

染料苏丹红的高通量致突变性筛选

汪 祺, 王亚楠, 颜玉静, 宋 捷, 鄂 蕊, 胡燕平*, 文海若*, 马双成

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要: 目的 初步建立 Ames 波动试验酶标仪结果判定标准, 并对染料苏丹红 I~IV 的 DNA 碱基突变风险进行评价。方法 不同浓度的阳性对照 2- (2-呋喃基) -3- (5-硝基-2-呋喃基) 丙烯酰胺 (AF-2)、2-氨基蒽 (2-AA) 分别作用于鼠伤寒沙门氏菌 TA98 和 TA100 后, 分别经人工识别或用酶标仪在 492 和 623 nm 波长下进行读数, 确立基于吸光度的阳性孔判定标准。无或有代谢活化 ($-S_0$) 条件下使用鼠伤寒沙门氏菌 TA98 和 TA100 开展基于 96 孔液态培养法的细菌回复性突变试验, 苏丹红 I~IV 终浓度分别为 0.625、1.250、2.500、5.000 和 10.000 $\mu\text{g/mL}$ 。结果 非 S_0 代谢条件下酶标仪读板结果与人工计数结果一致性达 98.1%, S_0 代谢条件下酶标仪读数与菌落生长情况无法建立良好关联。在非代谢活化条件下, 苏丹红 I 与 IV 对 TA98 的致突变性作用相对较弱; 苏丹红 I~IV 对 TA100 存在明显的致突变性作用, 并呈一定的浓度相关性。在 S_0 代谢活化条件下, 苏丹红 III 对 TA98 和 TA100 均未见致突变作用; 苏丹红 I 在最高浓度 10 $\mu\text{g/mL}$ 时对 2 者均有明显的致突变作用, 苏丹红 IV 浓度高于 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、苏丹红 II 浓度高于 5 $\mu\text{g/mL}$ 时, 对 2 者致突变作用均显著。结论 首次使用 Ames 波动试验检出苏丹红 I~IV 的基因突变风险, 吸光度读数可在非 S_0 代谢条件下准确判断 Ames 波动试验结果, 为染料的高通量遗传毒性筛选奠定基础。

关键词: 苏丹红; 高通量; 基因突变; 波动 Ames 试验; 光密度

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2020) 09-1747-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.09.012

High-throughput mutagenicity screening of dye Sudan Red

WANG Qi, WANG Yanan, YAN Yujing, SONG Jie, AO Rui, HU Yanping, WEN Hairuo, MA Shuangcheng

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

Abstract: Objective To preliminary establish a determination criteria for the results of the Ames fluctuation test microplate reader and to evaluate the risk of DNA base mutation of the dye Sudan Red I ~ IV. **Methods** After different concentrations of AF-2 or 2-AA were applied to *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100, respectively, they were manually identified or read at 492 nm and 623 nm using a microplate reader to establish a positive well determination based on absorbance. A 96-well liquid culture-based bacterial reversion mutation test was performed using *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100 in the absence or presence of metabolic activation ($-S_0$). The final concentrations of Sudan I-IV were 0.625, 1.250, 2.500, 5.000 and 10.000 $\mu\text{g/mL}$, respectively. **Results** The results of the microplate reader readings and manual counting results were 98.1% under non- S_0 metabolic conditions. The microplate reader readings and colony growth conditions under S_0 metabolic conditions could not establish a good correlation. Under the condition of non metabolic activation, the mutagenic effect of Sudan I and IV on TA98 was relatively weak; Sudan I-IV had obvious mutagenic effect on TA100, and there was a certain concentration correlation. Under the condition of S_0 metabolic activation, Sudan III had no mutagenic effect on TA98 and TA100; Sudan I had obvious mutagenic effect on both of them at the highest concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$; when the concentration of Sudan IV was higher than 2.5 $\mu\text{g/mL}$ and the concentration of Sudan II was higher than 5 $\mu\text{g/mL}$, the mutagenicity of both was significant. **Conclusion** This study was the first to use the Ames fluctuation test to detect the risk of genetic mutations in Sudan Red I ~ IV, and for the first time to establish a positive well standard based on absorbance readings. The absorbance reading can accurately judge the results of the Ames fluctuation test under non- S_0 metabolic conditions, laying a foundation for future high-throughput genotoxicity screening of dyes.

