

论著

脱氢乙酸钠遗传毒性研究

耿雪, 张晓鹏, 李永宁, 张倩男, 刘海波, 崔文明, 杨辉, 于洲, 贾旭东

(国家食品安全风险评估中心 国家卫生健康委员会食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021)

摘要:目的 研究脱氢乙酸钠 (Na-DHA) 的遗传毒性。方法 细菌回复突变试验采用鼠伤寒沙门菌 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 菌株, 设 1 667、556、185、62 和 21 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 5 个剂量组, 同时设自发回复突变组、溶剂对照组和阳性对照组, 在加和不加代谢活化系统 (S9) 的情况下计数每皿回复突变菌落数。微核试验采用昆明小鼠, 设 549.0、275.0 和 137.0 $\text{mg}/\text{kg BW}$ 3 个剂量组, 同时设阴性对照组和阳性对照组, Na-DHA 灌胃给予小鼠 2 次, 间隔 24 h, 末次给予 6 h 后取股骨骨髓涂片, 观察红细胞 (RBC)、嗜多染红细胞 (PCE) 和出现微核的嗜多染红细胞 (MN) 数, 计算每组 PCE/RBC 和 MN/PCE (微核发生率)。体外哺乳类细胞染色体畸变试验采用中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞, 设 2 000、1 000、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 3 个剂量组, 同时设阴性对照组、溶剂对照组和阳性对照组, 处理 6 和 24 h, 观察 300 个中期分裂相/组, 记录畸变类型和数目, 计算畸变率。结果 各剂量组 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 的回复突变菌落数与自发回复突变组比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。各剂量组微核发生率与阴性对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。各剂量组 CHO 细胞染色体畸变率与阴性对照组比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。自发回复突变组和阴性对照组三项试验的回复突变菌落数、微核发生率及染色体畸变率均低于阳性对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。结论 本研究条件下, 未发现 Na-DHA 具有遗传毒性。

关键词: 脱氢乙酸钠; 食品添加剂; 遗传毒性; 安全性评价

中图分类号: R155 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2020)02-0118-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2020.02.002

Genotoxicity evaluation of sodium dehydroacetateGENG Xue, ZHANG Xiaopeng, LI Yongning, ZHANG Qiannan, LIU Haibo,
CUI Wenming, YANG Hui, YU Zhou, JIA Xudong(National Health Commission Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment, China National
Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To study the genotoxicity of sodium dehydroacetate (Na-DHA). **Methods** Five strains of *Salmonella* Typhimurium (TA97a, TA98, TA100, TA102 and TA1535) were used with the presence and absence of S9 in bacterial reverse mutation test. Bacteria were treated with Na-DHA at the dose levels of 1 667, 556, 185, 62, 21 $\mu\text{g}/\text{plate}$. Both negative and positive controls were set. The number of revertant colonies per plate were counted. Kunming mice used for micronucleus test were treated with Na-DHA at 549.0, 275.0 and 137.0 $\text{mg}/\text{kg BW}$ by gavage twice a day with a 24 h interval. The femurs of mice were removed at 6 h after the second gavage. The numbers of red blood cell (RBC), polychromatic erythrocytes (PCE) and micronucleus (MN) were observed. The PCE/RBC and MN/PCE (the incidence of micronucleus) were calculated. Chinese hamster ovary (CHO) cells were treated with Na-DHA (2 000, 1 000, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in the presence and absence of S9 for 6 or 24 h. Three hundred well-spread metaphases per group were scored, following the incidence of chromosomal aberration recorded. **Results** No significant difference in the number of mutant colonies of TA97a, TA98, TA100, TA102 and TA1535 between the treated groups and the negative control group ($P>0.05$). The incidence of micronucleus in each dose group was not significantly different from that in the negative control group ($P>0.05$). No significant difference in the incidence of CHO cell chromosome aberration between the dose group and the negative control group ($P>0.05$). The mutant colony number, the incidence of micronucleus and the incidence of chromosome aberration in the three tests were significantly lower than that in the positive control groups, with statistically significant differences ($P<0.01$). **Conclusion** No genotoxicity of Na-DHA was found in vivo nor in vitro.

