

茜素型蒽醌化合物体外 *Pig-a* 基因突变性试验研究

闫明, 叶倩, 王雪, 汪祺*, 文海若*

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要: 目的 对具有相同母核结构的7种茜素型蒽醌化合物开展体外 *Pig-a* 基因突变试验, 分析不同茜素型蒽醌化合物取代基结构与其致突变性的关联。方法 小鼠淋巴瘤细胞 L5178Y (*tk⁺*-3.7.2.C) 分别与系列浓度的茜草素、异茜草素、甲基异茜草素、羟基茜草素、甲基异茜草素-1-甲醚、茜草素-1-甲醚和光泽汀作用 4 h (有 S9) 或 24 h (无 S9), 给药 24 h 后应用细胞计数仪进行计数, 计算细胞相对倍增速率 (RPD) 评价受试物细胞毒性; 细胞培养 8 d 后经 APC-anti-CD45 和 PE-anti-CD90.2 抗体孵育后, 使用流式细胞仪检测细胞突变 (CD45⁺CD90.2⁺) 率。结果 所有受试物在有或无代谢活化条件下所设浓度组 RPD 均大于 50%, 未见明显细胞毒性作用, 可排除试验中假阳性结果。在无 S9 代谢活化条件下, 光泽汀 (16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组、羟基茜草素 (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组、甲基异茜草素-1-甲醚 (31.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组 *Pig-a* 基因突变率与溶媒对照组比较显著升高 ($P<0.05, 0.01, 0.001$); 在有 S9 代谢活化条件下, 光泽汀 (4.8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、羟基茜草素 (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、茜草素-1-甲醚 (3.75、15.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、甲基异茜草素 (12.5、25.0、50.0、100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、甲基异茜草素-1-甲醚 (15、30、60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、异茜草素 (2.50、5.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 组 *Pig-a* 基因突变率与溶媒对照组比较显著升高 ($P<0.05, 0.01, 0.001$)。结论 羟基取代基所在位点是茜素型蒽醌化合物致突变性强弱的决定性因素, 其体内致突变性有待进一步确证。

关键词: 茜素型蒽醌; 致突变性; L5178Y 细胞; 体外 *Pig-a* 基因突变试验; 茜草素; 异茜草素; 甲基异茜草素; 羟基茜草素; 甲基异茜草素-1-甲醚; 茜草素-1-甲醚; 光泽汀

中图分类号: R994 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 07-1227-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.07.002

Mutagenic risk evaluation of alizarin-type anthraquinone using *in vitro* *Pig-a* mutation assay

YAN Ming, YE Qian, WANG Xue, WANG Qi, WEN Hairuo

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

Abstract: **Objective** *Pig-a* gene mutation assay was carried out on seven alizarin type anthraquinone compounds with the same parent nuclear structure *in vitro* and the relationship between the substituent structure and the mutagenicity were analysed. **Methods** Alizarin, xanthopurpurin, rubiadin, purpurin, rubiadin -1-methyl, alizarin -1-methyl and lucidin were treated on mouse lymphoma cell L5178Y (*tk⁺*-3.7.2.C) for 4 hours (-S9) or 24 hours (+S9). Cell counting plate was used to count 24 h after administration, and the relative cell multiplication rate (RPD) was calculated to evaluate the cytotoxicity of the tested samples. Cells were cultured for 8 days and APC anti-CD45 antibody/PE-anti-CD90.2 antibody were used to detected mutant cells (CD45⁺CD90⁺) by flow cytometry. **Results** The RPD of all tested substances in the concentration group with or without metabolic activation was greater than 50%, and no obvious cytotoxicity was observed, so false positive results in the test could be excluded. In the absence of S9, the mutant cells (CD45⁺CD90.2⁺) were significantly increased by lucidin (16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), purpurin (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and rubiadin-1-methyl ether (31.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) compared with solvent control group. In the presence of S9 metabolic activation, the mutation rate of *Pig-a* gene in lubutin (4, 8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), hydroxyl alizarin (10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), alizarin-1-methyl ether (3.75, 15.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), methylisocalizarin (12.5, 25.0, 50.0, 100.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), methylisomadicin-1-methyl ether (15, 30, 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and isomadicin (2.50, 5.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) groups was significantly higher than that in solvent control group ($P<0.05, 0.01, 0.001$). **Conclusion** The location of hydroxyl substituents is a decisive factor in the mutagenicity of alizarin type anthraquinone compounds, while their *in vivo* mutagenicity need to be further investigated.

