

基于体外 *Pig-a* 基因突变试验的大黄素型蒽醌致突变风险评价

王亚楠, 叶倩, 王雪, 汪祺*, 文海若*

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要: 目的 对相同母核结构的8种大黄素型蒽醌类化合物开展体外 *Pig-a* 基因突变试验, 分析不同大黄素型蒽醌结构与致突变性的关联。方法 L1578Y细胞分别与系列浓度的大黄素、芦荟大黄素、大黄素甲醚、大黄酚、大黄酸、羟基大黄素、大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷和芦荟大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷作用4 h (有S9) 或24 h (无S9), 给药24 h后应用细胞计数板进行计数, 计算细胞相对倍增速率 (RPD) 评价受试物细胞毒性; 细胞表达8 d后经APC-anti-CD45和PE-anti-CD90.2标定后, 使用流式细胞仪检测突变细胞 (CD45⁺CD90⁻) 发生率。结果 所有受试物在有或无S9代谢活化条件下所设浓度组 RPD均大于50%, 未见明显细胞毒性作用, 可排除试验中假阳性结果。在非S9代谢活化条件下芦荟大黄素 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 *Pig-a* 基因突变率与溶媒对照组比较显著升高 ($P < 0.001$); S9代谢活化条件下, 与溶剂对照组比较, 大黄素 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组, 羟基大黄素 6.25、12.5、25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组, 大黄酚 25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组和大黄酸 12.5、25、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 *Pig-a* 基因突变率显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。结论 羟基取代基的多寡及所在位点是蒽醌类化合物致突变性强弱的决定性因素, 其体内致突变性及致癌性作用仍需进行大量体内研究证实。

关键词: 大黄素型蒽醌; 致突变性; L1578Y细胞; 体外 *Pig-a* 基因突变试验; 羟基取代基; 大黄素; 芦荟大黄素; 大黄素甲醚; 大黄酚; 大黄酸; 羟基大黄素; 大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷; 芦荟大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷

中图分类号: R994 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2022) 07-1233-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.07.003

Mutagenic risk evaluation of emodin-type anthraquinone using *in vitro Pig-a* mutation assay

WANG Yanan, YE Qian, WANG Xue, WANG Qi, WEN Hairuo

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

Abstract: Objective To test eight emodin-type anthraquinone compounds with the same core structure using *in vitro Pig-a* gene mutation assay, and to analyze the relationship between different emodin-type anthraquinone structures and mutagenicity. **Methods** L1578Y cells were treated with different concentrations of emodin, aloe-emodin, emodin methyl ether, chrysophanol, rhein, hydroxyemodin, emodin-8-*O*- β -D-glucoside and aloe-emodin-8-*O*- β -D-glucoside treatment for 4 h (with S9) or 24 h (without S9). Cell counting plate was used to count 24 h after administration, and the relative cell multiplication rate (RPD) was calculated to evaluate the cytotoxicity of the tested samples. After eight days of expression period, the cells were labelled with APC-anti-CD45 and PE-anti-CD90.2, and the incidence of mutant cells (CD45⁺CD90⁻) were detected using flow cytometry. **Results** The RPD of all tested substances in the concentration group with or without metabolic activation was greater than 50%, and no obvious cytotoxicity was observed, so false positive results in the test could be excluded. The mutation rate of *Pig-a* gene in aloe emodin 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group was significantly higher than that in the solvent control group under non-S9 metabolic activation condition ($P < 0.001$). Under S9 metabolic activation condition, compared with solvent control group, the mutation rate of *Pig-a* gene in emodin 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ group, hydroxyl emodin 6.25, 12.5, 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ groups, chrysophanol 25, 50, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ groups and rhein 12.5, 25, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ groups was significantly increased ($P < 0.05$, 0.01, 0.001). **Conclusion** The number and position of hydroxyl substituents are the decisive factors for the mutagenicity of anthraquinone compounds. However, *in vivo* mutagenic and carcinogenic effects of emodin-

收稿日期: 2022-03-29

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: 王亚楠, 女, 硕士, 研究方向为遗传毒理。E-mail: wangyanan_ytu@126.com

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

汪祺, 女, 博士, 研究员, 研究方向为中药毒理。E-mail: sansan8251@sina.com

type anthraquinones still need to be confirmed by a large number of *in vivo* studies.

