

光泽汀体内遗传毒性风险评价

闫明, 王雪, 秦超, 汪祺*, 文海若*

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

摘要: 目的 评价光泽汀小鼠体内的遗传毒性。方法 C57BL/6J小鼠分为溶剂对照(0.5% CMC-Na)组、茜草素(200 mg·kg⁻¹, 结构对照)组、乙酰基亚硝基脒(ENU, 40 mg·kg⁻¹, 阳性对照)组、甲基磺酸乙酯(EMS, 200 mg·kg⁻¹, 阳性对照)组和光泽汀低、中、高剂量(100、200、300 mg·kg⁻¹)组, 溶剂、光泽汀和茜草素连续7 d ig给予, 给药第1天记为D1, 阳性对照ENU和EMS分别连续3 d给予, 均每天给药1次。于D7、D56采集约0.5 mL外周血用于血清生化检测; 于D14、D28、D42、D56采集外周血开展*Pig-a*基因突变试验; 末次给药后采集肝、肾细胞开展彗星试验, 分析每只动物至少100个细胞的尾DNA百分含量; 末次给药后制备骨髓细胞样本, 计算嗜多染红细胞的微核发生率。解剖后取心、肝、脾、肺以及肾脏进行组织病理学检查。**结果** 试验期间所有动物一般症状未见明显异常, 各组动物体质量未见明显差异, 未见与给予受试物有关的组织病理学改变。光泽汀低、中、高剂量组及EMS组肾脏尾DNA百分率均显著高于溶剂对照组($P < 0.05$ 、 0.001), 光泽汀高剂量组及EMS组肝脏尾DNA百分率与溶剂对照组比较显著增加($P < 0.05$ 、 0.001)。光泽汀与茜草素的小鼠骨髓微核试验、*Pig-a*基因突变试验均为阴性。**结论** 100~300 mg·kg⁻¹光泽汀未见对小鼠整体产生明显毒性。光泽汀可导致小鼠肝、肾细胞DNA损伤, 肾细胞DNA损伤程度更为严重。

关键词: 光泽汀; 茜草素; 体内遗传毒性; *Pig-a*基因突变试验; 彗星试验; 微核试验

中图分类号: R994 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2022)07-1248-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2022.07.005

Risk assessment of *in vivo* genotoxicity of lucidin

YAN Ming, WANG Xue, QIN Chao, WANG Qi, WEN Hairuo

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

Abstract: Objective To evaluate the *in vivo* genotoxicity risk of lucidin in mice. **Methods** C57BL/6J mice were divided into solvent control (0.5% CMC-NA) group, alizarin (200 mg·kg⁻¹, structural control) group, acetyl nitrourea (ENU, 40 mg·kg⁻¹, positive control) group, ethyl methyl sulfonate (EMS, 200 mg·kg⁻¹, positive control) group, and lubutin low-dose, medium-dose and high-dose (100, 200, 300 mg·kg⁻¹) groups, the solvent, lubutin and alizarin were given intragaigally for consecutive 7 d, denoted D1 on the first day of administration, and positive control ENU and EMS were given for consecutive 3 d, once a day, respectively. About 0.5 mL of peripheral blood was collected on D7 and D56 for serum biochemical detection; peripheral blood was collected on D14, D28, D42 and D56 after administration for *Pig-a* gene mutation test; liver and kidney cells were collected after the last administration, and comet assay was performed to analyze the percentage of tail DNA in at least 100 cells of each animal. Bone marrow cell samples were prepared after the last administration, and the incidence of micronuclei of polychromatic erythrocytes was calculated. After dissection, the heart, liver, spleen, lung and kidney were taken for histopathological examination. **Results** During the study period, all animals had no obvious abnormal clinical symptoms, there was no significant difference in the body weight of animals in each group during the test period, and no histopathological changes related to the administration of the test substance were found. The percentages of DNA tails in kidneys in the low, medium, and high-dose groups and EMS groups were significantly higher than those in the vehicle control group, and the changes were statistically different ($P < 0.05$, 0.001). Compared with the vehicle control group, the percentage content increased, and the change was statistically significant ($P < 0.05$, 0.001). Compared with the vehicle control group, there was no significant difference in the percentage of DNA tails in liver and kidney in the alizarin

