

• 综述 •

体内彗星试验在药物遗传毒性评价中的研究方法

张建军, 姜 凌, 柴振海*

天津药物研究院 天津市新药安全评价研究中心, 天津 300301

摘 要: 体内彗星试验是采用单细胞凝胶电泳的方法检测体内 DNA 损伤的技术。具有灵敏度高、操作简便、经济快速等优点。随着遗传毒性研究的发展, 体内彗星试验已经成为重要的药物遗传毒性评价方法。对动物试验阶段和彗星试验阶段各操作步骤进行了归纳总结, 以期对相关方法学建立提供参考, 并提出采用简化和标准化的研究方法将有利于体内彗星试验在药物遗传毒性评价的应用。

关键词: 体内彗星试验; 单细胞凝胶电泳; 药物评价; 遗传毒性

中图分类号: R994.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2014)03-0272-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2014.03.020

Research methods of *in vivo* comet assay on drug genotoxicity evaluation

ZHANG Jian-jun, JIANG Ling, CHAI Zhen-hai

Tianjin Center for Drug Safety Assessment and Research, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300301, China

Abstract: The *in vivo* comet assay is a technology using single cell gel electrophoresis for the detection of DNA damage *in vivo*. The assay has the advantages of high sensitivity, ease of performance, low cost, and short time. With the development of the genotoxicity research, the *in vivo* comet assay has become an important method for genotoxicity assessment. This article reviewed some operating procedures in the animal test stage and the comet test stage, and suggested that using simplified and standardized research methods should be good for the application of *in vivo* comet assay on drug genotoxicity evaluation.

Key words: *in vivo* comet assay; single cell gel electrophoresis; drug evaluation; genotoxicity

彗星试验 (comet assay) 又称单细胞凝胶电泳 (single cell gel electrophoresis)。1984 年, Ostling 和 Johanson 首次采用该技术在酸性条件下检测单细胞的 DNA 双链断裂^[1]。1988 年, Singh 等^[2]建立了碱性 (pH>13) 单细胞凝胶电泳方法, 该技术不仅可检测 DNA 的单、双链断裂, 还可检测不完全修复位点, 不稳定的碱基位点, DNA-蛋白质交联和 DNA-DNA 交联等。根据细胞来源不同, 彗星试验可分为体内试验和体外试验。顾名思义, 体内彗星试验就是采用单细胞凝胶电泳方法检测生物体内细胞有无 DNA 损伤的试验, 具有以下优点^[3]: 可检测体内任何组织和 (或) 特定细胞类型; 可以检测多种与 DNA 单、双链相关的遗传毒性损伤; 试验灵敏度高; 每个样本仅需少量细胞; 操作流程简便; 试验周期短; 所需费用较少。

20 世纪 90 年代, 人用药物注册技术要求国际协调会议 (ICH) 和经济合作发展组织 (OECD) 颁布了一系列遗传毒性相关指导原则, 用于药物评价的遗传毒性标准组合及试验技术方法均未出现大的变化。而 2011 年 11 月, ICH 正式颁布了新的遗传毒性指导原则 S2 (R1), 增加了一种全新的试验标准组合, 包含细菌回复突变试验和两种不同组织/终点的体内试验, 并推荐将体内彗星试验作为第二项体内试验^[4]。这是国际权威机构首次将彗星试验纳入遗传毒性指导原则。体内彗星可作为体内微核试验重要的补充^[5], 在遗传毒理学研究上有重要意义。但其在药物遗传毒性评价中的应用却极少, 仅见于遗传毒性常规评价方法外的补充研究, 尚无相关的指导原则, 国内大部分实验室还没有方法学建立。本文重点关注在药物评价中体内彗星试验应

收稿日期: 2014-02-20

基金项目: 十二五“重大新药创制”国家科技重大专项 (2012ZX09505001-001)

