

· 毒理 ·

微核试验和彗星试验检测朱砂的遗传毒性

张超超, 吴文斌, 汤家铭*

(上海中医药大学实验动物中心, 上海 201203)

[摘要] **目的:**研究朱砂对大小鼠染色体的损伤作用,比较短期给药与长期给药对遗传毒性检出的影响,探讨结合生殖毒性 I 段试验进行遗传毒性研究的可行性。**方法:**18 只小鼠分 3 组灌胃给药 10, 5.0, 2.5 g·kg⁻¹ (分别相当于人临床最高等效剂量约 100, 50, 25 倍)朱砂悬浊液, 2 d 后处死;结合生殖毒性 I 段大鼠 (每组 6 只)连续灌胃给药 1.0, 0.3, 0.1 g·kg⁻¹ (分别相当于人临床最高等效剂量的 20, 6.4, 2.0 倍), 雄性 42 d 以上, 交配成功后处死;雌性 20 d 以上, 妊娠第 15 天处死, 取骨髓细胞做微核试验和彗星试验。**结果:**小鼠各剂量组灌胃给药的微核率分别为 0.175%, 0.108%, 0.092%, 与阴性对照组比较差异有显著意义, 但彗星试验结果阴性。结合生殖毒性 I 段试验的微核试验中雄性和雌性大鼠的微核率与阴性对照组比较, 差异无显著意义, 但有随剂量增高而增高的趋势;而彗星试验结果显示雄性的中、高剂量和雌性的高剂量的拖尾阳性率为 27.6%, 42.8%, 22.3%, 与阴性对照组比较, 差异有显著和极显著意义。**结论:**①朱砂短期内大剂量灌胃给药或长期小剂量给药可能引起染色体损伤;②利用生殖毒性 I 段试验多次给药后取材做微核试验和彗星试验在方法上是可行的, 在剂量设计上更符合中药长期低剂量给药方式;③微核试验和彗星试验的组合在评价药物的体内遗传毒性中具有互补性。

[关键词] 微核试验; 彗星试验; 朱砂; 遗传毒性

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0228-06

Detection of Genotoxicity of Cinnabaris by Using Micronucleus Assay and Comet Assay

ZHANG Chao-chao, WU Wen-bin, TANG Jia-ming*

(Laboratory Animal Center, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of Cinnabaris on mouse/rat chromosome damage, and to compare the detection of genotoxicity by short-term and long-term dose administration, exploring the feasibility of integrating micronucleus assay and comet assay into reproductive toxicity test I period (male fertility and early embryonic development). **Method:** Cinnabaris suspension was orally administrated to male mice by ig at doses of 10, 5.0, 2.5 g·kg⁻¹ respectively (equal to 100, 50, and 25 times of the human highest clinical equivalent doses), after 2 days mice were sacrificed. Cinnabaris suspension was orally administrated to rats by ig at doses of 1.0, 0.3, 0.1 g·kg⁻¹ respectively (equal to 20, 6.4, and 2.0 times of the human highest clinical equivalent doses), according to the protocol of rat fertility and early embryo development toxicity by ig administration of Cinnabaris, male rats were sacrificed after 42 day's continuous administration and mating, and female rats after 20 day's continuous administration and on D15 of pregnancy. Then the bone marrows were taken to do micronucleus assay and comet assay. **Result:** The micronucleus rates of mice administrated were 0.175%, 0.108% and 0.092% respectively, and had statistical significance when compared with the negative control. But in comet assay, the results were

[收稿日期] 20110128(005)

[基金项目] 科技部重大新药创制基金项目 (2009ZX09502-002)

