

## 亚硝胺化合物对人源肝癌细胞 HepG2 的 DNA 损伤风险评价

文海若<sup>#</sup>, 叶倩<sup>#</sup>, 于敏, 王雪, 汪祺<sup>\*</sup>, 耿兴超<sup>\*</sup>

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

**摘要:** 目的 使用人肝癌 HepG2 细胞筛选亚硝胺的体外彗星试验的 S9 mix 配方, 并对 17 种常见的亚硝胺化合物开展彗星试验, 研究其 DNA 亲和力和碱基嵌入风险。方法 在非 S9 活化和 S9 活化条件下对 HepG2 细胞进行 *N*-二甲基亚硝胺 (NDMA)、*N*-二乙基亚硝胺 (NDEA)、*N*-亚硝基二丁胺 (NDBA)、*N*-亚硝基二异丙胺 (NDIPA)、*N*-亚硝基-*N*-甲基-4-氨基丁酸 (NMBA)、*N*-亚硝基甲乙胺 (NMEA)、*N*-亚硝基-*N*-乙基异丙胺 (NEIPA)、*N*-亚硝基二丙胺 (NDPA)、*N*-甲基-*N*-亚硝基苯胺 (NMPA)、亚硝基二苯胺 (NDPh)、二乙醇亚硝胺 (NDELA)、亚硝基吗啉 (NMOR)、亚硝基-*N*-甲基-*N*-(2-苯基)乙胺 (NMPEA)、亚硝基吡咯烷 (NPYR)、亚硝基哌啶 (NPIP)、4-甲基亚硝胺基-1-3-吡啶基-1-丁酮 (NNK)、*N*-亚硝基降烟碱 (NNN) 给药处理, 2 种条件均设置溶媒对照 (0.5% DMSO)、3 个浓度梯度的给药组和阳性对照组, 在非 S9 活化条件下以甲基磺酸甲酯 (MMS) 为阳性对照, S9 活化条件下以环磷酰胺 (CP) 为阳性对照。以 NDMA 和 NDEA 为例比较 3 种 S9 mix 配方对亚硝胺化合物体外 DNA 亲和力和 DNA 损伤风险, 选择效果最优者开展剩余化合物在 S9 条件下的彗星试验, 计算各组尾 DNA 含量百分率 (%tail DNA) 的平均值和中位数。结果 在非 S9 代谢活化条件下 17 种常见亚硝胺化合物均未导致 HepG2 细胞核 DNA 明显损伤。S9 mix 配方 C 中 S9 体积分数仅为 3.36%, 但对亚硝胺化合物的代谢活化效果最佳。在该条件下, 除 NDPh 外, 其余亚硝胺化合物均对 HepG2 细胞存在 DNA 的损伤作用。烷基类亚硝胺化合物对 DNA 损伤作用强弱顺序依次为 NDMA > NEIPA > NDPA > NMEA > NDEA > NDBA > NDIPA, 与化合物  $\alpha$  氢的数目基本呈正相关。含苯基的亚硝胺化合物对 DNA 损伤作用强弱顺序依次为 NMPEA > NMPA > NDPh, 而环状亚硝胺化合物对 DNA 损伤作用强弱顺序为 NMOR > NPIP  $\approx$  NPYR。结论 提供最新的亚硝胺化合物体外 DNA 损伤风险数据, 并提出适宜亚硝胺化合物的体外彗星试验 S9 mix 配方, 为亚硝胺化合物的毒性评价提供手段。

**关键词:** 亚硝胺化合物; DNA 损伤; 体外彗星试验; HepG2 细胞; 代谢活化

中图分类号: R994 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 11-2200-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.11.005

## DNA damage risk assessment of nitrosamine compounds on human hepatocyte HepG2

WEN Hairuo, YE Qian, YU Min, WANG Xue, WANG Qi, GENG Xingchao

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

**Abstract: Objective** The S9 mix formula of *in vitro* comet assay for nitrosamines was evaluated by human hepatoma HepG2 cells, and 17 common nitrosamines were tested by comet assay to study their DNA affinity and base embedding risk. **Method** HepG2 cells were treated with *N*-dimethylnitrosamine (NDMA), *N*-diethylnitrosamine (NDEA), *N*-nitrosodibutylamine (NDBA), *N*-nitrosodiisopropylamine (NDIPA), *N*-nitrosone-*N*-methyl-4-aminobutyric acid (NMBA), *N*-nitrosomethylethylamine (NMEA), *N*-nitrosone-ethylisopropylamine (NEIPA), *N*-nitrosodipropylamine (NDPA), *N*-methyl-*n*-nitroaniline (NMPA), nitrosodiphenylamine (NDPh), diethanol nitrosamine (NDELA), nitrosomorpholine (NMOR), nitroso-*N*-methyl-*N*-(2-phenyl) ethylamine (NMPEA), nitrosopyrrolidine (NPYR), nitroso piperidine (NPIP), 4-methylnitrosamine-1-3-pyridyl-1-butanone (NNK), *N*-nitrosoneornicotine (NNN) under non-S9-activated and S9-activated conditions, solvent control (0.5% DMSO), administration

