

大鼠肝彗星试验与骨髓微核试验评价结果比较研究

文海若, 兰洁, 叶倩, 王曼虹, 王雪, 汪祺*, 耿兴超*

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要: 目的 梳理国家药物安全评价监测中心联合开展的大鼠多终点体内遗传毒性试验数据, 比较大鼠肝彗星试验与骨髓微核试验结果的一致性和灵敏性。方法 试验分设阴性物质组、作用机制明确的遗传毒性阳性物质组、受试物组, 阴性物质组包括超纯水、0.9%氯化钠注射液、玉米油、0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、5%蔗糖和聚山梨酯 80, 给药体积为 10 mL·kg⁻¹; 遗传毒性阳性物质组包括 200 mg·kg⁻¹ 甲磺酸乙酯(EMS)、40 mg·kg⁻¹ *N*-乙基-*N*-亚硝基脲(ENU)、40 mg·kg⁻¹ 环磷酰胺、75 mg·kg⁻¹ 甲基苄肼、800 mg·kg⁻¹ 尿烷、75 mg·kg⁻¹ 对氯苯胺、40 mg·kg⁻¹ 1, 2-二溴-3-氯丙烷和 10 mg·kg⁻¹ 秋水仙素; 受试物包括 100、300、1 000 mg·kg⁻¹ 大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、6.5、65.0、650.0 mg·kg⁻¹ 单蒽酮和 6.5、65.0、650.0 mg·kg⁻¹ 大黄素甲醚。分别在实验 0、24、45 h 给药 1 次, 给药体积为 10 mL·kg⁻¹。开展大鼠肝彗星试验和骨髓微核试验, 计算每只动物的肝细胞刺猬细胞率和尾 DNA 百分含量(Tail% DNA), 以及每只动物的嗜多染红细胞(PCE)/总红细胞(ERY)比例和嗜多染红细胞微核(MNPCE)率。结果 大鼠肝彗星试验可有效检出 DNA 断裂剂, 对多种烷化剂(甲磺酸乙酯、甲基苄肼和尿烷等)有较好的预测性, 但对环磷酰胺和多倍体诱导剂不灵敏。大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷、单蒽酮和大黄素甲醚骨髓微核试验结果均为阴性。大黄素-8-*O*-β-*D*-葡萄糖苷在 1 000 mg·kg⁻¹ 剂量下导致的肝 Tail% DNA 与 0.5% CMC-Na 组比较显著升高($P < 0.05$); 单蒽酮的肝彗星试验结果为明确阳性, 剂量为 650 mg·kg⁻¹ 时, 单蒽酮可导致大鼠肝 Tail% DNA 显著升高($P < 0.05$), 且作用存在剂量相关性; 大黄素甲醚的肝彗星试验结果为阴性。结论 大鼠肝彗星试验可与骨髓微核试验互补, 有效检出主要作用于肝脏且亲电子性较强的遗传毒性化合物。

关键词: 大鼠; 彗星试验; 微核试验; 遗传毒性; 一致性; 灵敏性; 比较研究

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)10-2002-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.10.009

Comparative study on evaluation results of liver comet assay and bone marrow micronucleus test in rats

