

## 染料溶剂红207的体外致突变风险评价

汪 祺<sup>1#</sup>, 闫 明<sup>1, 2#</sup>, 王亚楠<sup>1</sup>, 鄂 蕊<sup>1</sup>, 胡燕平<sup>1\*</sup>, 文海若<sup>1\*</sup>, 马双成<sup>1</sup>

1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

2. 中国药科大学, 江苏 南京 211198

**摘要:** 目的 使用基于鼠伤寒沙门氏菌的Ames波动试验和小鼠淋巴瘤细胞(L5178Y)的体外*Pig-a*基因突变试验评价新型染料溶剂红207的碱基突变风险。方法 不同质量浓度的溶剂红207(0.625~10.000 μg/mL)分别与TA98和TA100混合于96孔培养板,在37℃条件下作用72h后判断其对突变菌落数的影响。在优化后的体外L5178Y细胞*Pig-a*基因突变实验中,溶剂红207(2.5~20.0 μg/mL)分别与L5178Y细胞在有或无S9代谢活化条件下作用24h或4h,于给药后第8天评价其是否可诱导哺乳动物细胞*Pig-a*基因的突变频率增加。结果 无和有S9代谢活化条件下,溶剂红207可导致TA98和TA100回复性突变孔数显著增加( $P < 0.05, 0.01, 0.001$ ),且存在浓度效应相关性,代谢活化后增加更为明显。在非S9代谢活化条件下,溶剂红207各浓度组*Pig-a*基因突变率与阴性对照组比较无显著性差异;在S9代谢活化条件下,溶剂红207质量浓度范围为2.5~20 μg/mL时,可导致*Pig-a*基因突变率显著增加( $P < 0.01, 0.001$ ),且存在浓度效应关系。结论 首次使用体外高通量试验方法评价溶剂红207的致突变风险,发现其存在体外致突变性且经I相代谢活化后致突变性进一步增强。

**关键词:** 溶剂红207; 致癌性; 碱基突变; 波动Ames试验; *Pig-a*基因突变试验

中图分类号: R992 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2020)12-2416-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2020.12.011

## *In vitro* mutagenicity risk assessment of dye solvent red 207

WANG Qi<sup>1</sup>, YAN Ming<sup>1,2</sup>, WANG Yanan<sup>1</sup>, AO Rui<sup>1</sup>, HU Yanping<sup>1</sup>, WEN Hairuo<sup>1</sup>, MA Shuangcheng<sup>1</sup>

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

2. China Pharmaceutical University, Nanjing, 211198, China

**Abstract: Objective** To evaluate the base-pair mutation risk of a novel medicinal dye solvent red 207 by fluctuation Ames test based on *Salmonella typhimurium* and the *in vitro Pig-a* gene mutation assay based on mouse lymphoma cells (L5178Y). **Methods** Different concentrations of solvent red 207 (0.625—10.000 μg/mL) were mixed with TA98 and TA100 in 96-well culture plates, and its effects to the number of revertants were determined after a 72 h incubation at 37 °C. In addition, solvent red 207 (2.5—20.0 μg/mL) were treated with L5178Y cells under the conditions with or without metabolic activation for 24 h or 4 h, and its effects to the frequency of *Pig-a* gene mutation in mammalian cells were evaluated on the 8th day after treatment. **Results** Both in the absence and presence of S9 metabolic conditions, the solvent red 207 ranges between 0.625—10 μg/mL led to significant increase in the number of TA98 and TA100 revertants ( $P < 0.05, 0.01$  and  $0.001$ ), and there was a concentration-effect correlation, and the extent of increase in the number of revertants are more obvious after the metabolism. In absence of S9 activation, the *Pig-a* gene mutation rates in cells treated with different concentrations of solvent red 207 showed no difference comparing to the vehicle control group; In the presence of S9 activation, solvent red 207 ranges between 2.5—20 μg/mL induced increase of the frequency of *Pig-a* gene mutation, and there is a certain concentration-effect relationship ( $P < 0.01$  and  $0.001$ ). **Conclusion** This study for the first time used the *in vitro* high-throughput test methods to evaluate the mutagenic risk of solvent red 207, and suggested that the solvent red 207 is mutagenic, while the mutagenicity could be further enhanced after the phase I metabolism.

