

百里香酚对山羊子宫内膜上皮细胞的体外毒活性研究

闫宝琪¹,张世栋^{1*},董书伟¹,王东升¹,那立冬^{1,2},桑梦琪¹,杨洪早^{1,2},严作廷^{1*}

(1.中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所,甘肃省新兽药工程重点实验室,兰州 730050;

2.甘肃农业大学动物医学院,兰州 730070)

[收稿日期] 2016-10-10 [文献标识码]A [文章编号]1002-1280(2017)04-0035-07 [中图分类号]S859.79

[摘要] 为了探究百里香酚对山羊子宫内膜上皮细胞(goat endometrial epithelial cells, gEECs)的毒性作用,采用不同浓度的百里香酚作用于gEECs后,观测其对细胞生长曲线,细胞形态学变化,以及细胞膜结构完整性的影响。结果表明,百里香酚对EECs的毒性作用与其浓度呈剂量依赖效应($y = -0.008x + 1.2202$, $R^2 = 0.9767$),即随着药物浓度的增加细胞的增殖抑制率增大,药物对细胞的半数增殖抑制率(IC_{50})为100 $\mu\text{g/mL}$ 。当50、100 $\mu\text{g/mL}$ 的百里香酚作用于EECs时,gEECs的细胞核、细胞浆的形态均未产生明显变化,但当150 $\mu\text{g/mL}$ 的百里香酚作用于gEECs时,细胞膜破裂,细胞死亡;而且药物浓度 $\geq 100 \mu\text{g/mL}$ 时细胞LDH的释放量显著高于正常细胞组,gEECs细胞膜的完整性受到破坏。百里香酚作用于山羊子宫内膜上皮细胞后呈现一定的毒性作用,且毒性作用和药物的浓度有关。百里香酚作用于gEECs的安全范围在0~100 $\mu\text{g/mL}$,研究结果为百里香酚治疗奶牛等经济动物的炎症性疾病的临床用药浓度提供理论依据。

[关键词] 百里香酚;子宫内膜上皮细胞;细胞毒性;膜通透性

The Cytotoxic Effect of Thymol on Goat Endometrial Epithelial Cells

YAN Bao-qi¹,ZHANG Shi-dong^{1*},DONG Shu-wei¹,WANG Dong-sheng¹,NA Li-dong^{1,2},
SANG Meng-qi¹,YANG Hong-zao^{1,2},YAN Zuo-ting^{1*}

(1.Lanzhou Institute of Animal Husbandry and Pharmaceutical Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730050, China; 2.College of Veterinary Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

Abstract: In order to explore the cytotoxicity of thymol on goat endometrial epithelial cells (gEECs), gEECs was treated by different concentrations of thymol. And the cell growth curve, the changes of cell morphology, the integrity of the cell membrane was detected. The results showed that thymol has a role in promoting proliferation of the gEECs. There was a dose-dependent effect between thymol toxicity to gEECs and concentrations ($y = -0.008x + 1.2202$, $R^2 = 0.9767$), The inhibitory rate of cell proliferation increased with

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划重点课题(2012BAD12B03);中国农业科学院科技创新工程项目(CAAS-ASTIP-2014-LIHPS-03);甘肃省自然科学基金(1506RJYA146)

作者简介:闫宝琪,硕士,从事临床兽医方向研究。

通讯作者:严作廷,E-mail:yanzuoting@caas.cn;张世栋,E-mail:zhangshidong@caas.cn

the increasing of the drug concentration; And 50% inhibitory rate of proliferation (IC_{50}) of this drug on EECs is 100 $\mu\text{g/mL}$. When the 50 and 100 g/mL of thymol stimulated gEECs, the nuclear morphology and the cytoplasm of the gEECs cells didn't change significantly. But when 150 g/mL thymol treated gEECs, cell membrane rupture and cell would die; When the concentration was more than 100 g/mL , the integrity of cell membrane can be damaged, promoting the release of LDH significantly compared with normal cells group. In summary, there was a certain toxicity of thymol on goat endometrial epithelial cells, and the toxicity related to concentration. The safe concentration of thymol is in the range of 0~100 g/mL . Which provided a theoretical basis not only for the clinical treatment on the inflammatory diseases of cows and other economic animal but also for the relevant experiments of thymol at the molecular level.

