

## 保健食品耐缺氧功能体外评价方法建立\*

王凤岩, 黄俊明, 谭剑斌, 胡永成, 杨颖, 李欣, 陈瑞仪

**摘要:**目的 将小鼠大脑皮质神经元的缺糖 缺氧模型用于耐缺氧保健食品的体外评价。方法 采用血清药理学方法制备含牛磺酸复合制剂的小鼠血清, 观察其对缺糖缺氧损伤神经元的乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)活力及细胞生存率的影响, 并与小鼠急性脑缺血性缺氧实验结果比较。结果 中、高剂量含牛磺酸复合制剂小鼠血清组 LDH 活力分别为(5.97±0.85)、(5.68±1.55) U/(g prot), 低于空白血清对照组的(8.27±1.54) U/(g prot) ( $P < 0.05$ ); 低、中、高剂量含牛磺酸复合制剂小鼠血清组 SOD 活力分别为(6.83±0.65)、(6.95±0.68)、(7.55±0.82) U/(mg prot), 高于空白血清对照组的(5.57±0.89) U/(mg prot), 细胞生存率分别为 90.06%、89.04%、91.92%, 高于空白血清对照组的 75.74% ( $P < 0.05$ ); 牛磺酸复合制剂低、中、高剂量组小鼠急性脑缺血性缺氧存活时间分别为 17.3、19.5、18.2 s, 比纯水对照组的 15.5 s 长 ( $P < 0.05$ )。结论 含有某保健食品的小鼠血清对神经元缺糖 缺氧损伤具有保护作用; 小鼠大脑皮质神经元的缺糖 缺氧模型可用于保健食品耐缺氧功能的体外评价。

**关键词:** 神经元; 缺糖 缺氧模型; 血清药理学

中图分类号: R 115

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2011)05-0537-02

**Development of neuron glucose oxygen deprivation model in evaluation on anoxia endurance function of health food**

WANG Fengyan, HUANG Junming, TAN Jianbin, et al. Department of Toxicology, Center for Disease Prevention and Control of Guangdong Province (Guangzhou 510300, China)

**Abstract Objective** To develop a mouse cortical neuron glucose oxygen deprivation model to evaluate anoxia endurance (acute hypoxic ischemic damage) function of health food in vitro. **Methods** Serum pharmacology method was adopted to prepare mouse serum containing taurine. Primary cortical neurons from neonate mouse (within 24hr) were cultured and treated with different concentrations of the serum on the 8th day under the deprivation of oxygen and glucose. Then the contents of lactate dehydrogenase (LDH) and superoxide dismutase (SOD), and the viability of the neurons were determined and compared with those of the mice with acute brain hypoxic ischemic damage. **Results** The LDH levels for moderate and high dose taurine-containing serum treatment groups were 5.97±0.85 and 5.68±1.55 U/g prot and significantly lower than that of blank control (8.27±1.54 U/g prot;  $P < 0.05$ ). For low, moderate, and high dose taurine-containing serum treatment groups, the SOD levels were 6.83±0.65, 6.95±0.68, and 7.55±0.82 U/mg prot and the viability of the neurons were 90.06%, 89.04%, and 91.92%, which both significantly higher than those of blank serum control (5.57±0.89 U/mg prot, 75.74%;  $P < 0.05$  for all). The survival time of the mice in low, moderate, and high dose taurine complex treatment groups were 17.3, 19.5, and 18.2 s and were significantly longer than that of in pure water treatment group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Taurine-containing mouse serum has a protective effect on the cultured newborn mouse cortical neurons. The results suggest that oxygen/glucose deprivation model of mouse cortical neuron can be used to evaluate the function of health food against acute hypoxic ischemic damage in vitro.

**Key words** neuron; oxygen/glucose deprivation model; serum pharmacology

急性暴露于缺氧环境会给机体带来严重危害, 耐缺氧保健食品能提高机体对缺氧的适应能力而减少损伤。目前对耐缺氧保健功能的评价采用动物实验, 但周期长, 实验动物非常痛苦, 且需要动物的量也较大。近年来, 国际上提倡“3R”原则, 即在实验中尽可能减少动物的使用量, 而用组织细胞、各种体外试验等方法替代动物实验<sup>[1-2]</sup>。本研究采用体外细胞培养技术, 以某保健食品为例, 将体外培养的小鼠大脑皮质神经元缺糖 缺氧模型用于耐缺氧保健食品的体外评价。

## 1 材料与方 法

1.1 主要仪器与试剂 Neurobasal™培养基、B<sub>27</sub>培养基、胎牛血清培养液(DMEM)、胰酶(美国 Gibco公司); 胎牛血清(杭州四季青生物工程有限公司); 四甲基偶氮唑蓝(MTT, 美国 Sigma公司); 连二亚硫酸钠(N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)与其他试剂均为国产分析纯; 乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(北京中山生物科技有限

