

大鼠体内碱性彗星试验方法的建立和验证

梅阿宁¹, 傅 鹏^{1*}, 张建军^{2*}

1. 安徽医科大学 药学院, 安徽 合肥 230032

2. 天津药物研究院 新药评价有限公司, 天津 300301

摘要:目的 对体内碱性彗星试验的主要影响因素琼脂糖浓度、解旋时间和电泳时间进行探讨, 建立大鼠体内碱性彗星试验方法, 并用阳性对照药甲磺酸乙酯进行验证实验。**方法** 肝细胞来源于健康雄性SD大鼠, 制备3层单细胞凝胶玻片。第1层琼脂糖凝胶提前1天铺, 选用3种不同浓度(1.00%、0.75%、0.50%)的正常熔点琼脂糖, 选用3种不同终浓度(0.91%、0.68%、0.45%)的低熔点琼脂糖和单细胞混悬液铺第2层, 第3层低熔点琼脂糖浓度与第2层相同。玻片裂解过夜后, 4℃下分别避光解旋4种不同时间(20、30、40、60 min), 在2~10℃新鲜电泳液(pH>13)中以有效电压0.7 V/cm分别电泳3种不同时间(20、30、40 min), 中和并用无水乙醇脱水后干燥保存。染色后在荧光显微镜下拍照并保存, 用CASP软件对细胞图像分析, 以细胞尾DNA百分比衡量细胞的DNA损伤程度。将10只健康雄性SD大鼠随机分为溶媒对照组和阳性对照组, 分别给生理盐水和甲磺酸乙酯(200 mg/kg), ig给药2次, 间隔21 h, 最后1次给药后3 h收集肝组织制备单细胞悬液, 按照已建立的实验方法检测甲磺酸乙酯的遗传毒性。**结果** 第1层使用0.75%的琼脂糖溶液铺片合适, 使用终浓度为0.68%的低熔点琼脂糖和单细胞混悬液铺第2层琼脂糖凝胶时, 铺片合适, 分别选择解旋20 min和电泳20 min作为解旋时间和电泳时间。经方法学检测, 甲磺酸乙酯遗传毒性结果为阳性。**结论** 成功地建立了大鼠体内碱性彗星试验方法并验证成功, 有利于彗星试验在新药安全评价中发挥更大的作用。

关键词: 体内碱性彗星试验; 肝细胞; 影响因素; 甲磺酸乙酯; 琼脂糖浓度; 解旋时间; 电泳时间

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)06-1253-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.06.017

Establishment and verification of *in vivo* alkaline comet assay in rats

MEI Aning¹, FU Peng¹, ZHANG Jianjun²

1. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Evaluation Co., Ltd., Tianjin 300301, China

Abstract: Objective The agarose concentration, unwinding time and electrophoresis time of the main influencing factors of the alkaline comet assay *in vivo* were discussed, and the alkaline comet assay method in rats was established, and the common positive control ethyl methanesulfonate (EMS) was used for verification experiment. **Methods** Hepatocytes were derived from healthy male SD rats, and three-layer single-cell gel slides were prepared. First layer of agarose gel was laid one day in advance, and three different concentrations of normal melting point agarose (1.00%, 0.75%, and 0.5%) were used. Three different final concentrations of low melting point agarose and single cell suspension (0.91%, 0.68%, and 0.45%) were used as the second layer, and the third layer of low melting point agarose has the same concentration as the second layer. After the slides were lysed overnight, they were incubated in alkaline (pH > 13) electrophoresis buffer at 4℃ for four different time (20, 30, 40, 60 min), and then electrophoresed at an effective voltage of 0.7 V/cm for three different time (20, 30, and 40 min) at 2~10℃. After the electrophoresis was completed, the slides were dehydrated with absolute ethanol and then dried and stored. After staining with fluorescent dyes, taken pictures and saved them under a fluorescence microscope, analyzed with CASP, and measured the degree of DNA damage of the cells by the percentage of DNA in the cell tail. Ten healthy male SD rats were randomly divided into vehicle control group and positive control group. They were given physiological saline and EMS (200 mg/kg) respectively, and were administered by gavage twice at an interval of 21 hours. The liver tissues were collected three hours after the last administration and prepare a single cell suspension to detect the

