

保健食品快速筛选试验 ——细胞毒性方法的确定

隋海霞¹ 高 芑¹ 张立实² 仲伟鉴³ 严卫星¹ 刘长喜¹ 徐海滨¹

(1. 中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021;2. 四川大学华西公共卫生学院,四川 成都 610041;
3. 上海市疾病预防控制中心,上海 200335)

摘要:为建立保健食品的快速安全性评价方法,用 CHO 和 V₇₉ 两个细胞系对三七进行了 MTT 法、中性红吸收法、集落形成法进行细胞毒性试验,用 BalB/c 细胞、CHL 细胞、SL - 7 细胞 3 个细胞系对川芎用上述 3 种方法进行了细胞毒性试验。结果发现:用 CHO 和 CHL 细胞系,中性红吸收法做出的细胞毒性结果比较稳定可靠。

关键词:食品;营养保健品;研究技术;三七;川芎

Rapid evaluation of safety of ingredients from health food

Sui Haixia, Gao Peng, Zhang Lishi, Zhong Weijian, Yan Weixing, Liu Changxi, Xu Haibin
(National Institute for Nutrition and Food Safety, Chinese CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: There are many inadequacies in the inspection of health foods in China. The efficiency of conventional evaluation methods is too low. The study on safety evaluation technique and standard of ingredients from health foods was aimed at establishing a rapid method for estimating the safety of functional foods. This article only dissertated in one aspect, that is, cytotoxicity. In this article, notoginseng and rhizome of Sichuan lovage were taken for exmple. Three methods were used, that is, MTT, NRU and clony formation assay. For notoginseng, CHO and V₇₉ cell lines were selected. For rhizome of Sichuan lovage, the cell lines were CHL, BalB/C and SL - 7 cell lines. The results showed that NRU method on CHO and CHL cell lines was more sensitive and reliable.

Key Words: Food; Dietary Supplements; Investigative Technique, PANAX NOTOGINSENG;
LIGUSTICI CHUANXIONG

我国保健食品的安全性评价方法中存在一些不足,如:保健食品种类和数量多,但是提供的基础数据少;传统的检验方法效率低等。随着中国加入 WTO,这两者之间的矛盾日益尖锐。本课题的目的是建立一套快速、安全、有效的保健食品安全评价筛选系统。本文仅就细胞毒性实验的方法进行探讨,旨在为建立一套快速、安全、有效的保健食品原料安全性评价筛选系统以及技术标准提供依据。

1 材料和方法

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(2001BA804A06)

作者简介:隋海霞 女 硕士

通讯作者:徐海滨 男 研究员

1.1 样品来源 三七和川芎均购于北京松兰饮片厂,经中国中医研究院中药研究所鉴定,川芎为伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的干燥根茎的饮片。三七为五加科植物三七 *Panax notoginseng* (Burk) F H Chen 的干燥根茎的饮片。

1.2 细胞系 中国仓鼠卵巢细胞 CHO(华西公共卫生学院提供)、中国仓鼠肺细胞 CHL(上海市疾病预防控制中心提供)、中国仓鼠肺细胞 V₇₉(华西公共卫生学院提供)、SL - 7 人胚肺细胞(上海市疾病预防控制中心提供)、BalB/c 3T3 小鼠胚胎成纤维细胞

This work was supported by the Grant from National Sciece and Technology Program Funds of Ministry of Science and Technology, China. (2001BA804A06)

(上海市疾病预防控制中心提供)。

1.3 仪器和试剂 MEM 培养基、RPMI1640 培养基(美国 GIBCOBRL 公司)、小牛血清、胎牛血清(杭州四季青生物制品有限公司)、中性红水溶液(5 mg/ml 的中性红水溶液)、固定液(1%CaCl₂ - 1%福尔马林水溶液)、抽提液(1%醋酸 - 50%乙醇水溶液)、二甲基亚枫(Dimethyl Sulphoxide DMSO)(sigma 公司)、0.25%胰蛋白酶(新疆化学试剂厂)、酶标仪(奥地利 Tecan 公司)、CO₂ 孵箱(Heraeus LISHEN BB5060, 美国 Forma 公司)。