WEN Hairuo, LAN Jie, YE Qian, WANG Manhong, WANG Xue, WANG Qi, GENG Xingchao

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract: Objective The data of multi-endpoint *in vivo* genotoxicity tests in rats jointly carried out by the National Center for Safety Evaluation of Drugs was analyzed, and the consistency and sensitivity of rat liver comet assay and bone marrow micronucleus test results were compared. **Methods** The test was divided into negative substance, genotoxic positive substance with clear mechanism of action, and subject group. Negative substances included ultra-pure water, 0.9% sodium chloride injection, corn oil, 0.5% sodium carboxymethyl cellulose (CMC-Na), 5% sucrose and polysorbide 80, with an administration volume of 10 mL·kg⁻¹. Genotoxic substances included 200 mg·kg⁻¹ ethyl mesylate (EMS), 40 mg·kg⁻¹ *N*-ethyl-*N*-nitrourea (ENU), 40 mg·kg⁻¹ cyclophosphamide, 75 mg·kg⁻¹ methyl benzyl hydrazine, 800 mg·kg⁻¹ urane, 75 mg·kg⁻¹ *p*-chloroaniline, 40 mg·kg⁻¹ 1, 2-dibromo-3-chloropropane and 10 mg·kg⁻¹ colchicine. The subjects included 100, 300 and 1 000 mg·kg⁻¹ emodin -8-*O*-β-*D*-glucoside, 6.5, 65.0 and 650.0 mg·kg⁻¹ monanthrone and 6.5, 65.0 and 650.0 mg·kg⁻¹ emodin methyl ether. At 0, 24 and 45 h of the experiment, the drug was given once ig in a volume of 10 mL·kg⁻¹. The rat liver comet test and bone marrow micronucleus test were performed. The hepatocyte hedgehog cell rate and Tail% DNA content (Tail% DNA), polychromatic red blood cell (PCE)/total red blood cell (ERY) ratio and polychromatic red blood cell micronucleus (MNPCE) rate of each animal were calculated. **Results** Rat liver comet assay could

收稿日期: 2022-04-24

基金项目: 国家十三五“重大新药创制”专项课题(2018ZX09201017); 国家自然科学基金资助项目(81503347)

第一作者: 文海若, 研究员, 研究方向为遗传毒理。

*共同通信作者: 汪祺, 研究员, 研究方向为药理毒理。E-mail: sansan8251@sohu.com

耿兴超, 研究员, 研究方向为药理毒理。E-mail: gengxch@nifdc.org.cn

effectively detect chemicals inducing DNA breakage and various alkylating agents (ethyl methanesulfonate, methyl benzylhydrazine and urane, etc.), while it was not insensitive to cyclophosphamide and polyploid inducer. The results of bone marrow micronucleus test were negative for emodin-8-*O*- β -*D*-glucoside, single anthrone and emodin-methyl ether. The liver % Tail DNA induced by emodin 8-*O*- β -*D*-glucoside at 1 000 mg·kg⁻¹ was significantly increased compared with 0.5% CMC-Na group ($P < 0.05$). The results of liver comet test of single ananthone were clearly positive. At a dose of 650 mg·kg⁻¹, single ananthone could significantly increase liver %Tail DNA ($P < 0.05$), and there was a dose-dependent effect. The liver comet test for emodin was negative. **Conclusion** As the second *in vivo* genotoxicity test recommended by the testing guideline, the rat liver comet assay could complement with the bone marrow micronucleus test and effectively detect genotoxic compounds that mainly act on the liver and are highly electrophilic.

Key words: rat; comet assay; micronucleus test; genotoxicity; consistency; sensitivity; comparative study

彗星试验又称单细胞凝胶电泳试验(SCGE),可针对药物蓄积部位及靶器官研究受试物对DNA损伤的影响,尤其是对短时间内诱发的DNA损伤较为敏感^[1]。碱性彗星试验则根据细胞样本在强碱性条件下(pH \geq 13)裂解后可同时检出DNA单链和双链的断裂的原理,评价包括受试物直接作用引起的DNA断裂、碱性不稳定性位点引起的DNA断裂和DNA切割修复所引起的瞬时DNA链断裂。彗星试验在放射毒理学、生态毒理学、肿瘤细胞生物学、流行病学及药物毒理学等领域应用较为广泛^[2],大量试验提示其结果与DNA损伤及肿瘤发生风险存在一定关联。如人外周淋巴血细胞彗星试验数据显示,年龄及污染因素与彗星拖尾的严重程度成正相关^[3]。体内彗星试验既可考察化合物与DNA的亲合力(染色体损伤之外的第2个评价终点),又可兼顾体内试验的优势,即考虑到受试物在体内吸收、分布、代谢和排泄等可能影响其遗传毒性的过程,在遗传毒性试验策略中意义重大。因此,国际人用药品注册技术协调会(International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH)在2011年颁布的ICH S2(R1)中建议在体内遗传毒性研究中增加肝细胞彗星试验或其他组织靶点的体内试验^[4]。ICH S2(R1)强调了将2个遗传学终点以联合的形式进行,即在1个动物试验系统中同时开展2个不同遗传终点的检测。国际上已完成肝细胞彗星试验实验室间联合验证工作,且经济合作与发展组织(OECD)于2014年颁布体内碱性彗星试验指导原则^[5]。我国于2018年新颁布的《药物遗传毒性研究技术指导原则》^[6]中也列入了该方法,国内的体内彗星试验实验室间联合验证工作计划于2022年完成。

