

鼠尾草酸的遗传毒性研究

马 征¹, 胡春生¹, 杨 智², 马晓宁³

1. 湖南省疾病预防控制中心, 湖南 长沙 410005

2. 湖南师范大学医学院, 湖南 长沙 410013

3. 湖南省食品药品检验研究院, 湖南 长沙 410001

摘要: 目的 研究鼠尾草酸 (carnosic acid, CA) 的遗传毒性。方法 选用鼠伤寒沙门杆菌回复突变 (Ames 试验)、体内哺乳动物红细胞微核、精子畸形以及单细胞凝胶电泳 (彗星试验) 四项致突变生物学试验进行筛选评价。结果 在 6.25~50 $\mu\text{g/mL}$ 的剂量水平, CA 对鼠伤寒沙门菌株 TA97、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 均无诱变性; 此外, 在受试剂量下小鼠骨髓嗜多染红细胞微核、小鼠精子畸形以及体内彗星试验的结果均为阴性 (与溶剂对照比较, $P>0.05$)。结论 在本实验条件下, CA 未见明显遗传毒性。

关键词: 鼠尾草酸; 遗传毒性; Ames 试验; 微核试验; 精子畸形试验; 彗星试验

中图分类号: R994.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674 - 6376 (2015) 06 - 0640 - 07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2015.06.012

Study on genotoxicity of carnosic acid

MA Zheng¹, HU Chun-sheng¹, YANG Zhi², MA Xiao-ning³

1. Hunan Provincial Center for Disease Control and Prevention, Changsha 410005, China

2. The Medical College of Hunan Normal University, Changsha 410013, China

3. Hunan Institute for Food and Drug control, Changsha 410001, China

Abstract: Objective To study the genotoxicity of carnosic acid (CA). **Methods** *Salmonella Typhimurium* reverse mutation assay (Ames test), *in vivo* mammalian erythrocyte micronucleus assay, sperm malformation assay, and single cell gel electrophoresis (Comet assay) were conducted to evaluate the genotoxicity. **Results** Under the concentration of 6.25—50 $\mu\text{g/mL}$, CA showed no mutagenic potency to the strains of TA97, TA98, TA100, TA102, and TA1535. Meanwhile in the test dose range, the genotoxicity indicated by mice bone marrow micronucleus assay, mice sperm malformation assay, and *in vivo* comet assay were negative (compared with solvent control, $P>0.05$). **Conclusion** CA has no obvious genotoxicity under the test condition.

Key words: carnosic acid; genotoxicity; Ames test; micronucleus assay; sperm malformation assay; comet assay

鼠尾草酸 (Carnosic acid, CA) 是一种存在于迷迭香叶中的多酚类双萜化合物, 为黄色粉末, 分子式为 $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}_4$, 相对分子质量 332.43, CAS NO 3650-09-7, 常用作油脂类成分抗氧化添加剂^[1-2]。在化学物毒性分级中 CA 属低毒物, 但由于其高效抗氧化性, 添加量很少, 在实际应用中对人体相对安全^[3]。根据 2002 年中国居民营养与健康状况调查结果, 城乡居民平均每天摄入烹饪油 42 g, 如果按迷迭香抗氧化剂在油脂中常用添加量 0.04% 计算^[4], 折合 CA 的平均摄入量为 16.8 mg, 成人体质量按

60 kg 计算, 每人每天平均摄入量为 0.28 mg/kg, 远远低于其半数致死量 3 160 mg/kg^[5]。目前, CA 已作为食品添加剂得到广泛应用, 更有研究表明^[6-9], CA 具有抑菌、抗癌、抗肥胖和保护大脑神经免受自由基氧化损伤等优良药理效应, 可作为先导化合物或辅助药物研究开发。但随着摄入剂量的增加或作为人用药物开发, 安全性的客观数据评价以及有效药理作用剂量尤为重要。之前本课题组对其急性经口毒性进行了初步探讨, 为进一步了解其安全性, 笔者设计了体内、外试验, 研究 CA 对原核和真核