Key words: thymol; endometrial epithelial cells; cytotoxicity; membrane permeability

子宫内膜炎 (Endometritis) 是奶牛的常见病之一, 多发生于产后, 是病原菌感染子宫内膜引起的炎症, 常导致奶牛屡配不孕^[1-2]。该病可造成奶牛生理功能紊乱、产奶量下降, 甚至终生不孕而被淘汰, 给养殖户造成严重危害, 经济损失巨大。据中国奶牛协会统计, 奶牛的繁殖障碍发生率高于其他牛, 而且在不孕的病因中以子宫内膜炎引起的不孕牛所占比例最高^[3,4]。临床上, 大量抗生素和激素应用于治疗子宫内膜炎, 导致耐药菌株的不断产生, 抗生素残留, 治疗效率明显降低。中草药具有明显的抗菌消炎, 毒副作用小, 增强免疫力, 改善血液循环和增加子宫收缩的作用, 所以近十几年来关于应用中草药治疗子宫内膜炎的研究成为热点^[5-6]。

百里香酚是一种单萜酚类物质, 最初从百里草中分离而得名, 即 5-甲基-2-异丙基苯酚 (5-methyl-2-iso-propylphenol)^[7]。研究发现百里香酚具有广谱抗菌活性, 对多种革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、真菌等均具有抑制作用^[8]。Aranxa Aznar 等^[9]研究发现将百里香酚、香芹酚和甲基混合后在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下能够有效抑制酵母菌繁殖生长, 抑制时间长达 21 d。Omran 等的研究也发现, 百里香精油对外阴道念珠菌有较强的抗真菌活性, 其效果优于氟康唑, 与 1 $\mu\text{g/mL}$ 的两性霉素 B 的抗真菌效果相当^[10]。体外实验表明, 百里香酚可以显著抑制低密度氧化脂蛋白诱导的人 THP-1 单核细胞促炎性细胞因子 $\text{TNF-}\alpha$ 、

$\text{IL-1}\beta$ 、 IL-6 并促进 IL-10 的基因和蛋白表达水平, 对一些炎症类疾病如皮炎、胸膜炎、腹膜炎和风湿性关节炎等均具有抗炎促愈合功能^[11-12]。

综上所述, 百里香酚有较好的抑菌抗炎效果, 对于一些炎症性疾病具有较好的应用前景, 但应用百里香酚治疗奶牛等经济动物的子宫内膜炎的研究还未见报道。近年来, 利用子宫内膜细胞的体外培养检测子宫生理功能的研究不断呈现新的进展, 同时利用 LPS 刺激子宫内膜上皮细胞建立的炎症模型检测炎症信号通路以及中草药抗炎机制的报道也在不断增加^[13-14]。实验中, 筛选出中草药作用于细胞无毒性作用的浓度是在分子细胞水平上检测中草药抗炎作用的前提条件。因此, 试验采用山羊子宫内上皮细胞 (gEECS) 作为材料, 研究百里香酚对其的毒性作用, 以期对百里香酚治疗奶牛子宫内膜炎的临床用药研究提供理论依据。

1 材料

1.1.1 细胞 山羊子宫内上皮细胞系 (EECs), 由西北农林科技大学动物医学院靳亚平教授惠赠。

1.1.2 主要仪器及设备 Memmert CO2 培养箱; Heal ForceB2 型生物安全柜; SW-CJ-1CU 型超净工作台; 倒置显微镜, Leica DMI6000B; MDC M2e 型多功能酶标仪; 细胞培养瓶、培养板为美国 eppendorf 产品。

1.1.3 药品及试剂 百里香酚 (Thymol, B21153, 100 mg), 上海源叶生物科技有限公司 ($\text{HPLC} \geq$

98%),用含 0.05%的 DMSO 将其稀释到所需要的浓度;DMEM/F12 培养基为 Gibco 公司产品;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)为杭州四季青公司产品;0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, pH7.2~7.4);MTT 为 Sigma 公司产品以 0.01 mol/L PBS 溶解至 5 mg/mL;瑞氏、姬姆萨染料为 Solarbio 公司产品;LDH 检测试剂盒(货号 A020-2)为南京建成生物工程研究所有限公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 从液氮中取出永生化山羊子宫内膜上皮细胞(EECs),37 ℃快速复苏,低速离心后添加含 10% FBS、100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素的 DMEM/F12 培养基,置于 37 ℃、5% CO₂ 饱和湿度的培养箱内培养。

