

金橙 II 及金胺 O 的体外遗传毒性评价

唐茵茹^{1,2}, 王亚楠², 王曼虹^{1,2}, 黄芝瑛¹, 汪 祺^{2*}, 文海若^{2*}

1. 中山大学 药学院, 广东 广州 510006

2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050

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) 的体外微核试验评价 2 种染料金橙 II 和金胺 O 的遗传毒性风险。方法 在 -/+S9 处理下, 不同质量浓度的金橙 II 和金胺 O ($0.625 \sim 10.000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 分别与鼠伤寒沙门氏菌组氨酸营养缺陷型菌株 TA98 和 TA100 混合后接种于 96 孔板中, 37°C 下孵育 72 h 后判断其对细菌回复突变的影响; 在体外微核试验中, 在 -/+S9 处理下, 金橙 II ($10 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和金胺 O ($0.6 \sim 1.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 分别与 L5178Y 细胞作用 4 h 或 24 h, 并在给药后 24 h 收集细胞进行流式细胞术检测。结果 金橙 II 自 $2.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 起可引起 -S9 和 +S9 处理组的 TA98 回复性突变孔数显著增加 ($P < 0.05, 0.01$), 代谢活化后增加幅度更为明显; 自 $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 起可引起 -S9 处理组的 TA100 回复性突变孔数显著性增加 ($P < 0.01$), 作用均呈浓度相关性。10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 金胺 O 可引起 -S9 处理组的 TA98 回复性突变孔数显著增加 ($P < 0.01$); 自 $0.625 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 起即可引起 +S9 处理组的 TA98 回复性突变孔数显著增加 ($P < 0.05, 0.01$), 且存在浓度相关性; 自 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 起可引起 +S9 处理组的 TA100 回复性突变孔数显著性增加 ($P < 0.05, 0.01$), 且存在浓度相关性。在 -S9 处理组中, $30 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 金橙 II 可引起 L5178Y 细胞微核率显著增加 ($P < 0.01$), 且存在浓度相关性; $0.9 \sim 1.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 金胺 O 可引起 L5178Y 细胞微核率显著增加 ($P < 0.01$), 且存在浓度相关性。在 +S9 处理组中, $10 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 金橙 II 可导致 L5178Y 细胞微核率显著增加 ($P < 0.05, 0.01$), $30 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 金橙 II 可导致 S 期的 L5178Y 细胞比例增加; 金胺 O 自 $0.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 起即可导致 L5178Y 细胞亚二倍体细胞核率增加。结论 金橙 II 和金胺 O 均存在一定的遗传毒性风险。

关键词: 金橙 II; 金胺 O; 染料; 碱基突变; 波动 Ames 试验; 体外流式微核试验

中图分类号: R965.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 03-0434-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.03.005

In vitro genotoxicity evaluation of orange II and auramine O

TANG Yinru^{1,2}, WANG Yanan², WANG Manhong^{1,2}, HUANG Zhiying¹, WANG Qi², WEN Hairuo²

1. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China

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

Abstract: Objective To evaluate the genotoxicity of two dyes orange II and auramine O using the fluctuation Ames test based on *Salmonella typhimurium* and the *in vitro* micronucleus test based on L5178Y mouse lymphoma cells. **Methods** A series of concentrations of orange II and auramine O ($0.625 \sim 10.000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) were mixed with TA98 and TA100, respectively, and then cultured into 96-well plates. After incubating at 37°C for 72 h, their effects on mutagenic respond were determined. In addition, L5178Y cells were treated with orange II ($10 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) and auramine O ($0.6 \sim 1.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) for 4 h or 24 h without or with metabolic activation, and cells were collected for *in vitro* micronucleus assay by flow cytometry. **Results** Orange II from $2.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ could significantly increase the number of TA98 reverse mutation pores in -S9 and +S9 treatment groups ($P < 0.05, 0.01$), and the increase was more obvious after metabolic activation. Orange II since $5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ could significantly increase the number of TA100 reverse mutation pores in -S9 treatment group ($P < 0.01$). Auramine O of $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ could significantly increase the number of TA98 reverse mutation pores in -S9 treatment group ($P < 0.01$). Auramine O from $0.625 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ could significantly increase the number of TA98 reverse mutation pores in +S9 treatment group ($P < 0.05, 0.01$), and there was a concentration correlation. Auramine O from $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ could significantly increase the number of TA100 reverse mutation pores in +S9 treatment group ($P <$

收稿日期: 2021-09-16

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: 唐茵茹, 硕士研究生, 从事遗传毒理研究。E-mail: tangyr3@mail2.sysu.edu.cn

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

汪 祺, 研究员, 从事药物毒理研究。E-mail: sansan8251@sina.com

0.05, 0.01), and there was a concentration correlation. In the -S9 treatment group, 30—50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ orange II could significantly increase the micronucleus rate of L5178Y cells ($P < 0.01$). Auramine O of 0.9—1.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ could significantly increase the micronucleus rate of L5178Y cells ($P < 0.01$). In the +S9 treatment group, orange II of 10—50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ could significantly increase the micronucleus rate of L5178Y cells ($P < 0.05, 0.01$). Orange II of 30—50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ could increase the proportion of L5178Y cells in S phase, Auramine O at 0.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ could increase the rate of sub diploid nucleus of L5178Y cells. **Conclusion** Orange II and auramine O have genotoxic potentials.