收稿日期: 2022-04-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503347); 国家“十三五”“重大新药创制”专项 (2018ZX09201017)

第一作者: 闫明, 男, 硕士, 研究方向为遗传毒理。E-mail: yanming0120@sina.com

*共同通信作者: 文海若, 女, 博士, 研究员, 研究方向为遗传毒理。E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

汪祺, 女, 博士, 研究员, 研究方向为中药毒理。E-mail: sansan8251@sina.com

Key words: alizarin-type anthraquinone; mutagenicity; L5178Y cell; *in vitro* Pig-a gene mutation assay; alizarin; xanthopurpurin; rubiadin; purpurin; rubiadin -1-methyl; alizarin -1-methyl; lucidin

茜素型蒽醌是一类以9,10-蒽醌为母核且取代基在同一侧苯环的蒽醌类化合物(图1),包括茜草素、异茜草素、甲基异茜草素、羟基茜草素等。该类化合物具有抗炎、抗肿瘤、抗氧化等多种药理学活性^[1-2]。茜草素在小鼠模型中具有降血糖、提高胰岛素抵抗作用^[3];羟基茜草素通过减少氧化应激压力产生抗炎活性,并能够通过血脑屏障,具有神经保护作用,以及通过抑制细胞色素酶P450酶系展现出抗突变性^[4];Wang等^[5]利用胰岛素作为模型蛋白,发现茜草素和羟基茜草素具有抑制胰岛素纤维化,降低淀粉样蛋白诱导的细胞毒性作用;此外,甲基异茜草素和甲基异茜草素-1-甲醚可通过阻断核因子 κ B(NF- κ B)通路,减少热带念珠菌生物膜的形成,抑制破骨细胞骨吸收^[6]。

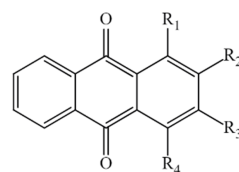
然而也有文献报道茜素型蒽醌化合物具有致突变风险。1-羟基蒽醌在2002年被国际癌症研究机构(IARC)列为2B类致癌物;光泽汀在细菌回复突变试验中能够导致多种菌株发生回复突变,且在哺乳动物细胞V79突变试验中呈阳性结果^[7];小鼠4 dig给药光泽汀($2\text{ mg}\cdot\text{d}^{-1}$),动物肝脏、肾脏以及结肠分别产生组织特异性DNA加合物^[8];一项F344雌性大鼠2年致癌性实验中发现茜草素和甲基异茜草素可导致肾脏发生癌前病变,后者产生的影响更大并同时作用于肝脏和结肠^[9]。

当前由于蒽醌母核化合物众多且缺少实验数据支持,毒理学预测软件通过结构效应关系以及数据库分析,根据该类化合物存在羟基蒽醌结构以及蒽-9,10-二醇前体结构,推断同类所有化合物均具有致突变风险。目前关于茜素型蒽醌化合物的致突变性研究主要基于细菌回复突变试验,然而由于细菌与哺乳动物细胞的代谢体系不同,产生不同的代谢产物,导致实验结果可能出现偏差,因此有必要通过哺乳动物致突变性评价方法对化合物的致突变风险进行研究。本课题组前期在国内首次建立并验证基于小鼠淋巴瘤(L5178Y $tk^{+/-}$ -3.7.2C)细胞的体外Pig-a基因突变试验^[10],本实验应用Pig-a基因突变试验,对7种存在于茜草科植物中的蒽醌化合物进行体外致突变性分析。

1 材料

1.1 主要试剂

茜草素(批号 T23J10T80571,质量分数 >



化合物	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
茜草素	OH	OH	H	H
异茜草素	H	OH	H	OH
甲基异茜草素	OH	CH ₃	OH	H
羟基茜草素	OH	H	OH	OH
甲基异茜草素-1-甲醚	OCH ₃	CH ₃	OH	H
茜草素-1-甲醚	OCH ₃	OH	H	H
光泽汀	OH	CH ₂ OH	OH	H

