

## 泰格列净 Ames 试验研究

张海娇<sup>1</sup>, 周博宇<sup>1</sup>, 任 萌<sup>1</sup>, 张建军<sup>1</sup>, 刘恩桂<sup>2</sup>, 李苙清<sup>2</sup>, 高悦译<sup>2</sup>, 刘 妍<sup>1\*</sup>, 申秀萍<sup>1\*</sup>

1. 天津药物研究院新药评价有限公司 天津市新药非临床评价技术工程中心, 天津 300301

2. 广州市力鑫药业有限公司, 广东 广州 510535

**摘要:** **目的** 应用 Ames 试验探讨泰格列净是否具有致突变性。**方法** 采用标准平板掺入法, 应用组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 对泰格列净进行回复突变试验。**结果** 在 31.25~2 000 μg/皿剂量范围内, 加和不加大鼠肝微粒体酶 S9 平行条件下测试, 泰格列净 Ames 回复突变试验结果为阴性。**结论** 在本试验条件下, 泰格列净无致突变性。

**关键词:** 泰格列净; Ames 试验; 致突变性

**中图分类号:** R962.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2018) 09- 1617 - 04

**DOI:** 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.09.010

## Study of Tianagliflozin in Ames assay

ZHANG Haijiao<sup>1</sup>, ZHOU Boyu<sup>1</sup>, REN Meng<sup>1</sup>, ZHANG Jianjun<sup>1</sup>, LIU Engui<sup>2</sup>, LI Changqing<sup>2</sup>, GAO Yueyi<sup>2</sup>, LIU Yan<sup>1</sup>, SHEN Xiuping<sup>1</sup>

1. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research New Drug Assessment Co., Ltd., Tianjin Engineering Research Center of Drug Preclinical Assessment Technology, Tianjin 300301, China;

2. Guangzhou Lixin pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510535, China

**Abstract: Objective** To study the mutagenicity of Tianagliflozin in Ames assay. **Methods** Using the standard plate incorporation assay, the bacterial reverse mutation of Tianagliflozin was tested in the histidine defective strains of salmonella typhimurium TA97, TA98, TA100, TA102, and TA1535. **Results** In the presence and absence of rat liver microsome S9 mix, the results of assay were negative at the dose within 31.25 – 2 000 μg/plate. **Conclusion** The mutagenicity of Tianagliflozin was not observed in the assay.

**Key words:** Tianagliflozin; Ames assay; mutagenicity

Ames 试验是国际上通用的遗传毒理实验的必检项目之一<sup>[1]</sup>。试验选用鼠伤寒沙门氏菌组氨酸营养缺陷型(异养型 his<sup>-</sup>)菌株, 该菌株不能生长在缺乏组氨酸的培养基中, 当受诱变剂作用后, 可发生回复突变而转变为野生型(原养型 his<sup>+</sup>), 通过自行合成组氨酸, 使其在缺乏组氨酸的培养基上能够生长发育成肉眼可见的菌落, 据此判断受试物是否为致突变物<sup>[2]</sup>。

泰格列净是 2 型钠离子依赖型葡萄糖协同转运蛋白(SGLT2)抑制剂类降糖药物, 通过抑制表达于肾脏的 SGLT2, 减少肾脏的葡萄糖重吸收, 增加尿液中葡萄糖的排泄, 从而降低血浆葡萄糖水平。本文采用 Ames 试验研究泰格列净有无致突变性。

### 1 材料

#### 1.1 Ames 菌株

鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型菌株 TA97、TA98、TA100、TA102, 引自天津市疾病预防控制中心; TA1535, 引自美国模式菌种收集中心(American Type Culture Collection, ATCC), 均于-80 °C 超低温冰箱保存。试验前对各菌株进行了组氨酸缺陷鉴定(his<sup>-</sup>)、脂多糖屏障缺陷鉴定(rfa)、紫外线修复缺陷鉴定(uvrB)、氨基青霉素抗性鉴定(pKM101)、四环素抗性鉴定(PAQ1)、自发回变数鉴定以及对阳性突变剂的敏感性鉴定, 经鉴定各菌株均符合相关要求。

收稿日期: 2018-04-24

基金项目: 国家科技重大新药创制项目(2015ZX09501004); 天津市科技计划项目(16PTGCCX00090)

