

两种齐墩果酸纳米粒的体外细胞摄取研究

鲍旭^{1*},高萌¹,徐红²,郭佳毅³,赵丹凤³,李德壮³,褚秋辰¹,田燕^{1#}(1.大连医科大学药学院,辽宁大连116044;2.大连医科大学技能实验室,辽宁大连116044;3.大连医科大学七年制2010级,辽宁大连116044)

中图分类号 R284.62;R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)09-0800-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.09.11

摘要 目的:研究人肝癌细胞株HepG2对同时包载齐墩果酸(OA)和香豆素6的乳酸羟基乙酸共聚物纳米粒(OCPN)和乳酸羟基乙酸共聚物-水溶性维生素E纳米粒(OCPTN)的体外摄取情况。方法:以超声乳化-溶剂挥发法制备OCPTN和OCPN,其中香豆素6为荧光标记物;采用高效液相色谱法测定两种纳米粒中香豆素6的载药量,体外测定HepG2细胞对分别含100、200、400 μg/ml(低、中、高质量浓度)香豆素6的OCPTN、OCPN混悬液的摄取率,显微镜观察HepG2细胞对OCPTN的摄取情况。结果:OCPTN和OPTN中香豆素6的载药量分别为7.6%、6.3%;低、中、高质量浓度OCPTN的细胞摄取率为(62.1±1.2)%、(53.6±1.3)%、(40.9±1.5)%,分别是相同质量浓度OCPN的细胞摄取率[(36.8±1.5)%、(31.2±1.9)%、(22.4±1.3)%]的1.69、1.72、1.83倍;镜下观察OCPTN被HepG2细胞摄取,处于细胞核周围。结论:OCPN和OCPTN均能被HepG2细胞摄取,且OCPTN的被摄取性更强。
关键词 齐墩果酸;香豆素6;纳米粒;摄取率;HepG2细胞

Study on the Absorption of 2 Kinds of Oleanolic Acid Nanoparticles *in vitro*

BAO Xu¹, GAO Meng¹, XU Hong², GUO Jia-yi³, ZHAO Dan-feng³, LI De-zhuang³, CHU Qiu-chen¹, TIAN Yan¹(1. College of Pharmacy, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China; 2. Skill Laboratory, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China; 3. Seven-year Grade 2010, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the absorption of Oleanolic acid (OA) and Coumarin-6-loaded polylactic-co-glycolic acid nanoparticles (OCPN) and Polylactic-co-glycolic acid-watermiscible vitamin E nanoparticles (OCPTN) by human hepatic cell line (HepG2). METHODS: OCPTN and OCPN were prepared by ultrasonication emulsion-solvent evaporation technique using coumarin-6 as fluorescent marker. The amounts of coumarin-6 in OCPTN and OPTN were determined by HPLC. The absorption rates of 100, 200 and 400 μg/ml coumarin-6 (low, medium and high concentrations) in OCPTN and OCPN suspension by HepG2 were determined *in vitro*. The absorption rate of OCPTN was observed by microscope. RESULTS: The amounts of coumarin-6 in OCPTN and OCPN were 7.6% and 6.3%. The uptake rate of low, medium and high concentrations of OCPTN were (62.1±1.2)%, (53.6±1.3)% and (40.9±1.5)%, respectively, which were 1.69, 1.72, and 1.83 folds to those of OCPN at corresponding concentrations [(36.8±1.5)%, (31.2±1.9)% and (22.4±1.3)%]. FIM images showed that OCPTN was absorbed by HepG2 and closely located around the nuclei. CONCLUSIONS: OCPN and OCPTN can be absorbed by HepG2, and especially for OCPTN.

