

## 基于毒理学软件和细菌回复突变试验的大黄素型蒽醌基因突变风险评价

王亚楠, 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 使用毒理学软件和细菌回复突变(Ames)试验评价大黄素型蒽醌类化合物的致突变风险, 分析不同取代基及所在位置对大黄素型蒽醌致突变风险的影响。方法 使用Toxtree、Derek Nexus和Sarah Nexus毒性预测软件对大黄素、羟基大黄素、芦荟大黄素、大黄素甲醚、大黄酚、大黄酸、大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、芦荟大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素-1-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷的致突变风险进行预测, 并使用鼠伤寒沙门氏菌TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535和TA1537及大肠杆菌WP2 *uvrA*开展基于6孔板的Ames试验, 评价10种大黄素型蒽醌的致突变性。结果 基于蒽醌母核结构, Toxtree、Derek Nexus和Sarah Nexus毒性预测软件提示所有大黄素型蒽醌均存在致突变风险。在非S9代谢活化状态下, 芦荟大黄素导致TA98和WP2 *uvrA* Ames菌落数增加, 大黄酚、大黄酸导致WP2 *uvrA* Ames菌落数增加。在大鼠肝S9代谢活化状态下, 大黄素和大黄酸导致TA98和TA1537 Ames菌落数增加, 羟基大黄素导致TA97、TA98、TA1537和WP2 *uvrA* Ames菌落数增加, 芦荟大黄素导致TA98、TA1537和WP2 *uvrA* Ames菌落数增加, 大黄素甲醚导致TA1537 Ames菌落数增加, 大黄酚导致TA1537和WP2 *uvrA*回复菌落突变数增加, 大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷可引起TA1537回复突变菌落数增加。结论 大黄素型蒽醌类化合物在大黄素母核的基础引入羟基后其诱变能力显著升高, 较大葡萄糖苷基团的引入反而使受试物诱变能力降低。

**关键词:** 大黄素型蒽醌; 致突变性; 构效分析; 毒性预测; 细菌回复突变试验; 大黄素; 羟基大黄素; 芦荟大黄素; 大黄素甲醚; 大黄酚; 大黄酸; 大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷; 芦荟大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷; 大黄素-1-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷; 大黄素甲醚-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷

中图分类号: R994 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)07-1240-08

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.07.004

## Evaluation on mutagenic risk of emodin-type anthraquinone based on toxicology software and bacterial recovery mutation test

WANG Yanan, WANG Xue, WANG Qi, WEN Hairuo

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

**Abstract: Objective** To evaluate the mutagenic risk of emodin-type anthraquinones using toxicology software and bacterial reverse mutation test, and to analyze the effect of different substituents and positions on the mutagenic risk of emodin-type anthraquinones. **Method** Toxtree, Derek Nexus and Sarah Nexu were used to predict the mutagenic risk of emodin, hydroxyl emodin, aloe emodin, emodin methyl ether, chrysophanol, emodin acid, emodin -8-O- $\beta$ -D-glucoside, aloe emodin -8-O- $\beta$ -D-glucoside, emodin-1-O- $\beta$ -D-glucoside, emodin-8-O- $\beta$ -D-glucoside. *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100, TA102, TA1535 and TA1537 and *Escherichia coli* WP2 *uvrA* were adopted to perform a 6-well plate-based bacterial reverse mutation test, and the mutagenicity of 10 emodin-type anthraquinones were evaluated. **Results** Based on the anthraquinone core structure, Toxtree, Derek Nexus and Sarah Nexus suggested that all emodin-type anthraquinones are mutagenic. In the condition absent of S9 metabolic activation, aloe-emodin led to an increase in the number of revertants of TA98 and WP2 *uvrA*, and hydroxyemodin, chrysophanol, and rhein led to an increase in the number of revertants of WP2 *uvrA*. In the condition present of rat liver S9 metabolic activation, emodin and rhein increased the number of revertants of TA98 and TA1537, hydroxyemodin increased the number of revertants of TA97, TA98, TA1537 and WP2 *uvrA*, aloe-emodin increased the number of revertants of TA98 and TA1537 and WP2 *uvrA*, emodin methyl ether increased the

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

number of revertants of TA1537, chrysophanol increased the number of revertants of TA1537 and WP2 *uvrA*, emodin-8-*O*- $\beta$ -D-glucoside increased the number of revertants of TA1537. **Conclusion** The mutagenic capability of emodin-type anthraquinones was significantly increased after the introduction of hydroxyl groups into the base of emodin nucleus, while the introduction of larger glucoside groups decreased the mutagenic capability of the tested substances.

