

适宜纳米材料的体外彗星试验方法研究

吴辉^{1#}, 汪祺^{1, 2#}, 杨颖¹, 耿兴超³, 文海若^{3*}

1. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

2. 中国食品药品检定研究院 中药民族药检定所, 北京 100050

3. 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 通过比较体外彗星常规试验方法和添加DNA修复酶——甲酰胺嘧啶DNA糖基化酶(FPG)的改良试验方法, 探究适宜评价纳米材料DNA损伤的遗传毒性试验方法。方法 使用TK6和CHL细胞, 以聚苯乙烯微球为纳米级阴性对照, 设置低、中、高浓度(5、10、20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的纳米标准物质Ag40, 分别使用体外彗星常规试验方法和FPG酶改良试验方法, 在非代谢活化条件下与细胞暴露4、24、72 h(以甲基磺酸甲酯为阳性对照), 代谢活化条件下添加2种配方的S9 mix(配方A中S9质量分数为10%, 配方B中S9质量分数为3.36%, 另添加钙离子)与细胞暴露4 h(以环磷酰胺为阳性对照), 检测%tail DNA和Olive尾距。结果 聚苯乙烯纳米微球与溶媒对照组比较未见统计学差异, 体外彗星试验结果为阴性, 阳性对照组结果均为阳性。非代谢活化条件下Ag40与TK6、CHL细胞作用4、24、72 h, 高、中、低浓度组的%tail DNA、Olive尾距与溶媒对照组相比均明显升高, 体外彗星试验结果为阳性。改良FPG酶处理法与常规方法在各条件下相比, Ag40的%tail DNA、Olive尾距均有一定程度的升高。代谢活化条件下, S9 mix配方A和配方B的体外彗星试验阳性结果基本一致。结论 添加FPG酶及调整S9含量(质量分数3.36%)后的改良体外彗星试验方法适用于纳米材料的DNA损伤风险评价。

关键词: 彗星试验; 纳米材料; 甲酰胺嘧啶DNA糖基化酶(FPG); DNA损伤; 遗传毒性

中图分类号: R965.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2024)08-1695-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2024.08.004

Study on *in vitro* Comet assay suitable for nanomaterials

WU Hui¹, WANG Qi^{1,2}, YANG Ying¹, GENG Xingchao³, WEN Hairuo³

1. China Pharmaceutical University School, Nanjing 210009, China

2. Institute of Chinese Traditional Medicine and Ethnic Medicine, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

3. Beijing Key Laboratory of Non-Clinical Drug Safety Evaluation, National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

Abstract: Objective To explore the genetic toxicity test method suitable for evaluating the DNA damage of nanomaterials, by comparing the conventional comet test method *in vitro* with the modified formamide pyrimidine DNA glycosylation enzyme (FPG) enzyme test method. **Methods** TK6 and CHL cells were used, polystyrene microspheres were used as nanoscale negative controls, and the nanoscale reference material Ag40 in low, medium, and high concentrations (5, 10, and 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) were exposed to the cells under non-metabolic activation conditions for 4, 24 and 72 h (using methyl methanesulfonate as a positive control) using two different test methods, respectively. Under metabolic activation conditions, two different formulations of S9 mix were added (10% S9 content in formula A, 3.36% S9 content in formula B, plus calcium ions) and cells were exposed for 4 h (using cyclophosphamide as a positive control), and %tail DNA and Olive Tail Moment (OTM) were detected. **Results** Ag40 was treated with TK6 and CHL cells for 4 h, 24 h and 72 h under non-metabolic activation conditions, and the % tail DNA of high, medium and low dose groups was significantly different from that of the solvent control group, and the results of comet test *in vitro* were positive. There was no

收稿日期: 2024-04-10

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFC2409702)

#共同第一作者: 吴辉, 女, 硕士研究生, 研究方向为遗传毒理学。

汪祺, 女, 博士, 研究员, 研究方向为药物毒理学

*通信作者: 文海若, 女, 博士, 研究员, 研究方向为药理毒理学。E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

statistical difference between polystyrene nanospheres and solvent control group, and the results of comet test *in vitro* were negative. Compared with the conventional method, the OTM of Ag40 was increased to a certain extent by modified FPG enzyme treatment. Under the condition of metabolic activation, the positive results of *in vitro* comet test of formula A and formula B of S9 mix were basically the same. **Conclusion** The modified *in vitro* comet assay method after adding FPG enzyme and adjusting S9 content (3.36%) is suitable for DNA damage risk assessment of nanomaterials.

