

茜素型蒽醌基因突变风险评价

文海若^{1#}, 闫明^{1, 2#}, 叶倩^{1, 2}, 宋捷¹, 鄂蕊¹, 汪祺^{2*}

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 使用毒性预测软件及细菌回复突变(Ames)试验评价茜素型蒽醌的基因突变风险。方法 通过毒性软件Toxtree、Derek Nexus和Sarah Nexus对茜素型蒽醌: 茜草素、异茜草素、甲基异茜草素、甲基异茜草素-1-甲醚、茜素-1-甲醚、羟基茜草素、光泽汀进行致突变风险预测; 每个受试物设置5个给药浓度, 分别在有或无S9代谢活化条件下, 使用5种鼠伤寒沙门氏菌TA97、TA100、TA102、TA1535和TA1537开展基于6孔板培养的Ames试验, 判断该类化合物苯环上不同取代基对致突变性的影响。结果 软件基于蒽醌环的存在预测该类化合物均具有致突变风险。在非S9代谢活化下, 异茜草素和羟基茜草素可导致TA1537回复突变菌落数增加; 光泽汀可诱导TA97、TA100和TA1537回复突变菌落数增加。在S9代谢活化下, 异茜草素可导致TA97、TA100和TA1537回复突变菌落数增加; 羟基茜草素可导致TA1537回复突变菌落数增加; 光泽汀可导致TA97、TA100和TA1537回复突变菌落数增加; 甲基异茜草素可导致TA97、TA100、TA102和TA1537回复突变菌落数大幅增加; 甲基异茜草素-1-甲醚可导致TA100回复突变菌落数增加。结论 茜素型蒽醌受试物在有或无S9代谢条件下表现出不同程度、不同菌株的回复突变, 开展相关研究评价其毒性风险对该类化合物合理监管具有重要价值。

关键词: 茜素型蒽醌; 基因突变; 遗传毒性; 构效预测; 细菌回复突变试验; 茜草素; 异茜草素; 甲基异茜草素; 甲基异茜草素-1-甲醚; 茜素-1-甲醚; 羟基茜草素; 光泽汀

中图分类号: R994 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)02-0234-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.02.005

Mutagenic risk assessment of rubiacin-type anthraquinone

WEN Hairuo¹, YAN Ming^{1, 2}, YE Qian^{1, 2}, SONG Jie¹, E Rui¹, WANG Qi²

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

2. China Pharmaceutical University, Nanjing, 211198, China

Abstract: **Objective** Use genotoxicity prediction softwares and mini-Ames assay to evaluate the mutation risk of alizarin-type anthraquinones. **Methods** The mutation risk of a series of alizarin-type anthraquinones (alizarin, xanthopurpurin, rubiadin, rubiadin-1-methyl ether, alizarin-1-methyl ether, prupurin, and lucidin) was predicted by toxicity prediction softwares (Toxtree, Derek Nexus and Sarah Nexus). The Ames test based on 6-well plate culture was carried out with five kinds of *Salmonella typhimurium* TA97, TA100, TA102, TA1535 and TA1537 with or without S9 metabolic activation to determine the effects of different substituents of the benzene ring on mutagenicity. **Results** Based on the presence of anthraquinone rings, the softwares predicted that all of these compounds had mutagenicity risk. Under the condition of non-S9 metabolic activation in the Ames assay, xanthopurpurin and purpurin could increase the number of mutant colonies of TA1537 compared with the control group. Lucidin could induce the increase of mutant colonies of TA97, TA100, and TA1537. Under the activation of S9 metabolism, xanthopurpurin could increase the number of reverse mutant colonies of TA97, TA100 and TA1537, and purpurin could increase the number of reverse mutant colonies of TA1537. Lucidin could increase the number of reverse mutation colonies of TA97, TA100, and TA1537. Rubiadin could cause TA97, TA100, TA102 and TA1537 reverse mutation colony numbers greatly increased, rubiadin-1-methyl ether can lead to TA100 reverse mutation colonies number increased. **Conclusion** Alizarin-type anthraquinones showed different degree of reverse mutation

