

【天然药物成分致突变评价】

天然药物成分致突变性风险预测与评价方法研究进展

文海若, 兰洁, 叶倩, 赵婷婷, 汪祺*, 耿兴超*

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要: 天然药物成分复杂, 无法逐一完成系统的致癌性风险评价及体内遗传毒性试验。鉴于计算机毒理学结合体外致突变风险评价方法在遗传毒性杂质致突变性评价方面的快速发展, 也可考虑将此评价模式应用于天然药物成分的致突变性筛选与机制研究。从计算机毒理学和体外致突变性评价两方面出发, 综述天然药物致突变性的研究方法, 为其遗传毒性试验评价及监管提供借鉴。

关键词: 天然药物; 致突变性; 定量构效关系; 警示结构; 细菌回复突变试验; 体外 *Pig-a* 基因突变试验

中图分类号: R991 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376 (2022) 07-1221-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.07.001

Research progress on prediction and evaluation methods of mutagenicity risk of natural medicinal ingredients

WEN Hairuo, LAN Jie, YE Qian, ZHAO Tingting, WANG Qi, GENG Xingchao

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

Abstract: The composition of natural medicine is complex, it is impossible to complete the systematic carcinogenic risk assessment and *in vivo* enotoxicity test. In view of the rapid development of computational toxicology combined with *in vitro* mutagenicity assessment methods in the mutagenicity evaluation of genotoxic impurities, this evaluation method could also be applied to the mutagenicity evaluation and mechanism study of natural medicine components. Therefore, from the perspectives of computational toxicology and *in vitro* mutagenicity evaluation, this article reviewed the existing methods and results of studying the mutagenicity of natural medicines, which can provide reference for its genotoxicity evaluation and supervision.

Key words: natural medicine; mutagenic; quantitative structure-activity relationship; alert structure; bacterial reverse mutation test; *in vitro* *Pig-a* gene mutation test

中华民族应用中医药防病治病历史悠久, 并取得了卓越的成效。然而中药所含化学成分复杂, 受产地、采收时间、加工工艺及贮存等因素影响, 化学成分还具有动态变化的特点^[1]。天然药物单体成分众多, 无法逐一完成系统的致癌性风险评价及体内遗传毒性试验来考察其人体致癌性风险。基于基因突变是绝大多数肿瘤发生的分子基础和起始环节这一认知^[2], 可使用计算机毒理学预测软件和体外致突变性评价方法实现对大量化合物的致突变

性的筛选。本文旨在通过综述现有研究方法, 以致癌性风险评价及体外遗传毒性试验角度为出发点, 为具有不同类型结构特点的中药提供安全性评价的思路和方法, 为类似化合物的遗传毒性试验评价及监管提供借鉴。

1 计算机毒理学预测

计算机毒理学可根据化合物结构和已知类似化合物的毒性数据来预测未知化合物的体内、外试验结果。其预测致突变性风险主要基于定性(量)

收稿日期: 2022-05-05

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

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

耿兴超, 研究员, 研究方向为药理毒理。E-mail: gengxch@nifdc.org.cn

结构-活性关系 [(quantitative) structural-activity relationship, (Q)SAR]等原理,包括基于已知警示结构的方法(即基于专家规则的方法)、基于机器学习算法或回归分析和分子描述符的定量结构-活性关系的方法(即基于统计的方法)^[3]。其中,化合物的警示结构(alert structure)识别,是进行风险评估和毒性预测数据库构建的基础。遗传毒性警示结构指化合物中某些具有DNA反应活性的基因或亚单位,可导致基因突变或染色体重排或断裂,含警示结构的化合物提示存在一定遗传毒性风险^[4]。当前计算机毒理学已广泛应用于药物杂质的致突变性风险筛查,并成为杂质风险控制的重要评价方法之一,在药物杂质监管中要求同时提供基于2种方法(基于专家规则和统计方法)的预测结果。也有研究提出中草药单体成分可参照杂质的评价模式,利用已知毒性数据库预测其毒性风险^[5]。目前常用的遗传毒性风险评价计算机毒理学数据库包括Toxtree、Lhasa Limited的Derek Nexus, Sarah Nexus、LeadScope的Genetox Expert Alerts和Genetox Statistical QSAR、MultiCASE, Inc.的CASE Ultra等。上述数据库以收录国外文献中研究数据为主,对天然药物成分的研究结果较少。中国的中药化学成分数据库包括物质毒性数据库(中国科学院上海有机化学研究所)、中药化学数据库(中国科学院过程工程研究所)及中国中药化学成分数据库(中国中医科学院)等,遗憾的是,上述数据库中毒理学数据很少且未能真正推广应用^[6]。

