

• 研究论文 •

大鼠体内彗星试验方法的建立与应用研究

王 欣, 王 雪*, 宋 捷, 王 超, 胡燕平, 李 波

中国食品药品检定研究院 国家药物安全评价监测中心, 北京 100176

摘 要: **目的** 建立大鼠肝细胞和外周血淋巴细胞的体内彗星试验方法, 并应用该方法对遗传毒性阳性物甲磺酸乙酯(EMS)和环磷酰胺(CPA)进行检测。**方法** 选择SD雄性大鼠为实验动物, 分别给予不同剂量EMS和CPA。给药结束后, 采集外周血样本和摘取动物左侧肝叶组织样本, 铺制成单细胞凝胶玻片。玻片经裂解、解旋、电泳、中和、脱水等步骤后, 得到可观察的实验标本。染色标本, 并在40×荧光显微镜下观察拍照, 使用专业分析软件对单细胞电泳图像进行分析和测定。**结果** 成功建立了基于大鼠肝细胞和外周血淋巴细胞的体内彗星试验方法。经该方法检测, EMS结果为阳性, CPA结果为阴性, EMS适合作为本方法的阳性对照。**结论** 成功建立大鼠体内彗星试验方法, 并可应用于遗传毒性检测。

关键词: 体内彗星试验; 甲磺酸乙酯; 环磷酰胺; 遗传毒性

中图分类号: R965.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2012)01-0006-04

Establishment and application of comet assay *in vivo* method in rats

WANG Xin, WANG Xue, SONG Jie, WANG Chao, HU Yan-ping, LI Bo

National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

Abstract: Objective To establish the comet assay *in vivo* method used for rat liver and peripheral blood lymphocyte cells and detect the genotoxicity of ethyl methanesulfonate (EMS) and cyclophosphamide (CPA). **Methods** Sprague-Dawley (SD) male rats were treated with series doses of EMS and CPA. Peripheral blood sample and tissue in left lobe of liver were collected to prepare single cell gel suspension and pave the slides. The slides were processed with complex steps containing lysis, unwinding, electrophoresis, neutralizing, and dehydrating to get the scoring specimen. To dye the specimens, observe the comet cells under fluorescence microscope (40×), and then photograph. The cell images were analyzed with special software and determined by electrophoresis. **Results** EMS showed positive reaction while CPA was negative in two tissues. It was convinced that EMS was appropriate as positive reagent in this assay. **Conclusion** The method of rat comet assay *in vivo* is successfully established and it could be used to genotoxicity detection.

Key words: comet assay *in vivo*; ethyl methanesulfonate (EMS); cyclophosphamide (CPA); genotoxicity

彗星试验(comet assay)也称作单细胞凝胶电泳(single cell gel electrophoresis)试验, 是一项可以直接检测核DNA损伤的敏感实验方法。它可以检测DNA单/双链损伤、碱性不稳定位点、DNA交联等多种损伤类型, 因此该实验方法是研究突变修饰和遗传性改变的有效手段^[1]。目前彗星试验多应用在体外培养细胞的遗传损伤检测研究中, 而采用体内组织细胞进行研究的报道较少。本实验目的是建立基于大鼠肝细胞和外周血淋巴细胞的体内彗

星试验方法, 并利用该方法对两种遗传毒性阳性物甲磺酸乙酯(EMS)和环磷酰胺(CPA)的体内DNA损伤性进行研究。

1 材料与方法

1.1 仪器

DYCP-31F型电泳仪, 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; 石蜡切片伸展器, 日本樱花公司; Nikon eclipse 80i荧光显微镜, 日本尼康公司;

收稿日期: 2011-11-12

基金项目: 重大新药创制科技重大专项(2008ZX09305-002)

作者简介: 王 欣, 女, 助理研究员, 主要从事药物安全性评价毒理学试验和研究工作。Tel: (010)67872233-8115 E-mail: wangxin-26@nicpbp.org.cn

*通讯作者 王 雪, 男, 理学博士, 主要从事药物安全性评价毒理学试验和研究工作。Tel: (010)67872233-8601 E-mail: xue_wang@nicpbp.org.cn

Komet 6.0 图像分析系统,英国安道尔科技有限公司; HB—RO 超纯水机,杭州惠邦净水设备有限公司。

1.2 试剂与材料

1.2.1 化学试剂 EMS、CPA, Sigma-aldrich 化学试剂公司; 戊巴比妥钠, 国药集团化学试剂有限公司; 琼脂糖, 北京市普京康利科技有限公司; 低融点琼脂糖, 北京欣京科生物技术有限公司; 超纯水, 自制。

