

研究报告

两色金鸡菊的遗传毒性及其食用安全性评价

胡燕平, 宋捷, 鄂蕊, 杨莹, 文海若

(中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全评价研究北京市重点实验室,
北京 100176)

摘要:目的 检测两色金鸡菊的遗传毒性,为其食用安全性评价提供研究数据。方法 以两色金鸡菊(水提取物)为受试物,采用细菌回复突变试验、小鼠淋巴瘤细胞TK基因突变试验(MLA)分别在代谢活化(+S9)和非代谢活化(-S9)条件下检测;以两色金鸡菊(粉末)为受试物,采用小鼠骨髓微核试验检测。细菌回复突变试验采用平板掺入法,检测1.25、2.5、5、10 mg/皿4个剂量诱发鼠伤寒沙门氏菌TA98、TA100、TA1535、TA1537及大肠杆菌WP2uvrA的his⁻/trp⁻回复突变能力;MLA采用微孔法,检测1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mg/mL 5个浓度在±S9/3 h处理条件下是否诱发L5178Y细胞tk⁺基因突变频率(MF)增加,评价对测试细胞的损伤作用;小鼠骨髓微核试验:间隔24 h连续3次经口灌胃给予CD-1小鼠900、1800、3600 mg/kg两色金鸡菊粉末(200目),并在末次给予后18~24 h取材,计数2000个嗜多染红细胞中含微核细胞,计算微核细胞率。结果 +、-S9条件下,1.25~10 mg/皿(生药剂量8.33~66.67 mg/皿)诱发5株测试菌的回变菌落数与灭菌注射用水阴性(溶媒)对照比较,无明显增加;1.5~3.5 mg/mL(生药浓度10~23.33 mg/mL)诱发的MF明显增加并具有浓度相关性,+S9条件下的3.0、3.5 mg/mL浓度组诱发的T-MF、S-MF达到阴性对照组的3倍以上,且以小集落突变体为主;900、1800、3600 mg/kg剂量组平均微核率分别为0.85±0.58、1.10±0.97、1.45±1.12,与去离子水阴性对照组比较无显著性差异。结论 两色金鸡菊(水提取物)无论代谢活化与否均可诱发L5178Y细胞tk⁺基因位点突变并导致染色体损伤,提示对人体具有潜在的遗传毒性。

关键词:两色金鸡菊;细菌回复突变试验;小鼠淋巴瘤细胞TK基因突变试验;小鼠骨髓微核试验;遗传毒性

中图分类号:R155

文献标识码:A

文章编号:1004-8456(2022)03-0498-06

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.03.016

Genotoxicity and edible safety evaluation of *Coreopsis tinctoria* Nutt.

HU Yanping, SONG Jie, AO Rui, YANG Ying, WEN Hairuo

(National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institute for Food and Drug Control, Key Laboratory of Beijing for Nonclinical Safety Evaluation Research of Drugs, Beijing 100176, China)

Abstract: Objective To detect the genotoxicity of *Coreopsis tinctoria* Nutt. (water extract) and provide research data for its safety evaluation. **Methods** The water extract of *Coreopsis tinctoria* Nutt. was used as the test substance in bacterial reverse mutation test, mouse lymphoma Assay (MLA) with and without metabolic activation S9; and the powder of *Coreopsis tinctoria* Nutt. was used in micronucleus test. Ames test based on the plate incorporation method was performed to detect his⁻/trp⁻ revert mutation capabilities of *S. typhimurium* TA98, TA100, TA1535, TA1537 and *E. coli* WP2 uvrA induced under four doses of 1.25, 2.5, 5 and 10 mg/plate; MLA based on the microporous method was performed to detect the increase of tk⁺ mutation frequency (MF) of L5178Y cells induced by 5 concentrations of 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 and 3.5 mg/mL under the treatment condition of ±S9/3 h, and to evaluate the damage effects on the tested cells; for the mouse bone marrow micronucleus test: CD-1 mice were administrated with 900 mg/kg, 1800 mg/kg and 3600 mg/kg of the *Coreopsis tinctoria* Nutt. powder (200 mesh) intragastrically for three times at an interval of 24 h, and the samples were collected by 18-24 h after the last dose. The micronucleated cells in 2000 polychromatic erythrocytes were counted, and the micronucleated cell rate were calculated. **Results** Under both conditions absent and present S9, the numbers of the revertants in five strains induced by 1.25~10 mg/dish (equivalent to crude drug: 8.33~66.67 mg/plate) were not significantly increased compared with the negative (solvent) control of sterilized water for injection. The MF

