

N-亚硝基二甲胺和*N*-亚硝基二乙胺的小鼠重复给药毒性及遗传毒性研究

叶倩, 汪祺, 林志, 杨艳伟, 耿兴超, 文海若*

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要: 目的 连续7 d重复给予C57BL/6J小鼠*N*-亚硝基二甲胺(NDMA)和*N*-亚硝基二乙胺(NDEA), 观察至首次给药后28 d, 评价两者主要毒性靶器官及遗传毒性风险。方法 分设溶媒对照组(0.5%羧甲基纤维素钠), 受试物组(分别给予0.75、1.50、3.00 mg·kg⁻¹ NDMA或3.25、7.50、15.00 mg·kg⁻¹ NDEA)和阳性对照组(200 mg·kg⁻¹ 甲磺酸乙酯、40 mg·kg⁻¹ *N*-乙基-*N*-亚硝基脲)。溶媒对照组和受试物组连续7 d每天ig给药1次, 阳性对照组连续3 d每天ig给药1次。末次给药后开展小鼠肝、肾和外周血彗星试验, 计算每只动物的肝、肾和血细胞尾DNA百分含量(% Tail DNA)和尾距(tail moment)平均值。观察结束后(D28)开展小鼠磷脂酰肌醇聚糖A类(*Pig-a*)基因突变试验, 计算网织红细胞(RET^{CD24+})和总红细胞(RBC^{CD24+})的突变率。并在末次给药和恢复期结束后, 试剂盒法检测小鼠肝、肾和肺的8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)水平、实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法检测DNA损伤基因(*ATM*、*gH2AX*、*Nbn*、*Prkdc*、*Trp*)和肝药酶基因(*CYP2E1*、*CYP2A6*)。结果 NDMA剂量为3 mg·kg⁻¹时, 动物全部死亡, 自连续给药4 d后, NDEA 15 mg·kg⁻¹组小鼠体质量与溶媒对照组相比显著性降低($P<0.001$); 且NDMA和NDEA组与溶媒对照组在脏器系数、血液生化指标、组织病理学等方面存在显著差异($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001), 提示NDMA和NDEA对肝脏和肾脏存在一定毒性; NDMA和NDEA组小鼠肝、肾彗星试验结果均为阳性, *Pig-a*基因突变试验中NDEA高剂量组RET^{CD24+}结果为阳性; 与溶媒对照组比较, NDMA和NDEA组小鼠肝、肾和肺中8-OHdG含量显著升高($P<0.05$ 、 0.001), DNA损伤和肝药酶基因表达也存在显著差异($P<0.05$ 、 0.001)。结论 NDMA分别在1.5 mg·kg⁻¹剂量条件下产生肝脏毒性, 0.75、1.50 mg·kg⁻¹剂量条件下使小鼠肝、肾细胞产生致突变性和肝、肾DNA损伤; NDEA可在15 mg·kg⁻¹剂量条件下产生肝脏毒性, 并导致肝、肾细胞产生致突变性和DNA损伤; 8-OHdG和DNA损伤基因等指标检测结果与NDMA和NDEA遗传毒性结果具有一定关联性。

关键词: *N*-亚硝基杂质; *N*-亚硝基二甲胺; *N*-亚硝基二乙胺; 重复给药毒性试验; C57BL/6J小鼠; 彗星试验; *Pig-a*基因突变试验; 遗传毒性

中图分类号: R965.3 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)01-0057-11

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.01.007

Toxicity and genotoxicity of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosodiethylamine in mice after repeated administration

YE Qian, WANG Qi, LIN Zhi, YANG Yanwei, GENG Xingchao, WEN Hairuo

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

Abstract: Objectives Repeated administration of *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) and *N*-nitrosodiethylamine (NDEA) in C57BL/6J mice for seven consecutive days was observed until 28 days after the first administration, and the main toxic target organs and genotoxic risk of both were evaluated. **Methods** A solvent control group (0.5% sodium carboxymethyl cellulose), a test group (0.75, 1.50, 3.00 mg·kg⁻¹ NDMA or 3.25, 7.50, 15.00 mg·kg⁻¹ NDEA, respectively) and a positive control group (200 mg·kg⁻¹ ethyl mesylate; 40 mg·kg⁻¹ *N*-ethyl-*N*-nitrosourea). The solvent control group and the test group were given ig once a day for seven consecutive days, and the positive control group was given ig once a day for three consecutive days. Comet tests in mouse liver, kidney, and peripheral blood were performed after the final dose, and the average percentage of Tail DNA and Tail Moment in liver, kidney, and blood cells of each animal were calculated. After observation (D28), mouse *Pig-a* gene mutation test was carried out to calculate the mutation rate of reticulocyte (RET^{CD24+}) and total erythrocyte (RBC^{CD24+}). The expression of 8-hydroxydeoxyguanosine

收稿日期: 2023-07-05

基金项目: 国家十三五“重大新药创制”专项(2018ZX09201017)

第一作者: 叶倩, 女, 硕士, 研究方向为遗传毒理。E-mail: yeqian1998@163.com

*通信作者: 文海若, 女, 博士, 研究员, 研究方向为遗传毒理。E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

(8-OHdG), DNA damage genes (*ATM*, *gH2AX*, *Nbn*, *Prkdc*, *Trp*) and liver drug enzyme genes (*CYP2E1*, *CYP2A6*) in liver, kidney and lung were studied after the final administration and recovery period. **Results** When the dose of NDMA was $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ all the animals died. After continuous administration for four days, the body weight of mice in the NDEA $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ group significantly decreased compared to the solvent control group ($P < 0.001$). There were differences in organ coefficient, blood biochemical index and histopathology between NDMA and NDEA and the solvent control group ($P < 0.05$, 0.01 , and 0.001), suggesting that NDMA and NDEA had certain toxicity to liver and kidney. The results of comet test in liver and kidney of NDMA and NDEA mice were positive, and RET^{CD24} in *Pig-a* gene mutation test of high-dose NDEA group was positive. The content of 8-OHdG in liver, kidney and lung of NDMA and NDEA groups was significantly increased ($P < 0.05$, 0.001), and there were significant differences in DNA damage and liver drug enzyme gene expression ($P < 0.05$, 0.001). **Conclusion** NDMA produced hepatotoxicity at a dose of $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, and mutagenic and DNA damage in liver and kidney cells at a dose of $0.75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, respectively. NDEA can produce hepatotoxicity at a dose of $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, and lead to mutagen and DNA damage in liver and kidney cells. It has been proved that the results of 8-OHdG and DNA damage genes are related to the genotoxicity results of NDMA and NDEA.

