

Ames 波动试验和 GADD45a-GFP GreenScreen 两种快速筛选方法评价大黄素和芫花素的遗传毒性

文海若, 宋捷, 刘倩, 王亚楠, 耿兴超, 李波, 王雪*, 胡燕平*

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

摘要: **目的** 使用 Ames 波动试验和 GADD45a-GFP GreenScreen 两种快速筛选方法, 对有毒中药芫花和了哥王的主要单体成分大黄素和芫花素的遗传毒性进行评价。 **方法** (1) Ames 波动试验: 在非代谢活化 (-S9) 和代谢活化 (+S9) 条件下使用鼠伤寒沙门菌 TA100 开展基于 96 孔液态培养法的细菌回复性突变试验, 大黄素和芫花素 (终质量浓度范围均为 0.1~10 $\mu\text{g/mL}$) 与菌液充分混合后在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养 72 h。 (2) GADD45a GreenScreen 高通量筛选试验: 在非代谢活化 (-S9) 和代谢活化条件下 (+S9) 将表达 GADD45a 基因的 TK 细胞 (GenM-T01 和 GenM-C01) 与大黄素 (0.13~32.0 $\mu\text{g/mL}$) 和芫花素 (0.07~16.0 $\mu\text{g/mL}$) 分别作用 48 h (-S9) 和 3 h (+S9), 之后通过酶标仪和流式细胞仪检测绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescent protein, EGFP) 的荧光强度。 **结果** 有无代谢活化条件下, 10 $\mu\text{g/mL}$ 大黄素均可诱导 TA100 的回复性突变率显著性升高 ($P < 0.05$ 、 $P < 0.001$); 代谢活化条件下, 10 $\mu\text{g/mL}$ 芫花素可诱导 TA100 的回复性突变率显著性升高 ($P < 0.001$), 16.0 $\mu\text{g/mL}$ 芫花素诱导 TK6 细胞表达的 GADD45a-EGFP 荧光强度也超过了遗传毒性阈值 (1.3 倍)。 **结论** 当前研究提示大黄素和芫花素为可疑遗传毒性, 需要开展深入研究明确其遗传毒性及机制。 Ames 波动试验和 GADD45a GreenScreen 是良好的高通量筛选备选试验, 可极大优化浩繁的药物的毒性筛选工作, 尤其适宜诸如中药等成分和配伍复杂的药物。

关键词: 遗传毒性; 高通量; 波动 Ames 试验; GADD45a GreenScreen 试验; 大黄素; 芫花素

中图分类号: R994 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 05 - 0734 - 08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.05.004

Genotoxicity Evaluation of Chinese Herbal Medicinal Ingredients Emodin and Genkwanin Using Rapid Screening Assays

WEN Hairuo, SONG Jie, LIU Qian, WANG Yanan, GENG Xingchao, LI Bo, WANG Xue, HU Yanping

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

Abstract: Objective To evaluate the genotoxicity of emodin and genkwanin, the main monomer components of the poisonous traditional Chinese medicines Daphne genkwa and Wikstroemia indica, using two rapid screening methods fluctuation Ames test and GADD45a GreenScreen assay. **Methods** (1) Fluctuation Ames test: A bacterial reversion test based on the 96-well liquid culture method was performed using *Salmonella typhimurium* TA100 under non-metabolic activation (-S9) and metabolic activation (+S9) conditions. Emodin and genkwanin (final concentrations ranged from 0.1 to 10 $\mu\text{g/mL}$) were well-mixed with the bacterial broth and incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 72 h. (2) GADD45a GreenScreen assay: TK cells expressing GADD45a gene (GenM-T01 and GenM-C01) were treated with emodin (0.13 to 32.0 $\mu\text{g/mL}$) and genkwanin (0.07 to 16.0 $\mu\text{g/mL}$) for 48 h (-S9) and 3 h (+S9) respectively. The fluorescence intensity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) was detected by microplate reader and flow cytometry. **Results** In the presence and absence of metabolic activation, the averaged mutated wells induced by 10 $\mu\text{g/mL}$ emodin to TA100 were significantly increase than negative control groups ($P < 0.05$, $P < 0.001$); in the presence of metabolic activation, 10 $\mu\text{g/mL}$ genkwanin also markedly elevated the averaged counts of wells with mutated bacteria ($P < 0.001$), 16.0 $\mu\text{g/mL}$ of genkwanin triggered fluorescence intensity of GADD45a-EGFP expressed by TK6 cells also exceeded the genotoxicity threshold (1.3 folds).

收稿日期: 2018-02-28

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项 (2015ZX09501004-002); 《中国药典》药品标准提高

第一作者: 文海若, 女, 博士, 副研究员, 主要从事药物遗传毒性评价。Tel: (010) 67876252 E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

*通信作者: 胡燕平, 女, 副主任药师, 研究方向为遗传毒性评价。Tel: (010) 67872233-8223 E-mail: huer64@126.com

王雪, 男, 主任药师, 研究方向为遗传毒性评价。Tel: (010) 67872233-8203 E-mail: xue_wang@nifdc.org.cn

Conclusion Both emodin and genkwanin demonstrated as suspicious positive in current genotoxicity study, and investigations on determine their genotoxicity and underlying mechanisms should be followed. The fluctuation Ames test and GADD45a GreenScreen assay are valuable high throughput screening alternatives that could greatly optimize the heavy toxicity screening of drugs, especially for the drugs with complicated compositions and compatibilities, such as the traditional Chinese medicines.