Key words: emodin-type anthraquinone; mutagenicity; L5178Y cell; *in vitro* *Pig-a* gene mutation assay; hydroxyl substituents; emodin; aloe-emodin; emodin methyl ether; chrysophanol; rhein; hydroxyemodin; emodin-8-*O*- β -D-glucoside; aloe-emodin-8-*O*- β -D-glucoside

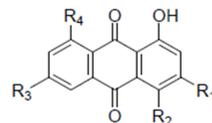
大黄素型蒽醌为一类以大黄素为母核且具有蒽醌环致突变警示结构的化合物,包括羟基大黄素、芦荟大黄素、大黄素甲醚、大黄酚、大黄酸等(图1),其细菌回复突变试验结果以导致鼠伤寒沙门氏菌 TA1537 和 TA98 回复菌落数增加为主^[1]。目前观点认为,大黄素型蒽醌的致突变作用是由其蒽醌环的平面致密环结构引起的,该结构可以嵌入 DNA 碱基对,并干扰拓扑异构酶 II 导致双倍的 DNA 断裂^[2]。然而,不同取代基及引入位点可能对大黄素型蒽醌的致突变性产生一定影响。当前关于蒽醌致突变性的判断主要基于细菌回复突变试验结果,且有研究证实大黄素型蒽醌经 I 相代谢后其致突变性加强,如仅在代谢活化条件下, Ω -羟基大黄素可导致鼠伤寒沙门氏菌回复性突变^[3]。因细菌与哺乳动物细胞的代谢体系不同,可能产生不同的代谢产物。一项就细菌突变试验结果与基于 F344 大鼠和 B6C3F₁ 小鼠的 213 个化合物的 2 年致癌性试验结果回顾性比较发现,前者的假阳性率可达 37.2%^[4]。故有必要开发其他致突变性评价方法与细菌回复突变试验有机结合,对化合物的致突变风险进行综合评估。本课题组前期在国内首次建立基于小鼠淋巴瘤(L5178Ytk^{+/+}-3.7.2C)细胞的体外 *Pig-a* 基因突变试验^[5],其中各阳性对照组与溶媒对照组之间存在显著差异,表明方法学完成初步验证^[6]。该方法可在体外对细菌回复突变试验结果为弱阳性的化合物的致突变性进行验证,对于化合物代谢产物的致突变性研究具有实用价值,也为化合物致突变性早期筛选提供新选择^[7]。

本研究分别无和有鼠肝 S9 代谢活化条件下开展体外 *Pig-a* 基因突变试验,评价 8 种典型大黄素型蒽醌的致突变性风险,从哺乳动物细胞试验体系验证不同取代基对大黄素型蒽醌致突变性风险的影响。

1 材料

1.1 主要试剂

大黄素(质量分数>98.7%,批号 110756-201512)、芦荟大黄素(质量分数>98.3%,批号 110795-201710)、大黄素甲醚(质量分数>99%,批号 110758-201616)、大黄酚(质量分数>99.2%,批号 110796-201621)、大黄酸(质量分数>99.3%,批



化合物	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
大黄素	CH ₃	H	OH	OH
羟基大黄素	CH ₃	OH	OH	OH
芦荟大黄素	CH ₂ OH	H	H	OH
大黄素甲醚	CH ₃	H	OCH ₃	OH
大黄酚	CH ₃	H	H	OH
大黄酸	COOH	H	H	OH
大黄素-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	CH ₃	H	OH	Glu
芦荟大黄素-8- <i>O</i> - β -D-葡萄糖苷	CH ₂ OH	H	H	Glu

图1 大黄素型蒽醌类化合物结构
Fig. 1 Structural diagram of emodin type anthraquinone compounds

号 110757-201607)均购自中国食品药品检定研究院;羟基大黄素(质量分数>98%,批号 T08J7Z17479)购自上海源叶生物科技有限公司;大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷(质量分数>98%,批号 17110201)、芦荟大黄素-8-*O*- β -D-葡萄糖苷(质量分数>98%,批号 17103003),购自成都普菲德生物技术有限公司。