收稿日期: 2020-11-06

第一作者: 梅阿宁(1997—), 女, 在读研究生, 主要从事毒理学研究。E-mail: meianing2017@163.com

*通信作者: 傅 鹏(1973—), 男, 硕士生导师。E-mail: fup@tjpr.com

张建军(1979—), 男, 副研究员, 研究方向为药物遗传毒理。E-mail: zhangjj@tjpr.com

genotoxicity of EMS according to the established experimental method. **Results** Use 0.75% agarose solution for the first layer to spread, and use low-melting agarose and single cell suspension with the final concentration of 0.68% to spread the second layer of agarose gel, which was suitable for spreading. Choose 20 min of unwinding and 20 min of electrophoresis as the unwinding time and electrophoresis time respectively. After methodological testing, the result of EMS genotoxicity was positive. **Conclusion** The laboratory has successfully established the *in vivo* alkaline comet assay method in rats and verified it successfully, which will help the comet assay play a greater role in the safety evaluation of new drugs.

Key words: alkaline comet assay *in vivo*; hepatocyte; influences; ethyl methanesulfonate; agarose concentration, unwinding time; electrophoresis time

彗星试验(comet assay)又称单细胞凝胶电泳试验(single cell gel electrophoresis assay),是一种在单细胞水平上检测DNA损伤的试验方法。2014年,经济合作与发展组织(Organization for Economic Cooperation and Development, OECD)批准了用于化学物质的哺乳动物体内碱性彗星试验的试验指南并在2016年发布书面版本^[1],对试验的基本要素、历史对照数据及操作方法给出了相应指导。2018年国家食品药品监督管理总局药品审评中心发布了药物遗传毒性研究技术指导原则^[2],将体内彗星试验纳入标准试验组合。碱性彗星试验凭借其灵敏度高、所需样本量少及操作简便等优点广泛应用于DNA损伤的检测,有研究者制定了彗星试验方案^[3],也有研究者对彗星试验主要过程探索^[4-5]。由于试验过程无法完全标准化,为了提高试验的重现性,本研究对彗星试验的主要影响因素琼脂糖浓度、解旋时间和电泳时间进行探讨,以尾DNA百分比为指标衡量DNA损伤程度,建立大鼠体内碱性彗星试验方法。OECD发布的试验指南将甲磺酸乙酯(EMS)列入阳性对照药,日本替代方法验证中心(Japanese centre for the validation of alternative methods, JaCVAM)推荐阳性对照药甲磺酸乙酯的给药剂量为200 mg/kg^[6],本研究用该剂量的甲磺酸乙酯验证已建立试验方法的适用性。

1 材料

1.1 动物

SPF级健康雄性SD大鼠,6~7周龄,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供,实验动物生产许可证号SCXK(京)2016-0006。动物饲养于室温20~26℃、湿度40%~70%的SPF级动物房内,光照条件12 h/12 h明暗交替,食物饮水自由摄取,适应1周后进入试验。

1.2 主要试剂

正常熔点琼脂糖(批号1128J051)、低熔点琼脂糖(批号831Q043)、D-Hank's缓冲液(批号H1045)、EDTA-2Na(批号906Q062)、DMSO(批号1121E031

8)、TBE(批号T1051)、氯化钠(批号726F0316)、Tris(批号916F071)、TritonX-100(批号82910210)、甲磺酸乙酯(批号114NO13),均购自北京索莱宝科技有限公司;氢氧化钠(批号20200723)、无水乙醇(批号20200131),均购自天津风船化学试剂科技有限公司;GelGreen染料(Biotium,批号41005);生理盐水(石家庄四药有限公司,批号2001223401)。

1.3 主要仪器

恒温水浴锅(天津泰斯特仪器有限公司);电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);高通量电泳槽、高通量电泳仪电源(BIO-LAB);倒置荧光显微镜(日本Nikon公司)。

2 方法

2.1 试剂配制

2.1.1 冷的切碎液配制 在pH 7.5,不含钙、镁离子和酚红的Hank's缓冲溶液加入20 mmol/L EDTA-2Na,临用前加入10% DMSO,溶液在使用前放置在10℃以下冰箱中保存。

2.1.2 琼脂糖溶液的配制 分别称取正常熔点琼脂糖1.00、0.75、0.50 g缓慢加到100 mL TBE缓冲溶液中,边加边搅拌防止琼脂糖聚集,微波炉高火加热使溶解,在沸腾前要保证至少进行2次摇匀,加热使琼脂糖完全溶解得到澄清透明无气泡的溶液,终浓度分别为1.00%、0.75%、0.50%。避免过度沸腾导致浓度改变,配制完成后55~60℃水浴。

