

DOI: 10.19812/j.cnki.jfsq11-5956/ts.20240429005

阿斯巴甜和糖精的基因毒性体外测试研究

高鹏霞^{1,2#}, 赵晓童^{1,2#}, 李治², 马波², 王朝霞²,
王莉莉², 徐华^{2*}, 陈爱兵^{1*}, 谢剑炜²

(1. 河北科技大学化学与制药工程学院, 石家庄 050018;
2. 军事医学研究院国家安全特需药品全国重点实验室, 北京 100850)

摘要: **目的** 探究两种常用甜味剂阿斯巴甜和糖精的基因毒性。**方法** 采用液相色谱-串联质谱(Liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)技术和高内涵筛选(high content screening, HCS)技术检测阿斯巴甜和糖精暴露后细胞中与 DNA 损伤修复途径相关的重要生物标志物, 即 γ -H2AX、p-H3、Rad51 和 p53 的表达水平, 并考察其量效和时效关系。**结果** LC-MS/MS 检测结果表明阿斯巴甜和糖精在考察浓度下均不会引起细胞 γ -H2AX 和 p-H3 表达增加, 即未呈现染色体断裂和纺锤体毒性; HCS 检测结果显示糖精对 4 种生物标志物均无影响, 阿斯巴甜对 p53、 γ -H2AX 和 p-H3 这 3 种 DNA 损伤生物标志物无明显影响, 但引起 DNA 同源重组修复(homologous recombination repair, HRR)蛋白 Rad51 呈现无剂量依赖性的显著增加。**结论** 本研究表明阿斯巴甜和糖精经两种基因毒性体外测试方法检测, 均未呈现显著 DNA 损伤基因毒性。

关键词: 阿斯巴甜; 糖精; 液相色谱-串联质谱技术; 高内涵筛选; 基因毒性

In vitro testing studies on the genotoxicity of aspartame and saccharin

GAO Peng-Xia^{1,2#}, ZHAO Xiao-Tong^{1,2#}, LI Zhi², MA Bo², WANG Zhao-Xia²,
WANG Li-Li², XU Hua^{2*}, CHEN Ai-Bing^{1*}, XIE Jian-Wei²

(1. College of Chemical and Pharmaceutical Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China; 2. State Key Laboratory of National Security Specially Needed Medicines, Beijing 100850, China)

ABSTRACT: Objective To investigate the genotoxicity of two kinds of commonly used sweeteners, aspartame and saccharin. **Methods** Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) techniques and high content screening (HCS) techniques were used to detect the expression levels of the important biomarkers related to the DNA damage repair pathway in cells after aspartame and saccharin exposure. The expression levels of important biomarkers, i.e., γ -H2AX, p-H3, Rad51, and p53, were examined for their quantitative and temporal relationships.

Results The LC-MS/MS results indicated that neither aspartame nor saccharin led to an increase in the expression

基金项目: 国家自然科学基金项目(21974151)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (21974151)

#高鹏霞、赵晓童为共同第一作者

#GAO Peng-Xia and ZHAO Xiao-Tong are Co-first Authors

*通信作者: 徐华, 副研究员, 主要研究方向为药物毒物分析。E-mail: huarxu@163.com

陈爱兵, 教授, 主要研究方向为能源材料。E-mail: chen_ab@163.com

*Corresponding author: XU Hua, Associate Professor, State Key Laboratory of National Security Specially Needed Medicines, Beijing 100850, China. E-mail: huarxu@163.com

CHEN Ai-Bing, Professor, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China. E-mail:

chen_ab@163.com

of cellular γ -H2AX and p-H3 at the tested concentrations, suggesting the absence of chromosome breakage and spindle toxicity. The HCS assay revealed that saccharin did not affect any of 4 kinds of biomarkers. As for aspartame, it did not significantly impact the expression of the three DNA damage response biomarkers of p53, γ -H2AX and p-H3. However, aspartame did cause a significant increase in the expression of the DNA homologous recombination repair (HRR) protein Rad51, while this effect was not dose-dependent. **Conclusion** This study shows that aspartame and saccharin do not exhibit significant DNA damage genotoxicity when tested by two kinds of *in vitro* genotoxicity test methods.

KEY WORDS: aspartame; saccharin; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; high content screening; genotoxicity

0 引言

人工甜味剂具有甜度高热量低的特征^[1], 被称为食品工业领域迄今为止最重要的成就之一, 但其安全性仍存在较大争议, 新陈代谢紊乱和糖尿病等与之直接相关的疾病报道日益增多^[2]。其中, 阿斯巴甜是食品和饮料中消费最多的甜味剂, 是一种二肽类无糖甜味剂, 甜度约为蔗糖的 200 倍^[3-4]。我国于 1986 年批准其在食品中使用。甜味剂作为一种常用的添加剂, 几乎涵盖了所有的食品, 我国批准使用的甜味剂有 15 种^[5]。2023 年 7 月 14 日, 世界卫生组织(World Health Organization, WHO)下属国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)与联合国粮农组织食品添加剂联合专家委员会(Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, JECFA)联合发布了阿斯巴甜对健康影响的评估结果。IARC 将阿斯巴甜归类为可能对人类致癌的 2B 组(IARC 2B), 即有致癌风险但缺乏充分科学证据, 需进一步研究考证^[6]。2007 年 JECFA 和欧盟食品安全局(European Food Safety Authority, EFSA)对其安全性进行评估, 用动物实验推算出体重约 60 kg 的正常健康人群每日摄入 2.4 g 阿斯巴甜, 并不会因此致癌, 但其由于科学依据太少仍无定论^[7-8]。有研究基于细菌回复突变实验、骨髓微核检测^[2]、彗星实验等检测结果认为阿斯巴甜无潜在基因毒性; 然而 ÇADIRCI 等^[9]采用染色体畸变实验评估其致基因损伤潜力, 得出相反的结论, 即认为阿斯巴甜具有基因毒性。总而言之, 验证阿斯巴甜是否具有致癌性的证据仍然有限, 其是否致癌仍需深入研究, 以正确评估其对人体健康的影响。

糖精是最古老的人工甜味剂, 甜度是蔗糖的 300 倍, 人体摄入后 85% 会被吸收经肾脏以邻氨基甲酰苯甲酸排泄出^[10]。有研究发现其在雄性大鼠体内有可能导致膀胱癌, 1977 年美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)要求将其在食品中禁用。1987 年, 又因糖精导致人类膀胱癌的证据不足, IARC 将其归为

2B 类。后续的基因毒性测试研究, 如沙门氏菌回复突变实验(Ames)和小鼠微核实验等结果则呈现阴性。因此, 糖精的安全性亦仍然存在争议, 关于其是否具有基因毒性仍待探讨。

