一定的剂量相关性; ENU 的致微核作用相对较弱。结论: 将多脏器彗星试验与微核试验与 3 天重复给药毒性实验整合是可行的; 实验流程的标准化、阳性剂的选择及实验设计等需根据具体情况来设计。

关键词: 药物安全性试验; 遗传毒性试验; 阳性对照物; 阴性对照物; 氯化钠; 玉米油; 环磷酰胺; N-乙基-N-亚硝基脲; 甲磺酸乙酯; 碱性彗星电泳; 骨髓微核试验

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2017)06-1063-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.06.19

Effects of repeated intragastric administration on alkaline comet assay and micronucleus test in SD rats^{*}WEN Hai-ruo¹, MAO Zhi-hui^{1,2}, CHEN Gao-feng^{1,2}, SONG Jie¹, LI Chen¹,
YANG Ying¹, WANG Wei-fan¹, WANG Xue¹, HUANG Zhi-ying²

(1. Beijing Key Laboratory, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract Objective: To compare the effects of commonly used solvent and positive controls in SD rats by gavage^{*} 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金课题 (2014C1); 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2015ZX09501004-002)

第一作者 Tel: (010) 67876252; E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

for 3-day repeated dosed toxicity study, combined with alkaline comet assay for liver, kidney and peripheral blood cells and bone marrow micronucleus test. By comparing the results of combined genotoxicity tests for detecting chromosomal damage and DNA breakage under the same experimental conditions, this study aims to provide reference for identifying the dosing and sampling time points and the selection of appropriate positive controls.

Methods: Male SD rats were randomly divided into deionized water group, 0.9% NaCl injection group, corn oil group, cyclophosphamide (CPA) $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group, cyclophosphamide (CPA) $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group, *N*-ethyl-*N*-nitrosourea (ENU) $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group and ethyl methanesulfonate (EMS) $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group, 5 rats in each group. The clinical observation and body weight were recorded during the experiment. Animals were sacrificed 3 hours after the last dosing, and the weights of liver and kidney were measured. Single cell suspensions were made from liver, kidney and peripheral lymphocytes for comet assay. The samples were subsequently proceeded to lysis, unwinding, electrophoresis, dyeing, and the results were analyzed using Komet 6.0 software. Bone marrow cells were also prepared smear in parallel for micronucleus test, and the incidence of micronucleated cells were counted in 2 000 PCE. **Results:** 1) No significant toxic effect was observed in animals treated with CPA, ENU or EMS in this study; 2) The percentage of hedgehog cells in hepatocytes, kidney cells and lymphocytes were significantly increased in only EMS group, and CPA and ENU had no significant effect on the percentage of hedgehog cells. Compared with the solvent control group, the percentage of tail DNA content and Olive tail moment (OTM) in all three tissues were the weak DNA fracture by ENU, while EMS in all three tissues showed strong DNA fracture. 3) As a classic bone marrow micronucleus test positive agent, its micronucleus results of CPA showed a certain dose correlation; ENU induced micronucleus was relatively weak. **Conclusion:** It is feasible to integrate multiple organ comet assay and micronucleus test with 3-day repeated drug toxicity test. However, the standardization of the experimental procedure, the selection of the positive agent and the design of the experiment should be designed according to the specific situation.

Keywords: drug safety testing; genetic toxicity test; positive control; negative control; sodium chloride; corn oil; cyclophosphamide; *N*-ethyl-*N*-nitrosourea; methanesulfonic acid ethyl ester; alkaline comet assay; micronucleus test

目前没有一种遗传毒性检测方法可以同时涵盖突变、染色体损伤及DNA断裂等多个检测终点^[1]。为全面考察化合物的潜在遗传毒性,通常开展标准化试验组合对药物遗传的毒性进行研究。其中体内试验能够考虑到受试物在体内吸收、分布、代谢和排泄等可能影响其遗传毒性的过程,在遗传毒性试验策略中意义重大。当前药物临床前遗传毒性安全性评价中,最常用的体内试验为以染色体非整倍体和断裂损伤作用为检测终点的啮齿类动物骨髓或外周血微核试验^[2-3]。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2011年颁布的药物遗传毒性研究技术指导原则的修订草案ICH S2(R1)中,建议在体内遗传毒性研究中除针对染色体损伤的检测外,增

加肝细胞彗星试验或其他组织靶点的体内试验作为第二遗传学终点^[4]。该草案强调了将2个遗传学终点以联合的形式进行,即在1个动物试验系统中同时开展2个不同遗传终点的检测,并建议将遗传终点毒性试验整合到重复给药毒性试验中。

本研究根据指导原则要求,尝试在SD大鼠3天重复经口灌胃给药毒性实验中,联合肝、肾和外周血碱性彗星电泳试验和骨髓微核试验,对常用的遗传毒性阴性(灭菌去离子水、0.9%氯化钠注射液及玉米油)及阳性化合物[(环磷酰胺(cyclophosphamide, CPA)、*N*-乙基-*N*-亚硝基脲(*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, ENU)和甲磺酸乙酯(ethyl methanesulphonate, EMS)]进行检测和比较。通过对比相同实验条件下开展的以染色体损伤和DNA断裂为检测终点的组合遗传毒性试验结果,为给药和取材时间点以及阳性剂的选择提供参