Key words: Sudan Red; high-throughput; gene mutation; Ames fluctuation test; optical density

收稿日期: 2020-01-19

基金项目: 国家自然科学基金(81503347); 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09201017);

第一作者: 汪 祺, 副研究员, 从事药物毒理研究。E-mail: sansan8251@sohu.com

*通信作者: 文海若, 副研究员, 从事药物毒理研究。E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

胡燕平, 副主任药师, 从事遗传毒性研究。E-mail: 441993379@qq.com

因中药材资源短缺、质量参差不齐,存在部分生产企业在药材中违法添加色素以次充好的现象;食品行业也有非法添加苏丹红而导致的“红心鸭蛋”“亨氏辣酱”等报道^[1]。《中华人民共和国食品安全法》对药用和食用染料的安全性提出严格的要求^[2]。苏丹红(I、II、III和IV)为偶氮化合物,被国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)列为3类致癌物,为国家明令禁止的非法添加剂^[3]。苏丹红可导致细胞及动物体内染色体损伤^[4-5]。有文献报道,苏丹I作用于AHH-1和MCL-5细胞后,其代谢产物可引起AHH-1和MCL-5细胞基因突变和微核率增加^[6]。苏丹红IV作用于HepG2细胞,也可诱导DNA断裂和染色体损伤^[7]。苏丹红III、IV对泥鳅的遗传毒性也均有相关研究^[8-9]。然而,苏丹红的致碱基突变数据罕有报道。

用于评价受试物的致碱基突变潜力的细菌回复突变(Ames)试验^[10-11]是食品和药品成分致癌性筛查的首选方法,已在各级药检所、疾控中心、安评中心等机构广泛实施^[12]。然而,传统的标准平皿Ames试验在实际应用中尚存在用药量较多、试剂消耗量大、计数工作量大等缺陷。此外,固态培养基的试验体系也不利于某些受试物与细菌充分作用。Green等^[13]提出的Ames波动试验,以液体培养基代替固体培养基,以pH指示剂颜色变化代替繁琐的菌落计数,以96或384孔板代替标准平皿。上述改良有助于受试物与菌株充分接触,可提高结果的灵敏度并减少受试物使用量,从而实现高通量、低消耗的目标,在药物早期大量药物遗传毒性筛选领域前景广阔。

因Ames波动试验以颜色作为结果判定的依据,当微孔颜色区分不明显时往往需要在显微镜下明确微孔中是否存在菌斑,而染料自身的颜色也可能对指示剂呈现的颜色产生干扰。本研究使用鼠伤寒沙门氏菌TA98和TA100开展波动Ames试验评价苏丹红(I、II、III和IV)的致突变风险。并在添加指示剂后经肉眼观察和酶标仪读数2种方法对试验结果进行评估,初步拟定适宜的酶标仪法评估标准,为染料等有色成分的致突变性高通量筛选及标准化提供参考。

1 材料

1.1 菌株

本研究所用菌株为鼠伤寒沙门氏菌组氨酸营养缺陷型(his⁻)菌株TA98和TA100,引自日本(株)生物科学中心(JBS INC)。研究显示TA98和

TA100结合可检出98%的致突变剂,是最常见用于开展Ames波动试验的菌株^[14]。两者经分离筛选后分别就其氨基酸及生物素合成缺陷、细胞壁脂多糖缺失(rfa)、紫外线(uvrA或 Δ uvrB)修复缺陷、抗氨基青霉素及抗四环素(含pKM101或pAQ1质粒)等特性进行鉴定,鉴定合格者扩增冻存并用于试验。

1.2 药物与主要试剂

苏丹I标准品(批号111953-201802)、苏丹IV标准品(批号111950-201602)购自中国食品药品检定研究院;苏丹II(批号99852)、苏丹III(批号822820)购自湖南华腾制药有限公司;大鼠肝S₉混合液(由苯巴比妥钠和 β -萘黄酮联合诱导大鼠肝脏制成,购自北京康瑞杰科技有限公司);其他试剂DMSO、G-6-P、遗传毒性阳性剂2-(2-呋喃基)-3-(5-硝基-2-呋喃基)丙烯酰胺(2-2-Furyl-3-5-Nitro-2-Furylacrylamide, AF-2,批号252361689 Fluka)、2-氨基蒽(2-Aminoanthracene, 2-AA,批号WA20255 Fluka)等,均购自Sigma-Aldrich;葡萄糖、组氨酸、色氨酸、生物素、MgSO₄·(7H₂O)、柠檬酸钠·(2H₂O)、K₂HPO₄·(3H₂O)、KH₂PO₄、(NH₄)₂SO₄、KCl、MgCl₂等,购自国药集团化学试剂北京有限公司;NADPN₂购自Amresco;PBS购自Hyclone;溴麝香草酚蓝购自阿拉丁。