收稿日期: 2022-03-22

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: 闫明, 男, 硕士, 研究方向为遗传毒理。E-mail: yanming0120@sina.com

*共同通信作者: 文海若, 研究员, 研究方向为遗传毒理。Tel: (010) 67876252 E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

汪祺, 研究员, 研究方向为中药毒理。Tel: (010) 67395282 E-mail: sansan8251@sina.com

group. The mouse bone marrow micronucleus test of lucidin and alizarin were both negative. There was no significant difference in RBC^{CD24+} and RET^{CD24+} and vehicle control groups in each dose group of lucidin and alizarin group. **Conclusion** There is no obvious overall toxicity of lucidin in mice 100—300 mg·kg⁻¹. Lucidin causes DNA damage in mouse liver and kidney cells, and the degree of DNA damage in kidney cells is more serious.

Key words: lucidin; alizarin; genotoxicity *in vivo*; *Pig-a* gene mutation test; comet assay; micronucleus test

光泽汀为茜草科植物的主要蒽醌类成分之一,茜草具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等多种药理学作用^[1-4]。除光泽汀外,茜草的主要蒽醌类成分包括茜草素、羟基茜草素以及相应的苷类等。世界卫生组织国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)将蒽醌列为2B类致癌物,但当前缺乏在人体内的致癌性数据。由于蒽醌母核化合物众多且缺少实验数据支持,毒理学预测软件根据结构效应关系以及数据库分析,因蒽醌化合物存在羟基蒽醌结构以及蒽-9,10-二醇前体结构推断同类所有化合物均具有致突变性风险^[5]。蒽醌包括大黄素型蒽醌和茜素型蒽醌,诸多研究表明大黄素能够与DNA结合,并导致碱基突变与DNA断裂,在细菌回复突变(Ames)试验、彗星试验中呈阳性结果^[6],其作用机制与蒽醌环的平面稠环结构可嵌入碱基序列及抑制腺嘌呤核苷三磷酸(ATP)与拓扑异构酶II结合有关^[7]。茜素型蒽醌与大黄素型蒽醌在结构上有所不同,其取代基均分布在同一侧苯环上。

当前茜素类蒽醌遗传毒性研究不够充分,其风险仍然存在争议。在鼠伤寒沙门氏菌TA98、TA100和TA1537菌株中,茜草在细菌DNA修复试验中呈阴性,而在Ames试验中呈阳性^[8]。本课题组前期研究结果则提示茜草素不导致Ames菌落数增加^[5]。1项F344雌性大鼠2年致癌性实验中发现甲基异茜草素可导致肾脏发生癌前病变,并同时作用于肝脏和结肠^[9]。光泽汀的遗传毒性作用较为明确,研究显示其在Ames试验中可诱导TA97、TA100和TA1537 Ames菌落数增加^[5],在哺乳动物细胞V79突变试验中呈阳性结果^[10]。小鼠ig给予2 mg·d⁻¹光泽汀,其肝脏、肾脏以及结肠可产生组织特异性DNA加合物^[10]。但也有研究报道光泽汀的骨髓微核试验结果为阴性^[12]。

与茜草素相比,光泽汀在结构上其蒽醌母核苯环上含有羟基取代基和羟甲基取代基。充分认识蒽醌类化合物的毒性与结构之间的关联,有助于筛选适宜的药效化合物及药物的增效减毒,对药物开发及应用有重要价值。当前对茜素型蒽醌化合物

的遗传毒性评价缺乏研究和数据支持。本研究以光泽汀为例,连续7 d ig给予小鼠光泽汀开展多终点遗传毒性评价,并设茜草素结构对照组,研究光泽汀在小鼠体内的遗传毒性作用特点。

1 材料

1.1 实验动物

60只雄性C57BL/6J小鼠,5~6周龄,体质量15~20 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SYXK(京)2016-0006,饲养于国家药物安全评价监测中心屏障系统内。研究方案通过国家药物安全评价监测中心实验动物福利伦理委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)审查(伦理审查编号IACUC-2020-087)。动物经过7 d检疫驯化期,按体质量随机化分组。分组后每笼5只饲养,自由摄食、饮水。动物饲养于SPF屏障系统,保持12 h交替昼夜节律,保持室内温度18~22 °C,相对湿度40%~60%。换气次数每小时10~20次。底铺高压蒸汽灭菌的玉米芯垫料,每周2次更换、清洗及消毒笼具。