考依据。本研究中,采用的间隔 24 h 连续 3 d 灌胃的给药方案,综合考虑了微核和 DNA 断裂的形成机制,可在同一研究中对微核及彗星拖尾的形成进行评价。该给药方法也与国际体内啮齿动物碱性彗星电泳联合验证的实验方案^[5]一致,有助于为今后在药品非临床研究质量管理规(good laboratory practice of drug, GLP)条件下开展的规范化的体内多终点遗传毒性研究积累背景数据。

1 材料

1.1 主要化学试剂

阴性对照品: ddH₂O 使用中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心 MilliQ-A10 超纯水机生产的超纯水, 121 ℃、15 min 高压灭菌, 4 ℃冰箱保存; 0.9% 氯化钠注射液, 石家庄四药有限公司; 玉米油, Sigma 公司。遗传毒性阳性剂: 环磷酰胺(cyclophosphamide, CPA), Sigma 公司; 甲磺酸乙酯(ethyl methanesulphonate, EMS), Sigma 公司; *N*-乙基-*N*-亚硝基脲(*N*-ethyl-*N*-nitrosourea, ENU), Sigma 公司。Trevigen Comet Assay[®] Kit 彗星检测试剂盒, Trevigen 公司。EDTA-2Na, Sigma 公司。Hank's 平衡盐溶液(HBSS)、磷酸缓冲盐溶液(PBS), Cellgro 公司。无水乙酸、无水甲醇, 北京化工厂。胎牛血清, Gibco 公司。SYBR Green I Nuclei Acid Gel Stain, Life Technologies 公司。Giemsa 染料, Sigma 公司, 临染色前使用 1/15 mol·L⁻¹ 的磷酸盐缓冲液(pH 6.8)(1/15 mol·L⁻¹ Na₂HPO₄ 溶液和 1/15 mol·L⁻¹ KH₂PO₄ 溶液 1:1 混合)配制成 5% Giemsa 应用液。吖啶橙, Fluka 公司, 临染色时将 0.1% 吖啶橙染液与上述 1/15 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 6.8)按 1:15 的比例配制成应用液。

1.2 实验仪器

DYCP-31F 型电泳仪和 DYY-6C 电泳仪电源, 北京市六一仪器厂; 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, 尼康公司。

1.3 实验动物

Sprague Dawley 大鼠, SPF 级, 给药时约 6~7 周龄, 体重 280~310 g, 共 35 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司[动物生产许可证号 SCXK(京)2012-0001]。在恒温(20~26 ℃), 恒湿(40%~70%), 各 12 h 明暗周期的条件下饲养; 饲养密度为 2~3 只/笼; 采用鼠全价颗粒饲料喂养, 自由

摄食和饮水。研究方案通过国家药物安全评价监测中心实验动物福利伦理委员会的伦理审查。

2 实验方法

2.1 动物分组及给药

分设去离子水组、0.9% 氯化钠注射液组、玉米油组、环磷酰胺(CPA) 10 mg·kg⁻¹ 组、环磷酰胺(CPA) 40 mg·kg⁻¹ 组、*N*-乙基-*N*-亚硝基脲(ENU) 40 mg·kg⁻¹ 组和甲磺酸乙酯(EMS) 200 mg·kg⁻¹ 组, 每组 5 只。根据动物体重按分层随机化法进行分组, 分组时个体体重差异不得大于平均体重的 ±20%。分别在首次给药第 0、24 和 45 h 连续 3 d 经口灌胃给药, 给药体积为 10 mL·kg⁻¹。

2.2 临床症状观察及体重测定

给药期间每天上午和下午对所有动物进行隔笼观察, 包括动物是否死亡、濒死、活动状况、外观及被毛、有无外伤、粪便情况等; 每次给药前对所有动物进行体重测定。

2.3 动物处死、脏器称重及取材

所有动物在首次给药后约 48~51 h 腹腔注射 2.5% 硫喷妥钠麻醉(麻醉剂量为 50 mg·kg⁻¹), 麻醉后从腹腔后大静脉进行采血, 完全放血处死后取材。

每只动物采血 50 μL, 放入肝素化采血管, 反复振摇防止凝血, 放冰盒内备用; 肝脏和双侧肾脏分离后迅速称重, 再进一步分离制备单细胞悬液。肝脏取肝左叶中间部分约 5 mm³ 组织; 肾脏取单侧肾脏弃去包膜, 沿皮质大弯中心处取约 5 mm³ 组织; 摘取大鼠单侧股骨用于骨髓微核试验。