Key words: *N*-nitroso impurities; *N*-nitrosodimethylamine; *N*-nitrosodiethylamine; repeated administration toxicity test; C57BL/6J mice; comet assay; *Pig-a* gene mutation test; genotoxicity

N-亚硝基化合物是一类含有亚硝基结构,可由亚硝酸盐或氮氧化物等与胺类物质反应生成的化合物。国际癌症研究机构(IARC)于1972年将其列为2A类致癌物,认为对人体致癌的可能性较高。多种药物中可含有*N*-亚硝基化合物,如替丁类、二甲双胍类和沙坦类药物,其生成与原料药、合成工艺、降解和储存等多种途径有关。人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)发布的《M7(R2):评估和控制药物中的DNA活性(致突变)杂质以限制潜在的致癌风险》中将*N*-亚硝基杂质列为有较高致癌风险的“关注队列”(COC)^[1]。近年来,因*N*-亚硝基二甲胺(NDMA)和*N*-亚硝基二乙胺(NDEA)等亚硝胺化合物在药品中含量超标而导致药品撤回事件屡见不鲜^[2-3]。2023年3月22日,美国Ascend Laboratories公司生产的达比加群酯胶囊因检出超量的NDMA而从市场召回。毒理学数据是确定*N*-亚硝基化合物毒性风险及监管限度制定的重要依据。然而,NDMA等亚硝胺化合物毒理学数据十分陈旧,数据的可靠性有待考察^[4],且并非所有亚硝胺类化合物均存在致突变性^[5]。与此同时,传统的遗传毒性试验组合不足以准确有效的检测*N*-亚硝基化合物的遗传毒性^[6-7],随着越来越多的*N*-亚硝胺化合物被发现,相应的遗传毒性评价体系也亟待建立。

本研究选择食品和药品中广泛存在且具有代表性的NDMA和NDEA开展小鼠重复7d经口给药毒性试验考察其耐受剂量及主要靶器官。研究伴随多脏器彗星试验、磷脂酰肌醇聚糖A类(*Pig-a*)基因突变试验,以及8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)、DNA损伤基因及肝药酶表达水平检测,验证

NDMA和NDEA的遗传毒性风险,探索适用于*N*-亚硝基化合物的遗传毒性评价方法/生物标志物。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级雄性C57BL/6J小鼠,给药时约6周龄,体质量20~25g,购自北京维通利华试验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号为SCXK(京)2016-0011。小鼠饲养于屏障系统内聚碳酸酯鼠盒中,饲养环境温度保持在20~26℃,湿度保持在40%~70%,饲养密度为每笼2~5只。试验动物自由摄取经Co⁶⁰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。本实验方案实施前经国家药物安全评价监测中心动物管理与使用委员会伦理审查批准(伦理批复编号IACUC-2020-097)。动物的使用符合3R原则。

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 IX71光学显微镜(Olympus公司); MAXI N610.1标准水平电泳仪(Carl Roth公司); Countess II自动细胞计数仪(Thermo Fisher公司); Comet Assay IV(Instem公司); FACSCalibur流式细胞仪(BD bioscience公司); Centrifuge5810R型高速冷冻离心机(Eppendorf公司); 免疫磁性分离架(Miltenyi公司); CK005酶标仪(BIOteck公司); ABI 7500荧光定量PCR仪器(Applied Biosystems公司); T100 PCR仪器(BIO-RAD公司)。

1.3 主要试剂

超纯水(MilliQ-A10超纯水机自制);

NDMA (批号 510166-201902, 质量分数 99.7%)、NDEA (批号 510168-201902, 质量分数 99.7%), 购自中国食品药品检定研究院; 甲磺酸乙酯 (EMS, 批号 141970611309162)、*N*-乙基-*N*-亚硝基脲 (ENU, 批号 MKCD2123)、乙二胺四乙酸四钠 (EDTA-4Na, 批号 SLBV0002), 购自 Sigma 公司; 乙二胺四乙酸二钠 (EDTA-2Na, 批号 20200701) 购自国药集团化学试剂有限公司; SYBR Gold® 染液 (批号 230110)、Counting Beads (批号 2324193), 购自 Invitrogen 公司; Comet LMA garose (批号 P250229)、Comet Slide™ (批号 P261667), 购自 RD systems 公司; PE-Anti-CD24 (批号 1006113)、PE-Anti-CD61 (批号 0321269), 购自 BD Pharmingen 公司。

2 方法

2.1 动物分组及给药

设 9 个不同给药组, 即: 溶媒对照 (0.5% CMC-Na) 组, NDMA 0.75、1.50、3.00 mg·kg⁻¹ 组, NDEA 3.25、7.50、15.00 mg·kg⁻¹ 组, EMS 200 mg·kg⁻¹ 组和 ENU 40 mg·kg⁻¹ 组, EMS 和 ENU 每组 5 只, 其余各组每组 10 只小鼠。溶媒对照组和受试物组连续 7 d (D1—D7) 每天 ig 给药 1 次, EMS 分别在 D5、D6 和 D7 连续给药 3 d, ENU 分别在 D1、D2 和 D3 连续给药 3 d。所有组别给药体积均为 10 mg·kg⁻¹。

2.2 各项检测及样本处理

动物购入日和分组日各进行 1 次体质量测定, 首次给药的 D1、D4、D8、D11、D14、D18、D21、D24、D28 各测定 1 次。末次给药 (D7) 结束 3 h 后对溶媒对照组、NDMA 组和 NDEA 组前 5 只和 EMS 组进行解剖, 取主要脏器称质量, 取部分肝、肾和外周血开展彗星试验, 8-OHdG、DNA 损伤和肝药酶基因检测, 其余脏器固定后用于组织病理学检查, 脏器采集部位及用途见表 1。D1、D14、D28 经眼内眦静脉丛采血进行外周血 *Pig-a* 基因突变试验, 采血用途及采血量见表 2。恢复期结束后 (D28) 对溶媒对照组、受试物组剩余 5 只和 ENU 组进行解剖, 取主要脏器进行称质量并摘取部分脏器用于 8-OHdG、DNA 损伤和肝药酶基因检测, 其余脏器固定后用于组织病理学检查。

表 1 脏器采集部位及用途

Table 1 Collection sites and uses of organs

用途	脏器种类	采集日期	采集动物
彗星试验	肝、肾	D7	每组 5 只 (除 ENU 组)
8-OHdG 检测、DNA 损伤基因检测	肝、肾、肺	D7、D28	溶媒对照组 NDMA (1.5 mg·kg ⁻¹) 组 NDEA (15 mg·kg ⁻¹) 组

表 2 动物采血时间和采血用途

Table 2 Blood collection time and use of animals

采血用途	采血量	抗凝剂	采血日期	采血时间	采血动物
血清生化	500 μL	不抗凝	D7、D28	末次给药后和恢复期结束后解剖时	每组 5 只
8-OHdG 检测					
<i>Pig-a</i>	100 μL	肝素钠	D1、D14、D28	给药日给药前采血; 恢复期上午采血	每组 5 只
彗星试验	100 μL	EDTA	D7	末次给药后解剖时	每组 5 只

2.3 血清生化指标检测

解剖日麻醉动物后用注射器采集腹主静脉血用于血清生化检测。将采集的血液室温静置 15 min, 2 000~3 000 r·min⁻¹ 离心 20 min, 取上清使用 Hitachi 7180 型全自动生化仪检测丙氨酸氨基转移酶 (ALT)、天冬氨酸氨基转移酶 (AST)、乳酸脱氢酶 (LDH)、总胆红素 (TBIL)、葡萄糖 (GLU) 和血清总蛋白 (TP) 水平。