Key words: Comet test; nanomaterials; formamide pyrimidine DNA glycosylation enzyme (FPG); DNA damage; genetic toxicity

纳米材料具有独特物理化学性质及与生物体相互作用的特性,在食品加工、抗菌产品生产、药物载体开发、肿瘤诊疗、体内示踪等领域中具有广泛的应用前景^[1]。纳米药物是指利用纳米制备技术将原料药或将载体材料与原料药结合形成的具有纳米尺度的颗粒及药物制剂^[2],目前为止,已有超过60种纳米制剂获得上市批准。然而,由于复杂的组成结构和特殊的理化性质,纳米药物的安全性,尤其是致癌性风险,引起广泛关注,如金属类无机纳米材料可穿透核膜,在表面活性和蓄积性的共同作用下,间接作用于细胞的遗传物质,产生DNA损伤。然而,随着研究的深入,当前国内外普遍认为传统的遗传毒性评价方法无法科学且充分地评价纳米材料的潜在风险^[3]。

彗星试验,即单细胞凝胶电泳(SCGE)是一项以DNA单链或双链损伤为评价终点的遗传毒性评价方法。它可直观地定量分析细胞内DNA单、双链缺口损伤的程度^[4],因DNA断裂是纳米材料常见的遗传毒性表现形式,彗星试验也是纳米材料的常见毒性评价方法。纳米尺寸的材料进入细胞较缓慢且蓄积时间较长,传统体外细胞试验在细胞培养及加样处理过程中通常存在血清、白蛋白、S9等成分,可能会影响细胞对纳米的摄取能力,导致假阴性结果。且不同细胞系对纳米材料摄取的敏感性及对DNA损伤的修复能力有所差异^[5-6],人源细胞p53基因功能完整,对损伤具有一定的修复能力。本研究使用人淋巴瘤(TK6)细胞和中国仓鼠肺(CHL)细胞开展以纳米标准物质为受试物的体外彗星试验。本研究在常规试验的基础上加入DNA修复酶——甲酰胺嘧啶DNA糖基化酶(FPG)并调整代谢活化系统(大鼠肝S9混合液,S9 mix)配方,建立适宜纳米材料的体外彗星试验研究方法及评价体系,为后续纳米药物的遗传毒性评价标准化提供借鉴。

1 材料

1.1 细胞

TK6细胞(10代以内)、CHL细胞(10代以内)来自中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心,

液氮保存。

1.2 主要试剂

纳米级受试物:Ag40(粒径40 nm,批号NM220722)来自国家纳米科学中心;聚苯乙烯纳米微球(粒径40 nm,批号JK-05-001-040)购自南京基科生物科技有限公司;丙酮酸钠及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公司;青链霉素混合液购自中国Solarbio公司;FPG购自美国New England Biolabs公司;马血清(DES)购自美国Cytiva公司;胎牛血清(FBS)购自以色列Biological Industries公司;RPMI 1640培养基购自中国Vivacell公司;SYBR Gold[®]染液购自美国Invitrogen公司;Trevigen Comet Assay[®] Kit彗星检测试剂盒购自美国Trevigen公司;SD大鼠肝S9混合液(由苯巴比妥钠和β-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

NU-543-400S生物安全柜(美国Nuair公司);5810R冷冻高速离心机(德国Eppendorf公司);PB203电子天平(美国Mettler Toledo Instrument公司);CP6201电子天平(德国Sartorius公司);Countness II FL全自动细胞计数仪(美国Thermo Fisher公司);BX63荧光显微镜(日本OLYMPUS公司);HSI高光谱成像系统(美国CytoViva公司)。