收稿日期:2021-08-27

基金项目:国家十三五“重大新药创制”专项(2018ZX09201017)

作者简介:胡燕平 女 副主任药师 研究方向为食品、药品的遗传毒性研究 E-mail: huer64@126.com

通讯作者:文海若 女 研究员 研究方向为遗传毒性研究 E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

induced by 1.5~3.5 mg/mL (equivalent to crude drug: 10~23.33 mg/mL) were significantly increased with a concentration-response relationship, and most of the mutants were in the form of small colony. The T-MF and S-MF induced by 3.0 and 3.5 mg/mL +S9 groups were more than 3 times of the negative control group; the mean micronucleus rates in 900 mg/kg, 1 800 mg/kg and 3 600 mg/kg groups were 0.85 ± 0.58 , 1.10 ± 0.97 and 1.45 ± 1.12 , respectively, with no significant difference compared with the deionized water negative control group. **Conclusion** The water extract of *Coreopsis tinctoria* Nutt. could significantly increase the mutation frequency of *tk⁺* gene and led to chromosome damage in L5178Y cells, no matter with or without metabolic activation, suggesting its potential genotoxicity to human.

Key words: *Coreopsis tinctoria* Nutt.; bacterial reverse mutation test; mouse lymphoma assay; mouse bone marrow micronucleus test; genotoxicity

两色金鸡菊(*Coreopsis tinctoria* Nutt.)为菊科(Compositae)金鸡菊属(*Coreopsis*)一年生草本植物,原产于美洲,后分布于世界各地。两色金鸡菊自2000年引入我国,主要分布于新疆高海拔的昆仑山区,又称“昆仑雪菊”。已有研究发现,两色金鸡菊提取物富含黄酮类、香豆素、有机酸、氨基酸类、皂苷类、鞣质、多酚类等化学成分,具有较好的降脂、降压、调节血糖、抗菌及抗氧化等药理活性^[1-6]。随着其相关药效学活性及机制研究的深入,两色金鸡菊的食用和药用价值逐渐受到关注^[7]。以两色金鸡菊为原料制成的茶饮当前具有较大市场前景。如何利用新疆当地丰富的两色金鸡菊资源,开发具有区域特色的营养保健品成为当前食品开发的热点之一。遗传毒性评价是食品安全性监管的准入门槛,对两色金鸡菊的遗传毒性报道当前较为少见,有必要进行综合考察。本文参照食品安全国家标准细菌回复突变试验^[8]、体外哺乳类细胞TK基因突变试验(MLA)^[9]和小鼠骨髓微核试验^[10]对两色金鸡菊进行了遗传毒性研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与细胞来源

鼠伤寒沙门氏菌组氨酸营养缺陷型(*his⁻*)菌株(*Salmonella typhimurium*, *S. typhimurium*)TA98、TA100、TA1535、TA1537和大肠杆菌色氨酸营养缺陷型(*trp⁻*)菌株(*Escherichia coli*, *E. coli*)WP2uvrA,菌种引自日本(株)生物科学中心(JBS INC.);MLA采用小鼠淋巴瘤L5178Y *tk⁺*-3.7.2C细胞,引自日本国立医药品食品卫生研究所。

1.1.2 实验动物

共50只CD-1小鼠(雌雄各半),约5~6周龄,SPF级,购自北京维通利华实验动物技术有限公司(实验动物出售许可证号:SCXK(京)2016-0006),初次给药时体质量为23.8~37.6g。小鼠饲养于屏障系统内PC聚碳酸酯鼠盒内,环境温度为20℃~

26℃,湿度为40%~70%,每小时换气15次以上,照明时间每天12h。试验期间给予钴⁶⁰放射灭菌鼠全价颗粒饲料,自由摄取。试验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的伦理审查(伦理批复编号:1ACUC-2018-051)。