KEYWORDS Oleanolic acid; Coumarin-6; Nanoparticles; Absorption rate; HepG2 cells

- mal growth factor receptor is a common mediator of quinine-induced signaling leading to phosphorylation of connexin-43: role of glutathione and tyrosine phosphatases[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(40):360.
- [5] 周守兵,蒋华,李文娟,等.培美曲塞时辰给药治疗肺腺癌裸鼠移植瘤的疗效[J].实用医学杂志,2012,28(14):2330.
- [6] Bjamason GA, Jordan R. Rhythms in human gastrointestinal mucosa and skin[J]. *Chronobiol Int*, 2002, 19(1):129.
- [7] Smaaland R, Sothem RB, Laerum OD, et al. Rhythms in human bone marrow and blood cells[J]. *Chronobiol Int*, 2002, 19(1):101.
- [8] 钟皎,赵文艳,吴福林.吉西他滨治疗非小细胞肺癌的时辰药理学研究[J].中国药房,2010,21(2):145.
- [9] Abolmaali K, Balakrishnan A, Stearns AT, et al. Circadian variation in intestinal dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) expression: a potential mechanism for benefits of 5-FU chronochemotherapy[J]. *Surgery*, 2009, 146(2):269.
- [10] 贾守薇,刘韬,黄红兵.治疗非小细胞肺癌的分子靶向药物的研究进展[J].中国药房,2013,24(32):3064.
- [11] Wei Q, Sheng L, Shui Y, et al. EGFR, HER2, and HER3 expression in laryngeal primary tumors and corresponding metastases[J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(4):1193.
- [12] Morshed K, Skomra D, Korobowicz E, et al. An immunohistochemical study of cyclin D1 protein expression in laryngeal squamous cell carcinoma[J]. *Acta Otolaryngol*, 2007, 127(7):760.
- (收稿日期:2013-10-28 修回日期:2013-12-11)
- * 硕士研究生。研究方向:天然药物新制剂、新技术。电话:0411-86110420。E-mail:baoxu88@163.com
通信作者:教授。研究方向:天然药物新制剂、新技术。电话:0411-86110420。E-mail:tiany2004@126.com

齐墩果酸(Oleanolic acid, OA)是天然五环三萜类化合物,具有抗肝炎、抗肿瘤和抗高血脂等多方面的药理作用,但是由于OA脂溶性较强,在胃肠道的溶出低、吸收差,导致其生物利用度低,不能被人体较好地吸收利用,故限制了其在临床上的应用。纳米粒(NPs)用作药物载体具有粒度小、比表面积大、活性中心多、吸附能力强等优点,经静脉注射后,在体内的分布取决于微粒的粒径大小及表面带电性^[1]。目前对于微粒给药系统体内评价的一个重要方面是研究其在体内的吸收和转运情况,较常用的方法是进行荧光标记后示踪给药系统的体内转运行为。香豆素6(Coumarin-6)是一种激光转化率较高、性能比较稳定的脂溶性激光染料,并且可用高效液相色谱(HPLC)法定量测定,检测灵敏度较高^[2]。因此,近年来香豆素6常被作为荧光探针,包载于微粒给药系统内进行给药系统的体内示踪、细胞摄取及转运机制研究^[3-4]。本试验采用乳化-溶剂挥发法制备同时包载模型药物OA和荧光标记物香豆素6的两种纳米粒,即OA/香豆素6/乳酸羟基乙酸共聚物纳米粒(Oleanolic acid and coumarin-6-loaded poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles, OCPN)和OA/香豆素6/乳酸羟基乙酸共聚物-水溶性维生素E纳米粒(Oleanolic acid and coumarin-6-loaded poly(lactic-co-glycolic acid)-d- α -tocopherol polyethylene glycol 1000 succinate nanoparticles, OCPTN),研究人肝癌细胞株HepG2对二者的体外摄取情况,为OA-NPs在体内对肝脏的主动靶向性、体内抑瘤率等试验奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

IX81荧光倒置显微镜(日本Olympus公司);1200型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);JY92-II N超声波细胞粉碎机(宁波新芝科技股份有限公司);NanoZS90激光粒径仪(英国Marlvern公司);RW20数显电动搅拌机(日本IKA公司);SCP-TOH型离心机(日本Hitachi公司,离心半径:13.5 cm);FD-1C冷冻干燥机(北京德天佑科技发展有限公司);FA1104型万分之一电子天平(上海精科实业有限公司);CO₂培养箱(美国Thermo公司);超净工作台(上海博讯实业有限公司);FLX800TB荧光酶标仪(美国Bio-Tek公司)。