2 方法

2.1 细胞培养和给药处理

2.1.1 细胞培养 复苏TK6细胞,用RPMI 1640培养基(含10%灭活DES、2%丙酮酸钠和1%青链霉素混合液)培养1~2代,达到对数生长期后,进行给药及后续操作。

复苏CHL细胞,用RPMI 1640培养基(含10%FBS、1%青链霉素混合液)培养1~2代,达到对数生长期后,进行给药及后续操作。

2.1.2 非代谢活化条件下给药处理 TK6细胞培养体系在室温条件下1 000 r·min⁻¹离心5 min,弃掉上清液;CHL细胞培养体系弃去旧培养基,在37℃

条件下,经胰酶消化收集细胞,室温 $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃掉上清液。用RPMI 1640完全培养基调整TK6和CHL细胞浓度为 2×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 接种于 $21\ \text{cm}^2$ 培养皿,每皿5 mL。CHL细胞接种后在 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养18~24 h,保证其贴壁良好。试验设计溶媒对照(灭菌注射用水)组、聚苯乙烯纳米微球组(纳米阴性对照, $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、Ag40(终质量浓度分别为5、10、 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组、MMS(阳性对照, $25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组,处理4、24、72 h。待受试物与TK6细胞反应结束后,室温 $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃去上层培养基;待受试物与CHL细胞反应结束后,用胰酶消化收集细胞,室温 $1\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心5 min,弃去上层培养基。RPMI 1640完全培养基重悬2种细胞并计数,将细胞浓度稀释到 2×10^5 个 $\cdot\text{mL}^{-1}$,进行后续制片处理。

2.1.3 代谢活化条件下给药处理 细胞接种操作同“2.1.2”项,加入500 μL S9 mix混匀,2种S9 mix配制方法参考文献报道(配方A为10% S9,配方B为3.36% S9)^[7]。CHL细胞接种后在 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养18~24 h,保证其贴壁良好。试验设计溶媒对照(灭菌注射用水)组、聚苯乙烯纳米微球组(纳米阴性对照, $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、Ag40(终浓度分别为5、10、 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组、CP(阳性对照, $100\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组,处理4 h。后续操作同“2.1.2”项。

2.2 体外彗星试验

参照Trevigen Comet Assay[®] Kit彗星检测试剂盒说明准备裂解液、LMAgarose等试剂,放置适宜温度保存。1.5 mL试管每管预先加入500 μL CometLMAgarose, $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴;取细胞悬液50 μL 加入1.5 mL试管中,迅速混匀后每孔50 μL 铺片,每个样本平行2孔。铺片结束后迅速将玻片置于 $4\ ^\circ\text{C}$ 、避光冷却15 min。将玻片置于预冷的裂解液中避光, $4\ ^\circ\text{C}$ 过夜($\geq 14\ \text{h}$)。裂解结束后常规法使用预冷的超纯水清洗玻片至少3次,每次5 min。FPG法使用预冷的酶缓冲液洗3次,每次5 min,取出玻片在每个孔中加入30 μL 含有FPG酶的缓冲液 $37\ ^\circ\text{C}$ 孵育45 min。将玻片平行码放在电泳槽内,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32 V,此时电流约为 $(300\pm 10)\ \text{mA}$,电泳过程中保持电泳液温度不超过 $10\ ^\circ\text{C}$,电泳20 min。电泳结束后,取出玻片,轻轻擦拭,去除多余液体。先用中和液漂洗5 min,更换新的中和液漂洗15 min。取出玻片,浸于无水乙醇溶液不少于15 min。将玻片放置通风处,室温

自然干燥。使用SYBRGold[®](1:10 000)染液染色30 min,染色结束使用Comet IV(Instem)彗星图像分析软件进行分析,每个样本至少计数150个彗星细胞的尾DNA百分含量(%tail DNA),计算Olive尾矩(OTM)。

Olive尾矩=%tail DNA \times 尾矩(头中心与尾中心之间的长度)

2.3 数据处理

所有数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,对3组及以上数据采用单因素方差分析检验进行统计学分析,数据图与统计结果采用GraphPad Prism8软件处理生成。