收稿日期: 2020-01-28

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFC1602104)

作者简介: 耿雪 女 研究实习员 研究方向为营养与食品卫生 E-mail: gengxue@cfsa.net.cn

通信作者: 张晓鹏 女 副研究员 研究方向为营养与食品卫生 E-mail: zhangxiaopeng@cfsa.net.cn

Key words: Sodium dehydroacetate; food additive; genotoxicity; safety evaluation

脱氢乙酸钠(sodium dehydroacetate, Na-DHA)是一种常用的食品添加剂,因其对真菌、酵母菌和霉菌的生长具有较好的抑制作用,因此常被用作高效广谱防腐剂和抗菌剂^[1]而广泛应用于多种食品和饮品中^[2-4]。但近年来,因其违规添加和超范围使用而引起的食品安全事件屡见不鲜,2017年宁夏回族自治区发生一起28名儿童中毒的事件,最终认定与牛奶中违规添加高浓度Na-DHA有关^[5];2018年广受关注的“辣条”事件中,也在产品中检出了超范围使用的Na-DHA,类似事件使Na-DHA的食用安全性愈发受到关注,开展Na-DHA食用安全性风险评估势在必行。

目前,由于Na-DHA的毒理学安全性资料国内外都很缺乏,有关国家和国际组织均未提出其每日允许摄入量(ADI)^[6],因此按照国际指南在符合良好实验室操作规范(good laboratory practice, GLP)的实验室中,对Na-DHA开展包括遗传毒性在内的系统性毒理学安全性评价成为开展风险评估的基础。本研究参照人用药品注册技术要求国际协调会议(ICH)推荐的遗传毒性试验组合^[7],按照《经济合作与发展组织(OECD)化学品测试准则》^[8-10]和GB 15193.4—2014《食品安全国家标准 细菌回复突变试验》^[11]、GB 15193.5—2014《食品安全国家标准 哺乳动物红细胞微核试验》^[12]、GB 15193.23—2014《食品安全国家标准 体外哺乳类细胞染色体畸变试验》^[13]中相关遗传毒性试验的指南和试验方法,对市售食品用Na-DHA开展遗传毒性研究,为风险评估积累基础毒理学数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 受试物

食品添加剂Na-DHA购自南通奥凯生物技术开发有限公司,经北京汇智泰康医药技术有限公司检测,受试样品符合GB 25547—2010《食品安全国家标准 食品添加剂脱氢乙酸钠》^[14]的质量规格要求,纯度为99.3%。

1.1.2 实验动物

无特定病原体(SPF级)健康昆明小鼠50只,雌雄各半,体质量为25~27 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2016-0006。使用汇智泰康生物技术(北京)有限公司动物房,级别:屏障环境,许可证号:SYXK(京)2018-0009。饲养环境的温度为18~25℃,湿度为

60%。小鼠维持饲料购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2015-0015。

1.1.3 菌株与细胞

鼠伤寒沙门菌组氨酸缺陷型TA97a、TA98、TA100、TA102和TA1535菌株均购自北京汇智泰康医药技术有限公司,中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞购自美国模式培养物集存库(ATCC, CCL-61)。

