

大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷的体内外遗传毒性评价^Δ

文海若^{1*}, 颜玉静¹, 宋捷¹, 鄂蕊¹, 马双成², 汪祺^{2#}(1.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; 2.中国食品药品检定研究院中药民族药检定所, 北京 100050)

中图分类号 R994 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)01-0018-06

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.01.04

摘要 目的:评价大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷(EG)的体内外遗传毒性,并比较体外细胞试验及大鼠体内实验评价结果的差异。方法:采用体外二维(2D)、三维(3D)细胞培养法分别构建2D、3D HepaRG 细胞模型,造模成功后,分别将2D、3D HepaRG 细胞分为空白对照组[0.5%二甲基亚砜(DMSO)]、丝裂霉素C组(阳性对照,0.1 μ g/mL)和EG低、中、高剂量组(10、50、200 μ g/mL),然后检测各组HepaRG 细胞的微核形成率和尾DNA百分含量。将SD大鼠分为空白对照组(0.5%羧甲基纤维素钠)、甲磺酸乙酯组(阳性对照,200 mg/kg)和EG低、中、高剂量组(100、300、1 000 mg/kg),每组6只,连续灌胃给药15 d,每天1次;15 d后检测各组大鼠骨髓嗜多染红细胞、肝细胞的微核形成率及外周血淋巴细胞、肝细胞的尾DNA百分含量、尾距。结果:在体外2D HepaRG 细胞模型中,与空白对照组比较,丝裂霉素C组HepaRG 细胞的微核形成率和尾DNA百分含量均显著升高($P < 0.01$),EG各剂量组HepaRG 细胞的微核形成率和尾DNA百分含量差异无统计学意义($P > 0.05$);在3D HepaRG 细胞模型中,与空白对照组比较,丝裂霉素C组HepaRG 细胞的微核形成率和尾DNA百分含量均显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),EG高剂量组HepaRG 细胞的尾DNA百分含量显著升高($P < 0.01$)。在大鼠体内实验中,与空白对照组比较,甲磺酸乙酯组大鼠骨髓嗜多染红细胞、肝细胞的微核形成率和外周血淋巴细胞、肝细胞的尾DNA百分含量、尾距均显著升高($P < 0.01$),EG高剂量组大鼠外周血淋巴细胞尾DNA百分含量显著升高($P < 0.01$),EG各剂量组大鼠骨髓嗜多染红细胞、肝细胞的微核形成率和肝细胞尾DNA百分含量、尾距差异无统计学意义($P > 0.05$),但随剂量增加有升高趋势。结论:本研究结果提示在2D细胞模型中,EG未导致染色体断裂及DNA损伤,但3D细胞模型长期给药和体内重复给药结果均显示EG存在一定DNA损伤风险,故3D HepaRG 细胞模型的评价结果更接近大鼠体内实验结果。

关键词 大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷;遗传毒性;HepaRG 细胞;二维培养;三维培养;大鼠;微核试验

Study on *in vitro* and *in vivo* Genotoxicity of Emodin-8-*O*- β -D-glucoside

WEN Hairuo¹, YAN Yujing¹, SONG Jie¹, AO Rui¹, MA Shuangcheng², WANG Qi²(1.National Center for Safety Evaluation and Monitoring of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control/Key Laboratory of Beijing for Nonclinical Safety Evaluation Research of Drugs, Beijing 100176, China; 2.Institute for TCM and Ethnic Medicine Control, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To evaluate the *in vitro* and *in vivo* genotoxicity of emodin-8-*O*- β -D-glucoside (EG), and to compare the difference of *in vitro* cell test and *in vivo* test of rats. METHODS: 2D and 3D hepatocyte models were established by *in vitro* two-dimensional (2D) and three-dimensional (3D) cell culture. After modeling, 2D and 3D hepatocyte were divided into blank control group (0.5% DMSO), mitomycin C group (positive control, 0.1 μ g/mL), EG low-dose, medium-dose and high-dose groups (10, 50, 200 μ g/mL), respectively. The micronucleus ratio and tail DNA% of HepaRG cells were detected. SD rats were divided into blank control group (0.5% sodium carboxymethyl cellulose), ethyl methanesulfonate group (positive control, 200 mg/kg), EG low-dose, medium-dose and high-dose groups (100, 300, 1 000 mg/kg), with 6 rats in each group. They were given medicine intragastrically for consecutive 15 d, once a day. 15 days later, the micronucleus formation rate of bone marrow polychromatic erythrocytes and hepatocytes, the tail DNA% and tail distance of peripheral blood lymphocytes and hepatocytes were measured. RESULTS: In the *in vitro* 2D HepaRG hepatocyte model, compared with blank control group, the micronucleus formation rate and tail DNA% of HepaRG cell were increased significantly in mitomycin C group ($P < 0.01$). There was no statistical significance in micronucleus formation rate and tail DNA% of HepaRG cell among EG groups ($P > 0.05$). In 3D HepaRG cell model, compared with blank control group, micronucleus formation rate and tail DNA% of HepaRG cell were increased significantly in mitomycin C group ($P < 0.01$ or $P < 0.001$), while tail DNA% of HepaRG cell was