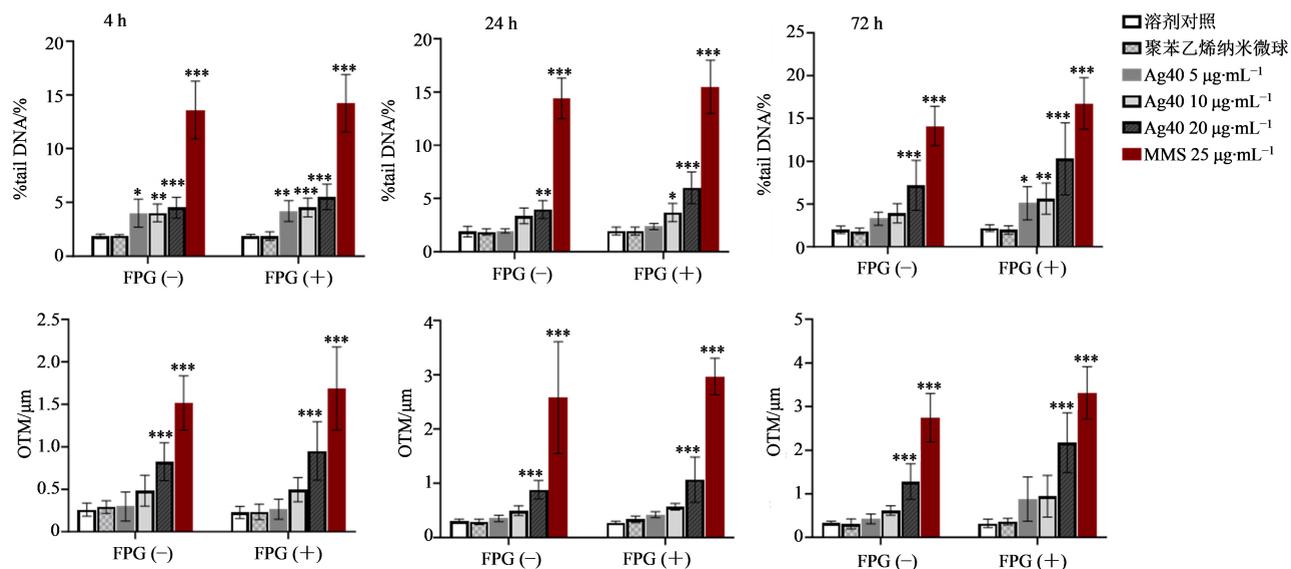
3 结果

3.1 非代谢活化条件下试验结果

MMS与TK6、CHL细胞在非代谢活化条件下作用4、24、72 h后,使用常规彗星试验方法与FPG酶处理法时,MMS的%tail DNA、OTM均显著高于溶媒对照组($P<0.001$),见图1、2,提示该试验体系成立。

非代谢活化条件下Ag40与TK6细胞作用4 h后,各浓度组的%tail DNA与溶媒对照组和聚苯乙烯纳米微球组相比均显著升高($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),且各浓度组经过FPG处理后,%tail DNA均有所增加。作用24、72 h后有和无FPG酶处理的Ag40高浓度($20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组、有FPG酶处理的Ag40中浓度($10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组及72 h有FPG酶处理的低浓度($5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组的%tail DNA与溶媒对照组和聚苯乙烯纳米微球组相比均显著升高($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),且各浓度组经过FPG处理后,%tail DNA均有所增加。Ag40与TK6细胞作用4、24和72 h后,有和无FPG酶处理的Ag40高浓度($20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组的OTM与溶媒对照组相比显著升高($P<0.001$),其他浓度组未见统计学差异,但各浓度组经过FPG酶处理后,OTM均有一定程度的升高(图1)。