**Key words:** solvent red 207; carcinogenic; gene mutation; Ames fluctuation test; *Pig-a* assay

收稿日期: 2020-09-03

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

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

闫 明, 硕士研究生, 从事遗传毒理研究。E-mail: yanming0120@sina.com

\*通信作者: 文海若, 研究员, 从事药物毒理研究。E-mail: hairuowen@163.com

胡燕平, 副主任药师, 从事遗传毒性研究。E-mail: huer64@126.com

溶剂染料为一类可溶于有机溶剂的有机发色化合物。随着化工产业的兴盛,国内溶剂染料品种日益增多,其中大多用于喷漆、粉末涂层、油墨、木材及醋酸纤维素的着色。考虑其成分的潜在毒性风险,《中华人民共和国食品安全法》<sup>[1]</sup>、《化妆品安全技术规范》<sup>[2]</sup>和药品相关法规中均明确规定不得在食品、化妆品及药品中使用。然而,为降低生产成本,商家非法添加工业染料的情况仍时有发生。胡莉等<sup>[3]</sup>在食品染色剂使用情况筛查中发现,个别企业出售的鸡蛋喷码油墨为工业染料“溶剂红49”,除鸡蛋壳外,该染料可在煮鸡蛋的水以及与鸡蛋同蒸的馒头中检出。姜子波等<sup>[4]</sup>在部分市售化妆品中检出颜料橙5、颜料红53和溶剂红49等工业染料。上述事件对人民健康和安全带来极大隐患。

作为食品、化妆品或药品中的添加/残留成分,溶剂染料的毒性风险尤其是长期服用或接触导致肿瘤甚至癌症的风险受到广泛关注。多种溶剂已被国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)列为致癌物<sup>[5]</sup>。如苏丹红可导致DNA断裂和染色体损伤<sup>[6-7]</sup>;碱性红9盐酸盐(又称C.I.42500)可导致大鼠和小鼠肝细胞癌以及大鼠外耳道腺癌、甲状腺癌和皮肤癌等<sup>[8]</sup>。

本课题组前期在非法添加染色筛查中发现,个别中药材和中成药中存在溶剂红207残留,高度怀疑与厂商非法药物染色有关。溶剂红为蒽醌型溶剂染料,其所包含的蒽醌结构被认为是遗传毒性警示结构(图1),该类物质存在一定致癌性风险。溶剂红207属于新型染料,其遗传毒性及致癌性尚无试验研究报道,且合成量有限。为综合评价其潜在致突变风险,本研究分别开展可利用少量药物开展的基于细菌的波动Ames试验<sup>[9]</sup>(鼠伤寒沙门氏菌TA98和TA100)和基于哺乳动物细胞的体外Pig-a基因突变试验(小鼠淋巴瘤细胞L5178Y)<sup>[10-11]</sup>,评价溶剂红207的致突变风险并探讨新兴高通量遗传毒性评价方法在染料中的应用。

## 1 材料

### 1.1 菌株与细胞

鼠伤寒沙门氏菌组氨酸营养缺陷型(*his*<sup>-</sup>)菌株TA98和TA100,引自日本(株)生物科学中心(JBS INC),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。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 $\Delta$ *uvrB*)修复缺陷、抗氨苄青霉素及抗四环素(含pKM101或

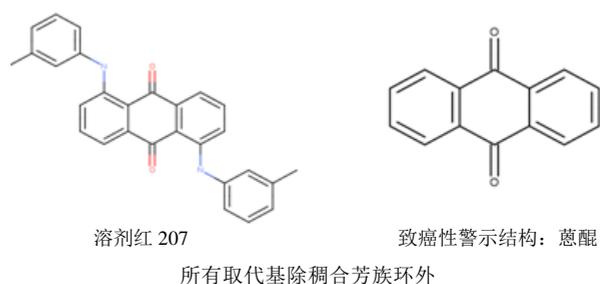


图1 溶剂红207及其致癌性警示结构

Fig. 1 Structure and carcinogenic alert structure of solvent red 207

pAQ1质粒)等特性进行鉴定,鉴定合格者扩增冻存并用于试验。

小鼠淋巴瘤细胞L5178Y *tk*<sup>+/-</sup>-3.7.2C,引自日本国立医药品食品卫生研究所,经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。