收稿日期: 2022-04-24

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

#共同第一作者: 文海若, 研究员, 研究方向为遗传毒理。E-mail: hairuowen@163.com

叶倩, 研究生, 研究方向为遗传毒理。E-mail: 1633487699@qq.com

\*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

group with three concentration gradients and positive control group were set up, and methyl methylene (MMS) was used as the positive control under non-S9-activated conditions meanwhile cyclophosphamide (CP) as the positive control under the S9-activated conditions. Before the comet assay under S9-activated conditions, taking NDMA and NDEA as examples, the DNA affinity and DNA damage risk of three S9 mix formulations to nitrosamines *in vitro* were compared, then the average and median of %tail DNA in each group were calculated. **Results** Seventeen common nitrosamines didn't introduce significant nuclear DNA damage in HepG2 under the condition without S9 metabolic activation. The content of S9 in S9 mix formula C is only 3.36%, whereas demonstrated the best metabolic activation effect on nitrosamines, and all nitrosamine compounds had DNA damage effect on HepG2 cells under this condition except NDPh. The order of the strength of alkyl nitrosamines on DNA damage was as follows: NDMA > NEIPA > NDPA > NDIPA > NMEA > NDEA > NDBA, which had a positive correlation with the number of  $\alpha$ -hydrogen of compound. The order of DNA damage caused by nitrosamines containing phenyl groups was as follows: NMPEA > NMPA > NDPh, and the order of DNA damage caused by cyclic nitrosamines was as follows: NMOR > NPIP  $\approx$  NPYR. **Conclusion** This study provides the latest DNA damage risk data *in vitro* for nitrosamines, and a suitable comet assay S9 mix formula for nitrosamines *in vitro* was proposed, which provides a powerful method for the toxicity evaluation of nitrosamines.

**Key words:** nitrosamines; DNA damage; *in vitro* comet assay; HepG2 cells; metabolic activation

亚硝胺类化合物简称亚硝胺,是一类以亚硝基为母核的化合物<sup>[1]</sup>。国际癌症研究机构(IARC)于1972年将二甲基亚硝胺(NDMA)、*N*-二乙基亚硝胺(NDEA)等亚硝胺类化合物列为2A类致癌物。即对人类致癌证据有限,但在动物中获得充足的致癌数据且具备致癌物特征的化合物<sup>[2]</sup>。近年来,缬沙坦、雷尼替丁、二甲双胍等药物中亚硝胺类化合物含量超过规定限量的事件引发社会对亚硝胺的遗传毒理学评价及研究的关注。然而,亚硝胺类化合物种类繁多,而相关致突变性研究数据十分陈旧且可靠性有待考察。

彗星试验是评价化合物诱导DNA损伤风险的常用遗传毒性评价方法,用于检测单链断裂、双链断裂、氧化损伤和DNA交联等多种损伤<sup>[3]</sup>。试验原理主要基于损伤的DNA与完整的DNA电泳时的迁移速率不同,损伤的DNA经电泳后可形成“彗星”样结构,从而可通过凝胶电泳来区分受试物是否导致DNA链断裂<sup>[4]</sup>。通过测定DNA迁移部分的光密度可考察单个细胞DNA损伤程度,从而确定受试物的作用剂量与DNA损伤效应的关系<sup>[5]</sup>。尽管彗星试验的检测终点不是基因突变,但彗星试验结果为阳性时可提示化合物具有一定DNA亲和力,其结果可以作为细菌突变试验的补充。本研究使用人肝癌HepG2细胞比较了3种亚硝胺体外彗星试验的S9 mix配方,并对17种常见的亚硝胺化合物开展彗星试验,研究其DNA亲和力和碱基嵌入风险。