尽管含有相同母核结构的单体化合物可以通过已知化合物的毒性数据库预测毒性风险^[7-8]。但目前的计算机毒理学预测结果较为笼统,缺乏不同取代基对相似结构化合物的毒性研究数据,通常依据某一结构而推断一系列化合物均存在遗传毒性风险,从而降低了预测结果的价值。高雅等^[5]使用Toxtree对近千种中药单体成分的遗传毒性风险进行预测,发现因数据库中信息匮乏,无法对结构存在差异的化合物的毒性差异进行区分,预测结果不够准确。也有研究显示构效分析数据库对新型化合物预测能力不足^[9]。因此,仍有必要对某类含相同警示结构的化合物开展试验研究。

基于导致碱基突变的化合物均具有亲电子性或DNA反应活性的理论,Ashby等^[4]对高DNA反应活性的化合物梳理归纳后提出含酰卤、烷基或苯基磺酸酯、烷基或苯基磷酸酯、*N*-羟甲基衍生物等结构的化合物致突变风险较高。蒽醌类和二蒽酮类

化合物胞苷的蒽醌环也是致突变性警示结构之一,其平面稠环结构可嵌入DNA碱基影响DNA复制与转录,从而导致突变^[10-11]。毒理学预测软件(如Derek Nexus)认为该类化合物均存在致突变性、染色体损伤和致癌性风险。进一步研究发现^[10-12],当蒽醌环上含有1个或多个羟基,其致突变性可显著提高。而部分试验验证结果显示,并非所有蒽醌类化合物均存在致突变性,与软件预测结果存在出入。如本课题组前期研究发现大黄素甲醚不导致沙门氏菌回复突变(数据未发表),且连续给予大鼠14 d大黄素甲醚,体内微核试验和彗星试验结果均为阴性^[13]。毒理学软件预测主要基于体外研究数据,因代谢条件及化合物暴露量存在差异,体外研究及预测结果的准确性有待进一步考察。

2 体外致突变性评价方法

近年来分子生物学技术的发展推动了遗传毒性评价方法的革新。减少受试物用量的微孔板细菌回复突变(Ames)试验、体外彗星试验,以及体外*Pig-a*基因突变试验的开发,有助于对大量化合物的致突变性进行快速筛选。计算机毒理学与高通量筛选方法有机结合,有助于按类别对化合物的遗传毒性风险进行系统性评价及梳理,也可深入了解特定基因及基团所在位点与致突变风险之间的关联。

2.1 Ames 试验

基因突变是肿瘤与癌症发生的重要分子基础,以基因突变为检测终点的细菌回复性突变是药物遗传毒性评价标准试验组合的重要组成部分,也是化合物致突变性(Q)SAR数据库建立的数据基础^[14]。Ames试验使用营养缺陷型菌株开展,利用缺乏相应营养组分条件下仅有突变菌落会大量增长的原理,评价试验体系中是否存在致突变剂。其结果对灵长类动物肿瘤发生风险预测率高达87.5%,被视为最可靠的遗传毒性评价试验^[15]。然而,传统Ames应用于天然药物检测时,可能存在一定局限。如部分天然药物(如大黄素)颜色较深,可能影响菌落计数的准确性。此外,传统方法的受试物用量较多,而部分天然药物单体成分提取量有限。基于6孔板和24孔板开展的Ames试验可在不改变原先试验原理的前提下尽可能减少受试物的用量,上述方法与使用标准平皿开展的Ames试验结果的一致性达95%^[16]。此外,使用96孔板和液态培养体系的Ames波动试验或Ames II则简化了菌落计数环节,使用显色剂来识别回复突变菌落发生率,研究显示Ames II与标准平皿Ames试验相比结