1.2 主要仪器

FACSCalibur流式细胞仪(美国BD bioscience公司);Centrifuge 5810R高速冷冻离心机(德国Eppendorf公司);QuadroMACS™ Separator免疫磁性分离架(德国Miltenyi公司);Eclipse 80i荧光显微镜(日本Nikon公司);BX63正置自动显微镜(日本Olympus公司),Comet Assay IV图像分析系统(英国Perceptive公司)。

1.3 主要试剂

光泽汀(上海源叶生物科技有限公司,批号S1ZD11D134341,质量分数>95%);茜草素(上海源叶生物科技有限公司,批号T23J10T80571,质量分数>95%);LS分离柱(德国Miltenyi Biotec公司,批号5180614049);Anti-PE磁性微球(德国, Miltenyi Biotec,批号5181016169);PE-anti CD61抗体(美国BD Pharmingen™,批号8310876);PE-anti CD24抗体(美国BD Pharmingen™,批号2201617);Lympholyte®-Mammal淋巴细胞分离液(美国/加拿

大CEDARLANE公司,批号55-182);CountBright绝对计数微球(美国Thermo Fisher公司,批号1971889);乙酰基亚硝基脲(ENU,美国Sigma-Aldrich公司,批号MKCD2123);甲基磺酸乙酯(EMS,美国Sigma-Aldrich公司,批号126K0758);羧甲基纤维素钠(carboxymethyl cellulose sodium, CMC-Na,美国Sigma-Aldrich公司);ddH₂O为MilliQ-A10超纯水机自制;Trevigen Comet Assay[®] Kit(美国Trevigen公司);SYBR Green I核酸凝胶染料(美国Life Technologies公司);Giemsa染料(美国Sigma-Aldrich公司),使用0.067 mol·L⁻¹磷酸缓冲液配制为浓度5%的工作液;吖啶橙(德国Fluka),0.1%吖啶橙与0.067 mol·L⁻¹磷酸缓冲液按1:15的比例配制为工作液。

2 方法

2.1 动物分组及给药

60只小鼠分设溶剂对照(0.5% CMC-Na)组、茜草素(200 mg·kg⁻¹,结构对照)组、ENU(40 mg·kg⁻¹,阳性对照)组、EMS(200 mg·kg⁻¹,阳性对照)组和光泽汀低、中、高剂量(100、200、300 mg·kg⁻¹)组,给药剂量参考文献报道^[10]及前期预试验中小鼠最高耐受剂量设置。检疫期最后1 d称质量后按照分层随机化法进行分组,溶剂对照组、光泽汀各剂量组和茜草素组每组10只;阳性对照组每组5只。溶媒(0.5% CMC-Na)、光泽汀和茜草素连续7 d ig给予,每天1次,给药第1天记为D1,阳性对照ENU和EMS分别连续3 d给予,给药剂量参考文献设置^[11,13-14]。

2.2 大体观察、称质量和取材

给药期间每天对动物一般症状进行观察;每周测定1次体质量及1次摄食量;溶剂对照组、光泽汀各剂量组、茜草素组和EMS组各取5只动物于末次给药结束(D7)后约3 h解剖,取肝、肾和外周血开展彗星试验,取骨髓开展骨髓微核试验。其余动物在D56 *Pig-a* 试验采血后实施安乐死。

2.3 血样采集

分别于D7、D56采集约0.5 mL外周血(不抗凝)用于血清生化检测,使用Hitachi 7180型全自动生化仪及相应试剂测定血液样本,检测指标包括丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)、尿素(UREA)、肌酐(CRE)。于D14、D28、D42、D56采集约0.1 mL外周血(肝素钠抗凝)用于*Pig-a*基因突变试验。非解剖日动物使用异氟烷麻醉后,使用毛细管经眼眶

后静脉丛采血,采血后轻压采血部位止血。解剖日动物使用异氟烷麻醉后,用注射器经腹主动脉采血。血样于室温放置45 min~2 h后,8 000 rmin⁻¹室温离心10 min分离血清。

