

# *N*-亚硝基乙基异丙胺和 *N*-亚硝基二异丙胺致小鼠肝毒性和肠道菌群代谢差异

文海若<sup>1</sup>, 寇小旋<sup>2#</sup>, 赵晶<sup>1</sup>, 赵婷婷<sup>1</sup>, 汪祺<sup>3\*</sup>

1. 中国食品药品检定研究院 安全评价研究所, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

2. 中国药科大学, 江苏 南京 210009

3. 中国食品药品检定研究院 中药民族药检定所, 北京 100020

**摘要:** **目的** 从肠道菌群的角度探讨结构相似的 *N*-亚硝基乙基异丙胺 (NEIPA) 和 *N*-亚硝基二异丙胺 (NDIPA) 的肝毒性强弱与其代谢途径差异的关联。**方法** 70 只 C57BL/6J 小鼠随机分为 7 组: 对照组 (0.5% CMC-Na), NEIPA 低、中、高剂量 (25、50、100 mg·kg<sup>-1</sup>) 组, NDIPA 低、中、高剂量 (25、50、100 mg·kg<sup>-1</sup>) 组, 各组连续 ig 给药 7 d, 随后设置 3 周恢复期, 并且分别在末次给药和恢复期结束解剖动物和观察指标。实验期间, 每天观察动物一般状态, 每周测定体质量。末次给药后称肝脏质量、进行血清生化检查和肝组织病理学检查。试验期间收集粪便, 并进行 16S rRNA 基因测序, 比较其在肠道菌群结构组成方面的差异。**结果** 与对照组相比, NEIPA 组和 NDIPA 组在首次给药后 28 d 内均未观察到异常症状或明显体质量下降, 且 NEIPA 组和 NDIPA 组与对照组在脏器指数上无显著差异; 首次给药后 7、28 d 时, NEIPA 高剂量组在丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 水平上显著升高 ( $P < 0.01$ 、 $0.001$ ); 给药 7 d 时, NDIPA 高剂量组肌酸激酶 (CK) 水平显著升高 ( $P < 0.05$ ), 但在首次给药后 28 d 时无显著差异。NEIPA 中、高剂量组可见肝细胞肥大/核巨大, 病变发生率及病变程度随剂量增加而增加; 肠道菌群分析结果提示, 与对照组相比, 在给予 NEIPA 的小鼠中, *Turicibacter*、*Lactobacillus*、*Akkermansia* 和 *Faecelbaculum* 的丰度显著增加, *Liilactobacillus*、*f\_Lachnospiraceae*、*Lachnospiraceae\_NK4A136\_group* 的丰度降低; 在给予 NDIPA 的小鼠中, *f\_Muribaculaceae*、*g\_unclassified\_o-Clostridia\_UCG-014*、*Lactobacillus* 和 *Akkermansia* 的丰度增加, *Lachnospiraceae\_NK4A136* 和 *liilactobacillus* 的丰度降低。**结论** NEIPA 仅比 NDIPA 多一个  $\alpha$ -氢原子, 但肝毒性存在一定差异, NEIPA 增加了与胆汁酸代谢相关的 *Turicibacter* 的丰度, NDIPA 增加了有促炎作用的 *o-Clostridia\_UCG-014* 的丰度。NEIPA 和 NDIPA 肝毒性风险的差异可能归因于它们不同的代谢途径, 相关代谢途径及机制有待深入研究。

**关键词:** *N*-亚硝基杂质; *N*-亚硝基乙基异丙胺 (NEIPA); *N*-亚硝基二异丙胺 (NDIPA); C57BL/6J 小鼠; 肠道菌群代谢; 遗传毒性; 肝毒性

中图分类号: R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2025)09-2453-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.09.007

## Liver toxicity and differences in intestinal flora metabolism of *N*-nitrosoethylisopropylamine and *N*-nitrosodiisopropylamine in mice

WEN Hairuo<sup>1</sup>, KOU Xiaoxuan<sup>2</sup>, ZHAO Jing<sup>1</sup>, ZHAO Tingting<sup>1</sup>, WANG Qi<sup>3</sup>

1. Beijing Key Laboratory of Nonclinical Safety Evaluation Research of Drugs, Institute of Safety Evaluation, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China

2. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

3. Institute of Traditional Chinese Medicine and National Medicine Control, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100020, China

**Abstract: Objective** To investigate the relationship between the hepatotoxicity of *N*-nitrosoethyl isopropylamine (NEIPA) and *N*-nitroso-diisopropylamine (NDIPA) and their differences in metabolic pathways from the perspective of intestinal flora. **Methods**

收稿日期: 2025-02-19

基金项目: 药品监管科学全国重点实验室课题“药品杂质遗传毒性评价新技术和生物标志物研究”(2023SKLDRS0128)