果一致性可达84%^[17]。部分马兜铃酸单体成分获得量有限,曹易懿等^[18]使用波动Ames检测了4种马兜铃酸的致突变作用,发现不同马兜铃酸单体的致突变作用强弱有差异,其机制可能与结构差异有关。本课题组^[12]使用鼠伤寒沙门氏菌TA98及TA100开展Ames波动试验发现大黄素可诱导TA100的回复突变率升高,与文献报道相符。

2.2 小鼠淋巴瘤细胞试验

以哺乳动物细胞为试验体系的小鼠淋巴瘤细胞试验(mouse lymphoma assay, MLA)是以胸苷激酶(*tk*)基因突变为检测终点的试验方法。该方法以小鼠淋巴瘤L5178Y3.7.2c-*tk*⁺细胞中*tk*基因突变频率为检测指标。MLA既能检测出点突变等小的基因突变,又能检测出染色体水平及大的缺失等基因的改变。因*tk*基因自身存在*tk*^{+/+}, *tk*^{+/-}及*tk*^{-/-}等多个基因型,在进行致突变研究之前,应对所需的基因型进行筛选,确保试验中所用的细胞表达目的基因型(即*tk*^{+/-})。Kirkland等^[19]回顾大量文献数据后认为Ames试验和体外微核试验已足够用于预测啮齿类动物致癌性和体内遗传毒性;在两者的基础上增加MLA后,检出率仅从78%(316/405)提高至79.5%(322/405)。有研究开展MLA考察单方青木香和复方龙荟丸的致突变作用,发现其中马兜铃酸含量与药物的致突变性强弱呈正相关,且复方成分有减毒效果^[20]。朱钦燾等^[21]研究发现大黄素和大黄酸的MLA结果呈弱阳性,MLA结果与其他遗传毒性终点(如彗星试验)有一定关联性。

2.3 体外彗星试验

体外彗星试验(comet assay)是用于检测受试物诱导DNA损伤风险的方法,主要检测终点包括DNA单链及双链缺口损伤。其原理是基于损伤的DNA与完整的DNA电泳时的迁移速率不同。当DNA链断裂时,其超螺旋结构受到破坏,在细胞裂解液作用下,细胞膜、核膜等膜结构受到破坏,细胞内的蛋白质、RNA以及其他成分均扩散到电解液中,而核DNA由于相对分子质量太大不能进入凝胶而留在原位^[22]。在碱性电解质的作用下,DNA发生解螺旋,损伤的DNA断链及片段被释放出来,这些DNA的相对分子质量小且碱变性为单链。在电泳过程中带负电荷的DNA会离开核DNA向正极迁移形成“彗星”状图像,而未受损伤的DNA部分保持球形^[23]。DNA受损越严重,产生的碎片越多,在相同的电泳条件下迁移的DNA量就愈多,迁移的距离也就愈长。通过测定DNA迁移部分的光密度或迁移

长度就可以测定单个细胞DNA损伤程度,从而确定受试物的作用剂量与DNA损伤效应的关系^[24]。体外彗星试验可适用于多种细胞系,且涉及代谢活化条件、细胞给药处理方法、电泳条件等技术细节,而试验方法尚未达成标准化,因此文献报道的相同化合物的研究数据难以达到一致。如Brkanac等^[25]研究发现大黄素质量浓度为150 μg·mL⁻¹及以上时可诱导人外周血淋巴细胞DNA拖尾明显增加,而Mueller等^[26]使用L5178Y *tk*^{+/-}细胞开展彗星试验结果则提示大黄素不导致DNA损伤。

