

实验技术与方法

原代肝、肾细胞培养在保健食品原料毒性筛选中的应用

戴伟¹ 顾光² 高芃³ 徐海滨³

(1. 卫生部机关服务局, 北京 100044; 2. 中国疾病预防控制中心教育培训处, 北京 102206;
3. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所, 北京 100021)

摘要:目的 建立肝、肾毒性的体外筛选方法, 并研究其在保健食品原料毒性筛选中的应用。方法 以原代肝细胞、原代肾细胞、CHL 和 HepG2 细胞为平台, 用 MTT 法检测毒物对细胞活性的半数抑制浓度 IC_{50} , 用生化学方法检测培养液中酶学指标的变化, 作为毒性效应标志物; 用已知毒物对该方法进行验证; 用该方法对大黄、苍术、红花水提物进行毒性筛选。结果 该方法能够筛选出已知毒物的肝肾毒性; 在本实验条件下, 未发现大黄、苍术对肝肾存在靶毒性, 红花可能存在潜在的肾毒性。结论 本研究建立的方法可用于保健食品原料的毒性筛选; 有必要对红花进行更深入的安全性研究。

关键词: 毒性筛选; 原料; 保健食品; 肝细胞; 肾细胞

中图分类号: TS202.1; S481.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-8456(2010)03-0233-04

Application of *in vitro* Screening Test in Screening the Toxicity of Raw Materials for Health Food on Primary Hepatocyte and Nephrocyte Cell Culture

DAI Wei, GU Guang, GAO Peng, XU Hai-bin

(Bureau of Internal Services, Ministry of Health, Beijing 100044, China)

Abstract: Objective To establish an *in vitro* screening method for hepatotoxicity and nephrotoxicity and to apply the test in screening the toxicity of raw materials for health food. **Method** Primary hepatocytes, primary nephrocytes, CHL and HepG2 cells were cultured. IC_{50} values were tested by MTT, and the enzymes leaking from cells were measured by biochemical methods and used as markers for toxicity. The method was validated by known toxic substances and was applied in screening the toxicity of raw materials for health food, such as water-extracted Rhubarb, Rhizoma Atractylodis and Safflower. **Results** The method was effective for screening the hepatotoxicity and nephrotoxicity. Target toxicity was not found from Rhubarb and Rhizoma Atractylodis on hepatocytes and nephrocytes. It might have potential nephrotoxicity from Safflower water-extracts. **Conclusion** The *in vitro* screening test for hepatotoxicity and nephrotoxicity was able to be used in screening raw materials for health food. Further study on evaluating the safety of Safflower water-extracts might be needed.

Key words: Toxicity Screening; Raw Material; Health Food; Hepatocyte; Nephrocyte

保健食品作为一种特殊食品, 人们对其安全性有着更高的要求。保健食品不同于药品, 其食用人群更广、服用时间更长, 如果应用于保健食品的原料有不安全因素, 其对人类健康影响更大。

由于肝肾毒性是保健食品使用过程中最常发生的毒副作用, 一旦发生, 对人体健康的损害极大, 因此本研究拟建立一种简便、快速的筛选毒物潜在肝、肾毒性的体外实验方法, 并探讨其在保健食品原料

安全性评价中的应用, 以达到在众多保健食品原料中快速、高效地筛选出有潜在肝、肾毒性的原料的目的, 为进一步的研究提供线索。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

四氯化碳 (CCl_4 , 化学纯) 购自北京化学试剂厂; 苍术苷 (Atractylósíde, ATR) 购自 Sigma 公司; 马兜铃酸 (Aristolochic Acid, AA) 购自 Sigma 公司; 氟化钠 (NaF, 分析纯) 购自北京化学试剂厂; 庆大霉素 (GM) Amresco 分装; 苍术、大黄、红花均为市售饮片, 购自同仁堂药店。四氮唑盐 (MTT) 购自 Sigma; MEM 培养基购自 Gibco; 胎牛血清 (FBS) 购自杭州四季青生物工程材料有限公司; 谷草转氨酶 (AST)、