收稿日期: 2015-07-01

基金项目: 湖南中医药科研计划项目 (2013106)

作者简介: 马 征 (1978—), 男, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为天然药物毒理学及功能学评价。

Tel: 13975806770 E-mail: 1846685@qq.com

细胞、生殖和体细胞的遗传毒性，为合理科学的临床利用提供可靠数据。

1 材料与方法

1.1 试药

鼠尾草酸，质量分数 HPLC>98%，中山百灵生物技术有限公司，批号 20120704；体外代谢活化系统 S9，来源于 Aroclor1254 诱导的雄性 SD 大鼠肝组织，上海宝录生物科技有限公司，批号 3239；小牛血清，100 mL/瓶，浙江天杭生物科技有限公司，批号 131007；注射用环磷酰胺 (Cyclophosphamide, CP)，0.2 g/瓶，江苏恒瑞医药股份有限公司，批号 12020525；叠氮钠，上海化学试剂采购供应站；2-氨基苄，瑞士 Fluka Chemie 公司；丝裂霉素 C，日本 Kyowa Hakko Kogyo 公司；1,8-二羟蒽醌，德国 Merck-Schuchardt 公司；9-苄蒽，美国 Aldrich Chemie 公司；溴乙啶，美国 Sigma-Aldrich 公司；实验用水为超纯水，其他试剂均为分析纯。

1.2 实验动物和菌株

SPF 级昆明种小鼠，由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供，生产许可证号为 SCXK(湘)2009-0004，动物质量合格证号为 43004700004667。喂饲于温度 (20±2) °C，相对湿度 (55±5) %，12 h 昼/夜更替人工照明环境中，使用许可证号为 SYXK(湘)2012-0005；TA97、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 标准测试菌株由中国疾控中心营养与食品安全所提供。

1.3 主要仪器

AJ100 电子天平，瑞士 Mettler-toledo；TP1200 电子天平，湖南湘仪天平；SX-500 全自动高压灭菌器，日本 Tomy；可调式微量移液器，德国 Eppendorf；311 CO₂ 培养箱，美国 Thermo；BBS-SSC 超净工作台，济南博鑫；菌落计数仪，西班牙 IUL；BX51T 系统荧光显微镜，日本 Olympus；T25 高速匀浆机，德国 IKA；5430R 台式高速冷冻离心机，德国 Eppendorf；电泳仪，美国 Bio-Rad；凝胶电泳成像分析系统，美国 Alpha Innotech 等。

1.4 方法^[10]

1.4.1 鼠伤寒沙门杆菌回复突变试验 (Ames 试验) 采用经鉴定符合要求的鼠伤寒沙门杆菌组氨酸缺陷型 TA97、TA98、TA100、TA102 和 TA1535 菌株，按平板掺入法，在加或不加体外代谢活化系统 (S9 混合物) 的条件下进行试验。根据预实验结果，试

验设 100、50、25、12.5、6.25 μg/mL 5 个 CA 剂量组，同时设自发回变、溶剂对照 (二甲基亚砜) 和阳性突变剂对照。用二甲基亚砜溶解 CA 配制成相应浓度，经 0.103 MPa，20 min 灭菌后备用。试验时，在顶层琼脂中加入 0.1 mL 试验菌株增菌液、0.1 mL 受试物溶液和 0.5 mL 磷酸缓冲液/10%的 S9 混合物 (当需要代谢活化时)，混匀后倒入底层培养基平板上，37 °C 培养 48 h，计数每皿菌落数。每个剂量设 3 个平行皿。整套试验在相同试验条件下，阴性结果至少重复 1 次，阳性结果至少重复 2 次。结果评价时，受试物组的回变菌落数如果增加 1 倍以上，并有剂量反应关系或至少某一剂量有可重复的并有统计学意义的可确认为阳性结果。