1.2.2 细胞分组与处理 取 100 μL 浓度为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液接种于 96 孔培养板,24 h 后弃去旧培养基,加入含不同浓度的百里香酚的完全培养液 100 μL,百里香酚的终浓度分别为:0、10、20、40、60、80、100、120、150 μg/mL,每个浓度设置 8 个复孔。

1.2.3 MTT 检测百里香酚对细胞的增殖作用 继续培养 48 h 后,观察细胞增殖情况。弃去旧培养基,加入 5 mg/mL 的 MTT 20 μL,孵育 4 h。弃去多余的 MTT,每孔加入 200 μL 二甲基亚砷,低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解后在酶标仪上以 570 nm 检测各孔 OD 值,并以不含细胞的孔调零,记录各孔 OD 值,计算细胞的半数增殖抑制率(IC₅₀)^[15-16]。以药物浓度为横坐标,细胞相对存活率为纵坐标,绘制曲线。

A₀:药物处理前 OD 值;A₁:对照组 OD 值;A₂:药物处理 48 h 后 OD 值。

$$IC_{50} = (A_2 - A_0) / (A_1 - A_0) \times 100\%$$

1.2.4 百里香酚对 EECs 的形态的影响 取 1 mL 浓度为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液接种于 12 孔培养板,培养 24 h 后弃去旧培养基,加入含百里香酚终浓度为 0、100、150 μg/mL 的完全培养液 1 mL,每个浓度设置 4 个复孔。继续培养 48 h 后收集细胞(1200 r/min, 5 min),加入 500 μL

的无菌 PBS 重悬细胞,涂片,晾干,放入预冷的甲醇溶液中固定 15~30 min。接着滴加 2~3 滴瑞氏染液,染色 2~3 min 后滴加等量的吉姆萨染液,染色 10 min。每张涂片计数 100 个细胞,于显微镜下观察细胞形态^[17-19]。

1.2.5 EECs 细胞膜完整性的检测 取 0.5 mL 浓度约为 5×10^4 个/mL 的细胞悬液接种于 24 孔培养板,培养 24 h 后,弃去旧培养基。分别加入含百里香酚终浓度为 0、10、20、40、60、80、100、120、150 μg/mL 的完全培养液 0.5 mL,每组设三个重复孔。继续培养 48 h 后收集细胞上清液,6600 r/min,离心 10 min,严格按照 LDH 检测试剂盒说明书操作,检测各组上清液中 LDH 的含量。

1.2.6 统计学方法 应用 SAS 9.30 软件分析数据,Excel 绘图软件进行绘图。结果以平均值±标准差表示,实验结果采用单因素方差分析进行统计学分析。

2 结果与分析

2.1 百里香酚对 EECs 增殖的影响 结果发现,当百里香酚的浓度处在 10~150 μg/mL 时,对 EECs 有增殖抑制作用。随着药物浓度的升高对细胞的抑制作用越明显,且细胞的增殖抑制率与药物的浓度呈一定的线性关系($y = -0.008x + 1.2202$, $R^2 = 0.9767$,如图 1)。由此可计算,当细胞的增殖抑制率为 0.5 时(IC₅₀),百里香酚的作用浓度为 100 μg/mL。

2.2 百里香酚对 EECs 的细胞形态影响 正常的山羊子宫内膜上皮细胞多数为梭形,少数呈三角形,核圆居中,培养 24 h 后,细胞交织成网状。细胞贴壁良好,体积较大、折光性好,形态大小均匀一致(如图 3A,大图为 100×,小图为 400×);经 100 μg/mL 百里香酚处理 48 h 后,EECs 的密度增大,且在倒置显微镜下观察细胞生长状态良好(如图 3B,大图为 100×,小图为 400×);由图 C 可以看出当百里香酚浓度达到 150 μg/mL 时,作用相同的时间细胞出现死亡现象,细胞结构遭到破坏,细胞膜破裂,细胞核暴露,视野内有大量的细胞碎片存在(如图 3C,大图为 100×,小图为 400×)。