**Key words:** emodin-type anthraquinone; mutagenicity; structure-activity analysis; toxicity prediction; bacterial reverse mutation test; emodin; hydroxyl emodin; aloe emodin; emodin methyl ether; chrysophanol; emodin acid; emodin -8-*O*- $\beta$ -D-glucoside; aloe emodin-8-*O*- $\beta$ -D-glucoside; emodin-1-*O*- $\beta$ -D-glucoside; emodin-8-*O*- $\beta$ -D-glucoside

大黄素型蒽醌在大黄、何首乌、番泻叶等中药中广泛存在,有止血、抗菌、泻下、利尿等临床功效<sup>[1]</sup>。当前,多种蒽醌类化合物的遗传毒性风险已引起广泛重视。如羟基蒽醌于2013年被国际癌症研究机构(IARC)归类为2B致癌物(可能对人体存在致癌性)<sup>[2]</sup>,蒽醌母核也被识别为遗传毒性警示结构。欧洲化学品管理局现已将蒽醌类化合物列为具有致癌潜力的化合物,德国联邦风险评估研究所(BfR)也从2013年在食品包装生产的推荐材料清单中去除了蒽醌类化合物。既往研究提示,多种大黄素型蒽醌可导致细菌回复突变、细胞染色体或DNA断裂等遗传物质损伤<sup>[3-4]</sup>。有研究提示大黄素可增加鼠伤寒沙门氏菌TA98、TA1535和TA1537菌株的突变率,诱导L5178Y和TK6细胞DNA损伤,并增加骨髓微核发生率<sup>[5]</sup>。在作用机制方面,研究提示大黄素的蒽醌环的平面致密环结构可通过嵌入DNA碱基影响DNA的复制和转录<sup>[6]</sup>。尽管如此,大黄素与人体致癌风险的相关性尚不明确。

除大黄素外,何首乌等药材中存在多种大黄素型蒽醌且含量较高,且不乏重要药效成分。如大黄素、大黄酸和大黄素甲醚的质量分数可分别达到0.073 5、0.008 9、0.089 3 mg·g<sup>-1</sup><sup>[7]</sup>。如仅根据蒽醌母核结构,将所有含类似结构的化合物均视为存在致癌性风险并对其含量进行控制不够合理。从临床合理用药的角度,有必要深入研究大黄素型蒽醌的突变风险、突变特点及与取代基团的关系。本研究首先使用基于构效分析的毒理学软件对10种大黄素型蒽醌的致突变型风险进行预测,之后继续开展细菌回复突变(Ames)试验对其致突变风险进行评价,并梳理不同取代基及所在位置对大黄素型蒽醌致突变风险的影响。

## 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%,批号110757-201607)均购自中国食品药品检定研究院;大黄素甲醚-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷(质量分数>96%,批号Z08J7B17476)、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*- $\beta$ -D-葡萄糖苷(质量分数>98%,批号17110201)、大黄素-1-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷(质量分数>98%,批号170508)、芦荟大黄素-8-*O*- $\beta$ -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。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, 批号WAP0369)购自美国Sigma公司;叠氮钠(sodium azide, NaN<sub>3</sub>, 批号S32296047)购自美国Merck公司;9-氨基吖啶(9-aminoacridine, 9-AA, 批号A012244401)购自美国Acros Organics公司;2-氨基蒽(2-aminoanthracene, 2-AA, 批号W20255)购自美国Fluka公司;营养肉汤(CM0067 nutrient broth No.2)购自英国OXOID公司;琼脂粉、氨苄青霉素、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>、烟酰胺腺嘌呤双核苷酸磷酸盐(NADP)、葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-P)、KCl、MgCl<sub>2</sub>购自美国Sigma公司;大鼠肝S9混合液购自北京康瑞杰科技有限公司。

### 1.2 主要仪器

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

### 1.3 菌株

本研究所用菌株为鼠伤寒沙门氏菌组氨酸营养缺陷型(*his*<sup>-</sup>)菌株TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537和大肠杆菌色氨酸营养缺陷型(*trp*<sup>-</sup>)菌株WP2 *uvrA*,引自日本(株)生物科学中心(JBS INC)。试验前已进行氨基酸及生物素合成

缺陷、细胞壁脂多糖缺失(*rfa*)、紫外线修复缺陷(*uvrA*或 $\Delta$ *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。

## 2 方法

### 2.1 毒理学软件预测

分别将不同化合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)后,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

细菌冻融液与营养肉汤混合后置于水浴摇床在37℃、120 r·min<sup>-1</sup>条件下扩增10 h。根据受试物溶解度,并根据抑菌情况调整后,每个受试物(大黄素、羟基大黄素、芦荟大黄素、大黄素甲醚、大黄酚、大黄酸、大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、芦荟大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷)设置5个浓度(0.6、1.1、2.3、4.5、9.0  $\mu$ g·孔<sup>-1</sup>),分别在有或无S9代谢活化条件下,使用鼠伤寒沙门氏菌株TA97、TA98、TA100、TA102、TA1535、TA1537以及大肠杆菌WP2 *uvrA*开展基于6孔板培养的Ames试验<sup>[8]</sup>。设置溶媒对照(1% DMSO)组,每组平行3孔,所有样本置于37℃恒温培养约48 h后进行菌落计数,试验重复3次。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。在有或无S9条件下,至少1种菌株在背景菌苔生长良好的前提下的回变菌落数在检测范围内呈现剂量相关性增加,和/或一个或几个测试点的回变菌落数呈现可重复性增加时判为阳性;反之为阴性。