1.4.2 小鼠微核试验 取体质量 25~30 g 的小鼠进行试验。试验设溶剂对照组 (食用植物油)、阳性对照组 (50 mg/kg 剂量的 CP) 和 3 个 CA 剂量组，每组 10 只动物，雌雄各半。CA 剂量设计为雄性 291、583、1 165 mg/kg，雌性为 461、923、1 845 mg/kg (参考本室小鼠急性经口毒性结果：雄性 2 330 mg/kg，雌性 3 690 mg/kg，高、中、低剂量分别为受试物的 1/2、1/4、1/8 LD₅₀)，配成相应的受试液给小鼠灌胃 (给药体积为 20 mL/kg)。连续染毒 3 d，于末次染毒 6 h 后颈椎脱臼处死动物，取胸骨骨髓用小牛血清稀释涂片，空气干燥后甲醇固定，Giemsa 染色。盲法制、阅片，光学显微镜下每只动物至少计数 2 000 个嗜多染红细胞 (Polychromatic erythrocyte, PCE)，微核发生率以含微核的 PCE 千分率计算。同时计数 200 个红细胞以确定 PCE 和总红细胞 [PCE 和正染红细胞 (Normochromatic erythrocyte, NCE) 之和] 的比例作为细胞毒性指标。结果评价时，剂量组与溶剂对照组比较，微核率有剂量反应关系并有统计学意义即可确认为阳性结果；若有统计学意义但无剂量反应关系须重复试验，结果能重复者确认为阳性。

1.4.3 小鼠精子畸形试验 取体质量 25~35 g 的雄性小鼠，随机分为 5 组，每组 5 只进行试验。组别剂量设计和结果评价参照小鼠微核试验。小鼠连续染毒 5 d，每日 1 次，于首次染毒后的第 35 天处死动物，取两侧副睾于生理盐水中剪开静置，4 层擦镜纸滤过后涂片，空气干燥后甲醇固定，2%伊红染色。盲法制、阅片，光学显微镜下每只动物计数 1 000 个结构完整的精子，观察畸变精子的类型和数量，计算精子畸变发生率。

1.4.4 单细胞凝胶电泳试验 (彗星试验) 采用体内彗星试验。微核试验中动物胸骨取材后, 剪取左侧肝组织 0.5 g 用冰冷生理盐水漂洗, 组织匀浆后用适量磷酸盐缓冲液 (PBS, 临用前加 10% 的二甲基亚砷) 制成混悬液, 200 目滤网过滤, 4 °C、1 000 r/min 离心 6 min, 弃上清, 再加适量 PBS, 同样条件下离心弃上清, 最后加入 PBS 制成单细胞悬液, 显微镜下调整细胞浓度至 $10^5/\text{mL}$, 放入冰盒内备用。将 0.75% 正常熔点琼脂糖 100 μL 铺于磨砂载玻片上, 加盖玻片于 4 °C 冷却固化后去掉盖玻片, 再取 10 μL 细胞悬液与 90 μL 0.75% 低熔点琼脂糖混合, 滴加到第一层凝胶上, 加盖玻片冷却固化。将载玻片移去盖玻片缓慢放入裂解液中, 4 °C 放置 1.5 h。经中和处理后将载玻片放入电泳槽中, 加电泳液覆盖, 4 °C 放置 25 min。接通电源 20 V, 电流 300 mA, 4 °C 电泳 25 min。经中和处理后, 每块载玻片滴加 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溴乙啶 20 μL 荧光染色 20 min, 避光条件下用 Alpha View 凝胶图像分析软件随机计数 100 个细胞, 记录拖尾细胞数计算拖尾阳性率,

并测量尾部 DNA 百分含量 (Tail DNA)。结果评价时, 与阴性对照组比较, 剂量组的拖尾阳性率或 Tail DNA 含量有剂量反应关系并有统计学意义即可确认为阳性结果。