## 1 材料

### 1.1 细胞

HepG2细胞(10代以内)来自中国医学科学院细胞库,液氮保存。使用DMEM培养基(含10%胎

牛血清、1%青霉素链霉素混合液)于37℃、5%CO<sub>2</sub>条件下培养传代。扩增至所需细胞量后,进行给药及后续检测。

### 1.2 主要试剂

受试物:NDMA(批号510166-201902,质量分数99.7%)、NDEA(批号510168-101902,质量分数99.7%)购自中国食品药品检定研究院;*N*-亚硝基二丁胺(NDBA,批号19-NNI-69-61,质量分数99.59%)、*N*-亚硝基二异丙胺(NDIPA,批号19-NIT-06-45,质量分数99.42%)、*N*-亚硝基-*N*-甲基-4-氨基丁酸(NMBA,批号19-NIT-11-70,质量分数99.77%)、*N*-亚硝基甲乙胺(NMEA,批号19-NIT-42-70,质量分数98.49%)、*N*-亚硝基-*N*-乙基异丙胺(NEIPA,批号19-NIT-05-52,质量分数96.31%)、*N*-亚硝基二丙胺(NDPA,批号20-NIT-27-31,质量分数99.23%)、*N*-甲基-*N*-亚硝基苯胺(NMPA,批号19-NIT-24-56,质量分数96.77%)、亚硝基二苯胺(NDPh,批号20-NIT-51-39,质量分数99.34%)、二乙醇亚硝胺(NDELA,批号20-NIT-36-49,质量分数99.22%)、亚硝基吗啉(NMOR,批号20-NIT-40-52,质量分数99.32%)、亚硝基-*N*-甲基-*N*-(2-苯基)乙胺(NMPEA,批号20-NIT-46-20,质量分数99.93%)、亚硝基吡咯烷(NPYR,批号20-NIT-09-61,质量分数99.9%)、亚硝基哌啶(NPIP,批号19-NNI-11-15,质量分数97.83%)、4-甲基亚硝胺基-1-3-吡啶基-1-丁酮(NNK,批号20-MET-49-51,质量分数99.93%)、*N*-亚硝基降烟碱(NNN,批号20-NIT-37-64,质量分数99.73%)购自美国Pharmaceutical Chemistry Laboratory。DMEM培养基(中国Solarbio公司);0.25%胰酶(北京全式金生物技术股份有限公司);

胎牛血清(以色列 Biological Industries 公司); 二甲基亚砜(DMSO, 中国 Solarbio 公司); Trevigen Comet Assay® Kit 彗星检测试剂盒(美国 Trevigen 公司); SYBR Green I nuclei acid gel stain(美国 Invitrogen 公司)。阳性对照甲基磺酸甲酯(MMS, 批号 MKCG1346)和环磷酰胺(CP, 批号 WXBD0289V)购自美国 Sigma Aldrich 公司。大鼠肝 S9 混合液(由苯巴比妥钠和  $\beta$ -萘黄酮联合诱导大鼠肝脏制成)购自江苏齐氏生物科技有限公司。

### 1.3 主要仪器

5810R 型离心机(德国 Eppendorf 公司); DYCP31F 型电泳仪(北京市六一仪器厂); Eclipse 80i 荧光显微镜(日本 Nikon 公司); Komet 6.0 图像分析系统(英国 Andor Technology 公司)。

## 2 方法

### 2.1 细胞培养和给药处理

**2.1.1 细胞培养** HepG2 细胞以  $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$  接种到含 2 mL DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清、1% 青霉素和链霉素混合液)的 6 孔板中,并于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h。使用 PBS 清洗 2 次后,进行给药处理。

**2.1.2 非 S9 条件下给药处理** 试验平行设置溶媒对照(0.5% DMSO)组、给药组(每种化合物 3 个浓度,最高浓度产生的细胞毒性不超过 50%, NDMA: 15、30、70  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , NDEA: 25、50、100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , NMBA、NMPA、NDIPA、NEIPA、NDELA、NDPA、NMOR、NMEA、NPIP、NPYR: 32.5、75.0、150.0  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , NDBA、NDPh、NMPEA、NNN、NNK: 50、100、200  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )和 MMS(阳性对照, 25  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )组,每孔添加 2 mL 含 0.5% DMSO 或药物的 DMEM(不含血清)。将 6 孔板缓慢震荡混匀后,置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 24 h。使用胰酶消化细胞,并于室温以  $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,弃上清。使用培养基将细胞密度稀释至  $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.1.3 S9 条件下给药处理试验** 开展 S9 条件下的正式试验前,本研究以 NDMA 和 NDEA 为例比较了 3 种不同 S9 mix 配方(配方 A 来自常用细菌回复突变试验<sup>[6]</sup>、配方 B 来自体外染色体畸变试验<sup>[7]</sup>和配方 C 来自文献中的体外彗星试验<sup>[8]</sup>,配方见表 1)。之后选择效果最优者开展 17 种亚硝胺化合物 S9 条件下的彗星试验。

