

【 评价方法学 】

人源 HepaRG 肝细胞毒性与遗传毒性高通量筛选方法的初步建立

文海若^{1#}, 毛志慧^{1,2#}, 耿兴超, 李波, 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, 广州 510006

摘要: **目的** 利用正常人源肝细胞 (HepaRG) 和高内涵技术检测肝毒性标志物, 并结合微核试验和单细胞凝胶电泳试验建立体外细胞毒性和遗传毒性的快速筛选平台。 **方法** 选取适当的荧光探针 Hoechst33342、DCFH-DA、Fluo4-AM、MitoTracker® Red CMX Ros 联合高内涵技术研究不同大黄蒽醌类单体 (AQs) 对 HepaRG 细胞活性氧簇 (ROS)、胞内 Ca²⁺ 含量及线粒体膜完整性等肝毒性标志物的影响, 并开展高内涵胞质分裂阻断法微核试验和高通量彗星电泳试验, 综合评价 AQs 致肝细胞毒性及染色体、DNA 损伤情况。 **结果** 与对照组比较, HepaRG 细胞经 25.0 μg/mL 大黄素、12.5 和 25.0 μg/mL 芦荟大黄素、50 和 25.0 μg/mL 大黄酚处理 24 h 后, 胞内 ROS 含量显著增多; 12.5 和 25.0 μg/mL 芦荟大黄素和 50.0 μg/mL 大黄酸可引起胞内 Ca²⁺ 含量显著增多; 大黄素 25.0 μg/mL、芦荟大黄素 25.0 μg/mL、大黄酚 50.0 和 25.0 μg/mL、大黄酸 50.0 和 25.0 μg/mL 组导致线粒体明显损伤 ($P < 0.05, 0.01$)。与对照组比较, 25.0 μg/mL 大黄素诱导微核率、尾 DNA 含量和彗星尾距 (OTM) 数值均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$); 50.0 μg/mL 大黄酚给药 72 h 后微核率显著升高 ($P < 0.01$)。 **结论** AQs 的研究结果与现有文献报道基本相符。本研究成功建立肝细胞毒性和遗传毒性的联合快速筛选模型, 有助于药物研发早期的毒性筛选。

关键词: 大黄蒽醌类单体; HepaRG 细胞; 高通量筛选; 肝细胞毒性; 活性氧; 线粒体损伤; 遗传毒性; DNA 断裂; 染色体损伤; 微核试验; 单细胞凝胶电泳; 大黄素; 芦荟大黄素; 大黄酚; 大黄酸

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2017)11-1550-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.11.006

Preliminary validation of high throughput screening methods for hepatotoxicity and genotoxicity in humanized HepaRG cells

WEN Hai-ruo¹, MAO Zhi-hui^{1,2}, GENG Xing-chao, LI Bo, WANG Xue¹, HUANG Zhi-ying²

1. National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of Beijing for Nonclinical Safety Evaluation Research of Drugs, Beijing 100176, China

2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To detect the hepatotoxicity biomarkers using normal human hepatocyte (HepaRG) and high-content screening, and to combine the micronucleus test and single cell gel electrophoresis to establish a rapid screening platform for *in vitro* cytotoxicity and genotoxicity. **Methods** The effects of rhubarb anthraquinones (AQs) on the reactive oxygen species (ROS), intracellular Ca²⁺ concentration and mitochondrial membrane potential (MMP) in HepaRG cells were studied using appropriate fluorescent probes Hoechst33342, DCFH-DA, Fluo4-AM, Mito Tracker Red CMX Ros and high-content screening methods, and the potential genotoxicity triggered by AQs were analyzed using the high-content based cytokinesis block micronucleus test and high throughput comet assay. **Results** The intracellular ROS level of HepaRG cells was significantly elevated by a 24 h treatment with Emodin (25.0 μg/mL), aloe-emodin (25.0 μg/mL) or chrysophanol (50.0 μg/mL), which are dose-concentration dependent ($P < 0.05$

收稿日期: 2017-06-09

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2015ZX09501004-002); 中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金(2014C1)

作者简介: 文海若, 女, 副研究员, 研究方向为药物遗传毒性。Tel: (010) 67876252 E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

毛志慧, 女, 硕士研究生, 研究方向为药物安全性评价。Tel: 15521253095, E-mail: 15521253095@163.com #为共同第一作者

*通信作者 王雪, 男, 主任药师。Tel: (010)67872233-8203 E-mail: xue_wang@nifdc.org.cn

黄芝瑛, 男, 研究员, Tel: (020)39943092, E-mail: hzhiying@mail.sysu.edu.cn *为共同通信作者

and 0.01); the intracellular Ca^{2+} increased and mitochondrial damage were observed with the treatment of aloe-emodin (25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and rhein (50.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, $P < 0.05$ and 0.01). Comparing to control group, Emodin (25.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) induced an increased micronucleus rate (1.59% \pm 0.68%, $P < 0.01$) and significantly higher percentage tail DNA and Olive tail moment (respectively 10.155% \pm 2.17% and 0.510 \pm 0.06, $P < 0.05$ and 0.01) after 24 h; while the chrysophanol increased the micronucleus rate to 1.29% \pm 0.54% ($P < 0.01$) after 72 h. **Conclusion** The results on the cytotoxicities and genotoxicities of AQs are consistent with the literatures. In this study, a rapid screening model for both hepatotoxicity and genotoxicity was successfully established, which will help with the early screening during the drug development stage.