2.3 百里香酚对 EECs 的细胞核形态影响

瑞氏-姬姆萨染色使细胞核呈深浅不同的紫红色,胞浆呈浅蓝色。染色结果显示正常组和经 100 $\mu\text{g/mL}$ 的百里香酚作用 48 h 的细胞的胞质和胞核界限清晰,胞核完整,胞浆均匀,细胞边缘完整,视野内未出现死亡细胞以及形态异常的细胞。(如图 4a, 4b, 大图为 100 $\times$, 小图为 400 $\times$)。当百里香酚的浓度达到 150 $\mu\text{g/mL}$ 时,染色结果显示大部分细胞的细胞膜完整性遭到破坏。与正常细胞组相比,视野内少数细胞其细胞膜着色变浅,且细胞核多位于细胞膜边缘;大多数细胞的细胞膜完全消失,视野内只有紫红色的细胞核存在,但大多数细胞核结构完整,只有少量的细胞核发生破碎裂解。

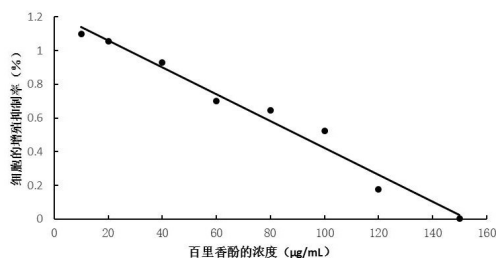


图1 0~150 $\mu\text{g/mL}$ 对 EECs 的促增殖作用

2.4 百里香酚对 EECs 细胞膜完整性的影响

测定结果显示:随着百里香酚浓度的升高,细胞培养液中 LDH 的含量有升高的趋势,但不存在规律性增长。且与对照组相比,当百里香酚的浓度大于 100 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞培养液中 LDH 的含量显著升高 ($P < 0.01$);与对照组相比 10、20、40、60、80、100 $\mu\text{g/mL}$ 的百里香酚作用细胞后培养液中 LDH 的含量虽然升高,但不存在显著性差异 ($P > 0.05$),如图 4 所示。

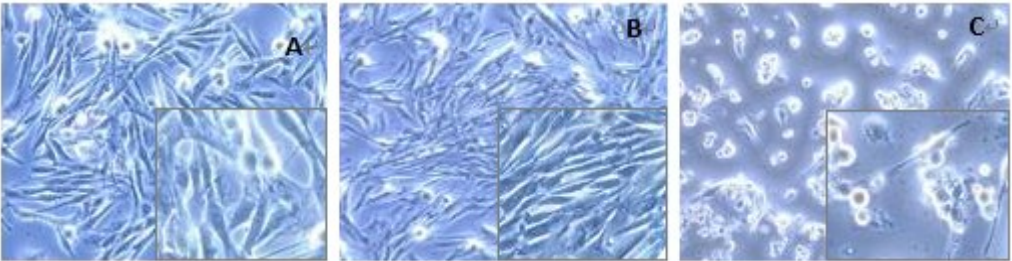
3 讨论

研究报道,通过阴道给药治疗妇科炎症具有可避免口服给药的首关效应和血药浓度的谷峰现象,避免药物对于胃肠道的刺激,避免注射给药的疼痛与心理恐惧,通过“First uterine-pass effect”能够将药物靶向传递到子宫内膜组织,因