甲基磺酸乙酯(EMS,批号 126K0758)、苯并芘[B(a)P,批号 SLBF45532]均购自美国 Sigma 公司;二甲亚砜(DMSO,批号 BCBW5664)、6-磷酸葡萄糖(glucose-6-phosphate, G-6-P,批号 WXBC7942V)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸二钠盐(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate disodium salt, NADP-Na₂,批号 18E2156560)、青链霉素混合液(批号 2019313)、丙酮酸钠(批号 20160612)购自国药集团化学试剂有限公司;RPMI 1640 培养基(批号 2025394)购自美国 Gibco 公司;马血清(批号 AC10235369)和磷酸缓冲液(PBS,批号 AD19942268)购自美国 Hyclone 公司;APC-anti-CD45(批号 7166674)和 PE-anti-CD90.2(批号 7110569)购自 BD Biosciences 公司;肝匀浆 S9(批号 20181105)购自北京安保迪科技有限公司。

1.2 主要仪器

流式细胞仪(FACS Calibur, BD Bioscience 公司);高速冷冻离心机(Centrifuge 5810R, Eppendorf 公司);倒置荧光显微镜(IX71, Olympus 公司);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);倒置显微镜(CKX31, 日本 Nikon 公司)。

1.3 细胞

小鼠淋巴瘤细胞 L5178Y $tk^{+/-}$ -3.7.2C, 引自日本国立医药品食品卫生研究所, 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。将 L5178Y 细胞解冻复苏后置于完全培养基 R10(含 10% 马血清、1% 青链霉素混合液、0.2 mg·kg⁻¹ 丙酮酸钠的 RPMI 1640 培养基), 在 37 °C、5% CO₂ 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进行试验。

2 方法

2.1 体外 *Pig-a* 基因突变试验

2.1.1 受试物短时(4 h)处理(有 S9) 细胞达对数生长期后, 更换 R0 培养基(含 1% 青链霉素混合液、0.2 mg·mL⁻¹ 丙酮酸钠的 RPMI 1640 培养基), 调整细胞密度为 5×10⁵·mL⁻¹ 于 50 mL 离心管中, 并添加各大黄素型蒽醌类化合物, 受试物质量浓度见表 1, 阳性对照采用 B(a)P(5.0 μg·mL⁻¹), 溶媒对照组加入 1% DMSO, 各组均加入 2% S9 混合液, 37 °C、20 r·min⁻¹ 振摇 4 h 后, 细胞经 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, PBS 洗涤 2 次, 重悬于 10 mL 完全培养基 R10。给药后 24 h 使用细胞计数板进行细胞计数, 细胞表达 8 d, 表达期细胞密度维持在 1.0×10⁶~2.0×10⁶ 个·mL⁻¹。

表 1 大黄素型蒽醌不同代谢条件下处理浓度

Table 1 Treatment concentration of emodin anthraquinone under different metabolic conditions

受试物	溶媒	质量浓度/(μg·mL ⁻¹)	
		无 S9	有 S9
大黄素	DMSO	3.125、6.250、12.500、25.000、50.000	3.125、6.250、12.500、25.000、50.000
羟基大黄素	DMSO	3.125、6.250、12.500、25.000、50.000	1.560、3.125、6.250、12.500、25.000
芦荟大黄素	DMSO	1.560、3.125、6.250、12.500、25.000	0.780、1.560、3.125、6.250、12.500
大黄素甲醚	DMSO	3.125、6.250、12.500、25.000、50.000	3.125、6.250、12.500、25.000、50.000
大黄酚	DMSO	3.125、6.250、12.500、25.000、50.000	6.250、12.500、25.000、50.000、100.000
大黄酸	DMSO	3.125、6.250、12.500、25.000、50.000	3.125、6.250、12.500、25.000、50.000
大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷	DMSO	6.25、12.50、25.00、50.00、100.00	6.25、12.50、25.00、50.00、100.00
芦荟大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷	DMSO	6.25、12.50、25.00、50.00、100.00	6.25、12.50、25.00、50.00、100.00