2.4 组织病理学检查

将组织固定后经修块取材, 逐级酒精脱水, 石蜡包埋, 切片机切片 (厚约 3 μm), 使用苏木精-伊

红 (HE) 染色, 光镜下进行检查。

2.5 彗星试验

将新鲜的脏器置于 3 mL 预冷的切碎液中剪切约 100~150 次, 经 40 μm 滤膜滤过后置于冰上备用。调整细胞密度后, 对样品进行制片、裂解、解旋、电泳、中和、脱水、干燥处理, 荧光染色拍照。使用 Comet 图像分析软件对每只动物分析至少 150 个细胞, 计算其尾 DNA 百分数 (% tail DNA) 和尾距 (tail moment) 的平均值。

2.6 *Pig-a* 基因突变试验

取抗凝血约 100 μL, 流式细胞术检测小鼠红细胞表面 CD24 蛋白表达水平。采用免疫磁计数微球

技术计算红细胞RBC^{CD24}和RET^{CD24}的突变率及占总红细胞的百分比。具体步骤按照Litron Laboratories生产的小鼠MutaFlow^{PLUS}试剂盒操作。

2.7 血清和脏器8-OHdG检测

采集的血液室温自然凝固10~20 min, 2 000~3 000 r·min⁻¹离心20 min。在2~8 °C条件下解冻事先冻存的脏器后, 加入一定量的PBS匀浆, 2 000~3 000 r·min⁻¹离心20 min, 收集上清。具体步骤按照武汉华美生物科技有限公司生产的小鼠8-OHdG检测试剂盒操作。

2.8 DNA损伤基因及肝药酶基因表达检测

取材溶媒对照组、NDMA 1.5 mg·kg⁻¹组和NDEA 15 mg·kg⁻¹组动物的肝、肾和肺, 提取DNA后, 采用实时荧光定量PCR(qRT-PCR)法对目的基因(*ATM*、*H2AX*、*Nbn*、*Prkdc*、*Trp53*、*CYP2A6*和*CYP2E1*)进行检测。采用HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)进行cDNA反转录, 实验操作按产品说明书进行, 引物信息见表3。

表3 引物信息
Table 3 Primers information

引物名称	引物序列(5'→3')	产物大小/bp
<i>Atm</i> 上游	CCTTTGTCCTTCGCGATGTTA	130
<i>Atm</i> 下游	GCTGTATGACAACTCGACTTAA TAGGT	
<i>H2ax</i> 上游	TACCTCACTGCCGAGATCCT	66
<i>H2ax</i> 下游	GATGCGCGTCTTCTTGTTG	
<i>Nbn</i> 上游	GTTGGCAGTTCAAGTGAAGGT	181
<i>Nbn</i> 下游	TGTTGACCACGACTCTGTCTG	
<i>Prkdc</i> 上游	TGCCGCCTGACCTCTTAAA	217
<i>Prkdc</i> 下游	CATGGGAGCTGGCAAAGTG	
<i>Trp53</i> 上游	CATCTACAAGAAGTCACAGCACAT	139
<i>Trp53</i> 下游	TTCCAGATACTCGGGATACAAA	
<i>CYP2A6</i> 上游	AGGGTCACCAAGGACACCA	182
<i>CYP2A6</i> 下游	GAAAAGGGCACAAGGCAT	
<i>CYP2E1</i> 上游	AACCTCGTCCCTTCCAACC	283
<i>CYP2E1</i> 下游	GCAGAATAGCAGACAAAAGCAG	
<i>ACTIN</i> 上游	CCATCTACGAGGGCTATGCT	150
<i>ACTIN</i> 下游	CTTTGATGTCACGCACGATT	

2.9 结果分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用GraphPad Prism 8.0.2进行统计学分析, 组间均数比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 状态观察及死亡情况

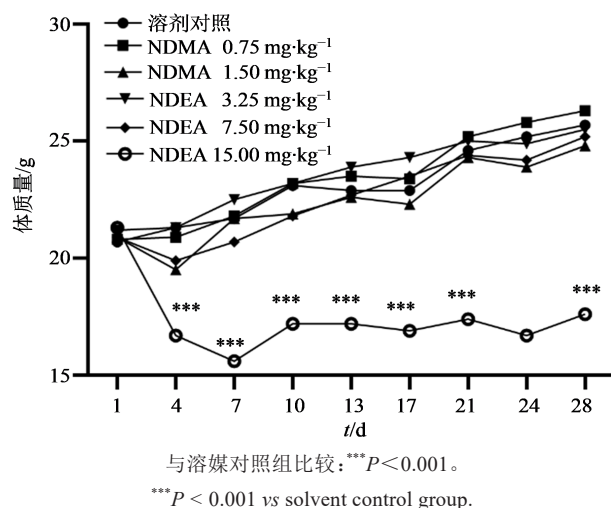
NDMA 3 mg·kg⁻¹组动物在首次给药后出现倦怠、发冷、竖毛等症状, 其余各剂量组动物均无异常临床症状。NDMA和NDEA重复毒性试验死亡动物数见表4。NDMA 3 mg·kg⁻¹组在第2次给药后(D2)全部死亡, 死亡动物组织病理学检查可见肝脏中度肝细胞坏死伴出血(小叶中心性), 同时, 脾脏、胸腺和肠系膜淋巴结可见轻度噬细胞增多和极轻度淋巴细胞减少, 推测免疫器官的组织病理学变化与动物濒死/死亡状态下的应激反应有关。因此死亡动物死因可能与肝细胞坏死而导致的肝功能受损衰竭有关; NDEA 15 mg·kg⁻¹组1只动物死亡, 组织病理学检查可见肝脏极轻度肝细胞萎缩和肝细胞糖原耗竭, 推测该动物死因与肝功能受损有关。连续7 d给药结束后, NDEA 15 mg·kg⁻¹组发现2只死亡动物, 组织病理学检查可见肝脏极轻度肝细胞变性/坏死(桥接性)、极轻度肝细胞萎缩, 以及极轻度至轻度肝细胞糖原耗竭, 推测死因可能与肝功能受损有关。

表4 死亡动物数
Table 4 Number of dead animals

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	动物只数	死亡只数	死亡率/%
溶媒对照	—	10	0	0
NDMA	0.75	10	0	0
	1.50	10	0	0
	3.00	10	10	100
NDEA	3.25	10	0	0
	7.50	10	0	0
	15.00	10	3	30
EMS	200	5	0	0
ENU	40	5	0	0

3.2 体质量及脏器质量

重复给药7 d后, NDMA和NDEA组小鼠的体质量的变化情况见图1。NDMA 3 mg·kg⁻¹组小鼠在D2全部死亡, 体质量未进行分析。自连续给药4 d后, NDEA 15 mg·kg⁻¹组小鼠体质量与溶媒对照组相比显著性降低($P < 0.001$), 提示NDEA为15 mg·kg⁻¹时可对小鼠产生明显毒性作用。试验期间, 溶媒对照组及其他NDMA和NDEA剂量组小鼠体质量稳步增加。