在上述背景下,体内彗星试验已在国内药物安全评价领域得到一定标准化及推广。然而,彗星试验作为遗传毒性试验组合试验之一,与传统的体内

骨髓微核试验结果的相关性有待探讨。本研究梳理国家药物安全评价监测中心联合开展的大鼠体内骨髓微核和肝细胞彗星试验数据,就彗星试验数据与微核试验结果的一致性和灵敏性进行比较,就彗星试验作为第2项体内试验的价值进行讨论。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠,给药时约6周龄,体质量210~280 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(京)2016-0011。大鼠饲养于屏障系统内聚碳酸酯鼠盒中,饲养环境温度保持20~26℃,湿度保持40%~70%,饲养密度为每笼2~3只。实验动物自由摄取经钴-60放射灭菌的鼠全价颗粒饲料,饮用水为经高压灭菌的自来水。研究方案通过国家药物安全评价监测中心实验动物福利伦理委员会的伦理审查(审查编号 IACUC-2017-K023、IACUC-2019-K014、IACUC-2019-054和IACUC-2021-096)。

1.2 主要仪器

H500FR台式高速冷冻离心机(Kokusan公司);Olympus BX63光学显微镜(Olympus公司);Olympus IX71光学显微镜(Olympus公司);MAXI N610.1标准水平电泳仪(Carl Roth公司);NTS-1300恒温振荡水槽(东京理化器械株式会社);Countess II自动细胞计数仪(Thermo Fisher公司);Comet Assay IV(Instem公司)。

1.3 主要试剂

大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷(质量分数 $>96\%$,批号Z08J7B17476)、大黄素甲醚(质量分数 $>99\%$,批号110758-201616),均购自中国食品药品检定研究院;单萘酮(质量分数 $>95\%$)由中国食品药品检定研究院杨建波博士提供。超纯水(MilliQ-A10超纯水机自制);0.9%氯化钠注射液(石家庄四药有限公司);玉米油、羧甲基纤维素钠(CMC-Na)、蔗糖、聚山梨酯80、环磷酰胺、甲磺酸乙酯(EMS)和*N*-乙

基-*N*-亚硝基脲(ENU)、对氯苯胺、1,2-二溴-3-氯丙烷、乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na),均购自 Sigma-Aldrich 公司;甲基苄肼(大连美仑生物技术有限公司);尿烷(中国食品药品检定研究院);秋水仙素($10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, Fluka 公司);Comet Assay[®] Kit 彗星检测试剂盒(Trevigen 公司);汉克斯平衡盐(HBSS, Cellgro 公司);磷酸盐缓冲液(PBS, Cellgro 公司);无水乙酸、无水甲醇(北京化工厂);胎牛血清(Gibco 公司);SYBR Green I nuclei acid gel stain(Life Technologies 公司);Giemsa 染料(Sigma-Aldrich 公司);吖啶橙(Fluka 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药