2.4 脏器称质量、固定和组织病理学检查

解剖后取心脏、肝脏、脾脏、肺脏以及肾脏用10%中性缓冲福尔马林溶液进行固定,固定后的组织经修块取材、酒精脱水、石蜡包埋后切为厚度约3 μm的切片。标本经苏木精-伊红(HE)染色后,在光镜下进行组织病理学检查。

2.5 彗星试验

末次给药后3 h,采集约1 cm³肝和肾组织置于3 mL组织切碎液中反复剪碎,之后经40 μm滤网过滤。预先将Comet LMAgraose煮沸使其呈液态,于37 °C水浴锅降温备用。取外周血10 μL或稀释后的肝、肾细胞悬液50 μL与500 μL Comet LMAgraose混匀。取混合液100 μL平行铺设2孔,转移至2~8 °C避光冷却20~30 min。冷却后转移至预冷的裂解液中,2~8 °C避光裂解,裂解时间>14 h。裂解结束后换超纯水清洗玻片至少3次,每次5 min,去除裂解液。将玻片置于碱性裂解液中,室温下25 min。转移至电泳槽中,调节电压0.7 V·cm⁻¹、电流不超过300 mA条件下电泳20 min。取出玻片放于中和液中中和2次,每次5 min,转移至无水乙醇中脱水20 min,室温下进行干燥。将玻片置于配置好的SYBR核酸染料工作液15 min后,进行荧光显微镜拍照。使用彗星图像分析软件COMET Assay IV分析每只动物至少100个细胞的尾DNA百分率的中位数。

2.6 骨髓微核试验

摘取小鼠双侧股骨,剪断两端开放骨髓腔;吸取2 mL胎牛血清,用注射器针头从股骨中冲洗骨髓至试管中,吹打支撑骨髓细胞悬液。将骨髓悬液1 000 r·min⁻¹离心5 min,弃去大部分上清液,留适量上清将骨髓细胞沉淀充分吹打均匀;吸取适量骨髓悬液滴于洁净玻片上,手推制片,根据骨髓细胞悬液的密度,每只动物制片3张;甲醇固定15 min后晾干。玻片于5% Giemsa染液中室温染色30 min。显微镜下观察计数200个总红细胞(ERY)中的嗜多染红细胞(PCE)和正染红细胞(NCE)的数目。经吖啶橙染色后,计数玻片标本中2 000个PCE中含微核细胞(MNPCE)的数目。

2.7 外周血 *Pig-a* 基因突变试验

将样本转移至3 mL Lympholyte[®]-Mammal, 800×g室温离心20 min;弃上清,加入2 mL磷酸缓

冲液(PBS)重悬, $235\times g$ 室温离心 10 min; 弃上清, 加入 150 μL PBS 重悬, 转移至 1.5 mL EP 管, 加入 100 μL CD61/CD24 抗体混合工作液, 置于 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。取对照组未染抗体细胞 20 μL 加入 200 μL PBS 作为 ICS A, 用于流式模板调节。将细胞全部转移至含 5 mL PBS 的 15 mL 离心管中, 以 $340\times g$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min。吸弃上清, 加入 100 μL Anti-PE 偶联磁珠并吹匀, $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min。结束后加入 5 mL PBS 以 $340\times g$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件离心 5 min。弃上清, 加入 1 mL PBS 重悬, 吸取 10 μL 转移至含 990 μL 核酸染料工作液的流式管中混匀, 此为柱前样品。将 ICS A 重悬, 吸取 5 μL 加入 500 μL 核酸染料工作液混匀作为 ICS B, 室温避光孵育 10 min 后转移至 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。样本于 3 h 内流式上机检测。搭建磁性分选架, 将 990 μL 细胞转移至分选柱, 加入 5 mL 混合缓冲液并收集流出组分, 以 $800\times g$ 、 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 5 min。弃上清, 剩余样本转移至 300 μL 核酸染料混合工作液, 室温避光孵育 10 min 后转移至 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存, 3 h 内流式上机检测。通过流式细胞术来计算网织红细胞 (RET) 和总红细胞 (RBC) 的每 1×10^6 个细胞中突变数。

2.8 统计学方法

动物体重、血清生化检测指标、彗星试验数据、微核试验数据、突变细胞数等以 $\bar{x}\pm s$ 列出。体重、彗星试验结果、*Pig-a* 基因突变试验结果采用单因素方差分析对组间数据进行检验; 微核试验结果采用泊松分布法检验。数据图与统计结果经 GraphPad Prism 7 软件处理生成。