1.2 药品与试剂

OA原料药(南京泽郎医药科技有限公司,批号:090120,纯度:99%);OA对照品(美国Sigma公司,批号:508-02-1,纯度:97%);香豆素6对照品(批号:91-64-5,纯度:98.0%)、香豆素6原料药(纯度:98.0%)均购自美国Sigma-Aldrich公司;维生素E聚乙二醇1000琥珀酸酯(TPGS,即水溶性维生素E,美国Eastman化学公司);乳酸羟基乙酸共聚物(PLGA,山东省医疗器械研究所,批号:13012011,乳酸-羟基乙酸比例:50:50);PLGA-水溶性维生素E(PLGA-TPGS,大连医科大学药理学教研室自制,批号:20121208);优级胎牛血清(天津市灏洋生物制品科技有限公司,批号:20130428);其余辅料均为药用规格,所用试剂均为分析纯。

1.3 细胞株

HepG2细胞系由中国医学科学院基础医学研究所细胞中心提供。

2 方法^[5]与结果

2.1 细胞培养

将HepG2细胞置于含10%胎牛血清的高糖培养基(HDMEM)中,放入37℃、饱和湿度、5%CO₂培养箱中培养,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤,0.25%胰酶消化液分散成单细胞悬

液,取对数生长期的细胞进行试验。

2.2 纳米粒的制备

2.2.1 处方。OA原料药10 mg,香豆素6 10 mg,PLGA-TPGS 100 mg,0.03%TPGS(乳化剂)水溶液120 ml。

2.2.2 制备工艺^[6]。精密称取OA原料药10 mg和香豆素6 10 mg,置于10 ml离心管中,再精密称取PLGA-TPGS 100 mg置于上述离心管中,加入10 ml乙酸乙酯,充分放置使其全部溶解;量取120 ml 0.03%TPGS水溶液至烧杯中,400 W超声条件下加入OA、香豆素6和PLGA-TPGS的乙酸乙酯溶液,继续超声6 min,400 r/min电动搅拌12 h,16 000 r/min高速离心15 min,用双蒸水冲洗3次,冷冻干燥24 h,得同时包载OA和香豆素6的OCPTN。同法,用PLGA替换PLGA-TPGS,制得同时包载OA和香豆素6的OCPN。

2.3 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Hypersil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇-水(9:1),流速:1.0 ml/min;检测波长:430 nm^[6];柱温:20℃;进样量:20 μl。分别称取香豆素6原料药、对照品适量,用甲醇溶解制成溶液;另称取OCPN和OCPTN适量,置于离心管中,用乙酸乙酯溶解后减压挥发乙酸乙酯,再分别加入流动相涡旋混匀制成含香豆素6均为10 μg/ml的溶液。取上述溶液20 μl进样分析,记录色谱,色谱图见图1。