1.5 统计学处理

对于计量资料, 各组数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS 18.0 软件对数据进行 *t* 检验统计分析; 对各种率进行 χ^2 检验。以 $\alpha=0.05$ 作为检验水准。

2 结果

2.1 Ames 试验

在本试验条件下 CA 的最低抑菌浓度 (MIC) 为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。正式试验中, 自发回变组各菌株的回变菌落数均在正常范围内。而与其比较, 阳性对照组则显著增加 ($P<0.01$), 并超过相应菌株自发回变数的 2 倍, 表明试验系统可靠。在 6.25~50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 剂量水平, CA 对 TA97、TA98、TA100、TA102 以及 TA1535 试验菌株, 加或不加 S9, 平行条件下试验 2 次, 回变菌落数均未超过自发回变菌落数的 2 倍, 亦无剂量反应关系。见表 1、2。

表 1 第一次 Ames 试验结果 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 1 Results of 1st Ames test ($\bar{x} \pm s, n=3$)

受试物	剂量 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	S9	菌落数/个				
			TA97	TA98	TA100	TA102	TA1535
CA	100	-	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
	50	-	123.3 \pm 5.0	35.3 \pm 4.0	143.0 \pm 10.1	266.7 \pm 16.8	14.7 \pm 3.5
	25	-	121.7 \pm 15.0	33.7 \pm 7.5	138.0 \pm 10.8	269.7 \pm 17.2	14.0 \pm 7.9
	12.5	-	119.0 \pm 18.5	38.3 \pm 4.5	141.7 \pm 13.1	270.3 \pm 9.5	13.7 \pm 4.9
	6.25	-	120.7 \pm 11.8	32.3 \pm 7.2	140.3 \pm 13.9	272.0 \pm 13.0	20.3 \pm 4.2
自发回变		-	118.0 \pm 17.6	37.0 \pm 3.0	139.7 \pm 17.2	266.0 \pm 15.1	14.3 \pm 2.5
溶剂对照 ^a		-	123.7 \pm 15.0	30.7 \pm 4.0	137.0 \pm 17.5	258.0 \pm 13.1	15.0 \pm 5.0
阳性对照 ^b		-	1193.7 \pm 86.2**	2210.3 \pm 98.3**	1438.0 \pm 119.0**	1167.3 \pm 151.5**	471.3 \pm 65.5**
CA	100	+	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
	50	+	120.7 \pm 13.7	38.7 \pm 5.5	135.3 \pm 11.5	263.7 \pm 11.6	13.3 \pm 7.5
	25	+	117.0 \pm 14.5	37.7 \pm 4.2	132.3 \pm 17.2	273.3 \pm 12.0	15.3 \pm 4.5
	12.5	+	124.0 \pm 14.0	35.7 \pm 6.7	135.0 \pm 15.5	264.3 \pm 14.8	17.0 \pm 10.5
	6.25	+	121.0 \pm 17.0	34.7 \pm 0.6	134.7 \pm 17.5	267.0 \pm 12.3	13.0 \pm 2.6
自发回变		+	125.3 \pm 13.4	39.3 \pm 5.1	138.3 \pm 12.9	259.7 \pm 11.7	17.7 \pm 3.1
溶剂对照 ^a		+	119.7 \pm 10.5	34.0 \pm 7.9	128.0 \pm 13.1	261.3 \pm 14.0	16.7 \pm 7.0
阳性对照 ^c		+	1224.7 \pm 112.4**	2540.0 \pm 142.8**	2262.0 \pm 121.5**	951.0 \pm 140.9**	208.7 \pm 71.4**

与自发回变比较: ** $P<0.01$ 。^a溶剂对照为 DMSO。^b阳性突变剂: TA97、TA98 采用 9-芴酮 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), TA100、TA1535 采用叠氮钠 (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$), TA102 采用丝裂霉素 C (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。^c阳性突变剂: TA97、TA98、TA100 和 TA1535 采用 2-氨基芴 (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), TA102 采用 1,8-二羟基蒽醌 (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