分别称取低熔点琼脂糖1.00、0.75、0.50 g缓慢加到100 mL TBE缓冲溶液中,与上述相同方法配制终浓度分别为1.00%、0.75%、0.50%的溶液,配制完成后37℃水浴。

2.1.3 裂解液的配制 细胞裂解液储备液:称取146.1 g NaCl、37.2 g EDTA-2Na和1.2 g Tris,先加入700 mL去离子水搅拌使混匀,加入8 g NaOH使完全溶解,调节pH值至10并定容至890 mL,室温下避光保存。试剂及终浓度见表1。

最终使用的细胞裂解液:至少使用前30 min取178 mL裂解储备液(pH值为10),加入1% TritonX-

表1 裂解液成分(pH=10)

Table 1 Lysis solution composition (pH=10)

试剂名称	试剂浓度
NaCl	2.5 mol/L
EDTA-2Na	100 mmol/L
Tris	10 mmol/L
TritonX-100	1%
DMSO	10%

100和10% DMSO定容至200 mL,使用前至少30 min放入4 °C冰箱中备用。

2.1.4 DNA解旋液的配制 DNA解旋储备液:配制10 mol/L NaOH储备液和200 mmol/L EDTA-2Na储备液(用NaOH调节pH值至10)。最终使用的DNA解旋液:至少使用前30 min量取30 mL 10 mol/L NaOH储备液和5 mL 200 mmol/L EDTA-2Na储备液,混合均匀后用去离子水定容至1 L, pH值>13,使用前至少30 min放入4 °C冰箱中备用。

2.1.5 中和缓冲液的配制 中和缓冲液成分:0.4 mol/L Tris, pH 7.5。中和缓冲液储备液:称取48.5 g Tris加入800 mL去离子水,搅拌均匀,先用10 mol/L HCl降低pH,再用1 mol/L或0.1 mol/L HCl调节pH值至7.5,最后用去离子水定容至1 L,室温下避光保存。使用前至少30 min放入4 °C冰箱中备用。

2.1.6 荧光染液的配制 把GelGreen 10 000×储备液稀释约3 300倍到0.1 mol/L NaCl中,配制成3×染色液。染液可重复使用3次,室温下避光保存。

2.1.7 甲磺酸乙酯的配制 适量甲磺酸乙酯原液(1.16 g/mL)用生理盐水稀释至20 mg/mL,配制完成后在2 h内使用。

2.2 琼脂糖终浓度、解旋时间、电泳时间考察

不同试验组使用的条件见表2。

表2 不同试验组使用的条件

Table 2 Conditions employed in different experiments

分组	第2层琼脂糖终浓度/%	解旋时间/min	电泳时间/min
1	0.91、0.68、0.45	20	20
2	0.68	20、30、40、60	20
3	0.68	20	20、30、40

2.2.1 单细胞悬液的制备 健康雄性大鼠安乐死后,取约5 cm³左肝叶用冷的切碎液洗去多余血液,将洗净的肝组织放入5 mL离心管中,加入3 mL冷的切碎液,用眼科剪剪碎组织得到细胞悬

液,将细胞悬液过40 μm细胞过滤器得到单细胞悬液。调整细胞浓度为1×10⁶/mL,将细胞悬液放在冰上直至铺片。

2.2.2 铺片 铺片前将单面磨砂载玻片和盖玻片清洗干净,干燥保存。

第1层胶体:1.00%、0.75%、0.50%的琼脂糖溶液55~60 °C水浴,将洁净载玻片的2/3区域分别浸入浓度为1.00%、0.75%、0.50%的琼脂糖溶液中,5 s后轻轻取出载玻片,用滤纸擦去载玻片背面和底部多余的琼脂糖,然后放置在平坦的桌面上干燥。这层胶体可以提前制备好,待载玻片干燥后在室温下保存,避免潮湿的环境。这种方法铺第1层胶比用枪头和盖玻片的速度快,一次可以铺多张载玻片,效率高,且铺的胶面均匀,避免了揭下盖玻片时琼脂糖的脱落。

