

## Bhas 42 细胞转化试验高通量检测方法的建立

黄鹏程<sup>1</sup>, 李若婉<sup>1,2</sup>, 李申宁<sup>1</sup>, 王敬婷<sup>1,2</sup>, 宋征<sup>1</sup>, 李华<sup>1\*</sup>

1. 国家上海新药安全评价研究中心/上海益诺思生物技术股份有限公司, 上海 201203

2. 中国医药工业研究总院, 上海 201203

**摘要:** 目的 建立基于96孔板的Bhas 42细胞转化试验高通量检测方法, 并探讨此方法用于药物非临床阶段体外致癌性评价的前景。方法 建立Bhas 42细胞转化试验96孔板高通量检测方法, 使用已知阳性诱癌物苯并芘(Benzoapyrene, BaP)和环磷酰胺(Cyclophosphamide, CP)为对照品, 比较转化灶人工计数法和过氧化氢高通量96孔板法对结果判定的影响。进行试验的细胞在接种后第19天以一定浓度的过氧化氢处理细胞24 h。24 h后, 洗去含过氧化氢的培养基, 加入新鲜培养基并加入CCK-8染色孵育2~4 h后测定450 nm波长吸光度以确定细胞转化率。同时, 转化灶人工计数法细胞在第21天经甲醇固定, 吉姆萨染液染色后计数每孔克隆数, 对比两种方法的差异性。结果 转化灶人工计数法中, 与阴性对照组比较, BaP和CP在启动试验中均被评价为阳性; 过氧化氢高通量法得到与转化灶人工计数法相同的结果。结论 成功建立了基于96孔板的Bhas 42细胞转化试验的过氧化氢高通量检测方法, 该方法相比于传统方法可简单、快速地检测化合物诱导Bhas 42细胞的转化效率, 并提高了结果评判的客观性。

**关键词:** Bhas 42细胞; 高通量方法; 细胞转化试验

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2019)05-0878-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2019.05.012

## Establishment of detection method for high through-put Bhas 42 cell transformation assay

HUANG Pengcheng<sup>1</sup>, LI Ruowan<sup>1,2</sup>, LI Shenning<sup>1</sup>, WANG Jingting<sup>1,2</sup>, SONG Zheng<sup>1</sup>, LI Hua<sup>1</sup>

1. National Shanghai Center for New Drug Safety Evaluation and Research /Shanghai Innostar Bio-Tech Co. LTD, Shanghai 201210, China

2. China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201210, China

**Abstract: Objective** To establish a high throughput assay for Bhas 42 cell transformation assay based on 96-well plate, and to explore the prospect of this assay in evaluating the carcinogenicity of drugs in non-clinical phase *in vitro*. **Methods** A 96-well plate high-throughput assay for Bhas 42 cell transformation assay was established. Benzoapyrene (BaP) and Cyclophosphamide (CP) were used as positive control substances to compare the effects of the manual counting method and 96-well plate high-throughput assay on the results. The Bhas 42 cells were treated with hydrogen peroxide on nineteenth days after inoculation for 24 h. After 24 hours, the medium containing hydrogen peroxide was washed off, fresh medium with CCK-8 was added and incubate for 2—4 hours. The cell transformation rate was determined by measuring 450 nm wavelength absorbance. At the same time, the cells were fixed by methanol on the 21st day and stained by Giemsa solution. The correlation between the two methods was statistically analyzed and compared. **Results** Compared with the negative control, both BaP and CP were positive in the initiation assay, and the results of high-throughput cell transformation assay were the same as manual counting cell transformation assay. **Conclusion** A 96-well plate-based high-throughput method for the detection of Bhas 42 cell transformation was successfully established. Compared with the traditional method, this method is easily and quickly, and improves the objectivity of the result evaluation.