** $P < 0.01$ vs spontaneity group. ^a Solvent control was DMSO. ^b Positive controls were 9-fluorenone (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for TA97 and TA98, sodium azide (15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for TA100 and TA1535, mitomycin C (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for TA102. ^c Positive controls were 2-aminofluorene (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for TA97, TA98, TA100, and TA1535, meanwhile 1,8-dihydroxyanthraquinone (500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for TA102

表2 第二次 Ames 试验结果 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)
Table 2 Results of 2nd Ames test ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

受试物	剂量/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	S9	菌落数/个				
			TA97	TA98	TA100	TA102	TA1535
CA	100	-	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	50	-	128.0±11.1	38.3±3.8	140.7±14.6	267.0±19.2	17.7±3.1
	25	-	126.7±14.8	41.7±4.2	139.3±12.1	263.7±16.9	15.0±2.0
	12.5	-	129.3±9.0	37.7±10.1	141.7±17.2	273.3±20.5	17.3±5.0
	6.25	-	127.7±13.1	35.7±2.5	143.7±8.3	274.0±18.0	18.3±3.1
自发回变		-	129.7±10.0	37.0±3.6	144.7±12.1	270.7±12.7	21.0±6.6
溶剂对照		-	123.3±13.0	31.3±3.2	136.7±19.3	265.7±20.4	16.0±7.2
阳性对照 ^a		-	1265.0±130.4**	2187.0±110.5**	1535.0±109.3**	1127.0±137.2**	505.7±67.0**
CA	100	+	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0	0.0±0.0
	50	+	128.3±8.0	35.3±6.5	133.7±9.5	270.0±14.8	14.3±6.0
	25	+	124.7±12.3	39.3±8.6	140.3±17.1	269.0±18.4	17.0±5.6
	12.5	+	132.7±16.5	33.3±6.8	136.0±11.1	269.7±14.6	13.3±4.2
	6.25	+	123.0±9.5	37.3±7.6	140.0±10.4	277.7±27.5	19.3±3.8
自发回变		+	130.0±13.5	29.7±4.9	136.7±15.0	264.3±17.6	17.0±8.7
溶剂对照		+	127.3±12.9	33.0±4.4	132.7±14.2	260.0±15.9	15.3±5.0
阳性对照 ^b		+	1277.3±82.2**	2640.7±93.6**	2310.0±129.9**	1048.7±136.8**	179.3±44.2**

表注同表1

The same as Table 1

2.2 小鼠微核试验

由表3可见,各剂量组的PCE/RBC比值均在正常范围内,且不少于对照组的20%,表明受试物浓度设置合理,PCE的形成没有受到抑制。与溶剂对照组比较,CA各剂量组的微核率差异均无统计学意义;而阳性对照组微核率则显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.3 小鼠精子畸形试验

由表4可见,与溶剂对照组比较,CA各剂量

组的精子畸形发生率差异均无统计学意义;而阳性对照组精子畸形发生率则显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。

2.4 彗星试验

由表5可见,与溶剂对照组比较,CA各剂量组的彗星拖尾率和Tail DNA含量无区别,差异无统计学意义;而阳性对照组二指标显著升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

表3 CA对小鼠嗜多染红细胞微核率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 3 Effects of CA on polychromatic erythrocyte micronucleus assay in mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

性别	组别	剂量/($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)	PCE数/个	含微核数/个	微核率/%	RBC数/个	PCE数/个	PCE/RBC
雄性	溶剂对照	0	10 000	20	0.20±0.07	1 000	707	0.707±0.069
	CP	50	10 000	358	3.58±0.69**	1 000	621	0.621±0.099
	CA	291	10 000	14	0.14±0.11	1 000	728	0.728±0.039
		583	10 000	18	0.18±0.11	1 000	713	0.713±0.048
		1 165	10 000	22	0.22±0.08	1 000	686	0.686±0.068
雌性	溶剂对照	0	10 000	24	0.24±0.09	1 000	719	0.719±0.065
	CP	50	10 000	306	3.06±0.67**	1 000	675	0.675±0.060
	CA	461	10 000	18	0.18±0.08	1 000	695	0.695±0.068
		923	10 000	16	0.16±0.09	1 000	745	0.745±0.064
		1 845	10 000	26	0.26±0.06	1 000	735	0.735±0.066

