

文章编号:1001-0580(2001)11-0994-02

细胞毒性试验测定麻痹性贝毒素的检测方法\*

中国医科大学(沈阳 110001) 陈 杰 曹雅明 刘 军 王述森 刘振林  
辽宁省卫生监督所 王义新

**摘 要:**目的 建立测定麻痹性贝毒素的细胞毒性试验。方法 体外培养小鼠神经母细胞瘤细胞,用石房蛤毒素为标准品,利用其钠通道阻断剂的特性,以四甲基偶氮唑蓝标定活细胞量,建立麻痹性贝毒素剂量与吸光度之间的标准曲线。结果 箭毒/藜芦碱对照组 OD 值平均为 0.385 0,石房蛤毒素在 0.2~0.6ng 剂量范围内与吸光度值呈直线相关关系,得回归方程为  $y=0.399\ 6+0.503x$  ( $r=0.988\ 0$ ,  $P<0.02$ )。结论 在 0~0.6ng 剂量范围内,石房蛤毒素剂量与所测的 OD 值呈现剂量反应关系,该细胞毒性试验方法可用于麻痹性贝毒素的检测。  
**关键词:**麻痹性贝毒素;细胞毒性试验;四甲基偶氮唑蓝

中图分类号:R155.5 文献标识码:A

Cell Bioassay for Detecting Paralytic Shellfish Poison CHEN Jie, et al. China Medical University(Shenyang 110001, China)

**Abstract:** **Objective** To develop a cell bioassay to detect paralytic shellfish poison. **Methods** Utilizing the sodium channel blocking character of saxitoxin, the standard curve between paralytic shellfish poison and optical density value was constructed. **Results** The average optical density value of Ouabain/veratridine control group was 0.385 0. The dosage of saxitoxin had a linear correlation with optical density value and the regression equation was  $y=0.399\ 6+0.503x$  ( $r=0.988\ 0$ ,  $P<0.02$ ). **Conclusion** Within 0~0.6ng of saxitoxin, there was a dose-response relationship between the dosage of saxitoxin and optical density value. The detecting method of the cell bioassay could be used to detect the toxins of paralytic shellfish poison.  
**Key words:** paralytic shellfish poison; cell bioassay; MTT

麻痹性贝毒素(PSP)是赤潮藻类毒素中对人类健康威胁最大的一种毒素,它是以石房蛤毒素(STX)为骨架,取代基不同而衍生出来的多种化合物混合体,是钠通道阻断剂,通过对中枢神经系统的麻痹作用而致死<sup>[1]</sup>。由于PSP对人类危害较大,各国都制定了不同的食用标准的安全浓度,并且对其检测方法进行了一些研究<sup>[2]</sup>。本试验依据麻痹性贝毒素钠通道阻断剂的特性,初步建立一种细胞毒性试验检测方法,报道如下。

1 材料与方法

- 1.1 试剂 RPMI 1640 培养基(Gibco),2mM 谷氨酰胺,1mM 丙酮酸钠,Heps,10%胎牛血清,50μg/ml 链霉素,50μg/ml 青霉素(pH<7.4),0.25%胰蛋白酶;四甲基偶氮唑蓝(MTT)原液(5mg/ml PBS pH7.4);二甲基亚枫;10mM 箭毒和 1mM 藜芦碱购于 Sigma 公司;石房蛤毒素(STX)标准品由美国食品药物管理局(FDA)赠送(100μg/ml)。
- 1.2 细胞 小鼠神经母细胞瘤细胞(Neuro-2a,ATCC#CCL131)。
- 1.3 仪器 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Sheldon manufacturing INC),超净工作台(苏州),倒置显微镜(日本 Olympus),电热干燥箱(南京),超速离心机(Dopont),电子天平,酶标仪(美国 Bio-rad 450)。
- 1.4 实验方法 (1)小鼠神经母细胞瘤细胞接种于 96 孔培养

板中,每孔  $4\times10^4$  细胞,170μl 培养液。(2)每孔分别加入标准品 10μl,剂量分别为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0、1.2ng,各剂量设 4 个重复孔,每孔再加 10μl 10mM 箭毒及 10μl 1mM 藜芦碱。设 10 个箭毒/藜芦碱对照组(10μl 培养液替代 STX 标准品),设 5 孔为非处理对照组(30μl 培养液)。轻摇混匀。(3)培养 24 小时,倒置显微镜观察细胞形态。(4)去除培养液,每孔加 60μl 1/6 稀释的 MTT,轻摇混匀,37℃ 15min 或直至非处理孔可见大量深紫色沉淀出现。(5)去除培养液,每孔加 100μl DMSO,轻摇震荡。(6)用酶标仪在 570nm 处测定各孔 OD 值。