收稿日期: 2010-04-06

基金项目: 国家科技部“十一五”支撑计划(2006BAK02A07)

作者简介: 戴伟 男 硕士 研究方向为营养与食品卫生

E-mail: daiwei1967@yahoo.com.cn

通信作者: 徐海滨 男 研究员 博士生导师 E-mail:

hbxu1231602@vip.sina.com

谷丙转氨酶(ALT)和乳酸脱氢酶(LDH)等酶学检测试剂盒购于中生北控生物科技公司。

1.2 主要仪器

BB5060型CO₂恒温细胞培养箱(Heraeus公司);BT01-100型蠕动泵(保定格兰公司);RA-1000 III型全自动生化分析仪(Technicon公司);SUNRISE型酶标分析仪(TECAN公司)。

1.3 受试物的配制

1.3.1 四氯化碳、苍术苷、马兜铃酸 先用DMSO(二甲亚砜)溶解,得到100倍于终浓度的储备液,4℃冰箱保存。每次试验前将其溶于培养液中,配制成不同浓度受试物,DMSO的体积分数不超过1%。

1.3.2 氟化钠、庆大霉素 直接溶于培养液中,配制成不同的浓度,临用前现配。

1.3.3 苍术、红花、大黄水提液 分别将3种保健食品原料的市售饮片研磨成粉末状,用双蒸水提取2次。滤纸过滤后将液体置于旋转蒸发器中,蒸馏、浓缩,最后得到相当于生药量1.0 g/ml的浓缩液,经0.22 μm滤膜过滤除菌后,4℃冰箱保存。试验前与细胞培养液配成一定浓度的受试物溶液。

1.4 细胞的准备

1.4.1 大鼠原代肝细胞制备及培养 按文献报道的方法进行^[1]。

1.4.2 大鼠原代肾细胞制备及培养 按文献报道的方法进行^[2]。

1.4.3 中国仓鼠肺成纤维细胞株 CHL 上海市疾病预防控制中心提供。

1.4.4 肝肿瘤细胞株 HepG2 购自中国医学科学院基础研究所细胞中心。

1.5 已知毒性的受试物的染毒

上述4种细胞分别接种于96孔板、24孔板24h后,分别用不同浓度的四氯化碳、苍术苷、氟化钠、马兜铃酸、庆大霉素染毒细胞,染毒时间为24h。

1.6 未知毒性的保健食品原料(苍术、红花、大黄)水提液的染毒

分别将3种保健食品原料水提液的细胞培养液配成一定浓度的受试物溶液,浓度分别相当于生药量的0.003、0.006、0.012、0.025、0.050和0.100 g/ml。染毒细胞,染毒时间为24h。

1.7 细胞活性的测定

1.7.1 MTT 比色法 按照文献报道的方法进行^[3]。

1.7.2 结果判定 计算每个培养板各浓度吸光度的平均值,再计算每一浓度下所做培养板的吸光度的平均值。每组的吸光度减去空白对照,再利用该

值求出各处理组相对于对照组的活性。

细胞活性计算公式: $\text{细胞活性} = \frac{\text{处理组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值} - \text{空白组 OD 值}} \times 100\%$

再用作图法和直线回归计算出细胞活性50%时的受试物浓度,即为该受试物的半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.8 细胞培养液中酶学指标的测定

细胞染毒结束后,收集各组细胞上层培养液,在自动生化分析仪上检测酶学指标的变化。经过预实验,确定以4种细胞的ALT、AST、LDH为细胞接触毒物的效应标志物,检测方法均按试剂盒所述。