1.1.3 主要仪器与试剂

5810R型离心机(Eppendorf);IOC42.XX1.C型气浴摇床;MIR-253低温恒温培养箱;SPECTRAMAX PLUS型酶标仪(Molecular Devices);二氧化碳培养箱(HERA cell VIOS 160i, Thermo Fisher);生物安全柜(NU-543-400S, Nuair);倒置显微镜(CKX31, Nikon)等。

灭菌注射用水,石家庄四药有限公司生产;去离子水,本实验室去离子水机现用现制;呋喃基糠酰胺(Furylfuramide, AF-2),日本和光纯药工业株式会社生产;叠氮钠(NaN_3),MERCK-Schuchardt生产;9-氨基吖啶(9-Aminoacridine, 9-AA),ACROS ORGANICS生产;2-氨基蒽(2-Aminoanthracene, 2-AA),Fluka生产;甲基甲烷磺酸酯(Methyl methanesulfonate, MMS)、环磷酰胺(Cyclophosphamide, CP)及突变选择剂三氟胸苷(Trifluorothymidine, TFT),均购自Sigma公司;营养肉汤(CM0067 Nutrient broth No. 2);英国OXOID生产;琼脂粉,购自日本;完全培养基由RPMI 1640培养基(Gibco)、0.2% NaHCO_3 (北京化学试剂公司)、1%青链霉素混合液(GIBCO)、丙酮酸钠(Amresco)配制而成,根据用途不同分为含10%马血清(传代、处理培养)、20%马血清(96孔板培养)和不含马血清(稀释)的培养液;TFT,终浓度3 $\mu\text{g}/\text{mL}$;S9,由多氯联苯诱导处理S.D雄性大鼠肝而获得,北京安宝迪科技有限公司生产;临用前配制S9含量为30%(细菌回复突变试验)或10%(MLA)的S9混合液(S9 mix)。

1.2 方法

1.2.1 受试物制备

受试物两色金鸡菊,棕色花蕊、黄色花瓣的干品,购自新疆和田地区克里阳乡。前处理方法:称取

两色金鸡菊 100 g, 蒸馏水 100 °C 回流提取两次, 每次提取 1 h, 第 1 次 10 倍量水, 第 2 次 8 倍量水; 将两次得到的提取液合并, 经旋转蒸发浓缩至干燥, 得到两色金鸡菊干燥提取物, 粉碎, 过 80 目筛即得两色金鸡菊棕褐色粉末(批号: 20180713), 提取率 150 mg/g 生药。体外试验使用以灭菌注射用水为溶媒配制为所需浓度的水溶液, 0.5 g 两色金鸡菊棕褐色提取物可溶于 1 mL 水。小鼠骨髓微核试验使用直接粉碎、过 200 目筛获得的两色金鸡菊粉末(批号: 20180626), 以去离子水为溶媒配制的混悬液。

1.2.2 菌株与细胞的处理

特性鉴定合格的测试菌于 -80 °C 保存, 试验前在 5 mL 营养肉汤中接种 20 μL (鼠伤寒沙门氏菌) 或 10 μL (大肠杆菌) 细菌冻融液(含 8% DMSO), 水浴摇床 37 °C、120 r/min 培养 10 h; 培养结束, 在波长 660 nm 处测定新鲜菌液光密度, 经计算确认活菌数浓度达 1×10^9 个/mL 以上的菌液用于试验。MLA 采用小鼠淋巴瘤 L5178Y tk⁺-3.7.2C 细胞, 经过纯化及支原体检查, 合格细胞置液氮保存, 复苏后传代 5 次内使用。

1.2.3 细菌回复突变试验

采用标准平板掺入法。设立 1.25、2.5、5、10 mg/皿 4 个剂量组、灭菌注射用水阴性对照组及阳性对照组(+S9: 2-AA; -S9: AF-2, NaN₃, 9-AA; 阳性剂配制时 NaN₃ 的溶媒为水, 其余溶媒均为 DMSO, 添加终浓度见表 1), 另外设置了阳性对照品的二甲基亚砜(DMSO)溶媒对照组; 每组平行 3 皿, 在 +、-S9 条件下平行检测, 平板置 37 °C 培养 48 h; 观察抑菌及沉淀情况, 计数每皿回变菌落数, 计算每组回变菌落数的平均值和标准差($\bar{x} \pm s$)。试验重复进行 2 次。