1.3 主要仪器

5810R型离心机(Eppendorf);NTS-1300水浴摇床(EYELA);IS600细菌培养箱(YAMATO);SPECTRAMax-PLUS型酶标仪(Molecular Devices)。

2 方法

2.1 菌株扩增

在5 mL营养肉汤培养基中加入20 μ L TA98/TA100菌液,37℃、120 r/min振摇过夜培养。培养后经酶标仪检测菌液600 nm处吸光度(A)值为0.4~0.6。过夜菌液经0.1 mol/L PBS(pH 7.4)以1:9稀释,在37℃条件下恒温120 r/min振摇培养3 h。

2.2 非活化条件下的Ames波动试验

无菌条件下配制D-M half盐溶液(每1 000毫升含K₂HPO₄ 38.5 g, KH₂PO₄ 11 g, (NH₄)₂SO₄ 5.5 g, 柠檬酸钠 1.375 g, 柠檬酸钾 1.375 g)和选择性生长培养基(每220.1毫升含有200 mL D-M half盐溶液、10 mL 20%葡萄糖、0.1 mL 0.1%组氨酸、10 mL 0.01%生物素)。上述溶液高温灭菌后4℃保存。在加样槽内加入20 mL选择性生长培养基、0.1 mL稀释后培养的菌液和0.2 mL受试物,充分混匀后使

用多通道移液器加入96孔板,每孔0.2 mL。用于确定酶标仪读数与颜色关系时所用阳性剂AF-2终浓度为1、5、10、30、50 ng/mL,使用阳性剂确立试验条件时共重复5次。

确定受试物苏丹红I~IV浓度范围时,首先以其在1%DMSO中的最高溶解度以及在培养基中不产生明显沉淀的浓度确定最高浓度,再以1:2倍比稀释设置5个浓度组,终浓度分别为0.625、1.250、2.500、5.000、10.000 $\mu\text{g/mL}$,用于检测苏丹红TA98菌株阳性剂AF-2终浓度为30 ng/mL,用于检测苏丹红TA100菌株阳性剂AF-2终浓度为10 ng/mL,阴性对照组DMSO终浓度为1%。每个受试物每个浓度平行2块板,置37 °C条件下培养72 h。

2.3 活化条件下的Ames波动试验

D-M half盐溶液配制同“2.2”项。无菌条件下配制 S_0 混合液(每1 mL S_0 混合液含0.2 mol/L PNa缓冲液(pH7.4)、0.1 mol/L NADP、1 mol/L G-6-P、1.65 mol/L KCl、0.4 mol/L MgCl_2 、10% S_0)选择培养基(200 mL D-M half盐溶液中加入8 mL 20%葡萄糖溶液)和选择性生长培养基(每140.9毫升选择性生长培养基含100 mL 0.1 mol/L PBS(pH7.4)、20 mL S_0 混合液、0.8 mL 20%葡萄糖、0.1 mL 0.1%组氨酸、20 mL 0.01%生物素)。在加样槽内加入4.93 mL选择性生长培养基、0.02 mL稀释后培养的菌液和0.05 mL受试物,充分混匀后使用多通道移液器加入96孔板,每孔0.05 mL。用于确定酶标仪读数与颜色关系时所用阳性剂2-AA终质量浓度为25、75、125、250、750 ng/mL。使用阳性剂确立试验条件时共重复5次。

受试物的终质量浓度同“2.2”项,阳性剂2-AA终质量浓度为750 ng/mL,阴性对照组DMSO终浓度为1%。每个受试物每个浓度平行2块板。置37 °C条件下培养约2 h后,每孔加入0.15 mL选择培

养基,继续在37 °C下培养至72 h。

2.4 结果观察及数据处理

96孔培养板在37 °C条件下培养72 h后,每孔加入20 μL 溴麝香草酚蓝(600 $\mu\text{g/mL}$)。分别根据文献使用酶标仪检测每孔在波长为492和623 nm时的吸光度值,计算两者差值作为酶标仪读数结果^[15]。此外,通过肉眼观察每孔颜色并判断其回复性突变情况。黄色孔计为阳性,绿色计为阴性;介于黄绿之间的微孔在非 S_0 代谢活化情况下计为阴性,在 S_0 代谢活化条件下计为阳性。当每孔颜色(吸光度值)与菌落生长情况不符时,以肉眼镜下结果为准:可见菌斑生长结果为阳性结果,无明显菌斑生长为阴性结果。阴性对照组每48孔回复突变孔数不超过10孔,且阳性对照组每48孔回复突变孔数超过25孔时认为试验体系成立。回复突变孔数均数表示为 $\bar{x} \pm s$,各剂量组与阴性对照组的回复突变孔之间差异使用student's *t*检验对数据显著性进行分析(GraphPad Prism 7: USA, GraphPad Software公司)。