非代谢活化条件下Ag40与CHL细胞作用4 h后,无FPG酶处理的各浓度组的%tail DNA与溶媒对照组和聚苯乙烯纳米微球组相比均未见显著性增加;4 h有FPG酶处理的Ag40高浓度($20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组,24、72 h有和无FPG酶处理的Ag40高浓度($20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组,72 h有和无FPG酶处理的Ag40中浓度($10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)组的%tail DNA与溶媒对照组和聚苯乙烯纳米微球组相比显著升高($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001),且各浓度组经过FPG酶处理后,%tail DNA均有所增加。Ag40与CHL细胞作用4、24和72 h后,有和无FPG酶处理的Ag40高

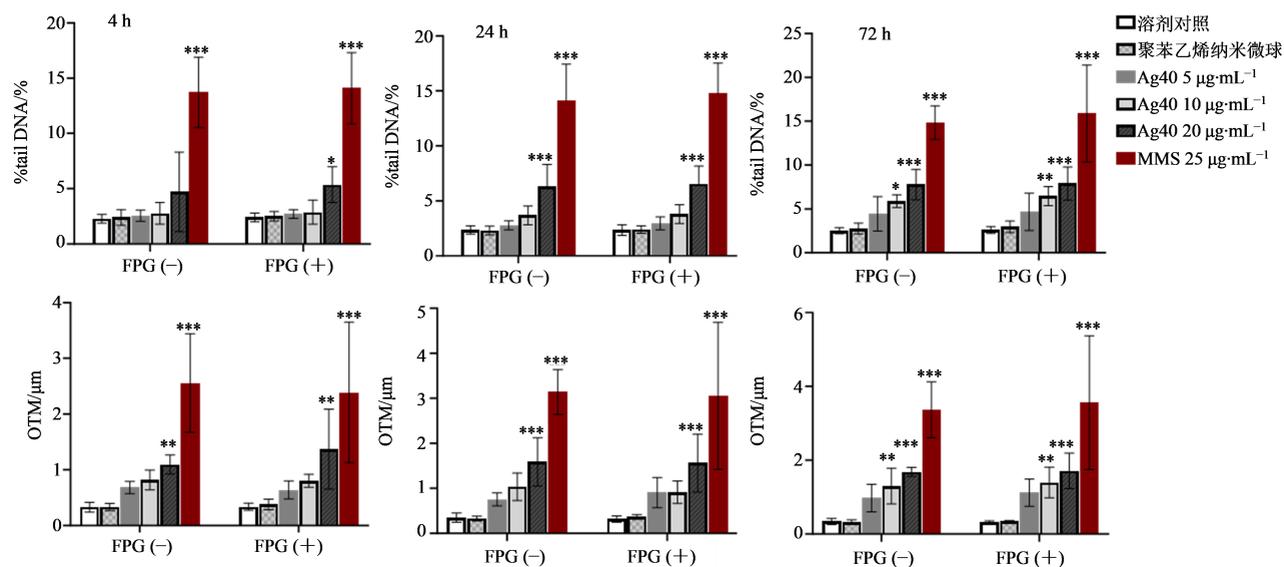


与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ 。

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

图 1 非代谢活化条件下 TK6 细胞彗星电泳结果

Fig. 1 Results of TK6 cells comet electrophoresis under non-metabolic activation conditions



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.

图 2 非代谢活化条件下 CHL 彗星电泳结果

Fig. 2 Results of CHL comet electrophoresis under non-metabolic activation conditions

浓度 ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组及 72 h 有和无 FPG 酶处理的 Ag40 中浓度 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组的 OTM 与溶媒对照组相比显著增加 ($P < 0.01, 0.001$), 其他浓度组未见统计学差异。且各浓度组经 FPG 酶处理后, OTM 均有所增加 (图 2)。

3.2 代谢活化条件下试验结果

Ag40 与 TK6 细胞在 2 种配方的 S9 mix 条件下作用 4 h 后, 配方 A、B 的有和无 FPG 酶处理的 Ag40 高浓度 ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组的 %tail DNA、OTM 与溶媒对

照组和聚苯乙烯纳米微球组相比显著升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。经过 FPG 酶处理后, Ag40 各浓度组的 OTM 均有所增加。结果见图 3。