[第一作者] 张超超, 学士, 实验师, 研究方向: 中药毒理学, Tel: 021-51322648, E-mail: stonezc1981@163.com

[通讯作者] * 汤家铭, 硕士, 研究员, 研究方向: 中药毒理, Tel/Fax: 021-51322647, E-mail: tangjiaming@hotmail.com

negative. The micronucleus rates of rats, which were integrated into the protocol of rat fertility and early embryo development toxicity test, had a tendency of increase as the doses increase, but no statistical significance. But in comet assay, the results showed that both tailed cell numbers and tailed lengths in high and middle dose groups statistically increased in both male and female rats when compared with the negative control. **Conclusion:** ① Both high dose, short-term and low dose, long-term administrations of Cinnabaris may cause chromosome damage; ② it is feasible that both micronucleus assay and comet assay be integrated into the protocol of rat fertility and early embryo development toxicity test, which is in accordance with the long-term and low-dose administration of traditional Chinese medicine. ③ The combination of micronucleus assay and comet assay is of complement in evaluating drug genotoxicity *in vivo*

[**Key words**] micronucleus assay; comet assay; Cinnabaris; genotoxicity

朱砂(Cinnabaris)是一味常用的矿物类中药,其化学成分主要为硫化汞(HgS)。朱砂性甘微寒,有小毒,归心经,具有清心镇惊、安神解毒等功效^[1],在我国已有悠久的药用历史,2005年版的《中国药典》收录的中成药中约7.4%含朱砂,其中不乏常用的中成药如牛黄清心丸等。但是,过服久服朱砂可引起毒副反应甚至中毒致死的病例亦有报道^[2-3]。朱砂的毒性主要是由于朱砂中的游离汞吸收后与组织细胞结合,形成多脏器的损害,其中以侵害肾脏、肝脏为最严重,其次是心脏、消化系统、脑及生殖系统等^[4-5]。但是至今为止,未见国内外有关朱砂对遗传物质损伤的报道。

骨髓细胞微核试验作为体内遗传毒性检测的经典和首选方法广泛用于评价药物的潜在遗传毒性,而单细胞凝胶电泳试验(又称彗星试验, comet assay)因其简便、灵敏、客观性强、需要样品量少等优点,已被推荐为第2种检测体内遗传毒性的方法^[6]。本实验用微核试验和彗星试验组合来研究朱砂对大小鼠染色体的损伤作用,比较短期给药与长期给药对遗传毒性检出的影响,探讨结合生殖毒性I段试验进行遗传毒性研究的可行性。

1 材料

1.1 动物 清洁级雄性ICR小鼠,体重(35±2)g;结合生殖毒性I段试验SD大鼠试验时体重雄性约450g,雌性约320g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供[实验动物生产许可证号SCXK(沪)2007-0005]。动物购入后,饲养在清洁级动物实验室内[实验动物使用许可证号SYXK(沪)2009-0069],温度控制在20~25℃,湿度控制在40%~70%。动物自由摄食、饮水,1周换1~2次垫料。

1.2 仪器及试剂 DYY-6C型双稳定时电泳仪(北

京六一仪器厂)、Motic BA400型生物显微镜(带数码照相及图像分析系统)、朱砂(产地贵州,由上海康桥中药饮片有限公司经水飞处理后的红色细粉末状,批号H2009092304,经上海市食品药品监督管理局检验硫化汞含量为99.3%,可溶性汞为2.98%)、环磷酰胺(购自江苏恒瑞医药股份有限公司,批号09110121)、低熔点和正常熔点琼脂糖、吖啶橙、Giemsa染液及其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 动物处理

2.1.1 小鼠分组及给药 小鼠购进后在SPF级动物饲养室观察5d后按体重分层随机分组,分成阴性对照组、环磷酰胺阳性对照组、朱砂高剂量组(10 g·kg⁻¹)、中剂量组(5 g·kg⁻¹)和低剂量组(2.5 g·kg⁻¹)5组,每组6只。朱砂按0.02 mL·g⁻¹体重灌胃给药,间隔24h再次给药;阴性对照组给予等容量的0.5% CMC-Na,环磷酰胺按80 mg·kg⁻¹1次给药。