Key words: genotoxicity; high throughput; fluctuation Ames test; GADD45a GreenScreen assay; emodin; genkwanin

药物遗传毒性评价的主要目的是检出存在潜在致遗传物质断裂、致突变和/或致癌作用的化合物^[1], 从而对药物的潜在致癌性进行预测。西方医学中使用的绝大多数化学药物成分明确, 除抗肿瘤药物外, 具有潜在遗传毒性的药物种类并不多见。而中药和天然药物的成分尚不明确, 在我国常作为调节机体状态的保健食品或治疗慢性疾病被人们长期服用。近年来, 中药的遗传毒性越来越受到人们的重视。如含有马兜铃酸的马兜铃属植物(含马兜铃、寻风骨、天仙藤和朱砂莲等)作为中药材曾广泛用于关节炎、痛风和炎症的治疗^[2]。而自1983年起, 人们逐渐发现其具有强致突变性和致癌性: 马兜铃酸在 Ames 实验^[3]、果蝇显性致死试验^[4]、染色体畸变实验^[5]、彗星实验^[6]中的结果均为阳性, 其遗传毒理机制也在逐步探索中。现明确存在遗传毒性的中药成分还包括槟榔、羌活、汉防己甲素、细辛等, 然而相当多中药成分和中药混合物是否有遗传毒性尚不清楚。充分了解中药成分毒性, 可有效避免药物在上市后出现严重中毒事故。

在临床前安全性评价阶段充分评价中药的遗传毒性是当前亟需加强的环节。中药处方组成复杂, 经过不同的中药炮制方法或配伍, 其遗传毒性可出现显著性差异。如有研究提示大黄经清蒸和醋蒸处理后 Ames 实验和彗星实验结果均降为阴性, 而清炒和醋炒后对大黄的减毒效果不明显^[7]。因此对中药组方的具体成分进行确认以及对其配伍方式的筛选十分重要。然而传统的遗传毒理学实验主要依靠人工观察计数、消耗大量试剂和细胞或菌株且耗时较长, 开展如此大量的筛选工作较为困难, 并不适用于中药遗传毒性的早期快速筛选。结合微孔法、分子生物和荧光成像等技术, 应用高通量而便捷的遗传毒性筛选方法对中药进行筛选, 可以在保证结果准确率的同时提高工作效率。

课题组前期发现芫花和了哥王均可能具有促癌作用^[8]。本研究联合 Ames 波动试验和 GADD45a-GFP GreenScreen 两种高通量筛选方法, 对含黄酮类有毒中药芫花和了哥王的主要单体成分大黄素和芫花素的遗传毒性进行评价。

1 材料

1.1 药物及主要试剂

大黄素标准品(批号 110756-200110, 纯度 98%) 和芫花素标准品(批号 111899-201202, 纯度 95%) 购自中国食品药品检定研究院; RPMI 1640 培养基和胎牛血清(FBS)生产厂家为 Gibco; 大鼠肝 S9 混合液购自北京康瑞杰科技有限公司(由苯巴比妥钠和 β -萘黄酮联合诱导大鼠肝脏制成); 其他试剂 DMSO、氨苄青霉素; 葡萄糖; 组氨酸; 色氨酸; 生物素; $\text{MgSO}_4 \cdot (7\text{H}_2\text{O})$; 柠檬酸钠 $\cdot (2\text{H}_2\text{O})$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot (3\text{H}_2\text{O})$ 、 KH_2PO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、NADP、G-6-P、KCl、 MgCl_2 、PBS、溴麝香草酚蓝、遗传毒性阳性剂 2-(2-呋喃基)-3-(5-硝基-2-呋喃基)丙烯酰胺(2-2-Furyl-3-5-Nitro-2-Furylacrylamide, AF-2)、2-氨基蒽(2-Aminoanthracene, 2-AA)和甲基磺酸甲酯(Methyl methanesulfonate, MMS)等均购自 Sigma-Aldrich。

1.2 菌株及细胞

Ames 波动试验选用鼠伤寒沙门菌组氨酸营养缺陷型(his-)菌株(*S. typhimurium*) TA100。试验所用菌株引自日本(株)生物科学中心(JBS INC), 经本实验室筛选、扩增, 特性鉴定(存在营养缺陷型、脂多糖屏障缺陷、紫外线修复缺陷、抗氨苄青霉素等特性)合格者置-80℃超低温保存。

将 GADD45a 基因的启动子与绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)融合后, 利用电穿孔法转入 p53 基因野生型人淋巴母细胞系 TK6 (GenM-T01), 同时构建一个含 EGFP 基因序列缺失的 GADD45a 基因的启动子与 EGFP 融合结构, 作为无法合成正常 EGFP 的阴性对照表达于 TK6 细胞 (GenM-C01)。之后分别利用潮霉素 B 挑选形成稳转细胞系^[9]。GenM-T01 和 GenM-C01 (10代以内)引自 Gentronix Limited (Cheshire, U.K.)。

1.3 主要仪器

5810R 型离心机 (Eppendorf); NTS-1300 水浴摇床 (EYELA); IS600 细菌培养箱 (YAMATO); HERAccl 150i 细胞培养箱 (Thermo); SPECTRAMax-PLUS 型酶标仪 (Molecular