### 1.2 药物与主要试剂

溶剂红207(22854 CA:10114-49-5),购自湖南华腾制药有限公司;大鼠肝S9混合液购自北京安保迪科技有限公司(由苯巴比妥钠和 $\beta$ -萘黄酮联合诱导大鼠肝脏制成);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)、2-氨基蒽(2-aminoanthracene, 2-AA)、甲基磺酸乙酯(EMS,批号126K0758),苯并芘(B(a)P)(批号SLBF45532)等均购自Sigma-Aldrich;葡萄糖、组氨酸、色氨酸、生物素、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、柠檬酸钠·2H<sub>2</sub>O、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、KCl、MgCl<sub>2</sub>等购自国药集团化学试剂北京有限公司;NADPNa<sub>2</sub>购自Amresco;PBS购自Hyclone;溴麝香草酚蓝购自阿拉丁。马血清(批号AC10235369)、PBS(批号AD19942268)购自Hyclone;APC-Anti Mouse-CD45(批号7166674),PE-Anti Mouse-CD90.2(批号7110569)购自BD biosciences。

### 1.3 主要仪器

5810R离心机(Eppendorf,德国);NTS-1300水浴摇床(EYELA,日本);IS600细菌培养箱(YAMATO,日本);SPECTRAMax-PLUS型酶标仪(Molecular Devices,美国);流式细胞仪(FACSCalibur, BD bioscience,美国);二氧化碳培养箱(HERA cell VIOS 160i, Thermo Fisher,美国);生物安全柜(NU-543-400S, Nuair,美国);流式细胞仪(FACSCalibur, BD bioscience,美国);倒置显微镜(CKX31, Nikon,日本)。

## 2 方法

### 2.1 Ames波动试验

**2.1.1 菌株扩增** 在5 mL营养肉汤培养基中加入20  $\mu$ L TA98/TA100菌液, 37  $^{\circ}$ C、120 r/min振摇过夜培养。培养后经酶标仪检测菌液600 nm吸光度(A)值为0.4~0.6, 过夜菌液经0.1 mol/L PBS(pH7.4)以1:9稀释, 在37  $^{\circ}$ C条件下恒温120 r/min振摇培养3 h。

**2.1.2 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升D-M half盐溶液含 $K_2HPO_4$  38.5 g、 $KH_2PO_4$  11 g、 $(NH_4)_2SO_4$  5.5 g、柠檬酸钠1.375 g)和选择性生长培养基(220.1 mL选择性生长培养基含有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  $^{\circ}$ C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。确定受试物溶剂红207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处理浓度, 再以1:2倍比稀释设置5个浓度组, 终质量浓度分别为0.625、1.250、2.500、5.000、10.000  $\mu$ g/mL, 用于检测TA98菌株阳性剂AF-2终质量浓度为30 ng/mL, 用于检测TA100菌株阳性剂AF-2终质量浓度为10 ng/mL, 阴性对照组DMSO终质量浓度为1%。每个受试物每个浓度平行2块板, 置37  $^{\circ}$ C条件下培养72 h。

**2.1.3 活化条件下的Ames波动试验** 无菌条件下配制S9混合液(每1毫升含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% S9)、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(140.9 mL含100 mL 0.1 mol/L PBS(pH7.4)、20 mL S9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。受试物的终浓度同“2.1.2”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  $^{\circ}$ 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  $^{\circ}$ C下培养至72 h。

**2.1.4 结果观察及评价标准** 96孔培养板在37  $^{\circ}$ C

条件下培养72 h后, 每孔加入20  $\mu$ L溴麝香草酚蓝(600  $\mu$ g/mL), 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。