外源致癌物根据作用机制可分为 DNA 损伤和非 DNA 损伤两大类, 而多数致癌物均具有直接损伤 DNA 的特性^[3]。生物标志物作为 DNA 损伤基因毒性物质的体外评价的指标, 如 γ -H2AX 是 DNA 损伤的生物标志物, 当 DNA 发生双链断裂(double strand breaks, DSBs)会激活 DNA 损伤应答机制(DNA damage response, DDR), H2AX 的 139 位丝氨酸残基迅速被磷酸化, 形成 γ -H2AX^[11-12]; p-H3 是细胞有丝分裂的生物标志物, 参与肿瘤微环境的构建等多种机制, 是非整倍体基因毒性特异性效应指标^[13]; RAD51 是一种与 DSBs 修复密切相关的蛋白质, 其在同源重组修复(homologous recombination repair, HRR)中发挥着核心作用^[14-15]; p53 蛋白是一种转录因子, 参与启动细胞凋亡过程, 促使受损细胞死亡, 从而防止损伤细胞继续分裂形成肿瘤, p53 蛋白的表达水平和基因突变状态可作为肿瘤治疗反应和预后的生物标志物^[16]。本课题组前期建立了一种定量分析 DNA 损伤修复标志物即磷酸化修饰组蛋白 γ -H2AX 和 p-H3 的质谱方法, 可有效应用于基因毒性化合物的发现、基因毒作用模式的判定、致癌性的体外评估^[11]以及药品中痕量基因毒性杂质的筛查^[17]。课题组亦建立了基于检测 γ -H2AX 和 p-H3 的高内涵筛选(high content screening, HCS)分析方法, 成功应用于基因毒性物质的筛查^[18]。因此, 本研究采用液相色谱-串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)技术精确测定了人源细胞 HepG2 经阿斯巴甜和糖精急性或亚急性暴露诱导生成的 γ -H2AX 和 p-H3; 同时采用基因损伤 HCS 分析盘, 检测 HepG2、Rad51-EGFP-SW480 和 A549 等 3 种细胞株经阿斯巴甜和糖精分别暴露后的基因损伤生物标志物 γ -H2AX、p-H3、Rad51 和 p53, 并考察其量效关系, 从而为探讨两种常用甜味剂阿斯巴甜和糖精的基因毒性提供实验依据和参考。

1 材料与amp;方法

1.1 药品、试剂和主要仪器

3 种基因毒性物质标准品(喜树碱、紫杉醇、叠氮胸苷)(纯度均大于 99%, 中国食品药品检定研究院); 受试化合物标准品阿斯巴甜(纯度 99%, 北京索莱宝科技有限公司); 受试化合物标准品糖精(纯度 99%, 上海源叶生物科技有限公司); 荧光探针 Hoechst 33342、小鼠抗人 γ -H2AX 单抗、p-H3 单抗、p53 单抗及 Alexa Fluor 488 标记的羊抗小鼠二抗(美国 Life Technologies 公司); 甲酸(纯度 98%)、胰酶消化液、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、Triton X-100(美国 Sigma-Aldrich 公司); 肽段 ATQASQEY 和 ATQApSQEY 及 [$^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}$]ATQASQEY 和 [$^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}$]ATQApSQEY、肽段 KSTGGKAPR 和 KpSTGGKAPR 及 [$^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}$]KSTGGKAPR 和 [$^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}$]KpSTGGKAPR(南京杰肽生物有限公司); 杜氏改良伊戈尔培养基(Dulbecco's modified eagle medium, DMEM)培养基、磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer solution, PBS)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 细胞核提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司); 三氯乙酸(纯度 100%)、丙酮(分析纯)、硫酸、醋酸(优级纯)[国药集团试剂有限公司(北京)]; 测序级胰蛋白酶(酶活性 14963 U/mg, 北京普罗麦格公司); 蛋白酶抑制剂及磷酸酶抑制剂(瑞士罗氏制药公司); C_{18} 膜(上海安谱科学仪器有限公司); 乙腈(色谱纯, 德国 Merck 公司)。

高内涵筛选系统(美国 PerkinElmer 公司); CO_2 培养箱(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 多功能酶标仪 SpectraMax M5(美国 Molecular Devices 公司); 洁净工作台 DL-CJ-1ND-II(东联哈尔滨仪器制造有限公司); 高速离心机 5418(德国 Eppendorf 公司); Q-TRAP 5500 型三重四极杆-离子阱串联质谱仪(美国 AB Sciex 公司); ACQUITY 型超高效液相色谱仪(美国 Waters 公司); Milli-Q A10 型超纯净水净化系统(美国 Millipore 公司); 恒温振荡水浴 HZQ-F160(瑞士 Ginkgo 公司); CKX41 倒置显微镜(日本 Olympus 公司); 3k30 高速冷冻离心机(美国 Sigma-Aldrich 公司); ACQUITY UPLC BEH C_{18} (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm)(上海沃特世科技有限公司)。

1.2 细胞培养

将 HepG2、Rad51-EGFP-SW480 和 A549 细胞分别采用含 10% FBS 的 1640、含 10% FBS 的 DMEM 培养基和含 10% FBS 的 F-12K 培养基于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 定期换液传代。

1.3 细胞毒性检测

HepG2 细胞进行计数, 用完全培养基将其稀释至 1×10^5 个/mL, 接种于 96 孔板中, 置于 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 的细

胞培养箱中培养 24 h, 吸出培养基, 加入不同浓度的待测物, 继续培养 24 h, PBS 缓冲液清洗后每孔加入 100 μL 的 CCK8 溶液, 继续在培养箱中孵育 2 h。使用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度(OD)值。实验重复 3 次, 根据拟合的剂量效应关系曲线计算半数抑制浓度(half maximal inhibitory concentration, IC_{50})值, 如公式(1)所示。

$$\text{细胞抑制率}/\% = \frac{\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{实验组}}}{\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{空白组}}} \times 100\% \quad (1)$$

1.4 LC-MS/MS 实验

1.4.1 细胞处理

急性暴露: 采用二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)分别溶解喜树碱和紫杉醇, 配制 0.01 mol/L 的母液, 再用无血清培养基经梯度稀释, 配制终浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的喜树碱和 1 $\mu\text{mol/L}$ 紫杉醇溶液作为阳性对照, 0.1% DMSO 的溶剂作为空白对照组。用无血清培养基溶解配制阿斯巴甜溶液, 设置 10.0、5.0 和 2.5 mg/mL 等 3 个质量浓度梯度; 用无血清培养基溶解配制糖精溶液, 设置 3.00、1.50 和 0.75 mg/mL 等 3 个质量浓度梯度。每皿加入 6 mL 相应浓度受试化合物溶液, 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h。

亚急性暴露: 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 的喜树碱溶液和 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 紫杉醇作为阳性对照组, 0.1% DMSO 的溶剂作为空白对照组, 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中孵育 24 h。糖精用完全培养基溶解至 0.75 mg/mL, 阿斯巴甜用完全培养基溶解至 2.5 mg/mL, 每皿加入 6 mL 受试化合物溶液, 37 $^\circ\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中定期传代孵育 7 d。

1.4.2 组蛋白提取及靶标肽段制备

参考文献[11]的方法, 采用细胞核提取试剂盒提取细胞核, 酸抽提法提取组蛋白。组蛋白预冷丙酮洗涤后溶于 40 μL 50 mmol/L NH_4HCO_3 溶液中, 高速离心收集上清液。加入测序级胰蛋白酶, 37 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 加入 20%醋酸终止酶切反应。经 C_{18} -Stage-tips 脱盐, 离心浓缩至干, 以 0.1%甲酸溶液复溶, 加入终质量浓度为 50 ng/mL 的混合内标溶液, 混匀待测。

H3 酶解前后均需经丙酰化处理, 保持 pH 8.0。处理过程为丙酰化试剂(甲醇:丙酸酐=1:3, $V:V$)加入组蛋白溶液, 51 $^\circ\text{C}$ 孵育 20 min, 真空离心浓缩后复溶, 加入丙酰化试剂, 51 $^\circ\text{C}$ 孵育 20 min。