Devices); FACSCalibur 流式细胞仪检测 (BD)。

2 方法

2.1 波动 Ames 试验

2.1.1 菌株扩增 在 10 mL 营养肉汤培养基 (含氨苄青霉素 50 $\mu\text{g/mL}$) 中加入 10 μL TA98/TA100 菌液或 30 μL WP2 uvrA 菌液, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、120 r/min 振摇过夜培养。培养后经酶标仪检测菌液 OD600 值约为 0.4~0.6。过夜菌液经 0.1 mol/L PBS (pH7.4) 以 1:9 稀释, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温 120 r/min 振摇培养 3 h。

2.1.2 非活化条件下的 Ames 波动试验 无菌条件下配制 D-M half 盐溶液 (含 0.049 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot (7\text{H}_2\text{O})$ 、0.25 g/L 柠檬酸钠 $\cdot (2\text{H}_2\text{O})$ 、3.5 g/L $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot (3\text{H}_2\text{O})$ 、1 g/L KH_2PO_4 、1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 和选择性生长培养基 (每 524.2 mL 选择性生长培养基含 500 mL D-M half 盐溶液、20 mL 20%葡萄糖、0.1 mL 0.1%组氨酸、0.1 mL 0.1%色氨酸、4 mL 0.1%生物素)。上述溶液高温灭菌后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。在 50 mL 离心管内加入 20 mL 选择性生长培养基、0.1 mL 稀释后培养的菌液和 0.2 mL 受试物, 充分混匀后使用多通道移液器加入 96 孔板, 每孔 0.2 mL。确定受试物浓度范围时, 首先以受试物在 1%DMSO 中的最高溶解度以及在培养基中不产生明显沉淀的浓度来确定大黄素和芫花素的最高处理浓度, 再以 1:3 倍比稀释设置 5 个浓度组, 终质量浓度分别为 0.1、0.3、1、3、10 $\mu\text{g/mL}$, 阳性剂 AF-2 终浓度为 1 ng/mL, 阴性对照组 DMSO 终体积浓度为 1%。每个受试物每个浓度平行 3 块板, 置 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 72 h。

2.1.3 活化条件下的 Ames 波动试验 D-M half 盐溶液配制同方法 1.2。无菌条件下配制 S9 混合液 (每 1 mL S9 混合液含 0.2 mol/L PNa 缓冲液 (pH7.4)、0.1 mol/L NADP、1 mol/L G-6-P、1.65 mol/L KCl、0.4 mol/L MgCl_2 、10% S9) 选择培养基 (200 mL D-M half 盐溶液中加入 8 mL 20%葡萄糖溶液) 和选择性生长培养基 (每 81.64 mL 选择性生长培养基含 60 mL 0.1 mol/L PBS (pH7.4)、20 mL S9 混合液、0.8 mL 20%葡萄糖、0.02 mL 0.1%组氨酸、0.02 mL 0.1%色氨酸、1.6 mL 0.1%生物素)。在 15 mL 离心管内加入 4 mL 选择性生长培养基、0.02 mL 稀释后培养的菌液和 0.98 mL 受试物, 充分混匀后使用多通道移液器加入 96 孔板, 每孔 0.05 mL。大黄素和芫花素的终浓度同方法 1.2, 阳性剂 2-AA 终质量浓度为 2 ng/mL, 阴性对照组 DMSO 终体积浓度为 1%。每个受试物每个浓度平行 3 块板。置 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养

约 17 h 后, 每孔加入 0.15 mL 选择培养基, 继续在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养至 72 h。

2.1.4 结果观察及数据处理 96 孔培养板在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下培养 72 h 后, 每孔加入 20 μL 溴麝香草酚蓝 (600 $\mu\text{g/mL}$)。黄色孔计为阳性, 蓝色为阴性, 介于蓝黄之间的为阴性。阴性对照组每 96 孔回复突变孔数不超过 10 孔, 阳性对照组回复突变孔数超过 50 孔认为试验体系成立。回复突变孔数均数表示为 $\bar{x} \pm s$, 各剂量组与阴性对照组的回复突变孔之间差异使用单因素方差分析 (One-Way ANOVA) 对数据显著性进行分析。

2.2 GADD45a GreenScreen 高通量筛选试验

2.2.1 细胞培养及给药处理 使用人类淋巴母细胞 TK6 作为检测细胞 (GenM-T01) 和无荧光的对照细胞 (GenM-C01) 的表达系统。GenM-C01 用来校准化合物的自发荧光, 而 GenM-T01 表达 GADD45-EGFP 融合基因。当后者暴露于遗传毒性化合物时, GADD45a-EGFP 表达水平增加, 从而诱导细胞内的荧光增加。

无菌操作条件下, 用 RPMI 1640+GlutaMAXTM 培养液 (含 1.8 mmol/L 丙酮酸钠、200 $\mu\text{g/mL}$ 潮霉素 B、1%青链霉素混合液、10%马血清) 分别培养细胞。对照细胞系 GenM-C01 和测试细胞系 GenM-T01 到达对数生长期后, 经 PBS 冲洗后使用含 20%马血清的培养基调整细胞密度为 2×10^6 个/mL。使用黑色板壁的 96 孔板, 每孔加入 75 μL 细胞 (终浓度 1×10^6 个/mL) 和 75 μL 受试物溶液。以受试物在 DMSO 中的最高溶解度确定大黄素和芫花素的最高检测浓度, 并设置 9 个浓度梯度 (大黄素终质量浓度为 0.13、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0、32.0 $\mu\text{g/mL}$; 芫花素终质量浓度为 0.07、0.13、0.25、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、16.0 $\mu\text{g/mL}$), 同时设立 MMS 阳性对照孔 (10、50 $\mu\text{g/mL}$) 和 1% DMSO 阴性对照孔, 分设添加或不添加 S9 代谢活化组 (S9 的配制方法同方法 1.3), 每个组每浓度平行 3 孔。GenM-C01 和 GenM-T01 平行给药处理。将细胞与受试物溶液混合均匀后在 96 孔板上覆盖塑料板盖, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 、95%湿度条件下培养。