2.4 碱性彗星试验

2.4.1 单细胞悬液制备 将肝和肾组织放入预冷的切碎液中反复刷洗。之后放入 5 mL 离心管内, 加入 3 mL 预冷的切碎液, 用剪刀剪碎组织以释放细胞, 并使用。制成的单细胞悬液轻轻吹打约 15 次后, 放冰盒内备用。

2.4.2 制片、裂解、解旋及电泳 肝细胞、肾细胞使用含 20 mmol·L⁻¹ EDTA-2Na 的 HBSS 溶液(pH 7.5)调整密度至约 2×10⁵ 个·mL⁻¹。根据试剂盒说明准备裂解液、LM 琼脂糖凝胶等试剂, 放置适宜温度保存。1.5 mL 试管 37 ℃水浴预热, 每管预先加入 500 μL Comet LMAgarose。取单细胞悬液(肝细胞和肾细胞每管加 50 μL, 外周血细胞每管加 20 μL), 用移液头迅速混合均匀 1~2 次后铺片, 保证细胞均匀分布于每孔, 1 次 1 孔, 每孔 500 μL, 每个样本平行 2 孔。铺

片结束后迅速将玻片置于 4 ℃、避光冷却 30 min。将玻片置于 4 ℃预冷的裂解液中避光, 4 ℃过夜, 裂解液平面刚好没过玻片表面。裂解后使用预冷的超纯水清洗 3 次, 每次 5 min。预先将电泳槽置于密闭冰盒内冷却备用。将玻片平行码放在电泳槽内, 缓缓添加预冷的碱性解旋液 (pH>13) 没过玻片。室温、避光解旋 20 min。电泳时设置电压为 $0.7 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$, 此时电流约为 300 mA, 电泳时间 20 min。电泳结束后, 取出玻片, 轻轻擦拭, 去除多余液体。在中和液中漂洗 2 次, 每次 5 min。之后取出玻片, 浸于无水乙醇溶液脱水至少 10 min。将玻片放置通风处, 室温自然干燥。

2.4.3 染色、拍照及分析 染色时将稀释过的 SYBR Green I (1:10 000) 加在每孔表面, 4 ℃冰箱放置 5 min, 去除多余液体, 室温、避光晾干。拍照前加盖玻片, 选择靠近孔中间位置且细胞密度适中的视野拍照。使用 Komet 6.0 (Andor Technology) 彗星图像分析软件进行分析, 每个样品至少计数 100 个彗星细胞。1) 每只动物都要分析 100 个可分析的尾 DNA 含量百分率和 Olive 尾距 (Olive tail moment) 的中位数, 计算每只动物 2 个孔的中位数的平均值及每个剂量组上述指标均值的组平均值及标准差。50 个 · 孔⁻¹; 2) 每只动物需计数 100 个细胞中“刺猬细胞”的数量。

2.5 骨髓微核试验

大鼠单侧股骨剪断两端开放骨髓腔; 吸取胎牛血清 2 mL, 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, $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 弃去大部分上清液, 留适量上清将骨髓细胞沉淀充分吹打均匀; 吸取适量骨髓悬液滴于洁净玻片上, 推片, 标本置于室温下自然干燥; 甲醇固定 15 min, 自然晾干。

分别计数每只大鼠计数每只动物的 Giemsa 染色玻片标本中 200 个总红细胞 (ERY) 中的嗜多染红细胞 (PCE) 和正染红细胞 (NCE) 的数目, 及吖啶橙染色玻片标本中 2 000 个嗜多染红细胞 (PCE) 中含微核细胞 (MNPCE) 的数目。

2.6 结果分析

计算并列出现每只动物体重和脏器重量的平均值 ± 标准差。彗星实验计算每只动物的刺猬细胞百分率、尾 DNA 含量百分率和 Olive 尾距的中位数, 并计算每组动物上述数值的平均值和标准差, 采用 Student's *t*-Test 对阳性对照组与 ddH₂O 溶媒对照组间数据进行检验, $P<0.05$ 时认为差异有统计学意义。

骨髓微核试验计算每只动物的嗜多染红细胞与总红细胞的比值和含微核的嗜多染红细胞千分率, 以及每组嗜多染红细胞与总红细胞的比值和含微核的嗜多染红细胞千分率的平均值 ± 标准差, 采用 “Poisson 分布两样本均数的比较” 对阳性对照组与 ddH₂O 溶媒对照组间微核率进行统计学分析, $P<0.05$ 时认为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 药物整体毒性评价

实验期间各组动物临床症状均未见明显异常。动物给药前未禁食过夜, 连续经口灌胃 3 d 对各组 SD 大鼠平均体重 (图 1) 及平均肝脏和肾脏重量 (表 1) 未见明显影响。动物体重变化和脏器重量是反应化合物的整体体内毒性。当前给药方案时间仅为 3 d, 遗传毒性阳性剂在短期给药条件下通常不会对上述指标有明显影响。结果提示在当前给药剂量和给药条件下, 所有受试物均未对动物整体产生严重的毒性作用。