表 1 不同 S9 mix 配方组成

Table 1 Composition of different S9 mix formulations

配方 A		配方 B		配方 C	
组分	体积/mL	组分	体积/mL	组分	体积/mL
灭菌注射用水	3.35	灭菌注射用水	1	12.5 mmol·L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>	1.6
0.2 mol·L <sup>-1</sup> PNa 缓冲液	5.00	20 mol·L <sup>-1</sup> Hepes 缓冲液(pH 7.2)	2	37.5 mmol·L <sup>-1</sup> KCl	1.6
0.1 mol·L <sup>-1</sup> $\beta$ -NADP Na <sub>2</sub>	0.40	50 mmol·L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>	1	12.5 mmol·L <sup>-1</sup> CaCl <sub>2</sub>	1.6
1 mol·L <sup>-1</sup> G-6-P-Na <sub>2</sub>	0.05	330 mmol·L <sup>-1</sup> KCl	1	7.5 mmol·L <sup>-1</sup> $\beta$ -NADP Na <sub>2</sub>	1.6
1.65 mol·L <sup>-1</sup> KCl-0.4 mol·L <sup>-1</sup> MgCl <sub>2</sub>	0.20	50 mmol·L <sup>-1</sup> G-6-P	1	9.375 mmol·L <sup>-1</sup> G-6-P	1.6
10% S9	1.00	40 mmol·L <sup>-1</sup> $\beta$ -NADP Na <sub>2</sub>	1	62.5 mmol·L <sup>-1</sup> NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.6
S9 mix 总量	10.00	30% S9	3	62.5 mmol·L <sup>-1</sup> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.6
		S9 mix 总量	10	3.36% S9	0.4
				S9 mix 总量	10.0

平行设置溶媒对照(0.5% DMSO)组、给药组(每种化合物 3 个浓度,最高浓度产生的细胞毒性不超过 50%, NDMA、NDEA、NMBA、NMPA、NDIPA、NEIPA、NDPh、NDPA: 250、500、1 000  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ; NMOR、NMEA、NDELA、NDBA、NMPEA、NPIP、NPYR、NNN、NNK: 125、250、500  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )和 CP(阳性对照, 100  $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ )组。每孔添加 1.8 mL 含 0.5% DMSO 或药物的 DMEM(不含血清)和 0.2 mL S9 mix。将 6 孔板缓慢震荡混匀后,置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 4 h,弃上清, PBS 清洗 2 次,每

孔添加 2 mL DMEM(含血清),置于  $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下培养 20 h。使用胰酶消化细胞,并于室温以  $1\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,弃上清。使用培养基将细胞密度稀释至  $2 \times 10^5 \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 2.2 彗星试验

参照 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 500  $\mu\text{L}$  Comet LM Agarose。取单细胞悬液 50  $\mu\text{L}$ ,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,每个样本平行2孔。铺片结束后迅速将玻片置于4℃、避光冷却30 min。将玻片置于4℃预冷的裂解液中避光,4℃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32 V,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5 min,更换新的中和液漂洗15 min。之后取出玻片,浸于无水乙醇溶液脱水至少15 min。将玻片放置通风处,室温自然干燥。染色时用稀释过的SYBR Gold®(1:10 000)染色30 min,去除多余液体,室温、

避光晾干。染色结束后使用Comet Assay IV(Istem)彗星图像分析软件进行分析,每个样品设置2个复孔,每个复孔至少计数75个彗星细胞的尾DNA含量百分率(%tail DNA),计算每组%tail DNA的平均值及中位数。

### 2.3 数据处理

所有数据均以每组2个复孔的 $\bar{x} \pm s$ 表示,对3组及以上数据应用GraphPad Prism 7软件采用单因素方差分析对结果进行统计分析。

## 3 结果

### 3.1 非S9条件下试验结果

在非S9代谢活化条件下(表2),阳性对照组(25  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  MMS)的%tail DNA中位数和平均值与溶媒对照组比较显著升高( $P<0.001$ ),提示试

表2 非S9条件下亚硝胺化合物对%tail DNA中位数、平均值的影响

Table 2 Effects of nitrosamines compounds on %tail DNA median and average in non-S9 condition