与溶剂对照组比较: ** $P < 0.01$

** $P < 0.01$ vs solvent control group

表4 CA对小鼠精子畸形发生率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 4 Effects of CA on sperm malformation assay in mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	精子数/个	畸形数/个	畸形发生率/%	各类型精子畸形的构成比/%						
					无钩	香蕉形	胖头	无定形	尾折叠	双头	双尾
溶剂对照	0	5 000	106	2.12±0.22	19.8	17.9	18.9	43.4	0.0	0.0	0.0
CP	50	5 000	439	8.78±0.93**	26.0	18.9	18.9	33.7	0.9	0.5	1.1
CA	291	5 000	120	2.40±0.40	23.3	20.8	17.5	38.4	0.0	0.0	0.0
	583	5 000	97	1.94±0.15	20.6	17.5	16.5	45.4	0.0	0.0	0.0
	1 165	5 000	114	2.28±0.60	24.6	18.4	14.9	42.1	0.0	0.0	0.0

与溶剂对照组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs solvent control group表5 小鼠肝细胞彗星试验的结果 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)Table 5 Results of comet assay in hepatic cells of mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

性别	组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	观察细胞数/个	拖尾细胞数/个	拖尾率/%	Tail DNA/%
雄性	溶剂对照	0	500	24	4.80±1.64	12.05±3.72
	CP	50	500	301	60.20±10.85**	45.56±7.52**
	CA	291	500	22	4.40±2.30	10.22±2.44
		583	500	30	6.00±2.92	13.28±2.85
		1 165	500	26	5.20±1.92	11.05±3.11
雌性	溶剂对照	0	500	33	6.60±1.67	9.26±1.86
	CP	50	500	269	53.80±6.98**	48.72±6.61**
	CA	461	500	27	5.40±2.07	12.37±3.43
		923	500	26	5.20±1.48	11.11±3.51
		1 845	500	31	6.20±1.79	10.70±3.15

与溶剂对照组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs solvent control group

3 讨论

遗传毒性筛选试验的意义在于评价受试物的致突变性。天然药物的遗传毒性是一个经常被忽视的领域,一方面是人们认为大部分天然药物性温不足以致突变,另一方面是天然药物成分复杂,用传统的遗传毒性试验方法难以有效研究。所以对此类药物遗传毒性进行综合评价时,应尽量选取一组既包括体内和体外,又能覆盖不同遗传学终点并相互补充的试验方法进行分析^[11-12]。因此,本课题组参考国际协调会议(ICH)和经济合作发展组织(OECD)颁布的系列遗传毒性相关指导原则,结合本实验室条件选择鼠伤寒沙门杆菌回复突变、小鼠骨髓嗜多染红细胞微核、小鼠精子畸形和单细胞凝胶电泳四项致突变生物学试验,分别从基因突变、DNA损伤、染色体改变3个不同遗传学终点对CA进行筛选和预测。结果显示,在检测剂量范围内4项遗传毒性试验结果均为阴性。