2.1.2 受试物连续(24 h)处理(无 S9) 细胞达对数生长期后, 更换 R0 培养基(同“2.1.1 项”), 调整细胞密度为 5×10⁵ 个·mL⁻¹ 于 10 mL 培养基中, 并添加各大黄素型蒽醌类化合物, 受试物浓度见表 2, 阳性剂为 EMS(500 μg·mL⁻¹), 溶媒对照组加入 1% DMSO, 细胞于 37 °C、5% CO₂ 条件下与受试物作用 24 h。处理结束后收集细胞并计数, 细胞经 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, PBS 洗涤 2 次, 重悬于 10 mL 完全培养基 R10, 细胞表达 8 d, 表达期细胞密度维持在 1.0×10⁶~2.0×10⁶ 个·mL⁻¹。

2.1.3 细胞毒性 以细胞相对倍增速率(relative population doubling, RPD)评价受试物细胞毒性。

给药 24 h 后细胞倍增速率(PD)=lg 处理后细胞量/初始细胞量/lg2

RPD=受试物组 PD/溶媒对照 PD

2.1.4 流式细胞术检测 L5178Y 细胞相对突变数取 2×10⁶ 个细胞, 4 °C、1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 弃上清, 每浓度组加 5 mL 工作液[含有 2% 胎牛血清的 PBS], 混匀后 4 °C、1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min。吸弃上清液, 每孔加入 200 μL APC-anti-CD45、PE-anti-CD90.2 混合工作液, 终质量浓度为 1 μg·mL⁻¹, 重悬细胞并混合均匀。将细胞置于 2~8 °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 工作液中, 4 °C、340×g 离心 3 min。吸弃上清液, 加入 300 μL 工作液, 混合均匀后转入流式管中上机检测。突变型细胞表面无 CD90 蛋白, CD45 蛋白正常表达, 故在流式图中显示无 PE 荧光, APC 正常。计算 L5178Y 细胞相对突变数。

L5178Y 细胞相对突变数=突变细胞数(CD90⁻CD45⁺)/总细胞数×10⁶

2.2 数据处理

数据采用 GraphpadPrism7 (USA, Graphpad Software 公司) 进行统计分析, 采用 One Way ANOVA 检验将各受试物处理组的相对突变数与溶媒对照组作比较。阳性剂组 L5178Y 细胞相对突变数的数目通常是溶媒对照组 2 倍及以上^[8-9]。本中心 1% DMSO、5.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ B(a)P (4 h, S9 条件) 和 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ EMS (24 h, 非 S9 条件) 诱导的 L5178Y 细胞相对突变数历史背景值范围分别为每 1×10^6 个细胞中有 100~400、1 000~1 800 和 1 200~1 600 个^[5]。

3 结果

3.1 大黄素型蒽醌的细胞毒性

大黄素型蒽醌类化合物给药后 24 h (无 S9) 或 4 h (有 S9) 后的 RPD 数据如图 2、3 所示, 所有受试物无论在有或无代谢活化条件下所设浓度组 RPD 均大于 50%^[5]。提示在本研究给药浓度范围内, 所有受试物均未见明显细胞毒性作用, 可排除试验中假阳性结果。