试验分设 3 个不同给药组,每组 5 只大鼠。阴性物质包括超纯水、0.9%氯化钠注射液、玉米油、0.5% CMC-Na、5%蔗糖和聚山梨酯 80,给药体积为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。作用机制明确的遗传毒性阳性物质包括 $200\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ EMS、 $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ENU、 $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 环磷酰胺、 $75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 甲基苄肼、 $800\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 尿烷、 $75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 对氯苯胺、 $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 1,2-二溴-3-氯丙烷和 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 秋水仙素。受试物包括 100 、 300 、 $1\ 000\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷、 6.5 、 65.0 、 $650.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 单蒽酮和 6.5 、 65.0 、 $650.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 大黄素甲醚,剂量设置参考本课题组前期研究成果^[7-8]。分别在实验 0、24、45 h 给药 1 次,给药体积为 $10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。

2.2 一般状态观察

给药期间每天上午和下午对所有动物进行隔笼观察,包括动物是否死亡或濒死,活动状况、外观及被毛、有无外伤、粪便情况等。

2.3 动物处死、脏器称质量及取材

所有动物在首次给药后 48~51 h ip 2.5% 硫喷妥钠($50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)麻醉,动物完全放血处死后取材,肝脏分离后迅速称质量,并取肝左叶中间部分约 5 mm^3 组织制备单细胞悬液;摘取大鼠单侧股骨用于骨髓微核试验。

2.4 碱性彗星试验

2.4.1 单细胞悬液制备 将肝组织放入预冷的切碎液中反复刷洗。之后放入 5 mL 离心管内,加入 3 mL 预冷的切碎液,用剪刀剪碎组织以释放细胞,制成单细胞悬液,然后轻轻吹打约 15 次后,放冰盒内备用。

2.4.2 制片、裂解、解旋及电泳 肝细胞需使用切碎液调整密度至 $2.0\times 10^4\sim 2.0\times 10^5\cdot\text{mL}^{-1}$ 。根据试剂盒说明准备裂解液、LM 琼脂糖凝胶等试剂,放置

适宜温度保存。 1.5 mL 试管 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴预热,每管预先加入 $500\text{ }\mu\text{L}$ Comet LMAgarose,取 $50\text{ }\mu\text{L}$ 单细胞悬液加入试管中,用移液头迅速混合均匀 1~2 次后铺片,保证细胞均匀分布于每孔,1 次 1 孔,每孔 $500\text{ }\mu\text{L}$,每个样本平行 2 孔。铺片结束后迅速将玻片置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、避光冷却 30 min。将玻片置于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 预冷的裂解液中避光、 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 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($\text{pH}>13$)没过玻片。室温、避光解旋 20 min。电泳时设置电压为 $0.7\text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$,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。

2.4.3 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, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 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 Comet Assay IV 彗星图像分析软件(Instem 公司)进行分析,每个样品至少计数 100 个彗星细胞。(1)每只动物都要分析 100 个可分析的尾 DNA 百分含量(Tail% DNA)和 Olive 尾距(Olive Tail Moment)的中位数,计算每只动物 2 个孔的中位数的平均值及每个剂量组上述指标均值的组平均值及标准差,每孔 50 个;(2)每只动物需计数 100 个细胞中“刺猬细胞”的数量。

2.5 骨髓微核试验

取大鼠单侧股骨,剪断两端开放骨髓腔后,使用注射器吸取 1~2 mL 胎牛血清冲洗骨髓并吹打为骨髓细胞悬液。室温条件下以 $1\ 000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃去大部分上清液,将骨髓细胞沉淀吹打均匀。吸取适量骨髓悬液推片,标本于室温自然干燥。样本经甲醇固定 15 min 后自然晾干。

2.5.1 Giemsa 染色 用 $0.067\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液($\text{pH}\ 6.8$)将 Giemsa 染色原液稀释,配制成 3%~5% 的 Giemsa 应用液;将甲醇固定后的玻片标本浸入 Giemsa 应用液中,染色 15~30 min;将染色后的标本置自来水或超纯水中冲洗干净,室温下自然干燥。