1.2.2 溶液配制 组织细胞切碎液 (7.45 g EDTA-2Na 粉末溶解于 900 mL 无钙、镁, 无酚红的 Hank's 溶液中, 调节 pH 至 7.5, 使用前加入 10% DMSO), 细胞裂解液 (146.1 g NaCl、37.2 g EDTA-2Na、1.2 g Tris-base、12 g NaOH 依次溶解于适量超纯水中, 加入少量 NaOH 调节 pH 至 10.0, 定容至 890 mL; 使用前加入 1% TritonX-100 和 10% DMSO), 电泳缓冲液 (12 g NaOH 和 0.372 g EDTA-2Na 溶解在 1 L 超纯水中, 加入 NaOH 调节 pH>13.0), 中和液 (0.2 mol/L Tris-HCl 溶液, 调节 pH 至 7.4), 染液 (20 μ g/mL 吖啶橙溶液)。以上溶液配制时使用的全部化学试剂均购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2.3 实验材料 单面毛玻璃片、盖玻片 (内壁涂有肝素), 1.5 mL 采血管, 1.5、5 mL 离心管, 水冰台面, 冰袋, 解剖剪和镊子, 2、20 mL 注射器, 100、200、1 000 μ L 加样器。

1.3 实验动物

7~8 周龄 SD 雄性大鼠, 体质量 230~250 g, 共 21 只 (购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 动物质量合格证 SCXK (京) 2007-0001)。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组及药物处理 分别设空白对照组、EMS 处理组和 CPA 处理组。空白对照组不给药, 共 3 只动物; EMS 处理组包括低、中、高 3 个剂量, 每组 3 只, 给药剂量分别为 100、200、400 mg/kg, 给药体积 10 mL/kg, ig 给药 2 次, 间隔 21 h, 末次给药后 3 h 收集样本制作标本。CPA 处理组包括低、中、高 3 个剂量梯度, 每组 3 只动物, 给药剂量 20、40、80 mg/kg, 给药体积 10 mL/kg, ip 给药 1 次, 给药后 24 h 收集样本制作标本。ip 给予 4.5% 戊巴比妥钠溶液麻醉后, 解剖并收集组织样本, 之后将动物放血处死。

1.4.2 制备组织样本单细胞悬液 每只动物从腹主动脉采血 200 μ L, 转移入采血管内, 反转振摇试管以防止血凝。将采集血样放入碎冰盒内保存备用。

采血完毕, 用 20 mL 注射器自动动物肝门静脉缓慢推注预冷的生理盐水直至肝脏鼓起发白, 剪下左侧肝叶一小块组织, 每只动物剪切组织块大小应尽量保持一致。将剪下的组织块放入预冷的切碎液中反复涮洗去除残留血液。洗干净的肝组织块放入 5 mL 离心管内, 向其中加入 3 mL 新鲜切碎液, 剪碎组织块以释放细胞。将盛有组织块的试管放入碎冰盒内保存备用^[2]。

1.4.3 制备单细胞凝胶玻片 配制适量体积 0.8% 琼脂糖凝胶液和 0.75% 低融点琼脂糖凝胶液, 加热煮沸, 放入 56 $^{\circ}$ C 恒温振荡水浴槽内备用。①基底凝胶层制备: 石蜡伸展器温度预设为 50~53 $^{\circ}$ C, 将毛玻璃片、盖玻片, 加样器、枪头放置于台面上预热备用。在玻片毛面一侧滴加 55 μ L 琼脂糖凝胶液, 以手动涂片方式涂布 3/4 玻片面积, 将玻片放回加热台上烤干备用。②普通凝胶层制备: 在基底凝胶层上滴加 100 μ L 琼脂糖凝胶液, 斜向右上方 30 $^{\circ}$ 角加盖玻片, 使琼脂糖层均匀地扩散到另一侧。将玻片立即放在水冰台上, 10~15 min 后凝胶层凝固, 轻轻揭掉盖玻片, 此为制备好的普通凝胶层玻片, 放置备用。③单细胞凝胶层制备: 将低融点琼脂糖凝胶液放至室温, 石蜡伸展器温度预设为 39 $^{\circ}$ C。取一支 1.5 mL 离心管, 将组织样本单细胞悬液与低融点琼脂糖液适量混合于离心管内, 轻轻吹打混匀。吸取 75 μ L 单细胞凝胶液, 滴加在制备好的普通凝胶层上, 加盖玻片推散细胞并固化, 凝固后揭掉盖玻片, 此为制备好的单细胞凝胶标本, 放置备用。肝细胞样本和血细胞样本分开制片, 每只动物的每一组织样本制片 3~4 张^[3]。