Key words: rhubarb anthraquinones; HepaRG cell; high throughput screening; hepatotoxicity; reactive oxygen species; mitochondrial damage; genotoxicity; DNA breakage; chromosome damage; micronucleus assay; single cell gel electrophoresis assay; emodin; aloe-emodin; chrysophanol; rhein

肝脏是代谢的主要器官, 药源性肝损伤 (Drug-induced liver injury, DILI) 引起的肝硬化或坏死等严重不良反应是药物研发失败或上市后撤回的主要原因^[1-3]。对药物引起的肝毒性评价是新药安全性评价的重要组合部分, 目前肝细胞毒性仍主要采用传统的评价技术和手段, 在灵敏度和特异性等方面均存在一定的缺陷。随着 3Rs (reduction、replacement、refinement) 原则的实施^[4], 体外替代研究逐渐成为热点。体外高通量研究与传统的试验方法比较, 具有相对客观性, 能快速准确地对受试物的毒性进行筛选, 节省人力并保障实验动物的福利。欧洲替代方法验证中心 (European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM) 等目前已建立了一些关于体外肝毒性的快速检测方法, 并成功应用于 1 000 多种化合物的快速筛选, 准确性较高。金家金^[5]利用高内涵筛选分析技术 (high content screening, HCS) 针对 HepaG2 细胞的细胞数目、DNA 含量、总谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 水平、ROS 活性氧簇 (reactive oxidative species, ROS) 水平及线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 等指标进行定量或定性检测, 经比较与 MTT 比色法结果基本一致。

遗传毒性是药物非临床安全性评价的重要组成部分, 与其他毒理学评价, 如生殖毒性和致癌性研究密切相关^[6], 是药物进入临床试验和新药上市的重要环节。肝脏是主要的代谢器官和药物毒性的主要靶器官之一, 也是遗传毒性评价首选的靶器官。人用药品注册技术规定国际协调会议 (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^[7]。

使用原代肝细胞进行肝毒性评价是肝毒性体外评价的金标准, 而原代细胞培养存在一定难度。

HepaRG 肝细胞来源于人肝祖细胞系, 是终末分化的肝细胞, 保留了许多原代肝细胞的特征, 如药物转运蛋白和关键代谢酶等。本研究创新性选用增殖分化能力高的 HepaRG 细胞作为研究模型, 以细胞内 ROS 水平、 Ca^{2+} 含量以及线粒体损伤为肝细胞毒性标志物, 并结合高内涵法胞质分裂阻断法微核试验 (cytokinesis-block micronucleus cytome assay, CBMN-cyt) 和高通量碱性彗星电泳试验比较不同化合物对肝细胞的毒性, 初步探究高通量体外 HepaRG 肝细胞毒性快速筛测方法的可行性, 有助于药物研发早期肝毒性筛选。

大黄蒽醌类单体 (anthraquinones, AQs) 是大黄药理作用的主要成分, 主要包括大黄素、芦荟大黄素、大黄酚、大黄酸和大黄素甲醚等, 具有潜在肝毒性、肾毒性和致癌性。连续 2 年 F344/N 大鼠经口给予大黄素致癌实验提示, 食物中掺入 (0.28 ~ 2.5) $\times 10^{-3}$ 大黄素对 F344/N 雄性大鼠无致癌性, 却可诱导雌性大鼠外耳道腺癌 (Zymbal's gland carcinoma) 发生率升高^[8]。研究提示, 大黄蒽醌类化合物因结构中含有蒽醌环, 可通过抑制 ATP 与拓扑异构酶 II (Topoisomerase II, Topo II) 结合诱导突变, 而吡啶环的结构可嵌入 DNA 链导致 DNA 断裂^[9]。本研究选用具有潜在遗传毒性的 AQs 进行研究, 与文献报道结果进行比较, 从而验证筛选平台的可靠性。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

芦荟大黄素 (批号 110795-201609)、大黄素 (批号 110756-200110)、大黄酸 (批号 110757-200206) 和大黄酚 (批号 11079-201520) 标准品, 均购自中国食品药品检定研究院, 纯度 98%; RPMI1640 培养基、0.25% 胰酶/1 mmol/L EDTA、DCFH-DA 染料、Mito Tracker® Red CMXRos (Invitrogen); 胎牛血清、I 型鼠尾胶原 (Gibco); EDTA-2Na (Sigma-Aldrich); 青霉素链霉素混合液、PBS 磷酸

盐缓冲液 (Hyclone); 无水乙酸、无水乙醇 (北京化工厂); DMSO (国药集团); 钙离子指示探针 Fluo4-AM (南京凯基生物); Trevigen Comet Assay Kit 彗星检测试剂盒 (Trevigen); Hoechst 33342 荧光探针 (Molecular Probes); SYBR Green I nuclei acid gel stain (Life Technologies); 细胞松弛素 B (Sigma-Aldrich)。

1.2 细胞

HepaRG 细胞 (代数 10 次以内), 来自中国医学科学院细胞库, 液氮保存。

1.3 主要仪器

SPECTRAMax-PLUS 型酶标仪 (Molecular Devices); 5810R 型离心机 (Eppendorf); DYCP31F 型电泳仪 (北京市六一仪器厂); Eclipse 80i 荧光显微镜 (Nikon); Komet 6.0 图像分析系统 (Andor Technology); IN Cell 2 000 高内涵分析仪 (GE Healthcare); Cell Insight CX5 高内涵成像系统 (Thermo Fisher Scientific)。

2 方法

2.1 高通量肝细胞毒性筛选

2.1.1 细胞接种及给药处理 HepaRG 细胞使用 RPMI 1640 完全培养基 (含 10% FBS) 培养。经 CCK-8 法摸索发现, 细胞以密度为 1×10^4 /mL 接种于 96 孔板时, 给药处理后细胞密度较为适宜, 可避免因接触抑制导致的大量细胞死亡。故正式实验选用 1×10^4 /mL 为接种密度, 每孔 100 μ L。细胞接种后在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 18~24 h, 待细胞生长良好并达到对数生长期更换不同浓度对照品 (0.5% DMSO) 及各浓度大黄素 (25.0、12.5、6.3、3.1、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1 μ g/mL)、芦荟大黄素 (25.0、12.5、6.3、3.1、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1 μ g/mL)、大黄酚 (50.0、25.0、12.5、6.3、3.1、1.6、0.8、0.4、0.2 μ g/mL) 和大黄酸 (50.0、25.0、12.5、6.3、3.1、1.6、0.8、0.4、0.2 μ g/mL) 处理 24 h, 阳性对照品 (H₂O₂, 25 μ mol/L) 处理 4 h, 每个浓度 8 个复孔。