2.1.2 大鼠分组与给药 结合朱砂灌胃给药生殖毒性I段试验的雄性和雌性大鼠,按生殖毒性I段试验分成阴性对照组、朱砂高剂量组(1 000 mg·kg⁻¹)、中剂量组(300 mg·kg⁻¹)和低剂量组(100 mg·kg⁻¹),阴性对照组给予等容量的0.5% CMC-Na,灌胃给药,雄性持续给药42d,雌性持续给药14d。

2.2 处死及取材 小鼠第2次给药24h后处死;结合生殖毒性I段试验的雄性大鼠给药42d后交配,交配成功后处死,雌性大鼠给药14d后至妊娠第6天,妊娠第15天处死。取出两侧股骨用止血钳夹碎,取骨髓分别用于以下微核试验和单细胞凝胶电泳试验。

2.3 微核试验 参照文献[7]方法,取适量骨髓在

凹孔瓷板内,与大鼠血清混匀、滴加到载玻片上推片,自然干燥。每个标本制作 2 片。将推片放入甲醇中固定 10 min,取出后放入 Giemsa 染液中染色 15~30 min,纯水冲洗,晾干。选择细胞完整、涂片均匀、染色适当的区域,在油镜下观察。用双盲法读片,每只动物计数 2 000 个嗜多染红细胞,观察含有微核的嗜多染红细胞数,计算微核率。

2.4 彗星试验 参照文献[8-9]的方法,用 1 mL 预冷的 HBSS 冲洗股骨髓于 1.5 mL 离心管中。在磨砂载玻片上滴加 0.6% 正常熔点琼脂糖 500 μ L,加盖玻片作为第 1 层,4 $^{\circ}$ C 冷却 15 min 后去掉盖玻片,备用。取 10 μ L 骨髓液与 90 μ L,0.75% 低熔点琼脂糖混合,滴加到第一层凝胶上,加盖玻片,冷却后去掉盖玻片。将载玻片缓慢放入裂解液中,4 $^{\circ}$ C 放置 1.5 h。经中和处理后将载玻片放入电泳槽中,加电泳液至覆盖玻片,4 $^{\circ}$ C 放置 45 min。接通电源 25 V,电流 300 mA,4 $^{\circ}$ C 电泳 25 min。经中和处理后,用 20 mg \cdot L⁻¹ 的吖啶橙染色,尽快观察结果,拍照。每张片子在图像分析系统上随机计数 50 个细胞,记录拖尾细胞数计算拖尾阳性率,测量拖尾长度。

2.5 统计分析 采用 SPSS 12.0 统计软件进行分析。计数数据用卡方检验,计量数据用方差分析进行比较。以 $P < 0.05$ 为差异有显著意义,以 $P < 0.01$ 为差异有极显著意义。

3 结果

3.1 环磷酰胺致小鼠骨髓细胞拖尾阳性率和拖尾长度的量效关系 分别用环磷酰胺按 12.5, 25, 50 mg \cdot kg⁻¹ 给 ICR 小鼠灌胃给药,24 h 后处死取骨髓细胞做彗星试验,结果阴性对照组无明显拖尾,而环磷酰胺各剂量组均出现骨髓细胞核物质向阳极迁移形成拖尾现象,形似彗星。环磷酰胺各剂量组的拖尾阳性率和拖尾长度与阴性对照组比较,差异均有极显著意义,且随着剂量的增加,拖尾阳性率和拖尾长度也随之明显增加,见表 1。

表 1 环磷酰胺各剂量小鼠骨髓细胞彗星试验($\bar{x} \pm s$)

分组	剂量 /mg \cdot kg ⁻¹	观察细胞数	拖尾细胞数	拖尾阳性率/%	拖尾长度 / μ m
阴性对照	-	300	14	4.67	23.76 \pm 3.87
环磷酰胺	12.5	300	68	22.67 ¹⁾	40.28 \pm 4.27 ²⁾
	25	300	182	60.67 ¹⁾	45.31 \pm 5.82 ²⁾
	50	300	206	68.67 ¹⁾	48.29 \pm 8.36 ²⁾