Ag40 与 CHL 在 2 种配方的 S9 mix 条件下作用 4 h 后, 配方 A 的有和无 FPG 酶处理的 Ag40 高浓度 ($20 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组及有 FPG 酶处理的 Ag40 中浓度 ($10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组, 配方 B 的有和无 FPG 酶处理的 Ag40 高、中、低浓度 ($20, 10, 5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组的 %tail DNA、OTM 与对照组和聚苯乙烯纳米微球组比较

均显著增加 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 且经过 FPG 酶处理后, Ag40 各浓度组的 %tail DNA、OTM 均有所增加。结果见图 4。

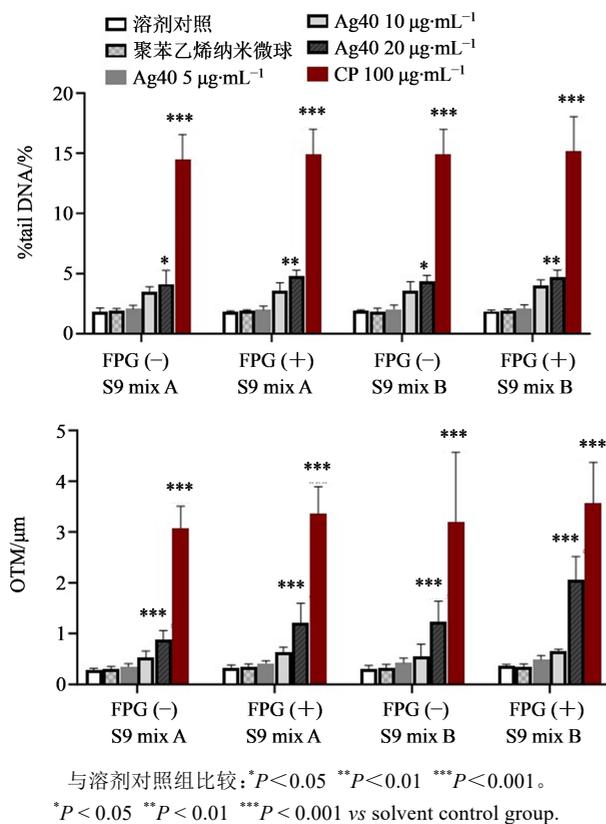


图3 2种 S9 mix 代谢活化条件下 TK6 细胞 %tail DNA 和 OTM 结果
Fig. 3 TK6 cells % tail DNA and OTM results under two S9 mix metabolic activation conditions

4 讨论

氧化应激是纳米材料诱导 DNA 损伤的重要机制, FPG 兼具 N-端糖基化酶活性和 AP-裂解酶活性, 可识别并切除 8-OH 鸟嘌呤及其他氧化损伤的嘌呤^[8]。在彗星试验中添加 FPG 有助于分析 DNA 断裂是否与氧化应激有关, 获得 DNA 损伤类型的相关信息。Karlsson 等^[9]研究表明, 彗星试验中 CuO 纳米颗粒暴露于 A549 细胞后会引发细胞毒性和 DNA 损伤, 同时 FPG 酶揭示 CuO 纳米颗粒增加了氧化损伤 DNA 水平。

纳米药物的毒性主要取决于其理化特性^[10]。纳米材料的尺寸越小, 越容易通过内化/摄取进入生物体。研究表明, 小于 50 nm 的纳米粒 iv 后能够更快分布到各个组织器官, 诱导氧化应激和 DNA 损伤的能力更强, 从而产生更高的毒性效应^[11]。作为极具前景的纳米材料, 纳米银的尺寸与其细胞毒性和遗传毒性强弱呈反比, Yang 等^[12]研究提示, 30~