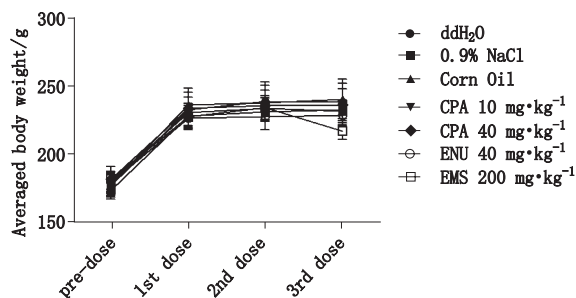


图 1 SD 大鼠体重变化趋势

Fig. 1 Changes of body weight in SD rats

表 1 连续 3 d 给药后各组 SD 大鼠平均脏器重量 (±SD, n=5)

Tab. 1 Averaged organ weight of SD rats in each group after 3 d administration

分类 (type)	供试品 (test article)	重量 (weight)/g	
		肝脏 (liver)	肾脏 (kidney)
溶剂 (solvent)	ddH ₂ O	7.480 ± 0.672	2.183 ± 0.300
	0.9% NaCl	7.058 ± 0.434	2.073 ± 0.146
	Corn Oil	7.688 ± 0.643	1.944 ± 0.093
阳性对照 (positive control)	CPA 10 mg · kg ⁻¹	7.014 ± 0.485	2.229 ± 0.196
	CPA 40 mg · kg ⁻¹	7.368 ± 0.541	2.110 ± 0.157
	ENU 40 mg · kg ⁻¹	7.405 ± 0.928	2.042 ± 0.239
	EMS 200 mg · kg ⁻¹	7.773 ± 0.442	2.051 ± 0.230

3.2 碱性彗星试验结果

刺猬细胞(hedgehog cell)指彗头很小而大多数DNA物质分布于彗尾的情况,彗尾可呈纺锤形。刺猬的出现往往提示该细胞凋亡,通常反映化合物的直接细胞毒性。然而也有文献指出^[6],在长时间DNA断裂剂作用下并未观察到刺猬细胞,它的形成反应了DNA的修复过程,并非DNA进一步断裂与丢失,故该指标应作为遗传毒性而非细胞凋亡的监测指标分析。无论刺猬细胞的具体意义如何,当前观点普遍认为刺猬细胞不应计入彗星图像分析。本研究结果如表2所示,与溶媒对照组比较,只有EMS组的肝细胞、肾细胞和淋巴细胞的刺猬细胞百分率明显升高,CPA及ENU在当前实验条件下对刺猬细胞百分率无明显影响。

彗星试验主要通过图像彗星拖尾程度对DNA

损伤水平进行分析,见图2。常见的分析指标包括头DNA含量百分率、尾DNA含量百分率、尾面积、尾长、Olive尾矩等。其中尾DNA含量百分率为彗星试验最常用的评价指标,而尾矩认为具有分析范围广、灵敏度较高的特点^[7]。本研究选取尾DNA含量百分率和Olive尾矩进行分析比较(表3)。结果显示溶媒组的肝、肾及淋巴细胞尾DNA含量百分率及Olive尾矩平均值均在文献报道范围之内^[8-9]。CPA 40 mg·kg⁻¹组的上述数值与CPA 10 mg·kg⁻¹组比较仅略有升高,但外周血淋巴细胞的数值范围仍在阴性结果范围之内,与历史数据^[10]相符;ENU组的平均尾DNA含量百分率及Olive尾矩与溶媒对照组比较为弱致DNA断裂作用;而EMS作为经典的DNA断裂剂在3种细胞中均显示了强致DNA断裂作用。

表2 SD大鼠不同细胞平均刺猬细胞百分率比较(±SD, n=5)

Tab. 2 Comparison of average percentage of hedgehog cell counts of liver cell, kidney cell and lymphocyte in SD rats

分类 (type)	供试品 (test article)	平均刺猬细胞百分率 (average percentage of hedgehog cell counts)/%		
		肝细胞(liver cell)	肾细胞(kidney cell)	淋巴细胞(lymphocyte)
溶剂(solvent)	ddH ₂ O	1.20 ± 1.10	0.80 ± 0.84	1.00 ± 1.00
	0.9% NaCl	0.80 ± 1.79	2.20 ± 1.30	0.40 ± 0.55
	Corn Oil	1.20 ± 0.84	0.80 ± 0.45	0.80 ± 0.45
阳性对照(positive control)	CPA 10 mg·kg ⁻¹	1.00 ± 0.71	0.80 ± 0.84	0.80 ± 0.84
	CPA 40 mg·kg ⁻¹	1.40 ± 1.14	1.40 ± 0.89	1.40 ± 0.89
	ENU 40 mg·kg ⁻¹	1.40 ± 0.55	1.80 ± 1.30	0.80 ± 0.84
	EMS 200 mg·kg ⁻¹	4.80 ± 1.92*	5.40 ± 2.07*	4.40 ± 0.89**

#: 动物数(animal number): 5/组(group); 与ddH₂O组比较(compare with ddH₂O group); *P<0.05; **P<0.01