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81503347, 81503068);国家重大新药创制专项(No.2018ZX09201-017)

* 副研究员。研究方向:遗传毒理。电话:010-67876252。E-mail:wenhairuo@nifdc.org.cn

通信作者:副研究员。研究方向:中药毒理。电话:010-67395282。E-mail:sansan8251@sina.com

increased significantly in EG high-dose group ($P<0.01$). In the *in vivo* test, compared with blank control group, the micronucleus formation rate of bone marrow polychromatic erythrocytes and hepatocytes, the tail DNA% and tail distance of peripheral blood lymphocytes and hepatocytes were all increased significantly in ethyl methanesulfonate group ($P<0.01$). Tail DNA% of peripheral blood lymphocytes was increased significantly in EG high-dose group ($P<0.01$). There was no statistical significance in the micronucleus formation rate of bone marrow polychromatic erythrocytes and hepatocytes, the tail DNA% and tail distance of hepatocytes among EG groups ($P>0.05$); with the increase of dose, there was an increasing trend. CONCLUSIONS: The results of this study suggest that in 2D cell model, EG not lead to chromosome breakage and DNA damage, but the long-term administration and repeated administration *in vivo* of 3D cell model show that EG has a certain risk of DNA damage, so the evaluation results of 3D HepaRG cell model are more similar to those of rats *in vivo*.

KEYWORDS Emodin-8-*O*- β -D-glucoside; Genotoxicity; Two-dimensional culture; Three-dimensional culture; Rat; Micronucleus test

肝脏是人体最主要的代谢及解毒器官,药源性肝损伤(Drug-induced liver injury, DILI)已成为药品监管机构关注的重点^[1]。随着近年来临床不断出现含蒽醌类成分的中药致肝损伤的案例报道^[2],学界对蒽醌的肝损伤机制展开广泛研究。目前已有体外研究数据提示,蒽醌类化合物存在遗传毒性风险和致突变作用^[3]。课题组前期研究中也证实大黄素可诱导正常人源肝细胞HepaRG染色体损伤和DNA断裂,在体外彗星及微核试验中呈阳性结果^[4]。蒽醌类的潜在遗传毒性,尤其是肝脏肿瘤发生风险有待深入探索。

大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷(Emodin-8-*O*- β -D-glucoside, EG)是大黄素在体内的主要代谢产物及形式^[5],其原型同样存在于大黄、何首乌、虎杖、决明子、冬凌草等中药中且含量较高^[6]。以何首乌为例,不同产地的何首乌药材中EG的含量最高可达0.42%^[7]。文献报道EG可有效提高中枢神经系统中乙酰胆碱含量,保护神经元损伤,对阿尔茨海默病有一定改善,临床应用较为广泛。然而作为蒽醌类化合物,EG含有的羟基蒽醌结构属于遗传毒性警示结构,该结构与DNA碱基类似,使其可嵌入DNA链并导致沙门氏菌(尤其是TA1537菌株)回复性突变^[8]。EG的遗传毒性风险不容小觑,但目前关于EG的毒性及致癌性风险缺乏充足的试验研究。

啮齿类动物在毒性研究中独具优势,但是大量开展体内动物实验成本较高且不符合替代毒理学减少动物使用的理念,因此,使用体外模型进行药物毒性初筛及作用机制的初步研究十分必要。HepaRG细胞是从慢性丙型肝炎病毒感染的肝癌患者体内非瘤组织分离而得的细胞株,能表现人肝细胞的大多数功能,其体外二维(Two-dimension, 2D)培养模型是常用的体外肝毒性评价工具^[9]。本课题组前期研究证实HepaRG细胞可在不额外添加代谢活化剂的情况下较好地代谢药物,在了解以肝脏为靶器官遗传毒性方面独具优势^[10]。但2D模型缺乏细胞-细胞接触和细胞-胞外基质间的联系,长时间培养会出现生长抑制现象^[11]。利用悬滴技术构建的三维(Three-dimension, 3D)HepaRG多细胞聚球体模型则可长期培养,并能够保持较高的白蛋白分泌水平和肝药