1.4.3 色谱条件

HPLC 色谱柱为 ACQUITY UPLC BEH C_{18} (100 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm); 柱温 40 $^\circ\text{C}$; 流动相 A 为 0.1%甲酸溶液, 流动相 B 为乙腈; 进样体积 10 μL ; 流速 0.25 mL/min; 梯度洗脱程序: 0~8.0 min, 1%~30% B; 8.0~8.5 min, 30%~80% B; 8.5~10.1 min, 80%~1% B; 10.1~120.0 min, 1% B。

1.4.4 质谱条件

监测模式: 多反应监测(multiple reaction monitoring,

MRM) 模式; 离子源: 电喷雾离子源 (electro spray ionization, ESI), 正离子模式; 离子源温度: 500°C; 雾化气 (Gas1) 压力: 276 kPa; 辅助加热干燥气 (Gas2) 压力: 414 kPa; 碰撞室出口电压 (collision cell exit potential, CEX): 15 eV, 入口电压 (entrance potential, EP): 10 eV。MRM 方法参数如表 1 所示。

1.5 HCS 实验

1.5.1 细胞处理

急性暴露: 用无血清培养基溶解配制阿斯巴甜溶液, 设置 2.5、5.0 和 10.0 mg/mL 等 3 个质量浓度梯度; 用无血清培养基溶解配制糖精溶液, 设置 0.75、1.50 和 3.00 mg/mL 等 3 个质量浓度梯度。黑色底透 96 孔培养板每孔加入 100 μ L 受试溶液, 每组 3 个复孔, 转入 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。阳性对照分别为 0.1 μ mol/L 的喜树碱、紫杉醇和叠氮胸苷, 并平行设置空白对照组, 均于 37°C、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。

亚急性暴露: 采用无血清培养基分别溶解阿斯巴甜和糖精至 2.50 和 0.75 mg/mL, 暴露细胞, 于 37°C、5% CO₂ 培养箱中继续培养 7 d, 定期换代培养, HCS 检测前 16 h, 以每孔 $1.5 \times 10^4 \sim 2 \times 10^4$ 个细胞的密度接种于黑色底透 96 孔板中。

1.5.2 细胞核、 γ -H2AX、p-H3、Rad51 和 p53 检测

HepG2 和 A549 细胞均采用 4% 多聚甲醛 (200 μ L/孔) 固定细胞, 并于室温孵育 15 min。固定后, 用 100 μ L/孔的 PBS 洗涤孔板 2 次。然后, 用 200 μ L/孔的渗透液 (含 1% TritonX-100 的 PBS) 在室温下孵育 15 min。渗透后, 用

200 μ L/孔的 PBS 洗涤细胞 2 次。然后加入封闭液 (添加 5% FBS 的 PBS) (200 μ L/孔) 室温孵育 1 h, 以避免非特异性抗体结合。移弃封闭缓冲液, 每孔加入 50 μ L 一抗溶液 (含 0.5% H2AX/p-H3/p53 一抗的 PBS 溶液), 室温孵育 2 h。孵育后, 移弃一抗溶液, 用 PBS 洗涤孔板 2 次。随后加入 50 μ L 含有荧光二抗和 Hoechst 33342 DNA 染料的 PBS 溶液 (终浓度为 0.2% 二抗和 0.01% Hoechst 33342), 室温避光孵育 1 h。孵育后, 经 PBS 洗涤 2 次后, 加入 200 μ L PBS 上机检测。

Rad51-EGFP-SW480 细胞用 4% 多聚甲醛 (200 μ L/孔) 于室温孵育 15 min 固定后, 用 100 μ L/孔的 PBS 洗涤孔板 2 次, 加入 Hoechst 33342 染料于室温避光孵育 1 h。孵育后, 用 PBS 洗涤 2 次, 然后加入 200 μ L PBS 上机检测。

1.5.3 图像采集与分析

使用 HCS 系统采用 40 \times 放大倍数摄像头拍摄图像, 并使用 Harmony 5.1 软件进行分析。在通道 1 中检测核 DNA 荧光强度 (Hoechst 33342), 以鉴定活细胞; 在通道 2 中检测目标蛋白表达水平。通道 1 采集细胞核染色为蓝色, 通道 2 采集绿色荧光为 γ -H2AX、p-H3、Rad51 或 p53 染色。

1.6 数据处理

所有实验至少平行重复 3 次。所有测试化合物的 γ -H2AX、p-H3、Rad51 或 p53 的荧光强度结果均使用 GraphPad Prism 8 软件进行统计学分析, 样本均值为正态分布, 多组数据比较采用单因素方差分析, 两组比较采用 *t* 检验。P < 0.05 表示差异有统计学意义。

表 1 H2AX 肽段和 H3 肽段标准品 MRM 方法参数
Table 1 MRM method parameters for H2AX peptide and H3 peptide standards

肽段名称	母离子	子离子	去簇电压/eV	碰撞电压/eV	驻留时间/ms
ATQASQEY	449.2	182.1	100	15	100
		526.2	100	15	100
[¹³ C ₃ , ¹⁵ N]ATQASQEY	451.2	182.1	100	15	100
		526.2	100	10	100
ATQApSQEY	489.2	182.1	100	16	100
		526.2	100	16	100
[¹³ C ₃ , ¹⁵ N]ATQApSQEY	491.2	182.1	100	20	100
		442.1	100	15	100
KSTGGKAPR	535.3	829.5	70	19	100
		241.1	70	20	100
KpSTGGKAPR	575.3	526.2	70	18	100
		241.2	70	22	100
[¹³ C ₃ , ¹⁵ N]KSTGGKAPR	540.3	839.5	80	18	100
		242.1	80	18	100
[¹³ C ₃ , ¹⁵ N]KpSTGGKAPR	580.5	531.3	70	24	100
		919.3	70	24	100

2 结果与分析

2.1 细胞毒性检测结果

通过 CCK8 实验对糖精和阿斯巴甜进行 HepG2 细胞毒性测试。分别用 0.01、0.03、0.10、0.30、1.00、3.00、10.00 mg/mL 阿斯巴甜和 0.30、1.00、3.00、10.00、30.00、100.00 mg/mL 糖精处理 HepG2 细胞 24 h 后,用 CCK8 试剂盒检测细胞毒性。检测结果如图 1 所示,糖精处理对 HepG2 细胞存活率影响较高,其 IC_{50} 值为 3.32 mg/mL;阿斯巴甜对 HepG2 细胞的 IC_{50} 值为 12.56 mg/mL。