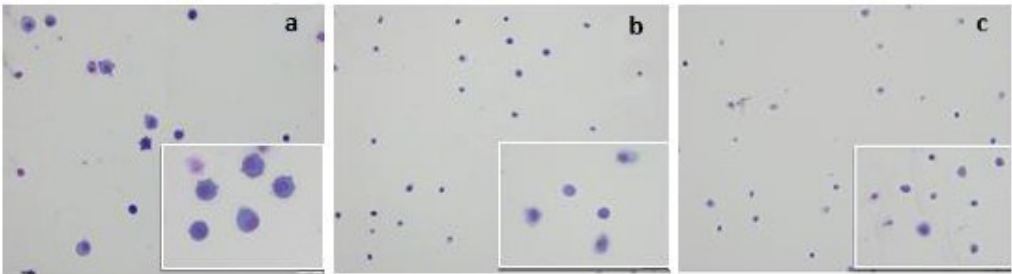
此,生物利用度高、药效显著^[20]。百里香酚具有抗炎、调节免疫力、抗氧化、抗癌等多种生物活性,在临床治疗中具有较好的应用前景,在将来的研究中百里香酚可以被开发成一种新型的子宫灌注剂,采用阴道给药治疗奶牛等经济动物的子宫内膜炎。那么,探明百里香酚对子宫内膜上皮细胞的刺激作用以及毒性作用是阐明其临床应用安全性的必要前提条件。所以试验开展百里香酚对子宫内膜上皮细胞体外的毒活性研究,为百里香酚治疗奶牛等经济动物子宫内膜炎的临床应用提供理论依据。

活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使外源性的 MTT 还原为难溶性的蓝紫色结晶物甲臞,并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。甲臞被溶解后所测得的光密度值越小,说明细胞存活率越低^[21-22]。本研究中 MTT 的结果表明,百里香酚对 EECs 的增殖抑制作用与其浓度成一定的关系,当浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 时达到 EECs 的半数增殖抑制率,因此可选用 0~100 $\mu\text{g/mL}$ 的百里香酚作用于 EECs 进行抗炎效果的研究。而在梁德洁^[23]用百里香酚对 LPS 诱发的乳腺炎小鼠的保护作用及作用机制研究中选取百里香酚对小鼠乳腺上皮细胞无毒性影响的最大浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 。这可能与百里香酚作用的细胞种类不同,细胞接种数量不同,实验操作不同等因素有关。

乳酸脱氢酶 (LDH) 是活细胞胞质内广泛存在的酶之一,正常情况下 LDH 不能透过细胞膜,但当细胞膜受损或细胞死亡导致细胞膜通透性改变时,则会释放到培养液中,释放的 LDH 与细胞膜的损伤程度或细胞死亡数成正比^[24]。检测培养液中 LDH 的含量可判断细胞膜的受损程度。本研究结果显示,当百里香酚的浓度 $\geq 100 \mu\text{g/mL}$ 时细胞释放的 LDH 含量显著升高,说明该浓度的百里香酚可显著引起细胞膜通透性增大。此外,细胞生长状态和瑞氏-姬姆萨染色结果显示,150 $\mu\text{g/mL}$ 的百里香酚对 EECs 的细胞膜能造成严重损伤,细胞膜破裂,细胞死亡。这一实验结果和之前的研究报道类似, Nostro



A: 正常细胞;B: 100 μg/mL 百里香酚处理的细胞;C: 150 μg/mL 百里香酚处理的细胞
图 2 不同浓度百里香酚作用 48 h 后对 EECs 生长状态的影响 (大图为 100×;小图为 400×)



A: 正常细胞;B: 100 μg/mL 百里香酚处理的细胞;C: 150 μg/mL 百里香酚处理的细胞。
图 3 不同浓度百里香酚作用 48 h 后对 EECs 形态的影响 (大图为 100×;小图为 400×)

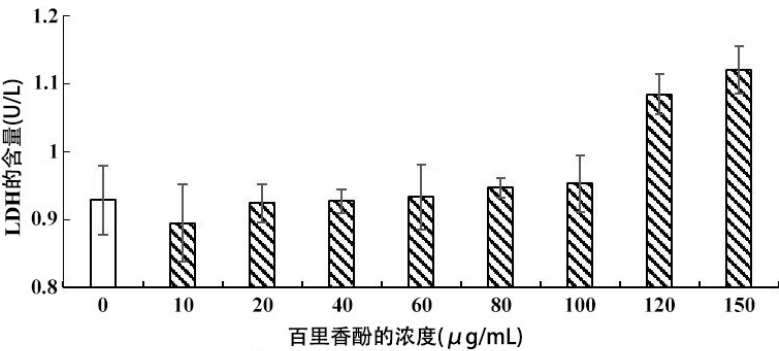


图 4 不同浓度的百里香酚对 EECs 乳酸脱氢酶释放的影响

等^[25]研究也报道百里香酚可以抑制金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌的生物膜形成。百里香酚可以通过影响细菌胞内 pH 稳态和无机离子平衡,从而破坏生物膜完整性对白色念珠菌产生抑制作用。进一步的研究表明,百里香酚可以增加小鼠平滑肌细胞胞膜去极化,导致肌质网 Ca^{2+}