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

#共同第一作者: 寇小旋 (2000—), 硕士研究生, 研究方向为遗传毒理学。E-mail: 1468021836@qq.com

\*通信作者: 汪祺, 女, 博士, 研究员, 研究方向为中药质量及安全性评价。E-mail: wangqi@nifdc.org.cn

Seventy C57BL/6J mice were randomly divided into seven groups: the control group (0.5% CMC-Na), the low, medium and high dose NEIPA groups (25, 50, and 100 mg·kg<sup>-1</sup>), and the low, medium and high dose NDIPA groups (25, 50, and 100 mg·kg<sup>-1</sup>). Each group was ig administered for seven consecutive days, followed by a three-week recovery period. Animals were dissected and indicators were observed at the end of the last administration and at the end of the recovery period, respectively. During the experiment, clinical symptoms were observed daily and weight was measured weekly. After the last dose, liver was weighed, serum biochemical examination and liver histopathology were performed. During the trial, stool was collected and 16S rRNA gene was sequenced to compare the differences in the structural composition of intestinal flora. **Results** Compared with the solvent group, no abnormal symptoms or significant weight loss were observed in NEIPA group and NDIPA group within 28 d after the first dose, and there was no significant difference in organ coefficient between NEIPA group and NDIPA group and the solvent control group. At D7 and D28 after administration, the ALT level in the high-dose group (100 mg·kg<sup>-1</sup>) of NEIPA group was significantly increased ( $P < 0.01, 0.001$ ); CK levels in the high-dose group (100 mg·kg<sup>-1</sup>) of the NDIPA group were significantly increased at D7 after administration ( $P < 0.05$ ), but there was no significant difference at D28 after administration. In NEIPA group (50 and 100 mg·kg<sup>-1</sup>), hepatocyte hypertrophy and nuclear giant were observed, and the incidence and degree of lesion increased with the increase of dose. The results of intestinal microflora analysis suggested that the abundance of *Turicibacter*, *Lactobacillus*, *Akkermansia* and *Faecalibaculum* were significantly increased in mice given NEIPA compared with the solvent group. The abundance of *Lilactobacillus*, *f\_Lachnospiraceae*, *Lachnospiraceae\_NK4A136\_group* decreased. In mice given NDIPA, the abundance of *f\_Muribaculaceae*, *g\_unclassified\_o\_Clostridia\_UCG-014*, *Lactobacillus* and *Akkermansia* increased, the abundance of *Lachnospiraceae\_NK4A136* and *lilactobacillus* decreased. **Conclusion** NEIPA has only one more  $\alpha$ -hydrogen atom than NDIPA, but there is some difference in hepatotoxicity. NEIPA increases the abundance of *Turicibacter*, which is related to bile acid metabolism, and NDIPA increases the abundance of *o\_Clostridia\_UCG-014*, which has pro-inflammatory effects. The difference in hepatotoxicity risk between NEIPA and NDIPA may be attributed to their different metabolic pathways, and relevant metabolic pathways and mechanisms need to be further studied.

**Key words:** *N*-nitroso impurities; *N*-nitrosoethyl isopropylamine (NEIPA); *N*-nitroso-diisopropylamine (NDIPA); C57BL/6J mice; intestinal flora metabolism; genotoxicity; hepatotoxicity

*N*-亚硝基化合物为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<sup>[1]</sup>,具有潜在的致癌风险。在人用药品中,处方、工艺、包材、生产和贮藏环境等因素均可能导致亚硝胺类杂质的产生<sup>[2-3]</sup>。自 2018 年缙沙坦事件以来,药品中的 *N*-亚硝胺类有害杂质引起了极大关注。美国食品药品监督管理局(FDA)在 2020 年 12 月 9 日的讨论中强调了与工业界持续对话的重要性,以确保基于全球统一要求提供安全药物。此外,欧盟也在 2018 年缙沙坦事件后对所有缙沙坦药物进行了审查,并扩展到其他血管紧张素受体阻滞剂/沙坦类药物,以及雷尼替丁药物的单独审查<sup>[4]</sup>。国际药品注册协调会议(ICH)也发布了关于 DNA 反应性杂质的分类及控制策略,这包括了亚硝胺类杂质的可接受摄入量的确定方法<sup>[5]</sup>。欧洲药品管理局(EMA)针对亚硝胺类化合物进行了深入研究,并提出了一种理论,即随着分子中  $\alpha$ -氢原子数的增加,亚硝胺的致突变性也相应增强<sup>[6-7]</sup>。然而,关于这种构效关系与毒性之间的具体联系,相关研究报告却鲜见报道。

在这样的背景下,肠道菌群的研究为探讨 *N*-亚

硝胺化合物的肝毒性提供了新视角。肠道菌群作为人体内重要的代谢和解毒场所,对化合物的代谢转化起着至关重要的作用。有研究表明,肠道菌群在 *N*-亚硝胺化合物代谢过程中发挥关键作用,菌群结构的改变可能导致 *N*-亚硝胺化合物在体内的积累,从而增加肝脏损伤的风险<sup>[8]</sup>。此外,特定肠道细菌还能将 *N*-亚硝胺化合物还原为亚硝酸,进而影响肝脏的氧化应激和炎症反应<sup>[9]</sup>。

*N*-亚硝基乙基异丙胺(NEIPA)和 *N*-亚硝基二异丙胺(NDIPA)是一对结构非常相似的亚硝胺化合物,NDIPA 仅比 NEIPA 增加一个  $\beta$  碳,NEIPA 仅比 NDIPA 多了一个  $\alpha$ -氢。目前两者均无半数中毒剂量(TD<sub>50</sub>)数据,当前 EMA 借用 *N*-亚硝基二乙胺(NDEA)的致癌性数据建议两者的终身服用临时限度为 26.5 ng·d<sup>-1</sup>。然而,NEIPA 和 NDIPA 体外致突变性和 DNA 损伤作用却存在明显差异,NEIPA 的致突变风险和 DNA 损伤作用均远强于 NDIPA。本研究从肠道菌群这一视角出发,探讨 NEIPA 和 NDIPA 的肝毒性强弱及其与代谢途径差异之间的内在联系。试图通过分析这 2 种化合物的代谢路径,揭示其肝毒性的差异,从而为风险评估

和防治策略的制定提供参考

## 1 材料

### 1.1 主要试剂

NEIPA (批号 19-NIT-05-52) 和 NDIPA (批号 19-NIT-06-45) 均由 Pharmaceutical Chemistry Laboratory 生产 (质量分数 99.5%); 使用 0.5% 的羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 分别制备 2.5、5.0、10.0 mg·mL<sup>-1</sup> 的 NEIPA 和 NDIPA 悬浮液, 供动物给药; EZNA™ 粪便 DNA 分离试剂盒 (美国 Omega Bio-tek 公司)。

### 1.2 实验动物

70 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 品系小鼠, 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) 2021-0006, 购入时约 6 周龄, 体质量约 20 g。饲养场所: 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心屏障系统。小鼠在屏障系统内 PC 聚碳酸酯鼠盒饲养, 提供钴 60 放射灭菌鼠全价颗粒饲料, 自由摄取。饲养环境保持温度 20~26 °C, 相对湿度 40%~70%, 每小时换气 15 次以上, 照明时间每天 12 h。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 (IACUC) 的伦理审查 (IACUC-2021-081)。