第一作者: 张海娇(1989—), 女, 天津市人, 助理实验师, 主要研究方向为药物遗传毒性。E-mail: zhanghj@tjipr.com

\*通信作者: 刘 妍 E-mail: liuy@tjipr.com; 申秀萍 E-mail: shenxp@tjipr.com

## 1.2 药物及主要试剂

泰格列净, 性状: 白色结晶性粉末, 质量分数: 99.88%, 批号: 140211, 理化性质: 易吸潮, 保存条件: 常温、干燥, 由天津药物研究院药物创新研究中心提供。溶媒对照: 二甲基亚砜 (DMSO), 批号 302A039, 购自 Solarbio。阳性诱变剂: 叠氮钠, 批号 4660C303, 购自 Amresco 公司; 敌克松, 由南开大学元素所馈赠; 2-氨基蒽, 购自 TCI 公司。

琼脂粉、营养肉汤培养基, 购自北京三药科技开发公司; 组氨酸, 购自天津市光复精细化工研究所; 生物素、磷酸氢钠胺和 6-磷酸葡萄糖, 购自 Sigma-Aldrich 公司; 氧化性辅酶 II ( $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADP)。

## 1.3 代谢活化系统

大鼠肝微粒体酶 S9, 本实验室自制, 采用苯巴比妥和  $\beta$ -萘黄酮联合诱导, 无菌检测和代谢活化特性检测符合实验要求。

## 1.4 主要仪器

恒温培养箱和高压蒸汽灭菌器, 购自 SANYO 公司; 全温度振荡培养箱, 购自太仓市华美生化器材厂; 恒温水浴箱, 购自天津泰斯特仪器有限公司; 电子天平, 购自 Sartorius 公司; 超净工作台, 购自

天津市拉贝尔实验室设备有限公司; 显微镜, 购自日本 Nikon 公司。

## 2 方法

### 2.1 预试验

选用组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100、TA102 和 TA1535, 泰格列净剂量设置为 5 000.000、2 500.000、1 250.000、625.000、312.500、156.250 和 78.125  $\mu\text{g}/\text{皿}$ , 另设空白对照组。采用平皿掺入法<sup>[4]</sup>, 每 1 实验菌株每 1 剂量非活化(-S9)系统各做 1 个平皿。肉眼和显微镜下观察, 抑菌情况判断标准为: ++: 有明显抑菌, 回变菌落数明显降低; +: 一定抑菌, 回变菌落数降低;  $\pm$ : 有微弱抑菌, 回变菌落数略有降低; -: 无明显抑菌, 回变菌落数正常。预试验结果显示, 各剂量均无沉淀产生; 625~5 000  $\mu\text{g}/\text{皿}$  剂量出现不同程度的抑菌作用, 结果见表 1。

根据“将不出现明显的抑菌情况, 且产生的沉淀不干扰计数的浓度设定为最高浓度”的原则<sup>[2]</sup>, 结合预实验结果, 本试验高剂量选择为 2 000  $\mu\text{g}/\text{皿}$ , 同时, 为了兼顾泰格列净对各菌株强弱不等的抑菌能力, 以及尽量扩大受试剂量范围的考虑, 本试验采用非等比间距, 另设 1 000.00、500.00、125.00 和 31.25  $\mu\text{g}/\text{皿}$  4 个剂量。

表 1 泰格列净非活化(-S9)系统 Ames 预实验抑菌情况

Table 1 Tianagliflozin absence of S9 mix Ames preliminary experiment on bacteriostasis

组别	剂量/ $(\mu\text{g}\cdot\text{皿}^{-1})$	TA97	TA98	TA100	TA102	TA1535
空白对照	—	—	—	—	—	—
泰格列净	78.125	—	—	—	—	—
	156.250	—	—	—	—	—
	312.500	—	—	—	—	—
	625.000	$\pm$	—	—	$\pm$	—
	1 250.000	+	+	+	+	+
	2 500.000	++	++	++	++	++
	5 000.000	++	++	++	++	++

## 2.2 泰格列净 Ames 试验

应用组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100、TA102 和 TA1535, 采用平皿掺入法<sup>[4]</sup>, 根据预试验结果剂量设置为 2 000.00、1 000.00、500.00、125.00 和 31.25  $\mu\text{g}/\text{皿}$ , 并设空白对照(不加任何药物和溶媒)、溶媒对照(DMSO)和阳性对照组。其中敌克松: 50  $\mu\text{g}/\text{皿}$ , 加入量 0.1 mL/皿, 为 TA97、TA98 和 TA102 菌株非活化系统