2.5.2 吖啶橙染色 染色前,将 0.1% 吖啶橙染液与 $0.067\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液($\text{pH}\ 6.8$)按 1:15 的比例混合,配制成吖啶橙应用液;将甲醇固定后的标本置

于吖啶橙应用液中,染色1~3 min;将染色后的标本置0.067 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 6.8)中浸泡1~3 min,重复1~3次。

显微镜下观察计数Giemsa染色玻片,每只动物计数500个总红细胞(ERY)中的嗜多染红细胞(PCE)和正染红细胞(NCE)的数目。荧光显微镜下(总放大倍数约为400~1 000)观察吖啶橙染色玻片,每只动物总共计数4 000个PCE中含微核PCE(MNPCE)数目。计算每只动物的PCE/ERY和MNPCE率。

2.6 结果分析

结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用SPSS 20.0软件分析,组间均数比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 已知遗传毒性化合物肝彗星试验和骨髓微核试验结果比较

实验期间各组动物一般状态均未见明显异常。首先就常用动物ig溶媒和遗传毒性作用机制明确的化合物的肝彗星试验和骨髓微核试验结果进行比较(表1)。所有溶媒(包括水、0.9%氯化钠注射液、玉米油、0.5% CMC-Na、5%蔗糖和聚山梨酯80)的肝刺猬细胞发生率、肝Tail% DNA、骨髓PCE/ERY和MNPCE率均在文献报道范围之内,肝Tail% DNA不超过3.20%,MNPCE率不超过0.20%,符合预期。

EMS为彗星试验最常用阳性对照,连续3 d给

予后,肝Tail% DNA和MNPCE率与超纯水组比较均升高,且存在显著性差异($P < 0.01$ 、 0.001),但MNPCE率偏低。

ENU是体内基因突变试验的最常用阳性对照,研究显示其在大鼠体内彗星试验和骨髓微核试验中均呈阳性结果,但数值偏低^[9]。

环磷酰胺为体内骨髓微核试验最常用的阳性对照,MNPCE率与超纯水组比较显著升高($P < 0.01$)。但因在体内可与谷胱甘肽结合无法持续产生DNA损伤作用^[10],因此肝彗星试验结果呈阴性。

甲基苄肼、尿烷、对氯苯胺、1,2-二溴-3-氯丙烷分别为2A、2A、2B和2B类致癌物。其中甲基苄肼和尿烷的肝彗星试验和骨髓微核试验结果均为明确阳性。对氯苯胺剂量为75 mg·kg⁻¹时肝彗星试验结果为明确阳性但骨髓微核试验结果为阴性;1,2-二溴-3-氯丙烷肝彗星试验结果为明确阳性,骨髓微核试验结果虽与超纯水组比较升高且存在显著性差异($P < 0.05$),但数值较低。秋水仙素为多倍体诱导剂,大鼠肝彗星试验结果为阴性符合预期,大鼠MNPCE率与溶媒对照组比较略高,但差异未达显著性。

3.2 遗传毒性不明确化合物肝彗星试验和骨髓微核试验结果比较

大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷、单蒽酮和大黄素甲醚均为大黄素型蒽醌类化合物^[11],因具有羟基蒽醌