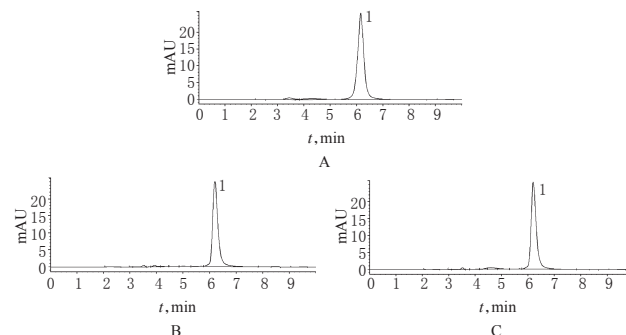


图1 高效液相色谱图

A. 香豆素6对照品; B. OCPN; C. OCPN; 1. 香豆素6

Fig 1 HPLC chromatograms

A. coumarin-6 control; B. OCPN; C. OCPN; 1. coumarin-6

液。由图1可知,香豆素6的保留时间约为6.1 min,分离度符合要求。在此条件下,理论板数以香豆素6计不低于3 000。

2.4 粒径和Zeta电位的测定

按前期试验方法^[7]分别测得OCPTN的平均粒径为(182.6±2.6) nm($n=3$),Zeta电位为(-23.58±0.56) mV($n=3$);OCPN的平均粒径为(284.3±3.2) nm($n=3$),Zeta电位为(-14.76±0.37) mV($n=3$)。

2.5 OA载药量的测定

按前期试验方法^[7]测得OCPTN和OCPN中OA载药量分别为(7.9±0.8)%($n=5$)和(6.8±0.6)%($n=5$)。

2.6 香豆素6载药量和包封率的测定

2.6.1 标准曲线的绘制。精密称取干燥至恒重的香豆素6对照品10 mg,置于50 ml量瓶中,加甲醇稀释至刻度得质量浓度为200 μg/ml的对照品贮备液。精密量取香豆素6对照品贮备液100、200、400、800、1 600、3 200、6 400 μl,分别置于10 ml量瓶中,用甲醇稀释至刻度配制2、4、8、16、32、64、128 μg/ml的系列对照品溶液,按“2.3”项下色谱条件分别进样分析,记录峰面积。以峰面积(A)为纵坐标、质量浓度(c)为横坐标进行线性回归分析,得标准曲线方程为 $A=13.315c+3.489 4$ ($r=$

0.999 1), 结果表明, 香豆素 6 检测质量浓度的线性范围为 2~128 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.6.2 精密度试验。精密吸取香豆素 6 对照品贮备液 1 600、2 000、2 400 μl , 各 5 份, 分别置于 10 ml 量瓶中, 加甲醇定容至刻度, 摇匀, 配制 32、40、48 $\mu\text{g/ml}$ 的溶液, 按“2.3”项下色谱条件进样分析。连续测定 5 次和每日在同一时间进样、连续测定 5 d, 考察日内和日间精密度。结果 32、40、48 $\mu\text{g/ml}$ 溶液的日内 RSD 分别为 1.41%、1.52%、1.65% ($n=5$), 日间 RSD 分别为 2.07%、2.12%、2.15% ($n=5$), 表明精密度良好。

2.6.3 加样回收率试验。精密称取同一批的 OCPTN 和 OCPN, 各 9 份, 分别置于 10 ml 离心管中, 每份 3 mg, 每 3 份分别精密加入香豆素 6 对照品贮备液 100、900、1 300 μl , 稀释至刻度, 摇匀, 测定峰面积, 根据标准曲线方程计算含量, 以测得量与加入量比较, 计算加样回收率。结果 OCPTN 和 OCPN 中香豆素 6 的加样回收率分别为 100.24% (RSD=1.15%, $n=3$) 和 100.38% (RSD=1.21%, $n=3$), 表明此法用于测定样品含量的准确度良好。

2.6.4 载药量的测定。精密称取同一批的 OCPTN 和 OCPN, 各 5 份, 分别置于 10 ml 离心管中, 每份 5 mg, 用 2 ml 乙酸乙酯溶解后减压挥发乙酸乙酯, 加入 10 ml 流动相涡旋定容, 按“2.3”项下色谱条件进样 3 次, 每次 20 μl , 测定峰面积, 根据标准曲线方程计算样品中香豆素 6 含量; 再根据公式载药率 (DL)=纳米粒中的药物质量/纳米粒质量(取样量) $\times 100\%$ 计算载药量。结果 OCPTN 和 OCPN 中香豆素 6 的载药量分别为 (7.6 \pm 0.4)% ($n=5$) 和 (6.3 \pm 0.5)% ($n=5$)。