Key words: orange II; auramine O; dyes; gene mutation; fluctuation Ames test; *in vitro* micronucleus assay by flow cytometry

色素根据来源可分为天然色素和合成色素两类^[1-2],可提升食品或药品的感官品质。天然色素为直接提取自动植物组织中的色素,包括姜黄素、胡萝卜素、红曲等,通常对人体无害;而合成色素则多以苯、甲苯、萘等为原料,多含有苯环或氧杂蒽结构,多具有毒性。其中苏丹红等可导致碱基突变^[3]和染色体损伤^[4],存在人体致癌风险,长期暴露于这类物质对人体健康产生严重危害。当前可使用的食品着色剂品种、适用范围及限量均在《食品安全国家标准食品添加剂使用标准》^[5]中有明确规定。然而随着新型人工合成色素不断涌现,有必要对其开展必要的毒理学研究,为安全应用和科学监管提供依据。

本研究对两种色素金橙 II (orange II) 和金胺 O (auramine O) 的遗传毒性风险进行研究,其化学结构见图 1。卤制品中可检出非法添加的金橙 II,后者可引起食物中毒。化合物毒性预测软件 Derek Nexus (Version 6.0.1, Lhasa Limited, UK) 基于金橙 II 为芳香偶氮化合物认为其存在致癌风险,同样含有该警示结构的色素油橙 SS 于 2017 年经世界卫生组织国际癌症研究机构 (international agency for research on cancer, IARC) 列为 2B 类致癌物,即对人类致癌性证据有限或不充分。截止目前,针对金橙 II 和金胺 O 已有相关补充检验方法颁布,如精制冠心片中检查金橙 II (补充检验方法编号为 BJJY201707); 妇科调经片中 (补充检验方法编号为 BJJY202010)、绿袍散 (补充检验方法编号为 BJJY201922) 及蒲黄药材 (补充检验方法编号为 BJJY201803) 中需检查金胺 O。研究报道金橙 II 在 4 种 DNA 修复缺陷型 DT40 细胞中均未表现出明显增强的 γH2AX 病灶或细胞生长抑制^[6], 而金橙 II 在菌株 TA1538 中及其还原产物 1-氨基-2-萘酚在菌株 TA100 中均表现为弱致突变性^[7-8], 然而当前尚未见金橙 II 在常见菌株 TA100 和 TA98 的细菌回复突变试验和微核试验的研究数据。金胺 O (又名碱性嫩黄 O) 曾被添加至豆制品中或用于皮制品染色, 人体接触或者吸入后可出现结膜炎、皮炎和上呼吸道刺

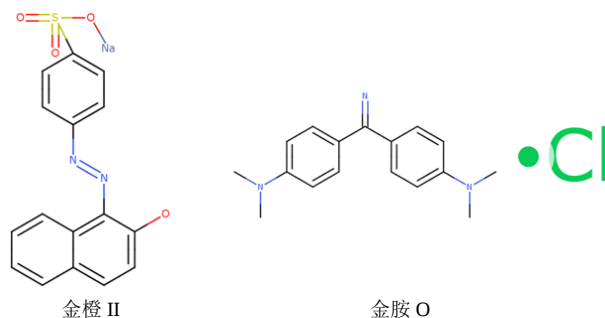


图 1 金橙 II 和金胺 O 的化学结构

Fig. 1 Chemical structure of orange II and auramine O

激性症状,严重时导致肝、肾损伤^[9]。然而, Derek Nexus 未检索到金胺 O 存在体外细菌致突变性警示结构。Tong 等^[10]研究发现金胺 O 可导致大鼠肝细胞染色体及 DNA 损伤,但大鼠外周血样本的基因突变和染色体损伤检测结果均为阴性。本研究分别开展基于鼠伤寒沙门氏菌 TA98 和 TA100 的波动 Ames 试验和基于 L5178Y 细胞的流式微核试验,综合碱基突变和染色体损伤两个终点,评价金胺 O 及金橙 II 的潜在遗传毒性风险。

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菌株 TA98 和 TA100, 来源于日本 (株) 生物科学中心 (JBS INC)。既往数据表明 98% 的致突变剂能被 TA98 和 TA100 结合所检测, 因此二者均为 Ames 波动试验常用的菌株。根据营养缺陷、细胞壁脂多糖屏障缺失、紫外线修复缺陷、结晶紫敏感性、抗四环素、抗氨基青霉素等特征对 TA98 和 TA100 进行筛选和鉴定, 鉴定合格者作为实验菌株, 扩增并于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冻存。

小鼠淋巴瘤细胞 L5178Y $tk^{+/-}$ -3.7.2C, 2C, 来自于日本国立医药品食品卫生研究所, 支原体检查合格后冻存于液氮中。本研究所用的 L5178Y 细胞均在 10 代以内。