TA97、TA98和TA100可检测移码突变,TA1535和TA102可检测碱基对置换,分别从不同角度判定

化学毒物致基因的突变性^[11]。对于具有抗菌作用的受试物,Ames试验中最高剂量可为MIC。所以,在试验正式开始前通过预试验来确定最高剂量。结果提示,在本实验条件下CA对5株鼠伤寒沙门杆菌的MIC为100 μg/mL。Moreno S等^[13]通过纸片扩散法探讨迷迭香提取物的抗菌活性,作为比对的CA对各试验菌株MIC范围:革兰阳性菌为2~15 μg/mL、革兰阴性菌为3~30 μg/mL、酵母菌均为2 μg/mL。Horiuchi K等^[14]通过稀释法研究迷迭香提取物鼠尾草酚增强氨基糖苷类抗生素的抗菌活性,其中CA对各试验菌株MIC范围:粪肠球菌为32~64 μg/mL、金黄色葡萄球菌为32 μg/mL、黏质沙雷菌和铜绿假单胞菌为>128 μg/mL。此外,袁干军等^[15]采用微量肉汤稀释法研究CA(98.6%)对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA,革兰阳性菌)的抗菌作用,结果显示其对各MRSA菌株的MIC范围为8~16 μg/mL。考虑鼠伤寒沙门杆菌为革兰阴性菌,此前研究并未针对性地进行过试验,且不同的培养方法和试验条件会造成数据上的一定出入。另

外,某些化学物质本身无毒或毒性较低,但在体内经生物转化后形成的代谢产物毒性增大甚至产生“三致”作用,所以在试验中加入S9作为致癌物质的代谢活化系统是必要的。本项试验过程中严格控制了杂菌干扰,所得数据均在本室正常范围内,结果真实可靠。

小鼠骨髓细胞微核试验是进行体内遗传毒性试验的首选方法,用来检测化学毒物对染色体的损伤作用^[11]。化学毒物在靶器官内蓄积到一定浓度才具有致突变作用,且不同毒物诱发微核出现的高峰时间是不同的,一般在24~72 h^[16]。连续染毒3 d及以上骨髓微核水平在最后1次给药后0~24 h内保持稳定,因此采用连续染毒3 d,尽量覆盖了高峰。同时为遵循“3R (replacement, reduction, refinement)”原则,体内彗星试验整合体内微核试验,采用重复给药,于末次染毒6 h后一次性采样,解决采样时间上的矛盾^[17]。在选用微核试验检测染色体断裂剂时,为了避免假阴性的出现,剂量设计非常重要。如果受试物剂量设计过高,抑制了骨髓细胞增殖,结果往往不可信。而判断骨髓细胞是否受到抑制的常用指标是观察骨髓细胞中PCE/RBC的比值(或PCE/NCE,二者生物学意义相同)。当增殖受到抑制,外周血大量进入骨髓,就会使比值下降,当比值少于正常对照组的20%时,提示骨髓细胞增殖已经受到抑制^[16]。在本研究以1/2 LD₅₀为高剂量,向下等比设置,各组小鼠胸骨骨髓细胞PCE/RBC的值均在本室正常范围内且不少于正常对照组的20%,说明剂量设计合理,结果可信。而彗星试验是近年来发展起来的一种鉴定化学物致突变性的方法,能灵敏地检测低水平的DNA损伤,广泛应用于遗传毒理学、环境生物监测、药物筛选等多个领域^[17]。由于这两种方法的采样可取自同一个动物,因此已有学者推荐两种方法组合进行体内遗传毒性试验,这样更具有可比性和互补性^[18]。在之前探讨急性经口毒性及其机制研究中,笔者发现肝脏为CA毒作用靶器官之一^[5]。值得注意的是,有一小部分化学毒物可在肝脏遗传毒性检测呈阳性,而在骨髓检测呈阴性,可能与代谢产物不能有效进入骨髓有关^[11]。因此选择肝脏作为取样组织进行体内彗星试验更具代表性。Tail DNA含量是彗星试验结果评价和解释最常用的指标,实验室内或空间重复性均较好,易于标准化,特别是采用计算机软件分析^[17]。此外,不同阶段的生殖细胞对外源性