收稿日期: 2019-01-10

基金项目: 上海市科学技术委员会科研计划项目(15140901100)

第一作者: 黄鹏程, Tel: 021-50800333-1219 E-mail: pchuang@ncdser.com。

\*通信作者: 李华, E-mail: hli@ncdser.com

**Key words:** Bhas 42 cell; high-throughput method; cell transformation assay

化学致癌物可根据诱导癌症形成的过程分为启动剂、促癌剂和进展剂。还可根据其是否引起遗传物质损伤将致癌物分为遗传毒性致癌物和非遗传毒性致癌物。遗传毒性致癌物的检测,可根据药物遗传毒性研究技术指导原则通过常规的遗传毒性试验组合,如Ames试验、染色体畸变试验和体内微核试验,检测化合物可能的致癌性<sup>[1]</sup>。然而,有较多的化合物在体内动物致癌实验中显示出致癌性,却在常规遗传毒性试验中呈阴性结果,从而无法通过常规的遗传毒性试验组合评价其潜在致癌性。试验动物的体内致癌试验因为耗时长,成本高,以及不符合3R原则等,被欧洲经济合作组织禁止应用于化妆品的致癌性评价<sup>[2]</sup>。因此,体外致癌试验的发展尤为重要。

体外细胞转化试验(cell transformation assays, CTAs),特别是两阶段体外细胞转化试验,可在体外培养细胞中模拟细胞致癌的启动阶段和促进阶段,最大程度的模拟体内致癌的作用。该方法既可检测遗传毒性致癌物,又可检测非遗传毒性致癌物。同时,CTAs可降低动物使用量,缩短试验周期,大大降低了试验成本<sup>[3]</sup>。

Bhas 42细胞是在Balb/c 3T3细胞的基础上导入v-Ha-ras基因而构建的工程细胞,其被视为处于癌症的启动状态,非遗传毒性致癌物暴露下不经过启动剂的预处理便可引起细胞恶性转化。两阶段试验是根据Bhas 42细胞的密度,选择不同的受试物暴露时间,而检测不同的致癌过程<sup>[4]</sup>。在较低细胞密度下暴露于受试物,可模拟细胞癌变的启动过程。而高密度情况下将细胞暴露于受试物,可模拟细胞癌变的促癌阶段。两阶段细胞转化试验,可同时检测细胞癌变的启动和促癌阶段,并检测出非遗传和遗传毒性致癌物。使用Bhas 42细胞进行的CTAs试验系统,从开始的培养皿到现在的6孔板,以及目前使用的96孔板,检测方法越来越简单,通量越来越高<sup>[5]</sup>。Sasaki等<sup>[6]</sup>利用低浓度过氧化氢对正常细胞的杀灭,而对转化后的癌变细胞无影响的优点,对CTAs进行了改进,对实验结果的评价进行了量化,使实验结果的评价更加客观,大大降低了人为计数转化灶误差。

本研究拟使用已知阳性致癌物苯并芘(Benzoapyrene, BaP)和环磷酰胺(Cyclophosphamide, CP)为受试物,在启动试验和促癌试验中分别以3-甲基胆蒎(3-

MCA, 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )和佛波酯(TPA, 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ),为阳性对照建立Bhas 42细胞转化试验96孔板高通量检测方法,比较转化灶法和高通量96孔板法对结果判定的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与仪器

苯并芘(货号B1760)、环磷酰胺(货号C0768)、3-甲基胆蒎(3-methylcholanthrene, 3-MCA)(货号213942)和佛波酯(12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate, TPA)(货号79346)购自Sigma公司;Bhas 42细胞由日本食品药品安全中心Sasaki博士惠赠;MEM培养基(货号11095072)、DMEM/F-12培养基(货号11320082)和胎牛血清(货号26050-088)购自Gibco公司;30%过氧化氢溶液(货号10011208)、结晶紫(货号71012314)、无水乙醇(货号10009218)和柠檬酸钠(货号10019408)购自购自国药集团化学试剂有限公司;Cell Counting Kit-8(CCK-8试剂盒)(货号CK04-500)购自日本同仁;SPECTRAMAX 340PC酶标仪,购自Molecular Devices公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 细胞培养** Bhas 42细胞复苏后扩增,使用含有10%二甲亚砜(DMSO)和20%胎牛血清的MEM培养基冻存,每支冻存 $2.5 \times 10^5$ 个细胞。每次试验前复苏一支细胞,复苏后细胞使用M10F培养基(含有10%胎牛血清的MEM培养基)培养于37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 条件下。当细胞汇合度达到约70%时,使用胰酶消化细胞进行传代,传代使用D5F5培养基(含有5%胎牛血清的DMEM/F-12培养基)。当细胞汇合度再次达到约70%时,细胞可以用于正式试验和细胞生长试验。每次试验使用一支新的冻存,防止细胞的基础自发转化率过高。