图1 茜素型蒽醌化合物母核结构及取代基信息

Fig. 1 Core structure and substituents of alizarin-type anthraquinone compounds

95%)、甲基异茜草素(批号 w27A10z96220,质量分数 >95%)、甲基异茜草素-1-甲醚(批号 W13J11Z108210,质量分数 >95%)、茜草素-1-甲醚(批号 P16J11S108411,质量分数 >95%)、羟基茜草素(批号 Y24A8H42410,质量分数 >95%)及光泽汀(批号 S1ZD11D134341,质量分数 >95%),均购自上海源叶生物科技有限公司;异茜草素(批号 wkq19120903,质量分数 >95%)购自上海扶生实业有限公司;二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Merck 公司;大鼠肝 S9 混合液购自北京康瑞杰科技有限公司;甲基磺酸乙酯(EMS,批号 126K0758)、苯并芘[B(a)P,批号 SLBF45532]均购自美国 Sigma 公司;APC Anti-mouse-CD45, PE Anti-mouse-CD90.2 antibody 购自美国 BD Biosciences;RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司。

1.2 仪器

NTS-1300 水浴摇床(东京理化器械株式会社);NU-543-400S 生物安全柜(美国 Nuair 公司);HERA cell VIOS 160i 二氧化碳培养箱(赛默飞世尔科技公司);CKX31 倒置显微镜(日本 Nikon 公司);Countess FL 全自动细胞计数仪(赛默飞世尔科技公司)。

1.3 细胞

小鼠淋巴瘤细胞 L5178Y($tk^{+/-}$ -3.7.2C),引自日本国立医药品食品卫生研究所,支原体检查后于液

氮长期保存,研究所用细胞为复苏传代后10代以内。将L5178Y细胞解冻复苏后置于完全培养基R10(含10%马血清、1%青链霉素混合液、0.2 mg·kg⁻¹丙酮酸钠的RPMI 1640培养基)在37℃、5% CO₂的培养箱内培养,培养基隔天更换,待细胞增殖至适宜密度后进行实验。

2 方法

2.1 体外 *Pig-a* 基因突变试验

2.1.1 连续(24 h)处理(无S9) 细胞达对数生长期后,更换R0培养基(含1%青链霉素混合液、0.2 mg·mL⁻¹丙酮酸钠的RPMI 1640培养基),调整细胞密度为5×10⁵·mL⁻¹于10 mL培养基中,分别添加不同浓度的茜素型蒽醌类化合物(茜草素2、4、8、16 μg·mL⁻¹,羟基茜草素1.25、2.50、5.00、10.00 μg·mL⁻¹,异茜草素1.25、2.50、5.00 μg·mL⁻¹,甲基异茜草素20、40、100、200 μg·mL⁻¹,甲基异茜草素-1-甲醚7.5、15.0、30.0、60.0 μg·mL⁻¹,茜草素-1-甲醚3.25、7.50、15.00、30.00 μg·mL⁻¹,光泽汀4、8、16 μg·mL⁻¹),阳性对照EMS(100 μg·mL⁻¹)及溶剂对照(1% DMSO)。细胞于37℃、5% CO₂条件下与受试物作用24 h。处理结束后收集细胞并使用细胞计数仪进行细胞计数,每个样本计数2次,保证变异系数(CV)值小于30%,否则重新计数。细胞经1 000 r·min⁻¹离心5 min, PBS洗涤2次,重悬于10 mL完全培养基R10。细胞表达8 d,表达期细胞密度维持在1.0×10⁶~2.0×10⁶·mL⁻¹。

2.1.2 短时(4 h)处理(有S9) 细胞达对数生长期后,更换R0培养基(同“2.1.1”项),调整细胞密度为5×10⁵·mL⁻¹于50 mL离心管中,分别添加不同浓度的茜素型蒽醌类化合物(茜草素2、4、8、16 μg·mL⁻¹,羟基茜草素1.25、5.00、10.00 μg·mL⁻¹,异茜草素1.25、2.50、5.00 μg·mL⁻¹,甲基异茜草素12.5、25.0、50.0、100.0 μg·mL⁻¹,甲基异茜草素-1-甲醚15、30、60 μg·mL⁻¹,茜草素-1-甲醚3.25、15.00、30.00 μg·mL⁻¹,光泽汀2、4、8 μg·mL⁻¹),阳性对照B(a)P(4.0 μg·mL⁻¹)及溶剂对照(1% DMSO)。各组均加入2% S9混合液,37℃、20 r·min⁻¹振摇4 h后,细胞经1 000 r·min⁻¹离心5 min, PBS洗涤2次,重悬于10 mL完全培养基R10。24 h后,使用全自动细胞计数仪进行细胞计数。细胞继续培养表达8 d,表达期细胞密度维持在1.0×10⁶~2.0×10⁶·mL⁻¹。