组别	质量浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	%tail DNA 中位数	%tail DNA 平均值	组别	质量浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	%tail DNA 中位数	%tail DNA 平均值
溶媒对照	—	2.46±0.47	4.35±0.68	NMOR	32.5	0.70±0.12	2.60±0.37
MMS	25	14.38±1.20***	14.93±0.35***		75.0	0.98±0.12	2.78±0.19
NDMA	15	1.35±0.23	4.46±0.58		150.0	0.72±0.25	3.17±0.17
	30	1.11±0.38	4.37±0.58	NMEA	32.5	1.74±0.08	3.21±0.19
	70	1.70±0.64	3.98±0.25		75.0	0.94±0.06	2.38±0.35
NDEA	25	0.71±0.00	2.71±0.17		150.0	1.28±0.07	3.35±0.18
	50	0.41±0.18	2.70±0.38	NPIP	32.5	0.50±0.05	2.34±0.65
	100	0.52±0.04	2.44±0.84		75.0	0.35±0.02	1.81±0.21
NMBA	32.5	0.95±0.16	2.71±0.70		150.0	0.89±0.19	2.38±0.78
	75.0	0.47±0.04	2.67±0.21	NPYR	32.5	0.42±0.01	2.08±0.14
	150.0	0.45±0.18	3.14±0.23		75.0	0.32±0.10	1.84±0.51
NMPA	32.5	0.74±0.63	2.56±0.47		150.0	0.39±0.06	1.99±0.01
	75.0	0.60±0.27	2.35±0.23	NDBA	50	1.92±1.17	3.26±0.80
	150.0	1.16±0.66	3.27±0.10		100	1.16±0.03	2.63±0.23
NDIPA	32.5	0.61±0.48	2.04±0.36		200	0.69±0.20	2.09±0.04
	75.0	1.40±0.60	2.68±0.07	NDPh	50	1.11±0.25	3.80±0.18
	150.0	0.66±0.06	2.18±0.47		100	0.26±0.11	2.72±0.04
NEIPA	32.5	0.49±0.11	1.68±0.27		200	0.37±0.34	1.57±0.09
	75.0	0.35±0.01	1.80±0.17	NMPEA	50	1.20±0.69	3.64±1.06
	150.0	0.23±0.06	1.87±0.53		100	0.31±0.01	2.78±0.12
NDELA	32.5	2.01±1.18	3.90±1.43		200	1.61±1.15	3.64±0.03
	75.0	0.95±0.30	3.39±0.22	NNN	50	1.74±0.36	3.84±0.72
	150.0	0.81±0.18	3.20±0.58		100	3.55±0.45	5.04±0.03
NDPA	32.5	2.44±0.77	5.54±1.48		200	1.42±0.10	3.13±0.06
	75.0	1.62±0.51	3.79±0.03	NNK	50	2.50±0.66	4.55±0.71
	150.0	0.50±0.29	2.98±0.06		100	2.57±0.04	4.28±0.33
					200	2.26±0.36	4.03±0.37

与溶媒对照组比较:\*\*\* $P<0.001$

\*\*\* $P<0.001$  vs solvent control group

验体系成立。所有亚硝胺化合物的平均%tail DNA 中位数和平均值与溶媒对照组相比均未见显著性差异。

### 3.2 体外彗星试验 S9 mix 配方比较

使用 NDMA 和 NDEA 比较 3 种不同 S9 mix (配方 A、B 和 C) 对体外彗星试验结果的影响 (表 3、4)。经配方 A 代谢活化处理后, NDMA 1 200、2 400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  组%tail DNA 中位数与溶媒对照组相比均显著升高 ( $P < 0.05$ ); NDMA 和 NDEA 各浓度组%tail DNA 平均值与与溶媒对照组相比均显著升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。

经配方 B 代谢活化处理后, NDMA 1 200、2 400  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  组%tail DNA 中位数与溶媒对照组相比显著升高 ( $P < 0.05$ ), NDEA 各浓度组%tail DNA 中位数与溶媒对照组相比显著升高 ( $P < 0.01$ ); NDEA 各浓度组%tail DNA 平均值与溶媒对照组相比显著升高 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。

而经配方 C 代谢活化处理后, NDMA 所有浓度

组%tail DNA 中位数和平均值与溶媒对照组相比显著升高 ( $P < 0.001$ ); NDEA 500、1 000  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  组%tail DNA 中位数与平均值与溶媒对照组比较显著升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ )。

与配方 A 和 B 相比, 配方 C 可在更低浓度下检测出亚硝胺化合物的 DNA 损伤结果, 更适于亚硝胺化合物体外 DNA 亲和力和 DNA 损伤风险的筛选。

### 3.3 S9 mix 条件下试验结果

本研究继续使用 S9 mix 配方 C 开展代谢活化条件下的体外彗星试验 (表 5)。除 NDPh 组的%tail DNA 中位数和平均值、NMPA 组的%tail DNA 中位数外, 所有亚硝胺化合物均可导致 HepG2 细胞的%tail DNA 中位数和平均值升高, 且变化与溶媒对照组相比存在显著性差异 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ 、 $0.001$ )。其中, NDMA、NEIPA 和 NMPEA 的作用明显; NDEA、NMBA、NMPA、NDPA、NMOR、NMEA、NPIP 和 NNN 的作用稍弱; NDIPA、NDELA、NDBA、NPYR 和 NNK 也表现出对 DNA 的损伤作用但作用