## 3 结果

### 3.1 致突变性风险预测

不同大黄素型蒽醌化合物的致突变性和致癌性预测结果如表1所示,Toxtree基于蒽醌母核结构预测大黄素、羟基大黄素、芦荟大黄素、大黄素甲醚、大黄酚、大黄酸、大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、芦荟大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷的Ames试验和致癌性结果均为阳性。Derek Nexus根据化合物含有的羟基蒽醌结构及蒽-9,10-二醇前体结构认为所有化合物均存在致突变性风险。Sarah Nexus则提示大黄素、羟基大黄素、芦荟大黄素、大黄素甲醚、大黄酚和大黄酸与数据库中可疑致突变性结构

匹配度达100%。含较大取代基的大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、芦荟大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷与可疑致突变性结构的匹配度则小于38%。

### 3.2 Ames试验

非S9代谢活化状态下和大鼠肝S9代谢活化后不同大黄素型蒽醌类化合物致Ames菌落数分别见表2、3。非S9代谢活化状态下,大黄酚、大黄酸在多个剂量条件下重复试验均可诱导大肠杆菌WP2 *uvrA* Ames菌落数达溶媒对照组均值的2倍及以上;芦荟大黄素可引起TA98(明确剂量效应关系)和WP2 *uvrA*(多个剂量)Ames菌落数达溶媒对照组的2倍及以上。

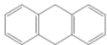
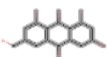
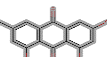
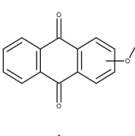
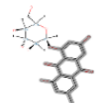
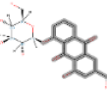
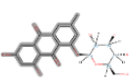
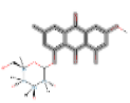
S9代谢活化状态下大黄素和大黄酸均可导致TA98和TA1537的Ames菌落数为溶媒对照组的2倍或3倍及以上(多个剂量);羟基大黄素可分别引起TA97(明确剂量效应关系)、TA98(明确剂量效应关系)和WP2 *uvrA*(多个剂量)Ames菌落数达溶媒对照组的2倍及以上,TA1537是溶媒对照组的3倍及以上(明确剂量效应关系);芦荟大黄素可引起TA98和WP2 *uvrA* Ames菌落数是溶媒对照组的2倍及以上(多个剂量),TA1537是溶媒对照组的3倍及以上(多个剂量);大黄素甲醚可引起TA1537 Ames菌落数达溶媒对照组的3倍及以上(明确剂量效应关系);大黄酚可引起TA1537 Ames菌落数达溶媒对照组的3倍及以上(多个剂量),WP2 *uvrA* Ames菌落数达溶媒对照组的2倍及以上(明确剂量效应关系);大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷可引起TA1537 Ames菌落数达溶媒对照组的3倍及以上(明确剂量效应关系)。部分菌株的Ames菌落数与给药剂量的关系不成明显线性关系,可能与较高剂量条件下受试物本身的细菌毒性导致的突变菌落数相对减少有关。

## 4 讨论

中药单体化合物众多,但相关毒性数据不足。基于构效关系模型建立的毒性预测软件已成为化合物毒性预测的首选方法<sup>[9]</sup>。由欧洲化学品局联合研究中心开发的免费毒性预测软件Toxtree对化合物的致细菌突变性和致癌性进行风险预测;由Lhasa Limited公司开发的Derek Nexus和Sarah Nexus则可以直接得出化合物致突变性风险等级分类,并提供包括相似化合物的试验结果、相关文献及推理过程。因基因突变是绝大多数癌症发生的起始环节,因此含警示结构的化合物具有一定致癌

表1 大黄素型蒽醌致突变风险预测结果

Table 1 Prediction results of mutagenic risk of emodin-type anthraquinone

| 大黄素型蒽醌             | CAS        | Toxtree    |     | Derek Nexus                                                                       |                                                                                     | Sarah Nexus 警示结构可信度/%                                                                      |                                                                                            |                                                                                            |                                                                                            |                                                                                            |
|--------------------|------------|------------|-----|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|
|                    |            | 致细菌<br>突变性 | 致癌性 | 警示结构                                                                              | 匹配结构                                                                                | 结构1<br> | 结构2<br> | 结构3<br> | 结构4<br> | 结构5<br> |
| 大黄素                | 518-80-9   | +          | +   | /                                                                                 |    | 100                                                                                        | 100                                                                                        | /                                                                                          | /                                                                                          | /                                                                                          |
| 羟基大黄素              | 481-73-2   | +          | +   | 羟基蒽醌结构<br>及蒽-9,10-二                                                               |    | 100                                                                                        | /                                                                                          | 100                                                                                        | /                                                                                          | /                                                                                          |
| 芦荟大黄素              | 481-72-1   | +          | +   | 醇前体结构                                                                             |    | 100                                                                                        | /                                                                                          | 100                                                                                        | /                                                                                          | /                                                                                          |
| 大黄素甲醚              | 521-61-9   | +          | +   |  |    | 100                                                                                        | 100                                                                                        | /                                                                                          | /                                                                                          | /                                                                                          |
| 大黄酚                | 481-74-3   | +          | +   | /                                                                                 |    | 100                                                                                        | 100                                                                                        | /                                                                                          | /                                                                                          | /                                                                                          |
| 大黄酸                | 478-43-3   | +          | +   | /                                                                                 |   | 100                                                                                        | 100                                                                                        | /                                                                                          | 100                                                                                        |                                                                                            |
| 大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷   | 23313-21-5 | +          | +   | /                                                                                 |  | 6                                                                                          | /                                                                                          | /                                                                                          | /                                                                                          | 29                                                                                         |
| 芦荟大黄素-8-O-β-D-葡萄糖苷 | 33037-46-6 | +          | +   | /                                                                                 |  | 13                                                                                         | /                                                                                          | /                                                                                          | /                                                                                          | 38                                                                                         |
| 大黄素-1-O-β-D-葡萄糖苷   | 38840-23-2 | +          | +   | /                                                                                 |  | 22                                                                                         | /                                                                                          | /                                                                                          | /                                                                                          | 29                                                                                         |
| 大黄素甲醚-8-O-β-D-葡萄糖苷 | 2629-54-8  | +          | +   | /                                                                                 |  | 8                                                                                          | /                                                                                          | /                                                                                          | /                                                                                          | 38                                                                                         |