图1 NDMA和NDEA对小鼠体质量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=5$)Fig. 1 Effects of NDMA and NDEA on body weight of mice ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

3.3 主要脏器指数

给予小鼠NDMA和NDEA后其脏器指数的结果见表5。与溶媒对照组相比,NDEA 15 mg·kg⁻¹组在末次给药后肝脏和脾脏质量显著降低($P < 0.001$),但在恢复期结束后恢复至正常水平($P >$

0.05),而NDEA 7.5、15.0 mg·kg⁻¹组在末次给药和恢复期后肺脏质量均显著升高($P < 0.001$),且存在剂量效应关系。由此可知,重复7 d给予7.5 mg·kg⁻¹以上的NDEA可对小鼠肝、肾等主要脏器产生一定毒性作用。

3.4 血清生化

小鼠的血液生化指标结果见图2(末次给药后)和图3(恢复期结束后)。与溶媒对照组相比,末次给药后NDMA 1.5 mg·kg⁻¹组ALT($P < 0.001$)、AST($P < 0.05$)、TBIL($P < 0.001$)水平显著增加,NDMA 0.75、1.50 mg·kg⁻¹组GLU水平显著降低($P < 0.001$),且均在恢复期结束后恢复至正常水平;NDEA 15 mg·kg⁻¹组ALT($P < 0.001$)、AST($P < 0.001$)、LDH($P < 0.01$)、TBIL($P < 0.001$)、TP($P < 0.01$)水平显著增加,NDEA 7.5、15.0 mg·kg⁻¹组GLU水平显著降低($P < 0.001$),恢复期结束后NDEA 7.5、15.0 mg·kg⁻¹组LDH水平显著降低($P < 0.01$),其余指标均恢复至正常水平。结果表明,连续7 d给予小鼠1.5 mg·kg⁻¹剂量的NDMA和15 mg·kg⁻¹剂量的NDEA可使小鼠产生明显的肝脏毒性。

表5 小鼠主要脏器系数($\bar{x} \pm s$, $n=5$)Table 5 Relative weight of major organs in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	肝系数/%		肺系数/%		肾系数/%		脾系数/%	
		D7	D28	D7	D28	D7	D28	D7	D28
溶媒对照	—	4.92±0.43	4.45±0.68	0.68±0.08	0.60±0.05	1.11±0.06	1.17±0.08	0.34±0.02	0.29±0.03
NDMA	0.75	5.03±0.20	4.98±0.26	0.66±0.05	0.57±0.06	1.10±0.06	1.08±0.08	0.31±0.03	0.27±0.01
	1.50	4.27±0.74	4.78±0.78	0.71±0.08	0.66±0.10	1.15±0.15	1.16±0.14	0.38±0.05	0.32±0.04
NDEA	3.25	5.13±0.24	5.04±0.15	0.66±0.06	0.59±0.04	1.08±0.05	1.03±0.08	0.32±0.03	0.29±0.03
	7.50	4.98±0.21	5.23±0.10	0.91±0.04***	0.73±0.08*	1.08±0.05	1.05±0.03	0.30±0.03	0.31±0.03
	15.00	3.38±0.43***	4.60±0.39	1.08±0.06***	0.99±0.05***	1.21±0.15	1.14±0.03	0.20±0.03***	0.26±0.01
EMS	200	4.40±0.19	/	0.63±0.06	/	1.08±0.05	/	0.17±0.02	/
ENU	40	/	5.03±0.12	/	0.58±0.06	/	1.09±0.04	/	0.27±0.03

与溶媒对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs solvent control group.

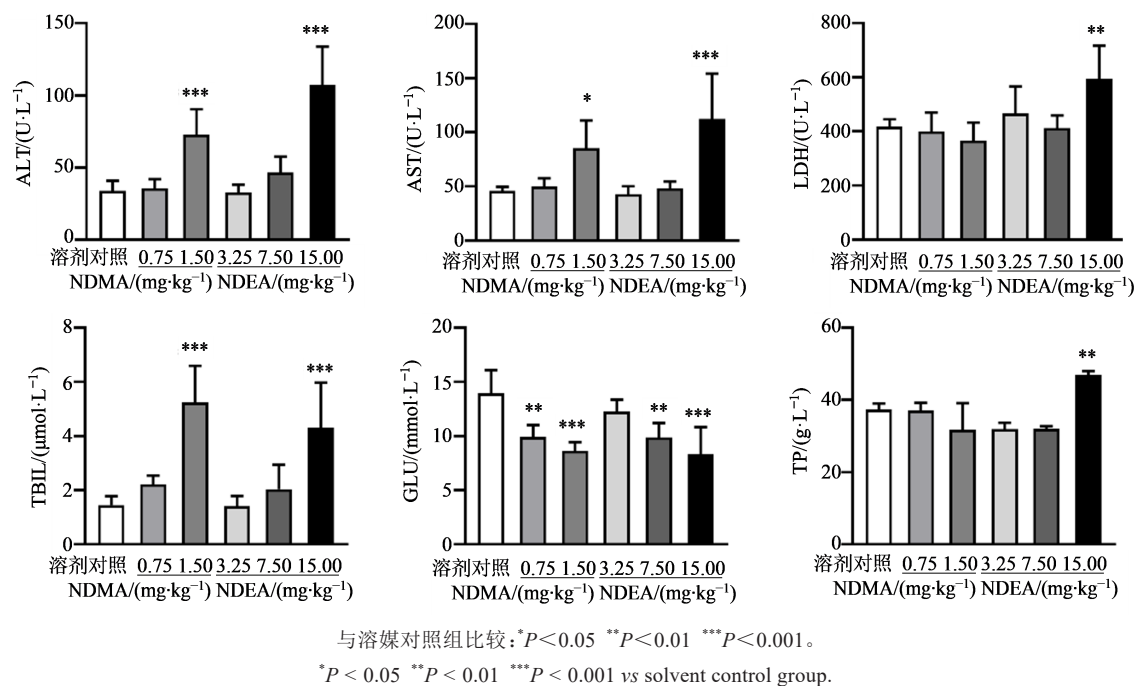
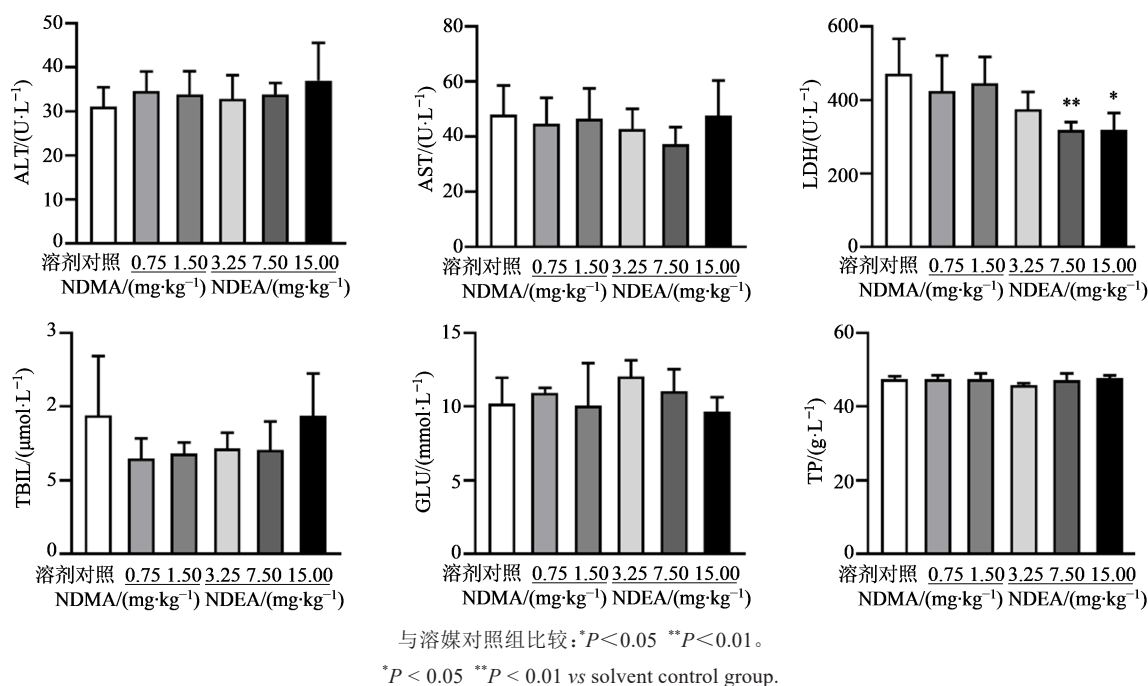
3.5 病理学检查