2.2.2 检测方法 非代谢活化条件组培养 48 h 后采用酶标仪检测 (吸光度检测波长为 620 nm; 荧光激发波长为 485 nm, 发射波长为 535 nm)。代谢活化条件组在 3 h 后, 每孔加入 60 μL 的碘化丙啶 (83 $\mu\text{g/mL}$) 混合均匀, 使用流式细胞仪检测 (激发波

长为 488 nm, 发射波长为 509 nm), 每孔收集 1×10^5 个细胞。

2.2.3 数据分析方法 96 孔板分别检测细胞吸光度(反应细胞增殖水平, 即细胞毒性)和荧光水平(反应 DNA 修复活力, 即遗传毒性), 测试细胞系的荧光读数需扣除对照细胞系的荧光读数。各浓度组荧光读数均数表示为 $\bar{x} \pm s$ 。受试物给药组细胞毒性检测值低于阴性对照组 80% 时认为是阳性结果; 遗传毒性荧光检测值在非代谢活化条件下超过阴性对照组数值的 1.5 倍时, 代谢活化条件下超过阴性对照组数值 1.3 倍时, 认为是阳性结果。

3 结果

3.1 Ames 波动试验检测大黄素和芫花的致突变性

在非代谢活化条件下 Ames 波动试验结果见图 1, 2-AF 阳性对照组的回复性突变平均阳性孔数 (67 ± 9) 与阴性对照组平均阳性孔数 (8 ± 2) 比较, 存在统计学上的显著性升高 ($P < 0.001$), 提示试验体系成立。大黄素给药质量浓度在 $0.1 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ 时, 只有 $3 \mu\text{g/mL}$ 的回复性突变阳性孔数量 (20 ± 5) 与阴性对照组比较显著性升高 ($P < 0.05$), 其他浓度组则未见统计学差异。芫花素给药质量浓度在 $0.1 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ 范围内时, 所有浓度组未见回复性突变阳性孔数与对照组存在显著性升高。上述结果提示大黄素在非代谢活化条件下只有 1 个浓度呈阳性, 对 TA100 的致突变性作用为可疑阳性。当处理浓度增加为 $10 \mu\text{g/mL}$ 时, 可能由于药物毒性作用较大, 阳性孔数反而有所降低。芫花素在非代谢活化条件下对 TA100 无明显的致突变性作用。

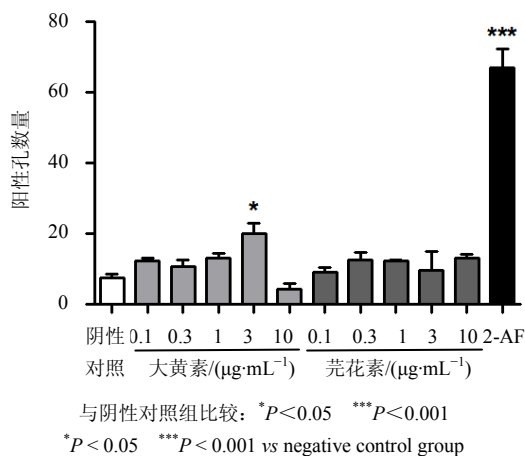


图1 非 S9 代谢活化条件下大黄素和芫花素 Ames 波动试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Ames Fluctuation Test of Emodin and Genkwanin without S9 Metabolic Activation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

代谢活化条件下 Ames 波动试验结果见图 2, 2-AA 阳性对照组的回复性突变平均阳性孔数 (70 ± 6) 与阴性对照组平均阳性孔数 (8 ± 2) 比较, 存在统计学上的显著性升高 ($P < 0.001$), 提示试验体系成立。大黄素给药浓度在 $0.1 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ 范围内时, 只有 $10 \mu\text{g/mL}$ 的回复性突变阳性孔数量 (29 ± 6) 与阴性对照组比较显著性升高 ($P < 0.001$), 其他浓度组则未见统计学差异。芫花素给药浓度在 $0.1 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ 范围内时, 同样仅最高浓度 $10 \mu\text{g/mL}$ 的回复性突变阳性孔数量 (25 ± 5) 与阴性对照组比较显著性升高 ($P < 0.001$)。上述结果提示大黄素和芫花素在代谢活化条件下对 TA100 的致突变性作用均为可疑阳性。