1.1.4 主要仪器与试剂

电子天平、低温高速离心机、-80℃低温冰箱、二氧化碳细胞培养箱、恒温水浴锅、生物安全柜、生物光学显微镜、Imager.Z2遗传扫描分析系统(德国Zeiss)。

敌克松[sodium p(dimethylamino) benzenediazo sulfonate, SDBS]、2-氨基芴(2-aminofluorene, 2-AF)、叠氮钠(NaN_3)、1,8-二羟基蒽醌(1,8-dihydroxyanthraquinone, DHAQ)、甲基磺酸甲酯(methyl methanesulfonate, MMS)、2-氨基蒽(2-aminoanthracene, 2-AA)均购自北京汇智泰康生物技术有限公司,二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)、环磷酰胺(cyclophosphamide, CPA)均购自美国Sigma-Aldrich,丝裂霉素C(mitomycin C, MMC, 美国Selleckchem),F-12K培养液、胎牛血清(FBS)和胰蛋白酶(trypsin, 0.25%)等细胞培养试剂均购自英国Gibco,代谢活化系统(S9,江苏齐氏生物科技有限公司),秋水仙素(英国TOCRIS),Giemsa染液及缓冲液均购自北京索莱宝科技有限公司,氯化钾,冰乙酸,甲醇。

1.2 方法

1.2.1 细菌回复突变试验(Ames试验)

Ames试验参照GB 15193.4—2014^[11]和OECD化学品毒性测试准则TG 471^[8]开展。在加S9(+S9)和不加S9(-S9)的条件下,对5种鼠伤寒沙门菌组氨酸缺陷型TA97a、TA98、TA100、TA102和TA1535菌株进行试验。预试验发现5000 μg/皿存在明显抑菌作用,设1667 μg/皿为最高剂量,采用 $\sqrt{10}$ 倍组距,共设5个剂量组,分别为1667、556、185、62和21 μg/皿。将1.5 g受试物以无菌蒸馏水溶解稀释制成溶液,并定容至30 ml为最高剂量,即受试物浓度为5000 μg/0.1 ml,在顶层培养基中加此浓度受试物溶液0.1 ml,即每皿中含受试物5000 μg。5000 μg/0.1 ml的受试物溶液稀释至其他所需浓度。同时,设置自发回复突变组、溶剂(无菌蒸馏水)对照组和阳性对照组(SDBS作为

TA97a、TA98 菌株-S9 阳性对照物,加入量为 50 $\mu\text{g}/\text{皿}$; NaN_3 作为 TA1535 菌株-S9 阳性对照物,加入量为 1.5 $\mu\text{g}/\text{皿}$; 2-AF 作为 TA97a、TA98、TA100 菌株+S9 阳性对照物,加入量为 20 $\mu\text{g}/\text{皿}$; DHAQ 作为 TA102 菌株+S9 阳性对照物,加入量为 100 $\mu\text{g}/\text{皿}$; MMS 作为 TA100、TA102 菌株-S9 阳性对照物,加入量为 1 $\mu\text{l}/\text{皿}$; 2-AA 作为 TA1535 菌株+S9 阳性对照物,加入量为 2.0 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 。各组均做三个平行皿作为平行对照,37 $^\circ\text{C}$ 培养 48 h,计数每皿回复突变菌落数。

1.2.2 哺乳动物红细胞微核试验

微核试验参照 GB 15193.5—2014^[12] 和 OECD 化学品毒性测试准则 TG 474^[9] 开展。选用体质量为 25~27 g 的昆明小鼠 50 只,随机分为 5 组,每组 10 只,雌雄各 5 只。通过前期对同品系小鼠开展的经口急性毒性试验,获得雌性和雄性小鼠的半数致死量 (LD_{50}) 均为 1 098 mg/kg BW。以 1/2 LD_{50} 为最高剂量,设置雌性和雄性小鼠的经口给予剂量均为 549.0、275.0 和 137.0 mg/kg BW,两次灌胃间隔 24 h。称受试物 2.745 g 以蒸馏水溶解至 100 ml 作为高剂量组,中、低剂量组依次用蒸馏水 2 倍倍比稀释,灌胃量为 20 ml/kg BW。阴性对照组为蒸馏水,阳性对照组为 CPA。第二次给予受试物 6 h 后处死动物,取股骨做骨髓涂片,自然干燥后固定、染色。每只动物计数 200 个 RBC,同时计数嗜多染红细胞 (PCE),并计算 PCE 占 RBC 百分比。每只动物油镜下观察 2 000 个 PCE,记录出现微核的嗜多染红细胞 (MN) 数,计算 MN 占 PCE 的千分率。

