

## 研究论文

## 甜蜜素联合柠檬黄对Caco-2细胞毒性机理的初步探究

张辉 曲道峰 冯立芳 韩剑众\*

(浙江工商大学食品与生物工程学院, 杭州 310018)

**摘要** 该文探讨甜蜜素联合柠檬黄对人克隆结肠腺癌细胞(Caco-2细胞)损伤的机理, 以高内涵细胞成像分析(high content analysis, HCA)技术为平台, 析因设计实验方差分析为联合毒性的评价方法、实时荧光定量PCR(quantificational Real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)和Western blot为检测方法对此进行探究。结果表明, 甜蜜素与柠檬黄均会显著地抑制Caco-2细胞的增殖, 且呈现剂量-效应关系,  $IC_{50}$ 分别为 $11.37 \pm 0.15$  g/L和 $1.21 \pm 0.12$  g/L。与单独组相比, 联合组显著地升高细胞内 $Ca^{2+}$ 浓度、升高活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平、抑制细胞增殖、增大细胞膜通透性、降低线粒体膜电位。联合组在细胞内 $Ca^{2+}$ 浓度、ROS水平上表现为协同作用, 在线粒体膜电位变化上表现为相加作用。qRT-PCR和Western blot显示, 联合组显著提高Bax、细胞色素c(cytochrome c)、胱冬肽酶-3(caspase-3)等基因的表达, 并上调Bax和下调Bcl-2的蛋白质水平, 同时提高细胞色素c、剪切胱冬肽酶-3(cleaved-caspase-3)的蛋白质水平来抑制Caco-2细胞增殖。

**关键词** 甜蜜素; 柠檬黄; Caco-2细胞; 联合毒性; 高内涵分析

## The Mechanism of Joint Toxicity of Sodium Cyclamate and Lemon Yellow on Caco-2 Cells

Zhang Hui, Qu Daofeng, Feng Lifang, Han Jianzhong\*

(College of Food and Biotechnology, Zhejiang Gongshang University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract** The aim of this study is to investigate the mechanism of sodium cyclamate together with lemon yellow on suppressing proliferation of Caco-2 cells, which is based on high content analysis (HCA), factorial design experiment analysis of variance as the joint toxicity evaluation method, qRT-PCR and Western blot as technical methods. The experiment indexes evaluated mainly include calcium concentration, reactive oxygen species (ROS) accumulation and mitochondrial membrane potential. The results indicated that sodium cyclamate and lemon yellow dose-dependently decreased the growth of Caco-2 cells with an  $IC_{50}$  of  $11.37 \pm 0.15$  g/L and  $1.21 \pm 0.12$  g/L at 24 h, respectively. Compared with the high dose group, mix group could significantly decrease the cell number and mitochondrial membrane potential, accompanied by the increase of membrane permeability, ROS accumulation and calcium concentration. Both sodium cyclamate and lemon yellow have synergistic effect on calcium concentration, oxidative stress and additive effect on mitochondrial membrane potential. The results obtained by qRT-PCR and Western blot showed that mix group could inhibit Caco-2 cells proliferation by significantly increasing the mRNA

收稿日期: 2016-09-27 接受日期: 2017-02-06

浙江省食品科学与工程重中之重一级学科开放基金资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0571-28008901, E-mail: hanjz99@zjgsu.edu.cn

Received: September 27, 2016

Accepted: February 6, 2017

This work was supported by the Zhejiang Province Food Science and Engineering Emphasis on A Major Open Subject Project

\*Corresponding author. Tel: +86-571-28008901, E-mail: hanjz99@zjgsu.edu.cn

网络出版时间: 2017-03-20 17:02:11

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170320.1702.018.html>

levels of *Bax*, *cytochrome c*, *caspase-3* and protein levels of *Bax*, *cytochrome c*, cleaved-*caspase-3* and decreasing the protein level of *Bcl-2*.

**Keywords** sodium cyclamate; lemon yellow; Caco-2 cell; joint toxicity; high content analysis

食品添加剂作为一类在日常生活中广泛应用的化合物,其安全性一直被人们广泛关注<sup>[1]</sup>。目前的食物添加剂的安全性评价是针对单一品种制定相应的最大使用量<sup>[2]</sup>,而一种食品可能含有十几种甚至数十种食品添加剂,实际生活中,人每天通过摄入的食品添加剂可能达到几十种甚至上百种之多<sup>[3]</sup>。单一添加剂在规定使用范围是安全的,但是几种添加剂联合作用时,可能产生相加、协同、拮抗等联合作用。因此,探究并评价食品添加剂的联合毒性,对我国食品添加剂的安全使用具有重大意义。高内涵细胞成像分析(high content analysis, HCA)技术是一种应用高分辨率的荧光数码影像系统<sup>[4]</sup>,旨在获得样品对细胞产生的多维立体和实时快速的生物效应信息<sup>[5]</sup>,同时也是在细胞水平上检测多个指标的多元化、功能性的技术平台<sup>[6]</sup>。该系统广泛应用于医学化合物新药的筛选等领域,很多采用HCA评价新药物的细胞损伤机制的研究,证明了其有效性、敏感性及准确性<sup>[7]</sup>。日常生活中,甜蜜素和柠檬黄在果脯、蜜饯中经常混合使用,很容易同时摄入体内。目前尚未见到关于这两种食品添加剂联合作用的研究报道,因此,探究这两种食品添加剂的联合作用就显得很有必要。本研究是以高内涵细胞成像分析(HCA)技术为平台、析因设计实验方差分析为联合毒性的评价方法,应用qRT-PCR和Western blot检测相关基因表达的变化,从而探究甜蜜素和柠檬黄对Caco-2细胞潜在的联合毒性作用的机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