3 结果

3.1 非 S_0 代谢活化条件下Ames波动试验结果

在非 S_0 代谢活化条件下TA98与TA100分别与终浓度为1、5、10、30、50 ng/mL的AF-2作用72 h后,分别对共计1 920个微孔作肉眼观察或酶标仪读数分析。非 S_0 代谢活化条件下黄色孔和绿色孔差异较为明显,肉眼识别阳性孔(黄色)为482个。将所有酶标仪读数经分析并与显色结果对比后可见(图1为颜色实例图示与酶标仪读数分析结果):当读数 ≥ 0.20 时微孔均呈黄色,可判定为阳性孔;读数介于0.18~0.20或 ≤ 0.18 时,该孔颜色呈黄绿之间或绿色,可判定为阴性孔。故以酶标仪分析结果 ≥ 0.20 为阳性孔判定标准,判定阳性孔473个。两种判定方式的一致性可达98.1%。根据上述标准对阴

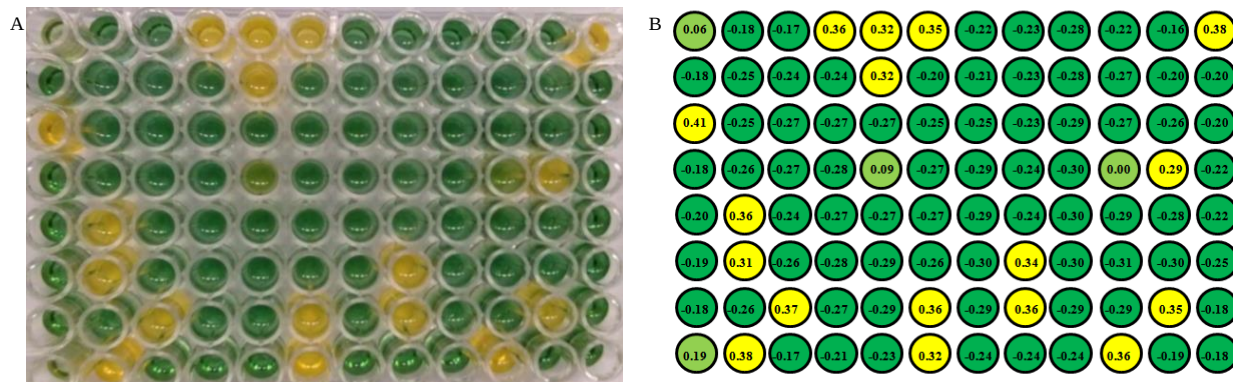


图1 TA100菌株在1 ng/mL AF-2浓度下96孔板显色结果示意图

Fig. 1 Colorimetric schematic of a 96-well plate of TA100 strain at 1 ng/mL AF-2 concentration

性对照组和不同浓度 AF-2 诱导的 TA98 和 TA100 菌落突变情况进行分析(表 1, 以其中 1 次数据为例展示), 酶标仪读数分析结果与肉眼观察结果基本一致。

苏丹红 I~IV 溶于 1% DMSO 后溶液呈红色, 加入微孔后呈浅粉色。非代谢活化条件下, 给药结束加入显色剂后, 不同浓度的苏丹红未对显色结果产生明显干扰, 人工观察和吸光度读数结果基本一致(表 2)。苏丹红 II 和 III 的处理浓度在 (0.625~10) $\mu\text{g/mL}$ 时, 所有浓度组未见 TA98 菌株回复性突变阳性孔数与对照组存在显著性升高。苏丹红 I 和

IV 的浓度分别为 2.5 和 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 时 TA98 菌株回复性突变阳性孔数与阴性对照组比较显著性升高 ($P < 0.05$), 其他浓度组则未见统计学差异。苏丹红 I~IV 在浓度为 (2.5~10.0) $\mu\text{g/mL}$ 时 TA100 菌株回复性突变阳性孔数与阴性对照组比较均有显著性升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 且各浓度组与阴性对照组比较突变孔数均达到其 2 倍及以上。可见苏丹红 I 与 IV 在非代谢活化条件下对 TA98 的致突变性作用相对较弱, 分别只有 1 个浓度呈阳性; 而苏丹红 I~IV 在非代谢活化条件下对 TA100 存在明显的致突变性作用, 并呈一定的浓度相关性。