2.1.2 肝毒性指标测定 1) 胞内 ROS 含量测定: 每孔加入 100 μ L 含 Hoechst 33342 (终质量浓度 2.5 μ g/mL) 和 DCFH-DA (终质量浓度 2.5 μ g/mL) 的培养基混合液; 2) 胞内钙离子 (Ca²⁺) 含量的测定: 每孔加入 100 μ L 含 Hoechst 33342 (终质量浓度 2.5 μ g/mL) 和 Fluo4-AM (终浓度 0.75 μ mol/L) 的培养基混合液; 3) 线粒体损伤水平的测定: 每孔加入 100 μ L 含 Hoechst 33342 (终质量浓度 2.5 μ g/mL)

和 MitoTracker[®] Red CMX Ros (终浓度 100 nmol/L) 的培养基混合液。移除各受试物的培养基, 并使用 0.1 mL 新鲜培养基冲洗细胞 2 次, 分别加入上述染料与细胞在 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 30 min。移除含染料的培养基, 使用 PBS 100 μ L 清洗 2 次, 每孔加入 50 μ L 含 5% 甲醇的 PBS 溶液固定。染色后的样本使用 IN Cell 2 000 型高内涵系统进行检测, 计算给药组与对照组平均荧光强度比值。

2.2 高通量微核试验

2.2.1 细胞接种及给药处理 微核实验接种前 96 孔板需每孔加 50 μ L 鼠尾胶原, 轻拍使鼠尾胶原平铺, 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 恒温培养箱中放置过夜, 每孔各加 100 μ L PBS 冲洗, 重复 2 次。细胞以 1×10^4 /mL 的密度接种于 96 孔板, 每孔 100 μ L。细胞接种后在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 18~24 h, 待细胞生长良好并达到对数生长期更换不同浓度对照品 (0.5% DMSO) 及各浓度大黄素 (25.0、12.5、6.3、3.1、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1 μ g/mL)、芦荟大黄素 (25.0、12.5、6.3、3.1、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1 μ g/mL)、大黄酚 (50.0、25.0、12.5、6.3、3.1、1.6、0.8、0.4、0.2 μ g/mL) 和大黄酸 (50.0、25.0、12.5、6.3、3.1、1.6、0.8、0.4、0.2 μ g/mL) 处理 24 h, 每个浓度 3 个复孔。移除各受试物的培养基, 使用 0.1 mL 新鲜培养基冲洗细胞, 之后更换含有细胞松弛素 B (3 μ g/mL) 的培养液 (100 μ L/孔), 继续培养约 1.5 个细胞倍增时间 (36 h)。

2.2.2 染色、拍照及分析 培养结束后移除含细胞松弛素 C 的培养基, 使用 100 μ L 新鲜培养基冲洗细胞并移除液体。每孔加入 100 μ L 含 Hoechst 33342 (终质量浓度 5 μ g/mL) 的培养基混合液, 在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 条件下培养 30 min。之后移除含染料的培养基, 使用 PBS 100 μ L 清洗 2 次, 每孔加入 50 μ L 含 5% 甲醇的 PBS 溶液固定, 并使用 Cell Insight CX5 高内涵成像系统型高内涵系统进行检测。

2.3 高通量彗星试验

2.3.1 单细胞悬液制备 调整细胞密度为 1×10^5 /mL, 取 6 孔细胞培养板 (设 3 个复孔), 每孔添加 4 mL 培养液/细胞液混合液。轻轻敲打混匀, 置 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱培养 18~24 h。细胞达对数生长期时, 更换不同浓度对照品 (0.5% DMSO)、阳性对照品 [分别为丝裂霉素 C (Mitomycin C, MMC) 1 μ g/mL、甲磺酸乙酯 (Ethyl Methanesulfonate, EMS) 200 μ g/mL、H₂O₂ 25 μ mol/L 和环磷酸胺

(Cyclophosphamide, CP) 100 $\mu\text{g/mL}$]及各质量浓度大黄素(6.25、12.5、25.0 $\mu\text{g/mL}$)、芦荟大黄素(6.25、12.5、25.0 $\mu\text{g/mL}$)、大黄酚(12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$)和大黄酸(12.5、25.0、50.0 $\mu\text{g/mL}$)分别处理 24 h, 收获细胞并将密度调整为 $2 \times 10^5/\text{mL}$ 。

2.3.2 制片、裂解、解旋及电泳 根据 Trevigen Comet Assay Kit 彗星检测试剂盒说明准备裂解液、LM Agarose 等试剂, 放置适宜温度保存, 1.5 mL 试管 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴预热, 每管预先加入 300 μL Comet LM Agarose (Trevigen Comet Assay Kit 彗星检测试剂盒中琼脂糖凝胶制备试剂)。每孔取单细胞悬液 30 μL , 用移液头与预热的 Comet LM Agarose 迅速混合均匀 1~2 次后铺片, 保证细胞均匀分布于每孔, 每个样本平行 2 孔。铺片结束后迅速将玻片置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 、避光冷却 30 min。将玻片置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 预冷的裂解液中避光, 4 $^{\circ}\text{C}$ 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 V/cm, 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。

2.3.3 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 $^{\circ}\text{C}$ 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 个彗星细胞的尾 DNA 含量和 Olive 尾距 (Olive tail moment, OTM) 的中位数, 计算每个剂量组的中位数的平均值及标准差。

2.4 数据处理

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 GraphPad Prism 5 软件, 对 3 组及以上数据采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 对 HepaRG 细胞毒性筛查

细胞总体 ROS 水平检测结果显示 (图 1), 与对照 (100.00 ± 9.57) % 比较, 阳性对照 H_2O_2 组的 ROS 含量 (167.93 ± 21.83) % 显著增加 ($P < 0.01$),