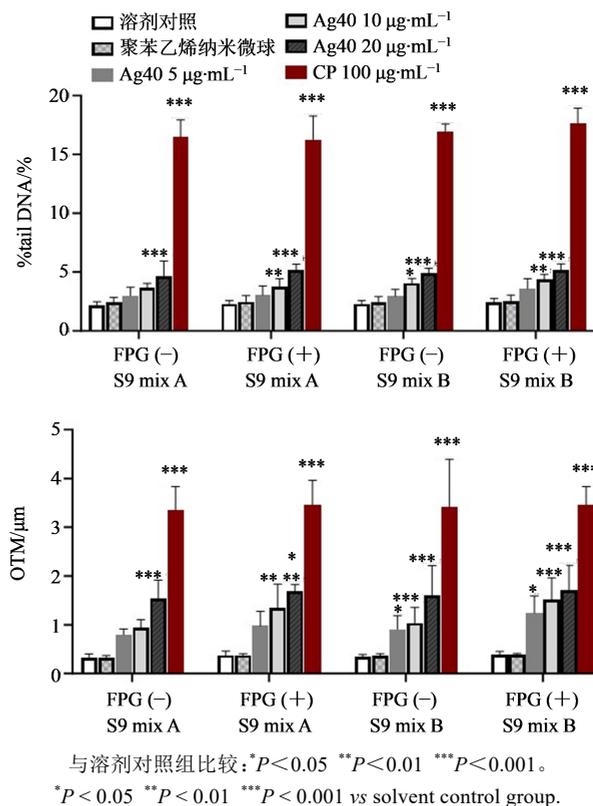


图4 2种 S9 mix 代谢活化条件下 CHL 细胞 %tail DNA 和 OTM 结果
Fig. 4 CHL cells %tail DNA and OTM results under two S9 mix metabolic activation conditions

50 nm 的纳米银可以透过核膜, 干扰 DNA 复制并与 DNA 磷酸骨架结合。Hsiao 等^[13]研究称 20~80 nm 的纳米银的毒性主要来源于银离子的释放, 而 10 nm 的纳米银由于尺寸较小更易穿透细菌的细胞膜, 毒性主要归于自身的效应。本研究结果显示惰性纳米材料聚苯乙烯纳米微球体外彗星试验结果为阴性, 纳米标准物质 Ag40 的体外彗星试验结果为阳性, 且发现 DNA 损伤情况与给予 Ag40 的浓度呈正相关, 加入 FPG 酶处理后, Ag40 导致的 DNA 拖尾与常规方法相比有一定程度的升高, 与文献报道相符。本研究提示 Ag40 作用于细胞后, 不仅诱发了 DNA 链断裂, 对 8-OH 鸟嘌呤及其他嘌呤也有损伤, 此类损伤属于氧化损伤, 且存在一定的浓度相关性。之后的研究中可增加相关抗氧化指标检测, 以进一步验证上述结果。

由苯巴比妥钠和 β -萘黄酮联合诱导大鼠肝脏制成的 S9 混合液中含有细胞色素 P450 酶、葡萄糖醛酸转移酶、醛氧化酶、黄嘌呤氧化酶、磺基转移酶、甲基转移酶、N-乙酰基转移酶等 I 相和 II 相代谢酶^[14]。本研究比较了 2 种 S9 mix 配方对试验结果的影响, 配方 A 中 S9 质量分数为 10%, 配方 B 中 S9 质

量分数仅为3.36%。尽管S9的质量分数不同,但2种配方彗星试验阳性结果基本一致,且与非代谢活化条件下的彗星结果相比无显著区别,可能是S9内含有大量药物代谢酶,酶作为蛋白质与纳米材料结合,从而对细胞摄取纳米材料产生抑制作用。Johnston等^[15]研究指出纳米材料与蛋白质结合后,附着蛋白可能会阻断纳米表面,从而降低纳米的反应性和毒性,同时附着蛋白可能会改变结构构象并变性,从而失去活性。Li等^[16]认为纳米银是纯金属颗粒,经S9代谢的可能性不大,但S9 mix可以包裹纳米颗粒,形成纳米颗粒胶束,影响纳米银诱导微核的产生。因此纳米材料的体外彗星试验标准化方案应包括有无代谢活化条件,本研究结果提示配方B的S9 mix更为适宜纳米材料的遗传毒性评价。