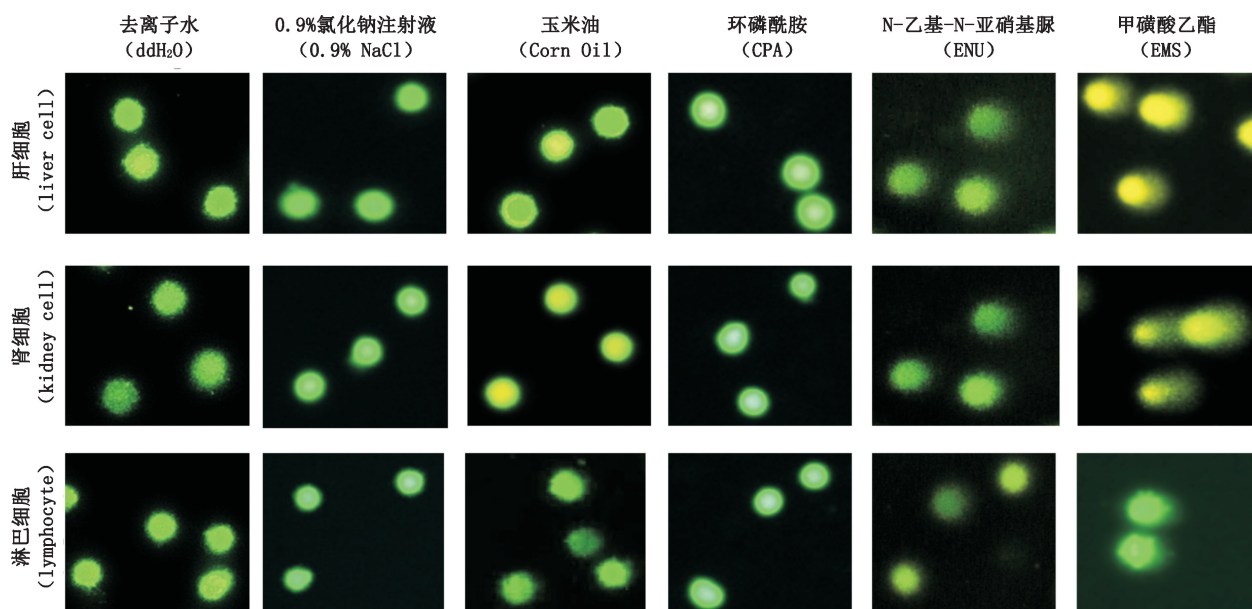


图2 SD大鼠不同组织细胞彗星电泳示意图

Fig. 2 Comet electrophoresis image of cells in different tissues of SD rats

表 3 SD 大鼠不同组织细胞彗星电泳分析结果比较 (±SD, n=5)

Tab. 3 Comparison of comet assay data of different cells in SD rats

分类 (type)	供试品 (test articles)	肝细胞 (liver cell)		肾细胞 (kidney cell)		淋巴细胞 (lymphocyte)	
		尾 DNA 含量百分率 (percentage of tail DNA content) /%	Olive 尾矩 (Olive tail moment)	尾 DNA 含量百分率 (percentage of tail DNA content) /%	Olive 尾矩 (Olive tail moment)	尾 DNA 含量百分率 (percentage of tail DNA content) /%	Olive 尾矩 (Olive tail moment)
溶剂 (solvent)	ddH ₂ O	2.64 ± 0.49	0.25 ± 0.04	2.49 ± 0.44	0.23 ± 0.04	2.51 ± 0.32	0.22 ± 0.03
	0.9% NaCl	2.94 ± 0.93	0.43 ± 0.09	2.45 ± 0.50	0.56 ± 0.27	2.26 ± 0.69	0.43 ± 0.13
	Corn Oil	3.20 ± 0.57	0.34 ± 0.05	1.35 ± 0.24	0.22 ± 0.11	1.56 ± 0.29	0.34 ± 0.21
阳性对照 (positive control)	CPA 10 mg · kg ⁻¹	3.02 ± 0.80	0.30 ± 0.10	2.42 ± 0.80	0.21 ± 0.09	2.26 ± 0.83	0.28 ± 0.15
	CPA 40 mg · kg ⁻¹	5.32 ± 1.04**	0.49 ± 0.16*	4.45 ± 1.34*	0.36 ± 0.11	2.53 ± 0.70	0.25 ± 0.06
	ENU 40 mg · kg ⁻¹	6.09 ± 1.25**	0.60 ± 0.11**	6.83 ± 1.61**	0.67 ± 0.16**	5.10 ± 1.54*	0.46 ± 0.12*
	EMS 200 mg · kg ⁻¹	23.86 ± 2.81**	2.38 ± 1.05*	26.52 ± 4.03**	2.98 ± 1.62*	20.48 ± 3.03**	2.58 ± 0.23**

注: 动物数 (animal number): 5/ 组 (group); 与 ddH₂O 组比较 (compare with ddH₂O group): *P<0.05; **P<0.01