1.9 结果表示

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。半数抑制浓度 IC₅₀ 用作图法和直线回归计算。

2 结果

2.1 5种已知毒性受试物的染毒结果

2.1.1 5种毒物对4种细胞活性的影响 结果见表1。有明确肝毒性的四氯化碳对肝细胞的IC₅₀值为0.800 mg/ml,对其他3株细胞的IC₅₀值是肝细胞的4倍左右;有明确肾毒性的庆大霉素对肾细胞的IC₅₀值为1.480 mg/ml,对其他3株细胞的IC₅₀值是肾细胞的2倍左右;有明确肝、肾毒性的苍术苷对肝、肾细胞的IC₅₀值分别为0.163和0.405 mg/ml,比对另外2株细胞的IC₅₀值低10倍以上;有明确肾毒性的氟化钠对肾细胞的IC₅₀值为0.053 mg/ml,比对其他3株细胞的IC₅₀值低3~5倍;有明确肾毒性的马兜铃酸对肾细胞的IC₅₀值比对CHL和HepG2细胞株的IC₅₀值低7~12倍。

表1 5种毒物对4种细胞的IC₅₀(mg/ml)

	肝细胞	肾细胞	CHL细胞	HepG2细胞
四氯化碳	0.800	3.188	3.256	3.229
庆大霉素	2.807	1.480	3.171	1.969
苍术苷	0.163	0.405	>5.000	>5.000
氟化钠	0.173	0.053	0.244	0.190
马兜铃酸	0.040	0.025	0.309	0.177

2.1.2 5种毒物对4种细胞培养液中的酶学指标的影响 四氯化碳使肝细胞酶漏出量显著升高的最低浓度是1.00 mg/ml,与其他3种细胞相比是最低的;庆大霉素使肾细胞酶漏出量显著升高的最低浓度是1.20 mg/ml,与其他3种细胞相比最低;苍术苷使肝、肾细胞酶漏出量显著升高的最低浓度分别是0.04和0.16 mg/ml,而对CHL和HepG2细胞在最高浓度都没有使其酶漏出量显著升高;氟化钠使肾细胞酶漏出量显著升高的最低浓度是0.04 mg/ml,相比其他3种细胞也是最低的;马兜铃酸使肾细胞

酶漏出量显著升高的最低浓度是0.02 mg/ml,与肝细胞的相近,与 CHL 和 HepG2 细胞相比较低。检测结果见表 2。

表 2 5 种毒物使 4 种细胞酶漏出量显著升高时的最低浓度(mg/ml)

	肝细胞	肾细胞	CHL 细胞	HepG2 细胞
四氯化碳	1.00	2.00	3.00	3.00
庆大霉素	3.00	1.20	3.40	5.00
苍术苷	0.04	0.16	>5.00	>5.00
氟化钠	0.18	0.04	0.24	0.18
马兜铃酸	0.03	0.02	0.10	0.20

2.2 3 种保健食品原料水提液的染毒结果

2.2.1 3 种受试物对细胞活性的影响 结果见表 3。大黄对 CHL 的 IC_{50} 值为 0.005 g/ml,其他 3 种细胞的 IC_{50} 值是其 8 倍以上;苍术对 CHL 细胞的 IC_{50} 值为 0.007 g/ml,其他 3 株细胞是其 2 倍以上;红花对肾细胞和 CHL 细胞的 IC_{50} 值均为 0.007 g/ml,比 HepG2 细胞 IC_{50} 值略低,约为肝细胞的 1/3。

表 3 3 种保健食品原料水提物对 4 种细胞的 IC_{50} (g/ml)

	肝细胞	肾细胞	CHL 细胞	HepG2 细胞
大黄	>0.100	0.048	0.005	0.039
苍术	0.050	0.017	0.007	0.016
红花	0.024	0.007	0.007	0.011

2.2.2 3 种受试物对 4 种细胞培养液中的酶学指标的影响 检测结果见表 4。大黄使肾细胞和 HepG2 细胞的酶漏出量显著升高的最低浓度均为 0.025 g/ml,对 CHL 细胞是 0.050 g/ml,对肝细胞是 0.100 g/ml;苍术使肾细胞、CHL 和 HepG2 细胞的酶漏出量显著升高的最低浓度均为 0.025 g/ml,对肝细胞是 0.050 g/ml;红花使肾细胞的酶漏出量显著升高的最低浓度是 0.003 mg/ml,即在受试物的最低浓度下即出现酶漏出量显著升高,是 4 种细胞中最低的。