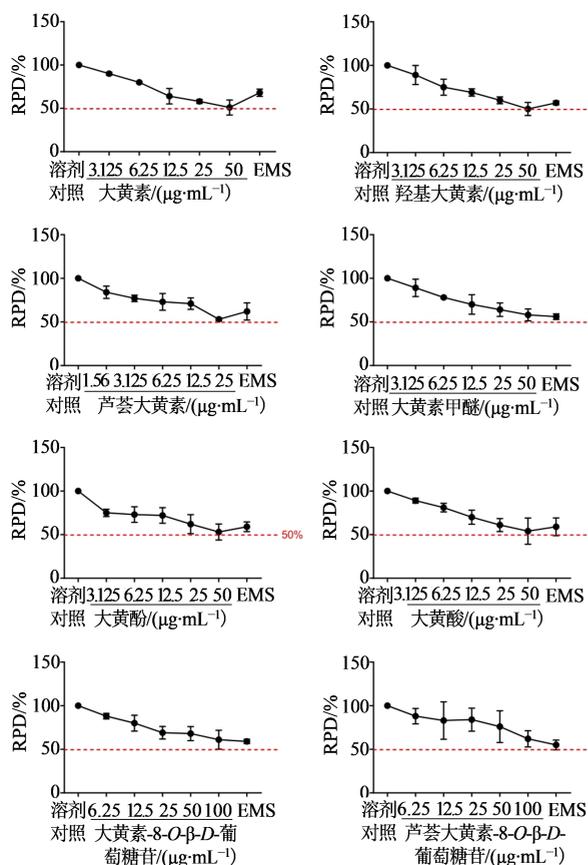


图2 非S9代谢状态下大黄素型蒽醌类化合物 RPD 结果 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 2 RPD results of emodin anthraquinone compounds in non S9 metabolic state ($\bar{x}\pm s, n=3$)

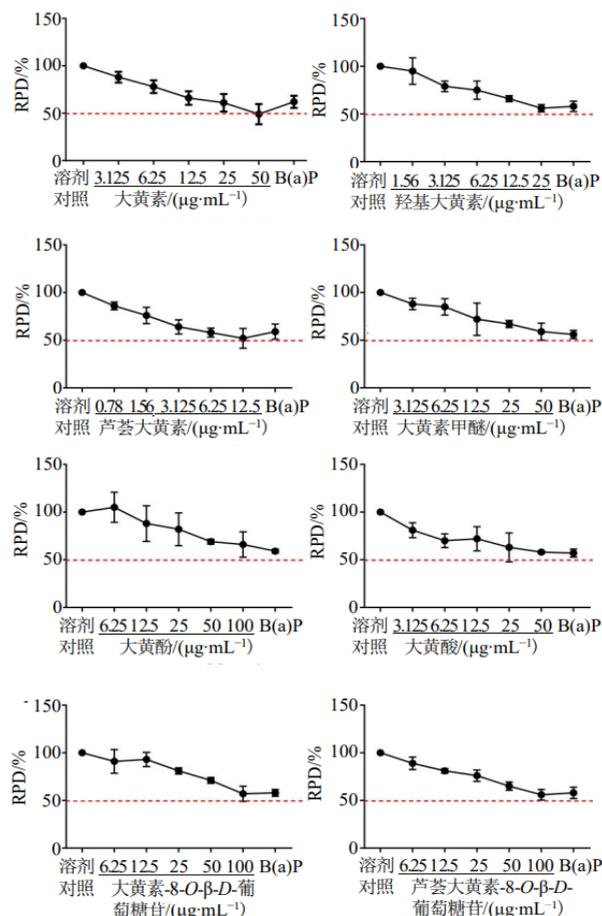


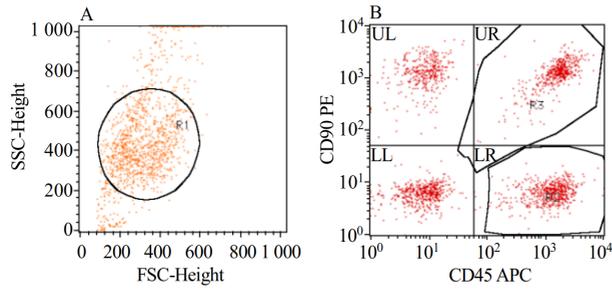
图3 有S9代谢状态下大黄素型蒽醌类化合物 RPD 结果 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

Fig. 3 RPD results of emodin anthraquinone compounds under S9 metabolism ($\bar{x}\pm s, n=3$)

3.2 大黄素型蒽醌对 *Pig-a* 基因突变率的影响

Pig-a 基因突变流式模板调试见图 4, 非 S9 代谢活化条件, 溶剂对照组和阳性对照组 EMS ($500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 流式结果示意图见图 5。S9 代谢活化条件, 溶剂对照组和阳性对照组 B(a)P ($5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) 流式结果示意图见图 6。非 S9 代谢活化条件下, 大黄素型蒽醌类化合物给药 24 h 后表达 8 d 时 *Pig-a* 基因突变率结果见图 7, 芦荟大黄素 $25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 *Pig-a* 基因突变率与溶媒对照组比较显著升高 ($P < 0.001$)。