酶活性^[12],从而更好地模拟药物体内代谢条件,提供更有价值的评价数据。

本研究同时利用体外2D、3D肝细胞培养模型和大鼠体内重复给药试验评价EG的遗传毒性,并比较3种评价结果的差异,以期EG的临床合理应用和毒性评价方法的选择提供参考。

1 材料

1.1 仪器

悬滴 GravityPlus™ 和 GravityTRAP™ 板(瑞士 Inphero 公司); VICTOR X5 多功能酶标仪(英国 Perkin Elmer 公司); 5180R 台式冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); NTS-1300 恒温振荡水槽(东京理化器械株式会社); DYCP-31F 电泳仪(北京市六一仪器厂); CX41 三目生物显微镜(日本 Olympus 公司); eclipse 80i 荧光显微镜(日本 Nikon 公司); Komet 6.0 图像分析系统(英国安道尔科技有限公司)。

1.2 药品与试剂

EG(成都普菲德生物技术有限公司,批号:17110201,纯度:98.0%); 甲磺酸乙酯(批号:141970611309162)、细胞松弛素B(批号:2989720)、二甲基亚砜(DMSO,批号:RNBG7476)均购自美国 Sigma-Aldrich 公司; 磷酸盐缓冲液(批号:AD19942268)、RPMI 1640 培养基(批号:AE27856292)、Giemsa 染料(批号:SLBT6353)均购自美国 Hyclone 公司; 胰蛋白酶消化液(批号:1974026)、胎牛血清(批号:1908121)均购自美国 Gibco 公司; 丝裂霉素C(日本东京化成株式会社,批号:AKZ80-EF); 羧甲基纤维素钠(国药集团化学试剂有限公司,批号:20170830); 彗星分析试剂盒(美国 Trevigen 公司,批号:P191587); Hanks 平衡盐溶液(美国 Corning 公司,批号:28417007); SYBR Gold 核酸凝胶染液(美国 Invitrogen 公司,批号:1987319); 吡啶橙(美国 Fluka 公司,批号:930226)。

1.3 细胞

HepaRG 人源肝细胞系购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司,本试验所用细胞为第11~12代。

1.4 动物

SPF级SD大鼠30只,5~6周龄,均为♂。购于北京维通利华实验动物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2016-0006。在恒温(20~26℃)、恒湿(40%~70%)、各12h明暗周期的条件下饲养。饲养密度为2~3只/笼。提供经钴60放射灭菌的鼠全价颗粒饲料,自由摄食及饮水,取材前不禁食禁水。本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(Institutional animal care and use committee, IA-CUC)审查。

2 方法与结果

2.1 给药浓度确定

在96孔培养板中,每孔接种5000个HepaRG细胞,孵育18~24h后给药。分别设置空白对照组(0.5% DMSO)和EG给药组(给药浓度分别为324、162、81、27、9、3 μg/mL),于37℃,5%CO₂的条件下孵育24h后,即得2D HepaRG细胞模型,然后每孔加入等体积的三磷酸腺苷检测试剂,轻轻晃动,室温平衡10min后,采用酶标仪检测各孔的三磷酸腺苷发光强度,并计算细胞存活率(%)=(EG各给药组发光强度/空白对照组发光强度)×100%,再根据浓度与存活率关系曲线计算EG的IC₅₀。结果,2D HepaRG细胞模型中EG的IC₅₀为205.4 μg/mL,因此,将后续体外2D HepaRG细胞模型评价试验中的EG高浓度设置为200 μg/mL,由于体外3D HepaRG细胞模型评价试验中的给药时间长,给药浓度不应高于体外2D HepaRG细胞模型评价试验,为保证EG在不同体外细胞模型中的可比性,本研究EG在2D、3D HepaRG细胞模型中给药浓度保持一致。

2.2 统计学方法

微核试验、碱性彗星试验结果以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)的形式列出。彗星试验结果采用单因素方差分析对组间数据进行检验;微核试验结果采用Poisson分布法检验; $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。数据图与统计结果经GraphPad Prism 7软件处理生成。