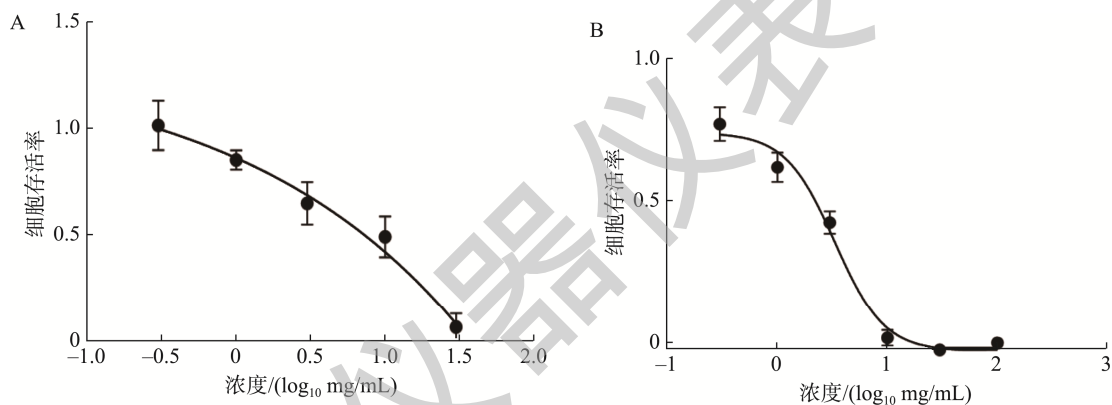
2.2 LC-MS/MS 检测结果

课题组前期建立的 LC-MS/MS 方法已成功应用于缙沙坦原料药中基因毒性杂质的筛查检测,通过检测 γ -H2AX 的表达水平以指征评价 N-亚硝基二胺的存在及其基因毒性^[19];并通过联合定量分析组蛋白 γ -H2AX 和 p-H3,

实现对致染色体断裂化合物和非整倍体毒性化合物这两类典型基因毒性物质的筛查和分类^[11],且该方法灵敏度高,在 0.1 μ mol/L 喜树碱和 0.1 μ mol/L 紫杉醇暴露下即可检测到 γ -H2AX 及 p-H3 呈现阳性结果。因此本研究通过该方法定量监测阿斯巴甜和糖精暴露细胞后的基因毒性标志物 γ -H2AX 和 p-H3,以探讨其基因毒性。

2.2.1 受试化合物急性暴露后 γ -H2AX 和 p-H3 量效变化

本研究通过 MS 技术考察了细胞与 2.5、5.0、10.0 mg/mL 3 种质量浓度的阿斯巴甜和 0.75、1.50、3.00 mg/mL 3 种质量浓度的糖精溶液孵育 24 h 后的 γ -H2AX 和 p-H3 水平变化,如图 2 所示,与对照组相比,阿斯巴甜和糖精不改变 γ -H2AX 和 p-H3 的 $R_{\gamma/T}$ 值,即阿斯巴甜和糖精不影响细胞 γ -H2AX 和 p-H3 的表达水平。依照 SMART 等^[20]建立的基因毒性评价标准,即阳性基因毒性结果判定必须符合处理组 γ -H2AX 水平大于阴性对照组的 1.3 倍,如图 3 所示,两种甜味剂阿斯巴甜和糖精短期急性暴露的结果显示



注: A. 阿斯巴甜; B. 糖精, 图 2、4 同。

图 1 阿斯巴甜和糖精对 HepG2 细胞活性的影响

Fig.1 Effects of aspartame and saccharin on HepG2 cell activity

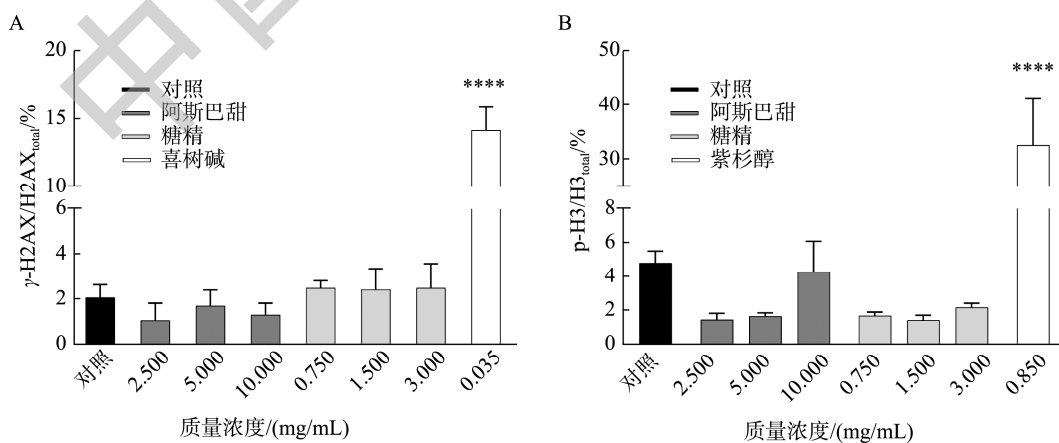


图 2 阿斯巴甜和糖精急性暴露诱导 HepG2 细胞 γ -H2AX 和 p-H3 表达的剂量关系

Fig.2 Dose effect analysis of acute exposure to aspartame and saccharin induced expression levels of γ -H2AX and p-H3 in HepG2 cells

γ -H2AX 与 p-H3 并未发生显著增加。有研究采用染色体畸变实验和彗星实验评估阿斯巴甜的基因毒性, 证明阿斯巴甜在 IC₅₀ 的暴露浓度下会引起人淋巴细胞中染色体畸变频率(chromosome aberration, CA)的增加^[9]且彗尾长度呈现剂量依赖性增加^[21], 提示阿斯巴甜可能具有一定基因毒性。但亦有报告指出阿斯巴甜并不会导致姐妹染色单体交换的增加^[22], 并且在 Ames 实验中无致突变性^[23-24], 而本研究结果进一步支持了该结论。糖精暴露于小鼠体内, 彗尾实验显示其具有一定 DNA 损伤特性^[26]; 但在多数基因毒性测试实验例如 Ames 和微核等实验中, 糖精均呈现阴性结果, 在体外无基因诱变活性^[27], 与本研究结果一致, 即体外评估糖精无基因毒性。