2.1.3 细胞毒性 以细胞相对倍增速率(relative population doubling, RPD)评价受试物细胞毒性。

给药24 h后细胞倍增速率(PD)=lg(处理后细胞量/初

始细胞量)/lg2

RPD=受试物组PD/溶剂对照组PD

2.1.4 流式细胞术检测突变率 取2×10⁶个细胞,4℃、1 000 r·min⁻¹离心5 min,弃上清,每浓度组加5 mL工作液[含有2%胎牛血清的PBS],混匀后4℃、1 000 r·min⁻¹离心5 min。吸弃上清液,每孔加入200 μL APC-anti-CD45、PE-anti-CD90.2混合工作液,终质量浓度为1 μg·mL⁻¹,重悬细胞并混合均匀。将细胞置于2~8℃避光孵育30 min后,置于室温继续孵育10 min。孵育结束后,重悬细胞悬液后转移至5 mL工作液中,4℃、340×g离心3 min。吸弃上清液,加入300 μL工作液,混合均匀后转入流式管中上机检测。突变型细胞表面无CD90.2蛋白,CD45蛋白正常表达,故在流式图中显示无PE荧光,APC正常。

2.2 数据处理

数据采用GraphpadPrism 7(USA, Graphpad Software公司)进行统计分析,采用One Way ANOVA检验将各受试物组的突变率与溶媒对照组作比较。阳性对照组L5178Y细胞突变率通常是溶媒对照组2倍及以上。

3 结果

3.1 细胞毒性

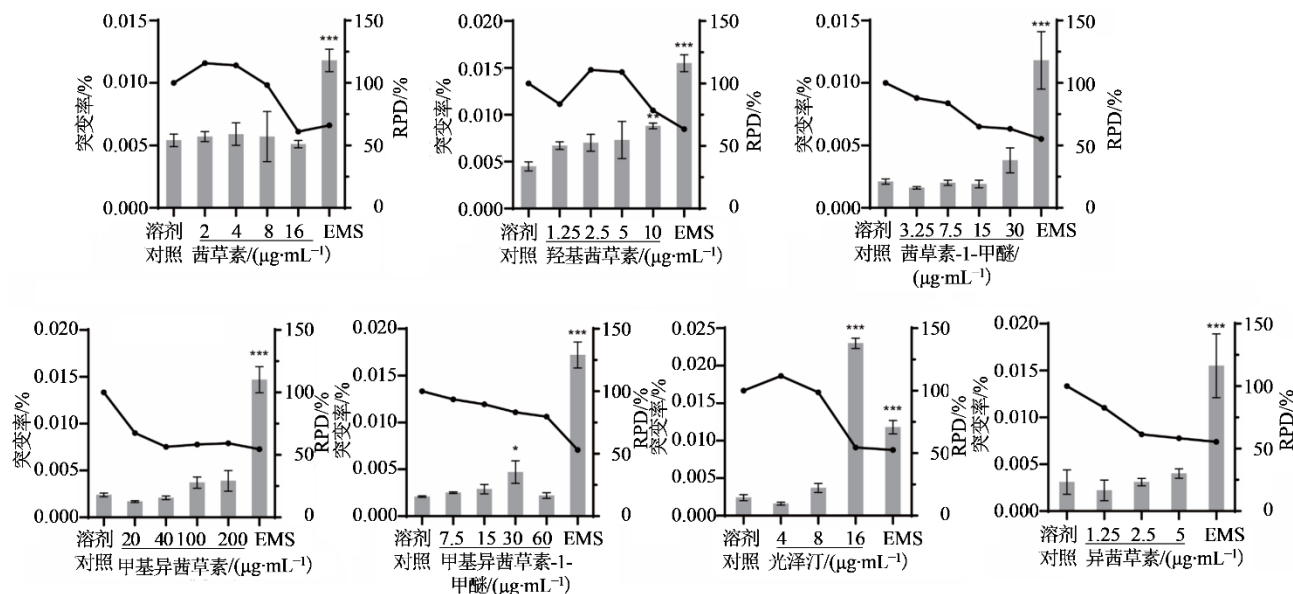
茜素型蒽醌化合物给药后24 h(无S9)或4 h(有S9)后的RPD数据如图2、3所示。所有受试物无论在有或无S9代谢活化条件下所设浓度组RPD均大于50%。提示在给药浓度范围内,所有受试物均无明显细胞毒性作用^[11]。