### 1.3 主要仪器

7180 型全自动生化仪 (日本 Hitachi 公司); PC 聚碳酸酯鼠盒 (北京科澳协力饲料有限公司); Illumina MiSeq PE300 平台 (中国 Allwegene Tech 公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物分组及给药

实验动物隔离 5 d 后, 随机分为 7 组: 对照组 (0.5% CMC-Na), NEIPA 低、中、高剂量 (25、50、100 mg·kg<sup>-1</sup>) 组, NDIPA 低、中、高剂量 (25、50、100 mg·kg<sup>-1</sup>) 组, 剂量参考两者的终身服用临时限度为 26.5 ng·d<sup>-1</sup> 及预试验设置, 每组 10 只, 每天 ig 1 次, 连续 7 d。

### 2.2 状态观察、体质量和脏器质量

每天观察动物症状, 并于 D1 (实验第 1 天)、D4、D7、D10、D14、D17、D21、D24、D28 测量体质量, 于 D7 及 D28 对动物经麻醉采血后, 完整取出肝脏、双侧肾脏和肺脏进行称质量, 计算脏器指数。

### 2.3 血清生化检测

动物经 ip 舒泰 50 麻醉后, 经腹腔大静脉采血用

于血清生化检测。取血后室温静置 15 min, 2 000~3 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min。取上清液采用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)、碱性磷酸酶 (ALP)、肌酸激酶 (CK) 水平。

### 2.4 病理学检查

小鼠肝脏组织经修块取材, 逐级酒精脱水、石蜡包埋, 切片机切片 (厚约 3 μm), 经苏木精-伊红 (HE) 染色, 光镜检查。

### 2.5 粪便微生物群 DNA 提取及 16S rRNA 基因测序

在 D7、D14、D28, 将单只小鼠转移至独立的已灭菌鼠笼, 采集新鲜粪便 (每次每只 2~3 粒), 收集对照组、NEIPA 和 NDIPA 高剂量组小鼠的粪便进行肠道菌群的检测。使用 EZNA 粪便 DNA 分离试剂盒从粪便样品中提取微生物 DNA。采用引物对 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 和 PCR 热循环器, 在以下条件下扩增细菌 16S rRNA 基因的高可变区 (V3~V4): 94 °C 初始变性 5 min, 然后是 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 72 °C 延伸 7 min 的 28 个循环。扩增子在 Illumina MiSeq PE300 平台上进行配对端测序。

### 2.6 微生物群数据分析

原始测序数据使用 QIIME 平台 (v2020.2) 进行分析。原始读数经过滤和组装。然后使用 SILVA 参考数据库分类器 (v138) 以 97% 的序列相似度阈值对 OUT 进行分类。OTUs 的 α-多样性指数 (Sobs、Shannon、Simpson、Chao) 采用 Mothur v1.30 计算。基于 unifrac 和 Bray-Curtis 距离, 主成分分析 (PCA) 采用 Vegan v3.3.1 进行排列多元方差分析 (PERMANOVA) 检验, 检验各组间微生物群落组成 (β-多样性) 的差异。使用 Python v2.7 分析群落组成, 以确定门和属水平上的每个样本相对丰度。

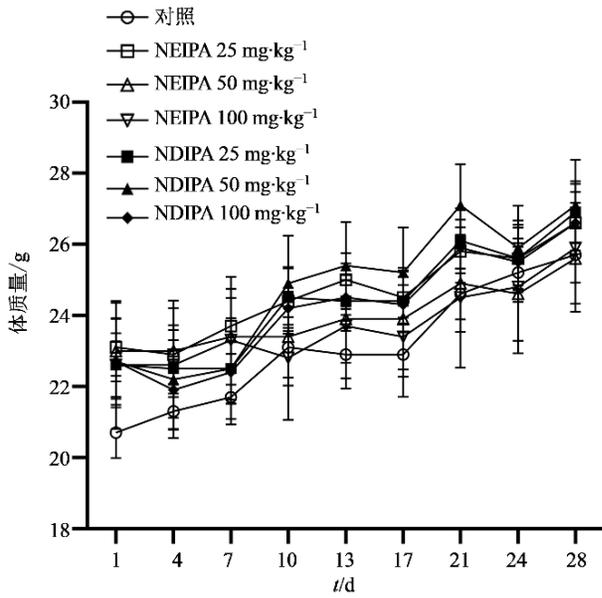
### 2.7 统计分析

数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 GraphPad Prism 8.0.1 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 体质量和器官指数

NEIPA 组和 NDIPA 组小鼠体质量变化见图 1, 脏器指数结果见图 2。本研究未见死亡或濒死动物。



D1~D7 为每组 10 只; D8~D28 为每组 5 只。

From day 1 to day 7, each group consists of 10 animals; from day 8 to day 28, each group consists of five animals.

图 1 NEIPA 和 NDIPA 对小鼠体质量的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Fig. 1 Effects of NEIPA and NDIPA on body weight of mice ( $\bar{x} \pm s$ )

NEIPA 组和 NDIPA 组所有动物给药后均未见异常症状。与对照组相比, NEIPA 组和 NDIPA 组动物平均体质量和肝、肾及肺的脏器指数均未见统计学差异。

### 3.2 血清生化

D7 解剖动物血清生化检测结果见图 3。与相应对照组相比, NEIPA 和 NDIPA 各剂量组中检测的 AST、ALP、LDH 和 TBIL 等指标均无明显显著性差异 ( $P > 0.05$ ); NEIPA 高剂量组 ALT 显著升高 ( $P < 0.01$ ); NDIPA 高剂量组 CK 显著升高 ( $P < 0.05$ )。

D28 结束后解剖动物血清生化检测结果见图 4。与相应对照组相比, NEIPA 和 NDIPA 各剂量组 ALP、LDH、TBIL、AST 和 CK 等指标检测结果均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。NEIPA 高剂量组 ALT 显著升高 ( $P < 0.001$ ), 且作用有剂量相关性。

### 3.3 病理学检查

小鼠的组织病理学结果显示 (图 5、表 1), NEIPA 中、高剂量可导致肝细胞肥大/巨大核, 且病变发生率和程度随剂量增加而增加, 认为与 NEIPA 作用有关。其余各组动物肝脏未见病变。