3.3 骨髓微核试验结果

不同化合物对骨髓细胞 PCE 的影响及致骨髓细胞微核发生率结果见表 4。本研究所用受试物对骨髓细胞 PCE 的产生率均未产生明显影响。溶媒对照组的骨髓细胞微核率低且均在文献报道范围之内^[11-12]。所有遗传毒性阳性剂均诱导骨髓细胞微核率显著性高, 其中 CPA 作为经典的体内骨髓微核试验阳性剂, 显示了一定的剂量相关性; ENU 的致微核作用则相对较弱。

表 4 骨髓微核试验结果比较 (Mean ± SD)

Tab. 4 Comparison of micronucleus test results

分类 (type)	供试品 (test article)	嗜多染红细胞与总红细胞的比值 (ratio of PCE to total erythrocytes)	含微核的嗜多染红细胞百分率 (percentage of MNPCE) /%
溶剂 (solvent)	ddH ₂ O	0.51 ± 0.062	0.170 ± 0.067
	0.9% NaCl	0.53 ± 0.026	0.090 ± 0.055
	Corn Oil	0.53 ± 0.043	0.190 ± 0.082
阳性对照 (positive control)	CPA 10 mg · kg ⁻¹	0.51 ± 0.046	2.850 ± 0.4.03**
	CPA 40 mg · kg ⁻¹	0.50 ± 0.035	6.643 ± 0.857**
	ENU 40 mg · kg ⁻¹	0.51 ± 0.040	1.525 ± 0.289**
	EMS 200 mg · kg ⁻¹	0.53 ± 0.032	2.600 ± 0.352**

注: 动物数 (animal number): 5/ 组 (group); 与 ddH₂O 组比较 (compare with ddH₂O group): *P<0.05; **P<0.01

4 讨论

彗星试验和微核试验在放射毒理学、生态毒理学、肿瘤细胞生物学、流行病学及药物毒理学等领域应用非常广泛^[13]。在人外周淋巴血细胞彗星试验和微核试验监测结果均显示, 年龄及污染因素与彗星拖尾和微核的形成存在关联^[14-15]。而两者研究的侧重点不同。前者分析 DNA 断裂水平, 可针对药物蓄积部位及靶器官进行研究, 对短时间内诱发的 DNA 损伤较为敏感。本研究采用的碱性彗星电泳方法 (pH>13.0) 同时兼顾了 DNA 单链、双链断裂及碱性不稳定点 (指检测样本如存在脱嘌呤或脱嘧啶位点的情况, 可在强碱条件下转换为 DNA 断裂) 进行检测^[16]。而后者以检测外周血或骨髓微核为主, 是研究染色体或有丝分裂器损伤的较为简便的实验方法^[17]。彗星试验和微核试验的遗传毒性检测终点不同, 且均不依赖于特殊核型或动物实验模型, 在实际研究中可以有机结合。在开展 SD 大鼠体内遗传毒性研究时, 也可与近年来热门的 Pig-a 基因突变试验联合进行, 进一步实现对基因突变、染色体损伤和 DNA 断裂三项遗传毒性检测终点进行全方位检测^[18]。

肝脏和肾脏均为药物主要的代谢器官, 药源性肝肾损害已成为临床上与药物相关的重要致死原因。而外周血除了重要的代谢媒介之外, 也可对毒性进行动态监测。因此, 本研究在碱性彗星试验中

选取肝细胞、肾细胞和外周血淋巴细胞作为研究对象。目前国内已开展联合碱性彗星试验微核试验,并针对肝细胞和外周血细胞的遗传毒性的相关研究^[19-20]。在研究中发现,联合多项体内遗传毒性检测方法时,在阳性对照药的使用上需根据其作用机制及体内代谢情况慎重选择。如 CPA 是体内微核试验的经典阳性剂,但在体内与谷胱甘肽结合后可显著降低其遗传毒性^[21],因此无法产生持续性的 DNA 损伤。