表 4 3 种受试物使 4 种细胞酶漏出量显著升高时的最低浓度(g/ml)

	肝细胞	肾细胞	CHL 细胞	HepG2 细胞
大黄	0.100	0.025	0.050	0.025
苍术	0.050	0.025	0.025	0.025
红花	0.025	0.003 ^a	0.025	0.012

注:^a为与 CHL 细胞、HepG2 细胞相比, $P < 0.01$ 。

3 讨论

靶器官毒性一直是人们比较关注的问题,尤其是肝毒性和肾毒性。肝脏作为人体最大的消化腺,是物质代谢的主要器官,也是环境化学毒物的主要靶器官。各种化学毒物在肝内生物转化形式多种多样,肝毒作用的靶点及其毒作用过程也极为复

杂。肾脏为机体排泄终末代谢产物的重要器官,又是化学毒物或其代谢产物毒作用的重要靶器官。除主要担负排泄的功能外,肾脏还具有调节血压和血容量、调控电解质和酸碱平衡,分泌激素、参与物质代谢等多种功能,对维持机体内环境稳定性有着极其重要的作用。由于肾脏具有特殊的结构和功能,非常容易遭受化学毒物攻击成为毒作用的靶子。保健食品使用过程中最常发生的毒副作用就是肝、肾毒性。

评价化学物质的肝、肾毒性的传统方法主要是动物体内实验,通过大体解剖检查、称量重量计算脏器指数、血液生化学检查及病理形态学检查来发现化学物的肝、肾毒性。但随着需检测的化学物大量增加,以及对实验动物保护概念的关注,传统动物实验的方法已不能满足实际需要。用简便快速的体外实验方法对大量化学物进行筛选,发现最有可能具有毒性的物质,对其优先进行进一步的研究,已成为许多毒理学家的共识和研究的热点。

本研究通过 4 种不同类型细胞的组合(原代肝细胞、原代肾细胞、CHL 和 HepG2 细胞株),尝试建立一种筛选毒物潜在肝、肾毒性的体外实验方法。用 5 种已知毒物(四氯化碳、庆大霉素、苍术苷、氟化钠、马兜铃酸)对该方法进行了验证。从实验结果可见,有肝、肾毒性的物质对原代肝细胞、原代肾细胞的 IC_{50} 值比对其他类型细胞的 IC_{50} 值低,通常至少低 1/4 ~ 1/2 倍。细胞胞内酶在维持细胞的正常生理活性方面起重要作用,如果细胞受到有害物质的作用,细胞的功能丧失或细胞膜的完整性受到损害,细胞内的酶可以渗漏到细胞外,因此可以用模式细胞胞内酶泄漏的程度作为细胞毒性的效应标志物。本试验筛选出 AST、ALT、LDH 为细胞损伤的酶学效应标志物。研究发现,原代培养肝、肾细胞对肝、肾毒物的毒性较敏感,在较低的浓度下即出现酶漏出量显著升高。验证结果表明,该体外实验方法可识别出 5 种毒物的肝、肾毒性,且检测方法简便快捷,受试物用量少,并能减少实验动物用量,节省费用,有进一步研究的价值。

利用该方法对未知毒性的 3 种保健食品原料(大黄、苍术、红花)的水提物进行了毒性筛选。实验结果可见,大黄和苍术对肝、肾细胞的 IC_{50} 和使酶漏出量显著升高时的浓度,与 CHL 和 HepG2 细胞相近,未表现出对肝、肾细胞存在靶毒性。红花对肾细胞的 IC_{50} 与 CHL 和 HepG2 细胞相近,但相关酶漏出量显著升高时的浓度明显低于 CHL 和 HepG2 细胞($P < 0.01$),提示红花在低浓度下对肾细胞造成了损伤。