收稿日期: 2021-06-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81503347、81503068); 国家十三五“重大新药创制”专项(2018ZX09201017-001); 中国食品药品检定研究院学科带头人培养基金(2019X4)

#共同第一作者: 文海若, 研究员, 研究方向为药理毒理。E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

闫明, 硕士研究生, 研究方向为药物遗传毒理。E-mail: yanming0120@sina.com

*通信作者: 汪祺, 副研究员, 研究方向为中药毒理。E-mail: sansan8251@sina.com

in different strains in the presence or absence of S9 metabolism. It is of great value to carry out further relevant studies to evaluate the toxicity risk for rational regulation of these compounds.

Key words: alizarin-type anthraquinones; gene mutation; genotoxicity; structure-activity prediction; mini-Ames test; alizarin; xanthopurpurin; rubiadin; rubiadin-1-methyl ether; alizarin-1-methyl ether; prupurin; lucidin

蒽醌包括大黄素型蒽醌和茜素型蒽醌,在大黄、何首乌、虎杖、巴戟天等中药中含量较高^[1],具有治疗便秘^[2]、抗炎^[3]、抗菌^[4]、抗肿瘤^[5]等功效。此外,蒽醌也是合成工业原料纤维素的重要原材料,在多种食品包装中有一定残留^[6]。当前大黄素型蒽醌的遗传毒性研究较多,结果表明大黄素可导致碱基突变与DNA断裂,在细菌回复突变(Ames)试验及彗星试验中呈阳性结果^[7]。其作用机制与蒽醌环的平面稠环结构可嵌入碱基序列及抑制ATP与拓扑异构酶II结合有关^[8]。致癌试验结果提示,连续2年ig给予F344/N大鼠110~1 100 mg·kg⁻¹大黄素,可导致雌性大鼠外耳道腺癌发生率升高^[9]。国际职业安全与健康研究所毒性数据显示蒽醌类化合物具有致突变和致癌性风险^[10],德国联邦风险评估研究所(bundesinstitut für risikobewertung, BfR)于2013年将其从食品包装推荐使用材料清单中除名^[11]。世界卫生组织国际癌症研究机构(international agency for research on cancer, IARC)将蒽醌列为2B类致癌物,即对人体致癌性数据不充分,上述研究为蒽醌母核类化合物毒性预测的必要性和可行性提供重要数据支撑。

茜素型蒽醌,包括茜草素、异茜草素、羟基茜草素等,为茜草科植物茜草、巴戟天的主要药效学成分^[12],具有一定临床药用价值,应用范围较广。虽然该类化合物同样含蒽醌母核,但与大黄素型蒽醌羟基在苯环上的分布不同,母核结构见图1,取代基位置见表1。当前尚无研究对系列茜素型蒽醌的致突变风险进行充分梳理和评价,其致癌风险不明确。本研究首次使用毒性构效分析软件及Ames试验对一系列茜素型蒽醌的致突变风险进行评估,判断不同修饰基团对突变风险的影响,为蒽醌类化合物毒性预测及含茜素型蒽醌药物的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 菌株

鼠伤寒沙门氏菌组氨酸营养缺陷型(*his*⁻)菌株TA97、TA100、TA102、TA1535和TA1537,引自日本(株)生物科学中心(JBSINC),经分离筛选后对其是否存在氨基酸及生物素合成缺陷、细胞壁脂多糖

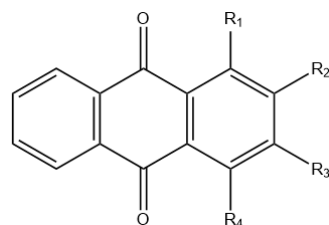


图1 茜素型蒽醌化合物母核

Fig. 1 Parent nucleus of rubiacin-type anthraquinone

表1 茜素型蒽醌化合物取代基信息

Table 1 Substituents of alizarin type anthraquinone compounds

茜素型蒽醌	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 ₂ CH ₃	OH	H	H
光泽汀	OH	CH ₂ OH	OH	H