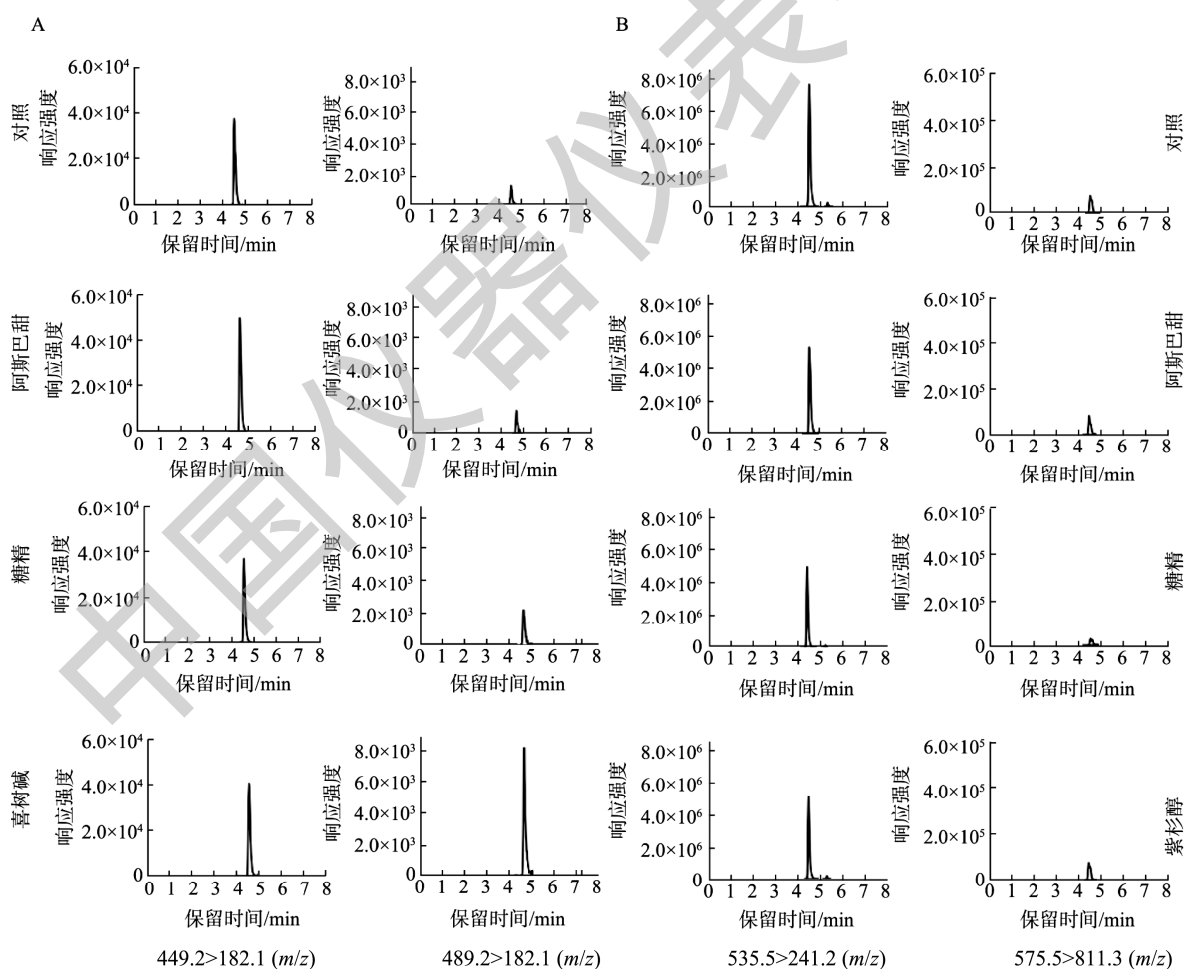
2.2.2 受试化合物亚急性暴露后 γ -H2AX 和 p-H3 表达

阿斯巴甜 2.5 mg/mL 和糖精 0.75 mg/mL 暴露 HepG2 细胞 7 d 后, 检测其对 γ -H2AX 和 p-H3 的影响, 结果如图 4 所示。与阴性对照组相比, 阿斯巴甜和糖精的低剂量长时

程暴露均不会引起 γ -H2AX 和 p-H3 的显著性增加, 即 LC-MS/MS 检测呈现阴性结果, 表明糖精和阿斯巴甜暴露后未呈现染色体断裂和纺锤体毒性。其肽段定量离子对色谱图如图 5 所示。

2.3 HCS 检测结果

与传统体外基因毒性检测方法相比, HCS 具有多参数、高通量、高灵敏、可视化等优点, 为体外测试基因毒性物质的研究提供了新工具。且经验证本研究建立的基因毒性 HCS 分析方法在 0.1 μ mol/L 喜树碱和 0.1 μ mol/L 紫杉醇暴露下即可检测到 γ -H2AX 及 p-H3 呈现阳性结果, 且在 10 μ mol/L 叠氮胸苷和 0.1 μ mol/L 喜树碱暴露下即可检测到 Rad51 和 p53 的显著性变化。因此本研究应用该 HCS 技术, 检测了细胞中不同 DNA 损伤修复通路的生物标志物 γ -H2AX、p-H3、p53 及 Rad51 的表达变化。



注: A. ATQASQEY和ATQA(p)SQEY; B. KSTGGKAPR和KpSTGGKAPR。

图3 阿斯巴甜及糖精急性处理HepG2细胞后ATQASQEY及ATQA(p)SQEY肽段和KSTGGKAPR及KpSTGGKAPR肽段定量离子对色谱图
Fig.3 Quantitative ion-pair chromatograms of ATQASQEY and ATQA(p)SQEY peptides and KSTGGKAPR and KpSTGGKAPR peptides after acute treatment of HepG2 cells with aspartame and saccharin

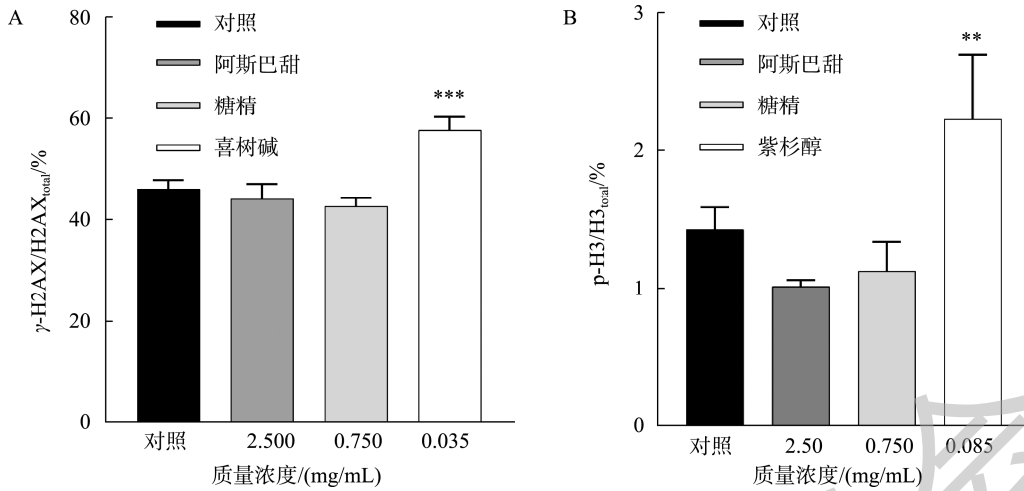
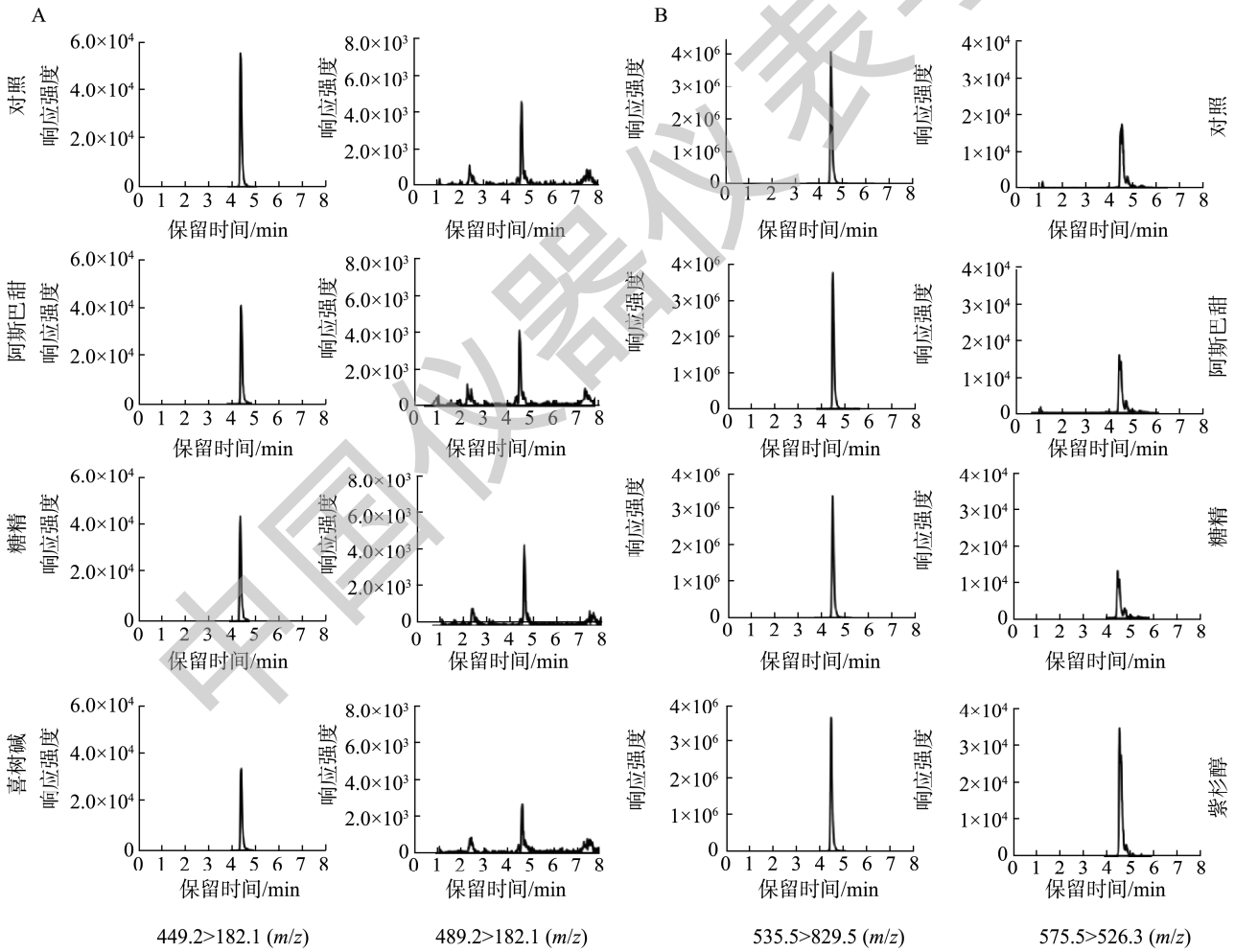