注:与阴性对照组比¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2 朱砂灌胃给药的小鼠骨髓细胞微核试验和彗星试验

3.2.1 朱砂灌胃给药的小鼠骨髓细胞微核试验 按照经典的小鼠骨髓细胞微核试验,给予 ICR 小鼠灌胃给药 2 次,24 h 处死后取骨髓细胞做微核试验。结果显示朱砂各剂量组嗜多染红细胞与总红细胞比值 [PCE/(PCE + NCE)] 在 0.50~0.55,属正常范围。从表 2 数据结果可以看出,朱砂各剂量组的微核率与阴性对照组比较,差异有显著意义(低剂量组)和极显著意义(中、高剂量组),且不同剂量组之间存在一定的量效关系。环磷酰胺阳性对照组的微核率显著高于阴性对照组($P < 0.01$)。

表 2 朱砂各剂量组小鼠骨髓微核率试验

组别	剂量 /g \cdot kg ⁻¹	动物数	观察细胞数	有微核细胞数	微核率 /%
阴性对照	-	6	12 000	2	0.017
环磷酰胺	0.08	6	12 000	128	1.067 ²⁾
朱砂	2.5	6	12 000	11	0.092 ¹⁾
	5.0	6	12 000	13	0.108 ²⁾
	10.0	6	12 000	21	0.175 ²⁾

注:与阴性对照组比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.2.2 朱砂灌胃给药的小鼠骨髓细胞彗星试验 用同一小鼠的骨髓细胞做彗星试验的结果表明,与正常对照组比较,朱砂给药组(给药 2 d)小鼠骨髓细胞的拖尾阳性率和拖尾长度差异不明显;但阳性对照组的小鼠骨髓细胞的拖尾阳性率明显升高,拖尾长度也明显升高,差异有极显著意义,见表 3。

表 3 朱砂各组小鼠骨髓细胞彗星试验($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/g \cdot kg ⁻¹	观察细胞数	拖尾细胞数	拖尾阳性率/%	拖尾长度/ μ m
阴性对照	-	300	5	1.6	22.98 \pm 3.31
环磷酰胺	0.08	300	262	87.33 ¹⁾	55.39 \pm 18.49 ²⁾
朱砂	2.5	300	6	2	24.39 \pm 4.09
	5.0	300	7	2.3	24.52 \pm 4.47
	10	300	7	2.3	24.78 \pm 4.94

注:与阴性对照组比¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.01$ 。

3.3 结合朱砂灌胃给药生殖毒性 I 段试验的大鼠骨髓细胞微核试验和彗星试验 结合朱砂灌胃给药生殖毒性 I 段试验的雄性和雌性大鼠做骨髓细胞微

核试验,结果显示雄性各剂量组的微核率与正常对照组比较,随着剂量的增加微核率也增高,有一定的量效关系,但差异无显著意义,见表 4。

表 4 结合朱砂灌胃给药生殖毒性 I 段试验各组雄性和雌性大鼠骨髓微核试验($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	动物数/雄/雌	观察细胞数	雄性微核率/%	雌性微核率/%
正常对照	-	6/6	12 000	0.107 \pm 0.058	0.113 \pm 0.072
朱砂	100	6/6	12 000	0.115 \pm 0.041	0.156 \pm 0.065
	300	6/6	12 000	0.124 \pm 0.061	0.240 \pm 0.124
	1 000	6/6	12 000	0.148 \pm 0.054	0.222 \pm 0.281

结合朱砂灌胃给药生殖毒性 I 段试验的雄性大鼠做骨髓细胞彗星试验,结果显示与正常对照组比较,中、高剂量组的拖尾阳性率和拖尾长度明显升高,差异有极显著意义($P < 0.01$,图 1,2),且呈明显的量效关系,见表 5。