表1 已知遗传毒性化合物肝彗星试验和骨髓微核试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 1 Results of liver comet assay and bone marrow micronucleus test for known genotoxic compounds ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肝彗星试验		骨髓微核试验	
		刺猬细胞/%	Tail% DNA/%	PCE/ERY	MNPCE率/%
超纯水	—	1.20±1.10	2.64±0.49	0.51±0.06	0.17±0.07
0.9%氯化钠注射液	—	0.80±1.79	2.94±0.93	0.53±0.03	0.09±0.06
玉米油	—	1.20±0.84	3.20±0.57	0.53±0.04	0.19±0.08
0.5% CMC-Na	—	1.13±0.67	2.23±0.48	0.54±0.02	0.20±0.10
5%蔗糖	—	1.43±0.98	2.14±0.18	0.52±0.05	0.20±0.08
聚山梨酯80	—	0.10±0.05	0.89±0.12	0.51±0.02	0.06±0.01
EMS	200	2.76±0.69	16.13±5.52***	0.47±0.04	2.10±0.38**
ENU	40	1.40±0.55	6.09±1.25*	0.51±0.04	1.53±0.29**
环磷酰胺	40	1.42±1.14	5.32±1.04	0.50±0.04	6.64±0.86**
甲基苄肼	75	2.33±0.51	24.49±5.81***	0.42±0.03	12.50±4.33**
尿烷	800	1.91±0.76	7.28±0.53*	0.45±0.03	1.52±0.33**
对氯苯胺	75	2.87±1.22	19.68±3.56**	0.47±0.02	0.13±0.03
1,2-二溴-3-氯丙烷	40	1.98±0.37	16.40±9.26**	0.52±0.05	0.58±0.25*
秋水仙素	10	3.20±0.73	5.54±1.74	0.52±0.05	0.24±0.07

与超纯水组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs ultrapure water group

结构及蒽-9,10-二醇前体结构认为均存在致突变风险。如表2所示,尽管3者骨髓微核试验结果均为阴性,但肝彗星试验结果有所不同。大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷在1 000 mg·kg⁻¹剂量下导致的肝细胞平均Tail% DNA与0.5%CMC-Na组比较升高,且存在显著性差异($P <$

0.05)。单蒽酮的肝彗星试验结果为明确阳性,剂量为650 mg·kg⁻¹时,单蒽酮可导致大鼠肝细胞平均Tail% DNA升高,与0.5% CMC-Na组比较差异显著($P <$ 0.01),且作用存在剂量相关性。大黄素甲醚的肝彗星试验结果为阴性。

表2 遗传毒性不明确化合物肝彗星试验和骨髓微核试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

Table 2 Results of liver comet assay and bone marrow micronucleus test for unknown genotoxic compounds ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肝彗星试验		骨髓微核	
		刺猬细胞率/%	Tail% DNA/%	PCE/ERY	MNPCE率/%
0.5% CMC-Na	—	2.02±1.41	2.23±0.48	0.54±0.02	0.20±0.10
大黄素-8- <i>O</i> - β - <i>D</i> -葡萄糖苷	100	2.11±0.66	3.05±0.92	0.59±0.06	0.26±0.17
	300	3.02±1.89	3.67±1.08	0.57±0.03	0.38±0.19
	1 000	2.33±1.67	5.14±0.82*	0.53±0.04	0.35±0.13
单蒽酮	6.5	1.43±0.98	2.61±0.44	0.51±0.04	0.19±0.08
	65.0	0.10±0.05	5.74±0.92	0.50±0.02	0.32±0.01
	650.0	2.76±0.69	9.45±3.90**	0.46±0.04	0.46±0.18
大黄素甲醚	6.5	1.58±0.95	2.56±1.88	0.53±0.04	0.20±0.08
	65.0	1.98±1.23	2.42±1.25	0.55±0.05	0.25±0.13
	650.0	1.73±0.64	3.05±1.46	0.56±0.03	0.18±0.10