甲酰胺嘧啶-DNA糖基化酶(FPG)为特异性识别8-羟基鸟嘌呤的修复酶,在体外彗星试验体系中加入FPG,可区分DNA损伤是否与该修复途径有关。有研究^[27]使用HepG2细胞开展彗星试验发现,马兜铃酸I可诱导FPG敏感的DNA损伤,FPG的引入可致马兜铃酸I诱导的DNA损伤大幅提高。

体外彗星试验可与其他体外通路研究有机结合研究单体成分的DNA损伤机制。Li等^[28]在使用彗星试验确证马兜铃酸I的DNA损伤作用的基础上,结合细胞凋亡和p53作用通路研究发现,马兜铃酸I可在细胞凋亡前不依赖野生型p53的途径导致DNA损伤,从而揭示其临床肾毒性表现为肾小管上皮细胞有限增殖和再生能力的原因。此外,彗星试验也用于中草药的抗氧化/氧化作用研究。如Szeto等^[29]使用人淋巴细胞开展彗星试验评价枸杞、五味子、女贞子等中草药对过氧化氢诱导的DNA损伤的保护作用。

2.4 体外*Pig-a*基因突变试验

*Pig-a*基因位于X染色体,其片段中单一突变即可影响糖磷脂酰肌醇(glycosylphosphatidylinositol, GPI)锚的合成并导致细胞表面GPI锚链蛋白的缺失。因此,可通过检测细胞膜表面锚链蛋白表达水平评价受试物的潜在致突变风险^[30]。基于大鼠红细胞和网织红细胞的*Pig-a*基因突变试验当前在国际上认可度较高^[31]。然而,体内*Pig-a*基因突变试验使用动物开展研究,受试物用量大,检测周期需1~2个月,且难以与机制研究结合开展。上述局限促进近年来哺乳动物细胞体外*Pig-a*基因突变试验的兴起。基于*Pig-a*基因在不同种属之间高度的结构、功能保守性,以TK6、MCL-5以及L5178Y等哺乳动物细胞系开展的体外*Pig-a*基因突变试验近年来得到迅速发展。Mckinzie等^[32]对L5178Y细胞进行全基因组测序研究发现,参与GPI锚链蛋白合成的所有编码基因均存在于L5178Y细胞中且仅*Pig-a*

基因存在纯合突变,其他基因均为杂合突变,认为L5178Y细胞适用于体外*Pig-a*基因突变研究。Kruger等^[33]则建立了基于TK6细胞的体外*Pig-a*基因突变检测方法。该方法以哺乳动物细胞为试验体系,可用于不适合使用Ames试验检测的化合物或在Ames试验中为弱阳性结果的化合物。较于传统的*hprt*或*tk*基因突变试验,该方法耗时短,耗材少。作为药物遗传毒性致突变评价中介于Ames试验和体内*Pig-a*的桥梁,可为早期遗传毒性筛选提供新选择。本课题组^[34]前期研究显示基于L5178Y细胞的体外*Pig-a*基因突变试验可在不同代谢活化

状态下对化合物的致突变性进行有效预测,且多次试验间数据离散程度低而偏差小。王亚楠等^[35]使用体外*Pig-a*基因突变试验评价了雷公藤甲素的致突变性,其结果与KM小鼠体内*Pig-a*基因突变试验结果一致。汪祺等^[36]开展Ames波动试验和体外*Pig-a*基因突变试验评价染料溶剂红207的致突变性风险,2项试验结果基本相符,发现其具有一定致突变性且经I相代谢活化后致突变性进一步增强。