缺失(*rfa*)、紫外线修复缺陷(*uvrA*或 Δ *uvrB*)、抗氨基青霉素及抗四环素(含pKM101或pAQ1质粒)等特性进行鉴定,鉴定结果符合要求后用于实验^[13]。

1.2 主要试剂

受试物:异茜草素(xanthopurpurin,批号wkq19120903,质量分数>95%),购自上海扶生实业有限公司;茜草素(alizarin,批号T23J10T80571,质量分数>95%)、甲基异茜草素(rubiadin,批号w27A10z96220,质量分数>95%)、甲基异茜草素-1-甲醚(rubiadin-1-methyl ether,批号W13J11Z108210,质量分数>95%)、茜草素-1-甲醚(alizarin-1-methyl ether,批号P16J11S108411,质量分数>95%)、羟基茜草素(prupurin,批号Y24A8H42410,质量分数>95%)、光泽汀(lucidin,批号S1ZD11D134341,质量分数>95%),购自上海源叶生物科技有限公司。

溶媒及阳性对照:二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)、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)购自美国Sigma公司;叠氮钠(sodium azide, NaN₃)购自美国Merck公司;9-氨基吡啶(9-

aminoacridine, 9-AA) 购自美国 Acros Organics 公司。

其他试剂: 营养肉汤 (CM0067 nutrient broth No.2) 购自英国 OXOID 公司; 琼脂粉 (agar powder)、氨苄青霉素、葡萄糖、组氨酸、色氨酸、生物素、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、柠檬酸钠 $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、NADP、G-6-P、KCl、 MgCl_2 均购自美国 Sigma 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。

1.3 主要仪器

二氧化碳培养箱 (HERA cell VIOS 160i, 赛默飞世尔科技公司); 生物安全柜 (NU-543-400S, 美国 Nuair 公司); 恒温培养箱 (MIR-253, 日本三洋公司); 倒置显微镜 (CKX31, 日本 Nikon 公司); NTS-1300 水浴摇床 (东京理化器械株式会社); IS600 细菌培养箱 (日本 YAMATO 公司)。

2 方法

2.1 构效软件预测

分别将受试物结构导入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)、基于专业知识的化合物毒性预测软件 Derek Nexus 和基于统计的化合物毒性预测软件 Sarah Nexus (version 6.0.1, Lhasa Limited, UK), 以致突变性为毒性终点预测其导致细菌突变的风险及可能的警示结构。

2.2 Ames 试验

琼脂及溶液制备方法参考文献报道^[14]。细菌冻融液与营养肉汤混合后置于水浴摇床在 37°C 、 $120\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 条件下扩增 10 h, 扩增后使用酶标仪对吸光度值进行检测, 估算活菌浓度达到 $1 \times 10^9\text{ cfu} \cdot \text{mL}^{-1}$ 后用于试验。根据受试物溶解度, 并根据抑菌情况调整后, 每个受试物设置 5 个给药浓度, 分别在有或无 S9 代谢活化条件下, 使用 5 种不同鼠伤寒沙门氏菌开展基于 6 孔板培养的 Ames 试验^[15]。设置溶媒对照 (DMSO) 组, 每组平行 3 孔, 所有样本置于 37°C 恒温培养约 48 h 后进行菌落计数, 试验重复 3 次。

2.3 菌落计数及结果判定

计数每孔中的回复菌落数量, 每个浓度组均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。TA1535 和 TA1537 给药组平均每皿 (孔) 中的回复菌落数大于溶媒对照组的 3 倍、其他菌株给药组平均每皿 (孔) 中的回复菌落数大于溶媒对照组的 2 倍且存在量效关系时判断结果为阳性; 反之则为阴性。