1.2 药物与主要试剂

金橙 II (批号 111769-201903, 质量分数 $>98\%$)

和金胺O(批号111770-201302,质量分数>98%)标准品购自中国食品药品检定研究院;大鼠肝S9混合液购自北京安宝迪科技有限公司(由苯巴比妥钠和β-萘黄酮联合诱导大鼠肝脏制成);阳性对照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)、丝裂霉素C(mitomycin, MMC)、环磷酰胺(cyclophosphamide, CP),其他试剂DMSO、G-6-P等均购自美国Sigma-Aldrich公司;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 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、KCl、 MgCl_2 等购自国药集团化学试剂北京有限公司;NADPN₂购自美国Amresco公司;溴麝香草酚蓝购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;马血清(批号AC10235369)、磷酸缓冲液(PBS,批号AD19942268)购自美国Hyclone公司;RPMI 1640(批号2120137)和胎牛血清(批号2037144)购自Biological Industries;In Vitro MicroFlow试剂盒购自Litron Laboratories(10×Buffer,批号153680;裂解液1,批号155116;裂解液2,批号155117;Nucleic Acid Dye A,批号155147;Nucleic Acid Dye B,批号155149;RNase Solution,批号143714);Cell Sorting Set-up Beads for Blue Lasers(批号2044336)购自Thermo Fisher。

1.3 主要仪器

5810R型离心机(Eppendorf公司);NTS-1300水浴摇床(东京理化器械株式会社);IS600细菌培养箱(日本雅马拓公司);SPECTRAMax-PLUS型酶标仪(德国Molecular Devices公司);HERA cell VIOS 160i二氧化碳培养箱(赛默飞世尔科技公司);NU-543-400S生物安全柜(德国Nuair公司);FACSCalibur流式细胞仪(美国BD公司);CKX31倒置显微镜(Nikon公司);高压蒸汽灭菌器(日本SANYO公司);电子天平(Mettler Toledo公司)。

2 方法

2.1 Ames波动试验

2.1.1 菌株扩增 将20 μL TA98/TA100菌液加入至5 mL营养肉汤培养基中,置于37 °C下120 r·min⁻¹振摇过夜培养。培养后的菌液在酶标仪600 nm波长下的吸光度(A)值为0.4~0.6。随后使用0.1 mol·L⁻¹ PBS(pH 7.4)将菌液以1:9的比例稀释,37 °C、120 r·min⁻¹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[1 000 mL D-M half盐溶液

含 K_2HPO_4 38.5 g、 KH_2PO_4 11 g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.5 g、柠檬酸钠1.375 g]和选择性生长培养基(220.1 mL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)。上述溶液经高压灭菌后于4 °C保存备用。将0.1 mL稀释后培养的菌液和0.2 mL不同浓度受试物加入至20 mL选择性生长培养基中充分混匀,使用多通道移液器加入96孔板中,每孔0.2 mL。以金胺O和金胺II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,终质量浓度分别为0.625、1.250、2.500、5.000、10.000 μg·mL⁻¹,TA98菌株阳性对照AF-2终质量浓度为30 ng·mL⁻¹,TA100菌株阳性对照AF-2终质量浓度为10 ng·mL⁻¹,阴性对照组DMSO终体积分数为1%。每个受试物每个浓度平行设置2块板,置于37 °C培养箱中培养72 h。

2.1.3 活化条件下的Ames波动试验 D-M half盐溶液配制同“2.1.2”项。无菌条件下配制S9混合液[1 mL S9混合液含0.2 mol·L⁻¹磷酸钠缓冲液(pH 7.4)、0.1 mol·L⁻¹ NADPN₂、1 mol·L⁻¹ G-6-P、1.65 mol·L⁻¹ KCl、0.4 mol·L⁻¹ 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选择性生长培养基含100 mL 0.1 mol·L⁻¹ PBS(pH 7.4)、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]。取4.93 mL选择性生长培养基,加入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,阳性对照2-AA终质量浓度为750 ng·mL⁻¹,阴性对照DMSO终体积分数为1%。每个受试物每个浓度平行设置2块板。将96孔板置于37 °C培养箱孵育约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。

2.1.4 结果观察及评价标准 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 μg·mL⁻¹),肉眼观察每孔颜色并判断其回复性突变情况。黄色计为阳性,绿色计为阴性;介于黄绿之间的微孔以肉眼下结果为准:可见菌斑生长为阳性,无明显菌斑生长为阴性。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^[3]。不同浓度的受试物组回复突变菌落数超过阴性对照组2倍则判断结果为阳性^[3]。

2.2 基于L5178Y细胞的流式微核试验

2.2.1 给药处理 L5178Y细胞使用含有10%灭活马血清、1%青链霉素混合液和0.2 mg·mL⁻¹丙酮酸钠的RPMI 1640培养基,在37℃、5% CO₂的培养箱内悬浮培养,细胞倍增时间为9~11 h,隔天传代。