3 结语

本文综述了适宜天然药物成分的不同体外致突变性评价方法,其特点、适用性及优缺点总结见表1。

表1 不同体外致突变评价方法比较

Table 1 Comparison of different *in vitro* mutagenicity evaluation methods

评价方法	特点	优点	不足
计算机毒理学预测	根据化合物结构和已知类似化合物的毒性数据,并基于(Q)SAR预测化合物的致突变性风险	简便,可用于海量筛选,并明确致突变警示结构	预测结果较为笼统,对新型化合物预测能力不足
Ames试验	基于仅突变的细菌才能在营养缺乏的条件下增长为菌落的原理,评价试验体系中是否存在致突变剂	较为简便,预测结果与人体肿瘤发生风险相关度高	传统方法受试物用量较多,部分天然药物中的成分可能影响结果准确性
小鼠淋巴瘤细胞试验	基于仅 <i>tk</i> 基因突变的细胞可在添加三氟胸苷的情况下生长为集落的原理,评价试验体系中是否存在致突变剂	以哺乳动物细胞为试验体系,适用于有抑菌性的药物	较为复杂,假阳性率较高
体外彗星试验	基于损伤的DNA与完整的DNA电泳时的迁移速率不同的原理,评价受试物诱导DNA损伤的风险	适用于多种细胞系,可与DNA损伤机制研究结合	试验方法尚未完成标准化
体外 <i>Pig-a</i> 基因突变试验	通过检测细胞膜表面锚链蛋白表达水平评价受试物的潜在致突变风险	较为简便,与Ames试验结果一致性较好,以哺乳动物细胞为试验体系,适用于有抑菌性的药物	试验方法尚未完成标准化

近年来,计算机毒理学结合体外致突变风险评价模式的模式已在遗传毒性杂质(针对致突变性)筛选、风险评价和监管方面获得广泛认可。国际人用药品注册技术协调会(ICH)M7指导原则已明确指出没有致癌性数据的药物杂质,首先通过计算机毒理学进行致突变性风险评估,根据评估结果考虑是否开展体外试验验证,并通过分级的方式进行风险管理。这一思路同样适用于种类繁多且提取量有限的天然药物成分的致突变性筛选及监管。然而,因天然药物/中药单体成分的致突变性研究数据有限,现有计算机毒理学数据库当前无法对其作出合理的预测,因此积累丰富的在适宜条件下开展的研究数据极为重要。从评价方法的角度考虑,通过对体外试验体系进行优化,并结合多种评价手段,可获得较为准确的评价结果。而以化合物的结构

为基础进行系统性评价,则可提供更多结构修饰和致突变性关联的信息,有助于提高毒理学数据库的预测效力,也为化合物的减毒设计提供重要思路。尽管计算机毒理学与体外试验结合可有助于前期筛选和风险评估,鉴于目前啮齿类动物致癌性试验是评价受试物导致肿瘤或致癌性风险的金标准,如需明确某一化合物的致癌性风险,仍需开展体内研究证实。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 赵超,李会军,陈君,等. 中药复杂成分解析与质量评价的研究进展[J]. 中国药科大学学报, 2012, 43(3): 283-288.
Zhao C, Li H J, Chen J, et al. Progress for chemical