小鼠组织病理学检查结果如图4所示,末次给药后,与溶媒对照组相比,NDMA 1.5 mg·kg⁻¹组可见极轻度至中度肝细胞坏死伴或不伴出血(小叶中心性肝细胞坏死);恢复期结束后,NDMA 0.75、1.50 mg·kg⁻¹组肝脏均未见该病变。末次给药后,NDEA 15 mg·kg⁻¹组可见极轻度单个肝细胞坏死、极轻度肝细胞萎缩和极轻度至轻度肝细胞糖原耗竭;恢复期结束后,NDEA各剂量组肝脏均未见上述

病变。结果表明,肝细胞坏死伴或不伴出血与给予1.5 mg·kg⁻¹剂量的NDMA有关,而15 mg·kg⁻¹剂量的NDEA可致小鼠单个肝细胞坏死、肝细胞萎缩和肝细胞糖原耗竭,且上述病变均属于可逆性病变。

3.6 彗星试验

小鼠肝、肾和外周血细胞彗星结果如图5所示,与溶媒对照组相比,EMS组中小鼠肝、肾和外周血尾DNA百分数和尾距的平均值均显著升高($P <$

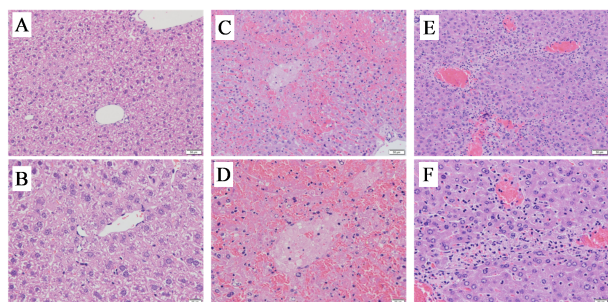
图2 小鼠末次给药后血清生化结果($\bar{x} \pm s, n=5$)Fig. 2 Serum biochemical results of mice after last administration ($\bar{x} \pm s, n=5$)图3 小鼠恢复期结束后血清生化结果($\bar{x} \pm s, n=5$)Fig. 3 Serum biochemical results of mice after convalescence ($\bar{x} \pm s, n=5$)

0.001),提示试验体系成立。与溶媒对照组相比,NDMA各剂量组肝、肾尾DNA百分数和尾距均显著增加($P < 0.001$);NDEA各剂量组肝脏尾DNA百分数和尾距均显著升高($P < 0.001$),NDEA 15 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 组肾脏尾DNA百分数($P < 0.001$)和尾距($P < 0.01$)显著升高,且存在明显的剂量效应关系。而NDMA和NDEA

各剂量组外周血尾DNA百分数和尾距均无显著性差异。因此,NDMA和NDEA肝、肾彗星结果均为阳性,外周血彗星结果为阴性。

3.7 *Pig-a*基因突变试验

*Pig-a*基因突变试验结果如图6所示,与溶媒对照组相比,ENU组第14天和第28天RET^{CD24+}和



给药末期:溶媒对照组:A(100×)、B(200×);NDMA组(1.5 mg·kg⁻¹):C(100×)、D(200×);NDEA(15 mg·kg⁻¹):E(100×)、F(200×)
Control group: A (100×), B (200×); NDMA (3 mg·kg⁻¹) group: C (100×), D (200×); NDEA (15 mg·kg⁻¹) group: E (100×), F (200×)
at end of administration

图4 小鼠肝脏病理结果

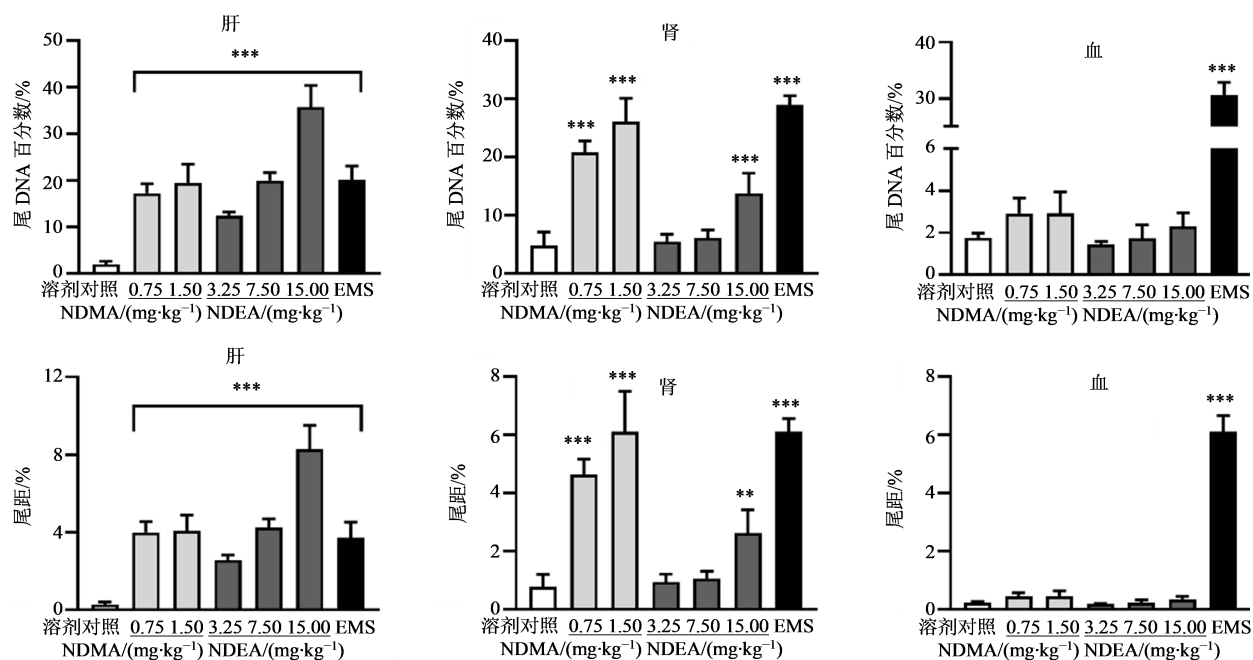
Fig. 4 Pathological results of mouse liver