3 结果

3.1 一般毒性

试验期间所有动物未见明显异常症状, 各组动物体重未见明显差异。连续 7 d 给药后, 动物血清生化检测结果如图 1 所示, 各给药组的 ALT、AST、ALP、TBIL 和 UREA 与溶剂对照组相比均未见差异。光泽汀高剂量组的 CRE 与溶剂对照组比较显著升高 ($P<0.05$), 且变化呈剂量相关性。D56 动物血清生化检测结果显示, 各组所有检测指标与溶剂对照组相比均无显著差异。D7 和 D56 采集主要脏器进行组织病理学检查, 可见小鼠肝脏存在小肉芽肿伴单个细胞坏死 (图 2), 此为常见背景病变, 与给予受试物无关。其他组织脏器未见组织病理学改变。

3.2 肝、肾彗星试验

结果如图 3 所示, 光泽汀低、中、高剂量组及

EMS 组肾脏尾 DNA 百分率均显著高于溶剂对照组 ($P<0.05$ 、 0.001); 光泽汀高剂量组及 EMS 组肝脏尾 DNA 百分率显著高于溶剂对照组 ($P<0.05$ 、 0.001)。茜草素组肝、肾尾 DNA 百分率与溶剂对照组相比均无明显差异。

3.3 骨髓微核试验

小鼠骨髓微核试验结果如图 4 所示, 各给药组 PCE/ERY 与溶剂对照组相比无明显降低, 表明该给药剂量下对骨髓细胞无明显毒性作用; EMS 组的微核率与溶剂对照组相比显著升高 ($P<0.001$), 光泽汀各组、茜草素组与溶剂对照组相比均无明显变化, 提示光泽汀和茜草素均对小鼠骨髓细胞染色体无明显损伤。

3.4 *Pig-a* 基因突变试验

结果如图 5 所示, 在试验期间所有检测点, ENU 组每 1×10^6 个 RET 和 RBC 中细胞突变数与溶剂对照组比较均显著升高 ($P<0.001$), 提示试验体系成立。所有时间点光泽汀各剂量组与茜草素组的突变数与溶剂对照组相比均无明显差异, 提示光泽汀和茜草素对小鼠外周血 *Pig-a* 基因突变率无明显影响。

4 讨论

茜草成分复杂, 其主要单体成分遗传毒性研究数据较少。有研究提示茜草在细菌 DNA 修复试验中呈阴性, 而在 Ames 试验中呈阳性^[8], 为期 1 年的慢性毒性研究则发现茜草针对肾脏、肝脏和血细胞存在慢性毒性^[9], 并提示其具有潜在致癌性风险。另 1 项大鼠致癌性试验则提示茜草具有促进肿瘤发展的作用^[15]。既往研究发现, 茜草的蒽醌类成分如光泽汀-3-*O*-素草苷及其去糖基代谢产物光泽汀的遗传毒性试验结果为阳性^[11], 有研究提示, 光泽汀在哺乳动物体内可在磺基转移酶 1A 等酶的作用下 R_2 位点羟甲基转换成苄基碳正离子, 具有强亲电性, 进而与 DNA 相互作用形成加合物。但其小鼠骨髓微核试验结果为阴性^[12]。光泽汀在有或无 S9 代谢条件均可导致 TA98 和 TA100 沙门氏菌的回复突变率大幅增加, 而光泽汀-3-*O*-素草苷经代谢活化后其回复突变率反而有所降低^[16]。

本研究对光泽汀进行体内多终点遗传毒性评价, 当前剂量下未见对动物整体产生明显毒性, 连续给药末期可能对动物产生一过性毒性, 停药后可恢复。光泽汀可导致小鼠肝、肾细胞 DNA 损伤, 肾细胞 DNA 损伤程度更为严重。文献报道^[10]光泽汀在小鼠肾脏中形成的 DNA 特异性加合物含量明显