1.4 方法

1.4.1 中性红吸收法 将 CHO 和 CHL 细胞用含 10%小牛血清的 MEM 培养基在 5%CO₂、37℃ 饱和湿度培养箱内常规培养。细胞培养至对数生长期时用 0.25%的胰蛋白酶消化,用含 20%小牛血清的 MEM 培养基配成密度为 10⁵/ml 的单细胞悬液,接种于 96 孔培养板中培养,每孔体积 100 μl。24 h 后细胞生长接近单层,向每孔中添加含一定浓度受试物的培养基 100 μl,继续培养 24 h。培养结束前 2 h,每孔加入中性红溶液(250 μg/ml) 50 μl,继续培养 2 h 后倾去培养液,每孔加入 100 μl 固定液固定 1 min。去除固定液,加入抽提液,每孔 100 μl,室温放置 20 min 使细胞中的中性红溶液全部溶出。充分振荡后使用酶标仪在波长 570 nm 下测定吸光度。^[1,2]

1.4.2 MTT 法 细胞培养、接种及受试物处理方法均同中性红吸收法。培养结束前 4 h,每孔加入中性红溶液 15 μl,继续培养 4 h 后倾去培养液,每孔加入 150 μl 二甲基亚枫 DMSO (Dimethyl Sulphoxide)。充分振荡后用酶标仪在波长 490 nm 下测定吸光度。^[3]

1.4.3 集落形成法^[4]

制备细胞悬液 取对数生长期的单层培养细胞,用 0.25%胰蛋白酶消化并吹打成单个细胞,把细胞悬浮在含 10%胎牛血清的 RPMI1640 培养液中备用。

接种细胞 根据细胞增殖能力,将细胞悬液作梯度倍数稀释,以适当的细胞密度接种于培养皿中。按每皿含 50、100、200 个细胞的梯度密度,分别接种于含 10 ml 预温 37℃ 培养液的培养皿中,然后以十字方向轻轻晃动培养皿,使细胞分散均匀。

培养 将平皿移入 CO₂ 孵箱,在 37℃、5%CO₂ 及饱和湿度环境下,静止培养 2~3 周。

染色 当培养皿中出现肉眼可见的克隆时,终止培养。弃去培养液,用 PBS(0.01 mol/L, pH7.4)小心浸洗 2 次。加入纯甲醇 5 ml 固定 15 min。弃去固定液,加适量姬姆萨应用液染色 10~30 min,然后流水缓慢洗去染色液,空气干燥。

计数 将平皿倒置并叠加一张带网格的透明胶片,用肉眼直接计数克隆数,或在显微镜下计数大于 50 个细胞的克隆数。按下式计算克隆形成率。

$$\text{克隆形成率} = \frac{\text{克隆数}}{\text{接种细胞数}} \times 100\%$$

2 结果

2.1 三七的研究结果

2.1.1 MTT 法 如表 1、2 所示,三七提取物在 2.1~2.5 mg/ml 剂量范围内可引起 CHO 和 V₇₉ 细胞 A 值显著降低(P < 0.05),即可引起 CHO 和 V₇₉ 细胞活细胞数减少,并存在明显的剂量效应关系。三七提取物浓度越高其毒性越大,在浓度为 2.5 mg/ml 时,CHO 和 V₇₉ 细胞存活率分别为 3.24% 和 12.30%。表明在较高剂量下三七提取物对正常细胞的活性和功能状态有较大影响,即可产生明显的细胞毒性。

表 1 三七对 CHO 细胞的毒性作用(MTT 法)

剂量 mg/ml	A ($\bar{x} \pm s$)	存活率 %
0.0	0.216 ± 0.008	100.00
0.5	0.215 ± 0.010	99.00
1.0	0.237 ± 0.005	109.72
1.5	0.226 ± 0.002	104.60
2.0	0.202 ± 0.008	93.52
2.1	0.154 ± 0.004 ⁽¹⁾	71.30
2.2	0.087 ± 0.002 ⁽¹⁾	40.30
2.3	0.046 ± 0.006 ⁽¹⁾	21.30
2.4	0.012 ± 0.004 ⁽¹⁾	5.64
2.5	0.007 ± 0.001 ⁽¹⁾	3.24

注:(1)与阴性对照组比较 P < 0.05。(2)A 为在 490 nm 测得的吸光度。y = 627.183 - 266.1x, R² = 0.991, IC₅₀ = 2.169。