**1.2.2 受试物储备液和浓度选择** BaP、3-MCA和TPA以DMSO为溶剂,配制1 000倍终浓度的储备液,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。CP以无菌去离子水为溶剂,配制20倍终浓度的储备液,-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用。

CP和BaP依据文献<sup>[7]</sup>选择最高受试物浓度,CP选择62.5、125、250、500、750、1 000、1 100、1 250、1 400、1 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  10个浓度;BaP选择0.006 3、0.012 5、0.025、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  10个浓度。5%无菌去离子水和0.1%DMSO分别为溶剂对照。启动实验以1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的3-MCA为阳性对照,促癌实验以0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的TPA为阳性对照。

### 1.3 高通量细胞转化试验

本试验同步进行转化灶人工计数法(6孔板)。转化灶法人工计数法参考 Sakai 在联合验证中的方法步骤,每个浓度3个复孔<sup>[8]</sup>。以下仅描述过氧化氢高通量96孔板细胞转化试验的步骤。

过氧化氢高通量细胞转化试验以细胞接种当天为第0天,以胰酶消化 Bhas 42 细胞,调整细胞密度为 $2 \times 10^3$ 和 $4 \times 10^3$ 个/mL。启动试验和促癌试验每孔接种0.1 mL,即分别为200和400个细胞。接种后的细胞培养于37℃、5% CO<sub>2</sub>条件下,每个浓度8个复孔。启动实验和促癌实验均同步进行细胞生长试验。

**1.3.1 启动试验** 启动试验细胞接种24 h后更换含有溶剂对照、各浓度受试物或阳性对照的D5F5培养基,培养至第4天,更换新鲜的D5F5培养基继续培养。其中细胞生长试验平板在第7天每孔加入10 μL CCK-8 孵育2~4 h,后测定450 nm 波长处的吸光度值( $A_{450}$ ),计算相对细胞生长率。

相对细胞生长率计算公式为:

$$\text{相对细胞生长率} = \frac{A_t - A_b}{A_c - A_b} \times 100$$

$A_t$ 为受试物组或阳性对照组吸光度值; $A_c$ 为溶剂对照组吸光度值, $A_b$ 为无细胞空白对照孔吸光度值。

启动实验组细胞,分别在第7、10、14天更换新鲜的D5F5培养基。第19天,更换含有0.0015%过氧化氢的D5F5培养基继续培养24 h。第20天,每孔更换含有10 μL CCK-8 的培养基溶液孵育2~4 h后,酶标仪检测 $A_{450}$ 值。

**1.3.2 促癌试验** 促癌试验在细胞接种后第4天更换含有溶剂对照、各浓度受试物或阳性对照的D5F5培养基。其中细胞生长试验平板在第7天检测CCK-8 孵育后的 $A_{450}$ 值,计算相对细胞生长率。计算方法同启动试验。

促癌实验组细胞分别在第7和10天更换含有溶剂对照、各浓度受试物或阳性对照的D5F5培养基,并在第14天更换新鲜的D5F5培养基。第19天,更换含有0.001 5%过氧化氢的D5F5培养基继续培养24 h。第20天,每孔更换含有10 μL CCK-8 的培养基溶液孵育2~4 h后,酶标仪检测 $A_{450}$ 值。