2.3 体外细胞试验评价EG遗传毒性

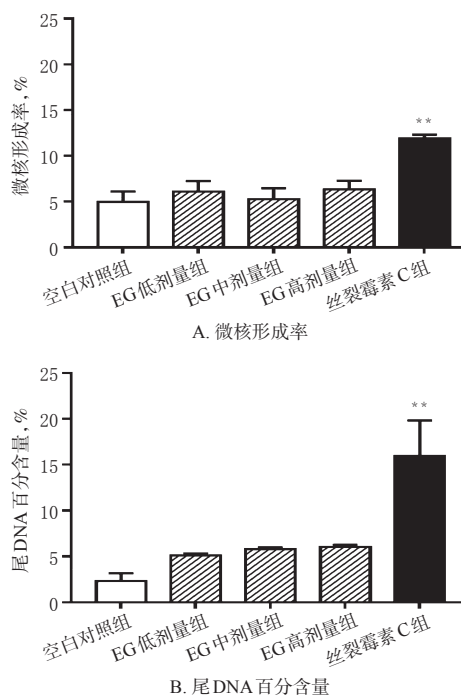
2.3.1 体外2D HepaRG细胞模型评价EG遗传毒性

(1)微核试验。调整HepaRG细胞浓度为 5×10^5 mL⁻¹,取6孔细胞培养板,每孔添加2 mL培养液/细胞混合液,置37℃、5%CO₂孵箱培养18~24h。细胞达对数生长期时,将其分为空白对照组(0.5% DMSO)、丝裂霉素C组(阳性对照,0.1 μg/mL)及EG低、中、高剂量组(10、50、200 μg/mL),处理24h后更换含细胞松弛素B(2 μg/mL)的培养基,继续培养40h。收获细胞并加入0.075 mol/L的氯化钾溶液2 mL,室温低渗处理5 min;加入固定液(无水甲醇:无水乙酸=3:1, V/V)5 mL固定,1000 r/min离心5 min,弃上清液,重复固定2次,每个样品滴片制备2张标本并编号。固定后的玻片标本浸入

5% Giemsa应用液中,染色25~30 min之后置于超纯水中冲洗干净,室温下自然干燥。显微镜下观察并计数每张玻片标本中每500个双核细胞中含微核的细胞数,计算微核形成率,微核形成率=(含微核双核细胞数/观察双核细胞总数)×100%^[13]。

(2)碱性彗星试验。HepaRG细胞处理及给药方法同“2.3.1(1)”项下微核试验,收获细胞后调整细胞浓度为 2×10^5 mL⁻¹,将收获的细胞进行制片、裂解、解旋、电泳、中和、脱水等处理后制成单细胞凝胶标本,每组制备3张标本。所有标本使用SYBR Green I(1:10 000)染色,并在荧光显微镜下拍照(放大倍数200~400)。再使用Komet 6.0彗星图像分析软件进行分析,每个标本至少分析100个彗星细胞的尾DNA百分含量并计算中位数。

结果,与空白对照组比较,丝裂霉素C组HepaRG细胞的微核形成率和尾DNA百分含量均显著升高($P < 0.01$),且其微核形成率和尾DNA百分含量在文献报道的范围内^[13],也表明体外2D HepaRG细胞模型构建成功;EG各剂量组HepaRG细胞的微核形成率和尾DNA百分含量差异无统计学意义($P > 0.05$)。体外2D HepaRG细胞模型的微核形成率及尾DNA百分含量测定结果见图1。



注:与空白对照组比较,** $P < 0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$

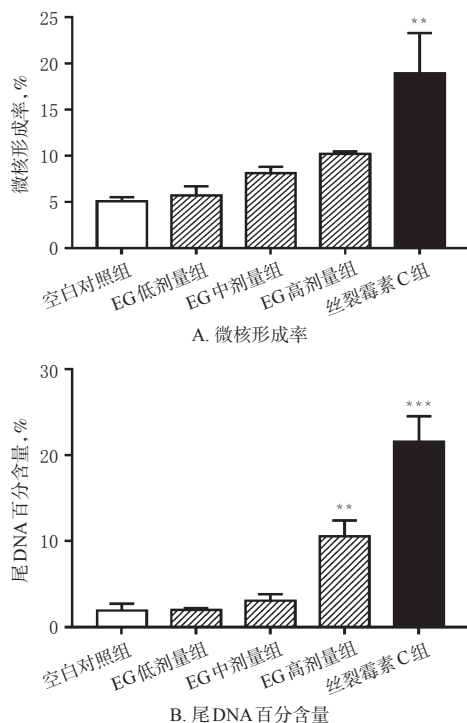
图1 体外2D HepaRG细胞试验中微核形成率及尾DNA百分含量测定结果($n=3$)