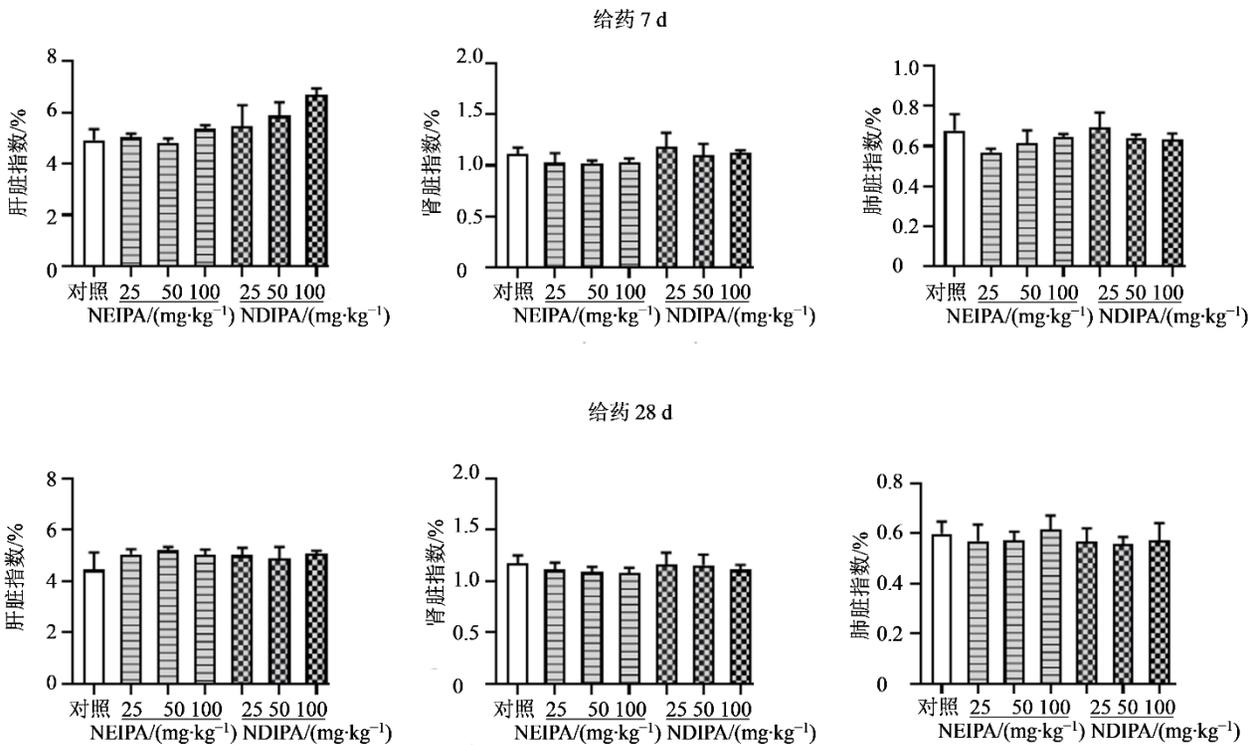


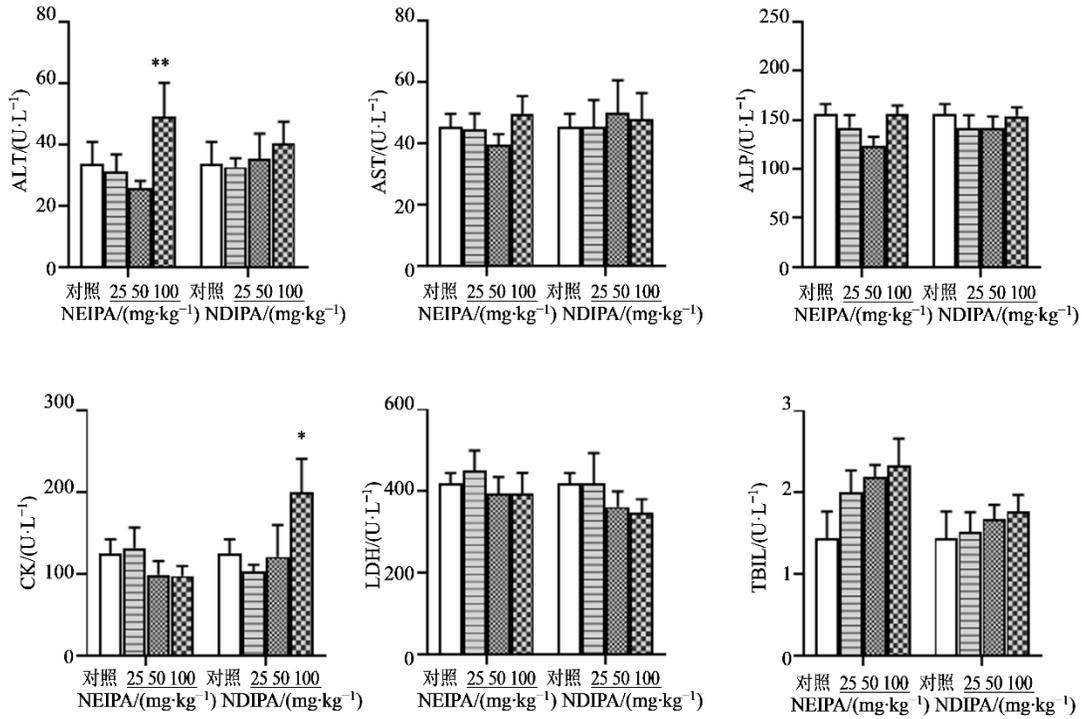
图 2 NEIPA 和 NDIPA 对小鼠器官指数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig. 2 Effects of NEIPA and NDIPA on organ coefficients in mice ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