图4 阿斯巴甜和糖精亚急性暴露诱导HepG2细胞 γ -H2AX和p-H3表达水平的剂量效应分析

Fig.4 Dose effect analysis of subacute exposure to aspartame and saccharin induced γ -H2AX and p-H3 expression levels in HepG2 cells



注: A.ATQASQEY和ATQA(p)SQEY; B. KSTGGKAPR和KpSTGGKAPR。

图5 阿斯巴甜及糖精亚急性处理HepG2细胞ATQASQEY及ATQA(p)SQEY肽段和KSTGGKAPR及KpSTGGKAPR肽段定量离子对色谱图

Fig.5 Quantitative ion-pair chromatograms of ATQASQEY and ATQA(p)SQEY peptides and KSTGGKAPR and KpSTGGKAPR peptides from aspartame and saccharin subacutely treated HepG2 cells

2.3.1 受试化合物急性暴露后 γ -H2AX、p-H3、Rad51 和 p53 量效变化

本研究检测了阿斯巴甜和糖精诱导 HepG2 细胞产生 γ -H2AX 的量效变化, 计算每种暴露浓度下 γ -H2AX 的平均核荧光强度, 如图 6 所示, 阳性对照 0.1 μ mol/L 喜树碱诱导细胞 γ -H2AX 的荧光强度明显增强, 阿斯巴甜则在最高浓度时才诱导凋亡型 γ -H2AX 产生, 其表现为泛核型非分散的荧光焦点, 与阳性对照诱导呈现的均匀荧光染色不同, 并非由 DNA 损伤所造成^[25]。糖精则对 γ -H2AX 表达无影响。本研究亦分析了阿斯巴甜和糖精在 HepG2 细胞中诱导生成 p-H3 的量效关系, 结果表明阿斯巴甜和糖精均不能引起 p-H3 的显著增加。

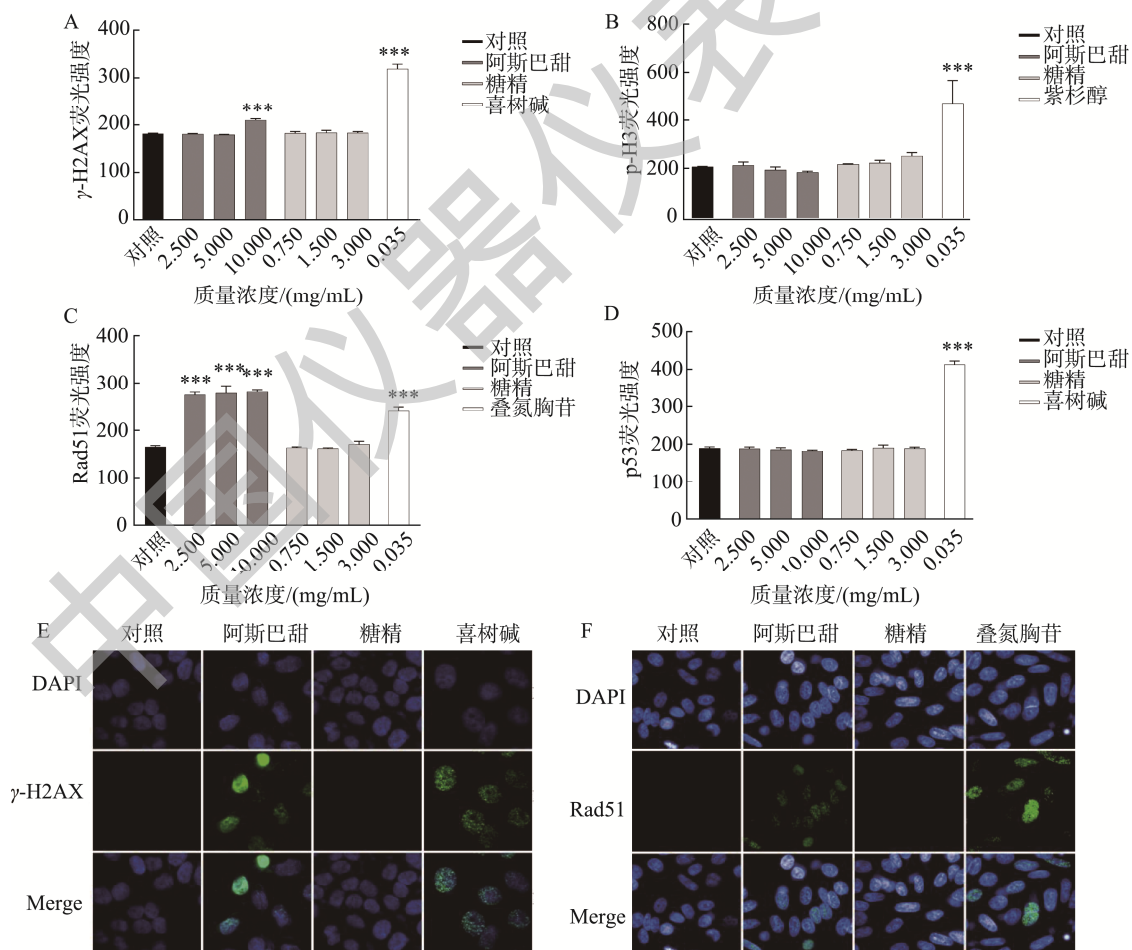
PANDURANGAN 等^[28]指出阿斯巴甜会引起 HeLa 细胞中 p53 肿瘤抑制基因和 bax 凋亡基因表达的降低, 减缓了癌细胞的凋亡过程。本研究将受试化合物暴露 A549 细胞 24 h 后, 检测 p53 的荧光强度。结果如图 6 所示, 与对照组相比, 阳性对照 0.1 μ mol/L 叠氮胸苷的 p53 荧光强度