1.2.3 体外哺乳类细胞染色体畸变试验

体外哺乳类细胞染色体畸变试验参照 GB 15193.23—2014^[13] 和 OECD 化学品毒性测试准则 TG 473^[10] 开展。预试验发现 2.5 mg/ml 受试物出现明显的细胞毒性,根据 OECD 指南,确定最高剂量为 2 mg/ml。在+S9 和-S9 的条件下,设置受试物剂量为 2、1 和 0.5 mg/ml。设置阴性对照组 (F-12K 培养液)、溶剂对照组 (DMSO 为阳性对照物的 MMC 溶剂) 和阳性对照组 (MMC 为-S9 阳性对照物,处理时间 6 和 24 h,处理终浓度为 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$; CPA 为+S9 阳性对照物,处理时间 6 h,处理终浓度为 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。将约 1×10^5 个/ml CHO 细胞接种于 6 孔细胞培养板中,在含 10% FBS 的 F-12K 培养液中培养 24 h (37 $^\circ\text{C}$, 5% CO_2)。称取 0.03 g 受试物溶于 15 ml F-12K 培养液,即获得 15 ml 含 2 mg/ml 受试物的培养液 (高剂量组),中、低剂量组依次用

F-12K 培养液 2 倍倍比稀释。吸去旧培养液加入新鲜配制的含有试验剂量受试物的培养液,培养 6 或 24 h 后更换新鲜的培养液。收获细胞前 4 h,加入细胞分裂中期阻断剂秋水仙素 (处理终浓度为 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。细胞培养结束后消化收集细胞,37 $^\circ\text{C}$ 低渗 30 min,甲醇-冰醋酸溶液 (3:1, V/V) 固定、滴片、10% 姬姆萨染色。每组选取 300 个分散良好的中期分裂相细胞,观察记录染色体畸变类型及畸变数目,计算畸变率。

1.3 统计学分析

Ames 试验和微核试验的数据以均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。Ames 试验采用 t 检验分析同期对照组与各剂量组间的差异,采用泊松分布对微核率进行统计处理,染色体畸变率采用 Fisher 精确检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Na-DHA 对 5 种菌株回复突变率的影响

如表 1 所示,在+S9 和-S9 条件下,1 667、556、185、62 和 21 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 剂量组 Na-DHA 对 TA97a、TA98、TA100、TA102、TA1535 的直接作用和代谢活化后的作用与自发回复突变组比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。然而,5 株试验菌株的阳性对照组中的回复突变菌落数均高于自发回复突变组,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.2 Na-DHA 对小鼠 RBC 微核形成的影响

受试物各剂量组 PCE/RBC 比值不少于阴性对照组的 20%,表明受试物在试验剂量下无细胞毒性。无论雄性还是雌性小鼠,阳性对照组的微核发生率均高于阴性对照组,差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 而受试物各剂量组的微核发生率与阴性对照组比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$),见表 2,因此,认为未发现 Na-DHA 对小鼠体细胞微核形成的诱导作用。

2.3 Na-DHA 对 CHO 细胞染色体畸变的影响

如表 3 所示,在+S9 或-S9 条件下处理 6 h 后,阴性对照组、溶剂对照组和受试物各剂量组的染色体畸变率均小于 5%。与阴性对照组比较,受试物各剂量组的染色体畸变率差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。阳性对照组的畸变率高于阴性对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。在-S9 条件下处理 24 h 后,除阳性对照组外,其余各组的染色体畸变率与阴性对照组比较,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$); 而阳性对照组的染色体畸变率高于阴性对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表1 Na-DHA对5种菌株回复突变数的影响($\bar{x}\pm s, n=3, \%$)
Table 1 Effect of Na-DHA on the recovery mutation number of 5 strains