### 3.4 肠道菌群分析

本研究对 100 mg·kg<sup>-1</sup> NEIPA 组和 100 mg·kg<sup>-1</sup>

NDIPA 组小鼠肠道菌群的结构和组成进行比较分析。Sobs、Ace、Chao 和 Shannon 指数测量 (图 6-

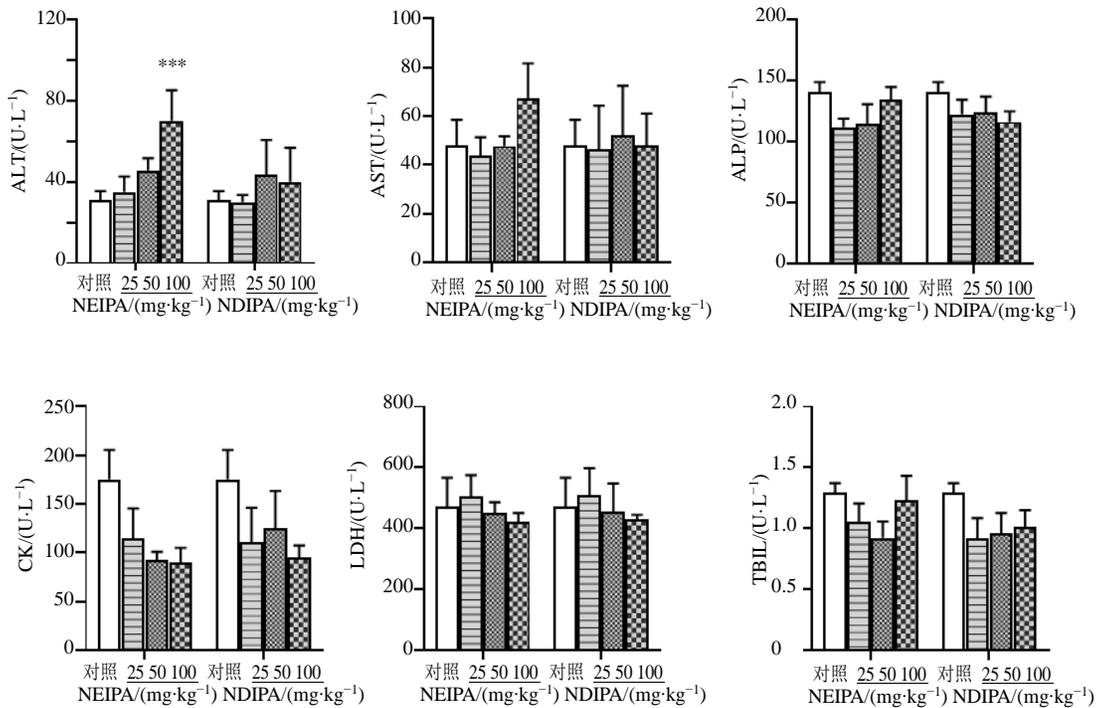


与对照组比较: \* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$ 。

\* $P < 0.05$  \*\* $P < 0.01$  vs control group.

图 3 末次给药后小鼠血清生化指标结果 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig. 3 Serum biochemical results of mice after last dose ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )



与对照组比较: \*\*\* $P < 0.01$ 。

\*\*\* $P < 0.01$  vs control group.

图 4 小鼠恢复期的血清生化指标结果 ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Fig. 4 Serum biochemical results of mice during recovery ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

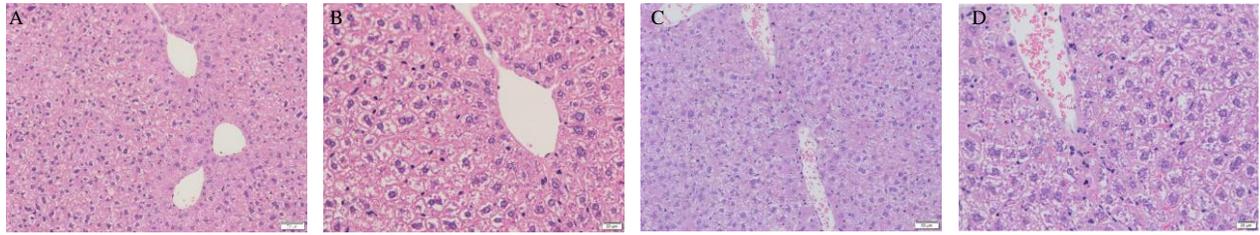


图 5 D28 对照组 (A: ×100, B: ×200)、NEIPA 高剂量组 (C: ×100, D: ×200) 肝脏背景病变

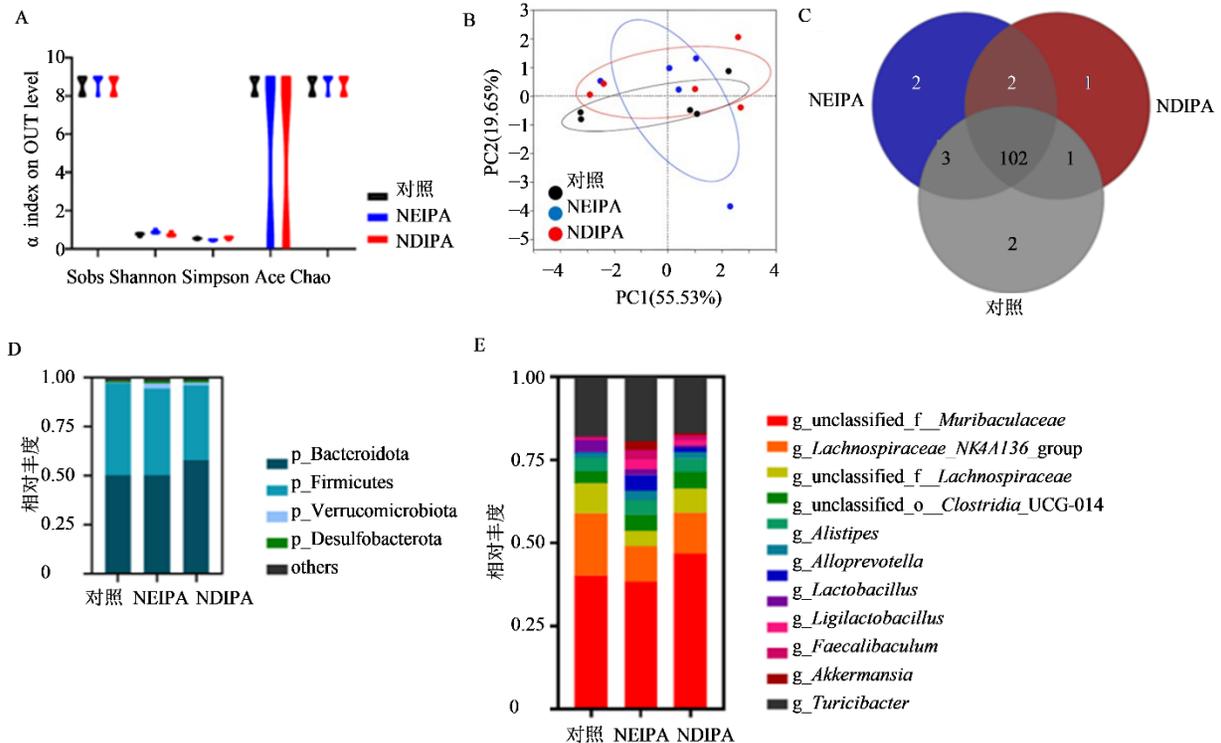
Fig. 5 Background lesions in liver of D28 control group (A: ×100, B: ×200) and high-dose group of NEIPA (C: ×100, D: ×200)