1.4.4 细胞裂解 将单细胞凝胶玻片浸入细胞裂解液中, 加入裂解液使体积刚好没过玻片。放置 4 $^{\circ}$ C 冰箱内, 避光裂解 2 h。取出玻片, 用预冷的超纯水清洗玻片 3 次, 每次 5 min, 放置备用。

1.4.5 DNA 解旋 (pH>13)、电泳、中和、脱水 预先将电泳槽放置在一个密闭的冰盒内, 冷却备用。将玻片平行码放在电泳槽内, 向其中缓缓加入预冷的电泳缓冲液没过玻片, 加盖, 避光解旋 30 min。在 300 mA 条件下, 电泳约 30 min。电泳结束后, 将玻片浸没在预冷的中和液中, 漂洗 3 次, 每次 5 min。将玻片取出, 浸没在无水乙醇中, 脱水处理 5 min^[4]。脱水完毕, 将玻片取出放置在自然通风处晾干, 待染色和观察。

1.4.6 标本染色、观察、拍照 向单细胞凝胶标本

表面滴加数滴吖啶橙染液, 加盖玻片, 染色大约 2 min, 然后在 40× 荧光显微镜下观察, 核 DNA 染色后呈绿色荧光。圆形的绿色光斑是彗头, 紧随其后的较长的散点状拖尾是彗尾。选择靠近玻片中间位置且密度适中的细胞进行拍照, 尽量避免重叠细胞。

1.4.7 数据计算与处理 使用 Komet 6.0 软件分析单细胞图像, 该软件可通过尾动度 (olive tail moment)、尾部 DNA 率 (tail DNA%)、尾长 (tail length)、长/高比值 (L/H) 等指标对结果进行分析, 本实验采用 tail DNA% 指标^[5]。每只动物的不同组织样本分别分析 100 个细胞, 计算每只动物的 tail DNA% 平均值、标准差以及每组动物的 tail DNA% 平均值、标准差。应用单侧配对 *t* 检验法, 将各剂量组数据与对照组比较, $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 彗星细胞观察结果

图 1、2 分别是肝细胞彗星电泳图和外周血淋巴细胞彗星电泳图, 分别从空白对照组、EMS 中剂量组、CPA 中剂量组中选择一张照片列出并进行比较。从图中可以看出, 与空白对照相比, EMS 处理过的肝细胞和淋巴细胞出现明显的彗星拖尾现象, 说明有不同程度的 DNA 断片产生; CPA 处理过的肝细胞和淋巴细胞未见彗星拖尾现象。

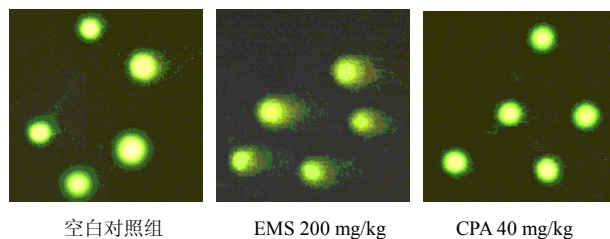


图 1 SD 大鼠肝细胞彗星电泳图

Fig. 1 Electropherogram of comet assay in liver cell of SD rats

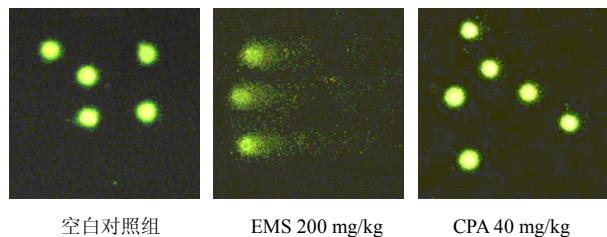


图 2 SD 大鼠外周血淋巴细胞彗星电泳图

Fig. 2 Electropherogram of comet assay in peripheral blood lymphocyte of SD rats

2.2 彗星细胞测定结果

表 1 为肝细胞和外周血淋巴细胞彗星试验结

果。EMS 高剂量组的外周血淋巴细胞因处理过度致核 DNA 损伤严重, 多数细胞彗头已经消失, 彗尾分散且光斑暗淡, 分析软件无法对这类细胞进行识别并分析, 故该组实验数据缺失。EMS 处理组的肝细胞和外周血淋巴细胞 (高剂量组除外) 在任一实验剂量下与空白对照组相比均有统计学差异。CPA 处理的肝细胞和外周血淋巴细胞在低、中、高 3 个剂量下, 与空白对照组相比均无统计学差异。