Fig 1 Micronucleus formation rate and tail DNA % of *in vitro* 2D HepaRG cell test($n=3$)

2.3.2 体外3D细胞模型评价EG遗传毒性

参考卢贤欢等^[9]的3D悬滴细胞模型培养方法构建体外3D HepaRG细胞模型,将HepaRG经2% DMSO高密度诱导培养14 d后,接种于GravityPlus™板以悬滴法培养4 d;待形成肝细胞微球后加入培养液并将其转移至Gravity TRAP™板中;隔天换液,连续培养10 d,即得3D HepaRG细胞模型;然后分为空白对照组(0.5% DMSO)、丝裂霉素C组(阳性对照,6 μg/mL)和EG低、中、高剂量组(10、50、200 μg/mL),连续给药3次,每次48 h,最后1次给药时加入含细胞松弛素B(6 μg/mL)的培养基。然后收集各组细胞,按“2.3.1”项下方法进行微核试验与碱性彗星试验。

结果,与空白对照组比较,丝裂霉素C组HepaRG细胞的微核形成率和尾DNA百分含量均显著升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.001$),EG高剂量组HepaRG细胞的尾DNA百分含量显著升高($P < 0.01$),且随着EG剂量的增加,3D HepaRG细胞的尾DNA百分含量升高,存在剂量效应相关性;EG各剂量在3D HepaRG细胞模型微核试验结果虽为阴性,但微核形成率随给药剂量增加有升高趋势。体外3D HepaRG细胞模型的微核形成率及尾DNA百分含量测定结果见图2。



注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Note: vs. blank control group, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

图2 体外3D HepaRG细胞试验中微核形成率及尾DNA百分含量测定结果($n=3$)

Fig 2 Micronucleus formation rate and tail DNA % of *in vitro* 3D HepaRG cell test ($n=3$)

2.4 大鼠体内实验评价EG遗传毒性

2.4.1 大鼠分组及给药

30只大鼠分为空白对照组(0.5%羧甲基纤维素钠溶液)、甲磺酸乙酯组(阳性对照,200 mg/kg,给药剂量参考文献^[14],给药时用0.5%羧甲基纤维素钠溶液制备灌胃溶液,甲磺酸乙酯为检测体内DNA断裂或染色体损伤时最常用阳性对照,故体内研究选择甲磺酸乙酯作为阳性对照)和EG低、中、高剂量组(100、300、1 000 mg/kg,给药剂量参考文献^[15],给药时用0.5%羧甲基纤维素钠溶液制备灌胃溶液),每组6只。连续灌胃给药15 d,每天1次,给药体积为15 mL/kg,末次给药3 h后所有大鼠以CO₂吸入法麻醉,从腹腔后大静脉取血用于彗星试验,采血量约0.5 mL/只。

2.4.2 微核试验

(1)骨髓微核试验。将大鼠处死后,取其单侧股骨,剪断两端开放骨髓腔;吸取胎牛血清约1~2 mL,使用注射器针头冲洗骨髓至试管中,并反复抽吸针头数次吹打成骨髓细胞悬液,经1 000 r/min离心5 min后,弃去大部分上清液,将骨髓细胞沉淀吹打均匀;吸取适量骨髓细胞悬液滴于洁净玻片上推片,标本置于室温下干燥,再经甲醇固定15 min后晾干待检^[14]。每只大鼠骨髓细胞样本计数200个总红细胞中的嗜多染红细胞的数目,以及2 000个嗜多染红细胞中含微核细胞的数目,分别计算嗜多染红细胞占总红细胞的百分率以及嗜多染红细胞的微核形成率。

(2)肝脏微核试验。取大鼠肝左叶约5 mm³大小组织,用刀片切成2~3 mm³小块,加入含0.05%胶原酶的HBSS溶液,于37℃水浴中振荡孵育1 h,每30 min人工用力振荡1次,再用移液器反复吹打消化后的细胞悬液50次,再经40 μm细胞筛过滤后,加入3 mL固定液(无水甲醇:冰醋酸=3:1, V/V)固定,并以800 r/min离心1 min;弃上清,再次加入3 mL固定液并重悬,样本于4℃条件保存待检。镜检前,取10~20 μL细胞悬液,加入等体积的吖啶橙-DAPI溶液进行荧光染色;染色后,取10~20 μL混合液滴片后加盖玻片,于荧光显微镜下观察。每只大鼠的样本计数1 000个含微核的肝细胞,计算肝细胞微核率。