表 1 非 S₉ 代谢活化条件下不同浓度阳性剂人工读数与酶标仪读数对比表 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 1 Comparison of manual readings and microplate reader readings of different concentrations of positive agents without S₉ metabolic activation conditions ($\bar{x} \pm s, n=4$)

给予物质	质量浓度/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TA98 阳性孔数(每 48 孔)		TA100 阳性孔数(每 48 孔)	
		人工观察判断	吸光度判断	人工观察判断	吸光度判断
1% DMSO	—	2±2	2±2	5±1	5±1
AF-2	1	7±0	7±1	5±1	5±1
	5	9±1	8±1	6±2	5±1
	10	20±3	19±3	44±2	43±1
	30	32±2	31±1	9±3	9±3
	50	0±0	0±0	0±0	0±0

表 2 非 S₉ 代谢活化状态下苏丹红 Ames 波动试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 2 Ames Fluctuation Test of Sudan Red without S₉ metabolic activation ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	剂量/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TA98 阳性孔数(每 48 孔)		TA100 阳性孔数(每 48 孔)	
		人工观察判断	吸光度判断	人工观察判断	吸光度判断
阴性对照	—	1.50±1.50	1.50±1.50	4.25±0.83	4.25±0.83
苏丹红 I	0.625	3.25±2.17	4.25±1.09	6.75±1.48	6.75±1.48
	1.250	5.25±2.95	5.25±2.77	7.75±0.83	7.75±0.83
	2.500	5.25±1.92*	5.75±0.83	8.50±1.12**	8.00±0.71
	5.000	4.75±3.34	5.50±2.96	9.00±1.58**	7.75±1.30
	10.000	6.00±5.10	7.00±4.12	9.75±2.59*	9.50±2.96
苏丹红 II	0.625	4.50±3.57	5.00±3.08	7.25±1.30	7.25±1.30
	1.250	4.50±4.03	5.00±3.54	6.50±2.60	6.25±2.38
	2.500	4.75±4.32	5.75±3.49	9.50±1.66**	9.25±2.05
	5.000	5.25±4.82	10.00±1.00	9.25±1.48**	9.00±1.41
	10.000	6.25±5.31	7.50±6.58	14.00±1.22***	14.00±1.22
苏丹红 III	0.625	4.00±1.41	4.75±0.83	5.00±3.08	7.25±3.56
	1.250	4.50±1.66	5.00±1.41	6.50±1.12	6.50±1.12
	2.500	4.00±3.16	4.50±2.96	9.25±1.64**	9.00±1.22
	5.000	5.00±4.61	5.75±4.32	9.50±2.18**	9.00±2.12
	10.000	6.00±5.52	6.25±5.26	10.75±1.09***	10.50±1.12
苏丹红 IV	0.625	3.00±2.24	3.25±2.38	7.00±1.22	10.75±4.02
	1.250	5.00±3.08	6.00±2.55	9.00±2.55*	9.00±2.55
	2.500	5.25±2.77	5.75±2.28	10.5±2.29**	10.50±2.29
	5.000	6.25±2.28*	6.25±2.28	10.5±1.80**	10.50±1.80
	10.000	8.00±4.64	7.50±5.22	11.5±2.06***	11.25±2.38
AF-2	0.03(TA98)/0.01(TA100)	31.5±2.06***	31.5±2.06	39.25±3.27***	39.25±3.27

与阴性对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs negative control group

3.2 S_0 代谢活化条件下 Ames 波动试验结果

S_0 代谢活化条件下 TA98 与 TA100 分别与终浓度为 25、75、125、250、750 ng/mL 的 2-AA 作用 72 h 后,黄色孔和绿色孔差异相对较小,介于黄色和绿色之间的经肉眼或镜下观察也可见大片菌斑形成,认为阳性结果。根据颜色和菌斑确认结果,2-AA 在上述浓度范围内可诱导 TA98 和 TA100 的回复突变孔数增加,并呈浓度效应相关性。然而黄色孔和绿色孔的酶标仪读数经分析后差异小(图2和表3),难以界定吸光度值与显色结果之间的关联。上述情况或与 S_0 引入后增加了微孔浑浊度,对指示剂显色和酶标仪读数存在一定影响有关。确定菌落突变的依据应为菌斑的形成,故该条件下不适宜使用酶标仪读数,而是人工观察计数含突变菌落的孔数。