(1)短时(4 h)处理组:细胞达对数生长期后,更换为无血清的RPMI 1640培养基(含有1%青链霉素混合液和0.2 mg·mL⁻¹丙酮酸钠),每10毫升培养基加入2滴计数珠用以计算细胞的相对存活率。在2% S9 mix的条件下添加不同质量浓度的金胺O(0.6、0.9、1.2 μg·mL⁻¹)和金橙II(10、20、30 μg·mL⁻¹),同时设置阴性对照(DMSO)组和阳性对照(CP, 3.75 μg·mL⁻¹)组,每个浓度设置2个复孔。调整细胞密度为2.5×10⁵·mL⁻¹接种于24孔板,每孔2 mL。置于37℃、5% CO₂的培养箱内孵育4 h。处理后的细胞经1 000 r·min⁻¹室温离心5 min后,使用PBS洗涤2次,并重悬于2 mL含血清的完全培养基中,给药24 h后收获细胞进行流式微核检测。

(2)连续(24 h)处理组:细胞达对数生长期后,更换新的含有血清的完全培养基,每10毫升培养基加入2滴计数珠用以计算细胞的相对存活率,并添加不同质量浓度的金胺O(0.6、0.9、1.2 μg·mL⁻¹)和金橙II(10、30、50 μg·mL⁻¹),调整细胞密度为2×10⁵·mL⁻¹接种于24孔板,每孔2 mL。细胞置于37℃、5% CO₂培养箱中孵育24 h。处理结束后收获细胞进行流式微核检测。

2.2.2 流式微核检测 给药结束后将细胞转移至15 mL离心管中,室温下300×g离心5 min,弃上清,轻敲离心管重悬细胞,于冰上静置20 min。随后每孔加入0.3 mL叠氮溴化乙锭(EMA)染料,在光照下反应30 min,后每孔加入3 mL含2% FBS的PBS溶液,室温下300×g离心5 min,吸弃上清液。每孔加入500 μL裂解溶液1,置于室温孵育1 h后再加入500 μL裂解溶液2,继续孵育30 min。孵育结束后即可进行流式检测。各给药组和对照组至少分析2×10⁴个细胞,计算相对存活率和微核率。

相对存活率=(处理组细胞数/处理组计数珠数)/(对照组细胞数/对照组计数珠数)

微核率=微核数/细胞数

2.2.3 结果分析与评价 为避免产生假阳性结果,L5178Y细胞相对存活率应高于(45±5)%^[11]。每个处理条件下的每个受试物至少包含3个可用于分析的浓度。与阴性对照组比较,至少有1个浓度的微核率具有统计学差异,且有浓度-效应关系,则判定

为阳性^[12]。

2.3 统计学方法

使用GraphPad Prism 7进行统计学分析,回复突变孔数表示为 $\bar{x} \pm s$,各给药组与阴性对照组之间差异使用student's *t*检验进行分析。流式微核各给药组与阴性对照组之间差异使用四格表卡方检验进行分析。

3 结果

3.1 Ames波动试验结果

TA98和TA100的Ames波动试验结果见表1。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。

金橙II:质量浓度自2.50 μg·mL⁻¹起可引起-S9和+S9处理组的TA98回复性突变孔数显著增加($P<0.05$ 、 0.01),且呈浓度相关性,代谢活化后增加幅度更为明显;质量浓度自5 μg·mL⁻¹起可引起-S9处理组的TA100回复性突变孔数显著性增加($P<0.01$),且呈浓度相关性。金胺O:质量浓度为10 μg·mL⁻¹时可引起-S9处理组的TA98回复性突变孔数显著增加($P<0.01$);自0.625 μg·mL⁻¹起即可引起+S9处理组的TA98回复性突变孔数显著增加($P<0.05$ 、

表1 Ames波动试验结果
Table 1 Result of fluctuation Ames test

组别	质量浓度/ (μg·mL ⁻¹)	TA98		TA100	
		-S9	+S9	-S9	+S9
阴性对照	—	2±1	3±2	4±2	5±1
金橙II	0.625	5±1	3±1	4±2	7±3
	1.250	5±1	6±2	6±1	6±2
	2.500	6±1**	8±1*	6±2	10±4
	5.000	8±2**	10±3**	9±1**	10±1
	10.000	9±2**	11±1**	9±2**	6±2
金胺O	0.625	3±1	9±1*	4±2	7±2
	1.250	3±1	11±1**	4±1	9±2
	2.500	3±1	19±6**	4±2	10±3*
	5.000	4±1	16±2**	4±1	12±1**
	10.000	6±1**	21±1**	6±1	14±1**
AF-2	0.03/0.01	35±4**	/	45±6**	/
2-AA	0.75	/	52±3**	/	35±5**

无S9代谢活化条件下阳性对照为AF-2(TA98为30 ng·mL⁻¹; TA100为10 ng·mL⁻¹);有S9代谢活化条件下阳性对照为2-AA;与阴性对照组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$

Positive control used at absence of S9 was AF-2 (30 ng·mL⁻¹ for TA98, 10 ng·mL⁻¹ for TA100). Positive control used at presence of S9 was 2-AA. * $P<0.05$ ** $P<0.01$ vs negative control group