结果,与空白对照组比较,甲磺酸乙酯组大鼠骨髓嗜多染红细胞、肝细胞的微核形成率均显著升高($P < 0.01$),EG各剂量组大鼠骨髓嗜多染红细胞/总红细胞比例和嗜多染红细胞、肝细胞的微核形成率差异无统计学意义($P > 0.05$),但随着EG剂量的增加,嗜多染红细胞微核形成率及肝细胞微核形成率均有所增加,存在剂量效应相关性。各组大鼠骨髓嗜多染红细胞/总红细胞比例和嗜多染红细胞、肝细胞微核形成率的测定结果见表1。

表1 各组大鼠骨髓嗜多染红细胞/总红细胞比例和嗜多染红细胞、肝细胞微核形成率的测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 1 Proportion and micronucleus formation rate of bone marrow polychromatic erythrocytes and hepatocytes in rats of each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量	嗜多染红细胞/总红细胞	嗜多染红细胞微核形成率, %	肝细胞微核形成率, %
空白对照组	0.5%羧甲基纤维素钠	0.54±0.02	0.20±0.10	0.16±0.13
EG低剂量组	100 mg/kg	0.59±0.06	0.36±0.27	0.20±0.12
EG中剂量组	300 mg/kg	0.57±0.03	0.58±0.19	0.38±0.10
EG高剂量组	1 000 mg/kg	0.53±0.04	0.78±0.30	0.54±0.09
甲磺酸乙酯组	200 mg/kg	0.47±0.04	2.10±0.38**	1.32±0.38**

注:与空白对照组比较, ** $P<0.01$

Note: vs. blank control group, ** $P<0.01$

2.4.3 碱性彗星试验

采集大鼠外周血约50 μL备用。肝组织样本采集肝左叶约2~3 mm³大小组织置于3 mL切碎液(含20 mmol/L EDTA-2Na和10% DMSO的Hanks平衡溶液)中并使用剪刀剪碎组织以释放细胞,经40 μm细胞筛过滤后置于冰上备用。取外周血淋巴细胞和肝细胞参考“2.3.1(2)”和“2.3.2”项下方法,分别进行体外2D、3D细胞模型的碱性彗星试验,测尾DNA百分含量和尾距(尾距=尾DNA百分含量×头部中心至尾部中心的距离)。结果,与空白对照组比较,甲磺酸乙酯组大鼠外周血淋巴细胞、肝细胞的尾DNA百分含量、尾距均显著升高($P<0.01$),EG高剂量组大鼠外周血淋巴细胞尾DNA百分含量显著升高($P<0.01$),EG各剂量组大鼠肝细胞的微核形成率和肝细胞尾DNA百分含量、尾距差异无统计学意义($P>0.05$),由此可知,EG对外周血淋巴细胞的染色体或DNA损伤效应强于肝细胞。各组大鼠外周血淋巴细胞、肝细胞尾DNA百分含量及尾距的测定结果见表2。

表2 各组大鼠外周血淋巴细胞、肝细胞尾DNA百分含量及尾距的测定结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab 2 Tail DNA% and tail distance of peripheral blood lymphocytes and hepatocytes in rats of each group($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	剂量	外周血淋巴细胞		肝细胞	
		尾DNA百分含量, %	尾距	尾DNA百分含量, %	尾距
空白对照组	0.5%羧甲基纤维素钠	1.19±0.30	0.14±0.03	2.23±0.48	0.21±0.03
EG低剂量组	100 mg/kg	0.96±0.27	0.11±0.03	5.05±1.85	0.57±0.29
EG中剂量组	300 mg/kg	2.50±0.37	0.29±0.17	5.77±0.88	0.60±0.10
EG高剂量组	1 000 mg/kg	4.71±1.27**	0.54±0.20	6.82±1.62	0.78±0.15
甲磺酸乙酯组	200 mg/kg	20.00±3.36***	4.19±1.25***	16.13±5.52***	3.90±1.85***

注:与空白对照组比较, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Note: vs. blank control group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

