

新药评价中彗星试验方法学研究及发展趋势

傅 鹏, 张建军, 姜 凌, 申秀萍 *

天津药物研究院, 天津 300193

摘 要 彗星试验是一项检测单细胞损伤的试验方法, 近年来在毒理学研究中发展很快。对彗星试验的原理和方法, 及其在新药评价遗传毒性研究、生殖毒性研究和靶器官毒理学研究中的应用进行了分析和介绍, 并提出了彗星试验技术的发展趋势。

关键词 彗星试验; 新药评价; 遗传毒性; 生殖毒性; 靶器官毒理学

中图分类号: R969.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2010) 04-0287-03

彗星试验 (comet assay) 又称单细胞凝胶电泳 (single-cell gel electrophoresis, SCGE), 是一项检测单细胞损伤的试验方法。近年来, 实验技术经过不断的改进, 已成为一种快速、灵敏、简便的检测单细胞 DNA 损伤的方法, 广泛地应用于 DNA 损伤和交联的检测、药物的毒性评价、细胞凋亡鉴定和致癌机制的研究等工作中^[1-5]。越来越多的毒理研究者应用此方法, 在体内、体外对有核细胞进行彗星试验, 以探讨药物对 DNA 损伤作用和毒性机制。

1 试验原理

SCGE 是一种能在单个细胞水平上检测遗传物质 DNA 损伤的实验技术。实验中细胞经过裂解、DNA 解旋等过程后, 在电泳条件下损伤的 DNA 从核中溢出, 朝阳极方向泳动, 产生一个尾状带, 未损伤的 DNA 部分保持球形, 二者共同形成“彗星”。DNA 片断越多, 片断长度越小, 彗星尾就越长。在一定范围内, “彗星”的长度 (代表 DNA 迁移距离) 和经荧光染色后“彗星”荧光强度 (代表 DNA 的量) 与 DNA 损伤程度相关, 这样就可以定量检测单个细胞中的 DNA 损伤^[6]。

2 研究方法^[7]

2.1 常用的彗星试验方法

2.1.1 碱性单细胞凝胶电泳

为了把 DNA 断裂暴露出来, 用碱变性来把 DNA 双链同 DNA 断链区分开来, 使彗星尾巴更显著, 在不影响其灵敏度的情况下提高检测 DNA 断裂的检出率。

2.1.2 中性单细胞凝胶电泳

在一段时间的碱性处理后, 恢复条件至中性后再电泳, 中性条件下溶解、解链、电泳, 则可检测 DNA 双链断裂。

2.1.3 对损伤特异酶类的使用

一些损伤剂可能直接引起 DNA 断裂, 但通常它们会很快重新连接起来。为了在提高灵敏度的同时提高特异度, 应用产生特定损伤或断裂的酶来消化。

2.2 不太常用的彗星试验形式

5-溴-2 脱氧尿苷标记检测复制 DNA、检测 DNA 修复的中间物、荧光原位杂交彗星试验。

3 SCGE 技术在新药评价遗传毒性研究中的应用

近年来, 以 DNA 损伤和修复为检测终点的单细胞凝胶电泳试验, 由于其快速、简便、敏感等优点, 越来越受到遗传毒理工作者重视。此方法作为一种检测 DNA 损伤的方法, 日益广泛地应用于各类化学诱变剂的检测, 在国外遗传毒理学核心期刊上出现频率很高。ICH 和 OECD 正在制定相关的指导原则, 准备将彗星试验引入到遗传毒性组合试验中^[8]。

我国新药评价中遗传毒性试验组合由微生物回复突变试验、哺乳动物培养细胞染色体畸变试验和啮齿动物微核试验组成。由于没有一个单一试验能检测所有遗传毒性终点, 因此通常采用一组遗传毒性体内和体外试验, 这些试验相互补充^[7]。但是, 当受试物的标准三项组合试验结果不一致时, 则需

收稿日期: 2010-03-15

基金项目: “十一五” 国家科技支撑计划课题 (2007BAI37B06)。

作者简介: 傅鹏 (1973—), 男, 主要研究方向: 药物遗传毒性。E-mail: fup@tjipr.com

* 通讯作者 申秀萍, 女, 研究员, 主要研究方向: 药物临床前毒理学及药效学, 通讯方式: 022-23006951, shenxp@tjipr.com.