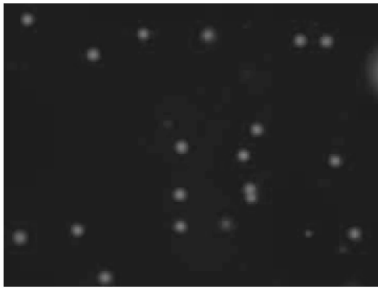


图 1 大鼠阴性对照组($\times 200$)

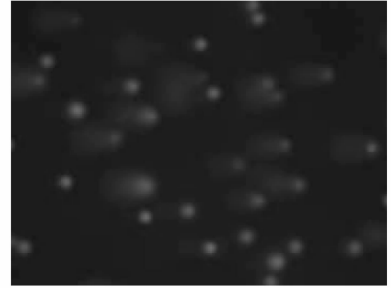


图 2 朱砂高剂量组($\times 200$)

结合朱砂灌胃给药生殖毒性 I 段试验的雌性大鼠做骨髓细胞彗星试验,结果显示与正常对照组比较,朱砂雌性大鼠给药组低剂量和中剂量组的拖尾阳性率和拖尾长度都无显著差异;高剂量组的拖尾阳性率和拖尾长度稍有升高,差异有意义($P < 0.05$),见表 6。

表 5 结合朱砂灌胃给药生殖毒性 I 段试验各组雄性大鼠骨髓彗星试验($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	观察细胞数	拖尾细胞数	拖尾阳性率/%	拖尾长度/ μm
正常对照	-	500	12	2.4	23.24 \pm 3.42
朱砂	100	500	36	7.2	27.98 \pm 9.13
	300	500	138	27.6 ¹⁾	38.29 \pm 19.23 ²⁾
	1 000	500	214	42.8 ¹⁾	46.07 \pm 23.78 ²⁾

注:与正常对照组比较¹⁾ $P < 0.01$,²⁾ $P < 0.01$ 。

表 6 结合朱砂灌胃给药生殖毒性 I 段试验各组雌性大鼠骨髓彗星试验($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	观察细胞数	拖尾细胞数	拖尾阳性率/%	拖尾长度/ μm
正常对照	-	300	17	5.7	25.00 \pm 6.05
朱砂	100	300	43	14.3	28.73 \pm 9.93
	300	300	34	11.3	26.98 \pm 8.46
	1 000	300	67	22.3 ¹⁾	31.82 \pm 13.43 ²⁾

注:与正常对照组比¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.05$ 。

4 讨论

中药的遗传毒性是一个长期被人们忽略的领域,一方面是因为人们往往认为中药毒性低,不足以

引起遗传物质的损伤,另一方面复方中药汤剂或一些矿物类中药很难用经典的体外遗传毒性试验方法如 Ames 试验和体外 CHL 细胞染色体畸变试验进行

研究。由于体外试验在评价药物遗传毒性的局限性,近年来一些学者和国际组织 ICH 提出用体内试验方法如用啮齿类外周血或骨髓细胞做微核试验和彗星试验以评价潜在的遗传毒性^[6,10-11]。体内试验的优点是它真实地表现药物进入体内后的吸收、分布、代谢和排泄等的整个过程,而中药复方因其成分的复杂性以及特殊的理化性质更适合用体内试验来进行评价。

小鼠骨髓细胞微核试验被认为是进行体内遗传毒性试验的首选方法,用来检测染色体断裂剂和非整倍体诱导剂对染色体的损伤作用^[11-12]。而彗星试验是近年来发展起来的一种检测细胞 DNA 断裂及鉴定化学物致突变性的方法^[9],因电泳时受损细胞 DNA 断裂片段从核中向阳极方向迁移,经荧光染色可见到明亮的拖尾现象,呈彗星状而得名。彗星实验能敏感检测单细胞水平的 DNA 链断裂,具有快速、简便、直观、价廉等优点,同时又能拍照保存,使实验结果更具客观性,广泛应用于遗传毒理学、预防医学、环境生物监测、药物筛选等多个研究领域^[9]。有报道显示在微核试验中阴性或可疑的致癌剂 90% 可用彗星试验检测出^[10],由于这 2 种方法的采样可取自同一个动物,因此已有学者推荐 2 种方法组合进行体内遗传毒性试验,在检测遗传毒性中更具有可比性和互补性。