“+”-Toxtree 预测结果阳性;“-”-Derek Nexus/Sarah Nexus 预测无匹配结构

“-”-Toxtree prediction result was positive; “/”-Derek Nexus/Sarah Nexus predicts no matching structure

表2 非S9代谢活化状态下Ames菌落数( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Table 2 Number of Ames colony count under non-S9 metabolic activation condition ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别   | 剂量/( $\mu\text{g} \cdot \text{孔}^{-1}$ ) | Ames 菌落数 |      |       |       |        |        |                 |
|------|------------------------------------------|----------|------|-------|-------|--------|--------|-----------------|
|      |                                          | TA97     | TA98 | TA100 | TA102 | TA1535 | TA1537 | WP2 <i>uvrA</i> |
| 溶剂对照 | —                                        | 47±5     | 9±3  | 47±4  | 48±2  | 5±2    | 5±2    | 3±3             |
| 大黄素  | 0.6                                      | 58±6     | 11±1 | 40±6  | 39±2  | 3±3    | 4±1    | 4±1             |
|      | 1.1                                      | 61±9     | 8±1  | 39±8  | 43±7  | 4±1    | 4±3    | 4±2             |
|      | 2.3                                      | 66±7     | 9±2  | 52±5  | 50±4  | 3±3    | 4±1    | 3±2             |
|      | 4.5                                      | 56±3     | 9±1  | 57±16 | 52±5  | 4±1    | 6±0    | 4±2             |
|      | 9.0                                      | 54±4     | 8±1  | 50±5  | 53±7  | 3±1    | 5±0    | 3±3             |