离子释放,影响细胞膜的通透性^[26-28]。由此可见,百里香酚能够破坏细胞膜的完整性,而且这可能与药物被细胞膜的转运吸收有关。

Zu 等^[26]人研究证实,由于百里香精油对人类癌症细胞具有较强的细胞毒性,因此百里香精油也具有一定的抗癌作用。其对PC-3、A549 和

MCF-7肿瘤细胞株 50%抑制浓度 (IC₅₀) 分别为 0.010% (V/V)、0.011% (V/V) 和 0.030% (V/V)。此外香芹酚和百里香酚作为目前应用最为广泛的重要香料之一,被广泛应用于饲料添加以及一些口腔卫生品和洗涤物品^[27]。

4 结 论

百里香酚对山羊子宫内膜上皮细胞的安全剂量为 $\leq 100\mu\text{g/mL}$,该剂量范围内药物对细胞活力和形态结构无显著影响;大于该剂量的百里香酚可显著增大子宫内膜上皮细胞的膜通透性,产生细胞毒性作用。综上所述,百里香酚对细胞的毒性作用的研究为其治疗奶牛等经济动物的炎症性疾病,癌细胞的抑制作用,以及作为食品添加剂的安全使用剂量提供一定的理论依据和参考价值。

参考文献:

- [1] Madoz L V, Giuliadori M J, Jaureguierry M, *et al.* The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows[J]. J Dairy Sci, 2013, 96(7): 4333-4339.
- [2] Polat B, Cengiz M, Cannazik O, *et al.* Endometrial echotexture variables in postpartum cows with subclinical endometritis[J]. AnimReprod Sci, 2015, 155:50-55.
- [3] 辛任升,刘宇,郝宝成,等. 苦豆子及其复方药物对奶牛子宫内膜炎 5 种致病菌的体外抑菌活性研究[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(04): 636-639.
- [4] 戴浩楠,石慧,郑明学,等. 雁门关地区奶牛子宫内膜炎病原菌分离鉴定及其致病性[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(04): 646-649.
- [5] 邝晓娇. 丹参水提物对 LPS 诱导子宫内膜上皮细胞炎症的抗炎机制研究[D]. 中国农业科学, 2014.
- [6] 何斌,陈洁,金尔光,等. 中草药防治奶牛乳房炎的研究进展[J]. 2016, 50(5): 60-64.
- [7] 仇昆仑,毛海舫,欧文华,等. 百里香酚的研究进展[J]. 香料香精化妆品, 2008, 4(02): 28-32.
- [8] 王娣,谢海伟,曹珂珂,等. 麝香草酚抑菌活性及其影响因素研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(14): 96-98.
- [9] Arantxa A P, Fernández S, Paula M P, *et al.* Antimicrobial activity of nisin, thymol carvacrol and cymene against growth of *Candida lusitanae*[J]. Food Science and Technology, 2013, 29(10): 1177.
- [10] Omran S M, Esmailzadeh S, Rahmani Z. Laboratory study of anticandidal activity of thyme, pennyroyal and lemon essential oils by micro dilution method[J]. Jundishapur J Microbiol, 2010, 3(4): 161-167.
- [11] Kavoosi G, Telxeira D A, SILVA J A, Saharkhiz M J. Inhibitory effects of Zataria multiflora essential oil and its main components on nitric oxide and hydrogen peroxide production in lipopolysaccharide-stimulated macrophages[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2012, 64(10): 1491-1500.
- [12] Dhaneshwar S, Patel V, Patil D, *et al.* Studies on synthesis, stability, release and pharmacodynamic profile of a novel diacerein-thymol prodrug[J]. Bioorganic & medicinal chemistry letters, 2013, 23(1): 55-61.
- [13] Madoz L V, Giuliadori M J, Jaureguierry M, *et al.* The relationship between endometrial cytology during estrous cycle and cutoff points for the diagnosis of subclinical endometritis in grazing dairy cows[J]. J Dairy Sci, 2013, 96(7): 4333-4339.
- [14] Polat B, Cengiz M, Cannazik O, *et al.* Endometrial echotexture variables in postpartum cows with subclinical endometritis[J]. AnimReprod Sci, 2015, 155:50-55.
- [15] 辛任升,刘宇,郝宝成,等. 苦豆子及其复方药物对奶牛子宫内膜炎 5 种致病菌的体外抑菌活性研究[J]. 中国兽医学报, 2015, 35(04): 636-639.
- [16] 戴浩楠,石慧,郑明学,等. 雁门关地区奶牛子宫内膜炎病原菌分离鉴定及其致病性[J]. 中国兽医学报, 2016, 36(04): 646-649.
- [17] Fischer, C, Drillich, M, Odau, S, *et al.* Selected pro-inflammatory factor transcripts in bovine endometrial epithelial cells are regulated during the oestrous cycle and elevated in case of subclinical or clinical endometritis[J]. Reprod Fertil Dev, 2010, 22(5): 818-829.
- [18] Swangchan-Uthai, T, Lavender, C R, Cheng, Z, *et al.* Time course of defense mechanisms in bovine endometrium in response to lipopolysaccharide[J]. Biol Reprod, 2012, 87(6): 13.
- [19] 杨洋,吴国娟,李培峰,等. 脂质体瞬时转染 siRNA 抑制肾小管上皮细胞去乙酰化蛋白酶 1 的表达[J]. 中国畜牧兽医, 2012, 39(08): 4-9.
- [20] 赵世云,赵新新,苏华荔,等. 猪外周血 T 淋巴细胞增殖反应 MTT 检测方法的建立[J]. 中国畜牧兽医, 2010, 37(12): 35-38.
- [21] Ding L, Liu B, Qi L, *et al.* Anti-proliferation, cell cycle arrest and apoptosis induced by a natural xanthone from *Gentianopsis paludosa* Ma, in human promyelocytic leukemia cell line HL-60