RBC^{CD24}均显著升高($P < 0.001$),提示试验体系成立。NDMA各剂量组与相应溶媒对照组相

比,RET^{CD24}和RBC^{CD24}均无显著性差异,NDEA 15 mg·kg⁻¹ RET^{CD24}在第14天显著升高($P < 0.001$),在第28天恢复至正常水平,RBC^{CD24}则无显著性差异。除NDEA 15 mg·kg⁻¹组RBC^{CD24}为阳性外,其余受试物组*Pig-a*基因突变试验结果均为阴性。

3.8 8-OHdG检测结果

收集末次给药和恢复期结束后小鼠的外周血和主要脏器进行8-OHdG检测。血清中8-OHdG结果如图7所示,与溶媒对照组相比,NDMA 0.75、1.50 mg·kg⁻¹组在末次给药后血清中8-OHdG表达水平无显著性差异,但在恢复期结束后血清中8-OHdG表达水平显著升高($P < 0.01$)。NDEA 15 mg·kg⁻¹组在末次给药后血清中8-OHdG表达水平显著升高($P < 0.001$),且在恢复期结束后血清中8-OHdG表达水平依然有显著性差异($P < 0.01$)。



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

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

图5 小鼠彗星试验结果($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

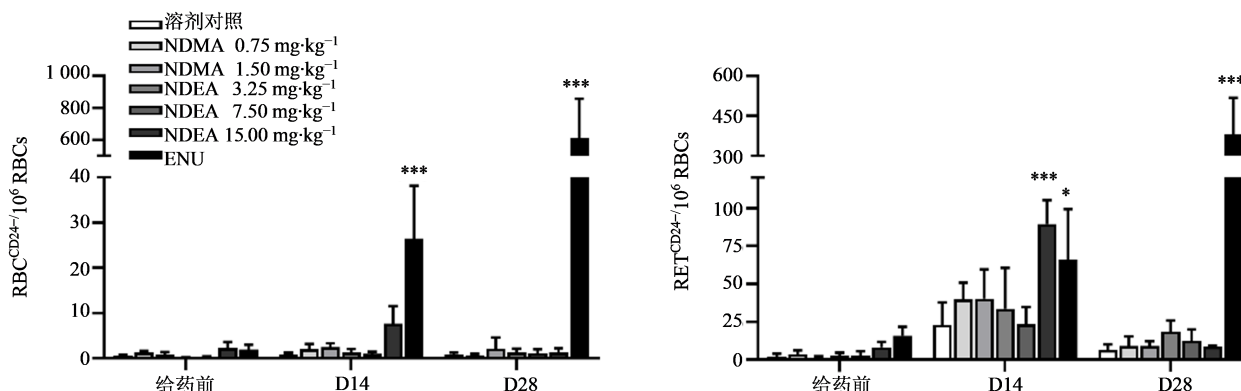
Fig. 5 Comet test results in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

脏器中8-OHdG结果如图8所示,与溶媒对照组相比,NDMA 1.5 mg·kg⁻¹组和NDEA 15 mg·kg⁻¹组在末次给药后肝、肾和肺中8-OHdG表达水平显著升高($P < 0.001$)。而在恢复期结束后,除NDEA 15 mg·kg⁻¹组肺中8-OHdG表达水平有显著性差异外($P < 0.05$),其余各组脏器中8-OHdG表达水平均无显著性差异。结果表明,重复给予小鼠NDMA和NDEA可造成小鼠外周血、肝、肾

和肺等脏器产生DNA氧化损伤。

3.9 DNA损伤和肝药酶基因检测结果

脏器DNA损伤和肝药酶基因检测结果如图9所示,末次给药后,与溶媒对照组相比,NDMA 1.5 mg·kg⁻¹组肝脏中*gH2AX*表达水平显著升高($P < 0.05$),NDEA 15 mg·kg⁻¹组肝脏中*Nbn*($P < 0.05$)、*Prkdc*($P < 0.05$)、*Trp*($P < 0.01$)表达水平显著降低而*ATM*表达水平显著升高($P < 0.05$),恢复期结束后各基因表达水平均无显著性差异。末次给药后,

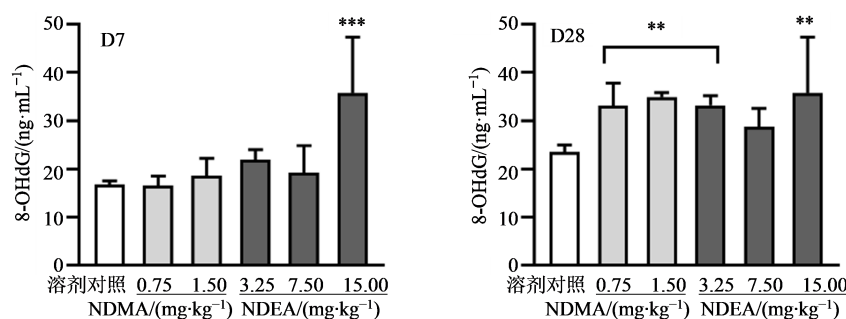


与溶媒对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$

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

图6 小鼠 *Pig-a* 基因突变试验结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 6 Results of *Pig-a* gene mutation test in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

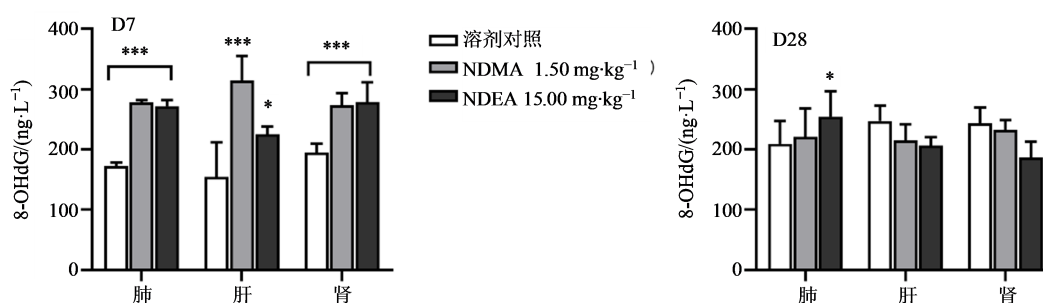


与溶媒对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

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

图7 小鼠血清 8-OHdG 结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 7 Results of serum 8-OHdG in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)