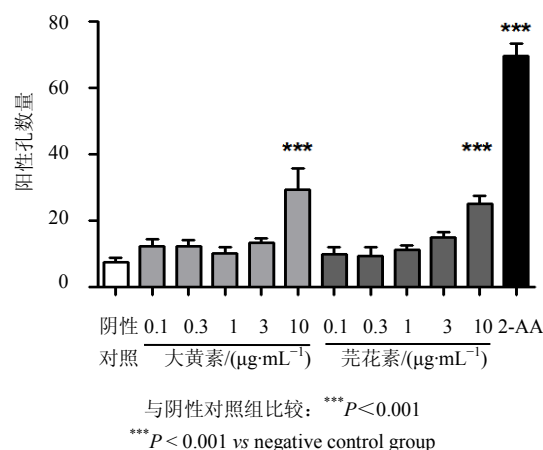


图2 S9 代谢活化条件下大黄素和芫花素 Ames 波动试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Ames Fluctuation Test of Emodin and Genkwanin with S9 Metabolic Activation ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3.2 GADDA45a GreenScreen 高通量筛选试验检测大黄素和芫花素对 DNA 损伤的影响

在非代谢活化条件下, 细胞毒性及 GADDA45a 基因表达水平检测结果见图 3。大黄素处理质量浓度高于 $4.0 \mu\text{g/mL}$ 时, 细胞相对密度低于 80%, 提示上述浓度存在一定细胞毒性; 而芫花素 9 个浓度梯度条件下处理的细胞相对密度不低于阈值, 提示芫花素在质量浓度为 $0.07 \sim 16.0 \mu\text{g/mL}$ 无细胞毒性。当前给药浓度范围内, 2 种中药单体大黄素 ($0.13 \sim 32.0 \mu\text{g/mL}$) 和芫花素 ($0.07 \sim 16.0 \mu\text{g/mL}$) 所诱导 GADDA45a-EGFP 荧光数值均未超过阈值。提示在无 S9 代谢活化时, 大黄素和芫花素在本研究选择的浓度内无遗传毒性。

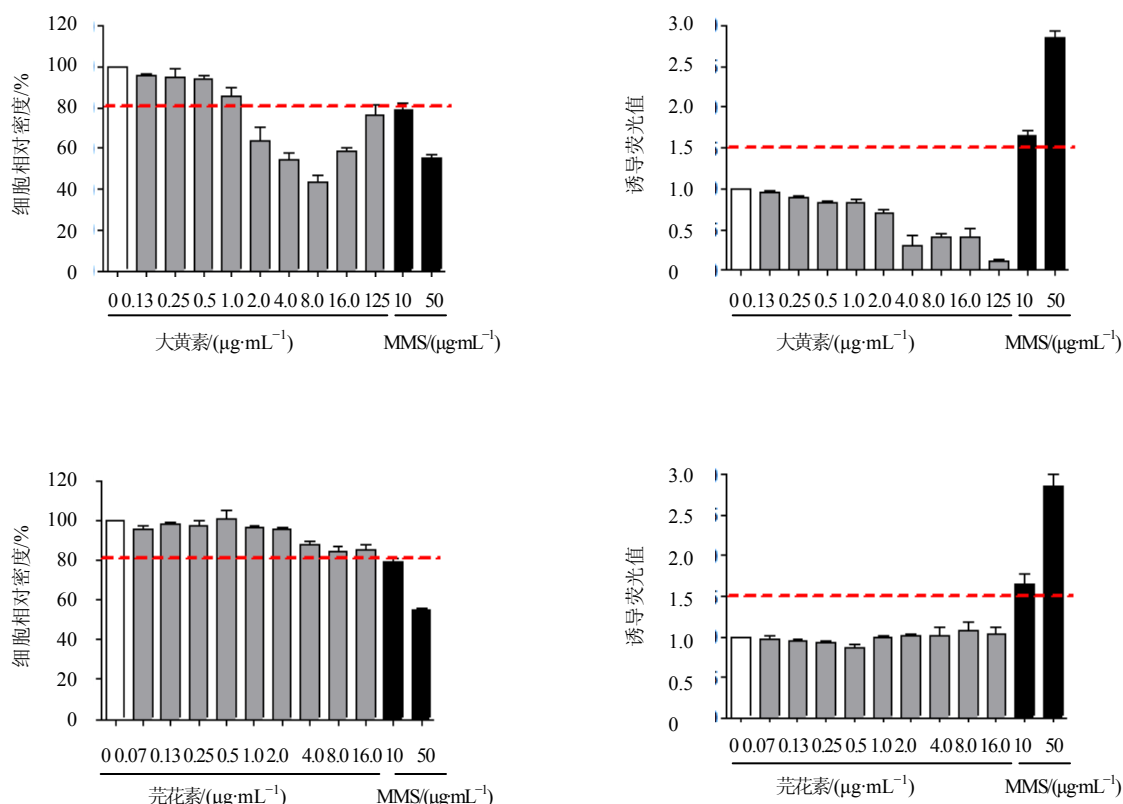


图3 非S9代谢活化条件下大黄素和芫花素给药48 h GreenScreen高通量筛选结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 3 GreenScreen HC Assay of Emodin and Genkwanin 48-hour Treatment without S9 Metabolic Activation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