0.01), 且存在浓度相关性; 浓度自 $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 起可引起 +S9 处理组的 TA100 回复性突变孔数显著性增加 ($P < 0.05, 0.01$), 且存在浓度相关性。

结果提示, 金橙 II 和金胺 O 均可导致 TA98 和 TA100 发生回复性突变, 两者均更易诱导 TA98 发生突变, 且两者代谢后产物的致突变性更为明显。

3.2 L5178Y 细胞流式微核试验结果

金橙 II 和金胺 O 给药浓度范围内各组的相对存活率均大于 $(45 \pm 5)\%$, 提示金橙 II 和金胺 O 在当前给药条件下对 L5178Y 细胞无明显的毒性作用, 可排除后续体外流式微核试验中假阳性结果。结果

如图 2、3 及表 2 所示, 在 -S9 处理组中, $30 \sim 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 金橙 II 可引起 L5178Y 细胞微核率显著增加 ($P < 0.01$), 且存在浓度相关性; $0.9 \sim 1.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 金胺 O 可引起 L5178Y 细胞微核率显著增加 ($P < 0.01$), 且存在浓度相关性。在 +S9 处理组中, $10 \sim 50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 金橙 II 可导致 L5178Y 细胞微核率显著增加 ($P < 0.05, 0.01$)。

此外, 基于流式细胞仪的体外微核检测方法还能提供细胞周期、亚二倍体核率等多个参数。通过对 FL1 通道中 SYTOX Green 的荧光信号面积进行定性分析可获得细胞周期的相关信息 (图 2), 其中

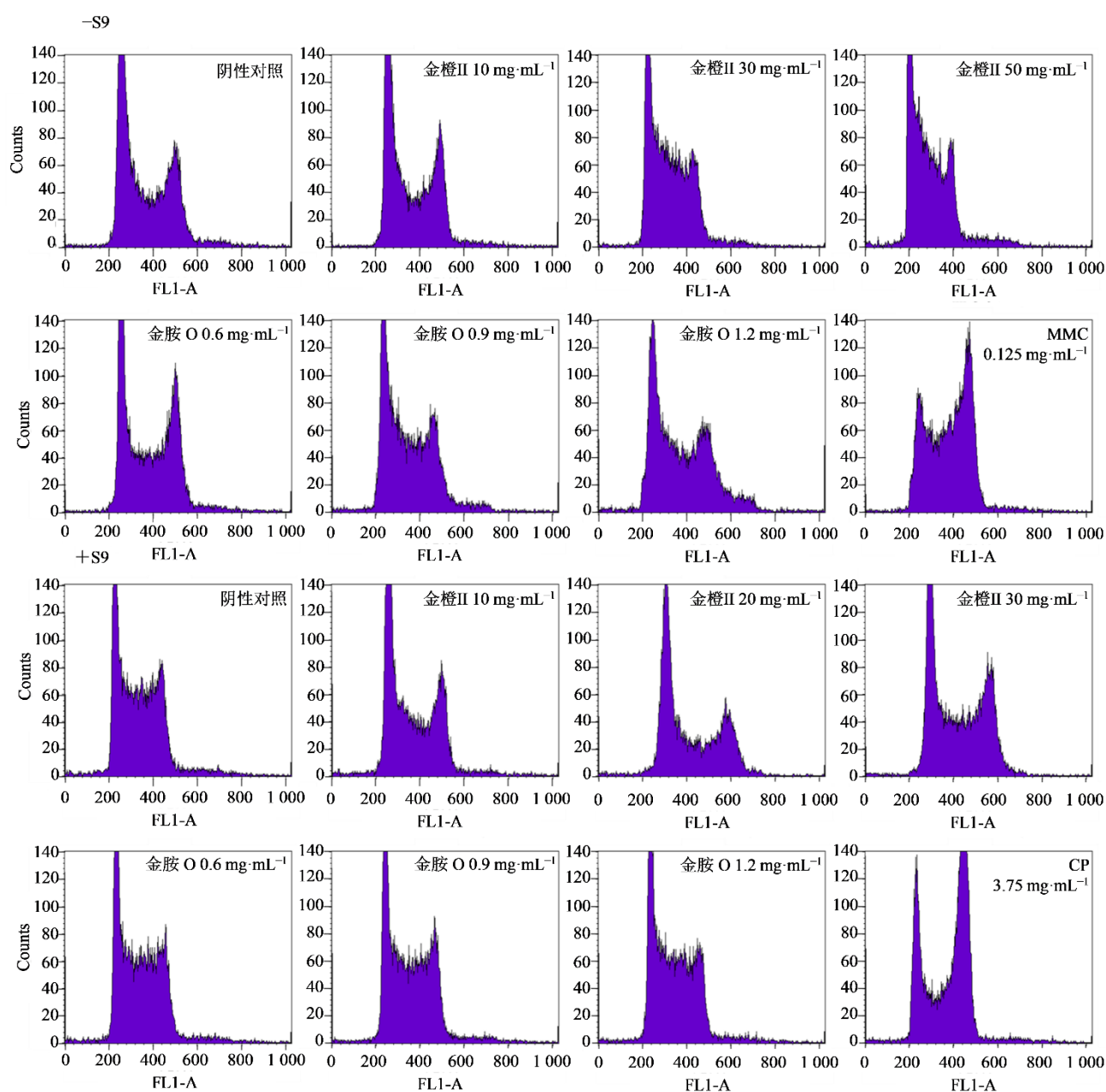


图 2 流式细胞术检测金橙 II 和金胺 O 对 L5178Y 细胞周期的影响

Fig. 2 Flow cytometry detection of effects of orange II and auramine O on cell cycle