则中, 单细胞凝胶电泳试验已作为遗传毒性试验组合外的备选试验项目^[9]。目前, 国内从事药物评价要引入新的试验进一步评价可疑药物是否会引起遗传毒性。在新颁布的药物遗传毒性研究技术指导原则的 GLP 实验室密切注视此项技术的研究与发展, 在科技部“支撑计划”和“重大新药创制”等基金项目中, 均将此项技术作为主要的研究内容。

4 SCGE 技术在新药评价生殖毒性研究中的应用

新药评价中生殖毒性试验研究主要集中在整体动物水平, 尚没有针对生殖细胞损伤的研究方法, SCGE 技术弥补了这方面的不足, 可以检测各种生殖细胞的 DNA 损伤水平, 从而更加全面地对药物的生殖毒性进行评价, 并为毒性机制的研究提供参考依据。

4.1 SCGE 技术在雄性生殖细胞中的应用^[10]

4.1.1 睾丸细胞

张遵真等建立了睾丸细胞的 SCGE 技术。将剪碎的睾丸生精小管用 110/200 目不锈钢网过滤后离心, 得到睾丸细胞, 再进行常规电泳实验。由于原代睾丸细胞具有一定的代谢活化作用, 可用于体内和体外诱变剂的毒性实验。

4.1.2 精子

精原细胞经过精母细胞、初级精母细胞、次级精母细胞、精细胞到精子成熟, 在染毒后不同时期利用彗星试验检测受试物对精子 DNA 损伤及修复, 可以反应出损伤发生在减数分裂的哪个阶段, 通过彗尾长度和彗尾荧光强度判定受试物的损伤程度。

4.1.3 支持细胞 (sertoli cell) 和生殖细胞共培养

利用支持细胞和生殖细胞共培养进行 SCGE, 为精子生成毒效应提供了一个敏感模型。当已知睾丸毒物作用于睾丸生殖细胞时, 共培养法发现了与体内类似的生殖细胞脱落。

4.2 SCGE 技术在雌性生殖细胞中的应用

4.2.1 卵丘细胞

卵丘细胞分泌必要的细胞外基质以促进排卵和受精, 在卵母细胞成熟与维持中扮演重要角色。因此, 卵丘细胞 SCGE 技术为雌性动物生殖细胞损伤的检测提供了可能, 更加丰富了生殖毒性的检测内容。

4.2.2 卵母细胞

对卵母细胞 DNA 损伤的研究方法大多用体外培养的卵母细胞 (常用中国仓鼠卵巢) 进行。新药

评价中可以与体外染色体畸变试验结合, 可以进行多个毒性终点检测。

5 SCGE 技术在靶器官毒理学研究中的应用^[11]

靶器官毒理学发展迅速, 目前已经成为毒理学研究的重要组成部分。从机体的角度, 研究各个特定器官对外源化学物毒性效应、结局及其机制, 是靶器官毒理学研究的主要内容。SCGE 技术在每个靶器官单细胞水平上的研究, 将成为靶器官毒理学研究的重要资料。

5.1 造血系统作为靶器官

动物取血后, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 等量稀释, 淋巴细胞分离液吸取中间层淋巴细胞, SCGE 电泳 30 min, 进行分析。淋巴细胞往返于循环系统内, 可增殖、分化, 寿命数月, 有的长达一年以上^[12]。直接应用分离的淋巴细胞进行体内和体外的彗星试验分析在理论上讲可以尽可能地排除血液中其它可能的干扰, 是研究药物对造血系统细胞 DNA 影响的主要方法。最近研究毒物对血液淋巴细胞 DNA 的损伤中, 采用微量全血法用于彗星试验^[13], 但是采用微量全血法与分离淋巴细胞相比其可靠性与敏感性相近。

5.2 内脏器官作为靶器官

肝、肾由于其特殊的解剖位置和生理功能, 成为新药评价研究中的主要靶器官。股动脉放血处死动物, 取出肝、肾放在滤纸上除去被膜后放小烧杯内, 加入少量预冷的 PBS 液清洗, 用眼科剪剪碎, 用 110 目的不锈钢筛网过滤, 收集细胞悬液, 进行彗星试验。将动物的肝 / 肾原代细胞应用于彗星试验具有敏感性高、取材方便、细胞制备简单、不需体外活化、实验周期短等优点, 对药物评价中的遗传毒性监测具有极其重要的意义, 其应用前景十分广阔^[14]。