1.2.4 MLA

采用微孔法。设立 1.5、2.0、2.5、3.0、3.5 mg/mL 5 个浓度组、灭菌注射用水阴性对照组和阳性对照组(+S9: CP; -S9: MMS; 溶媒均为 DMSO, 相应终浓度见表 2-3); 每个浓度组平行 2 管, 在 +S9/3 h、-S9/3 h 两种处理条件下检测。各组细胞处理液于 37 °C 振荡培养箱中培养 3 h, 经处理和洗涤后的细胞于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养 2 d 进行表达, 期间每日计测细胞密度, 计算每天的细胞增值率(Daily cell growth, DCG, %); 处理当天制备检测表达 0 d 平板接种效率(Plating efficiency, PE, %)的 PE0 平板, 表达结束制备检测表达 2 d 平板接种效率的 PE2 平板和基因突变频率(Mutation frequency, MF)的 MF 平板; PE0、PE2、MF 平板分别于 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养 11、9、14 d。培养结束, 计数含与

不含接种效率细胞克隆的孔数, 并计算 PE0 和 PE2、细胞相对存活率(Relative survival, RS)、相对悬浮生长率(Relative suspension growth, RSG)、相对总生长率(Relative total growth, RTG); 观察并分别计数含有突变细胞大集落(Large colony, LC)、小集落(Small colony, SC)及大、小集落(LC/SC)并存的孔数, 计算总突变频率(T-MF)、大集落突变频率(L-MF)、小集落突变频率(S-MF)和小集落突变百分率(SCM)。

$$RSG(\%) = (DCG1 \times DCG2)_{\text{处理组}} / (DCG1 \times DCG2)_{\text{阴性对照组}} \times 100\%$$

DCG1 = 表达 d1 计测的细胞密度 / 表达 d0 调整后的细胞密度

DCG2 = 表达 d2 计测的细胞密度 / 表达 d1 调整后的细胞密度或计测的细胞密度

PE0(2) = $-\ln(EW/TW)/1.6$, EW: 空孔数; TW: 总孔数

$$RS0(2)(\%) = (PE_{\text{处理组}} / PE_{\text{阴性对照组}}) \times 100\%$$

$$RTG(\%) = RS2 \times RSG \times 100\%$$

$$MF(\times 10^{-6}) = -\ln(EW/TW) / 2000 / PE2$$

$$SCM(\%) = (S-MF / T-MF) \times 100\%$$

1.2.5 小鼠骨髓微核试验

两色金鸡菊(粉末, 200 目)以去离子水为溶媒可配制为混悬液且不堵塞小鼠灌胃针的最高浓度为 180 mg/mL。小鼠连续灌胃给药最高可给予体积为 20 mL/kg。故以 3 600 mg/kg 为两色金鸡菊(粉末)最高给药剂量, 下设 1 800、900 mg/kg 分别为中、低剂量, 间隔 24 h 共给药 3 次。试验包括 3 个受试物剂量组, 并平行设置去离子水阴性对照组和阳性对照组(CP, 80 mg/kg)。阳性对照单次腹腔注射给药, 其他各组均灌胃给予, 给药体积均为 20 mL/kg。试验期间观察动物临床症状及体质量变化。末次给药后约 18~24 h 取材, 取材时摘取双侧股骨, 并用胎牛血清冲洗骨髓制备骨髓细胞悬液, 手工推片。样本自然晾干后分别经吉姆萨或吖啶橙染色。每只动物计数 200 个骨髓红细胞中嗜多染红细胞(Polychromatic erythrocytes, PCE)所占比例, 并观察计数至少 2 000 个 PCE 以判断 MNPCE(Micronucleated polychromatic erythrocytes, MNPCE)发生率。

1.3 统计及判定方法

细菌回复突变试验结果以每组回变菌落数的 $\bar{x} \pm s$ 表示; -S9 和/或 +S9 条件下, 至少在 1 个菌株上, 受试物组的回变菌落数 \geq 阴性(溶媒)对照组的 2 或 3 倍以上, 并同时具有剂量-反应关系或一个测试点呈现可重复性时, 结果判为阳性。MLA、RSG、