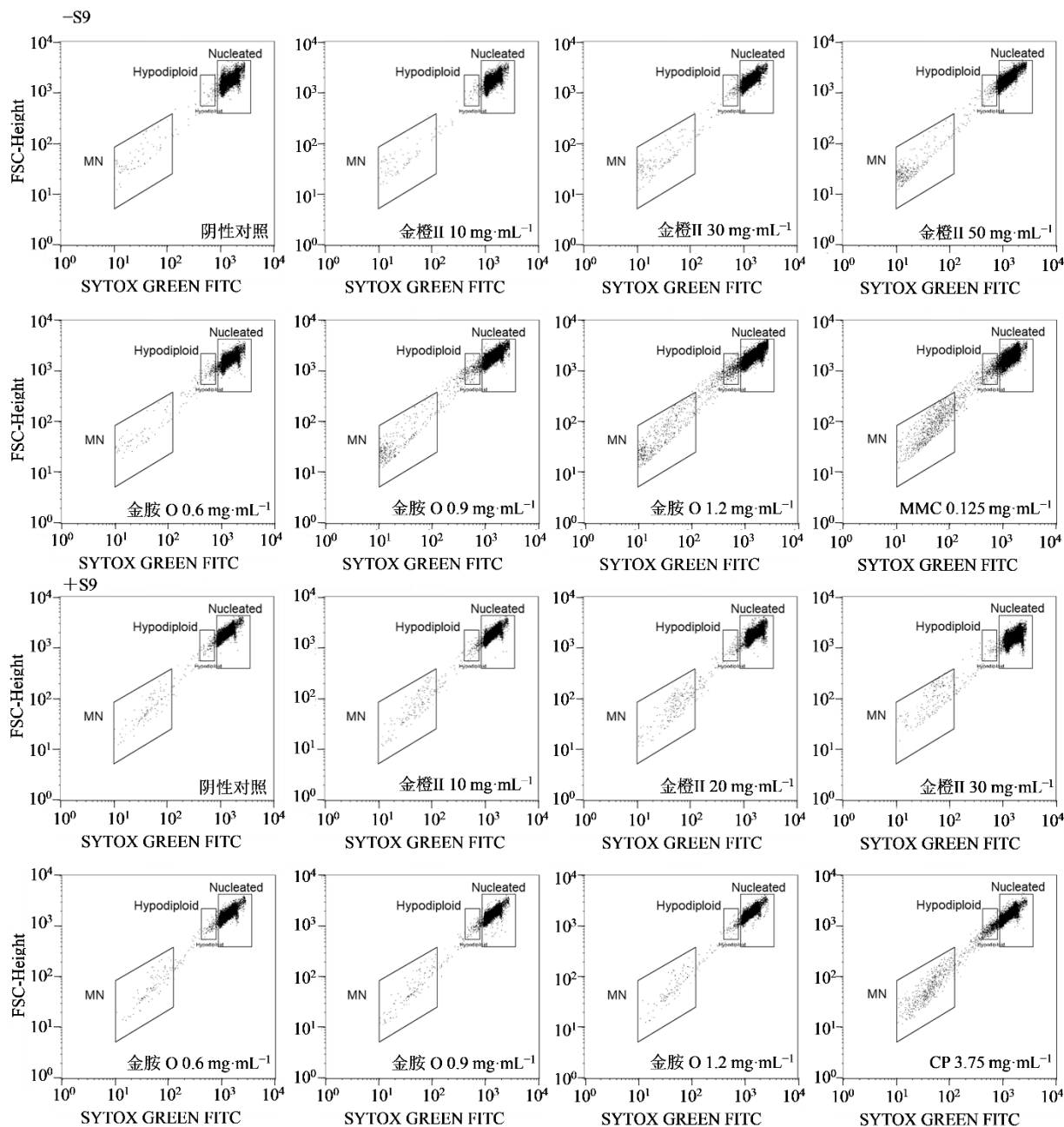


图3 流式细胞术检测金橙II和金胺O对L5178Y细胞微核率的影响

Fig. 3 Flow cytometry detection of effects of orange II and auramine O on micronucleus rate of L5178Y cells