续表2

| 组别                                           | 剂量/( $\mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$ ) | Ames 菌落数 |       |       |          |        |          |                 |
|----------------------------------------------|----------------------------------------|----------|-------|-------|----------|--------|----------|-----------------|
|                                              |                                        | TA97     | TA98  | TA100 | TA102    | TA1535 | TA1537   | WP2 <i>uvrA</i> |
| 羟基大黄素                                        | 0.6                                    | 48±10    | 8±8   | 32±4  | 50±7     | 3±2    | 5±2      | 6±1             |
|                                              | 1.1                                    | 45±6     | 8±3   | 32±4  | 61±3     | 4±2    | 6±1      | 5±2             |
|                                              | 2.3                                    | 43±7     | 7±3   | 28±2  | 45±7     | 4±1    | 2±1      | 8±4             |
|                                              | 4.5                                    | 40±2     | 8±5   | 25±3  | 56±3     | 4±2    | 6±3      | 6±3             |
|                                              | 9.0                                    | 38±2     | 5±2   | 28±5  | 65±9     | 2±2    | 4±1      | 5±3             |
| 芦荟大黄素                                        | 0.6                                    | 39±7     | 8±2   | 26±4  | 32±18    | 4±2    | 3±3      | 8±4             |
|                                              | 1.1                                    | 33±2     | 7±3   | 30±6  | 44±8     | 4±3    | 2±1      | 10±3            |
|                                              | 2.3                                    | 57±6     | 14±4  | 41±11 | 54±12    | 5±1    | 3±3      | 8±9             |
|                                              | 4.5                                    | 74±27    | 22±5  | 37±12 | 53±8     | 3±3    | 11±3     | 9±3             |
|                                              | 9.0                                    | 130±24   | 27±4  | 39±13 | 62±12    | 2±1    | 10±2     | 12±3            |
| 大黄素甲醚                                        | 0.6                                    | 46±10    | 9±4   | 46±6  | 40±2     | 4±3    | 4±1      | 3±1             |
|                                              | 1.1                                    | 59±16    | 9±1   | 45±3  | 41±9     | 3±2    | 2±2      | 4±3             |
|                                              | 2.3                                    | 58±10    | 9±2   | 42±12 | 46±7     | 4±2    | 2±1      | 4±1             |
|                                              | 4.5                                    | 48±6     | 9±4   | 49±5  | 39±5     | 2±2    | 4±1      | 1±1             |
|                                              | 9.0                                    | 61±9     | 10±3  | 52±9  | 39±13    | 2±1    | 5±1      | 3±1             |
| 大黄酚                                          | 0.6                                    | 43±10    | 6±2   | 27±3  | 52±9     | 5±0    | 6±4      | 6±3             |
|                                              | 1.1                                    | 46±9     | 6±1   | 28±1  | 55±12    | 4±2    | 6±3      | 9±2             |
|                                              | 2.3                                    | 37±3     | 6±3   | 32±10 | 58±7     | 5±2    | 3±2      | 6±4             |
|                                              | 4.5                                    | 45±8     | 7±4   | 31±4  | 52±6     | 3±2    | 9±2      | 7±2             |
|                                              | 9.0                                    | 43±6     | 4±3   | 28±6  | 47±20    | 11±3   | 4±2      | 8±4             |
| 大黄酸                                          | 0.6                                    | 35±4     | 4±2   | 34±5  | 48±10    | 8±3    | 6±1      | 10±3            |
|                                              | 1.1                                    | 45±4     | 6±2   | 28±6  | 50±11    | 4±3    | 5±2      | 2±2             |
|                                              | 2.3                                    | 43±3     | 5±2   | 28±2  | 52±5     | 6±4    | 6±4      | 8±1             |
|                                              | 4.5                                    | 38±23    | 5±1   | 32±10 | 49±3     | 4±1    | 5±1      | 3±2             |
|                                              | 9.0                                    | 45±7     | 5±2   | 30±4  | 54±6     | 11±5   | 5±5      | 13±1            |
| 大黄素-8- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -葡萄糖苷   | 0.6                                    | 56±11    | 7±1   | 51±1  | 45±8     | 4±3    | 5±4      | 2±1             |
|                                              | 1.1                                    | 56±3     | 11±6  | 50±5  | 38±11    | 2±3    | 3±2      | 2±1             |
|                                              | 2.3                                    | 55±7     | 9±5   | 46±3  | 46±6     | 3±2    | 4±3      | 5±3             |
|                                              | 4.5                                    | 57±8     | 8±6   | 50±9  | 41±1     | 5±1    | 4±3      | 4±1             |
|                                              | 9.0                                    | 56±12    | 6±2   | 44±6  | 43±1     | 4±1    | 4±2      | 4±2             |
| 芦荟大黄素-8- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -葡萄糖苷 | 0.6                                    | 49±4     | 7±3   | 33±3  | 40±8     | 4±4    | 4±3      | 3±3             |
|                                              | 1.1                                    | 39±6     | 7±5   | 30±8  | 46±4     | 3±4    | 4±3      | 4±4             |
|                                              | 2.3                                    | 39±1     | 10±3  | 25±6  | 48±3     | 2±2    | 4±3      | 10±6            |
|                                              | 4.5                                    | 40±4     | 9±2   | 32±8  | 51±8     | 5±3    | 4±2      | 5±4             |
|                                              | 9.0                                    | 47±2     | 9±2   | 32±9  | 53±13    | 5±2    | 5±2      | 6±4             |
| 大黄素-1- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -葡萄糖苷   | 0.6                                    | 51±8     | 8±1   | 41±5  | 35±4     | 3±1    | 4±2      | 3±1             |
|                                              | 1.1                                    | 47±4     | 5±2   | 42±7  | 40±1     | 4±2    | 2±1      | 3±2             |
|                                              | 2.3                                    | 44±1     | 10±3  | 45±5  | 40±4     | 4±3    | 1±1      | 2±1             |
|                                              | 4.5                                    | 46±8     | 11±1  | 47±8  | 46±1     | 4±3    | 3±1      | 3±2             |
|                                              | 9.0                                    | 54±9     | 14±5  | 49±4  | 50±2     | 4±2    | 4±2      | 4±3             |
| 大黄素甲醚-8- <i>O</i> - $\beta$ - <i>D</i> -葡萄糖苷 | 0.6                                    | 49±4     | 10±1  | 51±1  | 46±4     | 6±2    | 5±1      | 2±2             |
|                                              | 1.1                                    | 53±2     | 9±4   | 46±5  | 44±1     | 3±2    | 3±3      | 2±1             |
|                                              | 2.3                                    | 56±8     | 8±2   | 47±7  | 43±6     | 3±1    | 5±2      | 3±2             |
|                                              | 4.5                                    | 47±7     | 7±3   | 46±4  | 46±5     | 2±1    | 5±2      | 4±1             |
|                                              | 9.0                                    | 53±7     | 12±1  | 48±4  | 51±2     | 5±1    | 4±2      | 1±2             |
| 阳性对照*                                        | *                                      | 159±12   | 71±14 | 159±8 | 1 296±68 | 172±22 | 1 187±48 | 95±17           |