- analysis and quality control of traditional Chinese medicines [J]. *J China Pharm Univ*, 2012, 43(3): 283-288.
- [2] 邹向阳, 李连宏. 细胞周期调控与肿瘤 [J]. *国际遗传学杂志*, 2006, 29(1): 70-73.
Zou X Y, Li L H. Cell cycle control and tumor [J]. *Int J Genet*, 2006, 29(1): 70-73.
- [3] Ashby J, Tennant R W. Chemical structure, Salmonella mutagenicity and extent of carcinogenicity as indicators of genotoxic carcinogenesis among 222 chemicals tested in rodents by the US NCI/NTP [J]. *Mutat Res*, 1988, 204(1): 17-115.
- [4] Ashby J, Tennant R W. Definitive relationships among chemical structure, carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by the US NTP [J]. *Mutat Res Genet Toxicol*, 1991, 257(3): 229-306.
- [5] 高雅, 姚碧云, 周宗灿. 中草药重要成分的QSAR预测毒性数据库的建立 [J]. *毒理学杂志*, 2015, 29(6): 399-401.
Gao Y, Yao B Y, Zhou Z C. The establishment of toxicity database of important ingredients in Chinese herbal medicine predicted by QSAR [J]. *J Toxicol*, 2015, 29(6): 399-401.
- [6] 文海若, 闫明, 宋捷, 等. 符合中药特点的致癌风险评估方法 [J]. *中国药事*, 2020, 34(7): 829-835.
Wen H R, Yan M, Song J, et al. Cancer risk assessment methods in accordance with the characteristics of traditional Chinese medicine [J]. *Chin Pharm Aff*, 2020, 34(7): 829-835.
- [7] 刘睿, 李新宇, 李亚卓, 等. 网络毒理学及其在中药毒性成分预测中的应用研究 [J]. *药物评价研究*, 2018, 41(5): 709-715.
Liu R, Li X Y, Li Y Z, et al. Network toxicology and its application in predicting the toxicity of traditional Chinese medicine [J]. *Drug Eval Res*, 2018, 41(5): 709-715.
- [8] 高月, 梁爱华, 范晓辉, 等. 中药安全性研究: 方法、应用与前景 [J]. *工程*, 2019, 5(1): 165-178.
Gao Y, Liang A H, Fan X H, et al. Safety research in traditional Chinese medicine: Methods, applications, and outlook [J]. *Engineering*, 2019, 5(1): 165-178.
- [9] Hillebrecht A, Muster W, Brigo A, et al. Comparative evaluation of in silico systems for ames test mutagenicity prediction: Scope and limitations [J]. *Chem Res Toxicol*, 2011, 24(6): 843-854.
- [10] Tikkanen L, Matsushima T, Natori S. Mutagenicity of anthraquinones in the Salmonella preincubation test [J]. *Mutat Res*, 1983, 116(3/4): 297-304.
- [11] 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.
- [12] Liberman D F, Fink R C, Schaefer F L, et al. Mutagenicity of anthraquinone and hydroxylated anthraquinones in the Ames/Salmonella microsome system [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1982, 43(6): 1354-1359.
- [13] 任璐, 文海若, 吕建军, 等. SD大鼠重复给予大黄素甲醚肝毒性与遗传毒性研究 [J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(10): 1719-1726.
Ren L, Wen H R, Lü J J, et al. Hepatotoxicity and genotoxicity study of physcion in SD rats with repeated doses [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2018, 38(10): 1719-1726.
- [14] 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.
Wang Y N, Wen H R, Wang X. Research progress on evaluation methods of genotoxic gene mutation [J]. *Carcinog Teratog Mutagen*, 2019, 31(5): 406-411.
- [15] 于仲波, 吴南翔, 金锋, 等. 1485种化学物致突变试验和致癌试验结果一致性比较 [J]. *毒理学杂志*, 2007, 21(4): 320-320.
Yu Z B, Wu N X, Jin F, et al. Comparison of the consistency between mutagenic test and carcinogenic test of 1485 chemicals [J]. *J Toxicol*, 2007, 21(4): 320-320.
- [16] 许春花, 张秀萍, 许雪萍, 等. Mini-Ames与Ames实验结果一致性比较 [A] // 2016年第六届全国药物毒理学年会论文集 [C]. 重庆: 中国毒理学会, 2016: 262-263.
Xu C H, Zhang X P, Xu X P, et al. Consistency comparison between the experimental results of Mini-Ames and Ames [A] // 2016 Proceedings of the 6th National Conference on Pharmaceutical Toxicology [C]. Chongqing: Chinese Society of Toxicology, 2016: 262-263.
- [17] 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.
- [18] 曹易懿, 刘倩, 奚晶, 等. 应用Ames波动试验比较4种马兜铃酸组分的致突变作用 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2016, 28(5): 398-402.
Cao Y Y, Liu Q, Xi J, et al. Comparative evaluation of mutagenicity of four aristolochic acids components using the Ames fluctuation test [J]. *Carcinog Teratog Mutagen*, 2016, 28(5): 398-402.
- [19] Kirkland D, Reeve L, Gatehouse D, et al. A core *in vitro* genotoxicity battery comprising the Ames test plus the *in*