### 1.4 统计方法

用SPSS 21.0进行数据的统计处理。转化灶法人工计数法和96孔板的吉姆萨染色结果统计使用4个表卡方检验,过氧化氢高通量细胞转化试验的 $A_{450}$ 值采用 $t$ 检验统计差异性。

### 1.5 结果判定方法

转化灶法人工计数法和过氧化氢高通量细胞转化试验均以统计结果差异性分析。当受试物存在连续两个或两个以上浓度组的结果相对于阴性对照组有显著性差异时,判定为阳性结果。当受试物存在一个或不连续浓度组的结果相对于阴性对照组有显著性差异,判定为可疑结果。当受试物各个浓度组的结果相对于阴性对照组均无显著性差异,判定为阴性结果。

## 2 结果

### 2.1 转化灶法人工计数法

转化灶法人工计数法细胞生长采用结晶紫染色提取法测得,其结果见表1和表2。结果显示,BaP和CP均为诱癌物,其在启动试验中表现出明显的阳性结果。

### 2.2 过氧化氢高通量细胞转化试验结果

过氧化氢高通量细胞转化试验的相对细胞生长率采用CCK-8法检测。相对比与传统的结晶紫染色法,CCK-8检测方法无需固定、染色和洗脱,方法简单,省时省力。

其过氧化氢高通量转化试验结果见表3和表4。第20天更换含有CCK-8的培养基前,显微镜先观察96孔板发现,经0.001 5%双氧水处理后,正常细胞变圆,黯淡无光并脱离贴壁状态,表明细胞因过氧化氢处理而发生凋亡。而发生转化形成转化灶的细胞呈现不规则形多层生长,细胞生长状态良好,表明转化后的细胞对该浓度过氧化氢的抵抗能力较强。

不同浓度受试物 $A_{450}$ 值统计结果显示,BaP和CP均为诱癌物,其在启动试验中表现出显著的阳性结果,该结果同转化灶人工计数法的结果相吻合。证明了过氧化氢高通量转化试验准确性。

## 3 讨论

过氧化氢高通量细胞转化试验是对体外细胞转化试验的改进,该方法可结合自动化仪器的使用实现高通量选择,省去了固定、染色、洗脱等步骤。不但大大的减少了试验工作量,降低试验人工成本,而且使试验结果的判断更为客观<sup>[9]</sup>。

本试验的设计是基于发生恶性转化后的细胞对过氧化氢的抵抗能力相较于未发生转化的细胞较强<sup>[10]</sup>。而过氧化氢溶液是一种易分解的不稳定试剂。本研究发现,不同批次间过氧化氢的使用浓度有较大差异。其主要原因是过氧化氢分解,使其精确浓度不容易确定,稀释后可能达不到文献中要

表1 环磷酰胺的转化灶法人工计数法结果

Table 1 Manual counting results of cyclophosphamide

受试物	质量浓度/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	启动试验		促癌试验	
		相对细胞生长率/%	每孔灶点数	相对细胞生长率/%	每孔灶点数
5%灭菌水	—	100.00	1.67±0.58	100.00	2.00±1.00
环磷酰胺	125	89.75	1.00±0.00	103.37	1.33±0.58
	250	83.70	1.33±0.58	104.54	0.67±0.58
	500	80.17	1.67±0.58	95.67	1.67±0.58
	750	81.61	2.67±1.15	103.97	1.33±1.15
	1 000	72.65	5.33±1.53*	102.85	1.67±0.58
	1 100	71.01	5.33±2.31*	104.13	1.67±1.15
	1 250	67.36	7.00±1.00*	94.18	1.33±0.58
	1 400	58.62	8.67±3.51*	92.50	2.00±1.00
	1 500	47.52	7.00±2.00*	63.24	1.33±0.58
0.1% DMSO	0	100.00	1.67±0.58	0.00	1.33±0.58
MCA	0.1	53.24	22.33±4.51**	—	—
TPA	0.05	—	—	56.33	26.67±3.79**