3.2 茜素型蒽醌对 *Pig-a* 基因突变率的影响

使用流式细胞仪识别各处理样品中CD90⁺/CD45⁺细胞(突变细胞),分析细胞突变率,流式图例见图4。

非S9代谢活化条件下,茜素型蒽醌类化合物给药24 h后,表达8 d时 *Pig-a* 基因突变率如图2所示,光泽汀(16 μg·mL⁻¹)组、羟基茜草素(10 μg·mL⁻¹)组、甲基异茜草素-1-甲醚(30 μg·mL⁻¹)组 *Pig-a* 基因突变率与溶媒对照组比较显著升高($P<0.05$ 、0.01、0.001)。

S9代谢活化条件下,茜素型蒽醌类化合物给药4 h后表达8 d时 *Pig-a* 基因突变率如图3所示,光泽汀(4、8 μg·mL⁻¹)、羟基茜草素(10 μg·mL⁻¹)、茜草素-1-甲醚(3.25、15.00 μg·mL⁻¹)、甲基异茜草素(12.5、25.0、50.0、100.0 μg·mL⁻¹)、甲基异茜草素-1-甲醚(15、30、60 μg·mL⁻¹)、异茜草

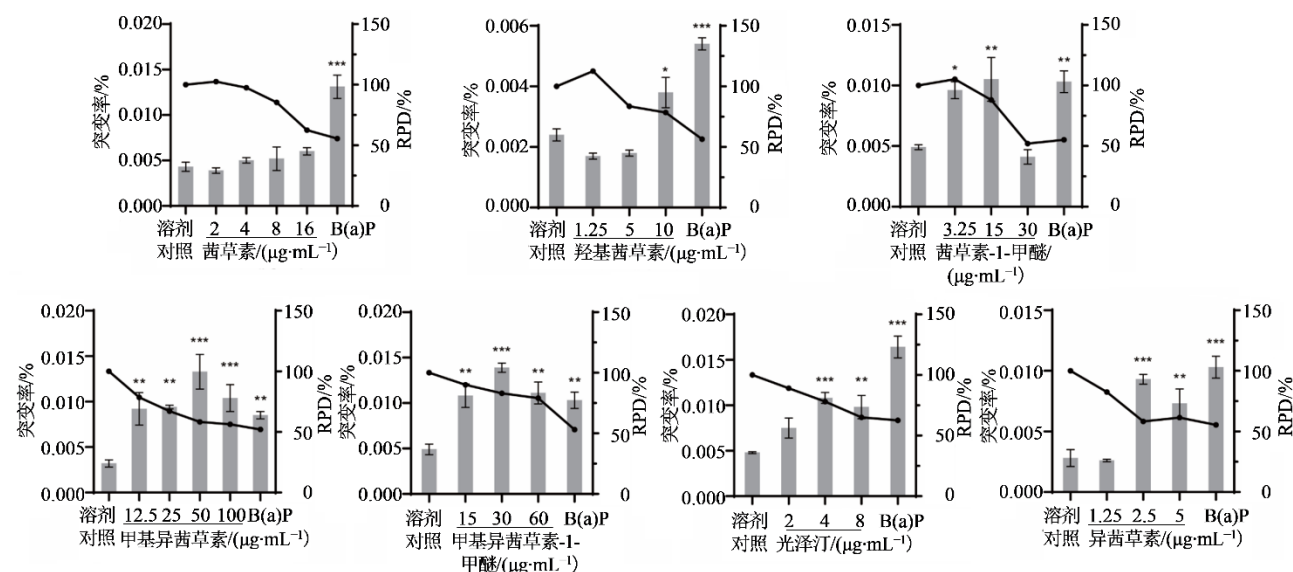


折线图-RPD;柱状图-突变率;与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

line chart-RPD; histogram-mutation rate; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs solvent control group

图2 非S9代谢状态下茜素型蒽醌对L5178Y细胞毒性及*Pig-a*基因突变率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 2 Effect of alizarin type anthraquinone on L5178Y cytotoxicity and *Pig-a* mutation rate without S9 metabolism ($\bar{x} \pm s, n=3$)



折线图-RPD;柱状图-突变率;与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

line chart-RPD; histogram-mutation rate; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs solvent control group

图3 S9代谢状态下茜素型蒽醌对L5178Y细胞毒性及*Pig-a*基因突变率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