第2层胶体:将密度为1×10⁶/mL的细胞悬液与浓度为1.00%、0.75%、0.50%低熔点琼脂糖以1:10混合均匀分别得到琼脂糖终浓度为0.91%、0.68%、0.45%的混合液。37 °C水浴,将载玻片铺有第1层胶的部分分为2部分,每部分加入70 μL细胞和琼脂糖溶液的混合液,盖上盖玻片铺展均匀,4 °C冰箱中放置10~15 min凝固。本实验室尝试用100 μL和50 μL混合液铺片,100 μL用量过多,薄厚不均匀,50 μL用量过少,故选用70 μL混合液铺片,薄厚适中,胶面均匀无气泡。

第3层胶体:从4 °C冰箱中取出载玻片,轻轻揭下盖玻片,取70 μL与第2层浓度相同的琼脂糖加到第2层胶体上,盖上盖玻片铺展均匀,4 °C冰箱中放置10~15 min凝固。

2.2.3 裂解、漂洗、解旋 取出4 °C冰箱中的载玻片,轻轻揭下盖玻片,浸入冷的新鲜配制的裂解液中,4 °C下避光裂解过夜。裂解完成后,将玻片浸入冷的去离子水中洗去残留的裂解液,至少2次,每次5 min。将漂洗过后的载玻片浸入预冷的新鲜配置解旋液中,4 °C下分别避光解旋20、30、40、60 min。

2.2.4 电泳、中和、脱水干燥 将载玻片放置在水平电泳槽中,避免有空隙,加入预冷的新鲜配制的电泳液,在有效电泳长度0.7 V/cm分别电泳20、30、40 min,电流300 mA左右。电泳过程中,在电泳槽周围放置冰块来保持低温,2~10 °C。电泳结束后,将载玻片浸入预冷的中和缓冲液中,中和漂洗至少3次,每次5 min。中和后将玻片浸入预冷的无水乙醇中20 min,室温下完全干燥后保存。

2.2.5 染色、观察、拍照 取出干燥保存的载玻片,

浸入 GelGreen 染料中,室温振荡染色 30 min 左右。染色完成后用去离子水洗去多余的染料,在荧光显微镜下观察结果,并拍照保存。每处理组制作 2 张凝胶玻片,每张载玻片随机采集 75 个细胞,1 个处理组共采集 150 个细胞。

2.2.6 统计学分析 用 CASP 软件分析图像,以尾 DNA 百分比为指标衡量 DNA 损伤程度。用 SPSS 25.0 软件对尾 DNA 百分比进行统计分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。先经方差齐性检验,方差齐时,用单因素方差分析进行多组间比较,如比较有差异,则采用 Dunnett 检验进行各组之间的比较;方差不齐时,采用 Kruskal-Wallis 进行多组间比较,如比较有差异,采用 Mann-Whitney 检验进行各组之间的比较。

2.3 方法验证

将 10 只健康雄性 SD 大鼠按体质量随机分为溶媒对照组和阳性对照组,体质量范围为 222~252 g,每组 5 只。溶媒对照组给生理盐水,阳性对照组给甲磺酸乙酯(200 mg/kg),给药体积 10 mL/kg。各组 ig 给药 2 次,间隔 21 h,末次给药后 3 h 收集肝脏制备单细胞悬液。每只动物制备 2 张载玻片样本,按照已建立彗星试验方法检测甲磺酸乙酯的遗传毒性。每只动物分析 150 个细胞,DNA 损伤程度分析方法同“2.2.6”项,应用两独立样本 *t* 检验进行统计分析。

3 结果

3.1 不同终浓度琼脂糖溶液

第 1 层:使用 1.00%、0.75%、0.50% 浓度的正常熔点琼脂糖制备第 1 层琼脂糖凝胶时,发现 1.0% 的正常熔点琼脂糖浓度过高,来不及铺展均匀就已经凝固,0.5% 正常熔点琼脂糖浓度过低,流动性大,胶面过薄,黏附力不足,容易脱落;0.75% 正常熔点琼脂糖浓度适中,薄厚适中,铺展均匀。故本实验室选用 0.75% 正常熔点琼脂糖作为第 1 层胶。

第 2 层:本试验分别配制 1.00%、0.75%、0.50% 浓度的低熔点琼脂糖,将细胞悬液和琼脂糖以 1:10 的比例混合后分别得到终浓度为 0.91%、0.68%、0.45% 的混合液,均匀铺在第 1 层胶上。结果发现,1.0% 浓度的琼脂糖浓度过高,胶面厚,不利于图像分析,0.5% 琼脂糖浓度过低干燥时间长,延长了试验周期,0.75% 琼脂糖薄厚适中,在 4 °C 冰箱放置 10~15 min 就凝固,胶面均匀,盖玻片不易粘在载玻片上。