靠近坐标原点的信号峰为G₁期,右边的信号峰为G₂/M期,两峰之间为S期。在-S9处理组中,30~50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 金橙II可导致S期的L5178Y细胞增加,提示该浓度范围内的金橙II可能会对DNA的合成造成影响;金胺O自0.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 起即可导致L5178Y细胞亚二倍体细胞核率增加,且增加程度存在浓度相关性(图3),提示金胺O可能是非整倍体诱导剂。

4 讨论

金橙II和金胺O均为以焦煤油中的苯胶为原料

合成的染料,可作为非法添加成分在食品(如豆制品、卤制品等)甚至药材中(如红花、蒲黄、五味子等)检出。金橙II已于2008年列入卫生部公布的食品中可能违法添加的非食用色素物质品种名单^[13]。此外,国家药监局于2020年发布了妇科调经片中金胺O检查项补充检验方法,加强其监管^[14]。已有研究提示两者存在一定刺激性或肝、肾毒性,然而遗传毒性及致癌性风险研究尚不充分。

本研究首次报道了金橙II在菌株TA100和TA98的细菌回复突变试验和微核试验的研究数据。

表2 细胞相对存活率及微核率
Table 2 Relative cell survival rate and micronucleus rate

组别	质量浓度/ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	-S9		+S9	
		相对存 活率/%	微核 率/%	相对存 活率/%	微核 率/%
阴性对照	—	100.00	0.35	100.00	0.59
金橙II	10	95.61	0.34	56.61	0.78*
	30	71.33	0.72**	51.56	1.10**
	50	58.69	1.60**	43.53	1.06**
金胺O	0.6	81.89	0.43	74.46	0.57
	0.9	77.42	1.65**	65.97	0.62
	1.2	52.34	2.55**	62.34	0.49
MMC	0.125	54.82	3.89**	/	/
CP	3.75	/	/	58.67	2.66**

与阴性对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

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

结果表明在有和无S9处理条件下,金橙II均能导致鼠伤寒沙门氏菌TA98回复突变频率和L5178Y细胞微核率增加,且经S9活化代谢后对L5178Y细胞毒性明显增强,提示其是一个具有遗传毒性风险的化合物。有文献报道金胺O可诱导大鼠肝脏腺癌,其细菌回复突变试、染色体畸变试验和彗星试验结果均为阳性^[15-17]。Tong等^[10]连续15 d经口给予SD大鼠金胺O后,大鼠肝微核细胞率和肝细胞尾部DNA百分率显著升高,而外周血细胞基因突变率与微核率均与阴性对照组相比未见差异,提示金胺O的遗传毒性与其代谢产物有关。与之相应,在本研究中活化代谢条件下金胺O所导致回复突变菌落数也多于非活化代谢条件。而在L5178Y细胞中,活化代谢条件下金胺O所导致的微核率反而较非活化代谢条件的低,这可能与活化代谢系统或细胞稳定性有关。

本课题组在国内首次建立基于L5178Y细胞的流式微核检测技术。目前常用的双染料标记法体外流式微核试验最初由Bryce等^[18]建立,该方法操作简便,特异性强,适合于高通量的自动化检测,能获得细胞相对存活率、微核率、凋亡/坏死比率、亚二倍核率、细胞周期、遗传毒性作用方式等多个参数,并已在L5178Y、TK6、CHO-K1、HepaG2等多个细胞系中得到验证^[19]。欧红梅等^[20]于2015年在国内首次建立基于CHO-K1细胞的体外流式微核检测方法,并使用12种化合物对该方法进行验证,结果提示该方法灵敏度高,特异性强,与人工阅片结果具有良好的相关性,可应用于化合物遗传毒性的筛选

及评价^[11]。本研究所使用的L5178Y细胞自发突变频率稳定,细胞倍增时间较短,易于培养,且L5178Y细胞的p53基因为突变型,对于同一阳性药的微核试验,如MMC,L5178Y细胞的浓度-效应关系比p53基因为野生型的TK6细胞更显著^[21]。

本研究利用基于细菌的Ames试验和基于L5178Y细胞的体外微核试验评价2种染料金橙II和金胺O的遗传毒性风险,结果表明,二者均具有弱致突变性,为其安全使用及监管提供参考依据和数据支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 胡梦坤,王震宇,董 娇.食用色素安全评价及检测技术[J].农业科技与装备,2019(4): 47-48.
Hu M K, Wang Z Y, Dong J. Food pigment safety evaluation and detection technology [J]. Agric Sci Technol Equip, 2019(4): 47-48.
- [2] 单 蕊,高 妍,杜兰威,等.食品中合成色素检测方法的改进[J].食品研究与开发,2019,40(14): 192-197.
Shan R, Gao Y, Du L W, et al. Improvement of detection methods for synthetic pigments in food [J]. Food Res Dev, 2019, 40(14): 192-197.
- [3] 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.
Wang Q, Wang Y N, Yan Y J, et al. High-throughput mutagenicity screening of dye Sudan Red [J]. Drug Eval Res, 2020, 43(9): 1747-1753.
- [4] 张小梅,刘 琳,逯 越,等.羟基酪醇对苏丹红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.
Zhang X M, Liu L, Lu Y, et al. Inhibition of Sudan I genotoxicity in human liver-derived HepG2 cells by the antioxidant hydroxytyrosol [J]. J Toxicol, 2009, 23(6): 453-456.
- [5] 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会.食品安全国家标准 食品添加剂使用标准:GB 2760—2014[S]. 2015.
State health and Family Planning Commission of the people's Republic of China. National food safety standard for use of food additives: GB 2760-2014 [S]. 2015.
- [6] Ooka M, Kobayashi K, Abe T, et al. Determination of genotoxic potential by comparison of structurally related azo dyes using DNA repair-deficient DT40 mutant panels [J]. Chemosphere, 2016, 164: 106-112.
- [7] Chung K T. Azo dyes and human health: A review [J]. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev,