3 结果

3.1 基因突变风险预测

遗传毒性警示结构 (alert structure) 指化合物中某些具有 DNA 反应活性的基团或亚单位, 可导致基因突变或染色体重排/断裂^[16]。特征基因突变是导致大多数癌症发生的原因^[17], 因此含警示结构的化合物具有一定致癌风险。警示结构的概念已广泛应用于毒性预测数据库的构建。Toxtree 预测结果提示本研究涉及的全部蒽醌类化合物均可导致沙门氏菌回复突变菌落显著增加; Derek Nexus 作为另一个基于文献回顾的数据库, 则根据本研究受试物均存在羟基蒽醌结构及蒽-9, 10-二醇前体结构认为所有化合物有致突变风险。而上述结论的试验均基于羟基蒽醌, 如 1-胺-4-羟基蒽醌和 2-羟基蒽醌, 可导致 TA1537 和 TA98 菌株回复性突变菌落显著增加^[18]。Sarah Nexus 则对受试物结构进行分解, 检索数据库中所有与受试物结构类似的化合物及其细菌突变数据, 估算其导致碱基突变的化合物结构及该结构导致碱基突变的可能性, 尽管所有受试物经 Sarah Nexus 预测均为阳性结果, 但甲基异茜草素-1-甲醚和茜草素-1-甲醚的致突变风险与其他化合物相比较低。结果见表 2。

3.2 Ames 试验结果

在非 S9 代谢活化条件下, 茜草素、甲基异茜草素、甲基异茜草素-1-甲醚和茜素-1-甲醚均为阴性。与对照组相比, 异茜草素和羟基茜草素可导致 TA1537 的回复突变菌落数增加; 光泽汀可诱导 TA97、TA100 和 TA1527 的回复突变菌落数增加, 且存在一定剂量效应相关性, 与文献报道一致^[19]。结果见表 3。

在 S9 代谢活化条件下, 异茜草素可导致 TA97、TA100 (但未见明显剂量效应关系) 和 TA1537 的回复突变菌落数增加; 羟基茜草素可导致 TA1537 的回复突变菌落数增加; 光泽汀可导致 TA97、TA100 和 TA1537 的回复突变菌落数增加, 且存在剂量效应关系。甲基异茜草素可导致 TA97、TA100、TA102 和 TA1537 的回复突变菌落数大幅增加且存在剂量效应关系; 甲基异茜草素-1-甲醚可导致 TA100 的回复突变菌落数增加。而茜草素和茜素-1-甲醚仍为阴性结果。上述结果提示代谢活化可增加异茜草素、甲基异茜草素、甲基异茜草素-1-甲醚和羟基茜草素的致突变风险, 其中甲基异茜草素在 S9 代谢条件下具有较强致突变性。结果见表 4。

表2 化合物诱导细菌突变风险预测结果及警示结构

Table 2 Risk prediction results and warning structure of bacterial mutation induced by compounds

茜素型蒽醌	CAS 号	Toxtree	Derek Nexus	Sarah Nexus可信度/%					Sarah Nexus 结论
				可疑结构1	可疑结构2	可疑结构3	可疑结构4	可疑结构5	
茜草素	72-48-0	沙门氏菌	存在阳性致突变警示结构:羟基蒽醌	100	100	100	/	/	阳性
异茜草素	518-83-2	阳性	醌及蒽-9,10-二醇前体	100	100	100	/	/	阳性
甲基异茜草素	117-02-2			100	100	100	/	/	阳性
羟基茜草素	81-54-9			100	100	100	/	/	阳性
甲基异茜草素-1-甲醚	7460-43-7			25	14	/	/	/	阳性
茜草素-1-甲醚	6170/6/5			25	14	/	18	/	阳性
光泽汀	478-08-0			100	100	/	/	100	阳性