与0.5%灭菌水组比较: \* $P\leq 0.05$ , \*\* $P\leq 0.01$

\* $P\leq 0.05$ , \*\* $P\leq 0.01$  vs 0.5% sterilized water group

表2 苯并芘的转化灶法人工计数法结果

Table 2 Manual counting results of benzopyrene

受试物	质量浓度/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	启动试验		促癌试验	
		相对细胞生长率/%	每孔灶点数	相对细胞生长率/%	每孔灶点数
0.1% DMSO	—	100.00	2.00±1.00	100.00	1.67±1.15
苯并芘	0.0125	117.18	1.67±0.58	95.29	0.67±0.58
	0.025	109.82	4.00±1.00	97.92	1.33±0.58
	0.05	87.18	10.33±2.52*	87.00	1.33±0.58
	0.1	58.05	17.00±2.65*	72.97	2.33±0.58
	0.15	33.51	7.00±1.00	60.88	1.33±0.58
	0.2	22.78	0.67±58	61.25	1.00±1.00
	0.25	12.35	0#	61.27	1.67±0.58
	0.3	10.26	0#	54.58	2.33±1.15
	0.5	5.33	0#	50.40	1.33±0.58
MCA	0.1	56.33	30.33±4.04**	—	—
TPA	0.05	—	—	51.25	20.00±4.36**

与0.1%DMSO组比较: \* $P\leq 0.05$ , \*\* $P\leq 0.01$ ; #: 细胞相对生长率过低, 即受试物的细胞毒性过大, 导致细胞数目较少, 没有形成转化灶。

\* $P\leq 0.05$ , \*\* $P\leq 0.01$  vs 0.1% DMSO group; #: The relative growth rate of cells is too low, that is, the cytotoxicity of the tested substance is too high, resulting in fewer cells and no transformation focus.

求浓度。因此, 对于不同批次的过氧化氢用于试验前, 建议进行精确的浓度滴定, 或者进行细胞杀伤预实验, 选择合适的过氧化氢浓度。

96孔板作为细胞培养系统, 每孔发生转化的多个转化灶容易融合在一起, 而未发现转化细胞的孔中则无转化灶形成。该原因易导致过氧化氢处理后, 无转化灶的孔中细胞全部死亡, 而存在转化灶

的孔中细胞数目较多, 其不同孔间 $A_{450}$ 值差异较大, 数据的变异度相对于转化灶人工计数法大。建议过氧化氢高通量细胞转化试验中每个浓度的受试物重复孔不低于8个。

本试验中建立了过氧化氢高通量细胞转化试验, 同时应用于检测了已知的诱癌物进行了验证。该实验从细胞接种到分析结果, 相较于传统的人工

表3 环磷酰胺的过氧化氢高通量转化试验结果

Table 3 High-throughput transformation assay test results of cyclophosphamide

受试物	质量浓度/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	启动试验		促癌试验	
		相对细胞生长率/%	$A_{450}$	相对细胞生长率/%	$A_{450}$
5% 灭菌水	—	100.00	0.345±0.132	100.00	0.413±0.132
环磷酰胺	125	95.25	0.253±0.055	95.77	0.455±0.145
	250	88.56	0.378±0.112	82.33	0.375±0.186
	500	80.50	0.425±0.145	95.54	0.425±0.225
	750	78.65	0.386±0.136	87.64	0.396±0.156
	1 000	74.01	0.588±0.229	90.79	0.445±0.054
	1 100	65.25	0.805±0.445*	81.63	0.425±0.135
	1 250	47.36	1.452±0.202*	72.08	0.478±0.253
	1 400	40.26	1.204±0.656*	74.42	0.325±0.121
	1 500	37.56	0.710±0.223*	68.11	0.416±0.435
0.1% DMSO	0	100.00	0.353±0.145	0.00	0.356±0.143
MCA	0.1	42.25	1.605±0.425*	—	—
TPA	0.05	—	—	45.25	1.526±0.478*

与0.5%灭菌水组比较: \* $P\leq 0.05$ , \*\* $P\leq 0.01$ \* $P\leq 0.05$ , \*\* $P\leq 0.01$  vs 0.5% sterilized water group