3 讨论

遗传毒性试验通常平行设置阳性对照,确保试验体

系的可靠性。本研究根据文献及经验在体内及体外研究中选择不同阳性对照,证实试验体系成立、评价结果可信。丝裂霉素C为体外微核试验常用阳性对照药,可在非代谢活化条件下诱导微核试验呈阳性结果^[13]。鉴于当前针对体外彗星试验,尤其是3D模型彗星试验的文献报道较少,且微核试验所用阳性对照药及浓度范围通常可兼顾彗星试验,故使用丝裂霉素C同时作为体外微核和彗星试验的阳性对照药^[16]。甲磺酸乙酯是以体内染色体和DNA损伤为检测终点时常用的阳性对照药,同时也是体内彗星试验联合验证的指定阳性对照^[17],故本研究将其作为体内微核和彗星试验的阳性对照。

研究EG的致癌性风险对于临床安全用药具有重要指导意义。本研究首次同时利用体外2D、3D细胞模型及大鼠连续15 d体内重复给药试验评价EG的遗传毒性风险。体内研究在传统骨髓微核试验的基础上增加肝微核试验,并平行取外周血及肝组织开展彗星试验。肝微核试验可同时考察毒性靶组织及药物代谢产物的遗传毒性,尤其在代谢产物体内遗传毒性评价方面具有独特优势^[18]。

本研究发现,在体外3D HepaRG细胞模型中,EG高剂量组HepaRG细胞的尾DNA百分含量与空白对照组相比显著升高,且尾DNA百分含量与EG浓度存在明显的剂量效应相关性;微核试验结果虽为阴性,但可见类似趋势。体内研究中,尽管EG在传统骨髓嗜多染红细胞微核试验中呈阴性,但各剂量组微核形成率随剂量升高有一定升高趋势,且与肝微核试验结果基本相符;此外,EG高剂量组可导致外周血淋巴细胞DNA明显损伤,各剂量组之间呈剂量效应相关性,肝细胞彗星试验结果为阴性但可见类似趋势。2项研究中外周血淋巴细胞均较肝细胞更为敏感,可见EG可与外周血淋巴细胞DNA相互作用,存在一定遗传毒性风险。相关体外和体内研究报道,含蒽醌环的化合物可导致遗传物质断裂、并导致微核试验和彗星试验结果呈阳性,如大黄素可诱导小鼠骨髓嗜多染红细胞微核形成率升高^[19],可致体外培养人淋巴瘤细胞和肝细胞DNA断裂^[4,20]。大黄素和大黄酸可诱导哺乳动物细胞tk基因突变率增加^[20],芦荟大黄素在排泄过程中可导致肾细胞和结肠细胞的DNA断裂等^[21]。分析原因认为与蒽醌结构可与Topo II (Topoisomerase II, Topo II)的三磷酸腺苷结构域竞争结合并抑制Topo II的活性,从而导致该复合物不易解离及DNA链断裂^[19]。此外,也有研究显示,蒽醌类化合物经I相代谢后其遗传毒性更强,如在体外试验中添加大鼠肝微粒体酶S9后(S9混合物配方中仅含启动I相代谢反应的底物),其中芦荟大黄素可诱导更多回复性菌落形成^[15]。有研究根据大鼠灌胃EG后,在血浆、尿和粪便样本中均可检测到大黄素,推测EG在体内先水

解为大黄素后再以游离蒽醌形式进一步在体内代谢^[22]。因此,EG体内遗传毒性物质基础可能与分子量较小的含蒽醌母核的化合物有关,该结论有待经体内代谢及组织分布研究证实。

此外,本研究也发现,EG对体外2D HepaRG细胞模型无明显致染色体断裂及DNA损伤风险,而3D细胞模型对其具有明显损伤,提示体外3D肝细胞模型的评价结果更接近于体内试验。体外3D肝细胞模型现已被应用于药物研发过程中的药物评估^[23-24]。体外3D肝细胞模型可长期培养,且能保持肝状类似结构和组织代谢活动^[25-26],在重复给药的体外肝毒性评价方面具有一定的优势。本研究的结果也表明,体外3D肝细胞模型是良好的体外毒性评价方法,其评价结果与体内实验相似,可以更准确地进行肝毒性药物的早期筛选。

参考文献

[1] 黄蓓.国家药监局发文指导中药肝损伤评价[J].中医药导报,2018,24(14):127.

[2] 练祥,柯婷婷,胡爱荣.何首乌及其制剂致药物性肝损伤52例临床分析[J].中华中医药学刊,2013,31(5):1133-1134.

[3] 李瑛,刘伏友.大黄的毒副作用研究[J].中国药房,2006,17(9):710-712.