表3 非代谢活化条件下Ames试验结果($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 3 Results of Ames test under non metabolic activation ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{孔}^{-1}$)	回复突变菌落数					组别	浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{孔}^{-1}$)	回复突变菌落数				
		TA97	TA100	TA102	TA1535	TA1537			TA97	TA100	TA102	TA1535	TA1537
溶媒对照	—	60±2	18±4	40±12	8±2	3±2		87.5	60±7	25±4	33±4	5±1	4±2
阳性对照*	*	173±17	62±11	197±21	406±13	1 287±215		175.0	58±2	25±6	38±3	2±2	1±1
茜草素	0.84	40±4	16±6	5±2	2±3	2±1	茜素-1-甲醚	350.0	55±3	22±4	34±1	3±2	3±2
	1.69	38±3	21±6	3±2	1±1	2±1		40.7	60±11	20±7	42±1	2±1	2±2
	3.37	39±4	13±6	7±2	2±1	5±3		81.4	59±7	22±4	36±2	3±1	4±3
	6.75	41±8	21±3	9±3	1±0	3±3		162.5	60±7	27±8	41±1	4±1	3±1
	13.50	16±9	10±10	5±3	1±1	4±1		325.0	50±4	19±1	34±6	2±3	3±2
异茜草素	31.3	75±3	27±3	40±5	3±2	6±2	羟基茜草素	650.0	44±8	15±4	41±9	3±1	3±1
	62.5	76±6	26±3	38±7	1±2	4±2		31.3	63±1	19±5	42±1	3±1	11±3
	125.0	79±6	23±9	41±7	4±0	11±3		62.5	71±6	19±4	40±3	2±1	13±1
	250.0	81±6	22±6	42±10	3±2	18±5		125.0	71±15	19±5	24±3	1±1	18±4
	5 000.0	63±11	19±4	33±8	2±1	26±4		250.0	57±4	16±6	9±2	3±1	37±33
甲基异茜草素	31.3	58±11	20±5	36±4	2±2	3±1	光泽汀	500.0	40±4	1±1	0±1	0±0	23±1
	62.5	68±2	26±3	41±2	3±1	5±1		0.062 5	79±19	30±17	6±3	2±1	5±2
	125.0	61±10	22±8	35±5	4±2	4±2		0.125 0	130±12	94±32	7±4	3±3	11±7
	250.0	57±12	28±4	32±0	3±2	3±1		0.250 0	167±9	98±35	8±1	2±2	21±6
	500.0	63±1	28±7	39±5	2±1	4±2		0.500 0	299±36	187±28	8±4	2±2	39±5
甲基异茜草素-1-甲醚	43.8	56±12	24±5	40±11	2±0	3±1		1.000 0	353±13	292±30	24±10	4±2	50±9

*TA97、TA100和TA102的阳性对照为AF-2(0.006 $\mu\text{g} \cdot \text{孔}^{-1}$); TA1535的阳性对照为NaN₃(0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{孔}^{-1}$); TA1537的阳性对照为9-AA(12 $\mu\text{g} \cdot \text{孔}^{-1}$)

*Positive controls of TA97, TA100 and TA102 were AF-2 (0.006 $\mu\text{g} \cdot \text{hole}^{-1}$); Positive control of TA1535 was NaN₃ (0.1 $\mu\text{g} \cdot \text{hole}^{-1}$); Positive control of TA1537 was 9-AA (12 $\mu\text{g} \cdot \text{hole}^{-1}$)

表4 代谢活化条件下Ames试验结果($\bar{x} \pm s, n=9$)Table 4 Ames test results under metabolic activation conditions ($\bar{x} \pm s, n=9$)