表 2 三七对 V₇₉ 细胞的毒性作用(MTT 法)

剂量 mg/ml	A ($\bar{x} \pm s$)	存活率 %
0.0	0.682 ± 0.011	100.00
0.5	0.684 ± 0.008	100.29
1.0	0.673 ± 0.006	98.68
1.5	0.679 ± 0.008	99.56
2.0	0.584 ± 0.001	85.63
2.1	0.506 ± 0.004 ⁽¹⁾	74.20
2.2	0.426 ± 0.007 ⁽¹⁾	62.47
2.3	0.386 ± 0.008 ⁽¹⁾	56.60
2.4	0.213 ± 0.005 ⁽¹⁾	31.34
2.5	0.084 ± 0.004 ⁽¹⁾	12.32

注:(1)与阴性对照组比较 P < 0.05。(2)A 为在 490 nm 测得的吸光度。y = 564.78 - 221.4x, R² = 0.993, IC₅₀ = 2.325。

2.1.2 中性红吸收法(NRU 法) 如表 3、4 所示,三七提取物在 1.5~2.5 mg/ml 剂量范围内可引起 CHO 和 V₇₉ 细胞的 A 值显著降低(P < 0.05),即可引起 CHO 和 V₇₉ 细胞活细胞数减少,并存在明显的剂量效应关系。三七提取物浓度越高其毒性越大,在浓度为 2.5 mg/ml 时,CHO 和 V₇₉ 细胞存活率分别为

6.45%和4.85%。表明三七提取物在较高剂量下对正常细胞的活性和功能状态有较大影响,即可产生明显的细胞毒性。

表3 三七对 CHO 细胞的毒性作用(NRU 法)

剂量 mg/ml	$A(\bar{x} \pm s)$	存活率 %
0.0	0.124 ±0.011	100.00
0.5	0.121 ±0.007	97.58
1.0	0.109 ±0.006	87.90
1.5	0.086 ±0.006 ⁽¹⁾	69.35
2.0	0.079 ±0.008 ⁽¹⁾	63.71
2.1	0.054 ±0.004 ⁽¹⁾	43.55
2.2	0.045 ±0.003 ⁽¹⁾	36.29
2.3	0.036 ±0.002 ⁽¹⁾	29.03
2.4	0.018 ±0.007 ⁽¹⁾	14.52
2.5	0.008 ±0.002 ⁽¹⁾	6.45

注:(1)与阴性对照组比较 $P < 0.05$ 。(2)A 为在 570 nm 测得的吸光度。 $y = 335.76 - 137x$, $R^2 = 0.931$, $IC_{50} = 2.084$ 。

表4 三七对 V₇₉ 细胞的毒性作用(NRU 法)

剂量 mg/ml	$A(\bar{x} \pm s)$	存活率 %
0.0	0.124 ±0.007	100.00
0.5	0.115 ±0.007	92.75
1.0	0.087 ±0.008 ⁽¹⁾	70.42
1.5	0.074 ±0.008 ⁽¹⁾	59.71
2.0	0.048 ±0.005 ⁽¹⁾	39.00
2.1	0.037 ±0.008 ⁽¹⁾	29.91
2.2	0.030 ±0.006 ⁽¹⁾	23.85
2.3	0.024 ±0.007 ⁽¹⁾	19.40
2.4	0.013 ±0.003 ⁽¹⁾	10.24
2.5	0.006 ±0.001 ⁽¹⁾	4.85

注:(1)与阴性对照组比较 $P < 0.05$ 。(2)A 为在 570 nm 测得的吸光度。 $y = 103.507 - 31.42x$, $R^2 = 0.967$, $IC_{50} = 1.703$ 。

2.1.3 集落形成试验 如表 5、6 所示,三七提取物在 0.75、1.00、1.50 mg/ml 剂量水平对 CHO 和 V₇₉ 2 种细胞的集落形成均有抑制作用 ($P < 0.05$),且随剂量增加,集落形成率降低,抑制率增加,抑制作用增加,呈良好的剂量效应关系。