表 1 SD 大鼠肝细胞和外周血淋巴细胞彗星试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Comet assay data on liver cell and peripheral blood lymphocyte of SD rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	给药剂量/ (mg·kg ⁻¹)	肝细胞彗星试验 tail DNA/%	外周血淋巴细胞彗 星试验 tail DNA/%
空白组	—	3.11 ± 0.35	2.54 ± 0.38
EMS 组	100	18.80 ± 0.17**	27.22 ± 3.09*
	200	25.49 ± 3.82*	31.38 ± 0.54**
	400	30.77 ± 3.66*	—
CPA 组	20	3.40 ± 0.45	2.64 ± 0.52
	40	4.28 ± 0.92	2.42 ± 0.25
	80	3.85 ± 0.81	4.89 ± 1.28

与空白对照组相比: * $P < 0.01$ ** $P < 0.001$

* $P < 0.01$ ** $P < 0.001$ vs control group

3 讨论

本研究成功建立了基于大鼠肝细胞与外周血淋巴细胞的体内彗星试验方法。该实验方法可采集的脏器细胞样本还可以是胃、十二指肠、肺、肾、脾、膀胱等^[2]。选择肝脏细胞和外周血细胞进行实验, 是因为肝脏作为药物体内代谢的重要靶器官, 暴露剂量充分, 能最大程度地反映药物对脏器组织的毒性作用; 而外周血则是比较容易获得的单细胞样本, 可以在不同时间点采集, 是监测药物对机体动态毒性效应的最佳样本。依实验目的不同, 也可以进行其他组织细胞的彗星试验研究, 本实验为进一步开展后续工作奠定了基础。

从图 1、2 和表 1 可知, EMS 的体内彗星试验结果为阳性, CPA 的体内彗星试验结果为阴性。其中, EMS 在 100、200、400 mg/kg 3 个剂量水平都呈现非常显著的阳性结果, 因此, EMS 可以作为本实验的阳性对照药使用, 推荐剂量为 200 mg/kg^[6]。CPA 是一种烷化剂, 可以诱导 DNA 交联, 从而造成染色体结构变异。本研究的 CPA 彗星试验结果为阴性, 推测可能与实验方法的特异性和灵敏度有关,

即 CPA 造成的损伤类型或损伤片段过小无法由该方法检测^[7]。同时,亦可能与 CPA 的暴露方式有关。研究中采用的给药剂量、次数、途径和样本采集时间等条件均参考微核试验方法设定^[8],这些条件可能不适用于彗星试验研究。因此,本实验结果提示体内彗星试验须注意实验条件的设定。应当积累更多阳性化合物的实验数据,为完成体内彗星试验方法的标准化奠定基础。

ICH 关于遗传毒性研究的技术指导原则正在完成修订,新的指导原则建议将体内彗星试验方法作为第二遗传终点检测指标纳入标准试验组合,以提高检测的准确度和完整性^[9-10]。同时,还建议采用联合或者整合的试验策略以减少使用动物数量,即将彗星试验与外周血微核试验联合,或者将彗星试验整合到一般毒性试验中,实现多终点检测。体内彗星试验在检测终点的特异性、操作的简便性、实验人员安全性等方面,较其他方法均有优势。因此,伴随新的指导原则的颁布与实施,体内彗星试验方法在遗传毒性研究中的应用会更加广泛。

参考文献

- [1] Liao W, McNutt M A, Zhu W G. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells [J]. *Methods*, 2009, 48(1): 46-53.
- [2] Sasaki Y F, Nishidate E, Izumiyama F, *et al.* Simple detection of chemical mutagens by the alkaline single-cell gel electrophoresis (comet) assay in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) [J]. *Mutat Res*, 1997, 391(3): 215-231.
- [3] Tice R R, 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): 206-221.
- [4] Hartmann A, Aquarell E, Beevers C, *et al.* Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. 4th International comet assay workshop [J]. *Mutagenesis*, 2003, 18(1): 45-51.
- [5] Kumaravel T S, Jha A N. Reliable comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionising radiation and chemicals [J]. *Mutat Res*, 2006, 605(1-2): 7-16.
- [6] Smithe C C, Adkins D J, Martin E A, *et al.* Recommendations for design of the rat comet assay [J]. *Mutagenesis*, 2008, 23(3): 233-240.
- [7] Collins A R, Oscoz A A, Brunborq G, *et al.* The comet assay: Topical issues [J]. *Mutagenesis*, 2008, 23(3): 143-151.
- [8] de Boeck M, Van Der Leede B J, Van Goethem F, *et al.* Flow cytometric analysis of micronucleated reticulocytes: Time- and dose-dependent response of known mutagens in mice, using multiple blood sampling [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2005, 46(1): 30-42.
- [9] ICH S2 (R1): Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use (Current Step 2 version) [S/OL]. (6 March 2008). <http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA4474.pdf>.
- [10] 王雪, 宋捷, 张旻, 等. ICH 遗传毒性研究指导原则修订的最新进展 [J]. *中国药事*, 2009, 23(5): 491-494.