与0.5% CMC-Na组比较: * $P <$ 0.05 ** $P <$ 0.01

* $P <$ 0.05 ** $P <$ 0.01 vs 0.5% CMC-Na group

4 讨论

尽管遗传毒性评价是以体外试验为主的评价体系,最新的ICH S2(R1)指导原则强调了体内遗传毒性研究的意义,并提出可以1项细菌回复突变试验和2项体内试验作为标准评价组合对药物遗传毒性进行评价^[4]。传统体内遗传毒性试验,即骨髓微核试验和骨髓染色体畸变试验,均以造血系统为取材组织。而随着新兴化合物的涌现,基于不同靶向的化合物在造血系统中的暴露量较低,因此传统的2项试验可能不适合评价其遗传毒性^[12]。此外,一些代谢后产生遗传毒性的化合物,也建议开展多种组织的体内遗传毒性评价从而预测其致癌风险。体内大鼠彗星试验正是基于上述背景在近年来得到迅速发展,并成为当前遗传毒性指导原则建议的第2种体内遗传毒性试验方法。该方法可考察受试物对体内靶组织的遗传毒性作用,并推荐以多终点联合的形式开展^[6]。国内自2015年起开展实验室间体内彗星试验联合验证工作,该方法也写入了我国的遗传毒性试验指导原则。目前已有多家机构有能力开展良好实验室规范(GLP)条件下的大鼠肝彗星试验。

本研究比较了多种化合物大鼠肝彗星试验和骨髓微核试验结果,给药方式均为连续3 d ig给予。结果发现,彗星试验可有效检出DNA断裂剂,对多

种烷化剂(EMS、甲基苄肼和尿烷等)有较好的预测性,但对环磷酰胺和多倍体诱导剂不灵敏。课题组前期研究发现大黄素甲醚不导致沙门氏菌回复突变^[13],且连续给予大鼠14 d大黄素甲醚体内微核试验和彗星试验结果均为阴性^[7]。而大黄素-8-*O*- β -*D*-葡萄糖苷存在致DNA损伤风险,且遗传毒性风险与其体内代谢产物有关^[8]。前期单蒽酮体外基因突变试验及彗星试验均提示其存在遗传毒性作用风险^[14]。可见,与骨髓微核试验相比,大鼠体内肝彗星试验对于遗传毒性作用不明确的化合物较为灵敏,与体外遗传毒性试验结果基本一致。Bowen等^[15]研究比较了大鼠彗星试验和骨髓微核试验联合开展时的灵敏性和有效性,发现二者各有侧重:前者可有效检出苯并(a)芘和氨基苄,而后者可有效检出多菌灵和丝裂霉素的遗传毒性作用。因此联合开展时,在节约受试物用量、节省动物使用成本(40%~70%)的同时,提高检测的灵敏性^[16]。Serpeloni等^[17]发现因化合物的蓄积组织或靶器官不同,肝彗星试验和骨髓微核试验检测组织不同,结果可能有所出入。Vasquez则指出为避免肝彗星试验的假阳性结果,必须重视实验室背景数据的积累,需以细胞毒性为彗星图像分析数据评价的基础。Bowen等^[15]建议大鼠彗星试验给药剂量分别为最大耐受剂量(MTD)、50%MTD和10%MTD为宜。