2.7 细胞摄取试验

2.7.1 不同质量浓度 OCPTN 和 OCPN 的细胞摄取率。取对数生长期 HepG2 细胞, 加至 96 孔板, 显微镜计数终浓度为 1×10^5 /孔, 孵育过夜, 细胞用 PBS 平衡 1 h 后分别加含 100、200、400 $\mu\text{g/ml}$ 香豆素 6 的 OCPTN、OCPN 混悬液和香豆素 6 溶液 (简称 CS, 溶剂: 0.1% 二甲基亚砷水溶液), 孵育 2 h 后吸去培养液, 每孔用 50 μl 冷 PBS 洗 3 次, 加入 50 μl 含 0.5% Triton X-100 的 0.2 mol/L NaOH 溶解细胞; 分别用荧光酶标仪在激发光波长 430 nm 和发射光波长 485 nm 下观察荧光强度, 测定荧光强度 I_1 。另将不加纳米粒的细胞同法溶解后, 分别加入含 100、200、400 $\mu\text{g/ml}$ 香豆素 6 的 OCPTN、OCPN 混悬液, 保持体积相同, 立即用荧光酶标仪在激发光波长 430 nm 和发射光波长 485 nm 下观察荧光强度, 测定 I_2 。按公式细胞摄取率 (%) = 摄取后细胞中香豆素 6 的荧光强度 I_1 /摄取前纳米粒中香豆素 6 的荧光强度 $I_2\times 100\%$ 计算细胞摄取率^[8], 结果见表 1。

表 1 不同质量浓度 OCPTN 和 OCPN 的细胞摄取率 (% , $\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab 1 Absorption rate of different concentrations of OCPTN and OCPN (% , $\bar{x}\pm s, n=6$)

质量浓度, $\mu\text{g/ml}$	细胞摄取率		
	CS	OCPTN	OCPN
100	0	62.1 \pm 1.2	36.8 \pm 1.5
200	0	53.6 \pm 1.3	31.2 \pm 1.9
400	0	40.9 \pm 1.5	22.4 \pm 1.3

由表 1 可知, 随着孵育时所加纳米粒质量浓度的增加, 两种纳米粒的细胞摄取率均下降, 而 OCPTN 在 2 h 时的细胞摄取率分别是相同质量浓度 OCPN 的细胞摄取率的 1.69、1.72、1.83 倍。这是因为 OCPTN 具有比 OCPN 更小的粒径, 更易被细胞摄取, 同时表面带负电荷的纳米粒容易与表面正电性的细胞靠近, 绝对值越大越易相互吸引, 故 OCPTN 测得的荧光

强度更大。

2.7.2 细胞摄取 OCPTN 的荧光倒置显微镜图。取对数生长期 HepG2 细胞, 加至 24 孔板, 显微镜计数终浓度为 1×10^5 /孔, 培养 24 h, 用含 100 $\mu\text{g/ml}$ 香豆素 6 的 OCPTN 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h, 用冷的 PBS 洗 3 次, 然后用乙醇固定 20 min, 取出细胞用碘化吡啶染色 30 min, 再用冷的 PBS 洗 2 次, 最后用荧光倒置显微镜观察细胞摄取情况, 结果见图 2。

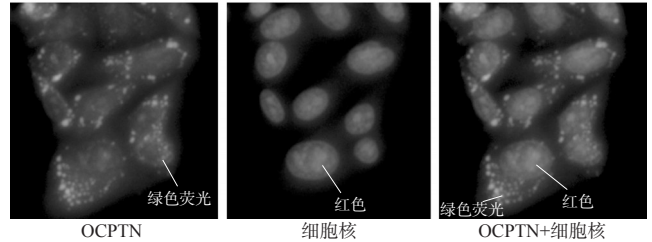


图 2 细胞摄取 OCPTN 的荧光倒置显微镜图 ($\times 200$)

Fig 2 Fluorescence inverted microscopy images of HepG2 cells after absorbing OCPTN ($\times 200$)