S9 代谢活化条件下, 大黄素型蒽醌类化合物给药 4 h 后表达 8 d 时 *Pig-a* 基因突变率见图 8, 与溶剂对照组比较, 大黄素 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组, 羟基大黄素 6.25、12.5、25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组, 大黄酚 25、50、100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组和大黄酸 12.5、25、50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 组 *Pig-a* 基因突变率显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001)。



A-圈选总细胞; B-分离收集细胞, 其中 UL-单染 PE-anti-CD90.2 细胞, UR-双染 APC-anti-CD45 和 PE-anti-CD90.2 细胞, LL-空白细胞, LR-单染 APC-anti-CD45 细胞
A-cycled total cells; B-cells were isolated and collected, including UL-monostained PE-anti-CD90.2 cells, UR-double-stained APC-anti-CD45 and PE-anti-CD90.2 cells, LL-blank cells, LR-monostained APC-anti-CD45 cells

图4 体外 *Pig-a* 流式模板示意图

Fig. 4 Schematic diagram of *Pig-a* test flow template *in vitro*

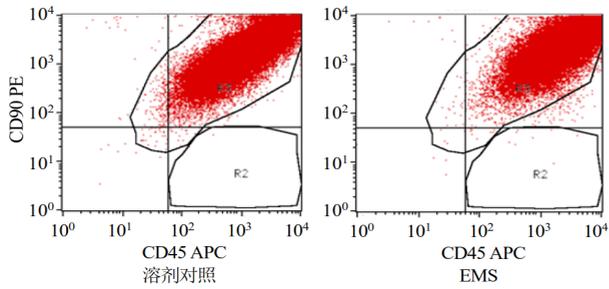


图5 非S9代谢状态下流式结果示意图

Fig. 5 Schematic diagram of flow results without S9 metabolic activation

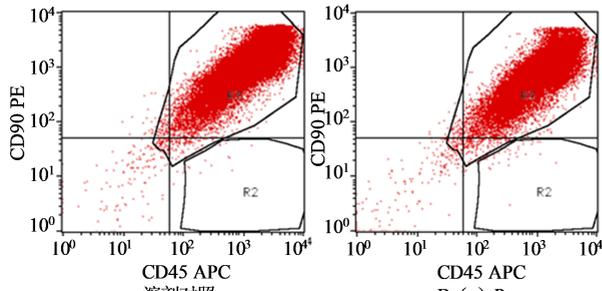
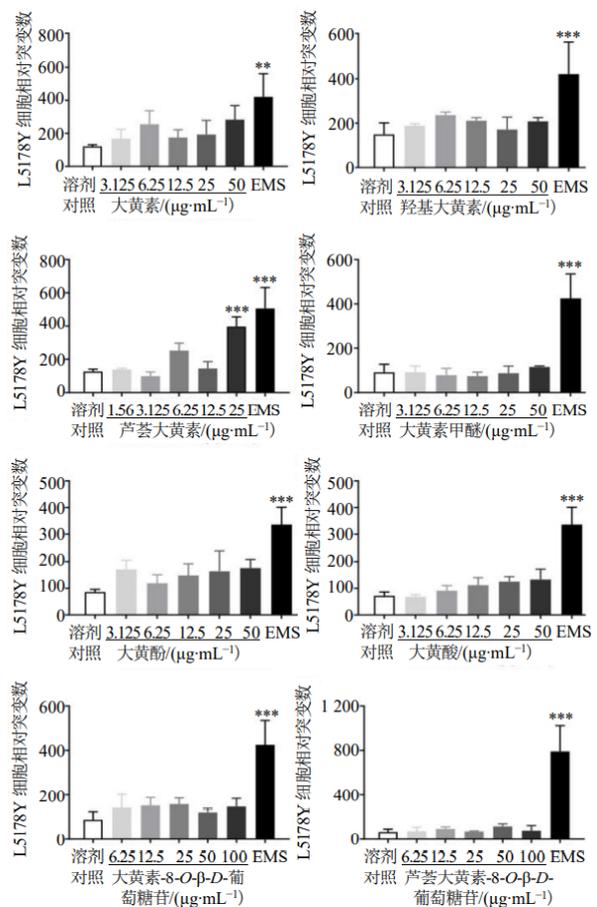