RS、RTG 表示细胞毒性水平, MF、SCM 表示突变水平;若受试物一个以上浓度组的 MF 显著高于阴性(溶媒)对照组,或是阴性(溶媒)对照组的 3 倍以上,并有剂量-反应趋势,则判为阳性结果;若仅在相对存活率低于 20% 的高剂量情况下出现阳性,则结果为“可疑”;若在相对存活率低于 20% 的高剂量情况下未见突变频率的增加,则结果判为阴性。小鼠骨髓微核试验,采用“Poisson 分布两样本均数比较”方法比较给药组的微核率与阴性对照组之间的差异是否存在统计学意义上的显著性;当 $P < 0.05$ 时,

认为存在显著性差异。

2 结果

2.1 细菌回复突变试验

如表 1 所示,回变菌落数平均值均在本实验室报道^[11]的背景数据范围内,阳性对照组诱发的回变菌落数均达到阴性对照组的 3 倍以上,显示出明显的诱变能力;两色金鸡菊的 4 个剂量组(“/”前为水提取物剂量,“/”后为生药剂量)诱发 5 株菌的回变菌落数与阴性对照组比较,均无明显增加。

表 1 两色金鸡菊(水提取物)的细菌回复突变试验试验结果($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Bacterial Reverse Mutation Test Results of *Coreopsis tinctoria* Nutt. ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (mg/皿)	TA98		TA100		TA1535		TA1537		WP2 <i>uvrA</i>	
		-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
阴性对照组(Water)	200 μ L/皿	37 \pm 1.0	34 \pm 2.1	133 \pm 4.7	121 \pm 14.7	17 \pm 4.7	13 \pm 4.6	14 \pm 1.0	15 \pm 1.5	39 \pm 4.6	19 \pm 2.5
	1.25/8.33	40 \pm 4.5	29 \pm 4.0	121 \pm 3.2	116 \pm 7.2	15 \pm 6.1	16 \pm 2.5	19 \pm 2.1	18 \pm 2.1	37 \pm 2.9	28 \pm 5.5
	2.5/16.67	41 \pm 3.2	31 \pm 3.5	124 \pm 7.0	109 \pm 7.2	17 \pm 5.6	14 \pm 2.1	17 \pm 5.3	17 \pm 1.5	36 \pm 6.2	28 \pm 7.1
	5/33.33	36 \pm 4.4	33 \pm 1.0	125 \pm 4.6	125 \pm 9.0	19 \pm 3.6	12 \pm 2.3	17 \pm 6.0	17 \pm 3.5	37 \pm 1.2	29 \pm 3.6
	10/66.67	40 \pm 3.2	32 \pm 1.2	128 \pm 10.4	112 \pm 10.4	19 \pm 4.4	11 \pm 2.3	15 \pm 5.3	16 \pm 4.7	34 \pm 9.0	30 \pm 2.0
阳性对照溶剂(DMSO)	100 μ L/皿	39 \pm 4.0	31 \pm 3.0	126 \pm 4.2	108 \pm 5.8	12 \pm 4.2	11 \pm 1.5	18 \pm 4.4	17 \pm 1.0	35 \pm 1.5	21 \pm 2.1
		537 \pm 41.2 ^a	—	467 \pm 24.7 ^b	—	—	—	—	—	114 \pm 13.2 ^b	—
阳性对照组		—	—	—	—	377 \pm 144.0 ^c	—	—	—	—	—
		—	—	—	—	—	—	346 \pm 67.2 ^d	—	—	—
		—	412 \pm 18.3 ^e	—	1138 \pm 95.5 ^f	—	101 \pm 19.2 ^f	—	74 \pm 4.0 ^f	—	141 \pm 19.3 ^g

注:^a: AF-2, 0.1 μ g/皿; ^b: AF-2, 0.01 μ g/皿; ^c: NaN₃, 0.5 μ g/皿; ^d: 9AA, 40 μ g/皿; ^e: 2AA, 0.5 μ g/皿; ^f: 2AA, 1.0 μ g/皿; ^g: 2AA, 10 μ g/皿