### 2.2 体外Pig-a基因突变试验

基于L5178Y细胞的体外Pig-a基因突变试验方法及数据分析方法的前期文献<sup>[10-11]</sup>。

**2.2.1 给药处理** 将L5178Y细胞解冻复苏后置于完全培养基R10(含有10%马血清、1%青链霉素混合液、0.2 mg/mL丙酮酸钠的RPMI 1640)在37  $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$ 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试验。细胞毒性以相对细胞倍增速率(Relative population doubling, RPD)为评价参数。

$$\text{细胞倍增速率(PD)} = \lg \frac{(\text{受试物处理后细胞量}/\text{初始细胞量})/\lg^2}$$

$$\text{RPD} = (\text{受试物组PD}/\text{对照组细胞PD})$$

非S9代谢条件连续(24 h)处理组: 细胞达对数生长期后, 更换R10培养基并添加不同质量浓度的溶剂红207(2.5、5、10、20  $\mu$ g/mL, 以溶剂红207在DMSO中最大溶解度20  $\mu$ g/mL为最高作用浓度), 调整细胞密度为 $5 \times 10^5$ /mL于10 mL培养基中, 细胞于37  $^{\circ}$ C、5%  $CO_2$ 条件下与受试物作用24 h。处理结束后收集细胞并计数, 细胞1 000 r/min离心5 min后, 使用PBS洗涤2次。将细胞重悬于10 mL完全培养基R10并维持密度为 $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ /mL。试验平行设置阴性对照组(1% DMSO)和阳性对照组(无S9: EMS 500  $\mu$ g/mL), 每组3个生物学重复。

S9代谢活化条件短时(4 h)处理组: 细胞达对数生长期后, 更换R10培养基, 添加不同质量浓度的溶剂红207(2.5、5、10、20  $\mu$ g/mL)并调整细胞密度为 $5 \times 10^5$ /mL于50 mL离心管中。置于气浴摇床中37  $^{\circ}$ C、20 r/min振摇4 h。细胞1 000 r/min离心5 min后, 使用PBS洗涤2次。将细胞重悬于10 mL完全培养基R10。给药后4 h后细胞计数, 维持密度为 $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^6$ /mL。试验平行设置阴性对照组(1% DMSO)和阳性对照组(有S9: B[a]P 5.0  $\mu$ g/mL), 每组3个生物学重复。

**2.2.2 流式检测** 给药后第8天收集 $2 \times 10^6$ 个细胞, 4  $^{\circ}$ C、1 000 r/min离心5 min, 弃上清, 每组加入5 mL含2% FBS的PBS缓冲液混匀, 4  $^{\circ}$ C、1 000 r/min离

心 5 min。吸弃上清液,每孔加入 200  $\mu\text{L}$  APC-anti-CD45、PE-anti-CD90.2 混合工作液,终质量浓度为 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,重悬细胞并混合均匀。将细胞置于 2~8  $^{\circ}\text{C}$  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 含 2% FBS 的 PBS 缓冲液中,4  $^{\circ}\text{C}$ 、340 $\times$ g 离心 3 min。吸弃上清液并加入 300  $\mu\text{L}$  含 2% FBS 的 PBS 缓冲液,混合均匀后转入流式管中上机检测。

### 2.3 观察及数据处理

回复突变孔数均数和每组 *Pig-a* 基因突变细胞均数表示为  $\bar{x}\pm s$ ,各剂组与阴性对照组之间差异使用单因素方差法检验对数据显著性进行分析(GraphPad Prism 7 软件:USA, GraphPad Software 公司)。

## 3 结果

### 3.1 Ames 波动试验结果

在无及有 S9 代谢活化条件下,阴性对照组每 48 孔中回复突变孔数均在 10 孔以内,且阳性对照组每 48 孔中回复突变孔均超过 25 孔,提示试验体系成立。无和有 S9 代谢活化条件下,溶剂红 207 自 0.625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  起可引起 TA98 回复性突变孔数显著性增加( $P<0.05, 0.01, 0.001$ ),且存在浓度效应相关性,且代谢活化后增加更为明显。无 S9 代谢活化条件下,溶剂红 207 自 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  起可引起 TA100 回复性突变孔数显著性增加( $P<0.01$ );有代谢活化条件下,溶剂红 207 自 1.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  起可引起 TA100 回复性突变孔数显著性增加( $P<0.001$ ),且存在浓度效应相关性。因此溶剂红可导致 TA98 和 TA100 发生回复性突变,且代谢活化后致突变性更明显。结果见表 1。

### 3.2 体外 *Pig-a* 基因突变试验结果

**3.2.1 细胞毒性** 溶剂红 207 给药质量浓度范围(2.5~20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )内各组 RPD 均大于 50%,提示溶剂红 207 在当前给药条件下无明显细胞毒性作用,可排除后续 *Pig-a* 基因突变试验中假阳性结果。结果见图 1。