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

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

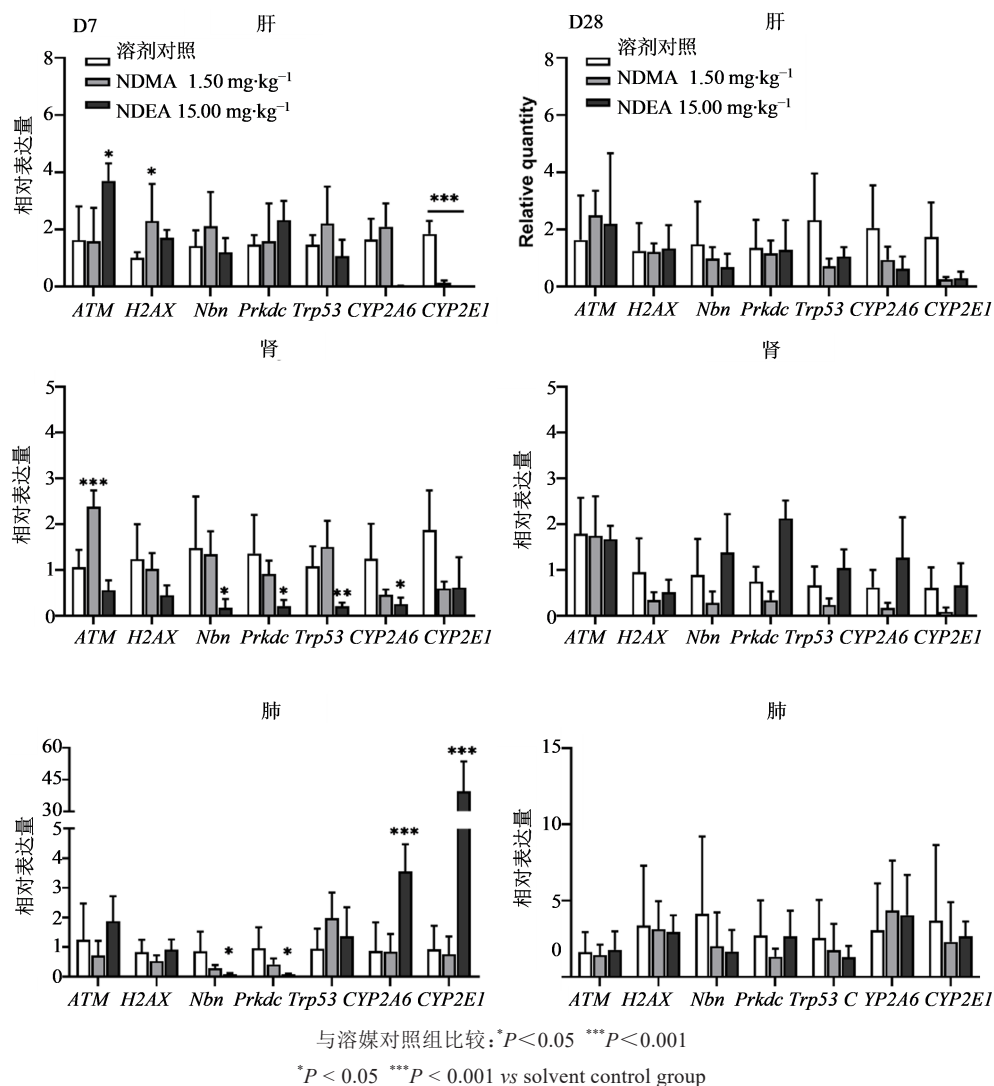
图8 小鼠脏器 8-OHdG 结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 8 Results of 8-OHdG in mouse organs ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

NDMA 1.5 mg·kg⁻¹组肾脏中 *ATM* 表达水平显著升高 ($P < 0.05$), NDEA 15 mg·kg⁻¹组肺脏中 *Nbn* 和 *Prkdc* 表达水平显著减低 ($P < 0.05$), 恢复期结束后各基因表达水平均无显著性差异。

末次给药后, 与溶媒对照组相比, NDMA 1.5 mg·kg⁻¹组肝脏中 *CYP2E1* 和 NDEA 15 mg·kg⁻¹组肝脏中 *CYP2E1* 和 *CYP2A6* 基因表达水平显著降

低 ($P < 0.05$), 恢复期结束后各基因表达水平均无显著性差异。NDEA 15 mg·kg⁻¹组肺脏 *CYP2E1* 和 *CYP2A6* 表达水平显著升高 ($P < 0.001$), 恢复期结束后表达水平无显著性差异。而 NDMA 和 NDEA 各剂量组肾脏中 *CYP2E1* 和 *CYP2A6* 表达水平均无显著性差异。结果表明, NDMA 和 NDEA 可导致小鼠主要脏器中调控 DNA 氧化损伤途径基因和 *N*-亚硝

图9 小鼠DNA损伤目的基因及肝药酶结果($\bar{x} \pm s$, $n=5$)Fig. 9 DNA damage target gene and liver drug enzyme results in mice ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

胺化合物主要代谢酶基因表达水平显著改变, NDMA和NDEA可导致小鼠肝、肾和肺等主要脏器产生DNA氧化损伤, NDMA主要靶器官为肝脏和肾, NDEA主要靶器官为肝脏和肺且主要代谢酶为CYP2E1。

4 讨论

本研究结果提示, 连续7 d给予小鼠1.5 mg·kg⁻¹以上的NDMA和15 mg·kg⁻¹以上的NDEA可对小鼠体质量、脏器系数、血清生化指标和病理学结果产生显著影响。其中NDMA 3 mg·kg⁻¹组小鼠在重复给药2 d后死亡, NDEA 1.5 mg·kg⁻¹组小鼠体质量有所降低, 且在给药期间肝脏和脾脏质量也有所降低。血清生化结果中, 除肝功能指标显著变化外, NDMA和NDEA均可导致小鼠血清中GLU含量显著降低, 但在恢复期恢复至正常水平, 且NDEA 15 mg·kg⁻¹组死亡小鼠病理学结果可见轻度的肝糖

原耗竭, 推测短期给予小鼠0.75 mg·kg⁻¹的NDMA和7.5 mg·kg⁻¹的NDMA可造成肝脏产生可恢复性损伤, 但在短期内给予1.5 mg·kg⁻¹的NDMA和15 mg·kg⁻¹的NDMA可造成小鼠急性肝功能损伤进一步导致死亡。George等^[8]的研究也表明, NDMA诱导的肝纤维化和早期肝硬化啮齿动物模型是一种快速和可重复的动物模型。

彗星试验可用于受试物针对药物蓄积部位及靶器官DNA损伤的研究, 尤其是对短时间内诱发的DNA损伤较为敏感^[9]。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^[10]。遗传毒性试验结果提示, NDMA和NDEA小鼠肝、肾彗星结果均为阳性, 但外周血彗星试验均为阴性。两者具有致DNA损伤作用, 且主要作用于肝脏和肾脏。Pig-a基因突变试验是一种通过检测细胞表面糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定蛋白(如CD59和CD24