6 SCGE 技术发展趋势

6.1 标准化实验室的建立

目前, SCGE 技术在国内实验室研究中试验条件存在一定的差别, 如电泳条件不同 (电压、电流、时间), 图像采集和分析软件不同等, 这些试验条件差别对试验结果有一定的影响。目前我国已有自主研发的适应彗星试验的分析系统, 配有相应的试剂盒, 提高了该试验的规范性和准确度, 避免了上述缺陷, 与国外公司相同设备相比, 经济实惠^[15]。随着彗星试验在新药评价中的广泛应用, 国内 GLP 实

实验室应建立相关的标准操作规程和标准化实验室,建立规范的彗星试验分析平台(包括电泳设备、图像采集和图像分析),减少试验的系统误差和人为误差,降低试验的假阳性率,使SCGE技术在新药评价中发挥更大的作用。

6.2 SCGE在药物高通量筛选中的应用

彗星试验已经成为一项敏感的遗传毒性实验技术,由于其快速、敏感、重复性好、可应用细胞范围广等优点,在96孔板上进行彗星试验已成为有发展潜力的高通量筛选方法之一。今后将彗星试验与FISH技术通过特异的DNA探针可联合用于检测选择性序列、区段和染色体的DNA损伤,检测方法将更加快捷、高效^[12]。

参考文献

- [1] Rojas E, Valverde M, Herrera L A, *et al.* Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes [J]. *Mutat Res*, 1996, 356: 77-84.
- [2] Fairbairn D W, Olive P L, OpNeill K L. The comet assay: A comprehensive review [J]. *Mutat Res*, 1995, 339: 37-42.
- [3] Mckelvey Martin V L, Green M H L, Schmezer P, *et al.* The single cell gel electrophoresis assay: European review [J]. *Mutat Res*, 1993, 288: 47-63.
- [4] 金顺姬, 段 链, 黄 梅, 等. 白藜芦醇和抗坏血酸对预防非典型肺炎方剂 I 和 VI 所致小鼠外周血液淋巴细胞 DNA 损伤的保护作用[J]. *中草药*, 2003, 34 (12): 1114-1117.
- [5] Isabel G, Anita P, Asgeir B. Comet assay-based methods for measuring DNA repair in vitro; estimates of inter- and intra-individual variation [J]. *Cell Biol Toxicol*, 2009, 25 (1): 45-52.
- [6] 张遵真, 衡正昌. 改良的彗星试验与标准方法的对比研究[J]. *卫生毒理学杂志*, 2000, 14 (3): 180-182.
- [7] ICH. S2 (R1): Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human uses [S]. 2008.
- [8] 黄芳华, 王庆历. 药物遗传毒性相关要求进展[J]. *中国新药杂志*, 2010, 19 (6): 464-472.
- [9] 宋春英, 杨建一, 高宝珍. 单细胞凝胶电泳技术在生殖细胞 DNA 损伤检测中的应用[J]. *生殖医学杂志*, 2007, 8 (16): 293-296.
- [10] 周宗灿. 毒理学教程[M]. 第三版. 北京: 北京大学医学出版社, 2006.
- [11] 段 链, 杨静玉, 于 海, 等. 彗星试验中全血法与分离淋巴细胞法的比较[J]. *癌变·畸变·突变*, 2004, 26 (5): 307-310.
- [12] 孙树秋, 姜树林, 姚洪菊, 等. 微量全血彗星实验法的建立及在生物监测中的初步应用[J]. *中国地方病学杂志*, 2003, 22 (2): 170-173.
- [13] 李爱武, 衡正昌, 刘科亮, 等. 体内彗星实验多种器官细胞分离条件研究[J]. *卫生毒理学杂志*, 2001, 15 (2): 101-102.
- [14] 闫学昆, 陈 英, 杜 杰, 等. 彗星实验图象分析中彗星分割阈值的选择[J]. *辐射研究与辐射工艺学报*, 2009, 27 (1): 15-19.

中草药杂志社 4 种期刊为允许刊载处方药广告的

第一批医药专业媒体

据国家药品监督管理局、国家工商行政管理局和国家新闻出版总署发布的通知, 中草药杂志社编辑出版的《*中草药*》、*Chinese Herbal Medicines (CHM)*、《*现代药物与临床*》、《*药物评价研究*》4 本期刊作为第一批医药专业媒体, 允许发布“粉针剂、大输液类和已经正式发文明确必须凭医生处方才能销售、购买和使用的品种以及抗生素类的处方药”广告。

电话: (022)27474913 23006821

传真: 23006821

联系人: 陈常青

网址: www.中草药杂志社.中国; www.tiprpress.com E-mail: zcy@tiprpress.com