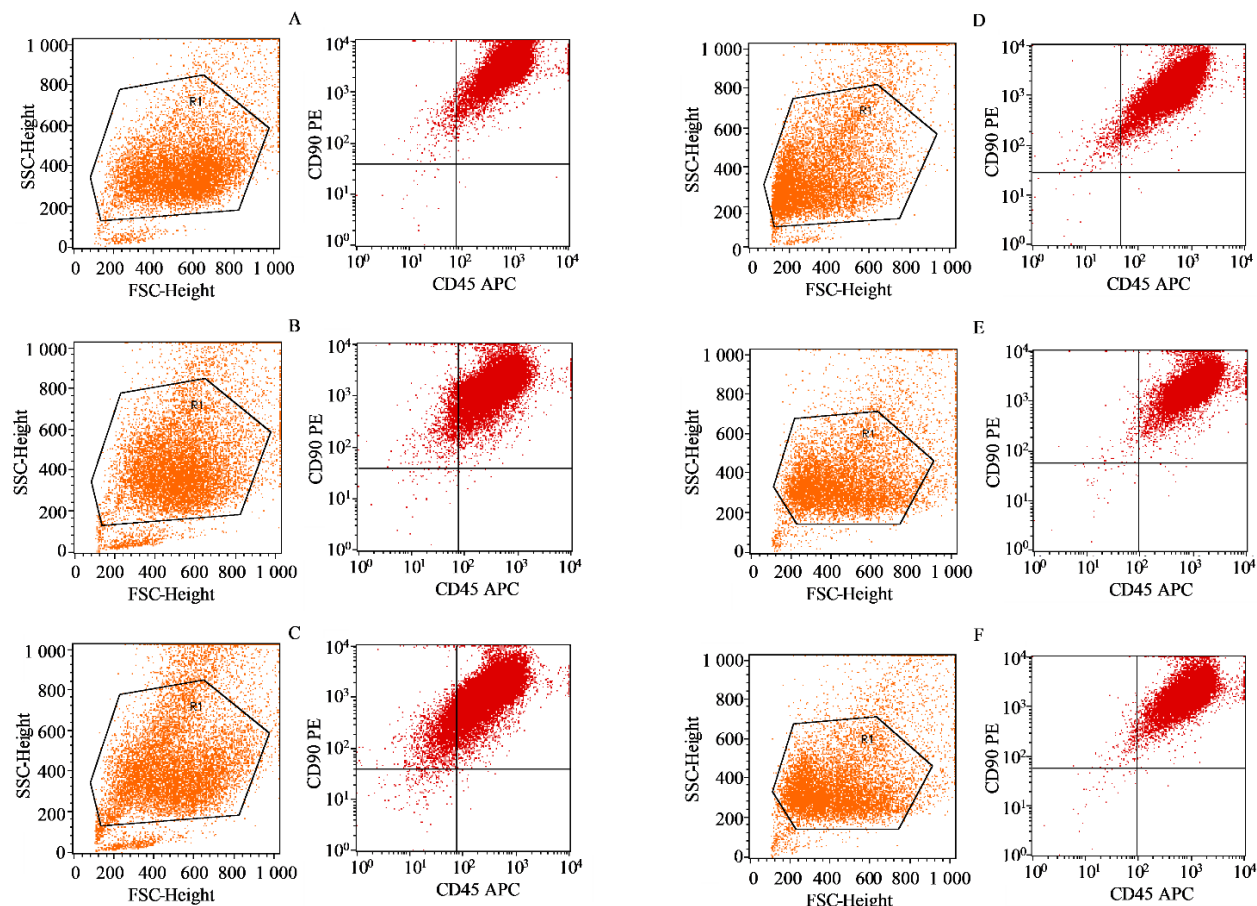
Fig. 3 Effect of alizarin type anthraquinone on L5178Y cytotoxicity and *Pig-a* mutation rate in S9 metabolism ($\bar{x} \pm s, n=3$)

素(2.50、5.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)组*Pig-a*基因突变率与溶媒对照组比较显著升高($P < 0.05, 0.01, 0.001$)。

4 讨论

哺乳动物细胞*Pig-a*基因突变实验是一种检测基因突变的体外遗传毒性评价方法^[12],通过抗体对突变细胞进行细胞表面分子标记,进行流式细胞术分析检测细胞的突变率。与编码次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶的*Hprt*基因突变实验以及*Tk*基因突变

实验相比具有高通量、试验周期短、特异性强的特点。体外*Pig-a*基因突变实验目前最常用的细胞系包括小鼠淋巴瘤细胞L5178Y*Tk*⁺3.7.2C^[13],人成淋巴瘤母细胞系TK6^[14]和与之同源的人淋巴瘤细胞MCL5^[15]。L5178Y细胞具有2个P53基因突变位点^[16],生长繁殖较快,经过全基因组测序表明该细胞系没有与*Pig-a*基因相关的有害突变^[17],且自身突变背景值较低因此检测前不需要进行分选,因此