等)的表达水平来考察 *Pig-a* 基因突变频率,从而评价受试物对生物体的致突变性^[11]。大量研究表明,RET突变的发生先于RBC突变^[12]。*Pig-a*基因突变试验中NDEA 15 mg·kg⁻¹组在第14天RET^{CD24}结果为阳性,剂量低于15 mg·kg⁻¹时 *Pig-a*基因突变试验结果均为阴性,提示NDEA对小鼠外周血有致突变性。NDMA 1.5 mg·kg⁻¹组的 *Pig-a*基因突变试验阴性结果和NDEA 15 mg·kg⁻¹组D28的 *Pig-a*基因突变试验结果为阴性的原因可能与给药剂量和暴露时间不足,或NDMA和NDEA在小鼠体内代谢特点有关(代谢速率高、代谢周期短,且在外周血中含量较低)。且 *Pig-a*基因突变试验的局限性在于依赖目标化合物到达骨髓,而NDMA和NDEA主要靶器官为肝和肾,骨髓暴露量十分有限,这可能也是导致NDMA组阴性结果的原因之一^[13]。

基于体细胞突变假设,DNA损伤是大多数致癌过程的初始事件,评估DNA损伤和/或修复已被提议作为评估致癌潜力的预筛选试验^[14]。8-OHdG可作为DNA氧化损伤的生物标志物^[15],定量检测8-OHdG可以反映DNA的氧化损伤程度。同时, *ATM*、*H2AX*、*Nbn*、*Prkdc*、*Trp53*等重要DNA损伤基因的检测也被广泛应用于DNA氧化损伤程度的研究和评价中^[16-17]。DNA损伤标志物检测结果提示,NDMA和NDEA均可导致小鼠血清、肝、肾和肺中8-OHdG含量显著升高。NDMA可导致小鼠肝、肾中DNA损伤修复基因 *gH2AX*和 *ATM*表达显著升高,NDEA可导致小鼠肝、肺中 *ATM*表达显著升高且抑制 *Nbn*、*Prkdc*等基因表达,表明NDMA和NDEA会对小鼠肝、肾细胞DNA造成损伤且抑制其修复机制从而产生遗传毒性,且NDMA和NDEA主要靶器官各不相同。CYP2E1和CYP2A6被普遍认为是催化 *N*-亚硝胺化合物代谢产生遗传毒性的主要代谢酶^[18]。但研究表明不同 *N*-亚硝胺化合物的主要代谢酶不尽相同^[19]。NDMA组在给药期和恢复期均未见CYP2A6和CYP2E1表达升高,提示NDMA在小鼠肝肾中的主要代谢酶可能并非CYP2A6和CYP2E1。NDEA高剂量组肺脏CYP2E1和CYP2A6表达显著升高,提示NDEA在首次给药后7 d可作用于小鼠肺脏,且可能被小鼠肝脏CYP2E1和CYP2A6代谢活化产生毒性。初步验证了 *ATM*、*gH2AX*、*Prkdc*和血清、脏器8-OHdG的表达水平可用于亚硝胺的致突变性预测。

本研究在证实NDMA和NDEA对小鼠的重复给药毒性的同时,证明了体内彗星试验和 *Pig-a*基

因突变实验用于 *N*-亚硝胺化合物遗传毒性评价的可行性,并对8-OHdG和 *ATM*、*gH2AX*等DNA损伤修复基因用于遗传毒性评价进行了初步探索。研究结果对 *N*-亚硝胺化合物的毒性及遗传毒性风险评估提供参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 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.
- [2] FDA. FDA Announces Voluntary Recall of Several Medicines Containing Valsartan Following Detection of an Impurity [EB/OL]. (2019-12-14) [2020-11-10]. <https://www.fda.gov/newsevents/pressannouncements/fda-announces-voluntary-recall-several-medicines-containing-valsartan-following-detection-impurity>.
- [3] European Medicines Agency. Angiotensin-II Receptor Antagonists (Sartans) Containing a Tetrazole Group [S]. 2019.
- [4] Magee P N, Barnes J M. The production of malignant primary hepatic tumours in the rat by feeding dimethylnitrosamine [J]. Br J Cancer, 1956, 10(1): 114-122.
- [5] Yahagi T, Nagao M, Seino Y, et al. Mutagenicities of *N*-nitrosamines on *Salmonella* [J]. Mutat Res, 1977, 48(2): 121-129.
- [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] 文海若,叶倩,于敏,等.亚硝胺化合物对人源肝癌细胞HepG2的DNA损伤风险评价[J].药物评价研究, 2022, 45(11): 2200-2207.
Wen H R, Ye Q, Yu M, et al. DNA damage risk assessment of nitrosamine compounds on human hepatocyte HepG2 [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(11): 2200-2207.
- [8] George J, Tsuchishima M, Tsutsumi M. Metabolism of *N*-nitrosodimethylamine, methylation of macromolecules, and development of hepatic fibrosis in rodent models [J]. J Mol Med, 2020, 98(9): 1203-1213.
- [9] 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.
- [10] Jha A N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay [J]. Mutagenesis, 2008, 23(3): 207-221.
- [11] Kawagoe K, Takeda J, Endo Y, et al. Molecular cloning of murine pig-a, a gene for GPI-anchor biosynthesis, and demonstration of interspecies conservation of its structure, function, and genetic locus [J]. Genomics, 1994, 23(3): 566-574.
- [12] Kimoto T, Suzuki K, Kobayashi X M, et al. Manifestation of Pig-a mutant bone marrow erythroids and peripheral blood erythrocytes in mice treated with *N*-ethyl-*N*-nitrosourea: Direct sequencing of Pig-a cDNA from bone marrow cells negative for GPI-anchored protein expression [J]. Mutat Res Toxicol Environ Mutagen, 2011, 723(1): 36-42.
- [13] Olsen A K, Dertinger S D, Krüger C T, et al. The *Pig-a* gene mutation assay in mice and human cells: A review [J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2017, 3: 78-92.
- [14] O'Connor M J. Targeting the DNA damage response in cancer [J]. Mol Cell, 2015, 60(4): 547-560.
- [15] Valavanidis A, Vlachogianni T, Fiotakis C. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG): A critical biomarker of oxidative stress and carcinogenesis [J]. J Environ Sci Health C, 2009, 27(2): 120-139.
- [16] Weitering T J, Takada S, Weemaes C M R, et al. ATM: Translating the DNA damage response to adaptive immunity [J]. Trends Immunol, 2021, 42(4): 350-365.
- [17] Halazonetis T D, Gorgoulis V G, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development [J]. Science, 2008, 319(5868): 1352-1355.
- [18] Camus A M, Geneste O, Honkakoski P, et al. High variability of nitrosamine metabolism among individuals: Role of cytochromes P450 2A6 and 2E1 in the dealkylation of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosodiethylamine in mice and humans [J]. Mol Carcinog, 1993, 7(4): 268-275.
- [19] Kamataki T, Fujita K, Nakayama K, et al. Role of human cytochrome P450 (CYP) in the metabolic activation of nitrosamine derivatives: application of genetically engineered *Salmonella* expressing human CYP [J]. Drug Metab Rev, 2002, 34(3): 667-676.

[责任编辑 兰新新]