化学物敏感性也不尽相同,精原细胞后期和初级精母细胞早期对化学诱变最为敏感。小鼠生精周期为35 d左右,在化学物首次染毒后对各级生精细胞的致突变作用可导致精子数量、质量的改变,4~5周后一次性检查所获得的精子畸形率较高^[16]。以上3项遗传毒性试验中阳性对照均采用CP,它是遗传毒性试验中常用的阳性对照品之一,本实验选择50 mg/kg的剂量进行经口染毒,是根据本室的经验值,保证染毒途径上与受试物的日常接触途径一致,又尽量使动物在试验期间不出现死亡而保证阳性模型成功。综上所述,在本实验条件下CA未见明显遗传毒性,值得进一步开发研究。

参考文献

- [1] Zhang Y, Chen X Q, Yang L, *et al.* Protective effects of high pure Carnosic Acid against lipid oxidation of sunflower oil [J]. *Nat Prod Res Dev*, 2010, 22: 107-112, 175.
- [2] 杨磊,刘芳,王化,等.鼠尾草酸的抗氧化活性及对鱼油的氧化稳定性[J].中国食品学报,2010,10(3):33-39.
- [3] Wang Q L, Li H, Li X X, *et al.* Acute and 30-day oral toxicity studies of administered carnosic acid [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012(50): 4348-4355.
- [4] 张佰帅,王宝维.天然抗氧化剂在油脂中的应用研究进展[J].肉类工业,2010,(10):54-56.
- [5] 马征,黄凰,肖佩,等.鼠尾草酸对大鼠的急性经口毒性及其机制[J].沈阳药科大学学报,2013,30(4):287-291,302.
- [6] Ojeda-Sana A M, Repetto V, Moreno S. Carnosic acid is an efflux pumps modulator by dissipation of the membrane potential in *Enterococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus* [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2013, 29(1): 137-144.
- [7] Manoharan S, Vasanthaselvan M, Slivan S, *et al.* Carnosic acid: a potent chemopreventive agent against oral carcinogenesis [J]. *Chem Biol Interact*, 2010, 188(3): 616-622.
- [8] Romo Vaquero M, Yáñez-Gascón M J, García Villalba R, *et al.* Inhibition of gastric lipase as a mechanism for body weight and plasma lipids reduction in Zucker rats fed a rosemary extract rich in carnosic acid [J]. *PLoS One*, 2012, 7(6): e39773.
- [9] Yoshida H, Mimura J, Imaizumi T, *et al.* Edaravone and carnosic acid synergistically enhance the expression of nerve growth factor in human astrocytes under hypoxia/reoxygenation [J]. *Neurosci Res*, 2011, 69(4):

- 291-298.
- [10] OECD. Guidelines for the testing of chemicals, section 4: Health effects [EB/OL]. http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788,2013-05-07.
- [11] ICH. Harmonised tripartite guideline S2 (R1): Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use [EB/OL]. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S2_R1/Step4/S2R1_Step4.pdf,2011-11-09.
- [12] 王根辈, 曹晶, 马晓慧, 等. 美国FDA对植物药制剂临床前毒理研究的要求 [J]. 中草药, 2013, 44(1): 116-119.
- [13] Moreno S, Scheyer T, Romano C S, *et al*. Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition [J]. *Free Radic Res*, 2006, 40(2): 223-231.
- [14] Horiuchi K, Shiota S, Kuroda T, *et al*. Potentiation of antimicrobial activity of aminoglycosides by carnosol from *Salvia officinalis* [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(2): 287-290.
- [15] 袁干军, 李沛波, 杨慧. 迷迭香中鼠尾草酸的抗MRSA活性研究 [J]. 中国现代应用药学, 2012, 29(7): 571-574.
- [16] 周宗灿. 毒理学教程 [M]. 第三版. 北京: 北京医科大学出版社, 2006.
- [17] 张建军, 姜凌, 柴振海. 体内彗星试验在药物遗传毒性评价中的研究方法 [J]. 药物评价研究, 2014, 37(3): 272-275.
- [18] 王欣, 王晨, 宋捷, 等. 体内彗星实验联合微核实验检测化合物的遗传毒性 [J]. 中国药房, 2014, 25(33): 3107-3109.