

凹土玉米芯垫料提取物对细胞毒性的研究

张延英*, 舒畅, 吴建军, 蔺兴遥, 朱建坤, 李存祥, 牛永玲

(甘肃中医学院, 兰州 730000)

[摘要] 目的:研究凹土玉米芯垫料对细胞毒性作用。方法:将凹土玉米芯,玉米秸,普通刨花垫料物质的丙酮提取物分别加到 H22-H2D8 细胞中培养,测定每个培养孔细胞的总蛋白量,计算细胞的半数致死量(LD₅₀);MTT 法检测不同垫料丙酮提取物对 H22-H2D8 细胞增殖率的影响,用 6 级毒性分类法进行毒性分级。结果:普通刨花垫料 LD₅₀ < 3 g·L⁻¹,玉米秸垫料 LD₅₀ < 20 g·L⁻¹,凹土玉米芯垫料 LD₅₀ > 40 g·L⁻¹。在垫料提取物浓度为 10 g·L⁻¹时,普通刨花的细胞毒性 5 级,玉米秸的细胞毒性为 2 级,凹土玉米芯的细胞毒性为 1 级;凹土玉米芯垫料组细胞增殖率显著高于玉米秸组和普通刨花组(P < 0.01)。结论:普通刨花的细胞毒性最大,凹土玉米芯的细胞毒性最小,玉米秸、普通刨花垫料物质均有较大的细胞毒性,其毒性显著高于凹土玉米芯。

[关键词] 凹土玉米芯;垫料;细胞毒性;丙酮提取物

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0242-03

实验动物垫料分为接触性垫料和非接触性垫料。木材来源的垫料是最常用的接触性垫料。实验动物垫料是影响实验动物质量和动物实验结果重要环境因素。垫料的作用有保温、隔热、吸收粪尿和水分等^[1-2]。大多数实验动物垫料使用本地木加工厂的,刨花、锯末等,其木材来源复杂,甚至有人工合成的板材,含大量的有机苯,这类木材对实验动物有较大的毒性,并且影响某些实验结果的准确性^[3]。我国玉米芯资源充足,且无毒副作用,凹凸棒石黏土(又称凹土)具有特殊的纤维结构、不同寻常的胶体和吸附性能,因此我们尝试使用凹土和玉米芯配方作为新型垫料进行了研究。为寻求一种可大量推广、安全可靠、有利于动物生长、发育、繁殖的新的实验动物垫料^[4],我们将凹土和玉米芯配方合成开发了新型、优质、低毒、无害、资源丰富、成本低廉、极少污染的实验动物垫料。本实验对普通刨花、玉米秸、凹土玉米芯垫料物质的细胞毒性进行了比较研究,为开发新型实验动物垫料凹土玉米芯提供依据。

1 材料和方法

1.1 动物垫料 凹土玉米芯垫料,玉米芯、凹土(又

称坡缕石)购自甘肃临泽,含水量 ≤ 12%,凹土玉米芯加工成约 2 cm × 2 cm × 0.5 cm 的碎片;普通刨花垫料,购自甘肃省兰州市雁滩家具市场木器加工厂混合型刨花,规格大小不相同;玉米秸 2 cm × 1.5 cm × 0.5 cm,购自兰州市榆中县农村。

1.2 仪器试剂 IX71-22PH/FI Olympus 倒置显微镜(日本),MCO-15AC 二氧化碳培养箱(日本),HFsafe760SZ 超净工作台,Incubator GFL-3033 空气浴摇床(德国),Benchmark Plus 连续波长酶标仪(美国),UV-2401PC 紫外分光光度计(日本岛津)。小鼠 H22-H2D8 瘤细胞株、DMEM 培养基、噻唑蓝(MTT)、考马斯亮蓝、牛血清白蛋白、小牛血清(购自 Sigma 公司)、二甲基亚砷和丙酮(购于兰州生升医药科技公司),其他试剂为国产分析纯。