作者简介: 张建军 (1979—), 男, 助理研究员, 研究方向为药物遗传毒理。E-mail: zhangjj@tjipr.com

*通信作者 柴振海 E-mail: chaizh@tjipr.com

如何开展,以期对相关方法学建立提供一些参考。

1 动物试验阶段

1.1 实验动物

体内彗星试验一般选用啮齿类动物(大鼠、小鼠)。根据S2(R1)建议,在可能的情况下应将体内试验与重复给药试验相整合。若同一受试物需进行两个遗传毒性体内试验,应尽可能整合在一个试验中(如体内微核和彗星试验),则更符合替代、减少、优化(replacement、reduction、refinement, 3R)原则,并可以节约时间成本。在性别选择方面,可选用两种性别动物;当受试物毒性或代谢在性别间无明显差异时,也可选用单一性别动物(如微核试验常选用雄性动物);如果受试物专用于某一性别人群,则通常选用相应性别的动物进行试验。

1.2 组别设置

试验一般应包括阴性对照组(溶媒对照组),受试物低、中、高剂量组和阳性对照组。Wiklund 和 Agurell 推荐每组一般应包括4~5只动物^[6]。

1.3 受试物剂量

基本与OECD 474哺乳动物红细胞微核试验指导原则相一致,对无明显毒性受试物的单次给药或重复给药时间≤14 d的上限剂量为2 000 mg/kg,而重复给药时间>14 d的上限剂量为1 000 mg/kg^[7];对有明显毒性受试物,高剂量应产生明显毒性,除非动物出现不能接受的毒性信号和(或)靶组织发生极端的细胞毒性。相邻的剂量间隔一般为2~3倍^[4]。

1.4 试验周期

以前的体内彗星试验一般多采用单次给药。但近年来也常见多次给药的报道^[5, 8],时间跨度可从几天至几周不等。由于试验整合和采样时间的需要,多次给药逐渐会得到更广泛的应用。

1.5 靶组织的选择

原则上彗星试验可适用于任何组织,但在缺少相关受试物的靶组织信息时,肝脏被认为是最适宜的靶组织。值得注意的是,有一小部分致癌物可在肝脏遗传毒性检测呈阳性结果,而在骨髓检测呈阴性结果,可能与代谢产物不能有效进入骨髓有关^[4];其次是胃、肠等可与受试物直接接触的组织(当肝脏的遗传毒性检测为阴性时)。靶组织的选择主要依据163个啮齿类动物和30个非啮齿类动物致癌物的相关彗星测定结果所进行的综合评估^[9]。

1.6 采样时间

对于单次给药的试验,一般为2个采样时间,

给药后几小时内和24小时左右;而对于重复给药的试验,可采用最后1次给药后2~6 h单次采样^[4]。结合微核试验,已有的研究表明微核试验中连续给药3 d及以上,骨髓微核的水平在最后1次给药后0~24 h内保持稳定。这样在多次给药时,可解决采样时间上的矛盾。

1.7 组织中单细胞的获取

从组织中获取单细胞悬液可采用胶原酶或胰蛋白酶等消化方法,也可采用组织擦刮法、剪碎法、灌洗法或液氮冷冻^[10]等机械方法,以及匀浆以释放细胞核。在采用机械法时,应加入乙二胺四乙酸(EDTA)^[10]螯合钙、镁离子以便阻止核酸内切酶激活,而加入自由基清除剂,如二甲基亚砜(DMSO),能阻止氧化诱导的DNA损伤^[11]。

2 彗星试验阶段

为保证研究结果的重现性和可靠性,涉及碱性(pH>13)单细胞凝胶电泳的所有试验步骤均同等重要。一般而言,在样品制备、溶液制备和应用、仪器使用和维护方面采用严格的质量控制标准,将会获得理想的试验结果。