由图 2 可知, 有绿色荧光的载香豆素 6 的 OCPTN 分布在被碘化吡啶染成红色的细胞核周围, 表明 OCPTN 被 HepG2 细胞摄取进入其中。

3 讨论

由于模型药物 OA 是白色没有荧光的药物, 无法直观地观察其在机体内的转运过程。本研究首次将脂溶性荧光标记物香豆素 6 和脂溶性药物 OA 同时包载在 NPs 中, 在细胞摄取试验中更能直观证明包载药物的 NPs 可以被直接摄取进入细胞; 而在相同的孵育时间内药物和标记物分子本身是无法通过细胞膜进入细胞内的。

NPs 被细胞摄取量是可饱和并有限的^[9-10], 这是因为细胞内容积有限, 只能摄取一定量的 NPs, 当细胞摄取 NPs 饱和后, 多余的 NPs 就不能再被细胞摄取, 故摄取率降低。同时细胞的摄取率与 NPs 的粒径大小呈反比, 粒径越小, 越容易被摄取, 摄取率越大, 故粒径小的 NPs 更有利于其进入细胞内发挥其药理作用。

HepG2 细胞用含香豆素 6 的 OCPTN 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育 2 h 后, 用 PBS 洗 3 次, 目的是为了完全除去在该时间内还没有被摄取进入细胞内的 OCPTN, 以证明荧光倒置显微镜下观察到的是被摄取入细胞内的 OCPTN 所发出的绿色荧光, 而排除其在细胞外被激发产生荧光的可能性。

参考文献

- [1] 方晓玲. 药剂学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007: 370-371.
- [2] Panyama J, Sanoo SK, Prabha S, et al. Fluorescence and electron microscopy probes for cellular and tissue uptake of poly (d, l-lactide-co-glycolide) nanoparticles[J]. *Int J Pharm*, 2003, 262(1/2): 1.
- [3] Ma Y, Zheng Y, Liu K, et al. Nanoparticles of poly (lactide-co-glycolide) -d-a-tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate random copolymer for cancer treatment[J]. *Nanoscale Res Lett*, 2010, 5(7): 1 161.
- [4] Zhang Y, Tang L, Sun L, et al. A novel paclitaxel-loaded poly (ϵ -caprolactone)/Poloxamer 188 blend nanoparticle overcoming multidrug resistance for cancer treatment[J]. *Acta Biomater*, 2010, 6(6): 2 045.

托品酸的致突变机制研究

曲见松*, 陈德俊, 赵岩, 魏霞, 祝清芬*(山东省食品药品检验所, 济南 250101)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)09-0803-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.09.12

摘要 目的:研究托品酸的致突变机制。方法:采用鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验,设5 000、2 500、1 250、625 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 4个剂量托品酸组、自发回变组、溶剂对照组和阳性对照[非代谢活化条件下:对二甲基氨基苯重氮磺酸钠(Dexon)50 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 、注射用丝裂霉素(MMC)0.5 $\mu\text{g}/\text{皿}$;代谢活化条件下:2-氨基芴(2-AF)20 $\mu\text{g}/\text{皿}$]组,每组6皿,各组在加和不加代谢活化系统S9的条件下,计数组不同致突变类型的氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌TA97、TA98、TA100、TA102的回变菌落数。结果:与溶剂对照组和自发回变组比较,非活化条件下2 500、5 000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 托品酸组和Dexon阳性对照组TA97、TA98、TA100菌株的回变菌落数均明显增加($P < 0.01$),MMC阳性对照组TA102菌株的回变菌落数明显增加($P < 0.01$);活化条件下2 500、5 000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 托品酸组TA98菌株的回变菌落数明显增加($P < 0.01$),2-AF阳性对照组TA97、TA98、TA100、TA102菌株的回变菌落数均明显增加($P < 0.01$),其余条件的回变菌落数差异无统计学意义。结论:托品酸的致突变作用机制为诱导组氨酸靶基因中鸟嘌呤-胞嘧啶位点碱基置换和移码突变,活化条件的存在会使其诱变性减弱。