明显增强; 阿斯巴甜和糖精则均不导致 p53 显著性增加。

对于 DNA 同源重组修复通路的主要生物标志物 Rad51^[29], 受试化合物暴露 Rad51-EGFP-SW480 细胞 24 h 后, 结果显示(图 6)阿斯巴甜会引起 Rad51-EGFP-SW480 细胞 Rad51 荧光强度的明显增加, 但无剂量依赖性; 糖精则对 Rad51 无影响。Rad51 是参与 DNA 损伤感应和细胞周期节点调控的关键分子, 有研究报道肿瘤细胞可优先依赖 HRR 通路修复 DNA 双链断裂^[14], 若细胞完成修复, 聚集在断裂位点的 Rad51 则解散, 其若持续存在则说明细胞始终停留在 DNA 损伤的应答修复阶段^[30]。本研究结果表明阿斯巴甜引起细胞损伤, 并激活 DNA 损伤修复应答。

2.3.2 受试化合物亚急性暴露后 γ -H2AX、p-H3、Rad51 和 p53 表达

阿斯巴甜 2.5 mg/mL 和糖精 0.75 mg/mL 分别暴露 HepG2、A549 和 Rad51-EGFP-SW480 细胞 7 d 后, 检测其对 γ -H2AX、p-H3、Rad51 和 p53 的影响, 结果如图 7 所示,



注: E. γ -H2AX代表性HCS图像; F. Rad51代表性HCS图像。

图6 阿斯巴甜和糖精暴露后细胞 γ -H2AX、p-H3、Rad51和p53量效变化及其代表性HCS图像

Fig.6 Dose-response changes and representative HCS images of γ -H2AX, p-H3, Rad51, and p53 in cells exposed to aspartame and saccharin

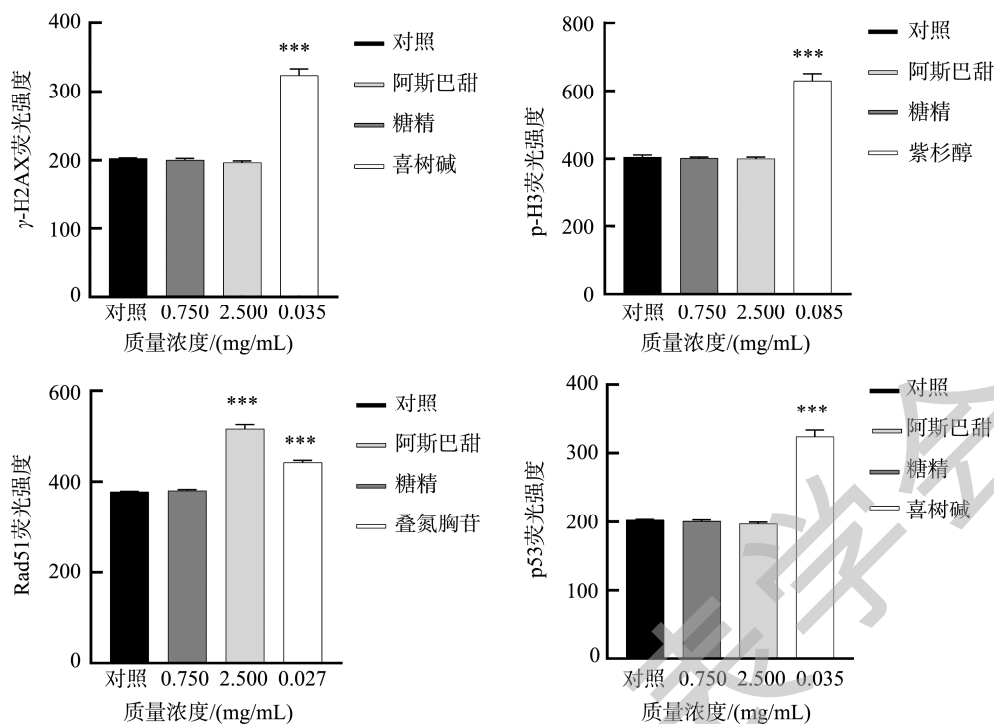


图7 阿斯巴甜和糖精亚急性孵育 γ -H2AX、p-H3、Rad51和p53变化

Fig.7 γ -H2AX, p-H3, Rad51 and p53 changes in cells after subacute incubation with aspartame and saccharin

阿斯巴甜和糖精均不会引起上述 3 种基因毒性生物标志物即 γ -H2AX、p-H3 和 p53 的显著性增加；但阿斯巴甜引起基因损伤修复标志物 Rad51 荧光强度的明显增强，但无剂量依赖性，而糖精对 Rad51 无影响。

3 结论

人工甜味剂的安全性一直存在争议，至今并不能证明其具有潜在基因毒性致癌风险。本研究主要探讨了阿斯巴甜和糖精两种常用甜味剂的体外基因毒性损伤潜力。采用 LC-MS/MS 技术定量评估了两种常用甜味剂阿斯巴甜和糖精在 HepG2 细胞中诱导生成的 γ -H2AX 和 p-H3；同时采用 HCS 技术分析了细胞 DNA 损伤修复途径相关生物标志物即 γ -H2AX、p-H3、Rad51 和 p53 的表达水平，并考察其量效和时效关系。结果表明阿斯巴甜会引起 Rad51 的显著增加，提示其激发了 DNA 损伤修复通路。两种体外测试方法的检测结果均表明阿斯巴甜和糖精无明显的 DNA 损伤基因毒性；然而为了确保人体健康，长期过量摄入人工甜味剂依然值得关注。

参考文献

- [1] 刘星, 蒙泳, 张言, 等. 食品中常见人工合成甜味剂的基本特征及其对生理代谢的影响[J]. 食品安全质量检测学报, 2021, 12(14): 5734–5741. LIU X, MENG Y, ZHANG Y, *et al.* Characteristics of common artificial sweeteners in food and their effects on physiological metabolism [J]. J

- Food Saf Qual, 2021, 12(14): 5734–5741.
- [2] CAROCHO M, MORALES P, FERREIRA ICFR. Sweeteners as food additives in the XXI century: A review of what is known, and what is to come [J]. Food Chem Toxicol, 2017, 107(Pt A): 302–317.
- [3] OTABE A, OHTA F, TAKUMI A, *et al.* Mutagenicity and genotoxicity studies of aspartame [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2019, 103: 345–351.
- [4] GOODMAN JE, BOON DN, JACK MM. Perspectives on recent reviews of aspartame cancer epidemiology [J]. Global Epidemiol, 2023, 3(6): 100117.
- [5] 柴梅梅, 侯磊磊, 加力, 等. 饮料中甜味剂的应用与食品安全[J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9(11): 2573–2577. CHAI MM, HOU LL, JIA L, *et al.* The application of sweeteners in beverages and food safety [J]. J Food Saf Qual, 2018, 9(11): 2573–2577.
- [6] 刘国信. 阿斯巴甜的安全性[J]. 防灾博览, 2024, (1): 70–73. LIU GX. Safety of aspartame [J]. Disast Prevent Expo, 2024, (1): 70–73.
- [7] 王子涵, 李喜泉, 杨巍巍. 阿斯巴甜的毒性及其合成影响因素的研究进展[J]. 沈阳医学院学报, 2018, 20(6): 562–564. WANG ZH, LI XQ, YANG WW. Research progress on the neurotoxicity and synthesis factors of aspartame [J]. J Shenyang Med Coll, 2018, 20(6): 562–564.
- [8] MCCULLOUGH ML, TERAS LR, SHAH R, *et al.* Artificially and sugar-sweetened carbonated beverage consumption is not associated with risk of lymphoid neoplasms in older men and women [J]. J Nutr, 2014, 144(12): 2041–2049.
- [9] ÇADIRCI K, ÖZDEMİR TÖ, TÜRKEZ H, *et al.* The *in vitro* cytotoxic, genotoxic, and oxidative damage potentials of the oral artificial sweetener aspartame on cultured human blood cells [J]. Turk J Med Sci, 2020, 50(2):