1.3 动物垫料物质丙酮提取物的制备^[5] 取 100 mL 丙酮,加入 5 g 实验动物垫料,室温 24 h,振荡频率 150 次/分,振荡 2 h,滤过液过氮流,用 5 mL 丙酮溶解剩余物,用上述方法制备空白对照液。

1.4 H22-H2D8 细胞存活率和半数致死量(LD₅₀)测定 按照细胞总蛋白量的检测方法^[6],将 H22-H2D8 实验以 1 × 10⁵/mL 密度种入 96 孔培养板,按 1,3,5,10,20,40 g·L⁻¹的终质量浓度梯度加入动物垫料物质丙酮提取物,每个细胞培养孔的总体积为 1 mL,设 10 个平行孔,同时设对照细胞培养孔和空白细胞培养孔,置 37 °C,5% CO₂培养箱 72 h,取出,1 000 r·min⁻¹,离心 5 min, PBS 洗 2 次,加入 0.3

[收稿日期] 2011-02-05

[基金项目] 2009 年省技术与开发专项计划项目(0912TCYA032)

[通讯作者] *张延英,硕士,从事实验动物教学及动物模型制作与实验动物支撑条件相关研究, Tel: 0931-8765471, E-mail: zyy@gzsy.edu.cn

mol·L⁻¹ NaOH 100 μL 100 °C, 10 min, 取出 50 μL 加入到 3 mL 考马斯亮蓝液中, 室温静置反应 10 min, 测定 595 nm 处的吸光度(A), 测定细胞的总蛋白量。细胞死亡 50% 时实验动物垫料提取物的质量浓度定为 LD₅₀。

细胞存活率 = (实验孔细胞的总蛋白量/对照孔细胞的总蛋白量) × 100 %

1.5 H22-H2D8 细胞相对增殖率的测定和细胞毒性评级 选取活力在 90% 以上的 H22-H2D8 细胞进行实验, H22-H2D8 细胞配制成 1 × 10⁵/mL, 加入 96 孔细胞培养板, 按 1, 3, 5, 10, 20, 40 g·L⁻¹ 的质量浓度梯度加入不同实验动物垫料丙酮提取物, 每细胞培养孔的总体积为 0.2 mL, 每组 10 平行孔, 对照组加丙酮细胞悬液, 置 37 °C, 5% CO₂ 培养箱 72 h, 用 MTT 法测定各孔的吸光度(A₄₉₂), 每孔重复测 3 次, 取其平均值, 并计算细胞相对增殖率(PGR)

$$RGR = (\text{实验组 } A_{492} / \text{对照组 } A_{492}) \times 100\%$$

根据细胞 RGR 划分细胞毒性级别, RGR = 0, 细胞毒性评为 5 级; RGR 1% ~ 24%, 细胞毒性为 4 级; RGR 25% ~ 49%, 细胞毒性为 3 级; RGR 50% ~ 74%, 细胞毒性为 2 级; RGR 75% ~ 99%, 细胞毒性为 1 级; RGR ≥ 100%, 细胞毒性为 0 级。

1.6 数据处理 使用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析, 计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用单因素方差分析, P < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 对细胞存活率的影响 随着垫料提取物浓度的增加, 细胞的存活率逐渐降低, 其中普通刨花降低最明显, 凹土玉米芯变化最小, 玉米秸垫料居中。普通刨花 LD₅₀ < 3 g·L⁻¹, 玉米秸垫料 LD₅₀ < 20 g·L⁻¹, 凹土玉米芯 LD₅₀ > 40 g·L⁻¹。见表 1。