\*TA97、TA100、TA102和WP2 *uvrA*的阳性对照为AF-2(0.01  $\mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$ );TA98的阳性对照为AF-2(0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{孔}^{-1}$ );TA1535的阳性对照为NaN<sub>3</sub>(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, TA102 and WP2 *uvrA* were AF-2 (0.01  $\mu\text{g}\cdot\text{hole}^{-1}$ ); positive control of TA98 was AF-2 (0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{hole}^{-1}$ ); positive control of TA1535 was NaN<sub>3</sub> (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3 S9代谢活化状态下Ames菌落数( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Table 3 Number of Ames colony count under S9 metabolic activation condition ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别                         | 剂量/( $\mu\text{g} \cdot \text{孔}^{-1}$ ) | Ames 菌落数 |         |        |       |        |        |                 |
|----------------------------|------------------------------------------|----------|---------|--------|-------|--------|--------|-----------------|
|                            |                                          | TA97     | TA98    | TA100  | TA102 | TA1535 | TA1537 | WP2 <i>uvrA</i> |
| 溶解对照                       | —                                        | 46±8     | 4±2     | 54±4   | 37±10 | 5±3    | 1±1    | 6±1             |
| 大黄素                        | 0.6                                      | 47±7     | 9±5     | 55±4   | 40±9  | 5±3    | 6±3    | 5±2             |
|                            | 1.1                                      | 52±9     | 6±1     | 54±1   | 36±5  | 6±2    | 8±6    | 4±2             |
|                            | 2.3                                      | 55±4     | 4±2     | 65±6   | 34±4  | 6±4    | 10±2   | 5±1             |
|                            | 4.5                                      | 54±9     | 8±6     | 56±7   | 39±3  | 4±2    | 8±1    | 6±1             |
|                            | 9.0                                      | 54±2     | 8±3     | 53±6   | 39±3  | 6±1    | 20±10  | 3±2             |
| 羟基大黄素                      | 0.6                                      | 93±23    | 29±14   | 58±8   | 37±2  | 2±1    | 2±3    | 12±9            |
|                            | 1.1                                      | 74±29    | 26±10   | 83±12  | 43±7  | 2±1    | 4±1    | 13±7            |
|                            | 2.3                                      | 123±2    | 32±11   | 83±18  | 48±8  | 8±5    | 3±2    | 15±8            |
|                            | 4.5                                      | 203±34   | 69±6    | 92±13  | 58±10 | 13±3   | 5±3    | 13±12           |
|                            | 9.0                                      | 252±56   | 73±14   | 102±18 | 67±6  | 6±1    | 11±7   | 14±9            |
| 芦荟大黄素                      | 0.6                                      | 64±5     | 5±2     | 41±6   | 42±5  | 5±1    | 5±4    | 12±2            |
|                            | 1.1                                      | 63±7     | 9±2     | 51±7   | 39±10 | 4±2    | 9±3    | 13±2            |
|                            | 2.3                                      | 66±9     | 10±6    | 48±7   | 55±6  | 5±4    | 4±2    | 12±3            |
|                            | 4.5                                      | 82±16    | 6±1     | 54±11  | 61±3  | 5±1    | 5±1    | 7±3             |
|                            | 9.0                                      | 88±4     | 10±2    | 65±6   | 52±13 | 4±4    | 2±2    | 5±1             |
| 大黄素甲醚                      | 0.6                                      | 47±5     | 5±1     | 48±8   | 38±2  | 7±2    | 2±2    | 5±2             |
|                            | 1.1                                      | 39±3     | 7±4     | 52±8   | 36±9  | 8±1    | 7±2    | 4±1             |
|                            | 2.3                                      | 39±6     | 7±1     | 49±5   | 43±6  | 3±1    | 6±2    | 3±1             |
|                            | 4.5                                      | 52±1     | 6±3     | 56±4   | 56±5  | 9±2    | 13±7   | 6±4             |
|                            | 9.0                                      | 58±9     | 10±8    | 52±4   | 56±2  | 8±5    | 7±5    | 6±1             |
| 大黄酚                        | 0.6                                      | 64±5     | 11±3    | 54±3   | 26±7  | 6±1    | 7±4    | 6±3             |
|                            | 1.1                                      | 65±9     | 6±2     | 53±6   | 41±8  | 6±1    | 6±3    | 11±3            |
|                            | 2.3                                      | 58±5     | 5±2     | 53±5   | 35±3  | 4±1    | 4±3    | 10±3            |
|                            | 4.5                                      | 67±7     | 7±3     | 51±13  | 41±7  | 3±2    | 5±1    | 10±2            |
|                            | 9.0                                      | 72±12    | 9±5     | 58±6   | 36±3  | 3±2    | 8±2    | 14±7            |
| 大黄酸                        | 0.6                                      | 65±13    | 13±6    | 49±6   | 41±4  | 5±4    | 3±3    | 7±2             |
|                            | 1.1                                      | 29±9     | 13±5    | 50±6   | 32±8  | 2±1    | 2±1    | 3±3             |
|                            | 2.3                                      | 58±8     | 8±1     | 41±8   | 42±3  | 5±2    | 6±3    | 7±3             |
|                            | 4.5                                      | 53±8     | 9±3     | 61±6   | 37±7  | 5±1    | 7±2    | 6±4             |
|                            | 9.0                                      | 61±9     | 11±1    | 49±4   | 44±6  | 2±2    | 2±2    | 8±3             |
| 大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷   | 0.6                                      | 52±10    | 3±2     | 59±8   | 43±3  | 5±3    | 1±0    | 5±2             |
|                            | 1.1                                      | 47±12    | 8±4     | 49±7   | 33±2  | 8±4    | 2±1    | 6±4             |
|                            | 2.3                                      | 42±2     | 4±2     | 45±12  | 32±8  | 5±5    | 2±2    | 2±1             |
|                            | 4.5                                      | 45±10    | 4±3     | 42±6   | 35±13 | 4±1    | 6±2    | 5±2             |
|                            | 9.0                                      | 44±6     | 5±2     | 53±4   | 36±3  | 3±2    | 4±2    | 6±2             |
| 芦荟大黄素-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷 | 0.6                                      | 70±9     | 11±2    | 52±2   | 28±5  | 8±5    | 1±1    | 12±2            |
|                            | 1.1                                      | 49±41    | 6±4     | 62±14  | 32±5  | 10±7   | 3±3    | 6±2             |
|                            | 2.3                                      | 58±7     | 7±5     | 70±3   | 31±7  | 6±2    | 3±2    | 5±2             |
|                            | 4.5                                      | 62±8     | 45±7    | 72±3   | 28±8  | 5±4    | 1±1    | 10±5            |
|                            | 9.0                                      | 37±38    | 37±11   | 72±3   | 33±8  | 4±1    | 3±3    | 9±7             |
| 大黄素-1-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷   | 0.6                                      | 42±3     | 9±4     | 52±11  | 34±4  | 4±2    | 3±3    | 3±2             |
|                            | 1.1                                      | 49±8     | 6±1     | 48±2   | 31±2  | 4±1    | 1±0    | 3±2             |
|                            | 2.3                                      | 49±9     | 5±2     | 46±7   | 31±7  | 5±2    | 0±1    | 5±5             |
|                            | 4.5                                      | 49±10    | 5±2     | 46±4   | 36±5  | 4±3    | 2±1    | 4±1             |
|                            | 9.0                                      | 49±11    | 5±2     | 48±11  | 29±6  | 5±2    | 1±1    | 3±1             |
| 大黄素甲醚-8-O- $\beta$ -D-葡萄糖苷 | 0.6                                      | 39±9     | 7±3     | 60±11  | 34±6  | 6±1    | 3±4    | 5±3             |
|                            | 1.1                                      | 41±5     | 3±2     | 49±9   | 30±11 | 7±3    | 1±1    | 3±2             |
|                            | 2.3                                      | 35±2     | 5±2     | 46±9   | 24±4  | 7±0    | 1±1    | 3±3             |
|                            | 4.5                                      | 40±2     | 3±2     | 53±5   | 26±6  | 5±3    | 1±1    | 5±4             |
|                            | 9.0                                      | 41±2     | 4±1     | 51±7   | 43±7  | 4±1    | 3±2    | 3±2             |
| 阳性对照*                      | *                                        | 468±40   | 533±110 | 137±10 | 265±4 | 74±9   | 161±61 | 42±10           |