苏丹红 I~IV 与细菌和 S_0 共同作用 72 h,在微孔中添加指示剂后所有含苏丹红的微孔均呈黄色,颜色差异不彰。酶标仪读数和肉眼观察颜色均无

法对回复突变情况作区分,故以菌斑观察结果为准(表4)。TA98 菌株:苏丹红 II 和 IV 给药浓度在 2.5~10.0 $\mu\text{g/mL}$ 时回复性突变阳性孔数量与阴性对照组比较均有显著性升高($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。苏丹红 I 在浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时回复性突变阳性孔数量与阴性对照组比较有显著性升高($P<0.05$),其他浓度组则未见统计学差异。TA100 菌株:苏丹红 I 和苏丹红 II 在 5~10 $\mu\text{g/mL}$ 时回复性突变阳性孔数量与阴性对照组比较均显著性升高($P<0.01$),苏丹红 II 和 III 浓度在 1.25 和 2.50 $\mu\text{g/mL}$ 时虽呈现出显著性差异,但是具体数目小于阴性对照组的 2 倍。苏丹红 IV 当浓度在 2.5~10.0 $\mu\text{g/mL}$ 时回复性突变阳性孔数量与阴性对照组比较均有显著性升高($P<0.05$ 、 0.01)。上述结果提示,苏丹红 III 在 S_0 代谢活化条件下对 TA98 和 TA100 均未见致突变作用。苏丹红 I 在最高浓度 10 $\mu\text{g/mL}$ 时对两者均有明显的致突变作用,苏丹红 IV 浓度高于 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 、苏丹红 II

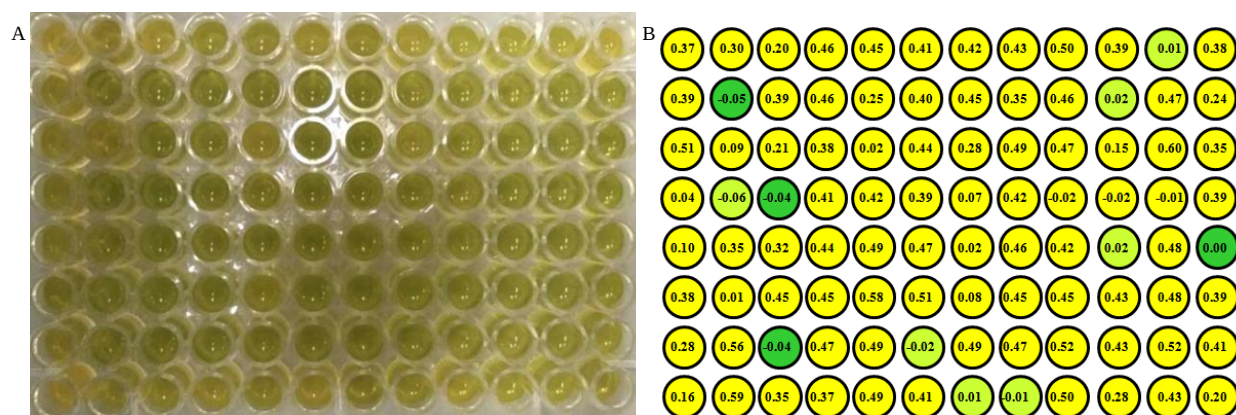


图2 TA100 菌株在 750 ng/mL 2-AA 浓度下 96 孔板显色结果示意图

Fig. 2 Colorimetric schematic of a 96-well plate of TA100 strain at 750 ng/mL 2-AA concentration

表3 S_0 代谢活化条件下不同浓度阳性剂人工读数结果($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	浓度/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	阳性孔数(每48孔)	
		TA98	TA100
阴性对照	—	2 $\pm$ 1	2 $\pm$ 2
2-AA	25	5 $\pm$ 3	8 $\pm$ 3
	75	10 $\pm$ 2	19 $\pm$ 4
	125	18 $\pm$ 3	18 $\pm$ 5
	250	30 $\pm$ 6	25 $\pm$ 10
	750	43 $\pm$ 5	46 $\pm$ 3