公司); 超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒(南京建成生物制品有限公司); 市售保健食品(主要活性成份为牛磺酸, 浓度为93%)。2424-2型二氧化碳培养箱(美国 Sheldon公司); ZEISS XDP-12倒置显微镜(德国 ZEISS公司); VL5BS超净工作台、Vensmax酶标仪(美国 Molecular Device公司)。

1.2 实验动物 KM种雄性小白鼠 68只, SPF级[广东省实验动物中心, 动物生产许可证号: SCXK(粤)2003-0002号, 质量合格证编号: 0032172], 6~8周龄, 体重 18~22 g, 使用常规颗粒饲料(广东省实验动物中心)饲养于 SPF级动物实验室, 室温为(22±2)℃, 湿度为 60%~80%。

## 1.3 方 法

1.3.1 牛磺酸复合制剂对小鼠急性脑缺血性缺氧体外模型建立 随机选取 48只小鼠随机分成 4组: 纯水对照组、牛磺酸复合制剂高、中、低剂量组[剂量分别为 0.50、0.17、0.08 g/(kg bw)], 每组 12只。高、中、低剂量组按设计剂量每日经口灌胃给予牛磺酸复合制剂 1次, 纯水对照组按同等容量灌胃给予纯净水, 连续 30 d。末次灌胃 1 h后, 各组动物自颈部逐只断头, 立即按秒表记录小鼠断头后至张口喘气停

\* 基金项目: 广东省医学科研基金(B2005004)

作者单位: 广东省疾病预防控制中心卫生毒理所, 广州 510300

作者简介: 王凤岩(1971-), 女, 辽宁人, 副主任技师, 硕士, 主要从事卫生毒理学研究。

止时间。

1.3.2 含牛磺酸复合制剂小鼠血清制备 剩余 20 只小鼠随机分成 4 组, 每组 5 只。分组与给予剂量同 1.3.1, 连续 5 d 空白对照组按同等容量灌胃给予纯净水, 制备空白血清对照。末次灌胃后 1 h 采眼血, 室温静置 1 h, 3 000 r/min 离心 15 min 分离血清, 将每组小鼠的血清混匀, 各组血清经 0.22 μm 滤膜过滤灭菌, -20℃ 保存备用。

1.3.3 小鼠大脑皮质神经元原代培养与细胞活性鉴定 在文献〔3〕方法基础上, 本研究使用新生 1~2 d 的小鼠, 以自制鼠尾胶原包被培养板, 胎蓝染色进行细胞活性鉴定, 细胞活性 > 90% 即用于实验。

1.3.4 神经元分组及缺糖/缺氧性损伤模型建立 将神经元分为 6 组, 分别为正常对照组 (不进行缺糖/缺糖处理)、缺糖/缺氧模型组、含牛磺酸复合制剂小鼠的血清高、中、低 3 个剂量组和空白血清对照组。将培养至第 8 d 的神经元弃去原培养液, 换以无血清培养基, 3 个剂量组及空白血清对照组分别加入制备好的小鼠血清, 体积分数为 20%, 孵育 24 h 后, 正常对照组用 Eagle's 液 (含 10 mmol/L 葡萄糖) 洗 2 次后每孔再加 1 mL 继续培养, 其他各组用无糖 Eagle's 液洗 2 次后, 每孔加入含 0.5 mmol/L 连二亚硫酸钠的无糖 Eagle's 液 1 mL 建立缺糖/缺氧性损伤, 作用 24 h。

1.3.5 上清液乳酸脱氢酶 (LDH) 活力测定 参照 LDH 试剂盒说明收集培养上清液进行测定。

1.3.6 细胞超氧化物歧化酶 (SOD) 活性检测 弃去培养液, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗 2 遍, 每孔加入 0.1 mol/L PBS-0.05 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠盐 (EDTA) (pH 8.0), 再加 1% Triton X 100 50 μL, 将培养板置振荡器震荡 1 min 使之溶解, 加 25% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 100 μL 以沉淀蛋白, 3 000 r/min 离心 15 min 取上清液按 SOD 试剂盒说明测定。

1.3.7 细胞存活率检测 去除原培养液, 用 D-Hank's 洗一次, 换无血清 DMEM, 每孔加 20 μL MTT (终浓度为 5 g/L), 37℃ 继续培养 4 h 弃上清液, 每孔加二甲亚砜 100 μL, 震荡 10 min 在酶标仪 570-630 nm 测吸光度 (A) 值, 结果以二者差值表示。

1.4 统计分析 应用 SPSS 11.0 软件进行方差分析和 *t* 检验。

## 2 结果

2.1 牛磺酸复合制剂对小鼠急性脑缺血性缺氧存活时间影响 (表 1) 小鼠给予牛磺酸复合制剂后, 与纯水对照组比较, 各剂量组急性脑缺血性缺氧的存活时间均明显延长 ( $P < 0.05$ )。