[4] 文海若,毛志慧,耿兴超,等.人源HepaRG肝细胞毒性与遗传毒性高通量筛选方法的初步建立[J].药物评价研究,2017,40(11):1550-1558.

[5] 郭忠会,贾志鑫,陈奎奎,等.基于UPLC-Q-TOP-MS分析何首乌提取物体内成分[J].中国中药杂志,2018,43(13):2796-2805.

[6] 李凯明,孙震晓.我国含大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷的植物资源整理[J].中国新药杂志,2016,25(24):2787-2792.

[7] 母茂君,李杨,李成功,等.UPLC法同时测定何首乌中2个蒽醌糖苷[J].大理大学学报,2018,36(12):57-61.

[8] LIBERMAN DF, FINK RC, SCHAEFER FL, et al. Mutagenicity of anthraquinone and hydroxylated anthraquinones in the Ames/Salmonella microsome system[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 43(6): 1354-1359.

[9] WILKENING S, STAHL F, BADER A, et al. Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line Hep2 with regard to their biotransformation properties[J]. *Drug Metab Dispos*, 2003, 31(8): 1035-1042.

[10] 颜玉静,文海若,淡墨,等.三种何首乌单体成分对大鼠肝损伤作用的研究[J].中国现代中药,2019,21(8):1054-1061.

[11] GUGUEN-GUILLOUZO C, GUILLOUZO A. General review on in vitro hepatocyte models and their applications[J]. *Methods Mol Biol*, 2010. DOI: 10.1007/978-1-60761-688-7_1.

[12] 卢贤欢,赵华琛,王雪,等.体外肝脏3D模型在药物肝毒性评价中的优势[J].药学报,2017,52(12):1859-1864.

[13] 文海若,淡墨,齐乃松,等.多细胞系胞质分裂阻滞微核细胞组学试验法的建立与应用[J].癌变·畸变·突变,2015,27(4):304-308.

[14] 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.

[15] OECD. *Test guideline 487: repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents*[EB/OL].[2019-06-01]. <http://www.oecd.org>.

[16] DAHL EL, CURREN R, BARNETT BC, et al. The reconstructed skin micronucleus assay (RSMN) in EpiDerm (TM): detailed protocol and harmonized scoring atlas[J]. *Mutat Res*, 2011, 720(1/2): 42-52.

[17] 韩天娇,周长慧,常艳.体内碱性彗星试验与微核试验联合测定甲磺酸乙酯遗传毒性方法的建立[J].癌变·畸变·突变,2016,28(4):277-280.

[18] 童文,周长慧,常艳.肝微核试验方法的最新进展[J].中国新药杂志,2017,26(11):64-68.

[19] LI Y, LUAN Y, QI X, et al. Emodin triggers DNA double-strand breaks by stabilizing topoisomerase II -DNA cleavage complexes and by inhibiting ATP hydrolysis of topoisomerase II [J]. *Toxicol Sci*, 2010, 118(2): 435-443.

[20] 朱钦翥,陈维,张立实.大黄素和大黄酸的体外遗传毒性评价[J].癌变·畸变·突变,2011,23(1):65-67.

[21] NESSLANY F, SIMAR-MEINTIERESS, FICHEUX H, et al. Aloe-emodin-induced DNA fragmentation in the mouse in vivo comet assay[J]. *Mutat Res*, 2009, 678(1): 13-19.

[22] 张立.基于HRMS的大鼠体内大黄药源性成分分析方法研究[D].北京:北京中医药大学,2015.

[23] GODOY P, HEWITT J, ALBRECHT U, et al. Recent advance in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME[J]. *Arch Toxicol*, 2013, 87(8): 1315-1330.

[24] YU CB, PAN XP, YU L, et al. Evaluation of a novel cholanoid fluidized bed bioreactor for future bioartificial livers [J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(22): 6869-6877.

[25] ABU-ABSI SF, FRIEND JR, HANSEN LK, et al. Structural polarity and functional bile canaliculi in rat hepatocyte spheroids[J]. *Exp Cell Res*, 2002, 274(1): 56-67.

[26] MIRANDA JP, RODRIGUES A, TOSTOES RM, et al. Extending hepatocyte functionality for drug-testing applications using high-viscosity alginate-encapsulated three-dimensional cultures in bioreactors[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010, 16(6): 1223-1232.

(收稿日期:2019-07-01 修回日期:2019-09-16)

(编辑:唐晓莲)