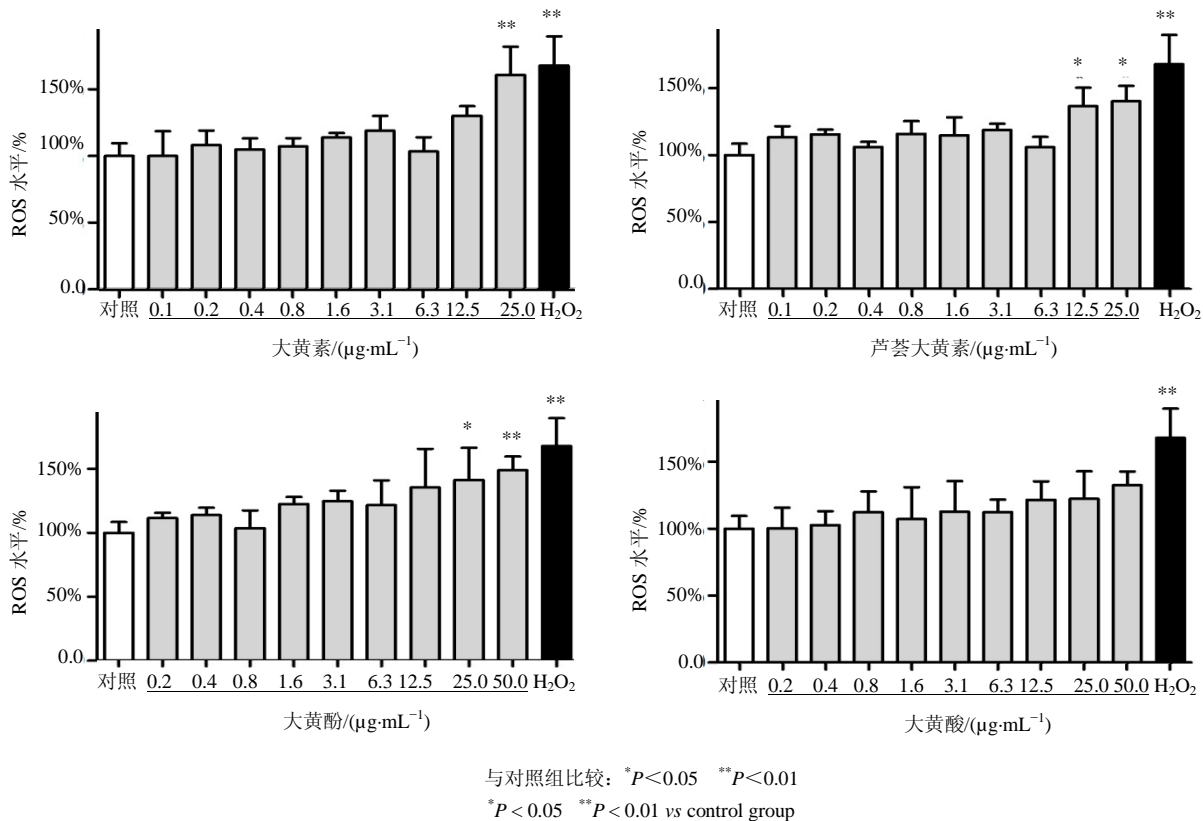


图 1 AQs 对 HepaRG 细胞 ROS 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
Fig. 1 Effects of AQs on ROS level of HepaRG cells ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

提示该研究体系成立；经给药处理 24 h 后，大黄素 25.0 μg/mL 组 ROS 水平为 (160.85 ± 20.99) %、芦荟大黄素 12.5 和 25.0 μg/mL 组分别为 (136.55 ± 13.85) % 和 (143.25 ± 11.45) %、大黄酚 50 和 25.0 μg/mL 组分别为 (149.08 ± 10.74) % 和 (141.5 ± 25.00) %，与对照组比较，显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)，且与剂量正相关。大黄酸给药剂量范围内未见对 HepaRG 细胞的 ROS 水平产生影响。

胞质中 Ca^{2+} 浓度检测结果显示 (图 2)，与对照

组 (100.00 ± 8.10) % 比较，阳性对照组 H_2O_2 的 Ca^{2+} 含量 (140.71 ± 16.48) % 显著增加 ($P < 0.01$)，提示该实验系统成立；经给药处理 24 h 后，芦荟大黄素 12.5 和 25.0 μg/mL 组 Ca^{2+} 含量为 (125.10 ± 7.28) % 和 (130.00 ± 3.13) %、大黄酸 50.0 μg/mL 组为 (146.40 ± 6.48) %，与对照组比较显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。大黄素和大黄酚在给药剂量范围内未见 Ca^{2+} 含量改变。此外，所有受试的 AQs 组的胞质中 Ca^{2+} 含量均与给药浓度呈正相关。