表 1 肝细胞肥大/核巨大的发生率及病变程度

Table 1 Incidence and severity of hepatocyte hypertrophy/nuclear giant

| 组别    | 剂量/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 肝细胞肥大/核巨大 |     | 总计  |
|-------|-------------------------------|-----------|-----|-----|
|       |                               | +         | ++  |     |
| 对照    | —                             | 0/5       | 0/5 | 0/5 |
| NEIPA | 25                            | 0/5       | 0/5 | 0/5 |
|       | 50                            | 2/5       | 0/5 | 2/5 |
|       | 100                           | 2/5       | 3/5 | 5/5 |
| NDIPA | 25                            | 0/5       | 0/5 | 0/5 |
|       | 50                            | 0/5       | 0/5 | 0/5 |
|       | 100                           | 0/5       | 0/5 | 0/5 |

A) 结果显示, NEIPA 和 NDIPA 组小鼠  $\alpha$ -多样性无显著差异。PCA 结果显示, NEIPA 和 NDIPA 与对照组在小鼠肠道微生物群落结构上差异不大 (图 6-B、C)。NEIPA 和 NDIPA 在门 (图 6-D) 和属 (图 6-E) 水平上的相对丰度模式存在差异。与对照组相比, 给予 NEIPA 的小鼠, 苏黎世杆菌属 *Turicibacter*、乳酸菌属 *Lactobacillus*、阿克曼菌属 *Akkermansia* 和啮齿粪杆菌属 *Faecalibaculum* 的丰度显著增加, 而 *liilactobacillus*、毛螺菌科 *f\_Lachnospiraceae*、毛螺菌科 NK4A136 群 *Lachnospiraceae\_NK4A136\_group* 减少, 这可能会促进胆汁酸代谢, 缓解肠道炎症。NDIPA 给药小鼠与对照组相比, *f\_Muribaculaceae*、



A-扩增子序列变异 (ASV) 水平  $\alpha$  指数; B-ASV 水平的 PCA; C-Venn 种图分析; D-门水平上肠道菌群的相对丰度; E-属水平上肠道菌群的相对丰度。

A-Amplification sequence variation (ASV) level  $\alpha$  index; B-PCA at ASV level; C-Venn diagram analysis; D- relative abundance of intestinal flora at phylum level; E-Relative abundance of intestinal flora at generic level.

图 6 NEIPA 和 NDIPA 对肠道菌群结构和组成的影响

Fig. 6 Effects of NEIPA and NDIPA on structure and composition of intestinal flora

未分类的梭状芽孢杆菌纲 UCG-014 群 *g\_unclassified\_o-Clostridia\_UCG-014*、乳酸菌属 *Lactobacillus* 和阿克曼菌属 *Akkermansia* 的丰度增加, *Lachnospiraceae\_NK4A136* 和 *Ligilactobacillus* 的丰度降低。*g\_unclassified\_o-Clostridia\_UCG-014* 是促炎的肠道菌群, 这类肠道菌群的增加代表肠道微生态从共生状态向致病状态转变。

肠道菌群检测结果提示, NEIPA 和 NDIPA 都可以增加乳酸杆菌和 *Akkermansia* 等益生菌的丰度, 从而改善动物的代谢。此外, *Lachnospiraceae\_NK4A136* 和 *Ligilactobacillus* 的丰度降低, 表明肠道菌群发生了变化。但 NEIPA 和 NDIPA 与对照组在小鼠肠道微生物群落结构上差异不大, NEIPA 和 NDIPA 可能不会对小鼠肠道菌群造成显著影响, 可能的原因是肠道菌群缺乏 NEIPA 和 NDIPA 的代谢酶。NDIPA 小鼠体内肝毒性明显弱于 NEIPA, 原因与其代谢原理有关, NDIPA 与 NEIPA 相比  $\alpha$ -氢数目降低, 且取代基空间位阻增大, 难以被酶代谢活化形成相应的致癌物与 DNA 发生反应, 使肝毒性明显弱于 NEIPA。

#### 4 讨论

小分子 *N*-亚硝基化合物可导致肝毒性风险。一项综合致癌性研究评估了 4 080 只暴露于 NDEA 或 *N*-亚硝基二甲胺 (NDMA) 的大鼠的剂量-反应, 数据表明肝脏是亚硝胺致癌性最敏感的靶点<sup>[10]</sup>。然而, 不同 *N*-亚硝胺类化合物的肝毒性与其结构及代谢物之间的关联尚未充分阐明。一般来说, 亚硝胺不是直接致癌物, 而是需要酶促氧化代谢才能转化为最终致癌物的前体<sup>[11]</sup>。在众多 *N*-亚硝胺类化合物致癌机制中, 最普遍接受的是  $\alpha$ -羟基化假说, 即亚硝胺  $\alpha$ -碳上的氢可以被多种氧化酶和加氧酶 (如细胞色素 p450 相关酶) 羟基化。合成的  $\alpha$ -羟基烷基亚硝胺最终代谢为烷基重氮离子和相应的羰基化合物, 重氮离子通常被认为是最终致癌物<sup>[12]</sup>。近年来的研究验证了, 该假说可支持 *N*-亚硝基类化合物致突变性风险强弱的评估<sup>[6]</sup>, EMA 现以该假说为基础提出致癌效力分类方法 (CPCA) 用于未知致癌性的 *N*-亚硝基化合物的监管限度的界定<sup>[13]</sup>。以上研究成果为探讨 *N*-亚硝基化合物的代谢与肝毒性之间的差异提供了思路。