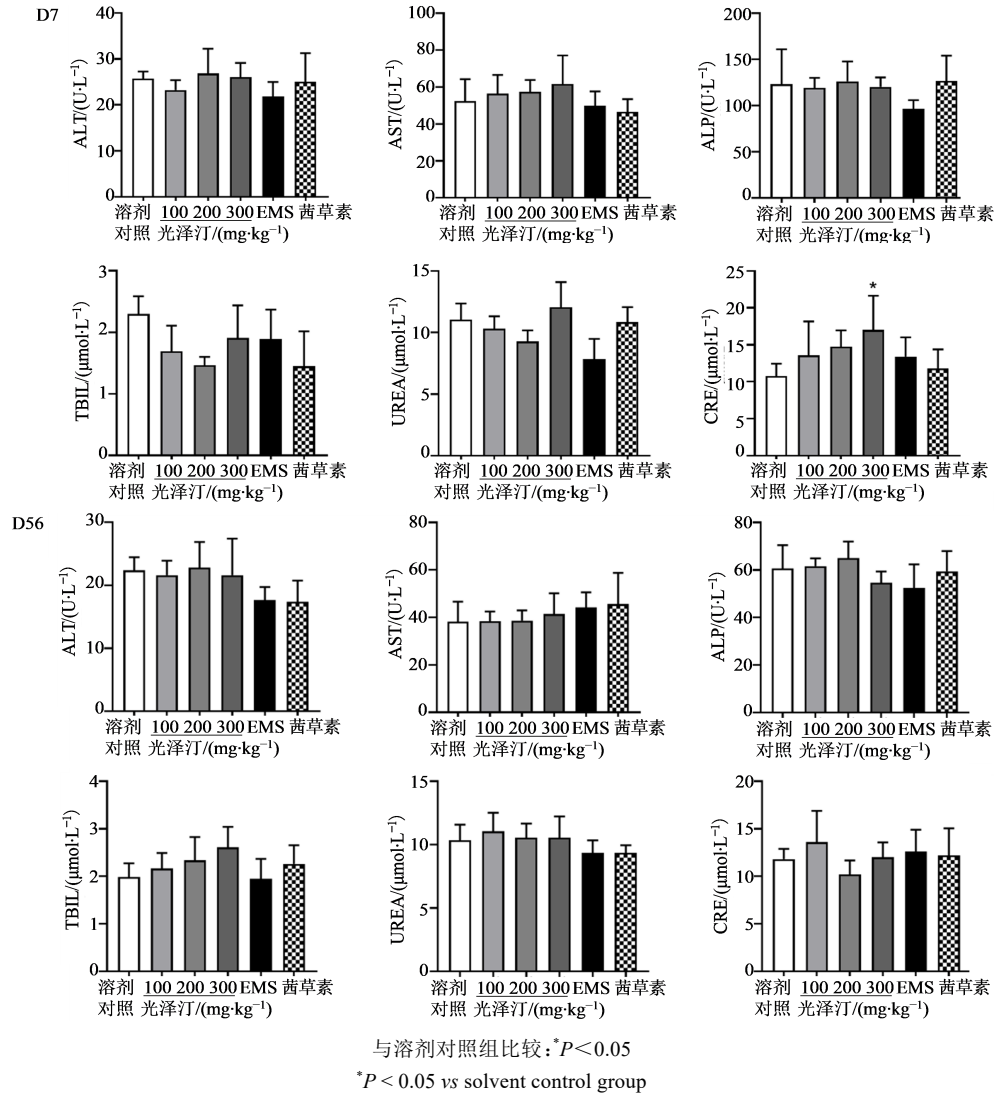
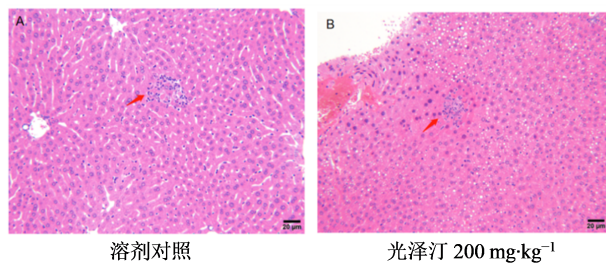