表4 苯并芘的过氧化氢高通量转化试验结果

Table 4 High-throughput transformation assay test results of benzopyrene

受试物	质量浓度/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	启动试验		促癌试验	
		相对细胞生长率/%	$A_{450}$	相对细胞生长率/%	$A_{450}$
0.1% DMSO	—	100.00	0.402±0.105	100.00	0.523±0.152
苯并芘	0.0125	95.16	0.486±0.176	84.66	0.555±0.253
	0.025	80.78	0.388±0.245	85.53	0.547±0.212
	0.05	66.44	1.045±0.462	70.49	0.523±0.085
	0.1	46.52	1.652±0.487*	65.14	0.576±0.140
	0.15	32.27	1.984±0.566**	56.05	0.447±0.121
	0.2	25.34	0.845±0.413	49.03	0.526±0.224
	0.25	17.13	—&	47.34	0.454±0.146
	0.3	15.46	—&	54.49	0.627±0.275
	0.5	—#	—&	51.65	0.514±0.124
MCA	0.1	50.25	2.205±0.545**	—	—
TPA	0.05	—	—	60.3	1.933±0.453**

与0.1%DMSO组比较: \* $P\leq 0.05$ , \*\* $P\leq 0.01$ ; #: 细胞相对生长率过低; &: 受试物的细胞毒性过大, 过氧化氢将剩余存活细胞全部杀死, 未检测  $A_{450}$  值。\* $P\leq 0.05$ , \*\* $P\leq 0.01$  vs 0.1% DMSO group; #: The relative growth rate of cells is too low; &: The cytotoxicity of the tested substance was too high, hydrogen peroxide killed all the remaining surviving cells, no  $A_{450}$  value was detected.

方法耗时短, 并且分析方法结果准确、可靠。该方法快速、结果评价客观性的优点, 可以有效降低试验成本, 提高试验效率, 为不同实验室间结果对比提供更客观的评价方法。该方法有望在将来的药物等化学品的安全性评价中得到广泛的应用和推广。

## 参考文献

- [1] 王颖, 蒲江, 齐乃松, 等. Bhas 42 细胞转化试验高通量检测方法的建立及应用[J]. 癌变·畸变·突变, 2015, 27(4):288-293.
- [2] 庞雅琴, 陈雯. 体外细胞转化试验研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2007, 19(6):511-514.
- [3] 王颖, 王雪, 李波. 两阶段细胞转化试验研究进展[J].

- 中国新药杂志, 2013(10):1133-1136..
- [4] Fontana C, Kirsch A, Seidel C, et al. In vitro cell transformation induced by synthetic amorphous silica nanoparticles[J]. *Mutat Res*, 2017, 823:22-27..
- [5] 王颖. Bhas42细胞转化试验方法学及其应用研究[D]. 北京: 中国食品药品检定研究院, 2013.
- [6] SASAKI K. A method for selecting mammal transformed cells: EP20090169631[P / OL]. 2009-09-07[2011-08-17]. <http://www.freepatentsonline.com/EP2163895B1.html>.
- [7] Sakai A, Sasaki K, Muramatsu D, et al. A Bhas 42 cell transformation assay on 98 chemicals: the characteristics and performance for the prediction of chemical carcinogenicity. [J]. *Mutation Research*, 2010, 702(1): 100-122.
- [8] Sakai A, Sasaki K, Hayashi K, et al. An international validation study of a Bhas 42 cell transformation assay for the prediction of chemical carcinogenicity [J]. *Mutation Research/genetic Toxicology & Environmental Mutagenesis*, 2011, 725(1-2):57-77.
- [9] Corvi R, Aardema M J, Gribaldo L, et al. ECVAM prevalidation study on in vitro cell transformation assays: general outline and conclusions of the study [J]. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2012, 744(1):12-19.
- [10] Sasaki, Kiyoshi c / o Food and Drug Safety Center. A method for selecting mammal transformed cells: EP2163895 [P]. 2011.