组别	TA97a		TA98		TA100		TA102		TA1535		
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	
自发回复突变组	104.0±5.0	113.3±2.1	43.0±4.4	47.3±11.7	229.0±28.2	403.3±21.5	267.7±10.7	337.3±30.4	13.3±1.5	11.7±1.5	
溶剂对照组	99.7±13.6	110.7±9.5	47.7±3.8	52.0±8.9	241.3±27.2	404.0±16.5	276.0±23.4	341.0±36.5	11.0±2.0	12.0±2.6	
剂量组/ ($\mu\text{g}/\text{皿}$)	21	129.3±12.4	135.0±24.8	48.7±7.5	55.0±9.6	250.7±31.1	427.3±13.7	258.3±29.0	381.3±17.2	8.7±2.9	9.0±3.5
	62	117.7±18.1	119.7±9.1	55.7±11.0	39.0±1.0	234.7±23.1	435.0±8.5	235.0±25.6	321.0±15.4	10.7±2.9	7.0±2.6
	185	133.3±14.8	131.3±19.3	46.0±12.5	55.7±8.7	222.7±31.9	379.0±5.0	200.3±8.4	365.3±18.4	13.0±3.6	17.3±9.3
	556	120.7±12.5	129.7±24.9	51.7±8.4	40.7±10.1	222.0±7.2	417.7±43.5	233.0±26.5	296.3±26.0	9.0±5.2	16.3±10.1
	1667	129.0±42.8	137.0±38.7	58.0±1.0	60.0±13.1	209.0±19.0	397.7±34.9	180.7±6.8	236.7±62.1	8.0±4.4	7.0±1.0
阳性对照组	NaN ₃	—	—	—	—	—	—	—	1011.7±137.7*	—	
	2-AF	2056.7±227.4*	—	3417.3±484.8*	—	2820.0±316.6*	—	—	—	—	
	SDBS	3245.0±437.5*	—	2408.7±317.7*	—	—	—	—	—	—	
	MMS	—	—	—	—	3271.3±342.4*	—	6292.7±439.0*	—	—	
	DHAQ	—	—	—	—	—	—	671.0±41.1*	—	—	
	2-AA	—	—	—	—	—	—	—	—	471.3±45.2*	

注:—表示无此项数据;*为与自发回复突变组比较, $P<0.01$

表2 Na-DHA对小鼠RBC微核形成的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)
Table 2 Effect of Na-DHA on the formation of micronucleus of mouse erythrocyte

组别	性别	PCE			MN		
		RBC/个	PCE/个	PCE/RBC/%	PCE/个	MN/个	MN/PCE/‰
阴性对照组	雌	200	111.20±5.64	55.60±2.82	2000	4.60±1.34	2.30±0.67
	雄	200	110.20±5.54	55.10±2.77	2000	5.20±1.48	2.60±0.74
549.0 mg/kg BW 剂量组	雌	200	107.80±3.96	53.90±1.98	2000	4.80±0.84	2.40±0.42
	雄	200	106.20±2.58	53.10±1.29	2000	5.00±1.00	2.50±0.50
275.0 mg/kg BW 剂量组	雌	200	107.20±3.12	53.60±1.56	2000	4.80±0.84	2.40±0.42
	雄	200	106.80±2.28	53.40±1.14	2000	4.00±1.00	2.00±0.50
137.0 mg/kg BW 剂量组	雌	200	106.60±2.60	53.30±1.30	2000	4.00±1.00	2.00±0.50
	雄	200	104.80±2.78	52.40±1.39	2000	4.80±0.84	2.40±0.42
阳性对照组	雌	200	99.40±4.04	49.70±2.02	2000	62.00±4.30	31.00±2.15*
	雄	200	98.60±6.30	49.30±3.15	2000	58.00±6.52	29.00±3.26*

注:*为与阴性对照组比较, $P<0.01$;MN/PCE即微核发生率

表3 Na-DHA对CHO细胞染色体畸变的影响
Table 3 Effect of Na-DHA on CHO cell chromosome aberration