2.1 玻片制备

长久以来,采用载玻片上制备凝胶的方法得到广泛应用^[12]。为了增加凝胶与玻片结合的稳固性及减少背景干扰,琼脂糖层数常被铺设为1~3层。在单层琼脂糖制备上,细胞被混悬于低熔点琼脂糖(一般37℃)中并直接置于玻片上;制备3层琼脂糖时,玻片预先铺设1层正常熔点琼脂糖,后加入细胞层琼脂糖,最后再铺设1层低熔点琼脂糖;而在制备两层琼脂糖时,省略了3层制备上最后铺设的低熔点琼脂糖。在琼脂糖凝固前取适当尺寸的盖玻片加以覆盖,以便在凝固时获得平整的、便于观察的表面,一般正常熔点琼脂糖浓度为1.0%~1.5%,低熔点琼脂糖浓度为0.5~1.0%,高浓度的琼脂糖可影响DNA迁移的长度。细胞浓度和琼脂糖浓度一样,是确保试验成功的重要参数,较高的细胞密度导致过多的彗星重叠,特别是存在高水平DNA迁移时。因此,适当的细胞数量应保证在每个视野中至多有几个细胞。

近年来,随着科学技术的发展,有研究者^[13]使用一种可黏附低熔点琼脂糖的Gelbond®膜替代底层琼脂糖,为低熔点琼脂糖提供了一个可黏附的表面,避免了玻片制胶易脱落的缺点,无需使用盖玻片,极大的简化了试验操作,提高了试验的稳定性。

目前,该方法已通过微孔列阵技术实现了高通量检测^[14],可检测多个样品,最高达 96 个,具有广阔的应用前景,也更易标准化,但价格昂贵。

2.2 裂解

待琼脂糖凝固后,取下盖玻片,浸入预冷的(4℃)裂解液(含高盐及去污剂)中,使细胞充分裂解。裂解液早期由 Singh 等^[2]提出,包含 100 mmol/L 的 EDTA、2.5 mol/L 的 NaCl、1%肌氨酸钠、10 mmol/L Tris,调 pH 值至 10,临用前加入 1%的 Triton X-100。接下来, Tice 等^[15]加入 10%的 DMSO,以保护样品(血液及组织)在裂解过程中释放的铁离子所诱导的 DNA 损伤。再之后, McKelvey-Martin 等^[16]报道,肌氨酸钠并非裂解液中所必需的。但是,一些特殊的细胞类型可能需要第二种去污剂才能完全裂解。裂解液临用前需预冷,以保持琼脂糖凝胶的稳定性。裂解时间主要依赖于细胞类型,可由 1 h 至数周不等。

2.3 碱性(pH>13)解旋、电泳及中和

电泳前,玻片先在碱性(pH>13)电泳缓冲液中产生单链 DNA 以检测单链 DNA 损伤。碱性溶液^[2]包含 1 mmol/L 的 EDTA 和 300 mmol/L 的 NaOH, pH>13。解旋时间一般为 20 min,如应用较短的解旋时间,则需对双链 DNA 是否变成单链 DNA 做出说明。

碱性解旋后,琼脂糖凝胶中单链 DNA 在碱性条件下继续电泳以产生彗星。电泳条件^[2]一般为 25 V 电压、300 mA 电流,电泳时间为 20 min。随着电泳仪规格的多样化,电压采用 V/cm 表示更准确,电压的一般范围是 0.7~1.0 V/cm。

电泳后,碱性凝胶玻片需要在合适的缓冲液(如 pH=7.5 的 Tris 缓冲液)中漂洗中和, Singh 等^[2]提出的规程是 3 次漂洗,每次 5 min。如果在评分过程中出现较高背景值时,增加冲洗次数会起到积极作用^[17]。中和后,早期的试验一般是在合理的时间内评分(如 24 h),以避免 DNA 的过度扩散。近期的试验一般是将琼脂糖凝胶先浸于无水乙醇或甲醇中短暂脱水^[18](如 5 min),或室温下干燥。干燥后经中性福尔马林固定,可保存较长时间。