24 h处理组:A-溶剂对照、B-阳性对照、C-光泽汀($16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); 4 h处理组:D-溶剂对照、E-阳性对照、F-茜素-1-甲醚($15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); 右下象限为突变细胞, 突变率=右下象限细胞数/(右下象限细胞数+右上象限细胞数)

24 h treatment group: A-solvent control, B-positive control group, and C-lucetin ($16 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); 4 h treatment group: D-solvent control group, E-positive control group, and F-alizarin-1-methyl ether ($15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); lower right quadrant represents the number of mutant cells, mutation rate = number of cells in lower right quadrant / (number of cells in lower right quadrant + number of cells in upper right quadrant)

图4 体外 *Pig-a* 基因突变流式图例

Fig. 4 *In vitro* *Pig-a* gene mutation flow chart

很适用于体外 *Pig-a* 基因突变实验。但由于其缺乏代谢酶, 实验时需添加额外的代谢酶系统。TK6 细胞是人源 *P53* 基因野生型细胞, 由于该细胞具有的 *Pig-l* 基因自发突变同样会导致糖基化磷脂酰肌醇(GPI)合成缺失, 导致实验背景值较高, 因此在使用该细胞系进行实验时需预先通过磁珠分选等方法将自发突变细胞进行分离, 并且该细胞系同样需要添加代谢酶系统。现有的实验数据表明 TK6 细胞较 L5178Y 细胞, 对受试物的耐受度更低, 且细胞突变率更高, 这可能是因为 TK6 细胞可同时检测 *Pig-a* 和 *Pig-l* 2 种基因突变类型所导致^[18]。另外, 人淋巴瘤细胞 MCL5 含有代谢酶, 因此在实验过程中不需要额外添其他代谢酶系统, 具有较好的应用前景。本实验选用遗传背景清晰、实验周期较短的 L5178Y 细胞, 经过课题组的验证和优化符合实验要求。当前由于哺乳动物细胞 *Pig-a* 基因突变检测方法缺乏标准化操作流程以及实验数据支持, 因此

仍需要进行大量的实验验证结合理论支持, 来明确该方法的重复性、适用范围以及影响因素。

本研究基于 L5178Y 细胞 *Pig-a* 基因突变实验对 7 种茜素型蒽醌化合物进行体外致突变性研究, 结果表明该类化合物对哺乳动物细胞具有致突变性, 其中 R_1 或 R_4 位点羟基取代和 R_2 及 R_3 位的取代基团类型是决定茜素型蒽醌化合物致突变性的重要因素(图 5)。当 R_2 及 R_3 位存在如羟基、甲氧基等取代基时该类化合物致突变性减弱; 当 R_2 及 R_3

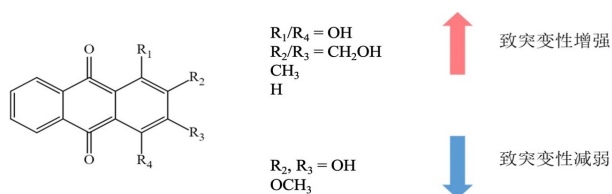


图5 茜素型蒽醌结构与致突变性关系

Fig. 5 Relationship between structure and mutagenicity of alizarin-type anthraquinone

位为甲基、羟甲基时(如光泽汀、甲基异茜草素),致突变性增加。当加入S9代谢活化系统后,该类化合物的致突变性增强,推断茜草素型蒽醌经I相代谢反应,通过氧化还原使R₂位或R₃位原本的甲基或羟甲基等易形成亲电中间体的基团形成苄基碳正离子,进而与DNA相互作用形成加合物,导致碱基突变。