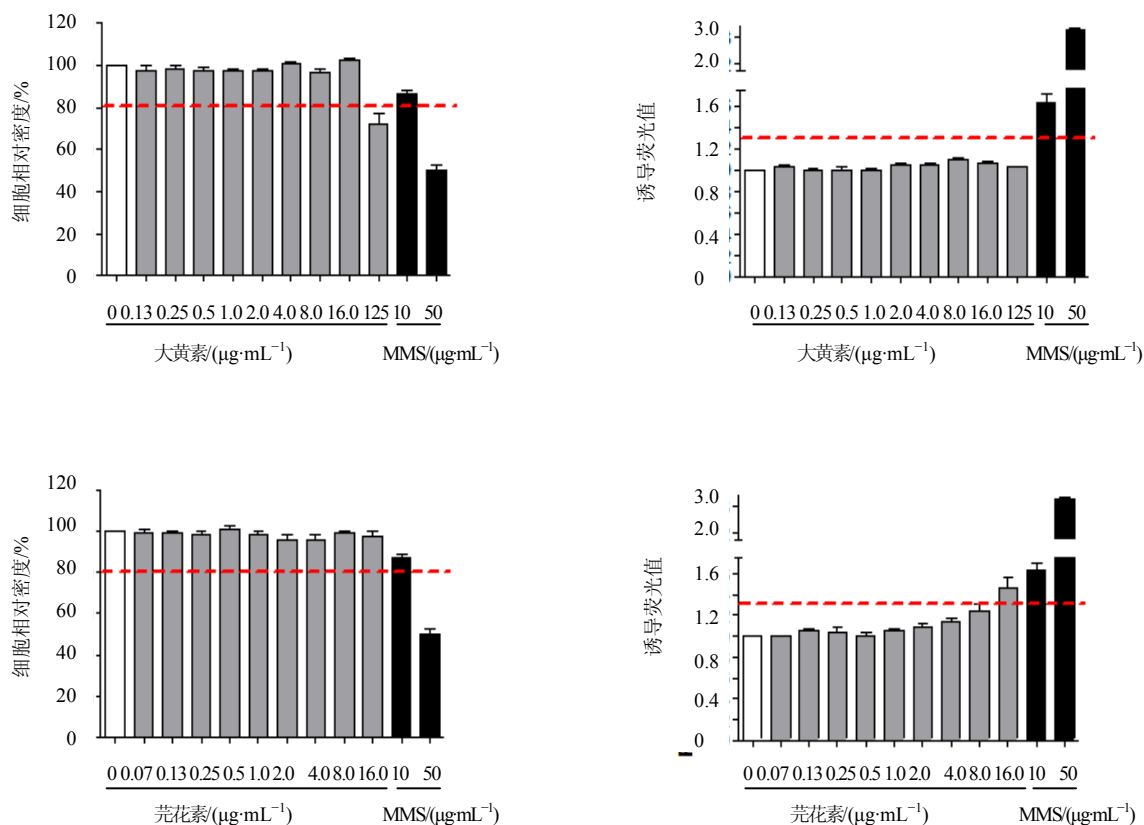
在代谢活化条件下, 细胞毒性实验结果及GADDA45a基因表达水平检测结果见图4。大黄素质量浓度为32.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时细胞相对存活率低于80%, 提示存在一定细胞毒性; 芫花素在0.07~16.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 细胞相对存活率均高于80%, 未见明显细胞毒性。大黄素在0.13~32.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 诱导TK6细胞表达的EGFP荧光的强度均低于阈值, 提示不具有遗传毒性; 而芫花素浓度为最高处理浓度16.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时细胞表达的GADDA45a-EGFP荧光强度超过阈值, 提示可疑阳性遗传毒性结果。

4 讨论

高通量遗传毒性评价方法对药物毒性筛选, 尤其是成分复杂的药物毒性成分筛选有重要意义。黄酮类化合物是广泛存在的一类中药有效成分, 根据Toxtree毒理学预测软件分析结果, 所有含黄酮类化合物均为有遗传毒性结构预警或毒性较强的III类化合物^[10]。本课题组前期在Bhas42细胞转化试验中发现含黄酮类中药芫花和了哥王(95%乙醇浸提

物)的促癌试验结果分别为可疑阳性和阳性^[8], 提示可能具有潜致癌性。大黄素和芫花素是两者的重要单体成分。本研究联合检测致突变性的Ames波动试验和针对遗传毒性生物标志物GADDA45a基因的GreenScreen筛选试验两种高通量方法检测两者遗传毒性, 结果发现大黄素和芫花素具有可疑遗传毒性: 即有无代谢活化条件下, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 大黄素均可诱导TA100的回复性突变率显著性升高($P<0.05$, $P<0.001$); 代谢活化条件下, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芫花素可诱导TA100的回复性突变率显著性升高($P<0.001$), 16.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 芫花素可诱导TK6细胞表达的GADDA45a-EGFP荧光强度超过阈值。故需要开展深入研究明确其遗传毒性及作用机制。

传统Ames试验是对致癌物预测性最好的遗传毒性试验, 是药物遗传毒性初筛的首选方法, 也是QSAR构效关系建立的遗传毒性数据库的重要数据基础^[11]。然而开展传统的Ames试验需制作大量琼脂糖平板(评价一个化合物需约200个平板)且菌

图4 S9代谢活化条件下大黄素和芫花素给药3 h GreenScreen 高通量筛选结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)Fig. 4 GreenScreen HC Assay of Emodin and Genkwanin 3-hour Treatment with S9 Metabolic Activation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