\* TA97、TA98、TA100 阳性对照为 2-AA ( $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{孔}^{-1}$ )；TA102 阳性对照为 2-AA ( $1.2 \mu\text{g} \cdot \text{孔}^{-1}$ )；TA1535 和 TA1537 阳性对照为 2-AA ( $0.6 \mu\text{g} \cdot \text{孔}^{-1}$ )；WP2 *uvrA* 阳性对照为 2-AA ( $6 \mu\text{g} \cdot \text{孔}^{-1}$ )

\*Positive controls of TA97, TA98, TA100 were 2-AA ( $0.2 \mu\text{g} \cdot \text{hole}^{-1}$ ); positive control of TA102 was 2-AA ( $1.2 \mu\text{g} \cdot \text{hole}^{-1}$ ); positive control of TA1535 and TA1537 was 2-AA ( $0.6 \mu\text{g} \cdot \text{hole}^{-1}$ ); positive control of WP2 *uvrA* was 2-AA ( $6 \mu\text{g} \cdot \text{hole}^{-1}$ )

风险,警示结构的概念也已广泛应用于毒性预测数据库的构建<sup>[10]</sup>。基于蒽醌母核结构,Toxtree、Derek Nexus 和 Sarah Nexus 提示所有大黄素型蒽醌均存在致突变风险。

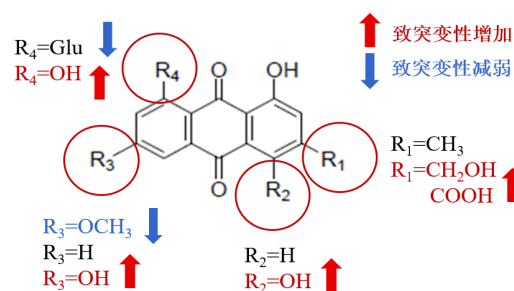
本研究Ames试验结果提示,羟基大黄素、大黄酚、大黄酸以及芦荟大黄素在非S9代谢活化状态下可导致WP2 *uvrA* Ames菌落数明显增加。Brown等<sup>[11]</sup>研究显示未取代蒽醌和蒽酮无诱变作用,提示羟基基团的引入,其诱变能力升高。本研究结果与相关文献报道显示沙门氏菌测定中羟基和甲基取代的蒽醌致突变性研究结果相吻合。先前研究报告中也指出大黄酚、大黄素等在S9代谢活化状态下对TA1537菌株具有明确诱变作用<sup>[12-13]</sup>。无论是否存在S9代谢活化条件下,羟基茜草素、芦荟大黄素和1-氨基-4-羟基蒽醌等致TA1537菌株突变均为阳性结果,2-羟基蒽醌在TA98/TA1537菌株中检测呈阳性结果<sup>[14-15]</sup>。羟基蒽醌类化合物可能的作用机制是受试物参与细菌DNA复制过程中的非共价插入,然后引发移码突变反应<sup>[16]</sup>。此外,本研究的S9代谢条件下化合物可产生I相代谢反应。本课题组前期研究<sup>[17]</sup>揭示在I相代谢作用下各类不同蒽醌类化合物之间存在相互转化,这也佐证了代谢后多数受试物诱变能力增加。上述结果提示羟基基团取代是重要的突变条件,含有1、2或3个羟基的化合物都具有诱变作用。然而,大黄素甲醚与大黄素相比以甲醚基团的引入代替羟基基团,却削弱了自身的诱变能力。大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、芦荟大黄素-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素-1-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷、大黄素甲醚-8-*O*- $\beta$ -D-葡萄糖苷与大黄素、芦荟大黄素、大黄素甲醚相比以葡萄糖苷取代羟基基团,较大基团的引入,空间位阻显著增大,受试物掺入DNA复制过程中的几率显著性降低,其诱变能力也随之发生改变。