2.2 MLA

如表 2、表 3 所示,阴性对照组的 PE、MF 在本实验室的背景数据范围内或与其相近(PE: 60%~140%; MF: 50~200 $\times 10^{-6}$);阳性对照组诱发的 T-MF 达到阴性对照组的 3 倍以上。+S9、-S9 条件下,受试物各浓度组(“/”前为水提取物浓度,“/”后为生药浓度)产生的 RTG 均 >30% 即细胞毒性均 <70%,

诱发的 MF 对比阴性对照组明显增加并具有浓度相关性;同时,+S9 条件下的 3.0、3.5 mg/mL 浓度组诱发的 T-MF、S-MF 达到阴性对照组的 3 倍以上,且以小集落突变体为主(前期研究中,当浓度 ≥ 4.0 mg/mL 时,RTG $\leq 11\%$,具有较高细胞毒性水平;诱发的 T-MF、S-MF 亦在阴性对照的 3 倍以上,诱变结果为“可疑”)。

表 2 +S9/3 h 处理条件下两色金鸡菊(水提取物) MLA 结果

Table 2 Results of MLA on *Coreopsis tinctoria* Nutt. with S9 at 3 h

组别	浓度(mg/mL)	PE0(%)	PE2(%)	RS0(%)	RSG(%)	RTG(%)	T-MF($\times 10^{-6}$)	S-MF($\times 10^{-6}$)	L-MF($\times 10^{-6}$)	SCM(%)
阴性对照组(Water)	10% (V/V)	85	148	100	100	100	198	76	97	38
	1.5/10	76	114	89	101	78	240	101	107	42
	2.0/13.33	84	88	99	113	67	255	109	118	43
	2.5/16.67	62	112	73	85	65	463	193	164	42
	3.0/20	49	79	58	60	32	603	274	207	45
3.5/23.33	64	95	75	59	38	730	338	183	46	
阳性对照组	CP 3 μ g/mL	75	177	88	127	66	824	414	212	50

表 3 -S9/3 h 处理条件下两色金鸡菊(水提取物) MLA 结果

Table 3 Results of MLA on *Coreopsis tinctoria* Nutt. without S9 at 3 h

组别	浓度(mg/mL)	PE0(%)	PE2(%)	RS0(%)	RSG(%)	RTG(%)	T-MF($\times 10^{-6}$)	S-MF($\times 10^{-6}$)	L-MF($\times 10^{-6}$)	SCM(%)
阴性对照组(Water)	10% (V/V)	105	107	100	100	100	188	71	99	38
	1.5/10	101	94	96	90	79	233	84	124	36
	2.0/13.33	108	106	103	67	66	301	141	120	47
	2.5/16.67	57	88	54	54	44	437	196	161	45
	3.0/20	42	116	40	29	31	467	203	147	43
3.5/23.33	49	127	47	45	54	507	223	149	44	
阳性对照组	MMS 10 μ g/mL	83	94	79	88	131	855	383	199	45

2.3 小鼠骨髓微核试验

试验期间阴性对照组、阳性对照组及所有给药组动物未见动物死亡、濒死,均无异常临床症状,且各剂量组动物的平均体质量与同性别相同时间段对照组比较均未见显著性差异。如表4所示,连续3 d给予受试物后18~24 h,两色金鸡菊(粉末)900、1 800、3 600 mg/kg 剂量组和阳性对照组动物的PCE/ERY的平均比值与溶媒对照组相比无明显差异,平均微核率与溶媒对照组比较无显著性差异($P>0.05$)。提示给予两色金鸡菊(粉末)对小鼠骨髓细胞微核发生率无影响。

表4 两色金鸡菊小鼠骨髓微核试验结果

Table 4 Results of mouse bone marrow micronucleus test of *Coreopsis tinctoria* Nutt.