2.4 DNA 染色及彗星显影

DNA 染色常使用荧光染料,而应用最为广泛的是溴化乙啶(EB)^[19],其他还可以使用碘化丙啶(PI)^[20]、4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)^[21]、SYBR Green I^[22]和苯并恶唑啉(YOYO-1)^[23]等。而非荧

光染色主要采用硝酸银染色技术^[24],较荧光染色具有易于保存、可随时观察、对研究人员伤害小等优点,但显色效果一般。彗星成像倍数一般 200×至 400×最为常见,主要依赖于评价细胞的类型、彗星迁移的范围以及显微镜和(或)成像系统的相关参数。

2.5 彗星评分

所有玻片在显微镜观察前均应进行编号标记,每只动物一般采集 50~100 个细胞,选用适宜的分析方法。广泛应用的方法是根据 DNA 迁移的长度和(或)尾部 DNA 所占比例进行分级评分,如分为 4 级^[25](0~3)或 5 级^[22](0~4),0 为无可见尾部,4 为绝大部分 DNA 在尾部。此法虽具有一定的主观性,精确性较差,但有较好的实用价值。同时,也可根据不同的分析系统对各种相关指标进行精确统计,常用指标有:彗星全长(comet length)、尾长(tail length)、尾部 DNA 百分含量(tail DNA%)、尾矩(tail moment,尾长与尾部 DNA 百分含量的乘积)、OLIVE 尾矩^[26](彗星头尾中心间距与尾部 DNA 百分含量的乘积)等,均能很好的反映 DNA 损伤的程度。

3 结语

近年来,体内彗星试验在遗传毒性研究中的优势和价值逐渐显现,开始获得了 ICH、OECD 等国际权威机构的认可和推广,具有了更广阔的发展空间。体内彗星试验在 GLP 条件下的建立和应用将有助于药物遗传毒性的准确评价,特别是当常规遗传毒性评价结果为可疑阳性时,可作为非常重要的备选试验。但由于缺乏权威机构的实验指南作为指导,各实验室在进行体内彗星试验时,在应用条件和分析方法上不尽相同,在个别步骤上仍存有分歧,导致了研究结果的可比性、重复性较差。而要将其引入相对成熟和稳定的药物遗传毒性评价上来,势必还要在单细胞获取、玻片制备、DNA 染色及彗星评分等细节的规范上多下功夫。这就需要各实验室相关研究人员紧跟国际研究进展,在试验中不断开拓创新、善于分析总结并及时沟通交流,首先应在丰富理论和实践经验的基础上,建立适用于本实验室的实验方法学,之后应尽可能的简化和标准化操作规程,以便减少干扰并获得真实、完整、可靠的评价结果。同时,也需药政相关部门及时掌握国际相关指导原则最新动态,结合我国国情,对遗传毒性指导原则进行及时及必要的修订,帮助相关人员掌握新方法、新技术,提高我国药物遗传毒性研究水