2 结果

- 2.1 显微镜观察结果 非处理对照组细胞生长活跃,形态正常,可见大量的深紫色沉淀物;箭毒/藜芦碱对照组可见大量变形肿胀或破裂死亡的细胞;各实验组细胞形态多为正常,有不同程度的深紫色沉淀物生成。
- 2.2 各组 OD 值 箭毒/藜芦碱对照组 OD 值平均值为 0.385 0,标准差为 0.092 3。各剂量组平均 OD 值见表 1。

表 1 不同 STX 剂量组光密度值(570nm)

STX 剂量组(ng)	孔数	OD 值均数	标准差
0.2	4	0.510	0.056 5
0.4	4	0.625	0.161 4
0.6	4	0.682	0.063 8
0.8	4	0.596	0.045 7
1.0	4	0.572	0.095 3
1.2	4	0.586	0.250 4

- 2.3 细胞毒性试验标准曲线的建立 由图 1 可见 STX 的含量在 0~0.6ng 范围内与光密度值呈剂量-反应关系,而在 0.6~1.2ng 范围内不呈现直线相关关系,在 STX 0.2~0.6ng 范围内得直线回归方程:  $y=0.399\ 6+0.503x$  ( $r=0.988\ 0$ ,  $P<0.02$ )。

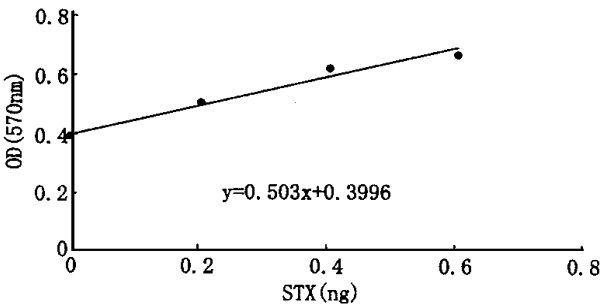


图 1 石房蛤毒素细胞毒性试验标准曲线

3 讨论

应用细胞毒性试验检测石房蛤毒素的原理是钠离子通道激活剂箭毒、藜芦碱对神经母细胞瘤钠离子通道具有协同的开放作用,可增进钠离子向细胞内的流动,从而引起细胞内外渗透压的改变,使细胞形态肿胀甚至细胞裂解死亡。PSP 类毒素具有钠离子通道阻滞剂的特性,可拮抗箭毒、藜芦碱的作用,以减少或“解救”细胞形态的改变及细胞裂解死亡,且此拮抗或“解救”作用与 PSP 类毒素的量呈剂量-反应关系。90 年代

\*辽宁省科学技术厅资助课题(课题号:99228001)

文章编号:1001-0580(2001)11-0995-01

## 饮食服务行业人员戊型肝炎感染的流行病学调查

山西省大同铁路卫生防疫站(大同 037005) 孙丽萍 张 莉

山西省化工设计院 张立华

中图分类号:R512.6

文献标识码:A

近几年来对急性散发性病毒性肝炎中戊型肝炎流行病学监测多有报道,监测结果表明均有较高的阳性率。为了解大同铁路地区饮食服务行业人员戊型肝炎感染及流行情况,我们于 1999 年 3 月~2000 年 3 月对 1 043 名饮食服务行业从业人员进行了戊型肝炎感染的调查。现将结果报告如下。

**对象与方法** (1)检测对象:大同铁路地区饮食服务行业的从业人员,共 1 043 名。其中男性 264 名,女性 779 名,平均年龄 33.3 岁。(2)血清来源:每名检测对象均于早晨采集空腹静脉血 3ml,分离血清后,置 -20℃ 冰箱内保存备检。(3)检测方法:采用酶免疫试验方法(ELISA)检测抗戊型肝炎病毒抗体(抗-HEV),试剂盒由北京医科大学肝炎试剂研究中心提供,按说明书操作并判断结果。(4)统计方法:数据均输入微机建立数据库,用 SPSS 软件处理。

**结果** (1)抗-HEV 抗体检测结果:1 043 名饮食服务行业人员中,抗体阳性者 20 名,总阳性率为 1.92%。其中男性 7 名,阳性率为 2.65%;女性 13 名,女性阳性率为 1.67%。(2)流行病学特征:年龄和性别分布:本次调查的饮食服务行业人员的平均年龄为 33.3 岁,平均感染年龄为 33.0 岁,其中男性平均感染年龄为 35.0 岁,女性平均感染年龄为 31.6 岁。男性抗-HEV 抗体阳性者在 20~49 岁组占多数,女性抗-HEV 抗体阳性者以 20~39 岁为主,同时在抗-HEV 抗体阳性组里,男性随着年龄的增大,阳性率在逐渐增高,而女性抗-HEV 抗体阳性者主要集中在 20~39 岁年龄组,在 30 岁~组阳性率最高。本次调查男女阳性率之比为 1.59:1,男女感染率之间的差异无显著性意义( $\chi^2 = 1.012, P > 0.05$ )。在同一年龄组里,男性感染率明显高于女性,在 20 岁~年龄组男女感染率差异无显著性意义( $\chi^2 = 0.128, P > 0.05$ ),在 30 岁~年龄组男女感染率差异也无显著性意义( $\chi^2 = 0.195, P > 0.05$ ),在 40 岁~年龄组里男女感染率差异有显著性意义( $\chi^2 = 5.231,$