阳性对照药; 叠氮钠: 1.5  $\mu\text{g}/\text{皿}$ , 加入量 0.1 mL/皿, 为 TA100 和 TA1535 菌株非活化系统阳性对照药; 2-氨基蒽: 5  $\mu\text{g}/\text{皿}$ , 加入量 0.1 mL/皿, 为 TA97、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 菌株活化系统阳性对照药。具体操作: 取保温在 45  $^{\circ}\text{C}$ 、含 2 mL 融化的顶层培养基的试管, 依次加入菌液 0.1 mL、不同浓度的受试物或阳性对照药 0.1 mL (空白对照组不加, 溶媒对照加 0.1 mL DMSO), 需代谢活化的

再加入 0.5 mL S9 混合液，混匀后倒入底层培养基上，铺平，标记组别、剂量、活化和非活化，固化后于 37 °C 温箱培养 48 h，计数各组肉眼可见回变菌落数。每 1 菌株每 1 剂量活化 (+S9) 和非活化 (-S9) 系统各做 3 个平皿，进行 2 次独立试验。

### 2.3 结果评价

结果应阐明药物细菌毒性大小和沉淀情况，每皿的回复突变菌落数以  $\bar{x} \pm s$  表示。

当至少在一个菌株上，在有或无代谢活化的情况下，受试物所诱发的回复突变菌落数出现浓度依赖性的增加和/或在一个或多个浓度组出现可重复性的增加，可判定为阳性结果，反之为阴性<sup>[3]</sup>。

### 3 结果

在不加 S9 活化条件下，计数菌落时未发现受试物沉淀，结果显示，泰格列净剂量为 2 000、1 000  $\mu\text{g}/\text{皿}$  时，对 TA97、TA98、TA100、TA102 均有不同程度的抑菌作用，回变菌落数明显降低，对 TA1535 无抑菌作用，回变菌落数正常；泰格列净

剂量为 500、125  $\mu\text{g}/\text{皿}$  时，对 TA102 有一定抑菌作用，回变菌落数降低，对 TA97、TA98、TA100 和 TA1535 无抑菌作用，回变菌落数正常；泰格列净剂量为 31.25  $\mu\text{g}/\text{皿}$  时，对 TA97、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 均无抑菌作用，回变菌落数正常；阳性对照组回变菌落数与溶媒对照组比较明显增加。见表 2。

在加 S9 活化条件下，计数菌落时未发现受试物沉淀，结果显示，泰格列净剂量在 2 000  $\mu\text{g}/\text{皿}$  时，对 TA97、TA98、TA100、TA102 均有不同程度的抑菌作用，回变菌落数明显降低，对 TA1535 无抑菌作用，回变菌落数正常；泰格列净剂量在 1 000  $\mu\text{g}/\text{皿}$  时，对 TA98 和 TA102 有抑菌作用，回变菌落数降低，对 TA97、TA100 和 TA1535 无抑菌作用，回变菌落数正常；泰格列净剂量在 31.25、125 和 500  $\mu\text{g}/\text{皿}$  时，对 TA97、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 均无抑菌作用，回变菌落数正常；阳性对照组回变菌落数与溶媒对照组比较明显增加。见表 3。

表 2 泰格列净非活化 (-S9) 系统 Ames 实验结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Ames experimental results of Tianagliflozin in absence of S9 mix ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

药物	剂量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{皿}^{-1})$	TA97	TA98	TA100	TA102	TA1535
空白对照	—	123.3±12.9	25.0±3.6	113.3±11.8	232.2±10.0	8.3±2.0
溶媒对照	—	121.2±5.0	24.5±6.0	120.2±4.0	233.5±9.2	11.5±2.6
泰格列净	31.25	111.8±12.8	23.7±2.9	118.3±14.8	230.2±11.9	9.3±1.0
	125.00	122.3±7.3	26.7±4.6	120.7±12.2	205.8±11.3 <sup>△</sup>	9.3±1.6
	500.00	105.0±7.4	27.5±4.4	129.7±9.8	152.0±11.8 <sup>△</sup>	8.7±1.4
	1 000.00	51.3±50.3 <sup>△</sup>	20.3±7.3 <sup>△</sup>	98.0±7.3 <sup>△</sup>	50.3±24.7 <sup>△</sup>	10.7±3.1
2 000.00	9.0±6.7 <sup>△</sup>	15.0±3.1 <sup>△</sup>	77.5±7.8 <sup>△</sup>	0.0±0.0 <sup>△</sup>	9.7±3.0	
敌克松	50	3 963.3±388.8*	1 343.7±278.0*	—	1 713.0±301.1*	—
叠氮钠	1.5	—	—	530.0±86.6*	—	535.8±93.0*