3.2 不同解旋时间

解旋 30 min 的尾 DNA 百分比与解旋 20 min 相

比减少,差异无统计学意义;解旋 40 min 的尾 DNA 百分比与解旋 30、20 min 比较显著增加,差异均有统计学意义($P < 0.01$);解旋 60 min 的尾 DNA 百分比与解旋 40、30、20 min 比较显著增加,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结果见图 1 和表 3。JaCVAM 建议对照组大鼠肝脏中尾 DNA 百分比的均值应不超过 8%^[6],因此解旋 40 和 60 min 不适合,为节约时间和成本,选择 20 min 作为解旋时间。

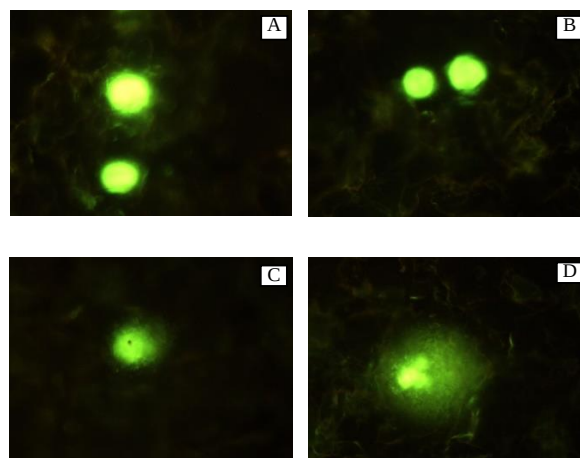


图 1 解旋 20(A)、30(B)、40(C)、60(D) min 图像
Fig. 1 Unspinning 20(A), 30(B), 40(C), 60(D) min

表 3 不同解旋时间试验结果($\bar{x} \pm s, n=150$)

Table 3 Results of experiments with different unwinding time($\bar{x} \pm s, n=150$)

解旋时间/min	尾 DNA 百分比/%
20	1.85±2.53
30	1.32±3.17
40	8.17±10.23**
60	11.65±10.93**

与其他各组比较:** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs other group

3.3 不同电泳时间

电泳 30 min 的尾 DNA 百分比与电泳 20 min 相比增加,差异有统计学意义($P < 0.01$);电泳 40 min 的尾 DNA 百分比与电泳 20 min 相比增加,差异有统计学意义($P < 0.01$),与电泳 30 min 比较差异无统计学意义。结果见图 2 和表 4。电泳 30、40 min 的尾 DNA 百分比均值均大于 8%,因此选择电泳 20 min 作为电泳时间。

3.4 方法验证结果

甲磺酸乙酯组的尾 DNA 百分比与溶媒对照组比较显著增加,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果见图 3 和表 5。

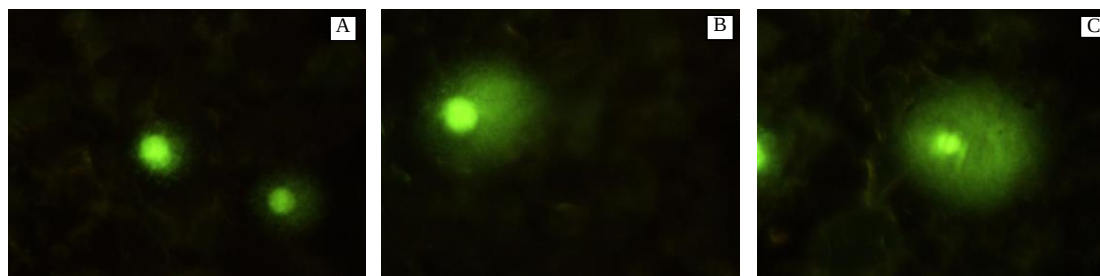
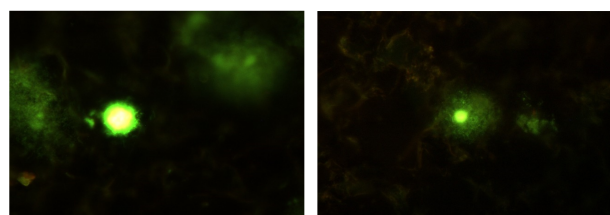