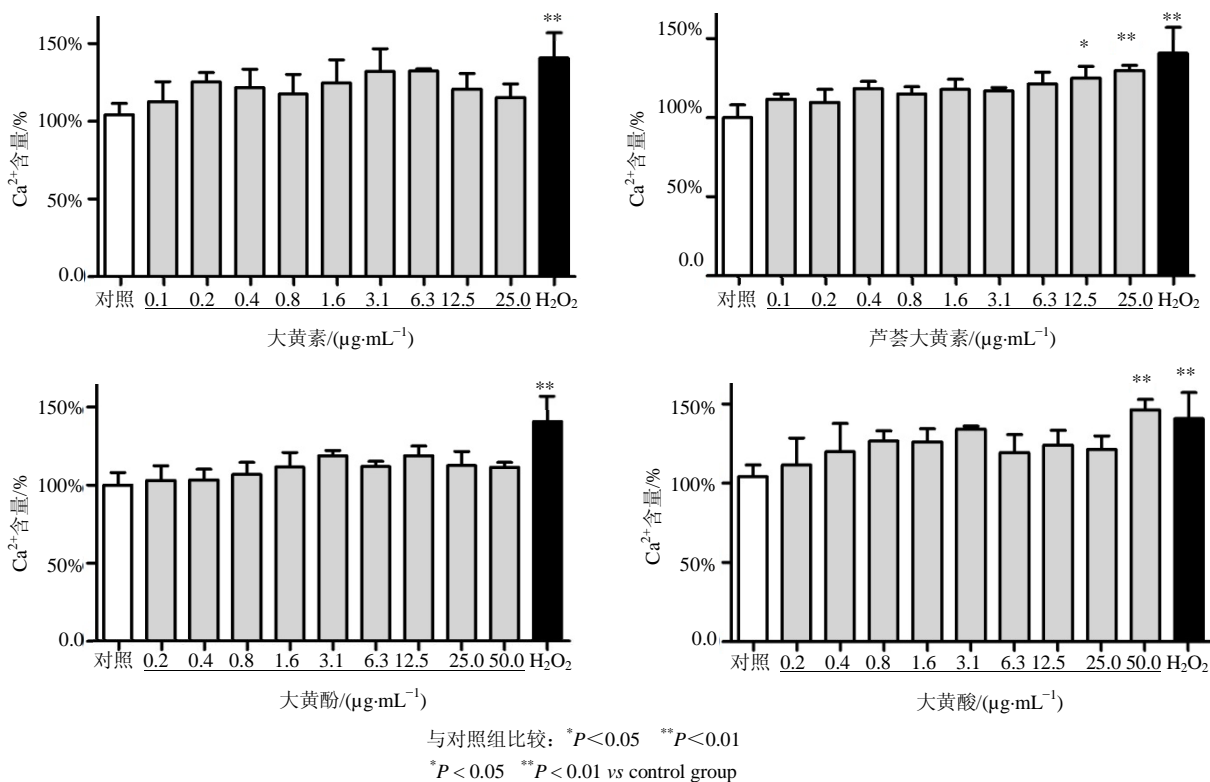


图 2 AQs 物胞内钙离子含量检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effects of AQs on the intracellular Ca^{2+} content of HepaRG cells ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

线粒体功能正常时，经 MitoTracker® Red CMX Ros 活体染色后进入线粒体的染料量较多；反之当线粒体出现损伤时，进入线粒体的荧光染料量降低，检测的荧光强度也相应降低。线粒体损伤水平检测结果 (图 3) 显示，与对照组荧光强度 (100.00 ± 6.35) % 比较，阳性对照 H_2O_2 组为 (78.13 ± 9.45) %，细胞中的染料含量显著减少 ($P < 0.01$)，提示损伤模型的建立；大黄素 25.0 μg/mL 组染料含量为 (84.33 ± 5.03) %、芦荟大黄素 25.0 μg/mL 组为 (85.35 ± 2.34) %、大黄酚 50.0 和 25.0 μg/mL 组为 (85.33 ± 4.38) % 和 (89.45 ± 1.30) %、大黄酸 50.0 和 25.0 μg/mL 组为 (88.03 ± 4.14) % 和 (89.03 ± 2.45) %，与对照

组比较显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。进入线粒体的染料含量与给药浓度呈反比。

3.2 对 HepaRG 细胞微核率的影响

双核细胞微核图例见图 4。所有组别的细胞在给药 24 h 后，细胞及细胞核形态均正常；而给药 72 h 后，除大黄酚组外，其余最高浓度组均因细胞大量死亡而无法获得足够细胞用于分析。与对照组 [24 和 72 h 处理组微核率分别为 (0.21 ± 0.07) % 和 (0.15 ± 0.11) %] 比较，给药 24 h 后大黄素 (25.0 μg/mL) 可诱导微核率显著性升高 [(1.59 ± 0.68) %， $P < 0.01$]；给药 72 h 后大黄酚 (50.0 μg/mL) 可诱导微核率显著性升高 [(1.29 ± 0.54) %， $P < 0.01$]。见图 5。

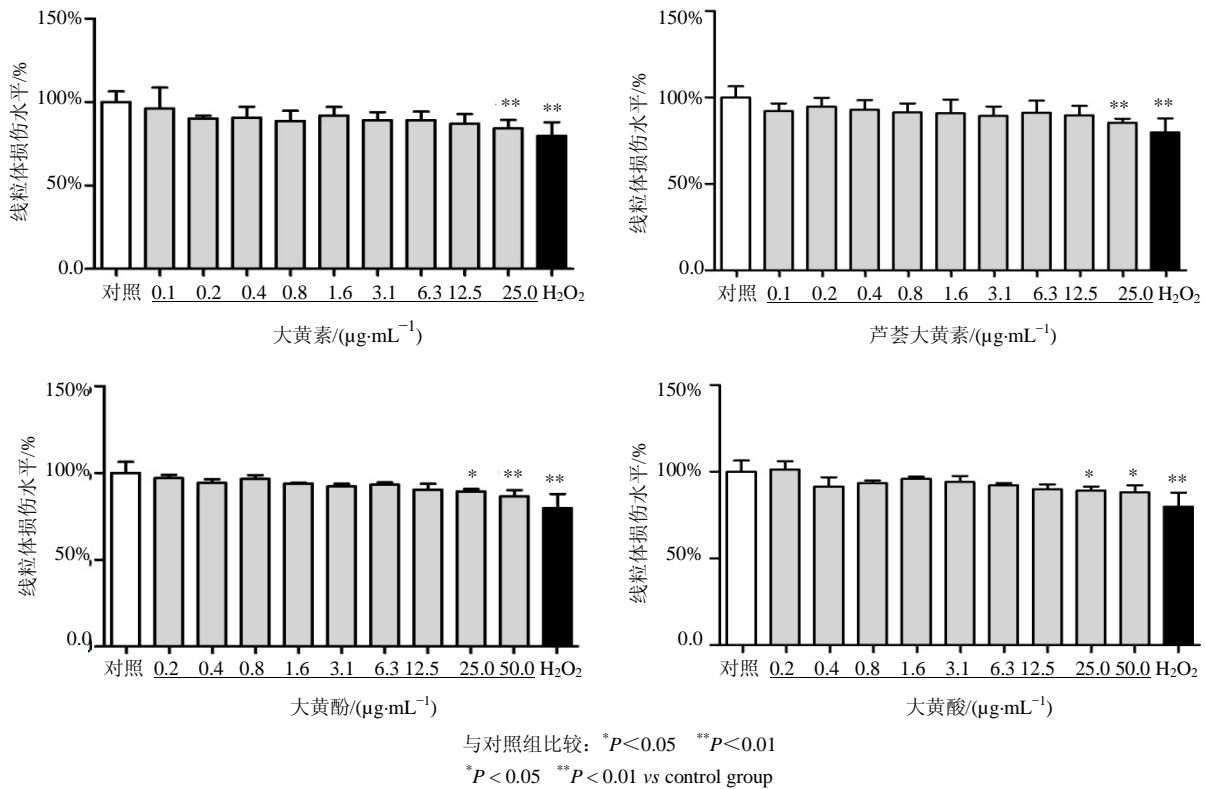
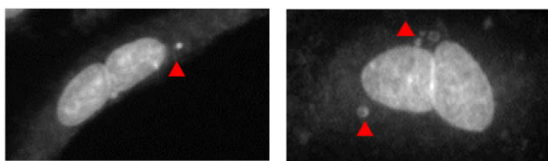