图6 S9条件下流式结果示意图

Fig. 6 Schematic diagram of flow results without S9 metabolic activation

4 讨论

Pig-a 基因突变试验是以正常哺乳动物细胞 *Pig-a* 基因缺失为报告基因, 以与 *Pig-a* 基因相关的细胞表面蛋白表达为检测对象的基因突变风险评价方法^[10]。本研究使用 L5178Y 细胞开展体外 *Pig-a* 基因突变试验, 该方法为课题组在国内首次建立并已完成初步方法学验证。L5178Y 细胞不携带 *Pig-l* 基因突变^[9], 与 TK6 细胞相比自发突变率低, 且常规应用于 *tk/hprt* 基因突变研究, 适用于就不同试验体



与溶剂对照组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

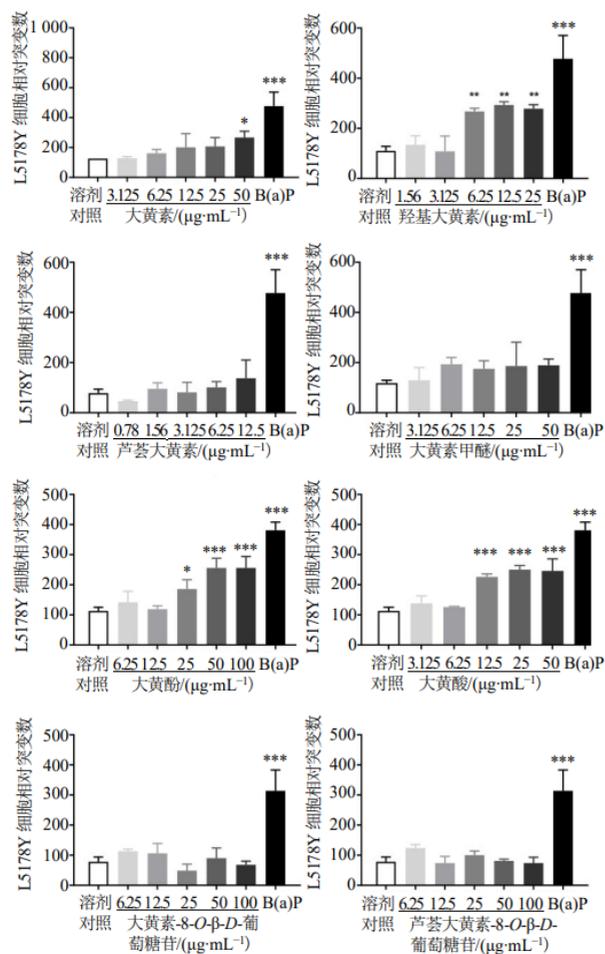
** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs solvent control group

图7 非S9代谢状态下大黄素型蒽醌对 *Pig-a* 基因突变率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effect of emodin type anthraquinones on mutation rate of *Pig-a* without S9 metabolic activation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

系的基因突变检测终点结果进行比较。前期研究^[6,9]提示, 体外 *Pig-a* 基因突变试验可有效检出致突变剂, 并对不同作用机制的遗传毒性化合物进行区分。该方法作为现有体外致突变性风险筛选方法(如细菌回复突变试验和 *tk/hprt* 基因突变试验)的有力补充, 具有重要应用前景^[7,11]。

本研究结果提示非 S9 代谢状态下芦荟大黄素 ($25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 组以及在 S9 代谢状态下大黄素 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组, 羟基大黄素 $6.25, 12.5, 25 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组, 大黄酚 $25, 50, 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组和大黄酸 $12.5, 25, 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 组 *Pig-a* 基因突变率有所增加。本课题组在细菌回复突变试验中得到相似结果。Tikkanen 等^[12]研究发现在经 I 相代谢反应后含有 1~3 个羟基基团的大黄素、茜素、大黄酚、2-羟基蒽醌、大黄酸可导致 TA1537 回复突变菌落数大幅增加; 其中, 大黄素、茜素、2-羟基蒽醌对 TA100 也具有