图2 电泳20(A)、30(B)、40(C) min 图像

Fig. 2 Electrophoresis images at 20 (A), 30 (B), and 40 (C) min

表4 不同电泳时间试验结果($\bar{x} \pm s, n=150$)Table 4 Results of experiments with different electrophoresis time($\bar{x} \pm s, n=150$)

电泳时间/min	尾DNA 百分比/%
20	7.73±8.82
30	13.36±11.20**
40	13.16±15.77**

与电泳20 min 比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs electrophoresis for 20 min

溶媒对照

甲磺酸乙酯 200 mg·kg⁻¹

图3 各组细胞图像

Fig. 3 Cell image of each group

表5 各组彗星试验结果

Table 5 Results of comet assay in different groups

组别	每只动物 尾DNA 百分比/%	每组尾DNA 百分比/%
溶媒对照	1.76±2.27	1.83±1.52
	1.96±1.90	
	1.59±2.65	
	1.90±2.90	
	1.92±2.76	
甲磺酸乙酯 200 mg·kg ⁻¹	13.08±4.02	13.07±1.01**
	11.98±2.92	
	12.52±3.34	
	14.69±3.77	
	13.09±2.97	

与溶媒对照组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs solvent control group

4 讨论

碱性彗星试验不仅可以检测DNA单、双链断裂,还可以检测碱性不稳定位点和切除修复不完全

位点,广泛应用于遗传毒性、环境生物检测和人类生物监测等科学研究^[7-9]。针对不同的细胞类型和损伤的差异,完全标准化的试验方法无法实现,本实验室对主要试验过程进行摸索,明确主要试验条件,并用常用阳性对照药甲磺酸乙酯进行条件验证,为国内GLP实验室建立和验证体内彗星试验提供参考。

为防止凝胶层脱落,选用单面磨砂载玻片,预涂1层正常熔点琼脂糖以增加低熔点琼脂糖的黏附力,一些研究者选用1.0%的正常熔点琼脂糖^[3,10],本实验室研究人员发现0.75%正常熔点琼脂糖浓度适中,薄厚适中,铺展均匀,每次使用新配制的琼脂糖溶液,以防止反复熔解改变琼脂糖浓度。OECD建议低熔点琼脂糖的浓度范围0.5%~1.0%,但终浓度不能低于0.45%^[1]。本实验室使用终浓度分别为0.91%、0.68%、0.45%的混合液,发现只有0.75%琼脂糖铺胶薄厚适中,在4℃冰箱放置10~15 min就凝固,胶面均匀,盖玻片不易黏在胶上。因每次用量少,将琼脂糖溶液每5~10 mL进行分装,4℃冰箱中保存,使用前加热得到澄清透明无气泡溶液,每次使用后剩余的琼脂糖溶液丢弃。对于第3层琼脂糖凝胶,本实验室在预试验过程中曾尝试不铺第3层胶,结果发现细胞丢失情况严重,且染色观察时琼脂糖凝胶干燥快,来不及分析。因此,选用与第2层相同的琼脂糖凝胶浓度铺第3层胶。

将载玻片浸入新鲜配制的冷的裂解液,4℃冰箱中避光裂解过夜。OECD建议,载玻片需在4℃避光裂解1 h至过夜,本试验需处理玻片多,选择裂解过夜后再进行处理。将载玻片从细胞裂解液中取出,将玻片浸入冷的去离子水中洗去残留的裂解液,至少浸洗2次,每次5 min。OECD建议此过程也可以使用中性缓冲液或磷酸盐缓冲液完成。将漂洗过后的载玻片浸入预冷的新鲜配置解旋液中,4℃下避光解旋。JaCVAM建议对照组大鼠肝脏中尾DNA百分比的均值应不超过8%^[6],因此解旋40、