本研究从氧化应激损伤检测和S9对试验体系的影响角度比较并优化了基于TK6细胞和CHL细胞的体外彗星试验,使其适用于纳米材料的DNA损伤性风险评价,为后续纳米材料体外彗星试验的标准化工作奠定基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Xavier P L, Chandrasekaran A R. DNA-based construction at the nanoscale: Emerging trends and applications [J]. *Nanotechnology*, 2018, 29(6): 062001.
- [2] 国家药品监督管理局药品审评中心. «纳米药物质量控制研究技术指导原则(试行)»«纳米药物非临床药代动力学研究技术指导原则(试行)»«纳米药物非临床安全性评价研究技术指导原则(试行)»的通告(2021年第35号) [EB/OL]. (2021-08-27) [2024-03-10]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/95945bb17a7dcde7b68638525ed38f66>. Drug Evaluation Center of the State Drug Administration. Technical Guidelines for Quality Control Research of Nanomedical Drugs (Trial). Technical Guidelines for Non-clinical Pharmacokinetic Research of Nanomedical Drugs (Trial). Technical Guidelines for Non-clinical Safety Evaluation Research of Nanomedical Drugs (Trial), Circular (No. 35 of 2021) [EB/OL]. (2021-08-27) [2024-03-10]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/95945bb17a7dcde7b68638525ed38f66>.
- [3] OECD. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 43: Genotoxicity of Manufactured Nanomaterials: Report of the OECD Expert Meeting [EB/OL]. (2014-12-3) [2024-03-10]. [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2014\)34&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2014)34&doclanguage=en).
- [4] Walsh K D, Kato T A. Alkaline comet assay to detect DNA damage [J]. *Methods Mol Biol*, 2023, 2519: 65-72.
- [5] Cveticanin J, Joksic G, Leskovac A, et al. Using carbon nanotubes to induce micronuclei and double strand breaks of the DNA in human cells [J]. *Nanotechnology*, 2010, 21(1): 015102.
- [6] di Virgilio A L, Reigosa M, Arnal P M, et al. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells [J]. *J Hazard Mater*, 2010, 177(1/2/3): 711-718.
- [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] Speit G, Schütz P, Bonzheim I, et al. Sensitivity of the FPG protein towards alkylation damage in the comet assay [J]. *Toxicol Lett*, 2004, 146(2): 151-158.
- [9] Karlsson H L, Cronholm P, Gustafsson J, et al. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: A comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes [J]. *Chem Res Toxicol*, 2008, 21(9): 1726-1732.
- [10] Zhao Z M, Ukidve A, Krishnan V, et al. Effect of physicochemical and surface properties on *in vivo* fate of drug nanocarriers [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, 143: 3-21.
- [11] Ajdary M, Moosavi M A, Rahmati M, et al. Health concerns of various nanoparticles: A review of their *in vitro* and *in vivo* toxicity [J]. *Nanomaterials (Basel)*, 2018, 8(9): 634.
- [12] Yang W J, Shen C C, Ji Q L, et al. Food storage material silver nanoparticles interfere with DNA replication fidelity and bind with DNA [J]. *Nanotechnology*, 2009, 20(8): 085102.
- [13] Hsiao I L, Hsieh Y K, Wang C F, et al. Trojan-horse mechanism in the cellular uptake of silver nanoparticles verified by direct intra- and extracellular silver speciation analysis [J]. *Environ Sci Technol*, 2015, 49(6): 3813-3821.
- [14] Richardson S J, Bai A, Kulkarni A A, et al. Efficiency in drug discovery: Liver S9 fraction assay As a screen for metabolic stability [J]. *Drug Metab Lett*, 2016, 10(2): 83-90.

- [15] Johnston H, Brown D, Kermanizadeh A, et al. Investigating the relationship between nanomaterial hazard and physicochemical properties: Informing the exploitation of nanomaterials within therapeutic and diagnostic applications [J]. J Control Release, 2012, 164 (3): 307-313.
- [16] Li Y, Chen D H, Yan J, et al. Genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using the Ames test and *in vitro* micronucleus assay [J]. Mutat Res, 2012, 745(1/2): 4-10.

[责任编辑 兰新新]

•公益广告•