图1 不同时间点小鼠血清生化指标变化 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

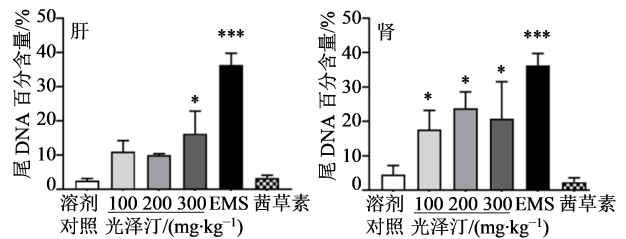
Fig. 1 Serum biochemical index changes of mice at different time points ($\bar{x} \pm s, n=5$)



溶剂对照 光泽汀 200 mg·kg⁻¹
箭头-小肉芽肿伴单个细胞坏死
arrow-small granuloma with single cell necrosis

图2 肝脏组织病理学改变

Fig. 2 Histopathological changes in liver



与溶剂对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$
* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs solvent control group

图3 小鼠体内彗星试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 3 Comet assay results *in vivo* ($\bar{x} \pm s, n=5$)

高于肝脏,与本研究结果一致。此外,骨髓微核试验结果为阴性,与文献报道相符。光泽汀小鼠 *Pig-a* 基因突变试验结果为阴性,与体外 Ames 试验结果不一致^[5]。上述结果产生的原因可能与体内 *Pig-a* 基因突变试验对弱阳性致突变剂不够敏感有关^[17],

也可能与本研究给药方式为 *ig*, 光泽汀在外周血含量较低有关。本研究中茜草素的彗星试验、骨髓微核试验和 *Pig-a* 基因突变试验结果均为阴性。从其结构上分析(图6),茜草素 R_1 位点虽有羟基取代,但其 R_2 位点仍为羟基,在哺乳动物体内酶的作用下 R_2

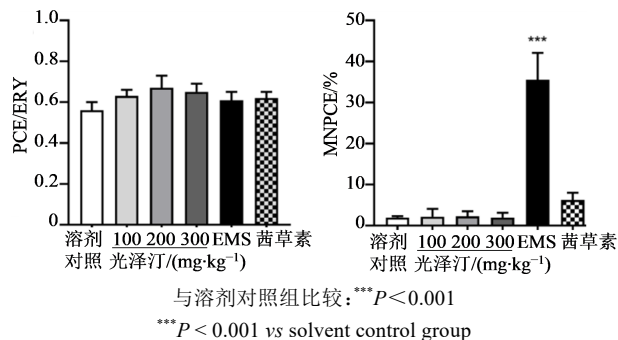


图4 小鼠骨髓微核试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 4 Bone marrow micronucleus results in mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

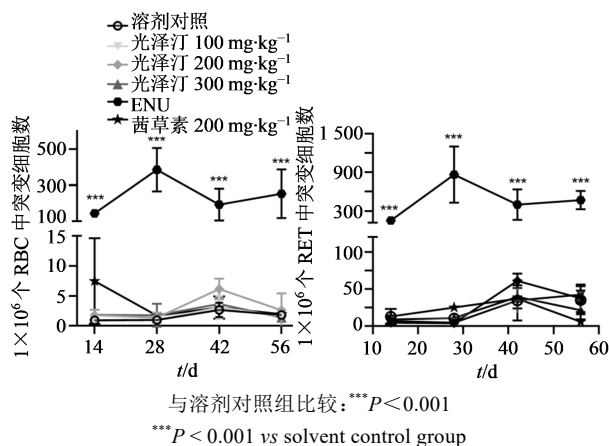


图5 小鼠外周血细胞的 *Pig-a* 基因突变结果 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Fig. 5 Results of *Pig-a* gene mutation in mouse peripheral blood cells ($\bar{x} \pm s, n=5$)

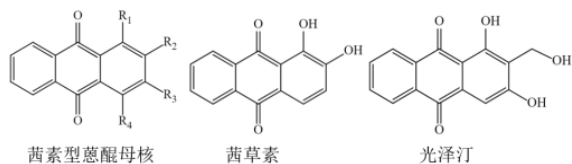


图6 茜素型蒽醌结构

Fig. 6 Structure of alizarin-type anthraquinone

位点无法形成亲电中间体,无法与DNA产生相互作用,故不具有遗传毒性。课题组前期研究结果提示茜草素及其代谢后均不诱导细菌回复突变^[5],本研究结果与其相符。

本研究开展多终点遗传毒性评价揭示光泽汀可能导致小鼠肝、肾细胞DNA损伤,但未见染色体损伤和体内基因突变作用。研究分析了茜草素和光泽汀的结构差异对遗传毒性的影响,为含茜素型蒽醌化合物的药物临床监管提供数据支撑。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Xiang W, Song Q S, Zhang H J, et al. Antimicrobial

anthraquinones from *Morinda angustifolia* [J]. Fitoterapia, 2008, 79(7/8): 501-504.