组别	浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{孔}^{-1}$)	回复突变菌落数					组别	浓度/ ($\mu\text{g} \cdot \text{孔}^{-1}$)	回复突变菌落数				
		TA97	TA100	TA102	TA1535	TA1537			TA97	TA100	TA102	TA1535	TA1537
溶媒对照	20	43±3	20±5	21±6	3±2	4±3		313	51±9	42±10	17±2	4±1	6±1
2-AA	0.2	317±40	109±26	89±11	137±7	34±14		625	49±8	35±8	15±2	7±2	5±3
茜草素	5	33±5	11±1	13±3	1±1	3±1		1 250	44±5	34±3	15±4	5±2	7±1
	10	41±4	6±2	15±3	2±2	2±1	茜素-1- 甲醚	78	40±7	25±3	20±6	2±3	8±2
	15	38±13	2±1	11±2	2±1	3±0		156	40±1	26±1	17±3	4±0	4±2
	20	22±3	9±1	13±3	3±2	3±1		313	46±3	22±2	25±3	3±2	9±5
	25	10±5	3±0	9±2	2±2	5±1		625	47±4	30±6	16±2	4±2	8±5
异茜草素	313	67±2	26±2	20±2	4±2	27±8		1 250	38±8	24±6	17±8	1±2	2±2
	625	66±7	46±9	21±6	5±3	26±6	羟基茜 草素	78	52±12	20±5	23±8	3±2	17±3
	1 250	74±11	35±3	23±5	5±2	43±5		156	68±5	32±2	20±3	3±1	17±1
	2 500	89±5	40±7	26±4	4±3	34±13		313	77±4	29±5	18±4	5±2	24±8
	5 000	78±4	35±5	30±6	2±2	53±8		625	79±6	35±5	18±2	4±3	27±5
甲基异茜 草素	78	423±51	775±137	44±13	8±3	31±18		1 250	76±15	28±8	2±1	5±2	28±8
	156	505±35	696±57	74±21	6±1	68±6	光泽汀	0.06	56±4	37±1	6±4	2±2	3±1
	313	549±70	691±57	78±19	7±2	48±19		0.25	139±21	122±14	9±5	3±2	2±2
	625	604±52	740±80	82±27	3±2	66±32		0.50	283±13	249±10	12±2	1±1	12±1
	1 250	575±35	688±50	82±24	4±2	49±17		1.00	290±14	238±42	11±2	7±4	11±3
甲基异茜草 素-1-甲醚	78	51±3	41±8	18±2	2±1	8±0		2.00	207±16	274±17	13±8	5±2	6±2
	156	53±5	45±2	15±3	4±2	8±4							

4 讨论

本研究首次对一系列茜素型蒽醌的致突变性从结构和细菌突变风险角度进行致突变性评价。当前茜素型蒽醌的致突变数据匮乏,仅有零星茜草根提取物和个别单体致突变性研究报道。国内学者使用林茜草根醇提物开展TA97、TA98、TA100及TA102 4个菌株Ames试验结果为阴性^[20];国外研究从茜草植物中提取得到茜草素昔(alizarinprimeveroside, AIP)和光泽汀昔(lucidinprimeveroside, LUP)^[12], AIP经大鼠ig给药代谢得到茜草素和1-羟基蒽醌,后者已被证实为一种哺乳动物致癌物^[21], LUP经大鼠ig代谢产生光泽汀和甲基异茜草素,光泽汀已被证实具有致突变作用,文献报道其可诱导多种菌株回复突变率增加^[19],并在大鼠肝脏及肾脏中形成特异性DNA加合物,导致DNA损伤^[22],而甲基异茜草素一方面有文献报道其具有抗病毒^[23]、肝保护^[24]以及抗氧化^[25]等多种药理作用,另有文献报道其在大鼠长期多器官实验中可导致肾脏发生癌变^[26]。茜素型蒽醌具有相同母环结构,毒理学数据库根据与其结构类似的蒽醌类化合物判断所有茜素型蒽醌均存在致突

变风险。从化学药物科学监管的角度看,存在致突变风险的化合物应排除于药物主要活性成分,如作为杂质其含量应有严格限定。如仅以计算机毒理学的评价结果,则严重限制了该类化合物的使用,开展相关试验研究评价其毒性风险对该类化合物合理监管具有重要价值。

Ames试验结果提示在非代谢活化条件下,异茜草素、羟基茜草素和光泽汀可导致TA1537菌株回复突变数增加,该菌株对茜素型蒽醌化合物较为敏感;在试验体系中添加S9及I相代谢反应启动剂后,异茜草素除导致TA1537回复突变数增加外,也可导致TA97、TA100呈阳性结果。药物在肝脏的I相代谢反应主要包括氧化、还原及水解反应,代谢产物多包含亲电子基团使其与DNA的相互作用增强。值得注意的是甲基异茜草素经I相代谢后可导致TA97、TA100、TA102和TA1537的回复突变数显著增加,考虑其代谢产物有较强DNA亲和力,可诱导多类型碱基突变。甲基异茜草素与光泽汀在结构上的差异为前者R2位点为甲基,而后者为羟甲基,鉴于光泽汀在有代谢活化条件下可诱导多菌株突变数增加,推断甲基异茜草素与光泽汀有相同