将针对一个或多个检测终点的体内遗传毒性试验方法与重复给药毒性研究相整合,可在减少实验动物使用的同时,对药物的遗传毒性、一般毒性与药物代谢和动力学等实验数据进行综合分析^[22]。如将动物临床症状、体重、摄食量、血清生化检测指标、尿检查、脏器重量、病理学观察、药代毒代数据、化合物体内分布情况等与遗传毒性指标相结合,对受试物的体内直接毒性、毒性靶器官、遗传毒性的潜在作用部位等进行综合分析。这一策略优化了药物临床前遗传毒性试验组合体系,也体现了动物福利 3Rs 原则(即 Reduction, Replacement 和 Refinement)。既往研究数据显示,体内骨髓或外周血微核试验与啮齿类动物的 2 周或 4 周给药方案相结合对已知致突变物的检测效果较为灵敏,大鼠肝细胞彗星试验同样可以整合至 2 周或 4 周的重复给药毒性研究中^[23-24]。最新修订的 ICH S2(R1)指导原则也为体内微核试验和彗星试验与一般毒性研究的整合提供了理论支持。然而在实际试验设计方面尚存在一些问题。比如在给药剂量设计方面,根据遗传的毒性指导原则^[25],低毒性化合物且给药时间不超过 14 d 时,最高推荐给药剂量为 $2\,000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$,给药时间超过 14 d 时的推荐最高剂量为 $1\,000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。因此微核和彗星试验的给药剂量往往高于重复给药毒性研究的设置,有时难以兼顾遗传毒性和重复给药毒性的剂量设计需求。在给药频率方面,根据微核和彗星拖尾形成的机理,遗传毒性生物标志物出现的峰值分别在末次给药后 24 h(骨髓微核)或 48 h(外周血微核)和末次给药后 3~6 h(彗星试验),通常采用间隔 24 h 连续 2 至 3 d 的给药方式,而重复 2 周或 4 周剂量暴露并不会提高对潜在遗传毒物的检测的敏感性。此外,阳性对照的给药方式及频率无需供试品相同。因此考虑将多终点遗传毒性检测与重复给药毒性实验整合时,应根据受试物

的毒性作用机制和在体内代谢分布等具体情况来设计。

制定标准化实验流程、不断积累本中心的阴性及阳性结果背景值对于合理评价化合物的遗传毒性是极为重要的。如在本研究中观察到因给药方式、药物体内代谢和作用机制的不同,使用不同染色体断裂剂和 DNA 断裂剂导致的尾 DNA 含量百分率背景值存在一定差异。不同细胞的毒性敏感性也有所不同。有研究显示,淋巴细胞对抗 H_2O_2 诱导的氧化应激损伤作用显示了较强的拮抗能力但修复水平较差^[26],认为淋巴细胞的高拮抗性与其较强的增生能力有关,而低修复能力与其缺少 β -DNA 多聚酶有关。此外,彗星试验使用的低熔点琼脂糖对所分析的细胞大小也有一定限制。在获得相同可计数细胞数的前提下,细胞尺寸越小,所需的琼脂糖浓度越高^[27]。除上述客观因素外,彗星试验操作步骤较繁复,多项环节均可对实验结果产生影响。如裂解时间、解旋时间、解旋液 pH、电压、电流强度及电泳时间等,其中解旋时间、pH、电压和电泳时间是影响试验结果的关键因素。如解旋液 pH 越高,解旋越彻底,尤其是碱性不稳定点只有在 $\text{pH} \geq 13$ 的条件下才可充分检出^[28]。因此,在开展多脏器细胞彗星实验的时候务必摸索并确定适宜的研究条件,以排除假阳性或假阴性结果的干扰,对研究数据做出合理的分析判断。

综上所述,上述研究证实将多脏器彗星试验与微核试验与重复给药毒性实验整合是切实可行的,多项体内遗传毒性试验与重复给药毒性实验联合开展将成为今后药物遗传毒性检测发展的重要方向。在实际应用中,研究人员尚需广泛积累背景数据,实现实验流程的标准化,并在阳性剂的选择及实验设计等方面酌情考量。

参考文献

- [1] 马华智,施畅,石富江,等.多遗传学终点的遗传毒性试验组合的建立[J].癌变·畸变·突变,2013,25(6):465
MA HZ, SHI C, SHI FJ, *et al.* Establishment of a new battery of toxicity tests for multiple genetic endpoints[J]. Carcinog Teratog Mutag, 2013, 25(6):465
- [2] MAISTRO EL. The *in vivo* rodent micronucleus test[M]// Genotoxicity and DNA Repair. New York: Springer, 2014: 103
- [3] KASAMOTO S, MASIMORI S, HAYASHI M. In vivo micronucleus assay in mouse bone marrow and peripheral blood[M]// Genotoxicity Assessment. New York: Humana Press, 2013: 179