cells [J]. *Toxicology in vitro*, 2009, 23(3):408-417.

[22] 刘新利. NF- κ B 抑制剂和 JNK 抑制剂对白血病细胞的协同杀伤作用[D]. 上海师范大学, 2014.

[23] 孟 凡, 靳宏辉. 采用析因设计研究瑞氏-吉姆萨染色法的影响因素[J]. *医疗卫生装备*, 2015, 36(08): 124-126.

[24] Angius F, Floris A. Liposomes and MTT cell viability assay: An incompatible affair [J]. *Toxicology in Vitro*, 2015, 29 (2): 314-319.

[25] Stockert J C, Blázquez-Castro A, Cañete M, *et al.* MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets[J] . *ActaHistochemica*, 2012, 114 (8): 785-796.

[26] 彭仕琪. 碘氧铈纳米材料对人类皮肤角质细胞的毒性研究 [D]. 太原理工大学, 2015.

[27] 梁德洁. 百里香酚对 LPS 诱发的乳腺炎小鼠的保护作用及作用机制研究[D]. 吉林大学, 2014.

[28] 李伟泽, 付丽娜, 赵 宁, 等. 黄藤素柔性纳米脂质体的制备及体外透黏膜给药研究 [J]. *中国药理学杂志*, 2015, 50(24): 2139-2145.

[29] Nostro A, Roccaro A S, Bisignano G, *et al.* Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms [J]. *Journal of medical microbiology*, 2007, 56(4): 519-523.

[30] Zu Y G, Yu H M, Liang L, *et al.* Activities of ten essential oils towards propionibacterium acnes and PC-3, A-549 and MCF-7 cancer cells[J]. *Molecules*, 2010, 15: 3200-3210.

[31] 董茂峰, 韩 薇, 白 冰, 等. 气相色谱法测定饲料香味剂中香芹酚和百里香酚的含量[J]. *上海农业学报*. 2015, 31 (03): 79-81.

(编辑:陈 希)