林邦和等^[4]曾用动物实验的方式对红花煎剂的毒性进行研究,用含生药 0.24、0.48 和 0.96 g/kg 的红花煎剂给妊娠大鼠灌胃,观察其对大鼠妊娠和胚胎发育的影响,结果表明红花煎剂对母体及其胚胎均有明显的毒性,可导致母体流产、体重降低、肾体指数升高,胚胎死亡率和宫内生长迟缓(IUGR)发生率上升,认为红花有终止早期妊娠和对胚胎有致死、致 IUGR 等毒性,并与剂量密切相关。曹毅君等^[5]曾报道了一例红花注射液引起急性肾衰综合征的病例,认为是药物过敏所致。红花作为一种长期大量服用的保健食品的原料使用应采取谨慎态度。本研究建立的简便、快速的肝肾毒性筛选实验方法可以在保健食品原料安全性筛选中应用。

参考文献

[1] SEGLEN P O. Preparation of isolated rat liver cells[J]. Meth Cell Biol, 1976 (13): 29-83.
 [2] 卢永科,李秋娟,宫德正. 利用原代培养细胞进行药物短期毒性筛选方法的建立[J]. 卫生毒理学杂志, 2003, 17(2): 112-114.
 [3] PONSODA X, JOVER R, NuÑEZ C, et al. Evaluation of the cytotoxicity of 10 chemicals in human and rat hepatocytes and in cell lines: correlation between *in vitro* data and human lethal concentration[J]. Toxic *in Vitro*, 1995, 9(6): 959-966.
 [4] 林邦和,严冬,周立人. 红花对大鼠妊娠和胚胎发育的毒性和影响[J]. 安徽中医学院学报, 1998, 17(4): 50-52.
 [5] 曹毅君,刘桂枝,钟美声. 一例红花注射液致急性肾衰综合征的治疗及护理[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2002, 23(10): 1189.

实验技术与方法

椰毒假单胞菌酵米面亚种脉冲场凝胶电泳分型的研究

郭云昌 王 岗 杜春明 付 萍 裴晓燕

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:目的 建立椰毒假单胞菌酵米面亚种的脉冲场凝胶电泳(pulsed-field gel electrophoresis, PFGE)分型方法,并对 29 株分离株进行 PFGE 分型研究。方法 分别选择 5 种限制性内切酶(*Xba* I、*Spe* I、*Not* I、*Sma* I、*Asc* I)酶切椰毒假单胞菌酵米面亚种染色体 DNA 以进行 PFGE 分析,并利用 BioNumerics 软件对分离株的指纹图谱进行聚类分析。结果 *Not* I、*Sma* I 和 *Asc* I 的酶切片段过小,而 *Xba* I 酶切片段的大小适中但数量过多,不能获得清晰可辨的图谱,均不适于椰毒假单胞菌酵米面亚种的 PFGE 分型。*Spe* I 酶切的 PFGE 条带数量和大小适中、指纹图谱清晰可辨,对椰毒假单胞菌酵米面亚种具有足够的分辨率。结论 本研究建立的 PFGE 分型方法可应用于椰毒假单胞菌酵米面亚种的分子分型和溯源。

关键词:椰毒假单胞菌酵米面亚种;脉冲场凝胶电泳;分子分型

中图分类号:R155.5 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2010)03-0236-04

Molecular Typing of *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* with Pulsed-Field Gel Electrophoresis

GUO Yun-chang, WANG Gang, DU Chun-ming, FU Ping, PEI Xiao-yan

(National Institute of Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To establish a method for molecular typing *Pseudomonas cocovenenans* subsp. *farinofermentans* with pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), and to analyze the type of 29 isolates with PFGE method. **Method** The isolates were digested with 5 kinds of restriction endonucleases *Xba* I, *Spe* I, *Not* I, *Sma* I and *Asc* I, and the PFGE

收稿日期:2010-03-08

基金项目:国家自然科学基金青年基金(30901200)

作者简介:郭云昌 男 副研究员 研究方向为食品卫生 E-mail:yunchangguo2006@yahoo.com.cn

通信作者:裴晓燕 女 助理研究员