组别	S9	处理时间/h	RICC /%	断裂 /个	断片 /个	环/个	单体互换/个	双着丝粒/个	其他 /个	畸变总数/个	畸变率 /%	多倍体 /个	裂隙 /个
阴性对照组	-	6	100	1	2	0	0	0	0	3	1.00	2	4
	+	6	89	0	3	1	0	1	0	5	1.67	6	4
	-	24	89	4	7	0	0	0	0	11	3.67	6	6
溶剂对照组	-	6	79	0	6	0	0	1	0	7	2.33	1	3
	+	6	74	0	1	0	0	4	0	5	1.67	3	6
	-	24	74	1	6	1	0	2	0	10	3.33	6	5
0.5 mg/ml 剂量组	-	6	89	1	6	0	0	0	0	7	2.33	2	2
	+	6	116	0	0	0	0	0	0	0	0.00	2	1
	-	24	79	1	6	1	0	2	0	10	3.33	4	3
1 mg/ml 剂量组	-	6	132	0	5	0	0	1	0	6	2.00	2	4
	+	6	111	0	0	0	0	1	0	1	0.33	3	5
	-	24	89	3	8	0	0	0	0	11	3.67	5	9
2 mg/ml 剂量组	-	6	126	0	6	0	0	1	0	7	2.33	2	4
	+	6	100	1	1	0	0	1	0	3	1.00	8	5
	-	24	121	7	4	0	0	0	0	11	3.67	38*	1
阳性对照组	-	6	79	21	23	6	32	0	0	82	27.33*	3	12
	+	6	100	2	100	0	1	4	3	110	36.67*	5	5
	-	24	79	110	0	5	24	0	0	139	46.33*	1	27

注:*为与阴性对照组比较, $P<0.01$;RICC(relative increase in cell count)为细胞相对增加数,用以评估细胞毒性

3 讨论

虽然,目前在 GB 2760—2014《食品安全国家标准 食品添加剂使用标准》^[15]中规定,脱氢乙酸(dehydroacetic acid, DHA)及其钠盐(Na-DHA)可作为防腐剂用于黄油和浓缩黄油、腌渍的蔬菜、腌渍的食用菌及藻类等的保鲜。但近年来,与 Na-DHA 超使用范围、超量使用相关的食品安全事件的频发,引起公众对于其健康风险的广泛关注,因此,开展包括遗传毒性在内的 Na-DHA 的毒理学安全性评价,并为风险评估提供毒理学数据成为当务之急。

遗传毒性研究是食品安全毒理学评价中的重要部分,包含体内试验和体外试验的遗传毒性试验组合,通过试验能够识别受试物可能导致的 DNA 损伤、基因突变、染色体损伤等以及潜在的致癌作用。目前,Na-DHA 的遗传毒性研究十分有限,且相关试验方法与现行国际指南存在较大差距,试验结果的使用具有局限性。为了解决上述问题,本研究中采用 ICH 推荐的遗传毒性试验组合^[7],即 Ames 试验、哺乳动物红细胞微核试验和体外哺乳类细胞染色体畸变试验的遗传毒性研究组合,并依照 OECD 和 GB 15193 系列标准中确定的试验方法,对 Na-DHA 开展遗传毒性评价。