- vitro* micronucleus test is sufficient to detect rodent carcinogens and *in vivo* genotoxins [J]. *Mutat Res*, 2011, 721(1): 27-73.
- [20] 蒋贵仲. 中药中马兜铃酸含量的 HPLC 测定及复方减毒效果的 MLA 试验研究 [D]. 上海: 上海交通大学, 2007.
Jiang G Z. Determination of aristolochic acids by HPLC and studies on toxicity-reduced effect by MLA in TCM [D]. Shanghai: Shanghai Jiao Tong University, 2007.
- [21] 朱钦翥, 陈维, 张立实. 大黄素和大黄酸的体外遗传毒性评价 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2011, 23(1): 65-67.
Zhu Q Z, Chen W, Zhang L S. Evaluation of *in vitro* genotoxicity of emodin and Rhein [J]. *Carcinog Teratog Mutagen*, 2011, 23(1): 65-67.
- [22] McKelvey-Martin V J, Green M H, Schmezer P, et al. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review [J]. *Mutat Res*, 1993, 288(1): 47-63.
- [23] Collins A R. Measuring oxidative damage to DNA and its repair with the comet assay [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(2): 794-800.
- [24] Rundell M S, Wagner E D, Plewa M J. The comet assay: Genotoxic damage or nuclear fragmentation? [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2003, 42(2): 61-67.
- [25] Brkanac S R, Gerić M, Gajski G, et al. Toxicity and antioxidant capacity of *Frangula alnus* Mill. bark and its active component emodin [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*, 2015, 73(3): 923-929.
- [26] Mueller S O, Schmitt M, Dekant W, et al. Occurrence of emodin, chrysophanol and physcion in vegetables, herbs and liquors. Genotoxicity and anti-genotoxicity of the anthraquinones and of the whole plants [J]. *Food Chem Toxicol*, 1999, 37(5): 481-491.
- [27] Nitzsche D, Melzig M F, Arlt V M. Evaluation of the cytotoxicity and genotoxicity of aristolochic acid I-a component of *Aristolochiaceae* plant extracts used in homeopathy [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2013, 35(2): 325-334.
- [28] 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.
- [29] Szeto Y T, Wong S C Y, Wong J W M, et al. *In vitro* antioxidation activity and genoprotective effect of selected Chinese medicinal herbs [J]. *Am J Chin Med*, 2011, 39(4): 827-838.
- [30] 陈高峰, 王亚楠, 王丹, 等. *Pig-a* 基因突变试验研究进展 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2019, 31(6): 492-497.
Chen G F, Wang Y N, Wang D, et al. The research progress of *Pig-a* gene mutation test [J]. *Carcinog Teratog Mutagen*, 2019, 31(6): 492-497.
- [31] Cammerer Z, Bhalli J A, Cao X F, et al. Report on stage III *Pig-a* mutation assays using *N*-ethyl-*N*-nitrosourea-comparison with other *in vivo* genotoxicity endpoints [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2011, 52(9): 721-730.
- [32] Mckinzie P B, Revollo J R. Whole genome sequencing of mouse lymphoma L5178Y-3.7.2C (*tk^{+/+}*) reveals millions of mutations and genetic markers [J]. *Mutat Res*, 2017, 814: 1-6.
- [33] 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.
- [34] 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.
- [35] 王亚楠, 闫明, 汪祺, 等. 雷公藤甲素致 L5178Y 细胞及小鼠 *Pig-a* 基因突变风险评价 [J]. *中国现代中药*, 2020, 22(10): 1630-1637.
Wang Y N, Yan M, Wang Q, et al. Risk assessment of *Pig-a* gene mutation risk on L5178Y cell and mice induced by triptolide [J]. *Mod Chin Med*, 2020, 22(10): 1630-1637.
- [36] 汪祺, 闫明, 王亚楠, 等. 染料溶剂红 207 的体外致突变风险评价 [J]. *药物评价研究*, 2020, 43(12): 2416-2421.
Wang Q, Yan M, Wang Y N, et al. *In vitro* mutagenicity risk assessment of dye solvent red 207 [J]. *Drug Eval Res*, 2020, 43(12): 2416-2421.

[责任编辑 兰新新]