表5 三七对 CHO 细胞集落形成的影响

剂量 mg/ml	集落数 个	集落形成率 %	抑制率 %
0.00	112.25 ±4.08	56.12	-
0.50	100.75 ±4.56	50.38	9.47
0.75	90.50 ±4.16	45.25 ⁽¹⁾	19.47
1.00	72.50 ±3.02	36.25 ⁽¹⁾	35.97
1.50	32.25 ±0.84	16.12 ⁽¹⁾	70.72

注:(1)与阴性对照组比较 $P < 0.05$ 。

表6 三七对 V₇₉ 细胞集落形成的影响

剂量 mg/ml	集落数 个	集落形成率 %	抑制率 %
0.00	102.25 ±4.08	51.12	-
0.50	96.75 ±3.64	48.37	5.38
0.75	84.75 ±3.02	42.27 ⁽¹⁾	17.32
1.00	64.75 ±4.16	32.37 ⁽¹⁾	36.68
1.50	28.00 ±3.60	14.00 ⁽¹⁾	72.62

注:(1)与阴性对照组比较 $P < 0.05$ 。

2.2 川芎

表7 不同方法和不同细胞系时川芎的细胞毒性结果

受试物	方法	IC ₅₀ mg/ml		
		BalB/c 细胞	CHL 细胞	SL - 7 细胞
川芎	中性红吸收法	16.758	79.8	26.6
	MTT 法	159.6	79.8	66.5
	集落形成法	2.128	5.32	不形成集落

3 讨论和结论

细胞毒性试验可观察各种类型的生命细胞在外源性有害物质的作用下所发生的一系列结构与功能的改变,根据所采用的方法不同可观察到体外培养细胞受某种化合物刺激后细胞的凋亡、衰亡直至死亡的全过程。研究内容涉及外源性有害物质对机体的细胞毒性作用、特异的细胞毒作用、细胞毒物代谢和毒物的细胞毒作用机理以及致癌性等,范围十分广泛,研究方法也各不相同。^[5]

细胞毒性试验有很多种方法,比如双重琼脂法、直接接触法、抽出法、形态学观察法、集落形成法、中性红吸收法、MTT 法等。比较常用的是中性红吸收法、集落形成法和 MTT 法。这些方法的优点是简便、稳定、试验周期短。根据本研究的对象是保健食品原料,绝大部分受试物无明显的毒性作用,且品种繁多的特点,主要考虑简便快捷的安全性评价方法。我们对三七分别做了 MTT 法、NRU 法、集落形成法 3 种方法,对每种方法分别做了 CHO 细胞和 V₇₉ 细胞 2 个细胞系。对川芎也用上述 3 种方法,做了 BalB/c 细胞、CHL 细胞、SL - 7 细胞 3 个细胞系,以期从 NRU 法、MTT 法及集落形成法等细胞毒性方法中筛选出合适的方法,建立一套简便、快速的试验,形成体外细胞毒性检测方法的组合。

从表 1~6 的数据中可以看出:集落形成法最灵敏,MTT 法最不灵敏。但是集落形成法尚存在许多问题:难获真正细胞悬液;集落形成率低;确定集落有一定难度;实验的周期长(7 h),且重复性差。MTT 法的优点是简便、快速、所需细胞数较少,但是结果不灵敏。同时,从实验结果可以看出,NRU 法和 MTT 法对 CHO 细胞的毒性结果稳定性好,如三七的 MTT 法 IC₅₀ 在 2.1~2.2 之间,NRU 法的 IC₅₀ 在 2.0~2.1 之间,结果很相近。从表 7 的结果也可以看出,CHL 细胞系的结果很稳定,而 V₇₉ 细胞、BalB/c 细胞以及 SL - 7 细胞的结果稳定性不高。根据我们实验室现有的条件和各种细胞培养的难易以及细胞的特点,最后确定用 CHO 细胞和 CHL 细胞这两个细胞系,用中性红吸收法作为细胞毒性的检测方法。