关键词 托品酸;鼠伤寒沙门氏菌回复突变试验;组氨酸营养缺陷型鼠伤寒沙门氏菌;致突变

Study on Mutagenicity Mechanism of Tropic Acid

QU Jian-song, CHEN De-jun, ZHAO Yan, WEI Xia, ZHU Qing-fen(Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the mutagenicity mechanism of tropic acid. METHODS: In *Salmonella typhimurium* reverse assay, 4 doses of tropic acid groups (5 000, 2 500, 1 250 and 625 $\mu\text{g}/\text{vessel}$), natural reverse group, solvent control group and positive control group [under non-metabolism activation condition: sodium p(dimethylamino) benzenediazo sulfonate (Dexon) 50 $\mu\text{g}/\text{vessel}$, Mitomycin for injection (MMC) 0.5 $\mu\text{g}/\text{vessel}$; under metabolism activation condition: 2-anilino fluorene (2-AF) 20 $\mu\text{g}/\text{vessel}$] were set up with 6 vessels in each group. The number of revertant colony of different mutation types of histidine auxotroph *Salmonella typhimurium* TA97, TA98, TA100 and TA102 were counted under metabolism activation condition or without metabolism activation condition. RESULTS: Compared with solvent control group and spontaneous revertant group, the number of revertant colony of TA97, TA98 and TA100 increased significantly in 2 500 $\mu\text{g}/\text{vessel}$ and 5 000 $\mu\text{g}/\text{vessel}$ tropic acid groups and Dexon positive control group ($P < 0.01$), and the number of revertant colony of TA102 increased significantly in MMC positive control group ($P < 0.01$) without metabolism activation. Under metabolism activation condition, the number of revertant colony of TA98 increased significantly in 2 500 $\mu\text{g}/\text{vessel}$ and 5 000 $\mu\text{g}/\text{vessel}$ tropic acid groups ($P < 0.01$); the number of revertant colony of TA97, TA98, TA100 and TA102 increased significantly in 2-AF positive control group ($P < 0.01$). There was no statistical significance in the number of revertant colony under other conditions. CONCLUSIONS: The tropic acid could induce base substitution and frame-shift mutation and the activation system *in vitro* could reduce the mutagenicity.

KEYWORDS Tropic acid; *Salmonella typhimurium* reverse mutation assay; Histidine auxotroph *Salmonella typhimurium*; Mutagenicity

[5] 田燕, 蒋妮, 高萌, 等. 齐墩果酸纳米粒的制备及质量控制[J]. 中国药房, 2010, 21(37): 3 506.

[6] 李晓芳, 马艳结, 张晓, 等. 包载荧光探针香豆素-6的PLGA纳米粒的制备[J]. 中国现代应用药学, 2011, 28(8): 740.

[7] 顾晓华, 王轩, 安磊, 等. 齐墩果酸PLGA-TPGS纳米粒体外释放度的测定及质量控制[J]. 中国药房, 2012, 23(29): 2 726.

[8] Ma YD, Huang LQ, Song CX, *et al.* Nanoparticle formu-

* 主管药师, 硕士。研究方向: 药检药理与毒理学评价。电话: 0531-81216532。E-mail: sdqjs@163.com

通信作者: 副主任药师, 博士。研究方向: 药检药理与毒理学评价。电话: 0531-81216599。E-mail: 13969128018@163.com

lation of poly(ϵ -caprolactone-co-lactide)-d-a-tocopheryl polyethylene glycol 1 000 succinate random copolymer for cervical cancer treatment[J]. *Polymer*, 2010, 51(25): 5 952.

[9] Qaddoumi MG, Ueda H, Yang J, *et al.* The characteristic and mechanisms of PLGA nanoparticles in rabbit conjunctival epithelial cell layers[J]. *Pharm Res*, 2004, 21(4): 641.

[10] Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, *et al.* Size-dependent internalization of particle via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis[J]. *Biochem J*, 2004, 377(Pt 1): 159.

(收稿日期: 2013-07-19 修回日期: 2013-10-14)