与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$

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

图8 S9代谢状态下大黄素型蒽醌对Pig-a基因突变率的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 8 Effect of emodin type anthraquinones on the mutation rate of Pig-a with S9 metabolic activation ($\bar{x} \pm s, n=3$)

致突变性,提示羟基取代基是蒽醌类化合物致突变性强弱的关键。大黄素型蒽醌经I相反应代谢后发生氧化反应^[13-14],生成羟基大黄素,并导致碱基置换作用^[14]。推断I相代谢反应可引入4,6,8位羟基(-OH)基团或3位羟甲基(-CH₂OH)和羧基(-COOH),从而增加分子间作用力及与分子碱基嵌入作用。相反,6位甲醚基(-OCH₃)和8位葡萄糖基(-Glu)结构的引入使蒽醌的空间立体位阻作用增强,可能减弱其与碱基结合作用。

综上所述,羟基取代基的多寡及所在位点是蒽醌类化合物致突变性强弱的决定性因素。在大黄素母核的基础上引入羟基基团后其致突变性大幅升高,而较大的甲醚基和葡萄糖基基团的引入反而使受试物致突变性降低。此外,羟基所在位点对其致突变性也存在一定影响。尽管大黄素型蒽醌类

经不同基团及不同位点修饰后,其致突变性强弱可发生改变,但其体内致突变性及致癌性作用仍需进行大量体内研究证实。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Bösch R, Friederich U, Lutz W K, et al. Investigations on DNA binding in rat liver and in *Salmonella* and on mutagenicity in the Ames test by emodin, a natural anthraquinone [J]. *Mutat Res*, 1987, 188(3): 161-168.
- [2] 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.
- [3] Murakami H, Kobayashi J, Masuda T, et al. *Omega*-hydroxyemodin, a major hepatic metabolite of emodin in various animals and its mutagenic activity [J]. *Mutat Res*, 1987, 180(2): 147-153.
- [4] Smith C J, Perfetti T A. Tumor site concordance and genetic toxicology test correlations in NTP 2-year feed studies [J]. *Toxicol Res Appl*, 2017, 1: 239784731773994.
- [5] 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.
- [6] 王亚楠, 王雪, 文海若. 基于L5178Y细胞的Pig-a基因突变试验方法学研究 [J]. *药物分析杂志*, 2021, 41(1): 89-96.
- Wang Y N, Wang X, Wen H R. Pig-a gene mutation test methodology research based on L5178Y cells [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2021, 41(1): 89-96.
- [7] 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. Research progress of Pig-a gene mutation test [J]. *Carcinog Teratog Mutagen*, 2019, 31(6): 492-497.
- [8] Krüger C T, Fischer B M, Armant O, et al. The *in vitro* Pig-a gene mutation assay: Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-related genotype-to-phenotype relationship in TK6 cells [J]. *Arch Toxicol*, 2016, 90(7): 1729-1736.
- [9] 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.

- [10] Bryce S M, Bemis J C, Dertinger S D. *In vivo* mutation assay based on the endogenous *Pig-a* locus [J]. Environ Mol Mutagen, 2008, 49(4): 256-264.
- [11] 文海若, 兰洁, 叶倩, 等. 天然药物成分致突变性风险预测与评价方法研究进展 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(7): 1221-1226.
- Wen H R, Lan J, Ye Q, et al. Research progress on prediction and evaluation methods of mutagenicity risk of natural medicinal ingredients [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(7): 1221-1226.
- [12] Tikkanen L, Matsushima T, Natori S. Mutagenicity of anthraquinones in the *Salmonella* preincubation test [J]. Mutat Res, 1983, 116(3/4): 297-304.
- [13] 汪祺, 杨建波, 刘越, 等. 基于UGT1A1抑制作用考察大黄素肝毒性作用 [J]. 药物分析杂志, 2019, 39(7): 1177-1184.
- Wang Q, Yang J B, Liu Y, et al. Study on the hepatotoxicity of emodin based on the inhibition of UGT1A1 enzyme [J]. Chin J Pharm Anal, 2019, 39(7): 1177-1184.
- [14] Fouts J R. Interaction of drugs and hepatic microsomes [J]. Fed Proc, 1962, 21: 1107-1111.

[责任编辑 兰新新]

•公益广告•