落计数繁复。相比传统的 Ames 试验方法, Ames 波动试验采用了液态多孔板培养的方法, 在微孔板中进行受试物和菌株的孵育, 利用培养基中的特殊指示剂溴甲酚紫显色。当孔中有回复突变的菌株生长使培养基 pH 值降低时, 指示剂由紫色变为黄色。试验通过计数黄色孔的数量来反映受试物的致突变性, 从而省去了平板制作和菌落计数等步骤, 实现高通量, 具有节省耗材、节约药量、缩短试验周期、结果客观、适宜大量药物筛选的优点。Gee 等^[12]于 1994 年开发了商业化的基于 384 孔板液态培养法的 Ames II 试剂盒, 该方法使用了 TA7001-TA7006 共 6 种混合菌株同时对受试物潜在诱导 T:A 和 C:G 点突变能力进行检测。Kamber 等^[13]比较传统 Ames 和 Ames II 检测 71 种化合物结果发现, 2 种方法对突变剂和非突变剂的检测结果一致性达 84%, 且对啮齿类动物致癌性的预测度接近。Ames 波动试验不依赖于试剂盒且实验成本低于 Ames II, 但在实验室内在菌株的选择、培养基的配方、显色剂的选择、

培养方式、计数和评价方法上都存在差异, 缺乏规范化的试验流程和评价方法。在确定规范化试验流程的基础上, 菌株的扩增和培养时使用浓度、阳性剂的选择及浓度也决定了不同菌株的回复性突变孔数背景值范围, 从而影响结果了判定。

本研究利用检测 G:C 碱基置换的 TA100 对大黄素和芫花素的致突变性进行初步评价, 发现当前给药浓度下, 个别浓度组结果为阳性。大黄素含有蒽醌环结构, 这一共平面稠环母体结构可嵌入 DNA 碱基对, 影响 DNA 的复制与转录。文献报道传统 Ames 试验中大黄素可诱导 TA98、TA1535、TA1537 在有无代谢活化条件下发生突变^[14-15], Ames 波动试验显示大黄素可诱导 TA100 产生可疑阳性结果、TA1537 产生阳性结果^[16-17], 与本研究数据基本相符。文献报道中芫花酯甲、芫花酯乙和芫花萜的 Ames 试验结果均为阴性^[18], 本研究首次对芫花素开展 Ames 试验而结果提示为可疑阳性, 该结果有待在其他菌株的 Ames 试验和 MLA、Pig-a 基因突

变试验等其他针对致突变性的进一步研究中得到验证。

GADD45-GFP GreenScreen HC 试验以 GADD45 基因为生物标志物来评价受试物的遗传毒性。GADD45 基因(Growth arrest and DNA damage inducible genes)是第一个被发现的 p53 调控的细胞增殖负调控基因^[19], 在控制细胞周期、DNA 的修复损伤^[20]、细胞凋亡^[21]等方面发挥至关重要的作用, 可与多种细胞增殖和细胞周期调控因子联合发挥 DNA 修复、细胞周期检查点调控和诱导和细胞凋亡等功能。该方法将质粒中的 GADD45 基因启动子与 EGFP 基因序列融合, 再将质粒转入人淋巴瘤 TK6 细胞表达, 通过检测反应 GADD45a 基因表达水平的 EGFP 的荧光强度来评价受试物的细胞毒性和遗传毒性^[22]。GreenScreen HC 测定方法具有特异性强、灵敏度高、高通量筛选、简便快速等特点。Birrell 等^[9]使用 GreenScreen HC 评价其对 62 种化合物的检测结果, 发现该方法对体外哺乳类动物细胞遗传毒性检测方法显示具有致癌性的 20 种化合物和体外遗传毒性检测方法显示不具有致癌性的 23 种化合物的检测结果文献符合率高达 93%, 对体外哺乳类动物细胞遗传毒性检测方法不具有致癌性但是诱导小鼠淋巴瘤细胞染色体畸变或者 TK 基因突变的 17 种化合物的检测结果文献符合率为 76%。

GADD45-GFP GreenScreen HC 试验结果提示大黄素在有代谢活化条件下均对 GADD45a 基因无明显影响, 但芫花素在代谢活化条件下存在可疑阳性结果。本课题组前期在 Bhas42 细胞转化试验中发现黄芩花和了哥王具有潜在促癌作用, 芫花具有可疑促癌作用^[8], 而芫花素是上述三者的主要单体成分, 而其致癌性评价结果未见文献报道。Asada 等^[23]建立的 Bhas42 细胞转化实验包括启动和促癌两阶段细胞转化实验两部分, 该方法除检测遗传毒性致癌物外, 还可对非遗传毒性致癌物进行筛查。然而, 2013 年欧洲替代方法验证中心 (ECVAM) 的报告指出^[24], Bhas42 细胞高通量转化试验是一种体外致癌性的检测方法, 该试验方法并不用于明确区分致癌物属于遗传毒性致癌物或非遗传毒性致癌物。Bhas42 细胞高通量转化实验由于给药周期与 GreenScreen HC 实验相比较长, 而 S9 本身具有一定细胞毒性, 长期给药可造成细胞大量死亡, 因此不适合在 Bhas42 细胞转化实验中添加 S9。GreenScreen HC 实验在添加 S9 条件下发现芫花素

存在遗传毒性, 是对 Bhas42 细胞转化实验结果的重要补充。因此不排除芫花素同时具有遗传毒性和非遗传毒性致癌性的作用, 当前结果提示有必要从多种检测终点深入探究芫花素的毒性和作用机制, 并警惕含芫花素药物的潜在致癌性。

综上所述, Ames 波动试验和 GADD45a GreenScreen 筛选试验不依赖于形态学分析, 可利用 96 孔板和特殊菌株、细胞模型实现高通量化, 且在国际上正处于改良和小规模实验室间验证阶段, 是良好的高通量筛选备选试验。两者可极大优化浩繁的药物的毒性筛选工作, 尤其适宜诸如中药等成分和配伍复杂的药物。现阶段这两种方法在国内仍处于探索阶段, 亟需建立标准化方法和一套背景数据来提高评价的可靠性并促进方法学的推广应用。