图3 AQs 细胞线粒体损伤水平检测结果 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Effects of anthraquinones on the mitochondrial injury of HepaRG cells ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



“△”为双核细胞微核
“△” for binucleated cells micronucleus

图4 HepaRG 细胞微核图例

Fig. 4 Representative image of micronucleus observed in HepaRG cells

3.3 对 HepaRG 细胞 DNA 断裂的影响

碱性彗星试验通过对电泳后的细胞图像进行分析,判断化合物是否诱导细胞发生 DNA 断裂,其中尾 DNA 含量和 OTM 是最常用的评价指标。如表 1 显示,经过受试物处理 24 h 后,与对照组比较,染色体断裂剂甲磺酸乙酯的尾 DNA 含量达 $(15.73 \pm 1.33)\%$ 、OTM 为 1.93 ± 0.57 ,显著升高 ($P < 0.01$);非整倍体诱导剂丝裂霉素 C 的尾 DNA 含量为 $(12.45 \pm 2.01)\%$ 、OTM 为 0.70 ± 0.0 ,显著升高

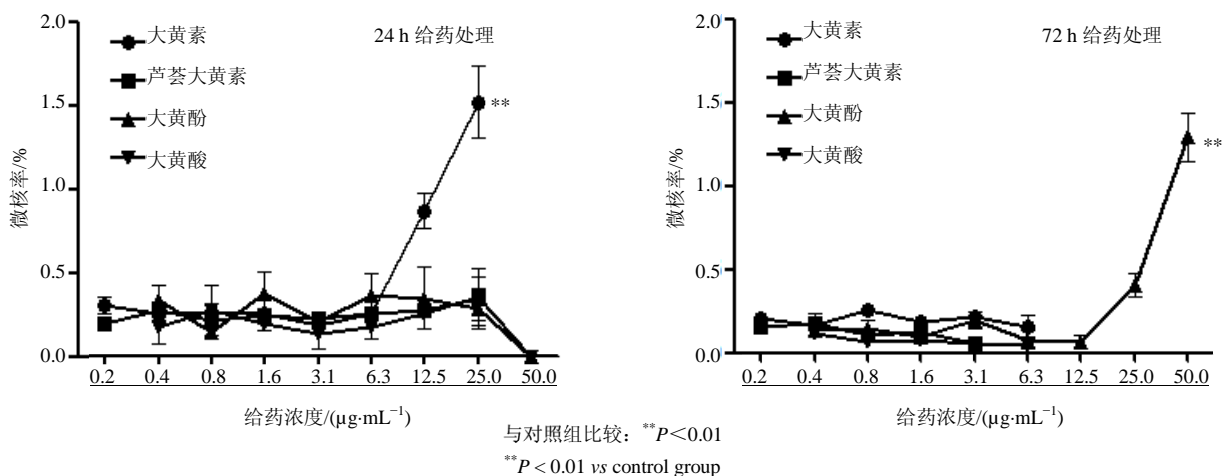


图5 大黄蒽醌类单体 HepaRG 细胞给药 24、72 h 的微核率 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 5 Micronucleus frequencies induced by a 24 and 72 h treatment with AQs ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

($P < 0.05, 0.01$), 提示该实验系统成立。大黄素(25.0 $\mu\text{g/mL}$) 给药 24 h 后, 尾 DNA 含量百分率达 (10.16 \pm 2.17) %、OTM 为 0.51 \pm 0.06, 与对照组比较显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 且彗星拖尾明显 (图 6)。其余受试物的分析结果与对照组比较无统计学差异。

4 讨论

研究药物的肝毒性的备选细胞系包括 HepaG2 细胞系、L02 细胞系、HepaRG 细胞系等。HepaG2 细胞系最初源于一个高加索男性的肝癌组织^[10], 常用于体外药源性肝损伤的药物筛选过程; HepaRG 细胞增殖能力较强, 具有类似肝脏祖细胞的双向分化能力, 可以分化为肝细胞和胆管细胞^[11], 它与表达功能蛋白能力较弱的人肝癌细胞系如 HepG2 细胞系不同, HepaRG 细胞表达各种 I 相代谢酶 (CYP1A2、2B6、2C9、2E1、3A4); 核受体, 如组成性雄甾烷受体 (constitutive androstane receptor, CAR) 和孕烷 X 受体 (pregnane X receptor, PXR);

表 1 大黄蒽醌类单体 HepaRG 细胞彗星试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 1 Results of AQs in HepaRG cell comet assay ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	尾 DNA 含量/%	OTM
空白	—	0.403 \pm 0.03	0.023 \pm 0.03
对照	—	1.408 \pm 0.17	0.068 \pm 0.01
甲磺酸乙酯	200	15.725 \pm 1.33**	1.933 \pm 0.57**
丝裂霉素 C	1	12.453 \pm 2.01**	0.698 \pm 0.09*
大黄素	6.25	2.275 \pm 0.39	0.125 \pm 0.16
	25.0	10.155 \pm 2.17**	0.510 \pm 0.06*
芦荟大黄素	6.25	0.373 \pm 0.03	0.015 \pm 0.03
	25.0	1.633 \pm 0.26	0.123 \pm 0.34
大黄酚	12.5	1.100 \pm 0.06	0.075 \pm 0.01
	50.0	1.710 \pm 0.58	0.118 \pm 0.06
大黄酸	12.5	0.690 \pm 0.01	0.045 \pm 0.01
	50.0	1.545 \pm 0.22	0.113 \pm 0.17