组别	PCE/ERY	MNPCE%
阴性对照组(Water)	100%	1.15±0.91
900 mg/kg 剂量组	95%	0.85±0.58
1 800 mg/kg 剂量组	108%	1.10±0.97
3 600 mg/kg 剂量组	99%	1.45±1.12
阳性对照组(CP, 80 mg/kg)	106%	38.20±7.70**

注:**表示 $P<0.01$

3 讨论

本文分别开展细菌回复突变试验、MLA和小鼠骨髓微核试验,评价两色金鸡菊的潜在遗传毒性风险。细菌回复突变试验和MLA采用不同的体外评价体系检测受试物的致突变性,前者所用4株沙门氏菌可检测组氨酸合成位点 his^- 突变,1株大肠杆菌可检测色氨酸合成位点 trp^- 突变;后者的灵敏度较高,其检测可覆盖胸苷激酶 $tk^{+/-}$ 基因突变和染色体损伤两个遗传终点,一般认为,大集落突变体的基因损伤多仅局限于 $tk^{+/-}$ 位点,即小范围的点突变,小集落突变体是由较大范围的染色体改变(染色体断裂、缺失、重组或分离异常等)所致;小鼠骨髓微核试验是传统而经典的检测染色体断裂剂、纺锤体毒物及非整倍体诱导剂的体内致突变试验。本文的研究结果发现,两色金鸡菊(水提取物)在剂量1.25~10 mg/皿(生药剂量8.33~66.67 mg/皿)无明显诱发 his^-/trp^- 突变的能力,但在水提取物浓度1.5~3.5 mg/mL(生药浓度10~23.33 mg/mL)诱发小鼠淋巴瘤L5178Y细胞 $tk^{+/-}$ 基因突变率明显增高并具有浓度相关性,且以小集落突变体为主,提示对细胞有较大程度损伤;而两色金鸡菊(粉末)给予剂量高达3 600 mg/kg时无诱导小鼠骨髓细胞染色体损伤或有丝分裂器损伤的作用。从评价方法的角度分析,MLA结果假阳性较高。本文用于评价的各浓度组的细胞毒性(RTG)均未超过70%,可排除

因毒性过大导致的假阳性情况。值得注意的是,用于小鼠骨髓微核试验的受试物为直接粉碎、过筛后的两色金鸡菊粉末,未经过化学提取处理,因此MLA阳性结果不排除与溶剂提取残留的化学物质干扰有关。

两色金鸡菊主要成分之一生物总黄酮(即黄酮类化合物,本文水提取物中含量为460 mg/g提取物)广泛存在于植物界。有研究报道^[12],膳食中常见的黄酮类化合物,如槲皮素、染料木素等,在非活化条件下可诱发小鼠淋巴瘤L5178Y细胞 $tk^{+/-}$ 基因突变。也有研究提示染料木素存在诱导染色体畸变和DNA突变的作用^[13]。本课题组前期研究发现黄酮类化合物在抑制肿瘤形成和促进肿瘤细胞转化方面具有双重性,其效应与作用浓度有关^[14]。与此同时,也有昆仑雪菊遗传毒性试验结果均为阴性的研究报道^[15]。故此,两色金鸡菊作为食品原料,其遗传毒性尚需进一步的研究验证。

本文在对两色金鸡菊开展的三项遗传毒性试验中得到“二阴一阳”的结果,结果不一致可能来自评价体系不同以及体内外试验生物系统、代谢途径等差异,如:体外形成的代谢产物未必在体内形成;活性代谢产物可能在体内迅速被解毒而体外则不能;受试物及其代谢产物在体内可快速和高效排泄等。与体外试验相比,体内试验方法具有考虑到与人体应用相关的吸收、分布、排泄的优点,而且体内代谢相对于体外试验中的代谢系统更具有相关性^[16]。

综上,两色金鸡菊可能具有遗传毒性风险。后续可开展染色体畸变试验和体内 $Pig-a$ 基因突变试验对其遗传毒性风险进行研究验证。本文结合三项针对不同检测终点的试验方法对两色金鸡菊的遗传毒性风险进行评价,并首次报道两色金鸡菊的MLA研究结果,为其遗传毒性风险评估提供参考。

参考文献

- [1] 潘英, 李宁, 倪慧, 等. 金鸡菊属植物化学成分和药理活性研究进展[J]. 现代药物与临床, 2012, 27(5): 512-518.
PAN Y, LI N, NI H, et al. Advances in research on chemical constituents in plants of *Coreopsis L.* and their pharmacological activities [J]. *Drugs & Clinic*, 2012, 27(5): 512-518.
- [2] 毛新民, 韩雪, 卢伟, 等. 两色金鸡菊对糖尿病小鼠血糖、血脂的影响[J]. 中药药理与临床, 2014, 30(2): 78-82.
MAO X, HAN X, LU W, et al. Effect of the ethyl acetate extract from *Coreopsis tinctoria* nutt. on fasting blood levels and blood lipids in diabetic mice [J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2014, 30(2): 78-82.
- [3] 梁淑红, 庞市宾, 刘晓燕, 等. 金鸡菊提取物降血脂作用的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(8): 234-235.