表 1 牛磺酸复合制剂对小鼠急性脑缺血性缺氧存活时间影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 [g/(kg bw)]	始重 (g)	终重 (g)	存活时间 (s)
纯水对照组	0.00	20.1 ± 0.9	41.3 ± 2.3	15.5 ± 1.2
低剂量组	0.08	20.1 ± 0.9	42.1 ± 1.6	17.3 ± 1.1 <sup>a</sup>
中剂量组	0.17	20.2 ± 0.9	43.2 ± 1.8	19.5 ± 1.2 <sup>a</sup>
高剂量组	0.50	20.2 ± 1.0	42.8 ± 2.2	18.2 ± 0.9 <sup>a</sup>

注: 与纯水对照组比较,  $aP < 0.05$

2.2 含牛磺酸复合制剂对小鼠血清皮质神经元缺糖/缺氧损伤影响 (表 2) 神经元经连二亚硫酸钠的无糖 Eagle's 液培养后, 与正常对照组比较, 培养上清液中 LDH 活力明显升高, SOD 活力与细胞生存率均明显降低 ( $P < 0.05$ ), 表明神经元缺糖/缺氧模型成功建立。与空白血清对照组比较, 含牛磺酸复合制剂的小鼠血清中、高剂量组神经元 LDH 活力明显降低 ( $P < 0.05$ ), 含牛磺酸复合制剂小鼠血清各剂量组 SOD 活力与生存率均明显升高 ( $P < 0.05$ )。

表 2 含牛磺酸复合制剂对小鼠血清皮质神经元缺糖/缺氧性损伤影响 ( $n = 6 \bar{x} \pm s$ )

组别	LDH 活力 [U/(g prot)]	SOD 活力 [U/(mg prot)]	生存率 (%)
正常对照组	4.15 ± 1.09	4.98 ± 0.56	100.00 ± 7.35
缺糖/缺氧模型组	14.71 ± 1.71 <sup>a</sup>	3.58 ± 0.44 <sup>a</sup>	68.36 ± 7.73 <sup>a</sup>
空白血清对照组	8.27 ± 1.54	5.57 ± 0.89	75.74 ± 7.00
低剂量血清组	6.96 ± 1.08	6.83 ± 0.65 <sup>b</sup>	90.06 ± 9.73 <sup>b</sup>
中剂量血清组	5.97 ± 0.85 <sup>b</sup>	6.95 ± 0.68 <sup>b</sup>	89.04 ± 6.98 <sup>b</sup>
高剂量血清组	5.68 ± 1.55 <sup>b</sup>	7.55 ± 0.82 <sup>b</sup>	91.92 ± 12.89 <sup>b</sup>

注: 与正常对照组比较,  $aP < 0.05$  与空白血清对照组比较,  $bP < 0.05$ 。

## 3 讨论

本研究结果表明, 小鼠大脑皮质神经元经连二亚硫酸钠合并缺糖培养后, 上清液中 LDH 活力明显升高, 表明缺氧造成神经元细胞膜通透性增加; 细胞的生存率与 SOD 活力降低, 表明本实验缺糖/缺氧模型建立成功。给予含牛磺酸复合制剂的小鼠血清后, 中、高剂量组 LDH 活力明显降低, 含牛磺酸复合制剂小鼠血清各剂量组 SOD 活力与细胞生存率均明显升高, 表明该保健食品对神经元缺糖/缺氧损伤具有一定的保护作用。随着“3R”原则逐渐被科学界接受, 体外实验替代整体实验是国际上安全性评价的趋势。本研究通过对皮质神经元的缺糖/缺氧培养模拟体内缺血性缺氧损伤, 建立缺血性缺氧的体外评价方法, 结果表明本方法是可行的。在此基础上, 可探讨神经元单纯缺氧培养、化学性缺氧 (如在培养基中加入耗氧剂) 用以模拟实验动物的常压缺氧与化学性缺氧等情况〔4〕, 探索建立保健食品耐缺氧功能的体外评价方法。

## 参考文献

- 〔1〕 白晶. 动物实验“3R”原则的伦理论证 [J]. 中国医学伦理学, 2007, 20(5): 48-50
- 〔2〕 邹进明. “3R”福利与实验动物 [J]. 检验检疫科学, 2007, 17(5): 70-72
- 〔3〕 周国钰, 胡学强, 陈晓红, 等. 步长脑心通含药血清抗缺氧诱导的皮质神经元凋亡的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2007, 27(9): 835-838
- 〔4〕 赵吉清, 林海, 燕蕙, 等. 缺氧对 PC12 细胞 IL-6 及 GP130 基因表达影响 [J]. 中国公共卫生, 2009, 25(3): 289-291

收稿日期: 2010-05-20

(王奕编辑 郭薇校对)