2.2 不同质量浓度垫料提取物对 H22-H2D8 细胞增殖的影响 随着垫料丙酮提取物浓度的增加, 培养孔活 H22-H2D8 细胞数逐渐减少, A 逐渐变小。在垫料提取物质量浓度 1 ~ 10 g·L⁻¹ 时, 玉米秸组与凹土玉米芯组之间有明显差异(P < 0.05), 浓度为 20 ~ 40 g·L⁻¹ 时, P < 0.01; 普通刨花各质量浓度组与凹土玉米芯组之间均有明显差异(P < 0.01), 垫料提取物浓度为 3 ~ 5 g·L⁻¹ 时, 凹土玉米芯与玉米秸, 普通刨花垫料之间差异明显(P < 0.01), 垫料提取物浓度为 10, 20, 40 g·L⁻¹ 时, 普通刨花垫料的 A₄₉₂ 为 0, 由此说明, 普通刨花垫料提取物毒性最大,

表 1 凹土玉米芯丙酮提取物对 H22-H2D8 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$) %

质量浓度 /g·L ⁻¹	细胞存活率		
	凹土玉米芯	玉米秸	普通刨花
1	98.53 ± 0.74	91.31 ± 0.63 ¹⁾	42.64 ± 0.38 ¹⁾
3	95.66 ± 0.86	67.57 ± 0.59 ¹⁾	31.25 ± 0.51 ¹⁾
5	93.57 ± 0.46	51.81 ± 0.43 ¹⁾	0
10	91.38 ± 0.38	47.35 ± 0.72 ¹⁾	0
20	90.13 ± 0.39	40.28 ± 0.38 ¹⁾	0
40	79.62 ± 0.44	33.54 ± 0.47 ¹⁾	0

注: 与相同质量浓度凹土玉米芯组比较 ¹⁾P < 0.01 (表 3 同)。

凹土玉米芯垫料提取物毒性最小。见表 2。

表 2 凹土玉米芯提取物对 H22-H2D8 细胞增殖(A)的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

质量浓度 /g·L ⁻¹	A			
	对照	凹土玉米芯	玉米秸	普通刨花
1	0.562 ± 0.071	0.556 ± 0.043	0.483 ± 0.092 ¹⁾	0.326 ± 0.041 ²⁾
3	0.545 ± 0.046	0.496 ± 0.077	0.409 ± 0.064 ¹⁾	0.196 ± 0.098 ²⁾
5	0.534 ± 0.039	0.459 ± 0.040	0.379 ± 0.082 ¹⁾	0.118 ± 0.079 ²⁾
10	0.527 ± 0.053	0.406 ± 0.073	0.332 ± 0.075 ¹⁾	0
20	0.516 ± 0.062	0.366 ± 0.060	0.258 ± 0.066 ²⁾	0
40	0.503 ± 0.038	0.342 ± 0.054	0.196 ± 0.048 ²⁾	0

注: 与相同质量浓度凹土玉米组比较 ¹⁾P < 0.05, ²⁾P < 0.01。

2.3 对 H22-H2D8 细胞 RGR 和细胞毒性评级的影响 从表 3 说明, 在 10 ~ 40 g·L⁻¹ 质量浓度范围普通刨花细胞毒性为 5 级, 玉米秸细胞毒性为 2 ~ 3 级, 凹土玉米芯细胞毒性为 1 ~ 2 级。各垫料丙酮提取物质量浓度相同情况下, 玉米秸、普通刨花 H22-H2D8 细胞 RGR 与凹土玉米芯 H22-H2D8 细胞 RGR 比较, 有显著性差异(P < 0.01)。凹土玉米芯 RGR 最高。

表 3 凹土玉米芯对 H22-H2D8 细胞增殖率及细胞毒性分级的影响 (n = 10)

质量浓度 /g·L ⁻¹	凹土玉米芯		玉米秸		普通刨花	
	RGR	分级	RGR	分级	RGR	分级
1	99	2	86 ¹⁾	1	58 ¹⁾	2
3	91	1	75 ¹⁾	1	36 ¹⁾	3
5	86	1	71 ¹⁾	2	22 ¹⁾	4
10	77	1	63 ¹⁾	2	0	5
20	71	2	50 ¹⁾	2	0	5
40	68	2	39 ¹⁾	3	0	5