$P < 0.05$ )。抗-HEV 抗体阳性者职业分布:在 20 名感染者中,有来自旅馆、歌舞厅行业的 5 名,占总感染人数的 25.0%;来自商店服务行业的 6 名,占总感染者人数的 30.0%;来自餐饮业的厨师 4 名、服务员 1 名,分别占总感染人数的 20.0%和 5.0%;来自其它服务行业的 4 名,占总感染人数的 20.0%。

**暴露因素调查**:对 20 名抗-HEV 抗体阳性者进行既往肝炎史、在外用餐史、饮水史、输血史和手术史的问卷调查。调查结果显示,这 20 名抗-HEV 抗体阳性者均否认上述暴露因素的存在,无一例有临床表现。

**讨论** 结果表明,抗-HEV 抗体阳性者 20 名,总感染率为 1.92%,明显低于新疆吐鲁番农村自然人群 HEV 感染率<sup>[1]</sup>;而抗-HEV 阳性者主要集中在 20~39 岁人群中,20 岁以下者阳性率为零,与 Lor<sup>[2]</sup>报道的健康人血清抗-HEV IgG 阳性率 20 岁以上人群明显高于 20 岁以下的人群相一致。此外,在本次调查中,抗-HEV 抗体阳性者虽均否认有肠道暴露史的存在,但是检测结果显示,抗-HEV 抗体阳性者中,同一单位、同一职业阳性率占总阳性率的 30.0%,这说明接触性隐性感染的比例是相当高的,提示戊型肝炎病毒感染的传播途径一样,对饮食服务行业戊型肝炎的防治应高度重视。

**作者简介**:孙丽萍(1961-),女,河北人,副主任技师,理学学士,主要从事卫生检验工作。

### 参 考 文 献

1. 周育森,等.新疆吐鲁番农村自然人群 HEV 感染的血清流行病学调查.中国公共卫生,1994,17(5):197-198.
2. Lor AS. Seroepidemiological study of hepatitis E in Hong Kong by recombinant-based enzyme immunoassays. Lancet, 1992, 340 (8829): 1205-1207.

(2001-04-24 收稿 2001-05-31 修回 李溪莹编辑 赵淑艳校对)

初,加拿大学者在此原理的基础上,应用结晶紫对细胞进行染色,在 96 孔板中进行实验,用酶标仪测定<sup>[3]</sup>。该方法减少了细胞用量,检测自动化,可同时大量检测样品,灵敏准确。但需要对细胞染色,多次洗板,并固定干燥,裂解细胞,操作繁琐。本实验对该法进一步做了改进,用四甲基偶氮唑蓝(MTT)代替结晶紫<sup>[4]</sup>。活细胞线粒体中含有一种脱氢酶,可作用于 MTT 使之变成深紫色产物。该方法不需要染色、洗板、固定、干燥、裂解细胞等,操作步骤简便,操作时间短,方法易掌握,检测试剂费用低。标准曲线所需的石房蛤毒素仅为 ng 级,对样品的提取要求也不高。本试验所测吸光度值在一定剂量范围内与 STX 呈剂量反应关系,初步建立了检测麻痹性贝毒素细胞毒性试验的标准曲线。

细胞毒性试验方法中,细胞的生长状况是至关重要的因素,细胞生长状态活跃可提高检测的灵敏性,反之将降低该方法的灵敏性。本试验箭毒/藜芦碱对照组,即 STX 为 0 的剂量组吸光度均值为 0.385,说明本试验灵敏度略低于其他报道,

这可能是由于本试验所用细胞的生长状态不够活跃所致,有待于进一步摸索。

**作者简介**:陈杰(1964-),男,辽宁省葫芦岛市人,副教授,硕士,从事劳动卫生与环境卫生学工作。

### 参 考 文 献

1. 陈杰,刘宁,李春盛,等.赤潮藻类毒素的研究概况.中国公共卫生,2001,17(5):478.
2. 陈杰,李春盛,曹雅明,等.赤潮藻类毒素检测方法的研究概况.中华预防医学杂志,2001,35(2):131.
3. Jellett J, Joanne F, Marks Linda J, Stewart James E, et al. Paralytic shellfish poison (saxitoxin family) bioassays: automated endpoint determination and standardization of the in vitro tissue culture bioassay, and comparison with the standard mouse bioassay. Toxicon, 1992, 30(10): 1143.
4. Manger Ron L, Leja Linda S, Lee Sue Y, et al. Detection of sodium channel toxins: directed cytotoxicity assays of purified ciguater toxins, brevetoxins, saxitoxins and seafood extracts. Journal of AOAC International, 1995, 78(2): 521.

(2001-08-12 收稿 蔡天德编辑 赵淑艳校对)