**3.2.2 溶剂红 207 对 L5178Y 细胞体外 *Pig-a* 基因突变率的影响** 当发生 *Pig-a* 基因突变时,细胞 CD90.2 表面抗原缺失,即产生 CD90(-)细胞。在非 S9 代谢活化条件下,各浓度组 *Pig-a* 基因突变率与溶媒对照组相比无显著性差异,且无明确浓度梯度关系;S9 代谢活化条件下,溶剂红 207 质量浓度范围为 2.5~20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,可导致 *Pig-a* 基因突变率明显增加,与阴性对照组比较差异显著( $P<0.01、$

表 1 溶剂红 207 Ames 波动试验结果( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

Table 1 Ames fluctuation test of dye solvent red 207( $\bar{x}\pm s, n=4$ )

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	TA98		TA100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
阴性对照	/	2 $\pm$ 2	3 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1	6 $\pm$ 1
溶剂 207	0.625	4 $\pm$ 0*	8 $\pm$ 1***	5 $\pm$ 1	5 $\pm$ 1
	1.250	5 $\pm$ 1*	7 $\pm$ 1***	5 $\pm$ 1	8 $\pm$ 1***
	2.500	7 $\pm$ 2*	17 $\pm$ 2***	3 $\pm$ 0	9 $\pm$ 1***
	5.000	7 $\pm$ 1**	16 $\pm$ 1***	4 $\pm$ 2	10 $\pm$ 1***
	10.000	9 $\pm$ 1***	18 $\pm$ 1***	8 $\pm$ 1**	10 $\pm$ 1***
AF-2	0.03/0.01#	32 $\pm$ 3***	/	40 $\pm$ 4***	/
2-AA	0.75	/	46 $\pm$ 3	/	39 $\pm$ 2***

#TA98、TA100 阳性对照 AF-2 分别为 30、10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ;与阴性对照组比较: \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$

Concentration of TA98 and TA100 positive controls AF-2 were 30 and 10  $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively. \* $P<0.05$  \*\* $P<0.01$  \*\*\* $P<0.001$  vs negative control group

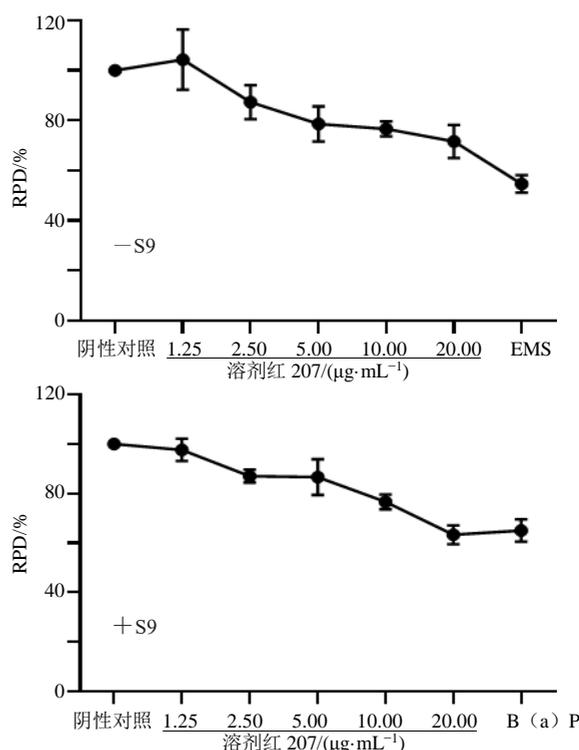


图 1 溶剂红 207 对细胞 RPD 的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Fig.1 Effects of Solvent Red 207 to RPD of cells( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

0.001),且增加程度呈浓度相关性,自 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  起突变率超过阴性对照组的 2 倍,见图 2。提示溶剂红 207 经代谢活化后可导致 L5178Y 细胞的 *Pig-a* 基因发生突变。