\*: 回变菌落数超过溶媒对照组的 2 倍以上;  $\Delta$ : 背景菌苔减少, 表示有细菌毒性

\*: the number of mutated colonies was more than 2 times that of the vector control group;  $\Delta$ : background bacterial reduction and bacterial toxicity

表 3 泰格列净活化 (+S9) 系统 Ames 实验结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 3 Ames experimental results of Tianagliflozin in presence of S9 mix ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

药物	剂量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{皿}^{-1})$	TA97	TA98	TA100	TA102	TA1535
空白对照	—	137.2±11.4	27.8±3.9	121.0±13.4	271.0±16.0	14.5±2.7
溶媒对照	—	137.5±10.0	31.2±7.9	124.0±14.6	256.0±16.3	13.0±3.4
泰格列净	31.25	146.3±10.4	27.3±6.4	118.5±13.1	249.2±12.6	14.7±4.6
	125.00	133.0±7.8	28.5±6.2	126.0±14.9	259.3±7.9	13.8±2.0
	500.00	136.7±14.4	26.8±5.0	116.7±10.6	254.5±13.3	13.2±3.1
	1 000.00	127.8±12.2	24.0±6.2 <sup>△</sup>	121.7±10.9	180.8±43.3 <sup>△</sup>	12.5±4.3
	2 000.00	35.5±14.7 <sup>△</sup>	19.2±4.1 <sup>△</sup>	94.5±16.4 <sup>△</sup>	37.3±23.0 <sup>△</sup>	12.8±2.6
2-氨基蒽	5	3 201.7±285.3*	2 355.0±218.0*	3 021.7±494.5*	779.3.0±82.2*	283.0±24.7*

\*: 回变菌落数超过溶媒对照组的 2 倍以上;  $\Delta$ : 背景菌苔减少, 表示有细菌毒性

\*: the number of mutated colonies was more than 2 times that of the vector control group;  $\Delta$ : background bacterial reduction and bacterial toxicity

#### 4 讨论

Ames 试验是一种快速检测受试物致突变性和致癌性的方法,而受试物的毒性作用可以导致 Ames 试验出现假阳性结果,由于受试物杀死了大部分细菌,使残存的细菌得以利用培养基中微量的组氨酸和生物素生长成肉眼可见的菌落,结合显微镜分析可排除由于受试物毒性导致的假阳性结果,从而提高结果判断的准确性<sup>[2]</sup>。

本研究设置的阳性对照组在有或无 S9 活化条件下,各菌株回变菌落平均数均超过溶媒对照组回变菌落平均数的 2 倍,证实试验系统有效。研究结果显示,在有或无 S9 活化系统的情况下,随着受试物剂量的增加,受试物各剂量组的回变菌落数均未超过溶媒对照组回变菌落数的 2 倍,且无剂量相关性。结果表明,在有或无代谢活化系统条件下,泰格列净对组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌 TA97、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 5 种试验菌株均未呈现致突变性。遗传毒

性试验方法有很多种,但没有任何单一试验方法能检测所有遗传毒性物质,因此,通常采用体外和体内遗传毒性试验组合的方法,以减少遗传毒性物质的假阳性结果<sup>[3]</sup>,之后本课题组将进行体内微核、细胞试验,这些试验相互补充,对结果判断综合考虑,进一步探讨泰格列净是否具有致突变性。

#### 参考文献

- [1] Ames B N, McCann J, Yamasaki E. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian micronucleus mutagenicity test [J]. *Mutat Res*, 1975, 31: 347-364.
- [2] 陈颖,姜娟,杨阳,等. Ames 试验假阳性的判断方法 [J]. *生物技术通讯*, 2014, 25(2): 242-244.
- [3] 《药物遗传毒性研究技术指导原则》课题研究组. 药物遗传毒性研究技术指导原则 [S]. 2008.
- [4] 柴莲花,王新刚,邬惠琼. 香薰的致突变性研究 [J]. *癌变·畸变·突变*, 1996, 8(3): 175-177.