致谢: 本文作者感谢 Gentronix Limited (Cheshire, U.K.) 的 Louise Birrell 对 GADD45a GreenScreen 高通量检测法的技术支持。

参考文献

- [1] ICH S2 (R1). Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use (step 4) [EB/OL]. (2008-03-06) [2018-01-25] http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_ProductsGuidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf.
- [2] 王智民. 含有马兜铃酸的中成药情况分析 [J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 27(6): 70-72.
- [3] Pfau W, Schmeiser H H, Wiessler M. Aristolochic acid binds covalently to the exocyclic amino group of purine nucleotides in DNA [J]. Carcinogenesis, 1990, 11(2): 313-319.
- [4] Frei H, Würzler F E, Juon H, et al. Aristolochic acid is mutagenic and recombinogenic in Drosophila, genotoxicity tests [J]. Arch Toxicol, 1985, 56(3): 158-166.
- [5] Abel G, Schimmer O. Induction of structural chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in human lymphocytes in vitro by aristolochic acid [J]. Human Genetics, 1983, 64(2): 131-133.
- [6] Wu K, Jiang L, Cao J, et al. Genotoxic effect and nitrate DNA damage in HepG2 cells exposed to aristolochic acid [J]. Mutat Res, 2007, 630(1-2): 97-102.
- [7] 于朝霞. 不同炮制方法对大黄遗传毒性减毒效果的影响 [J]. 医学信息, 2015(32): 153-153.
- [8] Pu J, Wang Y, Qi N, et al. A high-throughput Bhas 42 cell transformation assay for the determination of the carcinogenicity of three herbal extracts [J]. Fund Toxicol

- Sci, 2016, 3(4): 157-166.
- [9] Birrell L, Cahill P C, Tate M, et al. GADD45a-GFP GreenScreen HC assay results for the ECVAM recommended lists of genotoxic and non-genotoxic chemicals for assessment of new genotoxicity tests [J]. Mutat Res, 2010, 695(1-2):87-95.
- [10] 高雅, 姚碧云, 周宗灿. 应用 Toxtree 平台预测中草药重要成分的致癌性和遗传毒性 [J]. 毒理学杂志, 2016(5): 329-333.
- [11] Cassano A, Raitano G, Mombelli E, et al. Evaluation of QSAR models for the prediction of ames genotoxicity: A retrospective exercise on the chemical substances registered under the EU REACH regulation [J]. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2014, 32(3): 273-298.
- [12] Gee P, Maron D M, Ames B N. Detection and classification of mutagens: a set of base-specific Salmonella tester strains [J]. Proc Natl Acad Sci, 1994(91): 11606-11610.
- [13] Kamber M, Flückiger-Isler S, Engelhardt G, et al. Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity [J]. Mutagenesis, 2009, 24(4): 359-366.
- [14] Go S Y, Kwon K J, Park S N, et al. Genetic toxicity test of emodin by ames, micronucleus, comet assays and microarray analysis showing differential result [J]. Biomol Therapeutics, 2007, 15(3): 192-198.
- [15] Krivobok S, Seiglemurandi F, Steiman R, et al. Mutagenicity of substituted anthraquinones in the Ames/Salmonella microsome system [J]. Mutat Res, 1992, 279(1): 1-8.
- [16] 王青秀. 大黄及其主要成份的毒性毒理研究 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院 解放军军事医学科学院, 2007.
- [17] Flückiger-Isler S, Kamber M. Direct comparison of the Ames microplate format (MPF) test in liquid medium with the standard Ames pre-incubation assay on agar plates by use of equivocal to weakly positive test compounds [J]. Mutat Res, 2012, 747(1): 36-45.
- [18] 林飞, 徐小鸽, 黄念君, 等. Ames 试验检测十种中药有效成份和制剂的诱变性 [J]. 中国药理学通报, 1985(2): 51-55.
- [19] Kastan M B, Zhan Q, Eldeiry W S, et al. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia [J]. Cell, 1992, 71(4): 587-597.
- [20] Zhan Q. GADD45a, a p53- and BRCA1-regulated stress protein, in cellular response to DNA damage [J]. Mutat Res, 2005, 569(569): 133-143.
- [21] Rosemary Siafakas A, Richardson D R. Growth arrest and DNA damage-45 alpha (GADD45alpha) [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2009, 41(5): 986-989.
- [22] Hastwell P W, Chai L L, Roberts K J, et al. High-specificity and high-sensitivity genotoxicity assessment in a human cell line: validation of the GreenScreen HC GADD45a-GFP genotoxicity assay [J]. Mutat Res, 2006, 607(2): 160-175.
- [23] Asada S, Sasaki K, Tanaka N, et al. Detection of initiating as well as promoting activity of chemicals by a novel cell transformation assay using v-Ha- ras -transfected BALB/c 3T3 cells (Bhas 42 cells) [J]. Mutat Res, 2005, 588(1): 7-21.
- [24] EURL ECVAM Recommendation on the Cell Transformation Assay based on the Bhas 42 cell line [EB/OL].(2013-11)[2018-01-25] https://eurl-ecvam.jrc.ec.europa.eu/eurl-ecvam-recommendations/files-bhas/EURL_ECVAM_Recommendation_Bhas-CTA_2013.pdf.