或近似的I相代谢产物,或甲基异茜草素可代谢产生光泽汀。

同样为蒽醌类化合物,大黄素型蒽醌的羟基分布于两侧苯环,而茜素型蒽醌的羟基均位于同侧。本研究结果表明羟基和甲基数量是权衡突变风险的重要因素。当茜素型蒽醌结构侧链中仅含1个羟基时(如甲基异茜草素-1-甲醚和茜草素-1甲醚)未诱导细菌回复突变;含有2个及以上羟基时可诱导突变;当甲基变为羟甲基后(如甲基异茜草素经I相代谢和光泽汀R₂取代位点),致突变风险明显升高。大黄素型蒽醌主要诱导TA98和TA1537发生突变,两者突变类型分别为G:C置换和G:C移码^[15]。茜素型蒽醌结果与大黄素型蒽醌类似,以诱导针对G:C碱基突变的TA1537、TA97和TA100突变为主,然而甲基异茜草素可诱导检测A:T碱基置换的TA102回复突变数增加,其诱导突变的作用机制及特点需进一步通过哺乳动物体内致突变实验研究证实。

本研究通过评价一系列茜素型蒽醌的致突变风险,为含茜素型蒽醌药物的致癌性风险界定及在药材中的定量和有效监管提供重要借鉴,为毒理学构效预测数据库提供重要数据支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Monks T J, Hanzlik R P, Cohen G M, et al. Quinone chemistry and toxicity [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1992, 112(1):2-16.
- [2] van Gorkom B A, de Vries E G, Karrenbeld A, et al. Review article: Anthranoid laxatives and their potential carcinogenic effects [J]. Aliment Pharmacol Ther, 1999, 13(4): 443-452.
- [3] Khan K, Karodi R, Siddiqui A, et al. Development of anti-acne gel formulation of anthraquinones rich fraction from *Rubia cordifolia* (Rubiaceae) [J]. Int J Appl Res Nat Prod, 2012, 4: 28-36.
- [4] Fosso M Y, Chan K Y, Gregory R, et al. Library synthesis and antibacterial investigation of cationic anthraquinone analogs [J]. ACS Comb Sci, 2012, 14(3): 231-235.
- [5] Huang Q, Lu G D, Shen H M, et al. Anti-cancer properties of anthraquinones from rhubarb [J]. Med Res Rev, 2007, 27(5): 609-630.
- [6] 汪 焯. 蒽醌在茶叶种植和加工过程中的输入机制 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2017.
Wang X. The input of 9, 10-anthraquinone in tea cultivation and processing [D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2017.
- [7] Sevcovicova A, Bodnarova K, Loderer D, et al. Dual activities of emodin: DNA protectivity vs mutagenicity [J]. Neuro Endocrinol Lett, 2014, 35(Suppl 2): 149-154.
- [8] Li Y, Luan Y, Qi X M, 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.
- [9] National Toxicology Program. NTP toxicology and carcinogenesis studies of EMODIN (CAS NO. 518-82-1) feed studies in F344/N rats and B6C3F1 mice [J]. Natl Toxicol Program Tech Rep Ser, 2001, 493: 1-278.
- [10] National Toxicology Program. NTP technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of anthraquinone (CAS No. 84-65-1) in F344/N rats and B6C3F1 mice (Feed Studies) [J]. Natl Toxicol Program Tech Rep Ser, 2005(494): 1-358.
- [11] BfR. BfR removes anthraquinone from its list of recommendations for food packaging [EB/OL]. (2013-03-12) [2021-01-28]. <https://www.bfr.bund.de/cm/349/bfr-removes-anthraquinone-from-its-list-of-recommendations-for-food-packaging.pdf>.
- [12] Blömeke B, Poginsky B, Schmutte C, et al. Formation of genotoxic metabolites from anthraquinone glycosides, present in *Rubia tinctorum* L [J]. Mutat Res, 1992, 265 (2): 263-272.
- [13] 胡燕平, 宋 捷, 李 波. 细菌回复突变试验背景数据的采集 [J]. 中国新药杂志, 2009, 18(22): 2110-2112.
Hu Y P, Song J, Li B. Collecting historical data in bacterial reverse mutation test [J]. Chin J New Drugs, 2009, 18(22): 2110-2112.
- [14] Gatehouse D. Bacterial mutagenicity assays: Test methods [J]. Methods Mol Biol, 2012, 817: 21-34.
- [15] 文海若, 宋 捷, 鄂 蕊, 等. 微孔板与标准皿Ames试验比较研究 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(5): 884-889.
Wen H R, Song J, E R, et al. Comparative study on microplate and standard plate Ames Tests [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(5): 884-889.
- [16] 马 磊, 马玉楠, 陈 震, 等. 遗传毒性杂质的警示结构 [J]. 中国新药杂志, 2014, 23(18):2106-2111.
Ma L, Ma Y N, Chen Z, et al. Structural alerts of genotoxic impurities [J]. Chin J New Drugs, 2014, 23 (18): 2106-2111.
- [17] Saito Y, Koya J, Araki M, et al. Landscape and function of multiple mutations within individual oncogenes [J]. Nature, 2020, 582(7810): 95-99.
- [18] Butterworth B E, Mathre O B, Ballinger K E, et al. Contamination is a frequent confounding factor in