目前,Ames 试验已成为初步筛选化学物潜在致突变作用的首选方法,也是目前国际上检测潜在致癌物普遍采用的筛选方法。Ames 试验有不同的突变菌株,其检出能力不一,试验中需配套进行,其中 TA97a(或 TA97、TA1537)、TA98、TA100、TA1535 用于检测 GC 类型的突变,TA102(或 WP2 uvrA、WP2 uvrA pKM101)用于检测 AT 类型的突变,因此在 OECD 和 GB 15193 系列标准中均提出需涵盖以上 5 种类型菌株的 Ames 试验,才可以检测到几乎所有类型的突变。本研究开展的 Ames 试验选用国际指南推荐的鼠伤寒沙门菌组氨酸缺陷型 TA97a、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 五株菌株,发现 5 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在明显抑菌作用,故采用 1 667 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 为最高剂量,结果显示 Na-DHA 无致突变性。这与杜玉锋^[16]针对 DHA 开展的 Ames 试验,TA97、TA98、TA100、TA102 四株菌株在最高剂量为 0.005 mg/ml 的条件下未发现 DHA 具有致突变性的结果一致。ISHIDATE 等^[17]发现 5 mg/ml Na-DHA 对 TA92、TA1535、TA100、TA1537、TA94、TA98 六种菌株不具有致基因突变作用,也与本研究结果一致。

微核试验是在染色体分析方法基础上由 MATTER 和 SCHMID 于 20 世纪 70 年代初首创的检测遗传损伤的方法,主要检测化学或物理因素诱导产生的染色体分离异常与染色体完整性异常两种遗传学终点,微核率的高低可反映 DNA 损伤的程度,进一步反映致癌的可能性。以往研究中,HAYASHI 等^[18]单次腹腔注射给予小鼠 1 000、500、250、125 和 62.5 mg/kg BW Na-DHA,24 h 后取股骨骨髓涂片,每组观察 1 000 个 PCE,结果判定为阴性。本研究依据同品系小鼠 LD₅₀值 1 098 mg/kg BW,设置 1/2 LD₅₀值 549.0 mg/kg BW 为最高剂量,经口给予小鼠 549.0、275.0 和 137.0 mg/kg BW Na-DHA,各剂量组增加观察 PCE 至 2 000 个,微核率均与阴性对照组比较差异无统计学意义,未发现 Na-DHA 对小鼠体细胞微核形成的诱导作用,与前期研究结果基本一致。

体外染色体畸变试验是评价化合物潜在致癌作用和致畸作用的重要遗传毒性评价方法,该方法就细胞染色体具体结构和数目变化进行观察,在了解受试物对染色体的作用机制和特点方面具有不可替代的意义。ISHIDATE 等^[17]对 190 种合成食品添加剂和 52 种天然食品添加剂开展的中国仓鼠肺(Chinese hamster lung, CHL)细胞体外染色体畸变试验中,3 mg/ml Na-DHA 处理 CHL 细胞 48 h 后,分析 100 个中期分裂相,发现染色体结构畸变率增至 23%。但根据美国食品药品监督管理局红皮书 2000 中关于遗传毒性指导原则^[19],各剂量组至少应分析 200 个处于中期分裂相的细胞,OECD 指导原则^[10]更是要求至少分析 300 个处于中期分裂相的细胞,因为增加细胞分析数量有助于对数据进行科学的统计和判断,因此,本研究中体外染色体畸变试验采用 2、1、0.5 mg/ml Na-DHA 处理 CHO 细胞 6 和 24 h 后,各剂量组严格选取 300 个分散良好的中期分裂相细胞进行分析,未发现剂量组染色体畸变率与阴性对照组比较差异有统计学意义,且未呈现剂量相关性。针对体外多倍体的现象,ICH 遗传毒性指南^[7]中指出,多倍体是体外染色体畸变试验中的一种常见现象,仅出现多倍体数目的增加并不能提示受试物具有诱导非整倍体的潜力,而可能仅提示细胞周期紊乱或与细胞毒性的升高有关;如果在体外试验中仅见多倍体,而未见结构上的染色体断裂,确保具有合适暴露的体内微核试验的阴性结果,可提供不具有潜在非整倍体诱导作用的充分证据。本研究中体外染色

体畸变试验中仅 2 mg/ml 剂量组多倍体数高于阴性对照组,无其他染色体畸变差异,且微核试验结果也为阴性,据此判断 Na-DHA 细胞染色体结构畸变试验结果为阴性。