结合本研究结果分析,大黄素型蒽醌类化合物在大黄素母核的基础上引入羟基后其诱变能力显著升高,较大葡萄糖苷基团的引入反而使受试物诱变能力降低(图1)。而对于羟基在不同位点的修饰,化合物致突变作用强弱也存在一定的差异。本研究为大黄素型蒽醌成分的致突变性风险评估和药用开发提供数据支持。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

[1] Monisha B A, Kumar N, Tiku A B. Emodin and its role in



以大黄素为基础,当R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>和R<sub>4</sub>位点取代基为-OH或-CH<sub>2</sub>OH时其致突变性风险增加,当相应位置的取代基为-CH<sub>3</sub>、-OCH<sub>3</sub>或较大集团时,其致突变性风险减弱

Based on emodin, risk of mutagenicity was increased when substituents at R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> and R<sub>4</sub> sites were -OH or -CH<sub>2</sub>OH, and decreased when substituents at corresponding sites were -CH<sub>3</sub>, -OCH<sub>3</sub> or larger groups

图1 大黄素型蒽醌结构与致突变性关系推测

Fig. 1 Speculation on relationship between structure and mutagenicity of emodin-type anthraquinone

chronic diseases [J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 928: 47-73.

[2] Program N T. NTP toxicology and carcinogenesis studies of EMODIN (CAS NO. 518-82-1) feed studies in F344/N rats and B<sub>6</sub>C<sub>3</sub>F<sub>1</sub> mice [J]. Natl Toxicol Program Tech Rep Ser, 2001, 493: 1-278.

[3] 笪红远, 曾文, 江振洲, 等. 大黄酸对小鼠淋巴瘤L5178Y细胞TK基因的致突变作用[J]. 中草药, 2008, 39(12): 1858-1860.

Da H Y, Zeng W, Jiang Z Z, et al. Mutagenic effect of rhubarb acid on TK gene in mouse lymphoma L5178Y cells [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 2008, 39(12): 1858-1860.

[4] 朱钦燾, 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.

[5] 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.

[6] 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.

[7] 袁海龙, 柳正良, 张纯, 等. 超临界流体萃取-HPLC法测定何首乌中大黄酸、大黄素及大黄素甲醚的含量[J]. 中草药, 1999, 30(4): 258.

Yuan H L, Liu Z L, Zhang C, et al. Determination of Rhein, emodin and physcion in tuber fleeceflower (*Polygonum multiflorum*) by supercritical fluid extraction-

- HPLC [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 1999, 30(4): 258.
- [8] 文海若, 宋捷, 鄂蕊, 等. 微孔板与标准平皿 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 Rui, et al. Comparative study on microplate and standard plate Ames tests [J]. Drug Eval Res, 2019, 42(5): 884-889.
- [9] 高雅, 姚碧云, 周宗灿. 应用 Toxtree 平台预测中草药重要成分的致癌性和遗传毒性 [J]. 毒理学杂志, 2016, 30(5): 329-333.
- Gao Y, Yao B Y, Zhou Z C. Prediction of carcinogenicity and genotoxicity of important components in Chinese herbal medicine by Toxtree [J]. J Toxicol, 2016, 30(5): 329-333.
- [10] 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.
- [11] Brown J P. A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds [J]. Mutat Res, 1980, 75(3): 243-277.
- [12] Brown J P, Brown R J. Mutagenesis by 9, 10-anthraquinone derivatives and related compounds in *Salmonella typhimurium* [J]. Mutat Res, 1976, 40(3): 203-224.
- [13] Tikkanen L, Matsushima T, Natori S. Mutagenicity of anthraquinones in the *Salmonella* preincubation test [J]. Mutat Res, 1983, 116(3/4): 297-304.
- [14] Westendorf J, Marquardt H, Poginsky B, et al. Genotoxicity of naturally occurring hydroxyanthraquinones [J]. Mutat Res, 1990, 240(1): 1-12.
- [15] Krivobok S, Seigle-Murandi F, Steiman R, et al. Mutagenicity of substituted anthraquinones in the Ames/*Salmonella* microsome system [J]. Mutat Res, 1992, 279(1): 1-8.
- [16] Müller 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(1/2/3): 125-129.
- [17] 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.

[责任编辑 兰新新]