3 讨论

垫料原材料本身可能含有影响动物健康的物质,普通刨花垫料中含有大量的松树和雪松类木材,雪松中主要刺激物是皱酸(plicatic acid),松树属树木(family pinaceae)中主要有害成分是松香酸雪松和松树类木质素(wood lignin)的一些成分经过氧化、结构异构化后也会变成了致癌物。皱酸和松香酸能引起人免疫介导的过敏和炎症反应、哮喘、鼻炎、结膜炎,而且这个过程是渐进的^[8]。虽然,人们对皱酸和松香酸引起呼吸道疾病、哮喘、细胞毒性和致癌过程不是很清楚。流行病学调查发现,从事与雪松和松树职业有关的人,哮喘的发病率比其他行业人群高 50%,接触红雪松可能立刻发生哮喘,也可能推迟发生^[8]。皱酸可以增加体内 IgE, T 细胞数量以及组胺等物质的浓度,皱酸和松香酸还能引起气管和支气管上皮细胞脱落、坏死^[7]。

凹土玉米芯垫料是由玉米芯和凹土配合而成,是较为理想的可大量推广使用的实验动物垫料材料。玉米芯是生产粮食玉米的副产品,全国都有分布,玉米芯具有强大的吸水性,可吸收 4 倍于它自重的液体,是一种很有发展的活性炭资源。坡缕石(palygorskite)又名凹土或凹凸棒石(attapulgite),是一种水合镁铝硅酸盐非金属矿物。在凹凸棒石黏土矿藏中,凹凸棒石呈水晶链层状结构,其基本的化学分子式为: $Mg_5Si_8O_{20}(HO)_2(OH_2)_4 \cdot H_2O$ 。凹凸棒石黏土具有特殊的纤维结构、不同寻常的胶体和吸附性能,具有广泛的应用领域,有“千土之王”、“万用之土”等美誉。据甘肃省地矿局专家介绍,目前甘肃省已探明的坡缕石储量有 600 万吨,并称其性能

特点和所含微量生命元素众多,尤以碘元素为甚,堪称世界罕见。

实验结果说明,在细胞存活率、增殖率、相对增殖率及细胞毒性评级中,凹土玉米芯垫料提取物的毒性均低于普通刨花垫料组,研究结果为开发新型实验动物垫料凹土玉米芯提供了实验依据。

[参考文献]

- [1] 中华人民共和国国家标准[S]. 实验动物环境及设施,GB1492.
- [2] 邹移海,徐志伟,苏钢强,等. 实验动物学[M]. 北京:中国科技出版社,2004:204.
- [3] Kai H O, Pelkonen, Osmo O P Hanninen. Cytotoxicity and biotransformation inducing activity [J]. Toxicology, 1997,122:73.
- [4] 张志,潘甜美,张建红,等. 四种实验动物垫料物理性状及动物适应性研究[J]. 实验动物科学,2007,24(2):18.
- [5] 刘福英,王春梅,刘军须,等. 5 种垫料物质的细胞毒性研究[J]. 中国比较医学杂志,2003,13(6):349.
- [6] 王艳蓉,孙淑华,孟金萍,等. 实验动物垫料毒性安全评价进展[J]. 中国比较医学杂志,2007,17(4):245.
- [7] Hausen B M, Kreuger A, Mohnert J, et al. Contact allergy due to colophony (III). Sensitizing potency of resin acids and some related products [J]. Contact Dermatitis, 1989,20:41.
- [8] Frew A J, Chan H, Lam S, et al. Bronchial inflammation in occupational asthma due to western red cedar [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1995,151:340.

[责任编辑 何伟]

本刊欢迎网上投稿

《中国实验方剂学杂志》2010 年正式施行网上投稿,请登录本刊网站 www.syfjxzz.com 注册会员,登陆采编系统之后按照提示在线投稿。本刊对网上来稿免收稿件处理费。编辑部对来稿有修改权。经审后,如录用,请按通知要求交纳论文发表费。详见本刊稿约。