浓度高于 5 $\mu\text{g/mL}$ 时,对两者致突变作用均显著。

4 讨论

Ames 试验是最经典的遗传毒性评价方法,自 20 世纪 70 年代中期诞生伊始,人们热衷于对其进行不断优化和改良。Gatehouse 等^[16]首次于 1978 年将使用液体培养基的 Ames 试验优化为以 96 板为基础的 Ames 微量波动试验,其中 pH 指示剂(如溴麝香草酚蓝或溴甲酚紫)的应用是一项重要改进,使试验人员不必在镜下逐一确认每孔的突变菌生长情况,而可通过肉眼观察颜色进行判断。菌落生长可导致培养基 pH 值降低,本研究使用的溴麝香草酚蓝由绿色变为黄色的 pH 范围是 6.0~7.6,而溴甲酚紫变色时 pH 值范围在 5.2~6.8,前者较后者敏感。因实际工作中人工判断时易于出现偏差。故有必

表4 S₀代谢活化状态下人工观察苏丹红 Ames 波动试验
结果 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 4 Ames fluctuation test of Sudan Red with S₀ metabolic activation by artificial observation ($\bar{x} \pm s, n=4$)

组别	浓度/ (ng·mL ⁻¹)	阳性孔数(每48孔)	
		TA98	TA100
阴性对照	—	4.05±2.06	5.50±1.12
苏丹红 I	0.625	4.00±0.71	6.50±1.12
	1.250	4.75±0.83	8.25±1.09*
	2.500	6.50±0.50	9.00±3.08
	5.000	9.00±2.74	14.25±2.86**
	10.000	15.25±5.80*	15.75±3.03**
苏丹红 II	0.625	5.00±0.71	6.50±1.50
	1.250	6.75±3.11	9.00±2.12*
	2.500	10.25±2.49*	9.50±1.12**
	5.000	15.25±1.79***	11.00±1.87**
	10.000	20.25±2.95***	13.25±2.77**
苏丹红 III	0.625	4.00±1.41	6.25±0.43
	1.250	6.75±2.59	7.50±1.12
	2.500	8.00±0.71*	9.25±3.63
	5.000	6.00±3.54	8.75±0.83**
	10.000	9.75±3.34	9.75±2.59*
苏丹红 IV	0.625	4.50±1.12	7.50±1.12
	1.250	6.50±3.20	7.25±1.30
	2.500	12.5±4.92*	11.75±3.34*
	5.000	16.75±4.87**	14.25±3.11**
	10.000	19.00±6.75*	15.50±3.35**
2-AA	0.75	47.75±0.43***	42.25±4.60***

与阴性对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs negative control group

要探索更加客观的判断标准和方法进行计数。本研究首次在非 S₀ 代谢活化条件下建立以(波长为 492 和 623 nm 时)吸光度差值 ≥ 0.20 为阳性孔判定标准。不添加 S₀ 的试验体系中,该标准经阳性剂验证其可靠性达 98.1%,且可准确评价可对指示剂颜色判断产生干扰的染料苏丹红所诱导的细菌突变结果。S₀ 混合液的添加使阳性孔和阴性孔间的颜色差异缩小,并对酶标仪读数产生干扰,无色试剂(2-AA)的回复突变孔数可通过颜色识别判断,必要时镜下观察确认。该条件下苏丹红等红色或橙色染料可进一步对指示剂颜色产生干扰,无法通过微孔颜色来区分是否存在突变菌斑的形成,需肉眼或镜下确认是否存在菌斑形成。可见基于指示剂显色的 Ames 试验在检测染料时存在一定局限性。课题组今后将进一步对 S₀ 处理条件及观察方法进行优

化,以期实现在避免颜色干扰的同时高通量读板的最终目的。

苏丹红人体及动物致癌性相关数据较为充分,但未见相关 Ames 评价结果。欧盟开发的基于决策树的毒性预测平台 Toxtree (Version 3.1.01851、Istituto Superiore di Sanita (Italy))未能检索到苏丹红(I、II、III 和 IV)的体外细菌致突变性警示结构,而化合物毒性预测软件 Derek Nexus (Version 6.0.1、Lhasa Limited (UK))则根据其含有的芳香族偶氮化合物判断其体外细菌致突变性警示结构模棱两可(equivocal,指支持和反对的证据权重相当)。TA98 和 TA100 两种菌株检测的突变类型不同,前者检测 GC 移码而后者则针对 G:C 置换^[17]。根据本研究中受试物致菌株突变的敏感性可初步推断苏丹红 I、苏丹红 II 和苏丹红 IV 的致突变特点为 G:C 移码和置换;而苏丹红 III 的致突变特点为 G:C 移码。上述结果与文献报道中芳香族偶氮化合物的 Ames 试验结果基本相符^[18-20]。其突变特点需进一步对突变菌株进行基因测序以确定。