细胞毒性实验的数据可用于急性系统毒性的推测。在过去 20 年里,应用基础细胞毒性的数据来推测化合物在体内的急性作用,一直是研究的热点之

一。斯堪的那维亚细胞毒理学协会组织的一个国际协作计划,即 MEIC (Multicenter Evaluation of in Vitro Cytotoxicity 体外细胞毒性多中心评价),评价体外毒性与人体急性毒性的相关性。^[6~8]结果表明,所研究的 50 种参考化学物,在预测人致死血浓度方面,用人细胞系的体外实验和啮齿类 LD₅₀ 测定有相同作用。但是如果考虑到非基础细胞毒性的影响因素的存在,用体外细胞毒性试验来取代体内经口急性毒性试验,仍需要选择适宜的方法和检测手段。有证据表明:细胞毒性试验在预测低毒性物质的 LD₅₀ 时的准确性要高于预测高毒性物质的 LD₅₀ 的准确性。可能的原因是当一种物质的基础细胞毒性较低时,生物利用率以及在某些情况下的生物转化,起的作用比较小。最近, Spielmann 及其同事提出:^[9] 作为替代 LD₅₀ 试验的第一步,体外细胞毒性的数据可以作为体内试验的合适的起始剂量,从而大大减少动物用量。要做到这一点关键是选择合适的细胞系和恰当的检测方法。比如,预测啮齿类动物的 LD₅₀,最好选择啮齿类动物的细胞系。同样,要预测某物质对人的 LD₅₀,选择人细胞是最恰当的方法。同时还要考虑暴露时间(至少 24 h),试验终点以及终点的检测手段(比如 MTT, NRU, ATP, protein)等。因此,对新的保健食品可先做 IC₅₀,推测出 LD₅₀,作为动物急性毒性的起始剂量,以便大大减少动物用量。IC₅₀ 是否能替代 LD₅₀ 很难确定,但作为保健食品的筛选试验,细胞毒性试验是很好的方法。基于这个原因,在评价食品化学物在体内的潜在毒性的综合体系中,细胞毒性的确定应该是起始步骤。如果某种保健食品具有急性毒性,在大多数情况下,它会反应在对细胞的基本功能的损害上。已有一些研究者提出,以一组体外试验来替代整体动物进行急性毒性试验,要做到这一点还有许多工作要做。

参考文献:

- [1] Borenfreund E, Puerner J A. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assays (HTD/NR90) [J]. Tissue Culture Meth, 1984, 9:7—9.
- [2] Borenfreund D, Puerner J A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption[J]. Toxicol Lett, 1985, 24:119—124.
- [3] Borenfreund E, Babich, Martin-Alguacil N. Comparison of two in vitro cytotoxicity assays—the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests[J]. Toxicol In Vitro, 1988, 2:1—6.
- [4] 司徒镇强, 吴军正, 主编. 细胞培养[M]. 北京:世界图书出版公司, 1996, 183.
- [5] 刘国廉, 主编. 细胞毒理学[M]. 北京:军事医学科学出版社, 2000, 1—2.
- [6] Ekwall B C, Clemenson B, Crafoord Ba, et al. MEIC evaluation of acute systemic toxicity: part V. rodent and human toxicity data for the 50 reference chemical [J]. ATLA, 1998a, 26 (suppl):569—615.
- [7] Ekwall B C, Clemenson B, Ekwall, et al. EDIT: A new international multicentre programme to development and evaluate batteries on in vitro tests for acute and chronic systemic toxicity[J]. ATLA, 1999, 27:339—349.
- [8] Ekwall B B, Ekwall, Sjostrom. MEIC evaluation of acute systemic toxicity. part VIII. multivariate partial least squares evaluation, including the selection of a battery cell line tests with a good prediction of human acute lethal peak blood concentration for 50 chemicals [J]. ATLA, 2000, 28 (Suppl): 201—234.
- [9] Spielmann H E, Genschow M, Leibsch, et al. Determination of the starting dose for acute oral toxicity (LD₅₀) testing in the up-and-down procedure (UDP) from cytotoxicity data [J]. ATLA, 1999, 27: 957—966.

[收稿日期:2004-05-15]

中图分类号:R15;TS218;R994.4 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2004)06-0485-04

油脂脱胶:是脱除油脂中含有胶体物质的工艺过程。所脱除的胶体物质主要含磷脂和与磷脂结合的钙、镁、铁微量元素及其他杂质。所脱除的磷脂分为水化磷脂和非水化磷脂。水化磷脂如磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇 PC、磷脂酰肌醇 PI;磷脂乙醇胺 PE 和磷脂酸 PA 是两性的。大豆油脱胶后磷脂剩 25 % 时,金属钾几乎没有残留,金属钙残留 85 % 左右,金属镁残留 50 % 左右。