综上所述,本研究开展了 Ames 试验、哺乳动物红细胞微核试验和体外哺乳类细胞染色体畸变试验,未观察到 Na-DHA 的遗传毒性作用。但也应当看到,通过代谢试验发现 DHA 摄入后不会被迅速排出,且主要与血液中血清白蛋白和血清球蛋白相结合^[20],反复经口暴露发现 Na-DHA 可能通过抑制维生素 K₁ 环氧还原酶(VKOR)的活性,引起大鼠肝窦、肾小管等多脏器出血及凝血异常^[21-22],因此其低剂量长期暴露的风险需要进一步开展生殖发育毒性、慢性毒性等试验进行系统评价。

参考文献

- [1] 汪强,张月松,黄宇,等.食品中防腐剂的概述和应用前景[J].食品安全导刊,2018(1):90-92.
- [2] 朱新武,曾晓房,白卫东.食品防腐剂在月饼中的应用现状[J].中国食品添加剂,2014(8):158-164.
- [3] 王蓓,王蕾,高嵩.含乳食品中常用防腐剂、甜味剂同时检测方法的研究[J].中国奶牛,2015(2):48-50.
- [4] OHTSUKI T, SATO K, FURUSHO N, et al. Absolute quantification of dehydroacetic acid in processed foods using quantitative ¹H NMR [J]. Food Chem, 2013, 141(2): 1322-1327.
- [5] 刘峰,徐飞,袁秀娟,等.一起牛奶中脱氢乙酸钠中毒事件调查分析[J].中国食品卫生杂志,2019,31(5):490-493.
- [6] 张维蔚,刘于飞,梁伯衡,等.广州市米粉制品超范围使用脱氢乙酸情况调查及居民暴露水平分析[J].中国卫生检验杂志,2018,28(18):2293-2295.
- [7] ICH. Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use. [EB/OL]. (2011-11-09) [2020-01-02]. <http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html>.
- [8] OECD.Guidelines for the testing of chemicals. Bacterial reverse mutation test;471[S].1997.
- [9] OECD. Guidelines for the testing of chemicals. Mammalian erythrocyte micronucleus test;474[S]. 2016.
- [10] OECD.Guidelines for the testing of chemicals. *In vitro* mammalian chromosomal aberration test;473[S]. 2016.
- [11] 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,2014.
- [12] 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,2014.
- [13] 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 体外哺乳类细胞染色体畸变试验:GB 15193.23—2014[S].北京:中国标准出版社,2014.
- [14] 中华人民共和国卫生部.食品安全国家标准 食品添加剂 脱氢乙酸钠:GB 25547—2010[S].北京:中国标准出版社,2010.
- [15] 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 食品添加剂使用标准:GB 2760—2014[S].北京:中国标准出版社,2014.
- [16] 杜玉锋.脱氢乙酸的毒性及在鸡组织中消除规律的研究[D].扬州:扬州大学,2009.
- [17] ISHIDATE M, 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.
- [18] HAYASHI M, KISHI M, SOFUNI T, et al. Micronucleus tests in mice on 39 food additives and eight miscellaneous chemicals [J]. Food Chem Toxicol, 1988, 26(6): 487-500.
- [19] FDA. Toxicological principles for the safety assessment of food ingredients. Short-term tests for genetic toxicity[S]. 2007.
- [20] BARMAN T E, PARKE D V, WILLIAMS R T. The metabolism of dehydroacetic acid (DHA) [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1963, 5(5):545-568.
- [21] ZHANG Y M, YING D L, LIU H, et al. Serum pharmacokinetics and coagulation aberration induced by sodium dehydroacetate in male and female Wistar rats [J]. Sci Rep, 2017, 7:46210.
- [22] SAKAGUCHI Y, SUGA S, OSHIDA K, et al. Anticoagulant effect of sodium dehydroacetate (DHA-S) in rats [J]. J Appl Toxicol, 2008, 28(4): 524-529.