[2] Wu W J, Yan R, Li T, et al. Pharmacokinetic alterations of rhubarb anthraquinones in experimental colitis induced by dextran sulfate sodium in the rat [J]. J Ethnopharmacol, 2017, 198: 600-607.

[3] Ali A M, Ismail N H, Mackeen M M, et al. Antiviral, cytotoxic and antimicrobial activities of anthraquinones isolated from the roots of *Morinda elliptica* [J]. Pharm Biol, 2000, 38(4): 298-301.

[4] Tian W, Wang C M, Li D R, et al. Novel anthraquinone compounds as anticancer agents and their potential mechanism [J]. Future Med Chem, 2020, 12(7): 627-644

[5] 文海若, 闫明, 叶倩, 等. 茜素型蒽醌基因突变风险评估 [J]. 药物评价研究, 2022, 45(2): 234-240.

Wen H R, Yan M, Ye Q, et al. Mutagenic risk assessment of rubiacin-type anthraquinone [J]. Drug Eval Res, 2022, 45(2): 234-240.

[6] Kaur P, Chandel M, Kumar S, et al. Modulatory role of alizarin from *Rubia cordifolia* L. against genotoxicity of mutagens [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(1): 320-325.

[7] Sevcovicova A, Bodnarova K, Loderer D, et al. Dual activities of emodin: DNA protectivity vs mutagenicity [J]. Neuro Endocrinol Lett, 2014, 35(Suppl 2): 149-154.

[8] Inoue K, Yoshida M, Takahashi M, et al. Carcinogenic potential of alizarin and rubiadin, components of madder color, in a rat medium-term multi-organ bioassay [J]. Cancer Sci, 2009, 100(12): 2261-2267.

[9] Inoue K, Shibutani M, Masutomi N, et al. One-year chronic toxicity of madder color in F344 rats: Induction of preneoplastic/neoplastic lesions in the kidney and liver [J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(10): 3303-3310.

[10] Poginsky B, Westendorf J, Blömeke B, et al. Evaluation of DNA-binding activity of hydroxyanthraquinones occurring in *Rubia tinctorum* L [J]. Carcinogenesis, 1991, 12(7): 1265-1271.

[11] Chulasiri M, Matsushima T, Yoshihira K. Activation of lucidin-3-*O*-primveroside mutagenicity by hesperidinase [J]. Phytother Res, 1995, 9(6): 421-424.

[12] Ishidate M J, Sofuni T, Yoshikawa K, et al. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan [J]. Food Chem Toxicol, 1984, 22(8): 623-636.

[13] 王亚楠, 闫明, 汪祺, 等. 雷公藤甲素致L5178Y细胞及小鼠 *Pig-a* 基因突变风险评估 [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.

- [14] 文海若, 陈高峰, 任璐, 等. SD大鼠灌胃盐酸丙卡巴肼与乌拉坦的多脏器碱性彗星实验研究 [J]. 中国药房, 2019, 30(1): 26-30.
Wen H R, Chen G F, Ren L, et al. Study of alkaline comet assay at various tissues in SD rats with intragastric administration of procarbazine hydrochloride and ethyl carbamate [J]. China Pharm, 2019, 30(1): 26-30.
- [15] Yokohira M, Yamakawa K, Hosokawa K, et al. Promotion potential of madder color in a medium-term multi-organ carcinogenesis bioassay model in F344 rats [J]. J Food Sci, 2008, 73(3): T26-T32.
- [16] Kawasaki Y, Goda Y, Yoshihira K. The mutagenic constituents of *Rubia tinctorum* [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1992, 40(6): 1504-1509.
- [17] Bhalli J A, Shaddock J G, Pearce M G, et al. Sensitivity of the Pig-a assay for detecting gene mutation in rats exposed acutely to strong clastogens [J]. Mutagenesis, 2013, 28(4): 447-455.

[责任编辑 兰新新]