表 3 不同 S9 配方对%tail DNA 中位数的影响

Table 3 Effects of different S9 formulations on %tail DNA median

组别	质量浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	%tail DNA 中位数		组别	浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	配方 C %tail DNA 中位数
		配方 A	配方 B			
溶媒对照	—	1.01±0.11	0.99±0.13	溶媒对照	—	1.35±0.18
NDMA	600	2.56±0.83	1.98±0.01	NDMA	250	10.00±0.28***
	1 200	3.04±0.21*	2.33±0.57*		500	11.77±0.63***
	2 400	3.06±0.18*	2.54±0.65*		1 000	8.86±0.99***
NDEA	600	2.82±0.51	2.66±0.34**	NDEA	250	2.96±0.23
	1 200	2.49±1.07	3.34±0.06**		500	4.45±0.27**
	2 400	2.82±0.09	3.36±0.06**		1 000	6.67±0.25***

与溶媒对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs solvent control group

表 4 不同 S9 配方对%tail DNA 平均值的影响

Table 4 Influence of different S9 formulations on %tail DNA average value

组别	质量浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	%tail DNA 平均值		组别	质量浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	配方 C %tail DNA 平均值
		配方 A	配方 B			
溶媒对照	—	2.43±0.31	2.85±0.09	溶媒对照	—	4.47±0.21
NDMA	600	4.84±0.08***	4.43±0.95	NDMA	250	11.67±0.79***
	1 200	4.30±0.14**	3.78±0.54		500	14.12±1.11***
	2 400	4.80±0.19***	4.29±0.17		1 000	10.67±0.01***
NDEA	600	4.62±0.34***	4.58±0.00*	NDEA	250	4.96±0.22
	1 200	4.46±0.53***	5.13±0.50**		500	8.05±0.09**
	2 400	5.02±0.14***	5.05±0.34*		1 000	8.98±1.06**

与溶媒对照组比较: \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$

\*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs solvent control group

表5 S9代谢活化条件下亚硝胺化合物对%tail DNA中位数的影响

Table 5 Effects of nitrosamines compounds on %tail DNA median and average under S9 metabolic activation

组别	质量浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	%tail DNA 中位数	%tail DNA 平均值	组别	质量浓度/ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	%tail DNA 中位数	%tail DNA 平均值
溶剂对照	—	1.35±0.18	4.47±0.21	NMOR	125	7.31±2.13***	8.96±1.35***
CP	100	7.14±0.10***	11.34±0.59***		250	6.14±0.17***	7.20±0.38**
NDMA	250	8.96±0.43***	11.83±1.12***		500	3.49±0.82	5.39±0.04
	500	11.77±0.63***	14.12±1.11***	NMEA	125	5.35±0.55**	7.57±0.19***
NDEA	1 000	8.86±0.99***	10.67±0.01***		250	5.89±0.13***	8.00±0.33***
	250	2.96±0.23	4.96±0.22		500	6.88±0.26***	9.28±0.01***
	500	4.45±0.27*	8.05±0.09***	NDELA	125	5.45±0.22**	7.18±0.03**
NMBA	1 000	6.67±0.25***	8.98±1.06***		250	5.26±1.01**	6.96±0.93**
	250	4.01±0.20	7.55±0.29***		500	3.80±0.72	5.53±0.49
	500	4.81±1.17*	9.92±0.48***	NDBA	125	5.51±0.56**	7.10±0.17**
NMPA	1 000	1.46±0.02	4.41±0.23		250	4.96±0.53**	7.39±0.06***
	250	4.14±0.55	7.40±0.19***		500	4.96±0.42**	6.08±0.22
	500	3.69±0.39	8.33±0.17***	NMPEA	125	24.10±2.12***	24.02±0.37***
NDIPA	1 000	2.53±0.21	8.01±0.37***		250	26.21±2.64***	26.38±1.43***
	250	4.95±0.23**	9.30±0.77***		500	27.75±0.42***	27.74±0.06***
	500	3.24±0.66	6.08±0.23	NPIP	125	6.83±1.35***	8.66±0.76***
NEIPA	1 000	0.97±0.48	4.23±0.25		250	5.95±1.71***	7.25±0.40**
	250	9.52±0.52***	11.21±0.96***		500	4.26±1.15	6.39±0.69
	500	10.81±0.20***	12.61±0.19***	NPYR	125	4.05±0.51*	6.88±0.40**
NDPh	1 000	7.36±0.23***	9.96±0.41***		250	5.10±0.23**	6.73±0.38*
	250	1.61±0.59	4.44±0.50		500	5.60±0.94***	7.91±0.91***
	500	0.59±0.07	3.45±0.65	NNN	125	5.78±1.16***	8.52±1.22***
NDPA	1 000	0.35±0.23	2.38±0.12		250	8.01±2.10***	9.56±1.25***
	250	6.25±1.41***	10.66±0.76***		500	5.12±1.27*	7.07±0.26**
	500	5.79±0.20***	8.57±1.01***	NNK	125	4.56±1.33*	6.34±0.48
	1 000	3.23±0.02	6.58±0.30*		250	3.05±0.36	6.74±0.53*
					500	3.86±0.28	6.01±0.32