60 min 不适合。解旋 20、30 min 的尾 DNA 百分比无统计学差异,为节约时间和成本,选择 20 min 作为解旋时间。

解旋完成后,将载玻片放置在水平电泳槽中,避免有空隙,加入预冷的新鲜配制的电泳液,在有效电泳长度 0.7 V/cm 下电泳。实际电压大小取决于电泳槽正负两极的距离(cm),电泳过程中电泳液的体积需保持一致,以最大程度的减少电泳时的差异。电泳 30、40 min 的尾 DNA 百分比均值均大于 8%,因此选择电泳 20 min 作为电泳时间。有效电泳长度必须保持为 0.7 V/cm,电泳过程中电流通常保持在 300 mA,也有研究者认为保持在 300 mA 并不必要,只需保持有效电泳长度的恒定^[11],OECD 也只要求保持电流变动小,JaCVAM 将起始电流设置为 300 mA。合适的电流大小需要根据试验结果进行设定,并在试验过程中始终保持一致。电泳前将电泳槽放置在 4 °C 冰箱中降温至少 20 min,电泳过程中,在电泳槽周围放置冰块来保持低温,2~10 °C。电泳结束后用中和缓冲液中和后,如果 1~2 d 内分析玻片则不需要脱水干燥,如果来不及计数,将中和后的玻片浸入预冷的无水乙醇中 20 min,室温下完全干燥后保存。

染色后在荧光显微镜下观察结果,OECD 建议每个处理组至少分析 150 个细胞,避免分析边缘区域的细胞。用自动或半自动选择合适的图像分析软件,可对尾 DNA 百分比、尾长、尾矩等指标进行分析,OECD 建议以尾 DNA 百分比作为主要评价指标。

体内彗星试验方法,可以使用肝、胃、肾脏、外周血等进行试验,同时还可以与其他遗传毒性试验(如微核试验)整合以实现多终点遗传毒性检测降低试验的假阳性率,还可与其他毒理学研究联合试验以减少试验动物数量。2011 年 11 月,ICH 颁布的遗传毒性指导原则 S2(R1)把体内彗星试验列入遗传毒性标准组合试验的选择中,体内彗星试验成为体内微核试验之外的第二个体内试验^[12]。根据已建立的彗星试验方法检测常用阳性对照物甲磺酸乙酯的遗传毒性结果为阳性,证明该方法灵敏度和重复性可靠。本实验室成功地建立了大鼠体内碱性彗星试验方法,填补了天津新药评价遗传毒性领域(GLP 实验室)的空白,在此试验基础上建立标准操作规程有利于国内行业标准的制定,标准操作规程的制定还将填补体内彗星试验在天津市新药

评价研究中的空缺,同时提升了天津市新药遗传毒性评价研究水平,符合 ICH 颁布的遗传毒性指导原则的要求。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] OECD. Guideline for testing of chemicals No. 489: *In vivo* mammalian alkaline comet assay [S]. 2016.
- [2] 国家食品药品监督管理总局药品审评中心. 药物遗传毒性研究技术指导原则 [S]. 2018.
Drug Evaluation Center of China Food and Drug Administration. Technical guidelines for the study of drug genotoxicity [S]. 2018.
- [3] Bajpayee M, Kumar A, Dhawan A. *The Comet Assay: Assessment of In Vitro and In Vivo DNA Damage* [M]// Methods and Protocols [A]. New York: Springer New York, 2019: 237-257.
- [4] Azqueta A, Gutzkow K B, Brunborg G, et al. Towards a more reliable comet assay: optimising agarose concentration, unwinding time and electrophoresis conditions [J]. *Mutat Res*, 2011, 724(1/2): 41-45.
- [5] Karbaschi M, Ji Y, Abdulwahed A M S, et al. Evaluation of the major steps in the conventional protocol for the alkaline comet assay [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(23): E6072.
- [6] OECD. Reports of the JaCVAM initiative international pre-validation and validation studies of the *in vivo* rodent alkaline comet assay for the detection of genotoxic carcinogens [S]. 2014.
- [7] Žegura B, Filipič M. The application of the Comet assay in fish cell lines [J]. *Mutat Res*, 2019, 842: 72-84.
- [8] Azqueta A, Ladeira C, Giovannelli L, et al. Application of the comet assay in human biomonitoring: An hCOMET perspective [J]. *Mutat Res*, 2020, 783: 108288.
- [9] Glei M, Schneider T, Schlörmann W. Comet assay: an essential tool in toxicological research [J]. *Arch Toxicol*, 2016, 90(10): 2315-2336.
- [10] Hobbs C A, Recio L, Streicker M, et al. Comet assay evaluation of six chemicals of known genotoxic potential in rats [J]. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2015, 786/787/788: 172-181.
- [11] Collins A R, Oscoz A A, Brunborg G, et al. The comet assay: topical issues [J]. *Mutagenesis*, 2008, 23(3): 143-151.
- [12] ICH. Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use, S2(R1) [S]. 2011.

[责任编辑 兰新新]