## 4 讨论

本课题组前期在中药材和成药中检出溶剂红

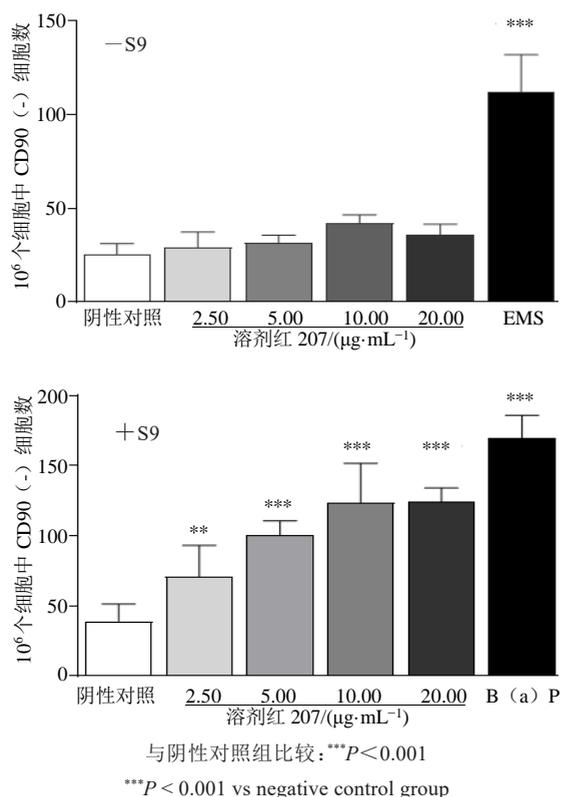


图2 溶剂红207对L5178Y细胞*Pig-a*基因突变率的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Fig. 2 Effects of Solvent Red 207 to *Pig-a* gene mutation rate of L5178Y( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

207,后者作为溶剂染料长期暴露于人体存在毒性风险,有必要开展致癌性风险评估。毒性预测软件Toxtree (Version 3.1.01851, Istituto Superiore di Sanita, Italy)预测结果提示溶剂红207含有遗传毒性致癌性警示结构, Derek Nexus (Version 6.0.1, Lhasa Limited, UK)根据其含有的蒽醌结构认为存在啮齿类动物体内致癌性警示结构(判定为模棱两可,即支持和反对的证据权重相当)。当前无溶剂红207致突变性的研究报道。本研究结果显示溶剂红207可导致鼠伤寒沙门氏菌TA98和TA100回复突变率增加,存在致突变性,且经代谢活化后(试验体系中添加I相代谢启动剂)突变率进一步增加。在非代谢活化条件下,溶剂红207未导致L5178Y细胞的*Pig-a*基因突变率升高,而经代谢活化后,溶剂红207自2.5 µg/mL起可导致*Pig-a*基因突变率显著升高。结果提示,溶剂红207经过I相代谢,以蒽醌为母环的侧链发生氧化、还原、或水解后使其亲电性增强,从而更易与DNA相互作用。与溶剂红207类似含有蒽醌结构的丹蒽醌、阿霉素和正定霉素已被IARC列为2A或2B类致癌物<sup>[12-14]</sup>,可诱导乳腺或

肾脏肿瘤,其致癌作用机制与代谢为半醌,促进氧化自由基的生成并导致DNA氧化损伤有关<sup>[15]</sup>。亦有文献报道羟基蒽醌可嵌入DNA并影响拓扑异构酶II的活性,从而导致DNA损伤<sup>[16]</sup>。今后可进一步研究溶剂红207的代谢产物及其与DNA的亲合力,明确其导致突变的物质基础。

约70%左右的致癌物可导致基因突变,后者认为是癌症发生发展的基础<sup>[17]</sup>。因此以碱基突变为评价终点的Ames波动试验在遗传毒性评价中备受重视。而基于液态培养法的Ames波动试验可减少化合物的用量,提高评价结果的客观性,在化合物早期筛选中也有一定应用<sup>[18]</sup>。体外*Pig-a*基因突变试验于2015年由Kruger等首次利用TK6细胞建立<sup>[19]</sup>,本实验室于2019年在国内首次建立基于L5178Y细胞的体外*Pig-a*基因突变试验<sup>[11]</sup>。当前国内外已使用近30种化合物对体外*Pig-a*基因突变试验方法进行验证,结果提示该方法可有效检出致突变化合物,且可以区分不同作用机制的遗传毒性化合物<sup>[20-21]</sup>。本研究中溶剂红207在体外代谢活化条件下导致回复突变菌落数和突变细胞数均多于非代谢活化条件,Ames波动试验和体外*Pig-a*基因突变试验结果存在一致性。因此,基于哺乳动物细胞的体外*Pig-a*基因突变试验数据可与基于细菌的Ames试验数据相互印证,前者可作为后者的补充,用以提供更多与受试物致突变性相关的信息。上述高通量致突变性评价方法尤其适用于多种微量化合物的早期筛选。