NEIPA 和 NDIPA 均为中小型亚硝胺化合物, 在分子结构上存在微小差异, NEIPA 仅比 NDIPA 多了一个  $\alpha$ -氢, 结构上的细微差异可能会影响它们在

肠道菌群中的代谢行为, 进而影响其在体内的生物活性。本研究重点评估了 NDIPA 和 NEIPA 的小鼠肝毒性和肠道菌群代谢差异。研究发现, NEIPA 的肝毒性强于 NDIPA。D7 和 D28 时, NEIPA 组的高剂量组在 ALT 水平上显著升高; D7 时, NDIPA 组的高剂量组在 CK 水平上显著升高 ( $P < 0.01$ ), 但在 D28 时无显著差异。除肝功能指标有显著变化外, 在 NEIPA 组可见肝细胞肥大/核巨大, 而 NDIPA 组未见明显异常。由此推测短期给予小鼠  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 NDIPA 使肝脏产生可恢复性损伤, 但在短期内给予  $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的 NEIPA 可造成小鼠急性肝功能损伤, 因此 NEIPA 在高剂量组具有一定肝毒性。此外, 本研究发现 NEIPA 和 NDIPA 都可以增加乳酸杆菌和 *Akkermansia* 等益生菌的丰度, 从而改善动物的代谢。此外, *Lachnospiraceae\_NK4A136* 和 *Ligilactobacillus* 的丰度均降低, 表明肠道菌群发生了变化。

当亚硝酸盐被吞进酸性的胃腔时, 会被质子化, 形成亚硝酸, 亚硝酸盐是一种强大的亚硝化剂, 可与膳食中的胺反应生成 *N*-亚硝胺<sup>[14]</sup>。Lundberg 等<sup>[15]</sup>推断 *N*-亚硝胺化合物的致癌作用可能是通过与 DNA 的直接相互作用介导的, 导致脱氨基和硝化。有研究表明, 服用 NDEA 的小鼠肠道菌群的丰度、组成和功能发生显著变化。Klewicka 等<sup>[16]</sup>指出, *N*-亚硝基-*N*-甲基脒 (MNU) 可降低氨水平, 显著影响大鼠肠道菌群。差异菌群也被确定, NEIPA 增加了胆汁酸代谢的 *Turicibacter* 的丰度, NDIPA 增加了促炎的 *o-Clostridia\_UCG-014* 的丰度。以前曾报道过接触 NDMA 和 NDEA 会诱发胆管肿瘤<sup>[13]</sup>。研究发现<sup>[17]</sup>接触 *N*-亚硝胺混合物会促进脂肪酸分解, 促进脂肪酸的  $\beta$ -氧化作用, 并引起小鼠食管发炎。这些数据进一步表明 NEIPA 和 NDIPA 在体内代谢和作用方面存在差异。

细胞色素 P450 酶催化的  $\alpha$ -碳位羟基化被认为是 *N*-亚硝胺化合物代谢活化的关键步骤<sup>[18-19]</sup>, 也是决定 *N*-亚硝胺化合物毒性的组织和物种特异性的重要因素。小鼠体内 CYP2A1 酶的活性与人相似, CYP2E1 酶的活性没有明显的物种差异<sup>[20-21]</sup>。NDIPA 诱导肝脏和肺部的 *Cyp2e1* 基因表达显著增加, 提示 CYP2E1 可能是 NDIPA 的主要代谢酶。 $\alpha$ -羟基化假说是目前最被广泛接受的 *N*-亚硝胺化合物致癌机制的概念。亚硝胺  $\alpha$ -碳在各种氧化酶和氧化酶的羟基化作用下可形成致突变物<sup>[22-24]</sup>。因此, 亚

硝胺  $\alpha$ -碳上取代基的数量和空间结构在 *N*-亚硝胺的代谢途径中起着重要作用, 从而影响其致突变性。正如 EMA 所述<sup>[25]</sup>, 所有含有  $\alpha$ -氢的 *N*-亚硝胺化合物都可能诱变和致癌, 而 *N*-亚硝胺的致突变性则取决于其官能团的性质、代谢活化和修复能力。例如, Lijinsky 等<sup>[26]</sup>发现, NDEA 及其 4 种亚硝基二乙胺烷基衍生物在 SD 大鼠体内的致癌作用与大鼠体内  $\alpha$ -氢原子的含量有关。因此, NEIPA 和 NDIPA 在突变和 DNA 损伤效能上的差异可能与它们  $\alpha$ -氢原子的个数有关, 这进一步影响了它们的代谢活化和器官特异性。