与溶剂对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$ \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  \*\*\* $P < 0.001$  vs solvent control group

更弱;而NDPh的结果为阴性,即对DNA无损伤作用。

#### 4 讨论

彗星试验可用于检测单链断裂的DNA损伤、DNA-DNA或DNA-蛋白质交联损伤和单链断裂的不完全切除修复位点<sup>[9]</sup>。该方法仅需少量细胞即可检测低水平的DNA损伤和损伤的修复能力,方法较为简便。Tafazoli等<sup>[10]</sup>研究开展彗星试验检测5种氯化烷、烯类物质的DNA损伤作用,发现氨基数目多寡和结构中是否存在双键是否影响其DNA损伤的决定性因素,提示彗星试验可用于考察化合物结构与DNA亲和力之间的关联。本研究使用HepG2

细胞在无和有大鼠S9代谢活化条件下开展彗星试验,结果提示,在非S9代谢活化条件下17种常见亚硝胺化合物均未导致HepG2细胞核DNA明显损伤,验证了亚硝胺化合物需经代谢活化后才能产生DNA反应活性,与文献报道一致<sup>[11]</sup>。经适宜的S9代谢活化条件处理后,除NDPh外所有亚硝胺化合物均对HepG2细胞存在DNA的损伤作用。烷基亚硝胺对DNA损伤作用强弱顺序依次为NDMA>NEIPA>NDPA>NMEA>NDEA>NDBA>NDIPA,与化合物 $\alpha$ -氢的数目基本成正相关。含苯基的亚硝胺化合物对DNA损伤作用强弱顺序依次为NMPEA>NMPA>NDPh,而环状亚硝胺类化合物

对DNA损伤作用强弱顺序为NMOR>NPYP≈NPYR。Wagner等<sup>[8]</sup>使用中国仓鼠卵巢细胞开展体外彗星试验,所用5种亚硝胺化合物其DNA损伤强度的顺序依次为NDMA>NPIP>NMOR>NDPh,且NDPh仅在1个浓度下具有DNA损伤作用,而NPYR的结果为阴性。该研究结论与本研究大致相符,但在强弱排序上存在一定差异,其原因可能与体外彗星试验条件未达成统一,且所用的代谢活化系统不同有关。

体外彗星试验常用细胞系包括人肝癌HepG2细胞、中国仓鼠卵细胞CHO和小鼠淋巴瘤L5178Y等。多数细胞不具备代谢活化能力,需在试验系统中额外添加S9代谢活化体系检测受试物的代谢产物是否具有DNA损伤潜力。HepG2细胞含有多种与遗传毒性致癌物代谢过程有关的I相代谢酶[如细胞色素P450(CYP)1A1、CYP1A2、CYP2B和CYP2E1]及II相代谢酶(如谷胱甘肽-S-转移酶、磺基转移酶、N-乙酰基转移酶和葡糖醛酸基转移酶等)<sup>[12]</sup>,其对药物的代谢活化效果与S9相当<sup>[13]</sup>。肝脏是亚硝胺化合物的主要毒性作用靶器官,故肝细胞来源的HepG2细胞是适合评价亚硝胺化合物毒性的体外细胞模型。然而,本研究结果提示在不额外添加代谢活化体系条件下,HepG2细胞自身的代谢酶无法将亚硝胺化合物充分代谢活化。这可能与HepG2缺乏CYP2E1和CYP1A2等亚硝胺化合物的主要代谢酶有关<sup>[14]</sup>。部分文献报道在无S9的条件下使用HepG2细胞开展体外彗星试验未检出NDMA存在DNA损伤作用,与本研究结果一致<sup>[15-16]</sup>。当前体外彗星试验方法尚未达成标准化。直接套用传统细菌回复突变试验的S9 mix配方或体外染色体畸变试验的S9 mix配方,无法使亚硝胺化合物充分代谢。参考Wagner等<sup>[8]</sup>制备的S9 mix配方中S9体积分数仅为3.36%,但对亚硝胺化合物的代谢活化效果最佳。