- 2016, 34(4): 233-261.
- [8] Dillon D, Combes R, Zeiger E. Activation by caecal reduction of the azo dye D & C Red No. 9 to a bacterial mutagen [J]. *Mutagenesis*, 1994, 9(4): 295-299.
- [9] 卢士英, 邹明强. 食品中常见的非食用色素的危害与检测 [J]. *中国仪器仪表*, 2009(8): 45-50.
- Lu S Y, Zou M Q. The hazards of frequent inedible colorants used in foods and their detection methods [J]. *China Instrum*, 2009(8): 45-50.
- [10] Tong W, Zhou C H, Huang P C, et al. Integration of micronucleus, comet, and Pig-a gene mutation endpoints into rat 15-day repeat-treatment studies: Proof-of-principle with auramine O [J]. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen*, 2019, 846: 403072.
- [11] 欧红梅, 周长慧, 涂宏刚, 等. 流式细胞术检测体外微核方法的验证 [J]. *中国新药杂志*, 2015, 24(14): 1590-1598.
- Ou H M, Zhou C H, Tu H G, et al. Validation of flow cytometry *in vitro* micronuclear assay [J]. *Chin J New Drugs*, 2015, 24(14): 1590-1598.
- [12] 国家食品药品监督管理总局. 药物遗传毒性研究技术指导原则 [S]. 2018.
- State Food and drug administration. Technical guidelines for drug genotoxicity research [S]. 2018.
- [13] 郑月明, 国伟, 聂雪梅, 等. 食品中违禁添加的非食用色素检测技术综述 [J]. *中国农学通报*, 2012, 28(9): 222-228.
- Zheng Y M, Guo W, Nie X M, et al. Research on detection methods of inedible pigment illegally added to food [J]. *Chin Agric Sci Bull*, 2012, 28(9): 222-228.
- [14] 国家药监局. 国家药监局关于发布妇科调经片中金胺O检查项补充检验方法等3项补充检验方法的公告 [EB/OL]. (2021-01-06)[2021-08-16]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20210106172628129.html>.
- State Food and drug administration. Announcement of the State Food and Drug Administration on Issuing three supplementary test methods including the supplementary test method of auramine O in Fuke Tiaojing tablets [EB/OL]. (2021-01-06)[2021-08-16]. <https://www.nmpa.gov.cn/xxgk/ggtg/qtggtg/20210106172628129.html>.
- [15] Martelli A, Campart G B, Canonero R, et al. Evaluation of auramine genotoxicity in primary rat and human hepatocytes and in the intact rat [J]. *Mutat Res*, 1998, 414 (1/2/3): 37-47.
- [16] Galloway S M, Armstrong M J, Reuben C, et al. Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: Evaluations of 108 chemicals [J]. *Environ Mol Mutagen*, 1987, 10(Suppl 10): 1-175.
- [17] Kirkland D, Aardema M, Henderson L, et al. Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity [J]. *Mutat Res*, 2005, 584(1/2): 1-256.
- [18] Bryce S M, Bemis J C, Avlasevich S L, et al. *In vitro* micronucleus assay scored by flow cytometry provides a comprehensive evaluation of cytogenetic damage and cytotoxicity [J]. *Mutat Res*, 2007, 630(1/2): 78-91.
- [19] 欧红梅, 涂宏刚, 周长慧, 等. 流式细胞术在体外微核分析中的应用进展 [J]. *中国新药杂志*, 2014, 23(4): 427-431.
- Ou H M, Tu H G, Zhou C H, et al. Progress in application of flow cytometry in the *in vitro* micronucleus assays [J]. *Chin J New Drugs*, 2014, 23(4): 427-431.
- [20] 欧红梅, 周长慧, 涂宏刚, 等. 流式细胞术检测体外微核方法的建立 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2015, 27(1): 39-43.
- Ou H M, Zhou C H, Tu H G, et al. Establishment of flow cytometric *in vitro* micronucleus assay [J]. *Carcinog Teratog Mutagen*, 2015, 27(1): 39-43.
- [21] 欧红梅, 周长慧, 涂宏刚, 等. p53基因状态对体外微核试验结果影响的研究进展 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2015, 29(1): 170-173.
- Ou H M, Zhou C H, Tu H G, et al. Impact of p53 gene status on *in vitro* micronucleus test: Research progress [J]. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2015, 29(1): 170-173.

[责任编辑 兰新新]