平并与国际接轨。

参考文献

- [1] Ostling O, Johanson K J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damage in individual mammalian cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 123(1): 291-298.
- [2] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. *Exp Cell Res*, 1988, 175(1): 184-191.
- [3] Susanne B S, Andreas H, Stefan P, *et al.* The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing [J]. *Mutagenesis*, 2005, 20(4): 245-254.
- [4] ICH. Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use, S2 (R1) [S]. Geneva, 2011.
- [5] Recio L, Hobbs C, Caspary W, *et al.* Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and Comet assay protocol [J]. *J Toxicol Sci*, 2010, 35(2): 149-162.
- [6] Wiklund S J, Agurell E. Aspects of design and statistical analysis in the comet assay [J]. *Mutagenesis*, 2003, 18: 167-175.
- [7] OECD. *Mammalian erythrocyte micronucleus test OECD guidelines for the testing of chemicals*, vol. 474 [M]. Paris, 1997.
- [8] Mauro M O, Monreal M T, Silva M T, *et al.* Evaluation of the antimutagenic and anticarcinogenic effects of inulin *in vivo* [J]. *Genet Mol Res*, 2013, 12(3): 2281-2293.
- [9] Sasaki Y F, Sekihashi K, Itumiyama F, *et al.* The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U. S. NTP carcinogenicity database [J]. *Crit Rev Toxicol*, 2000, 30(6): 629-799.
- [10] Bourdon J A, Saber A T, Jacobsen N R, *et al.* Carbon black nanoparticle instillation induces sustained inflammation and genotoxicity in mouse lung and liver [J]. *Part Fibre Toxicol*, 2012, 9: 5. doi: 10.1186/1743-8977-9-5.
- [11] Tice R R, Yager J W, Andrews A, *et al.* Effect of hepatic methyl donor status on urinary excretion and DNA damage in B6C3F1 mice treated with sodium arsenite [J]. *Mutat Res*, 1997, 386(3): 315-334.
- [12] Tice R R, Agurell E, Anderson D, *et al.* The single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2000, 35(3): 206-221.
- [13] McNamee J P, McLean J R, Ferrarotto C L, *et al.* Comet assay: rapid processing of multiple samples [J]. *Mutation Research*, 2000, 466(1): 63-69.
- [14] Azqueta A, Gutzkow K B, Priestley C C, *et al.* A comparative performance test of standard, medium-and high-throughput comet assays [J]. *Toxicol In Vitro*, 2013, 27(2): 768-773.
- [15] Tice R R, Andrews P W, Hirai O, *et al.* The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells [J]. *Adv Exp Med Biol*, 1991, 283: 157-164.
- [16] McKelvey-Martin V J, Green M H, Schmezer P, *et al.* The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): a European review [J]. *Mutat Res*, 1993, 288(1): 47-63.
- [17] Rojas E, Lopez M C, Valverde M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 1999, 722(1-2): 225-254.
- [18] Gurugunta A, Vasquez M, Tice R R. Characterization of the single cell gel (SCG) assay alcohol dried slides versus conventional slides [J]. *Environ Mol Mutagen*, 1996, 27(suppl 27): 27.
- [19] Raymundo T M, Favilla M, Niero R, *et al.* Genotoxicity of the medicinal plant *Maytenus robusta* in mammalian cells *in vivo* [J]. *Genet Mol Res*, 2012, 11(3): 2847-2854.
- [20] Wang X, Li S, Cao T, *et al.* Evaluating biotoxicity with fibroblasts derived from human embryonic stem cells [J]. *Toxicol In Vitro*, 2012, 26(6): 1056-1063.
- [21] Roudsari M T, Bahrami A R, Dehghani H. Bracken-fern extracts induce cell cycle arrest and apoptosis in certain cancer cell lines [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012, 13(12): 6047-6053.
- [22] Matic S, Stanic S, Bogojevic D, *et al.* Genotoxic potential of *Cotinus coggygia* Scop. (Anacardiaceae) stem extract *in vivo* [J]. *Genet Mol Biol*, 2011, 34(2): 298-303.
- [23] Gichner T, Mukherjee A, Veleminský J. DNA staining with the fluorochromes EtBr, DAPI and YOYO-1 in the comet assay with tobacco plants after treatment with ethyl methanesulphonate, hyperthermia and DNase-I [J]. *Mutat Res*, 2006, 605(1/2): 17-21.
- [24] Nadin S B, Vargas-Roig L M, Ciocca D R. A silver staining method for single-cell assay [J]. *J Histochem Cytochem*, 2001, 49(9): 1183-1186.
- [25] Maistro E L, Mota S F, Lima E B, *et al.* Genotoxicity and mutagenicity of *Rosmarinus officinalis* (Labiatae) essential oil in mammalian cells *in vivo* [J]. *Genet Mol Res*, 2010, 9(4): 2113-2122.
- [26] Olive P L, Banath J P, Durand R E. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay [J]. *Radiat Res*, 1990, 122(1): 86-94.