综上所述,本研究提供了亚硝胺化合物体外DNA损伤风险数据,并针对亚硝胺化合物的特点(代谢产物产生致突变性)对彗星试验条件进行优化,为亚硝胺化合物的毒性评价提供有力手段。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Sedlo I, Kolonić T, Tomić S. Presence of nitrosamine impurities in medicinal products [J]. Arh Hig Rada Toksikol, 2021, 72(1): 1-5.
- [2] European Medicines Agency. ICH Guideline M7(R1) on Assessment and Control of DNA Reactive (mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk Step 5 [S]. 2018.
- [3] Fairbairn D W, Olive P L, O'Neill K L. The comet assay: A comprehensive review [J]. Mutat Res Genet Toxicol, 1995, 339(1): 37-59.
- [4] Collins A R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay [J]. Biochim Biophys Acta BBA Gen Subj, 2014, 1840(2): 794-800.
- [5] Rundell M S, Wagner E D, Plewa M J. The comet assay: Genotoxic damage or nuclear fragmentation ? [J]. Environ Mol Mutagen, 2003, 42(2): 61-67.
- [6] 叶倩,汪祺,文海若.不同代谢活化条件对N-亚硝胺类化合物细菌回复突变结果的影响[J].中国医药生物技术, 2022, 17(2): 118-124.  
Ye Q, Wang Q, Wen H R. Effect of different metabolic activation conditions on the results of bacterial reverse mutation test of N-nitrosamine compounds [J]. Chin Med Biotechnol, 2022, 17(2): 118-124.
- [7] Matsuoka A, Hayashi M, Ishidate M J. Chromosomal aberration tests on 29 chemicals combined with S9 mix *in vitro* [J]. Mutat Res, 1979, 66(3): 277-290.
- [8] Wagner E D, Hsu K M, Lagunas A, et al. Comparative genotoxicity of nitrosamine drinking water disinfection byproducts in *Salmonella* and mammalian cells [J]. Mutat Res, 2012, 741(1/2): 109-115.
- [9] McKenna D J, Gallus M, McKeown S R, et al. Modification of the alkaline Comet assay to allow simultaneous evaluation of mitomycin C-induced DNA cross-link damage and repair of specific DNA sequences in RT4 cells [J]. DNA Repair, 2003, 2(8): 879-890.
- [10] Tafazoli M, Baeten A, Geerlings P, et al. *In vitro* mutagenicity and genotoxicity study of a number of short-chain chlorinated hydrocarbons using the micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis technique (Comet assay) in human lymphocytes: A structure-activity relationship (QSAR) analysis of the genotoxic and cytotoxic potential [J]. Mutagenesis, 1998, 13(2): 115-126.
- [11] Krishnan S, Bajrami B, Mani V, et al. Comparison of DNA-reactive metabolites from nitrosamine and styrene using voltammetric DNA/microsomes sensors [J]. Electroanalysis, 2009, 21(9): 1005-1013.
- [12] Knasmüller S, Parzefall W, Sanyal R, et al. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens [J]. Mutat Res, 1998, 402(1/2): 185-202.
- [13] 李欣,熊习昆.体外遗传毒性评价方法的新动向[J].

- 华南预防医学, 2007, 33(6): 38-42.
- Li X, Xiong X K. New trends of *in vitro* genotoxicity evaluation methods [J]. South China J Prev Med, 2007, 33(6): 38-42.
- [14] Knasmüller S, Mersch-Sundermann V, Kevekordes S, et al. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge [J]. Toxicology, 2004, 198(1/2/3): 315-328.
- [15] Uhl M, Helma C, Knasmüller S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (Hep G2) cells [J]. Mutat Res Toxicol Environ Mutagen, 2000, 468(2): 213-225.
- [16] Delgado M E, Haza A I, Arranz N, et al. Dietary polyphenols protect against N-nitrosamines and benzo(a) pyrene-induced DNA damage (strand breaks and oxidized purines/pyrimidines) in HepG2 human hepatoma cells [J]. Eur J Nutr, 2008, 47(8): 479-490.

[责任编辑 兰新新]