- 448–454.
- [10] 吴鹏, 张成云, 朱旭丽, 等. 人工甜味剂对人体的影响及国内外标准现状探讨 [J/OL]. [2023-08-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20230829.1912.016.html> [2024-04-26].
WU P, ZHANG CY, ZHU XL, *et al.* The influence of artificial sweetener on human body and the status quo of domestic and foreign [J/OL]. [2023-08-30]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2206.TS.20230829.1912.016.html> [2024-04-26].
- [11] QU M, XU H, CHEN J, *et al.* Distinct orchestration and dynamic processes on γ -H2AX and p-H3 for two major types of genotoxic chemicals revealed by mass spectrometry analysis [J]. *Chem Res Toxicol*, 2020, 33(8): 2108–2119.
- [12] PRABHU SK, KUTTIKRISHNAN S, AHAMAD N, *et al.* H2AX: A key player in DNA damage response and a promising target for cancer therapy [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 1: 175116663.
- [13] 黎青叶, 柳晓玲, 吴小嫩, 等. 组蛋白 H3(Ser10)磷酸化在维持肿瘤细胞恶性表型中的作用[J]. *癌变·畸变·突变*, 2018, 30(2): 81–86, 91.
LI QY, LIU XL, WU XN, *et al.* Histone H3 phosphorylation at Ser10 on maintenance of malignancy in tumor cells [J]. *Cancer Distort Mutat*, 2018, 30(2): 81–86, 91.
- [14] 郑云峰, 杨帆, 郭泽庚. 同源重组修复蛋白 Rad51 在癌症中的作用[J]. *生命的化学*, 2022, 42(10): 1874–1880.
ZHENG YF, YANG F, GUO ZG. Roles of homologous recombination repair protein Rad51 in cancer [J]. *Chem Life*, 2022, 42(10): 1874–1880.
- [15] BONILLA B. Rad51 gene family structure and function [J]. *Annual Rev Genet*, 2020, 54(1): 25–46.
- [16] LIU Y, SU Z, TAVANA O, *et al.* Understanding the complexity of p53 in a new era of tumor suppression [Z]. 2024.
- [17] 瞿敏敏, 陈佳, 徐斌, 等. 基于磷酸化组蛋白 H2AX 质谱定量分析的药品基因毒性杂质的毒效导向高通量筛查方法研究[J]. *分析化学*, 2021, 49(9): 1531–1539.
QU MM, CHEN J, XU B, *et al.* A toxic effect-directed screening method for genotoxic impurities in drugs based on mass spectrometry quantitative analysis of phosphorylated histone H2AX [J]. *Anal Chem*, 2021, 49(9): 1531–1539.
- [18] 瞿敏敏, 陈佳, 张雅姣, 等. 基于 γ -H2AX 检测的两种基因毒性体外测试方法的比较研究[J]. *分析化学*, 2021, 49(12): 2039–2047.
QU MM, CHEN J, ZHANG YJ, *et al.* Comparison of two *in vitro* genotoxicity testing methods based on γ -H2AX analysis [J]. *Anal Chem*, 2021, 49(12): 2039–2047.
- [19] 瞿敏敏. 组蛋白磷酸化修饰质谱分析揭示化合物基因毒性及其作用机制[D]. 北京: 军事科学院, 2021.
QU MM. Mass Spectrometry analysis of histone phosphorylation modification reveals genotoxicity and modes of action for chemicals [D]. Beijing: Academy of Military Sciences, 2021.
- [20] SMART DJ, AHMEDI KP, HARVEY JS, *et al.* Genotoxicity screening via the γ -H2AX by flow assay [J]. *Mutat Res*, 2011, 715(1-2): 25–31.
- [21] BANDYOPADHYAY A, GHOSHAL S, MUKHERJEE A. Genotoxicity testing of low-calorie sweeteners: Aspartame, acesulfame-K, and saccharin [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2008, 31(4): 447–457.
- [22] ALSUHAIBANI ES. *In vivo* cytogenetic studies on aspartame [J]. *Comp Funct Genom*, 2010, 2010: 605921.
- [23] KIRKLAND D, GATEHOUSE D. Aspartame: A review of genotoxicity data [J]. *Food Chem Toxicol*, 2015, 84: 161–168.
- [24] RENCÜZOĞULLARI E, TÜYLÜ BA, TOPAKTAŞ M, *et al.* Genotoxicity of aspartame [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2004, 27(3): 257–268.
- [25] 瞿敏敏, 陈佳, 郭磊, 等. DNA 损伤标志物 γ -H2AX 及其在毒性测试应用中的研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2021, 35(6): 401–411.
QU MM, CHEN J, GUO L, *et al.* Advances in DNA damage marker γ -H2AX and its toxicity testing applications [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2021, 35(6): 401–411.
- [26] ASHBY J. The genotoxicity of sodium saccharin and sodium chloride in relation to their cancer-promoting properties [J]. *Food Chem Toxicol*, 1985, 23(4-5): 507–519.
- [27] WHYSNER J, WILLIAMS GM. Saccharin mechanistic data and risk assessment: Urine composition, enhanced cell proliferation, and tumor promotion [J]. *Pharmacol Ther*, 1996, 71(1-2): 225–252.
- [28] PANDURANGAN M, ENKHTAIVAN G, MISTRY B, *et al.* Investigation of role of aspartame on apoptosis process in HeLa cells [J]. *Saudi J Biol Sci*, 2016, 23(4): 503–506.
- [29] THOMAS M, DUBACQ C, RABUT E, *et al.* Noncanonical roles of RAD51 [J]. *Cells*, 2023, 12(8): 1169.
- [30] 田岷, 陈显凌, 庄英婷, 等. BMS-345541 对急性粒细胞白血病细胞 DNA 损伤修复的影响[J]. *中国药理学通报*, 2015, 31(6): 763–769.
TIAN J, CHEN XL, ZHUANG YT, *et al.* BMS-345541 regulates repair of DNA double-strand breaks induced by VP-16 in acute myeloid leukemia cells [J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2015, 31(6): 763–769.

(责任编辑: 于梦娇 蔡世佳)

作者简介



高鹏霞, 硕士研究生, 主要研究方向为药物分析。

E-mail: gaopengxia00@163.com



赵晓童, 硕士研究生, 主要研究方向为药物分析。

E-mail: zxt17L0152066@163.com



徐华, 副研究员, 主要研究方向为药物毒物分析。

E-mail: huarxu@163.com



陈爱兵, 教授, 主要研究方向为能源材料。

E-mail: chen_ab@163.com