本研究首次开展Ames波动试验和体外*Pig-a*基因突变试验评价溶剂红207的致突变风险,发现其存在致突变性且经I相代谢活化后致突变性进一步增强。本研究是应用新型体外高通量试验方法评价合成量有限化合物的致突变性的示范,研究结果也为溶剂红207的监管提供重要参考依据。

#### 参考文献

- [1] 中华人民共和国食品安全法 [S]. 2018.
- [2] 化妆品安全技术规范 [S]. 2015.
- [3] 胡莉,靳可婷,仲伶俐,等.鸡蛋喷码油墨成分的测定及膳食安全分析 [J]. 食品安全质量检测学报, 2018, 9 (2): 429-433.
- [4] 姜子波,任国杰,毛希琴,等.高效液相色谱-串联质谱法同时测定化妆品中14种禁用着色剂 [J]. 分析测试学报, 2016, 35(7): 792-798.
- [5] Hami A, Beyazit I. *Food Chain Security* [M]. Berlin: Springer Netherlands, 2010: 23-48.

- [6] 张小梅, 刘琳, 逯越, 等. 羟基醌醇对苏丹红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.
- [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] National Toxicology Program. 14th report on carcinogens basic red 9 monohydrochloride [EB/OL]. (2016-11-3) [2020-9-3]. <https://www.scirp.org/reference/referencespapers.aspx?referenceid=2294695>
- [9] 汪祺, 王亚楠, 颜玉静, 等. 染料苏丹红的高通量致突变性筛选 [J]. 药物评价研究, 2020, 43(9): 1747-1753.
- [10] Wang Y Y, Revollo J, McKinzie P, et al. Establishing a novel Pig-a gene mutation assay in L5178YTK<sup>+/+</sup> mouse lymphoma cells [J]. Environ Mol Mutagen, 2018, doi: org/10.1002/em.22152.
- [11] 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.
- [12] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some traditional herbal medicines, some mycotoxins, naphthalene and styrene [J]. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 2002, 82: 1-556.
- [13] International Agency for Research on Cancer (IARC). Overall evaluations of carcinogenicity: an updating of IARC monographs volumes 1 to 42 [J]. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 1987, 7: 82-83.
- [14] International Agency for Research on Cancer (IARC). Pharmaceutical drugs [J]. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 1990, 50: 265-275.
- [15] Ohkuma Y, Hiraku Y, Kawanishi S. Sequence-specific DNA damage induced by carcinogenic danthron and anthraquinone in the presence of Cu (II), cytochrome P450 reductase and NADPH [J]. Free Radic Res, 2001, 34(6): 595-604.
- [16] Mueller S O, Lutz W K, Stopper H. Factors affecting the genotoxic potency ranking of natural anthraquinones in mammalian cell culture systems [J]. Mutat Res, 1998, 414(1-3): 125-129.
- [17] 王亚楠, 文海若, 王雪. 遗传毒性基因突变评价方法的研究进展 [J]. 癌变·畸变·突变, 2019, 31(5): 406-411.
- [18] 文海若, 宋捷, 刘倩, 等. Ames波动试验和GADD45a-GFP GreenScreen两种快速筛选方法评价大黄素和芫花素的遗传毒性 [J]. 药物评价研究, 2018, 41(5): 734-741.
- [19] Krüger C T, Hofmann M, Hartwig A. The *in vitro* PIG-A gene mutation assay: mutagenicity testing via flow cytometry based on the glycosylphosphatidylinositol (GPI) status of TK6 cells [J]. Arch Toxicol, 2015, 89(12): 2429-2443.
- [20] 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: 283-297.
- [21] David R, Talbot E, Allen B, et al. The development of an *in vitro* Pig-a assay in L5178Y cells [J]. Arch Toxicol, 2018, 92(4): 1609-1623.