本研究比较了使用人工观察和酶标仪读数两种方法对 Ames 波动试验结果判断的效果,并初步确立了非添加 S₀ 条件下酶标仪法评估标准,为致突变性高通量筛选方法优化提供参考,苏丹红的相关研究数据可作为其致突变性数据,作为其遗传毒性警示结构数据的补充。

参考文献

- [1] 国务院法制办公室. 中华人民共和国食品安全法 [J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 39(2): 83-85.
- [2] 龚正轩. 由"苏丹红"事件引发的社会学思考 [J]. 科学与财富, 2019(3): 133.
- [3] Smith M. The contribution of food safety management systems to the prevention of deliberate food contamination [J]. Nato Security Through Science, 2010: 23-48.
- [4] 张小梅, 刘琳, 逯越, 等. 羟基酚醇对苏丹红 I 号所致的 HepG2 细胞微核率的影响 [J]. 毒理学杂志, 2009, 23(6): 453-456.
- [5] Elliott B M, Griffiths K, MacKay J M, et al. CI solvent yellow 14 shows activity in the bone marrow micronucleus assay in both the rat and mouse [J]. Mutagenesis, 1997, 12(4): 255-258.
- [6] Johnson G E, Quick E L, Parry E M, et al. Metabolic influences for mutation induction curves after exposure to Sudan-1 and Para red [J]. Mutagenesis, 2010, 25(4): 327-333.
- [7] Weisburger E K, Russfield A B, Homburger F, et al. Testing of twenty-one environmental aromatic amines or

- derivatives for long-term toxicity or carcinogenicity [J]. J Environ Pathol Toxicol, 1978, 2(2): 325-356.
- [8] 常重杰, 王君, 肖静, 等. 苏丹红III对泥鳅的急性毒性、遗传及生理毒性研究 [J]. 水生态学杂志, 2012, 33(4): 113-117.
- [9] 杨炆. 苏丹红IV对大鳞副泥鳅和泥鳅的毒性研究 [D]. 新乡: 河南师范大学, 2012.
- [10] Ames B N, Durston W E, Yamasaki E, et al. Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1973, 70(8): 2281-2285.
- [11] Ames B N, Lee F D, Durston W E. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens [J]. Proc Nat Acad Sci USA, 1973, 70(3): 782-786.
- [12] Cassano A, Raitano G, Mombelli E, et al. Evaluation of QSAR models for the prediction of Ames genotoxicity: a retrospective exercise on the chemical substances registered under the EU REACH regulation [J]. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev, 2014, 32(3): 273-298.
- [13] Green M H, Muriel W J, Bridges B A. Use of a simplified fluctuation test to detect low levels of mutagens [J]. Mutat Res, 1976, 38(1): 33-42.
- [14] Zeiger E. Carcinogenicity of mutagens: predictive capability of the *Salmonella mutagenesis* assay for rodent carcinogenicity [J]. Cancer Res, 1987, 47(5): 1287-1296.
- [15] Kamber M, Flückiger-Isler S, Engelhardt G, et al. Comparison of the Ames II and traditional Ames test responses with respect to mutagenicity, strain specificities, need for metabolism and correlation with rodent carcinogenicity [J]. Mutagenesis, 2009, 24(4): 359-366.
- [16] Gatehouse D. Detection of mutagenic derivatives of cyclophosphamide and a variety of other mutagens in a "microtitre" fluctuation test, without microsomal activation [J]. Mutat Res, 1978, 53(3): 289-296.
- [17] Matsumura S, Ito Y, Morita O, et al. Genome resequencing analysis of *Salmonella typhimurium* LT-2 strains TA98 and TA100 for the establishment of a next-generation sequencing-based mutagenicity assay [J]. J Appl Toxicol, 2017, 37(9): 1125-1128.
- [18] Josephy P D, Dhanoa J, Elzawy G, et al. Structure-activity investigation of the potentiating effect of cyano substitution on nitroaniline mutagenicity in the Ames test [J]. Environ Mol Mutagen, 2018, 59(2): 114-122.
- [19] Li T, Hao M L, Pan J, et al. Comparison of the toxicity of the dyes Sudan II and Sudan IV to catalase [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2017, 31(10): e21943.
- [20] Stiborova M, Schmeiser H H, Frei E, et al. Enzymes oxidizing the azo dye 1-phenylazo-2-naphthol (Sudan I) and their contribution to its genotoxicity and carcinogenicity [J]. Curr Drug Metab, 2014, 15(8): 829-840.