为了探讨中药遗传毒性的研究方法,我们用朱砂作为载体,用微核试验和彗星试验组合来研究其对大小鼠染色体的损伤作用,比较短期给药与长期给药对遗传毒性检出的影响,探讨结合其他长期给药毒性试验进行遗传毒性研究的可行性。

根据《中国药典》2010 年版记载,朱砂成人用量为 0.1 ~ 0.5 g。按成人临床最高用量 0.5 g、成人 60 kg 体重计算,约为 8.3 mg·kg⁻¹。在本试验中,小鼠骨髓细胞微核试验和彗星试验的剂量设计采用最大给药量的倍比递减^[7],分别相当于人临床最高等效剂量约 100, 50, 25 倍,但仅连续给药 2 d。在大鼠生殖毒性 I 段中,我们设计高、中、低剂量组分别相当于人临床最高等效剂量的 20, 6.4, 2.0 倍,但连续给药雌性 42 d 以上,雌性 20 d 以上,小鼠短期给药的最高剂量是大鼠长期给药的 5 倍,说明在长期较低剂量情况下,药物的遗传毒性同样也能暴露出来,这种情况更接近中药的给药方式。

实验结果显示,按照经典的小鼠骨髓细胞微核试验用朱砂最大给药量给药 2 d,朱砂各剂量组与阴性对照组比较显示微核率增加,并有一定的量效关系,统计学上差异有极显著意义;而同样剂量组彗星试验的拖尾阳性率和拖尾长度与阴性对照组比较差异无显著意义。虽然用朱砂最大给药量,但在给药 2 d 后 2 种试验方法结果不一致,微核试验阳性而彗星试验阴性。

结合长期毒性试验或生殖毒性 I 段试验在大处理阶段取材做体内遗传毒性(微核)试验是近几年推荐的方法^[6,11],它不仅节省大量的人力物力,减少动物用量,而且对一些低毒性药物来说长期给药可以暴露其遗传毒性,揭示潜在的遗传毒性风险,这对于中药的遗传毒性评价来说尤为重要。

结果显示,结合朱砂灌胃给药生殖毒性 I 段试验动物大处理时取雄性和雌性大鼠骨髓细胞做微核试验,朱砂给药各剂量组无论是雄性还是雌性,与阴性对照组比较,微核率上升,且有一定的量效关系,但无显著意义。而在彗星实验中,雄性大鼠的朱砂中、高剂量组的拖尾阳性率和拖尾长度明显升高,差异有极显著意义;雌性大鼠只有高剂量组有显著意义。2 种方法比较,彗星试验在低剂量长期给药中比微核试验更敏感。由于生殖毒性 I 段的给药剂量高剂量仅为经典的小鼠微核试验高剂量的 20%,表明即使生殖毒性 I 段试验的高剂量设计远低于经典的小鼠微核试验,但长期给药能更好地暴露其遗传毒性,为我们今后结合生殖毒性 I 段试验或长期毒性试验做遗传毒性评价提供试验依据。至于试验体系的性别选择,在微核试验结果中并未显示性别对微核率的影响,但在彗星试验中,雄性高、中剂量组的拖尾阳性率和拖尾长度明显高于雌性,这可能是由于在生殖毒性 I 段设计中雌性在处死前有 10 d 的停药期(妊娠 d6 ~ d15)有关,因此结合生殖毒性 I 段试验做骨髓细胞的微核试验和彗星试验最好选择雄性。

结论:①朱砂短期内大剂量灌胃给药或长期小剂量给药可能引起染色体损伤;②利用生殖毒性 I 段试验多次给药后取材做微核试验和彗星试验在方法上是可行的,在剂量设计上更符合中药长期低剂量给药方式;③微核试验和彗星试验的组合在评价药物的体内遗传毒性中具有互补性。