尽管茜素型蒽醌类经不同基团及不同位点修饰后,其致突变性强弱发生改变,但其致突变性及致癌性作用仍需进行体内研究证实。

本研究揭示了茜素型蒽醌化合物的体外致突变性与结构上的关系,为茜素型蒽醌化合物及在结构上相似化合物的致突变性研究提供策略,为含茜素型蒽醌化合物的药物开发和药物临床监管提供数据支撑和参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wu W J, Yan R, Li T, et al. Pharmacokinetic alterations of rhubarb anthraquinones in experimental colitis induced by dextran sulfate sodium in the rat [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 198: 600-607.
- [2] Tian W, Wang C M, Li D R, et al. Novel anthraquinone compounds as anticancer agents and their potential mechanism [J]. Future Med Chem, 2020, 12(7): 627-644.
- [3] Xu L T, Xing M M, Xu X Q, et al. Alizarin increase glucose uptake through PI3K/Akt signaling and improve alloxan-induced diabetic mice [J]. Future Med Chem, 2019, 11(5): 395-406.
- [4] Singh J, Hussain Y, Luqman S, et al. Purpurin: A natural anthraquinone with multifaceted pharmacological activities [J]. Phytother Res, 2021, 35(5): 2418-2428.
- [5] Wang W, Zhang J X, Qi W, et al. Alizarin and purpurin from *Rubia tinctorum* L. suppress insulin fibrillation and reduce the amyloid-induced cytotoxicity [J]. ACS Chem Neurosci, 2021, 12(12): 2182-2193.
- [6] He Y Q, Zhang Q, Shen Y, et al. Rubiadin-1-methyl ether from *Morinda officinalis* How. inhibits osteoclastogenesis through blocking RANKL-induced NF- κ B pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 506(4): 927-931.
- [7] Chulasiri M, Matsushima T, Yoshihira K. Activation of lucidin-3-O-primveroside mutagenicity by hesperidinase [J]. Phytother Res, 1995, 9(6): 421-424.
- [8] Poginsky B, Westendorf J, Blömeke B, et al. Evaluation of DNA-binding activity of hydroxyanthraquinones occurring in *Rubia tinctorum* L. [J]. Carcinogenesis, 1991, 12(7): 1265-1271.
- [9] Inoue K, Yoshida M, Takahashi M, et al. Carcinogenic potential of alizarin and rubiadin, components of madder color, in a rat medium-term multi-organ bioassay [J]. Cancer Sci, 2009, 100(12): 2261-2267.
- [10] 王亚楠, 文海若, 王雪. 基于L5178Y细胞体外Pig-a基因突变试验方法的建立与初步探索 [J]. 生物技术通报, 2020, 36(1): 220-228.
Wang Y N, Wen H R, Wang X. Establishment and preliminary exploration of *in vitro* Pig-a gene mutation assay based on L5178Y cells [J]. Biotechnol Bull, 2020, 36(1): 220-228.
- [11] Greenwood S K, Hill R B, Sun J T, et al. Population doubling: A simple and more accurate estimation of cell growth suppression in the *in vitro* assay for chromosomal aberrations that reduces irrelevant positive results [J]. Environ Mol Mutagen, 2004, 43(1): 36-44.
- [12] Castel P, Carcopino X, Robert S, et al. The Pig-a gene as a new biomarker of mutagenesis: Proof of concept and technical specifications [J]. Med Sci (Paris), 2017, 33(4): 432-439.
- [13] Labash C, Bryce S, Bemis J, et al. Development of an *in vitro* Pig-a gene mutation assay based on L5178Y cells and the surface markers CD90 and CD45 [J]. Environ Mol Mutagen, 2015, 56: S53.
- [14] Krüger C T, Fischer B M, Armant O, et al. The *in vitro* Pig-a gene mutation assay: Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-related genotype-to-phenotype relationship in TK6 cells [J]. Arch Toxicol, 2016, 90(7): 1729-1736.
- [15] Rees B J, Tate M, Lynch A M, et al. Development of an *in vitro* Pig-a gene mutation assay in human cells [J]. Mutagenesis, 2017, 32(2): 283-297.
- [16] Storer R D, Kraynak A R, McKelvey T W, et al. The mouse lymphoma L5178Y Tk^{+/+} cell line is heterozygous for a Codon 170 mutation in the p53 tumor suppressor gene [J]. Mutat Res, 1997, 373(2): 157-165.
- [17] Bemis J C, Avlasevich S L, Labash C, et al. Glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchored protein deficiency serves as a reliable reporter of Pig-a gene Mutation: Support from an *in vitro* assay based on L5178Y/Tk^{+/+} cells and the CD90.2 antigen [J]. Environ Mol Mutagen, 2018, 59(1): 18-29.
- [18] Nicklas J A, Carter E W, Albertini R J. Both PIGA and PIGL mutations cause GPI-a deficient isolates in the Tk6 cell line [J]. Environ Mol Mutagen, 2015, 56(8): 663-673.

[责任编辑 兰新新]