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group

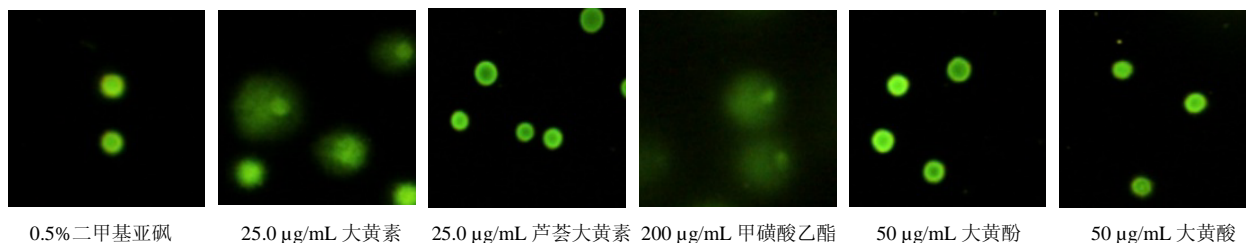


图 6 彗星电泳试验结果示意图

Fig. 6 Representative images of comet assay

II 相代谢酶如尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 (UDP-glucuronosyltransferase, UGT) 以及 III 相转运体 MRP、有机阴离子转运多肽 (organic anion-transporting polypeptide, OATP)、有机阳离子转运体 (organic cation transporter, OCT) 等, 在功能蛋白表达上类似于人原代肝细胞, 其特性满足了体外药物代谢学研究和有毒代谢产物筛选实验的要求。而且 HepaRG 细胞可维持功能蛋白表达和细胞活力达 1 个月, 因此 HepaRG 细胞系能较好地用于药物性肝损伤的体外筛选过程^[12-13]。一项使用不同的细胞系对 14 种具有明确肝损伤作用药物的预测能力的研究提示^[14], HepaRG 具有较高灵敏度 (相对于 L02、HepG2 和 hiHeps 细胞系) 检测肝毒性 (约登指数达到 71.4%, 而 HepG2 和 hiHeps 细胞系均只有 50%) 的优势。此外, 传统的体外哺乳动物细

胞遗传毒性研究中, 需要添加微粒体 S9 对某些代谢活化后产生具有遗传毒性的物质进行体外研究, S9 本身有一定细胞毒性, 因此在传统的需添加 S9 进行活化的实验系统中, 给药处理时间通常不超过 6 h, 而用肝细胞则可打破了这一局限性。因此本研究采用 HepaRG 细胞系来评价肝细胞毒性与遗传毒性, 为药物的体外肝毒性筛选提供一定参考。

在本研究中, 肝细胞毒性筛查结果提示, AQs 可不同程度地对肝细胞 HepaRG 产生毒性, 氧化应激损伤可能是 AQs 致潜在肝细胞毒性的重要分子机制之一。有文献报道^[15], 芦荟大黄素 (60 $\mu\text{mol/L}$) 可通过激活 caspase8 的线粒体旁通路诱导鼻咽癌细胞的凋亡, 同时引起 ROS 含量升高以及胞质内 Ca^{2+} 的释放增多; 大黄素 (30 $\mu\text{mol/L}$) 给药 72 h 后能引起正常人肝细胞系 L02 凋亡, 细胞形态皱缩成圆形^[16],

而空白组则呈现高分裂指数；大黄酚对 HepaRG 细胞的毒性主要表现在诱导 ROS 的生成，一定程度地致线粒体损伤。本研究结果与文献报道基本相符。虽然现有文献尚无明确证据提示大黄素对人体有直接的致癌性，但诸多研究表明，大黄素在遗传毒性试验中显示阳性结果。如 Ames 试验提示^[17]，大黄素在 3 株鼠伤寒沙门氏菌中(TA97、TA98 和 TA100)均显示阳性结果并与剂量成正相关，可能诱导基因突变，彗星试验研究结果表明大黄素能引起 DNA 损伤。Wamer 等^[18]通过彗星试验发现，光活化的大黄素能加重 Fe²⁺引起的 DNA 断裂及更明显的 DNA 的损伤。Chen 等^[19]研究显示芦荟大黄素(100 μmol/L)、大黄酸(50 μmol/L)、大黄素(40 μmol/L)均可诱发 SCC-4 人舌癌细胞 DNA 损伤，彗星电泳拖尾明显，且存在剂量相关性。Nesslany 等^[20]研究发现添加 S9 活化情况下，芦荟大黄素在 Ames 试验(TA1537、TA98 和 TA100)中可诱导回复性突变菌落数显著增加，在体外 TK6 人淋巴母细胞法微核试验(芦荟大黄素浓度 3.12~25 μg/mL)中也呈阳性结果；体内彗星试验结果则提示，芦荟大黄素可诱导肾脏和结肠细胞的彗星尾距数值显著升高，对肝脏细胞无明显影响，提示芦荟大黄素或者其代谢产物可能在代谢或者排泄过程中引起遗传毒性。本研究的肝细胞遗传毒性试验结果发现，大黄素及大黄酚可诱发 HepaRG 微核率升高，而大黄素有升高 HepaRG 细胞尾 DNA 含量及 OTM 的作用。上述结果提示，利用体外培养的肝细胞系对化合物的细胞毒性及遗传毒性进行早期综合筛选是可行的，实验体系的可靠性及大黄蒽醌类化合物的毒性机制有待进一步深入验证及探索。

早期快速高通量筛选是遗传毒性研究的发展趋势。建立新型体外毒性检测方法可通过多项生物标志物和毒性指标，来确定某类药物(化学品)的毒性预警信号(如氧化应激效应、线粒体损伤、染色体损伤或者 DNA 断裂)，从而对药物(化学品)的毒性机制进行综合分析。除高内涵法外，流式细胞计数也是毒理学试验中常用的高通量优化方法。如，Bryce 等^[21]利用流式细胞仪区分含微核细胞与坏死凋亡的细胞，从而对细胞毒性和遗传毒性进行评价，其结果与人工镜检结果一致性较好。然而，尽管叠氮溴乙锭(Ethidium Monoazide, EMA)可将凋亡、坏死的细胞与含微核的细胞区分，但 EMA 并不能很好地排除来自早调细胞的染色质^[22]，也无