- [4] International Conference on Harmonization (ICH). Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2(R1) (Step 4 version) [EB/OL]. [2017-05-02]. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf, 2011-11-09/2016-4-11
- [5] TAKASAWA H, TAKASHIMA R, NARUMI K. Results of the international validation of the *in vivo*, rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens: individual data for 1, 2-dibromoethane, *p*-anisidine, and *o*-anthranilic acid in the 2nd step of the 4th phase validation Study under the JaCVAM initiative [J]. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2015, 786-788 (2): 144
- [6] LORENZO Y, COSTA S, COLLINS AR, *et al.* The comet assay, DNA damage, DNA repair and cytotoxicity: hedgehogs are not always dead [J]. *Mutagenesis*, 2013, 28 (4): 427
- [7] KU-CENTURIÓN M, GONZÁLEZ-MARÍN B, CALDERÓN-EZQUERRO MC, *et al.* DNA Damage assessment in zebrafish embryos exposed to monceren (®) 250 SC Fungicide Using the alkaline comet assay [J]. *Zebrafish*, 2016, 13 (5): 442
- [8] PANT K, SPRINGER S, BRUCE S, *et al.* Vehicle and positive control values from the *in vivo* rodent comet assay and biomonitoring studies using human lymphocytes: historical database and influence of technical aspects [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2014, 55 (8): 633
- [9] RECIO L, HOBBS C, CASPARY W, *et al.* Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus and comet assay protocol [J]. *J Toxicol Sci*, 2010, 35 (2): 149
- [10] 王欣, 王雪, 宋捷, 等. 大鼠体内彗星试验方法的建立与应用研究 [J]. *药物评价研究*, 2012, 35 (1): 6
WANG X, WANG X, SONG J, *et al.* Establishment and application of comet assay *in vivo* method in rats [J]. *Drug Eval Res*, 2012, 35 (1): 6
- [11] ABREVAYA XC, CARBALLO MA, MUDRY MD. The bone marrow micronucleus test and metronidazole genotoxicity in different strains of mice (*Mus musculus*) [J]. *Genet Mol Biol*, 2007, 30 (4): 1139
- [12] 刘仕杰, 方展强. 流式细胞仪筛选环磷酸腺苷诱导骨髓嗜多染红细胞微核的技术方法 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25 (3): 53
LIU SJ, FANG ZQ. Methods screening of cyclophosphamide induced micronucleus of marrow cells by flow cytometry [J]. *Chin J Comp Med*, 2015, 25 (3): 53
- [13] JHA AN. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay [J]. *Mutagenesis*, 2008, 23 (3): 207
- [14] ERISMIS UC, IBRAHIM HC, KONUK M. Evaluation of DNA damage in Eurasian Marsh Frogs (*Pelophylax ridibundus*) by comet assay for determination of possible pollution in the different lakes in central anatolia, Turkey [J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2013, 90 (6): 660
- [15] CARBAJAL-LÓPEZ Y, GÓMEZ-ARROYO S, VILLALOBOS-PIETRINI R, *et al.* Biomonitoring of agricultural workers exposed to pesticide mixtures in Guerrero state, Mexico, with comet assay and micronucleus test [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2015, 23 (3): 2513
- [16] BAUSINGER J, SPEIT G. The impact of lymphocyte isolation on induced DNA damage in human blood samples measured by the comet assay [J]. *Mutagenesis*, 2016, 31 (5): 567
- [17] MIŠÍK M, FILIPIC M, NERSESYAN A, *et al.* Analyses of combined effects of cytostatic drugs on micronucleus formation in the *Tradescantia* [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2016, 23 (15): 14762
- [18] 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 reference compounds [J]. *Toxicol Sci*, 2012, 130 (2): 364
- [19] 文海若, 宋捷, 陈高峰, 等. 体外与体内肝细胞微核检测方法研究 [J]. *中国新药杂志*, 2016, 25 (7): 787
WEN HR, SONG J, CHEN GF, *et al.* *In vitro* and *in vivo* liver cell micronucleus tests [J]. *Chin J New Drugs*, 2016, 25 (7): 787
- [20] 吴文斌, 张超超, 汤家铭. 微核试验和彗星试验检测雄黄的遗传毒性 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2012, 26 (4): 550
WU WB, ZHANG CC, TANG JM. The genotoxicity of realgar evaluated by *in vivo* micronucleus test and comet assay [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2012, 26 (4): 550
- [21] TSAI-TURTON M, LUONG B T, TAN Y, *et al.* Cyclophosphamide-induced apoptosis in COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion [J]. *Toxicol Sci*, 2007, 98 (1): 216
- [22] ROTHFUSS A, HONMA M, CZICH A, *et al.* Improvement of *in vivo*, genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing [J]. *Mutat Res*, 2011, 723 (2): 108
- [23] ASANAMI S, SHIMONO K, SAWAMOTO O, *et al.* The stability of rat peripheral blood in subchronic studies for the micronucleus assay [J]. *Mutat Res*, 1995, 347 (2): 73
- [24] CAMMERER Z, ELHAJOUJI A, SUTER W. *In vivo*, micronucleus test with flow cytometry after acute and chronic exposures of rats to chemicals [J]. *Mutat Res*, 2007, 626 (1-2): 26
- [25] OECD Guideline for the Testing of Chemicals TG474, Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test [S]. 2014
- [26] 马爱国. 不同细胞 DNA 氧化损伤及自身修复能力的分析 [J]. *癌变·畸变·突变*, 1997, 9 (3): 138
MA AG. The differences of DNA damage and repair between several types of cells [J]. *Carcinog Teratog Mutag*, 1997, 9 (3): 138
- [27] MUKHOPADHYAY I, CHOWDHURI DK, BAJPAYEE M, *et al.* Evaluation of *in vivo* genotoxicity of cypermethrin in *Drosophila melanogaster* using the alkaline Comet assay [J]. *Mutagenesis*, 2004, 19 (2): 85
- [28] TICE RR, AGURELL E, ANDERSON D, *et al.* Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2000, 35 (3): 206

(本文于 2016 年 6 月 29 日收到)