大鼠肝彗星试验作为第2项体内遗传毒性试验,可与骨髓微核试验互补,有效检出主要作用于肝脏且亲电子性较强的遗传毒性化合物。考虑到其结果较为灵敏,在推进其用于药物评价时,应注重实验室试验经验积累,在剂量设计和试验具体操作等环节避免假阳性结果,从而提高数据的可靠性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 文海若,毛志慧,陈高峰,等. SD大鼠连续灌胃给药对碱性彗星电泳和骨髓微核的影响[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(6): 1063-1070.
Wen H R, Mao Z H, Chen G F, et al. Effects of repeated intragastric administration on alkaline comet assay and micronucleus test in SD rats [J]. Chin J Pharm Anal, 2017, 37(6): 1063-1070.
- [2] Jha A N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay [J]. Mutagenesis, 2008, 23(3): 207-221.
- [3] Erismis U C, IH Ciğerci, Konuk M. Evaluation of DNA damage in Eurasian marsh frogs (*Pelophylax ridibundus*) by comet assay for determination of possible pollution in the different lakes in central Anatolia, Turkey [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2013, 90(6): 660-665.
- [4] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Guidance on Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2(R1)(Step 4 version)[EB/OL]. (2013-11-02) [2021-04-22]. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines
- [5] OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals No. 489: *In vivo* mammalian alkaline comet assay [EB/OL]. (2014-09-26) [2021-04-22]. <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecdtg489-2014.pdf>.
- [6] 国家食品药品监督管理总局. 药物遗传毒性研究技术指导原则 [S]. 2018.
National Medical Products Administration. Guidance on genotoxicity study for pharmaceuticals [S]. 2018.
- [7] Bhalli J A, Neft R, Noteboom J, et al. Caffeic acid genotoxicity: Correlation of the pig-a assay with regulatory genetic toxicology *in vivo* endpoints [J]. Environ Mol Mutagen, 2019, 60(9): 837-844.
- [8] Tsai-Turton M, Luong B T, Tan Y M, et al. Cyclophosphamide-induced apoptosis in COV434 human granulosa cells involves oxidative stress and glutathione depletion [J]. Toxicol Sci, 2007, 98(1): 216-230.
- [9] 汪祺,李勇,王亚丹,等. 基于分子对接和体外大鼠肝微粒体抑制实验综合考察何首乌中潜在肝毒性成分研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(4): 635-640.
Wang Q, Li Y, Wang Y D, et al. Investigation of potential hepatotoxic components in *Polygonum multiflorum* based on molecular docking and rat liver microsome inhibition test [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(4): 635-640.
- [10] Wang D, Dan M, Ji Y L, et al. Single-dosed genotoxicity study of gold nanorod core/silver shell nanostructures by Pig-a, micronucleus, and comet assays [J]. J Biomed Nanotechnol, 2018, 14(11): 1953-1964.
- [11] 任璐,文海若,吕建军,等. SD大鼠重复给予大黄素甲醚肝毒性与遗传毒性研究 [J]. 药物分析杂志, 2018, 38(10): 1719-1726.
Ren L, Wen H R, Lv J J, et al. Hepatotoxicity and genotoxicity study of physcion in SD rats with repeated doses [J]. Chin J Pharm Anal, 2018, 38(10): 1719-1726.
- [12] 文海若,颜玉静,宋捷,等. 大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷的体内外遗传毒性评价 [J]. 中国药房, 2020, 31(1): 18-23.
Wen H R, Yan Y J, Song J, et al. Study on *in vitro* and *in vivo* genotoxicity of emodin-8-O-β-D-glucoside [J]. China Pharm, 2020, 31(1): 18-23.
- [13] 王亚楠,王雪,汪祺,等. 基于毒理学软件和细菌回复突变试验的大黄素型蒽醌基因突变风险评估 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(7): 1240-1247.
Wang Y N, Wang X, Wang Q, et al. Evaluation on mutagenic risk of emodin-type anthraquinone based on toxicology software and bacterial recovery mutation test [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(7): 1240-1247.
- [14] 文海若,王亚楠,杨莹,等. 大黄素型单蒽酮基因突变风险评估 [J]. 中国药物警戒, 2020, 17(8): 455-460.
Wen H R, Wang Y N, Yang Y, et al. Mutagenic risk evaluation of monanthrone with emodin type [J]. Chin J Pharmacovigil, 2020, 17(8): 455-460.
- [15] Bowen D E, Whitwell J H, Lillford L, et al. Evaluation of a multi-endpoint assay in rats, combining the bone-marrow micronucleus test, the Comet assay and the flow-cytometric peripheral blood micronucleus test [J]. Mutat Res, 2011, 722(1): 7-19.
- [16] Pfuhrer S, Kirkland D, Kasper P, et al. Reduction of use of animals in regulatory genotoxicity testing: Identification and implementation opportunities-Report from an ECVAM workshop [J]. Mutat Res, 2009, 680(1/2): 31-42.
- [17] Serpeloni J M, Grotto D, Aissa A F, et al. An evaluation, using the comet assay and the micronucleus test, of the antigenotoxic effects of chlorophyll b in mice [J]. Mutat Res, 2011, 725(1/2): 50-56.

[责任编辑 兰新新]