法区分含微核的双核、三核和多核细胞，或者是含多个微核的细胞^[23]，从而导致流式细胞仪检测结果阳性率偏高。本研究兼顾肝细胞毒性和遗传毒性，综合不依赖核型的微核试验和彗星试验两项遗传毒性检测方法，并借助当前毒理学热门的高内涵检测方法建立快速筛选平台。该平台通过对多个肝细胞毒性指标和遗传毒性生物标志物进行荧光标定，从而实现高通量快速分析。其结果也为体内实验中毒性反应结果溯源和推断药物毒理作用机制，提供了有力的理论支持。除结构类似的化学药物筛选外，本筛选平台在中药有效/毒性成分的快速筛选(中药肝毒性久居中药不良反应之首)也将发挥用武之地，也可应用于食品添加剂(如某些食用色素、膨化剂、甜味剂等可导致肝毒性和遗传毒性)以及化妆品(蓄积性肝毒性为化妆品的一项重要毒性终点)等诸多安全性检测领域中。除肝毒性外，肾毒性、神经毒性、生殖细胞毒性也是当前研究的热门领域，与之相关的体外筛选模型的探索正在国内兴起，可以肝细胞毒性与遗传毒性高通量筛选方法的建立为基础，拓展应用到其他体外细胞毒性模型的建立。

志谢：赛默飞公司(Thermo Fisher Scientific, 北京)刘育林和鲁扬对高内涵微核分析方法的技术支持。

参考文献

- [1] Katarey D, Verma S. Drug-induced liver injury [J]. Clin Med, 2016, 16(6): 104-109.
- [2] Ghabril M, Bjornsson C E. Drug-induced liver injury: a clinical update [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2010, 26(3): 222-226.
- [3] Czepielewski R S, Jaeger N, Marques P E, et al. GRPR antagonist protects from drug-induced liver injury by impairing neutrophil chemotaxis and motility [J]. Eur J Immunol, 2017, 47(4): 646-657.
- [4] Chantra Eskes, Maurice Whelan. Validation of Alternative Methods for Toxicity Testing [M]. Amercia: Springer International Publishing, 2016.
- [5] 金家金. 诃子肝毒性研究及高内涵肝毒性筛选方法的初探 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2015.
- [6] Karlsson H, Holgersson A, Moller L. Mechanisms related to the genotoxicity of particles in the subway and from other sources [J]. Chem Res Toxicol, 2008, 21(3): 726-731.
- [7] ICH S2 (R1). Guidance on genotoxicity testing and data

- interpretation for pharmaceuticals intended for human use (step 4) [EB/OL]. (2008-03-06) [2017-10-27] http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products_Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf
- [8] National Toxicology Program. NTP toxicology and carcinogenesis studies of EMODIN (CAS NO. 518-82-1) feed studies in F344/N rats and B6C3F1 Mice [R]. National Toxicology Program Technical Report. 2001, 493: 1-278.
- [9] Li Y, Luan Y, Qi X, et al. Emodin triggers DNA double-strand breaks by stabilizing topoisomerase II-DNA cleavage complexes and by inhibiting ATP hydrolysis of topoisomerase II [J]. *Toxicol Sci*, 2010, 118(2): 435-443.
- [10] Knowles B, Howe C, Aden D. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen [J]. *Science*, 1980, 209(4455): 497-499.
- [11] Cerec V, Glaize D, Garnier D, et al. Transdifferentiation of hepatocyte-like cells from the human hepatoma HepaRG cell line through bipotent progenitor [J]. *Hepatology*, 2007, 45 (4): 957-967.
- [12] Guillouzo A, Corlu A, Aninat C, et al. The human hepatoma HepaRG cells: a highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics [J]. *Chem Biol Interact*, 2007, 168(1): 66-73.
- [13] Lubberstedt M, Muller-vieira U, Mayer M, et al. HepaRG human hepatic cell line utility as a surrogate for primary human hepatocytes in drug metabolism assessment in vitro [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 2011, 63(1): 59-68.
- [14] 吴宇. 药物性肝损伤体外筛选模型和何首乌致肝损伤的初步研究 [D]. 北京: 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所, 2016.
- [15] Lin M L, Lu Y C, Chung J G, et al. Aloe-emodin induces apoptosis of human nasopharyngeal carcinoma cells via caspase-8-mediated activation of the mitochondrial death pathway [J]. 2009, 291(1): 46-58.
- [16] Li C L, Ma J, Zheng L, et al. Determination of emodin in L-02 cells and cell culture media with liquid chromatography-mass spectrometry: Application to a cellular toxicokinetic study [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 71(12): 71-78.
- [17] Sevcovicova A, Bodnarova K, Loderer D, et al. Dual activities of emodin--DNA protectivity vs mutagenicity [J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2014, 35(Suppl 2): 149-154.
- [18] Wamer W G, Vath P, Falvey D E. *In vitro* studies on the photo-biological properties of aloe emodin and aloin A [J]. *Free Radic Biol Med*, 2003, 34(2): 233-242.
- [19] Chen Y Y, Chiang S Y, Lin J G, et al. Emodin, aloe-emodin and rhein induced DNA damage and inhibited DNA repair gene expression in SCC-4 human tongue cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2010, 30(3): 945-951.
- [20] Nesslany F, Simar-Meintières S, Ficheux H, et al. Aloe-emodin-induced DNA fragmentation in the mouse *in vivo* comet assay [J]. *Mutat Res*, 2009, 678(1): 13-19.
- [21] Bryce S M, Bemis J C, Avlasevich S L, et al. *In vitro* micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity [J]. *Mutat Res*, 2007, 630(1-2): 78-91.
- [22] Avlasevich S L, Bryce S M, Cairns S E, et al. *In vitro* micronucleus scoring by flow cytometry: differential staining of micronuclei versus apoptotic and necrotic chromatin enhances assay reliability [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2006, 47(1): 56-66.
- [23] Verma J R, Rees B J, Wilde E C, et al. Evaluation of the automated MicroFlow® and Metafer™ platforms for high-throughput micronucleus scoring and dose response analysis in human lymphoblastoid TK6 cells [J]. *Arch Toxicol*, 2017, 91(7): 2689-2698.