NDIPA 和 NEIPA 在体内可能会经历不同的氧化代谢过程。本研究从肠道菌群的角度初步探讨了结构相似的 *N*-亚硝基化合物 NEIPA 和 NDIPA 的肝毒性差异及其与代谢途径的关系, 为理解 *N*-亚硝基化合物的肝毒性机制提供了新的视角。值得注意的是, NDIPA 的暴露期较短, 因此不能排除其致突变性, 还需要进一步的体内研究。此外, 还应进一步确定代谢物可能存在的差异。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Charoo N A, Dharani S, Khan M A, et al. Nitroso impurities in drug products: An overview of risk assessment, regulatory milieu, and control strategy [J]. AAPS PharmSciTech, 2023, 24(2): 60.
- [2] Horne S, Vera M D, Nagavelli L R, et al. Regulatory experiences with root causes and risk factors for nitrosamine impurities in pharmaceuticals [J]. J Pharm Sci, 2023, 112(5): 1166-1182.
- [3] Roberts S W, Lennard A, Mohan G, et al. Meeting report: *N*-nitrosamine impurity control strategies in the pharmaceutical and biotechnology industries [J]. AAPS J, 2021, 23(4): 94.
- [4] Wichitnithad W, Nantaphol S, Noppakhunsomboon K, et al. An update on the current status and prospects of nitrosation pathways and possible root causes of nitrosamine formation in various pharmaceuticals [J]. Saudi Pharm J, 2023, 31(2): 295-311.
- [5] 杨景舒, 李壮琪, 乔泽林, 等. 亚硝胺类 DNA 反应性杂质可接受摄入量的监管科学研究 [J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(7): 940-947.  
Yang J S, Li Z Q, Qiao Z L, et al. Regulatory science research on acceptable intake of nitrosamine DNA reactive impurities [J]. Chin J Pharm, 2021, 52(7): 940-947.
- [6] Ye Q, Geng X C, Jiang H, et al. Genotoxicity assessments of *N*-nitrosoethylisopropylamine (NEIPA) and *N*-nitrosodiisopropylamine (NDIPA) in the C57BL/6J mouse [J]. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen, 2024, 896: 503763.
- [7] 叶倩, 汪祺, 林志, 等. *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 [J]. 药物评价研究, 2024, 47(1): 57-67.  
Ye Q, Wang Q, Lin Z, et al. Toxicity and genotoxicity of *N*-nitrosodimethylamine and *N*-nitrosodiethylamine in mice after repeated administration [J]. Drug Eval Res, 2024, 47(1): 57-67.
- [8] Panel on Food Additives and Flavourings (FAF) E F S A, Younes M, Aquilina G, et al. Scientific opinion of flavouring group evaluation 411 (FGE.411): 2-(4-methylphenoxy)- *N*-(1*H*-pyrazol-3-yl)- *N*-(thiophen-2-ylmethyl) acetamide from chemical group 30 (miscellaneous substances) [J]. EFSA J, 2018, 16(10): e05421.
- [9] Chen L J, He J T, Pan M, et al. Antibiotics attenuate methamphetamine-induced hepatotoxicity by regulating oxidative stress and TLR4/MyD88/Traf6 axis [J]. Front Pharmacol, 2021, 12: 716703.
- [10] Li Y P, Hecht S S. Metabolic activation and DNA interactions of carcinogenic *N*-nitrosamines to which humans are commonly exposed [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(9): 4559.
- [11] Li L, Zhang A H, Li Z H. Theoretical study of reaction mechanism for subsequent carcinogenic metabolites by nitrosodimethylamine [J]. J Mol Struct THEOCHEM, 2006, 759(1/2/3): 239-243.
- [12] Guttenplan J B. Effects of cytosol on mutagenesis induced by *N*-nitrosodimethylamine, *N*-nitrosomethylurea and alpha-acetoxy-*N*-nitrosodimethylamine in different strains of Salmonella: Evidence for different ultimate mutagens from *N*-nitrosodimethylamine [J]. Carcinogenesis, 1993, 14(5): 1013-1019.
- [13] European Medicines Agency (EMA). Nitrosamine impurities in human medicinal products: Procedure under Article 5(3) of Regulation EC (No) 726/2004 – Assessment 608 Report [S]. 2020.
- [14] Carlström M, Moretti C H, Weitzberg E, et al. Microbiota, diet and the generation of reactive nitrogen compounds [J]. Free Radic Biol Med, 2020, 161: 321-325.
- [15] Lundberg J O, Weitzberg E. Biology of nitrogen oxides in the gastrointestinal tract [J]. Gut, 2013, 62(4): 616-629.
- [16] Klewicka E, Zduńczyk Z, Juśkiewicz J, et al. Effects of lactofermented beetroot juice alone or with *N*-nitroso-*N*-

- methylurea on selected metabolic parameters, composition of the microbiota adhering to the gut epithelium and antioxidant status of rats [J]. *Nutrients*, 2015, 7(7): 5905-5915.
- [17] Schrenk D, Bignami M, et al. Risk assessment of *N*-nitrosamines in food [J]. *EFSA J*, 2023, 21(3): e07884.
- [18] Zhang H, Zhao C, Liu Q W, et al. Dysregulation of fatty acid metabolism associated with esophageal inflammation of ICR mice induced by nitrosamines exposure [J]. *Environ Pollut*, 2022, 297: 118680.
- [19] Bellec G, Dréano Y, Lozach P, et al. Cytochrome P450 metabolic dealkylation of nine *N*-nitrosodialkylamines by human liver microsomes [J]. *Carcinogenesis*, 1996, 17(9): 2029-2034.
- [20] 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 (Berl)*, 2020, 98(9): 1203-1213.
- [21] Bogaards J J, Bertrand M, Jackson P, et al. Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: A comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man [J]. *Xenobiotica*, 2000, 30(12): 1131-1152.
- [22] Lewis D F, Ioannides C, Parke D V. Cytochromes P450 and species differences in xenobiotic metabolism and activation of carcinogen [J]. *Environ Health Perspect*, 1998, 106(10): 633-641.
- [23] Pottegård A, Kristensen K B, Ernst M T, et al. Use of *N*-nitrosodimethylamine (NDMA) contaminated valsartan products and risk of cancer: Danish nationwide cohort study [J]. *BMJ*, 2018, 362: k3851.
- [24] Tricker A R, Preussmann R. Carcinogenic *N*-nitrosamines in the diet: Occurrence, formation, mechanisms and carcinogenic potential [J]. *Mutat Res*, 1991, 259(3/4): 277-289.
- [25] Mirvish S S, Huang Q, Chen S C, et al. Metabolism of carcinogenic nitrosamines in the rat and human esophagus and induction of esophageal adenocarcinoma in rats [J]. *Endoscopy*, 1993, 25(9): 627-631.
- [26] Lijinsky W, Taylor H W. Carcinogenicity of methylated derivatives of *N*-nitrosodiethylamine and related compounds in Sprague-Dawley rats [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1979, 62(2): 407-410.

[责任编辑 兰新新]