- toxicology studies with anthraquinone and related compounds [J]. Int J Toxicol, 2004, 23(5): 335-344.
- [19] Westendorf J, Poginsky B, Marquardt H, et al. The genotoxicity of lucidin, a natural component of *Rubia tinctorum* L., and lucidinethylether, a component of ethanolic *Rubia* extracts [J]. Cell Biol Toxicol, 1988, 4 (2): 225-239.
- [20] 张跃华, 邹春颖, 施忠凯, 等. 林茜草根醇提取液毒性及致突变性试验 [J]. 毒理学杂志, 2006, 20(5): 328-329.
- Zhang Y H, Zou C Y, Shi Z K, et al. Toxicity and mutagenicity test of alcohol extract from *Radix rubiae* [J]. J Toxicol, 2006, 20(5): 328-329.
- [21] Mori H, Yoshimi N, Iwata H, et al. Carcinogenicity of naturally occurring 1-hydroxyanthraquinone in rats: Induction of large bowel, liver and stomach neoplasms [J]. Carcinogenesis, 1990, 11(5): 799-802.
- [22] Ishii Y, Inoue K, Takasu S, et al. Determination of lucidin-specific DNA adducts by liquid chromatography with tandem mass spectrometry in the livers and kidneys of rats given lucidin-3-*O*-primeveroside [J]. Chem Res Toxicol, 2012, 25(5): 1112-1118.
- [23] Peng Z, Fang G, Peng F H, et al. Effects of rubiadin isolated from *Prismatomeris connata* on anti-hepatitis B virus activity *in vitro* [J]. Phytother Res, 2017, 31(12): 1962-1970.
- [24] Rao G M, Rao C V, Pushpangadan P, et al. Hepatoprotective effects of rubiadin, a major constituent of *Rubia cordifolia* Linn [J]. J Ethnopharmacol, 2006, 103 (3): 484-490.
- [25] Tripathi Y B, Sharma M, Manickam M. Rubiadin, a new antioxidant from *Rubia cordifolia* [J]. Indian J Biochem Biophys, 1997, 34(3): 302-306.
- [26] Inoue K, Yoshida M, Takahashi M, et al. Possible contribution of rubiadin, a metabolite of madder color, to renal carcinogenesis in rats [J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(4): 752-759.

[责任编辑 兰新新]