- LIANG S H, PANG S B, LIU X Y, et al. Experimental study on hypolipidemic effect of extracts of *Coreopsis basalis* [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2010, 16(8): 234-235.
- [4] 梁淑红, 哈木拉提, 庞市宾, 等. 金鸡菊提取物降血压化学成分实验研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(7): 1619-1621.
- LIANG S H, HA M T L, PANG S B, et al. Experimental study on hypertensive effect of extracts of *Coreopsis basalis* [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2010, 21(7): 1619-1621.
- [5] ZHANG Y, SHI S P, ZHAO M B, et al. Coreosides A-D, C14-polyacetylene glycosides from the capitula of *Coreopsis tinctoria* and its anti-inflammatory activity against COX-2[J]. Fitoterapia, 2013, 87: 93-97.
- [6] CAO Y, PANG S B, XU L, et al. Antioxidant activities of *Coreopsis tinctoria* extracts in vitro [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2011, 17(12): 144-147.
- [7] 姚新成, 田丽萍, 秦冬梅, 等. 两色金鸡菊化学成分及生物活性研究进展[J]. 西北药学杂志, 2014, 29(6): 655-658.
- YAO X C, TIAN L P, QIN D M, et al. Research advances in the chemical constituents and biological activity of *Coreopsis tinctoria* Nutt [J]. Northwest Pharmaceutical Journal, 2014, 29(6): 655-658.
- [8] 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 细菌回复突变试验: GB 15193.4—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard bacterial reverse mutation test: GB 15193.4—2014 [S]. Beijing: China Standard Press, 2015.
- [9] 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 体外哺乳类细胞TK基因突变试验: GB 15193.20—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard in vitro mammalian cellTKgene mutation assay: GB 15193.20—2014 [S]. Beijing: China Standard Press, 2015.
- [10] 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 哺乳动物红细胞微核试验: GB 15193.5—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. National food safety standard mammalian erythrocyte micronucleus test: GB 15193.5—2014 [S]. Beijing: China Standard Press, 2015.
- [11] 胡燕平, 宋捷, 李波. 细菌回复突变试验背景数据的采集[J]. 中国新药杂志, 2009, 18(22): 2110-2121.
- HU Y P, SONG J, LI B. Collecting historical data in bacterial reverse mutation test [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2009, 18(22): 2110-2121.
- [12] 邬鸣. 用小鼠淋巴瘤细胞TK基因突变试验评价三种黄酮类化合物的诱变性和抗诱变性[D]. 成都: 四川大学, 2005.
- WU M. Evaluation of mutagenic and antimutagenic effects of three flavonoids by mouse lymphoma assay [D]. Chengdu: Sichuan University, 2005.
- [13] TSUTSUI T, TAMURA Y, YAGI E, et al. Cell-transforming activity and mutagenicity of 5 phytoestrogens in cultured mammalian cells [J]. International Journal of Cancer, 2003, 105(3): 312-320.
- [14] 王颖, 蒲江, 齐乃松, 等. Bhas 42细胞转化试验高通量检测方法的建立及应用[J]. 癌变·畸变·突变, 2015, 27(4): 288-293.
- WANG Y, PU J, QI N S, et al. A high-throughput screening method and application of cell transformation assay in Bhas 42 cells [J]. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis, 2015, 27(4): 288-293.
- [15] 艾尔肯·塔西铁木尔, 黄蕊芳, 刘晓峰, 等. 昆仑雪菊遗传毒性研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2018, 30(1): 18-21.
- TAXITIEMUER A, HUANG R F, LIU X F, et al. Study on genotoxicity of *Coreopsis tinctoria* Nutt. [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2018, 30(1): 18-21.
- [16] 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 genotoxicity research of drugs [S]. 2018.