蟾酥对豚鼠离体心脏的毒性作用和物质基础研究

蒋洁君¹, 周婧¹, 马宏跃^{1*}, 尤奋强², 段金康¹, 丁安伟¹

(1. 南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046;

2. 南京中医药大学 昆山附属医院, 江苏 昆山 215300)

[摘要] 目的:研究蟾酥对豚鼠离体心脏的毒性作用和其物质基础。方法:通过 Langendorff 灌流研究蟾酥对豚鼠离体心脏的毒性作用, HPLC 测定灌流后心脏中蟾蜍甾烯的含量。结果:蟾酥诱导豚鼠离体心脏出现房室传导阻滞、室速、室颤多种心律失常现象。当给药量累积达 $(60 \pm 11.5) \mu\text{g}$ 时致其停跳。采用 HPLC 在灌流心脏中测到 9 种蟾蜍甾烯类化合物, 其与心脏亲和力增加的顺序为:沙蟾毒精 > 蟾毒灵 > 远华蟾毒配基 > 噁根草苷元 > 日蟾毒它灵 > 华蟾毒灵 > 蟾毒它灵 > 脂蟾毒配基 > 去乙酰蟾毒它灵。结论:蟾酥对豚鼠心脏具有显著毒性, 其物质基础可能是脂蟾毒配基、蟾毒灵、蟾毒它灵、日蟾毒灵等 9 种蟾蜍甾烯类化合物。

[关键词] 蟾酥; 心脏毒性; 离体心脏灌流; HPLC; 物质基础

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)17-0233-05

[收稿日期] 20110118(010)

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金(30901894);教育部新教师基金(20093237120013);霍英东教育基金会第十二届高等院校青年教师基金(121044);江苏省中医药局项目(LZ09017);南京中医药大学青年自然科学基金(09XZR21)

[第一作者] 蒋洁君, 硕士, Tel/Fax:025-85811625, E-mail:jiangjj-118@126.com

[通讯作者] * 马宏跃, 博士, Tel/Fax:025-85811625, E-mail:hongyuema@hjutcm.edu.cn

[参考文献]

- [1] 中国药典. 一部[S]. 2005:92.
- [2] 边振考, 彭涛, 孟兆琛. 朱砂毒性的考证[J]. 中国药理学杂志, 1993, 28(2):117.
- [3] 王招定, 王光利. 中草药致小儿肝脏损害 18 例报告[J]. 浙江中医学院学报, 1996, 20(4):19.
- [4] 于从兰. 朱砂的药用价值、毒性及合理应用[J]. 中国中医药信息杂志, 2002, 9(10):37.
- [5] 梁爱华, 商敏凤. 朱砂的毒性研究概况[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(4):249.
- [6] Recio L, Hobbs C, Caspary W, et al. Dose-response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and comet assay protocol[J]. J Toxicol Sci, 2010, 35(2):149.
- [7] 袁伯俊, 廖明阳, 李波. 药物毒理学实验方法与技术[M]. 北京:化学工业出版社生物医药出版分社, 2007:293.
- [8] Singh N P, Mc Coy M T, Tice R R, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells[J]. Exptl Cell Res, 1988, 175(1):184.
- [9] 彭德惠, 蒋芸, 彭开良. 单细胞凝胶电泳实验技术经验之谈[J]. 预防医学杂志, 1998, 9(1):54.
- [10] Kirkland D, Speit G. Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity test to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens III. Appropriate follow-up testing *in vivo*[J]. Mutat Res, 2008, 654:114.
- [11] International conference on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use (ICH) S2(R1): guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use, 2008.
- [12] 《药物遗传毒性研究技术指导原则》课题研究组. 药物遗传毒性研究技术指导原则:第二稿[S]. 2006:10.

[责任编辑 邹晓翠]