Caco-2细胞株由中国科学院上海生命科学研究院细胞库提供;Fluo-4 NW Calcium Assay Kit、HCS Mitochondrial Health Kit、CellROX<sup>®</sup> Oxidative Stress Reagent购自Thermo Scientific公司;Trizol、SYBR<sup>®</sup> Green I Master Mix购自Life Technologies公司;PCR引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成;兔抗人*Bax*、*Bcl-2*、细胞色素c(*cytochrome c*)、胱冬肽酶-3(*caspase-3*)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(*GAPDH*)一抗和辣根过氧化物酶标记鼠抗兔二抗

购自Cell Signaling Technology公司;MTT细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;甜蜜素、柠檬黄购自上海瑞永生物科技有限公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养与药物处理** 人结肠腺癌 Caco-2细胞属于贴壁细胞,培养于含10% FBS的DMEM培养液中,培养液内含青霉素、链霉素各100 U/mL,置于37 °C、含5% CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中培养。待细胞长满培养瓶至80%时,加入0.25%胰蛋白酶消化,平均2~3 d传代1次,一般取对数生长期的细胞进行实验。称取适量的甜蜜素与柠檬黄,分别溶解于DMEM培养液中,0.22 μm滤膜滤过除菌,各自对应的终浓度为3.00、6.00、9.00、12.00、15.00 g/L及0.20、0.60、1.00、1.40、1.80 g/L。

**1.2.2 MTT法** 取一瓶对数生长期的Caco-2细胞,以 $5 \times 10^3$ /孔(100 μL)接种于96孔板上,在细胞培养箱中培养过夜,等细胞贴壁后吸出培养液,按照设定好的终浓度加入待测物,继续培养箱中培养20 h后,按照试剂盒的说明分别加入适量的MTT溶液以及Formazan溶解液。在酶标仪上测出每孔的吸光度(*D*)值(检测波长490 nm,参考波长570 nm),按下列公式算出每个剂量组细胞的抑制率。每个剂量设5个平行样,实验组设细胞对照孔和实验孔,并设空白孔(空白培养液,不加细胞)。

$$\text{细胞抑制率(\%)} = [(D_1 - D_2) / (D_1 - D_3)] \times 100\%$$

式中:*D*<sub>1</sub>为对照组细胞的*D*值;*D*<sub>2</sub>为各剂量组细胞的*D*值;*D*<sub>3</sub>为空白组细胞的*D*值。

**1.2.3 细胞凋亡检测** 将处于对数生长期的细胞以 $1 \times 10^4$ /孔(100 μL)接种于96孔板上,在细胞培养箱中培养过夜,等细胞完全贴壁后加入不同剂量的待测物,继续培养24 h后,用Hoechst 33342(10 μg/mL)与PI(10 μg/mL)双染Caco-2细胞,室温下孵育10 min后,用宽场高内涵成像系统进行拍照,高内涵成像分析系统进行分析。

**1.2.4 钙离子浓度检测** 使用钙离子浓度检测试剂盒检测细胞内Ca<sup>2+</sup>浓度变化,将处于对数生长期的细胞按试剂盒的要求以 $4 \times 10^4$ /孔(100 μL)接种于

96孔板上, 在细胞培养箱中培养过夜, 等细胞完全贴壁后加入不同剂量的待测物, 继续培养24 h后, 按照试剂盒的说明加入适量的钙离子染色液。拍照与分析软件同上。

**1.2.5 线粒体健康度检测** 使用线粒体健康试剂盒检测细胞内线粒体膜电位变化, 将处于对数生长期的细胞按试剂盒的要求以 $5 \times 10^3$ /孔(100  $\mu$ L)接种于96孔板上, 在细胞培养箱中培养过夜, 等细胞完全贴壁后加入不同剂量的待测物, 继续培养24 h后, 按照试剂盒的说明分别加入适量的线粒体膜电位、膜通透性染色液。拍照与分析软件同上。

**1.2.6 氧化应激检测** 使用氧化应激试剂盒检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量的变化。将处于对数生长期的细胞按试剂盒的要求以 $1 \times 10^4$ /孔(100  $\mu$ L)接种于96孔板上, 在细胞培养箱中培养过夜, 等细胞完全贴壁后加入不同剂量的待测物, 继续培养24 h后, 按照试剂盒的说明加入ROS染色液。拍照与分析软件同上。

**1.2.7 实时荧光定量PCR(quantificational Real-time polymerase chain reaction, qRT-PCR)检测** 将处于对数生长期的细胞接种于细胞培养瓶中, 在细胞培养箱中培养过夜, 等细胞完全贴壁后加入不同剂量的待测物, 继续培养24 h后, 收集瓶中所有细胞, 用Trizol试剂提取各组总RNA, 并检测RNA的纯度及浓度, 合格后进行反转录, 最后在荧光定量PCR循环仪上进行反转录产物的扩增, 以人类GAPDH基因作为内参, 以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算各组细胞mRNA的相对表达量。相关目的基因的引物序列见表1。

**1.2.8 Western blot检测** 用细胞裂解液提取细胞

总蛋白, 用BCA法检测蛋白质浓度。细胞总蛋白煮沸变性后进行12% SDS-PAGE。用湿转法将蛋白质分子转移至PVDF膜上, 用TBST溶解的5%脱脂牛奶封闭1 h, 一抗(1:1 000)4  $^{\circ}$ C下孵育过夜, TBST洗膜3次, 每次10 min, TBS洗膜10 min; 二抗(1:6 000)室温下孵育1 h, TBST洗膜3次, 每次10 min。以GAPDH为内参蛋白质, ECL试剂盒化学发光, Quantity One软件分析灰度值。

### 1.3 联合毒性评价

本次实验采用析因实验方差分析法对联合作用方式进行评价分析<sup>[8]</sup>。将甜蜜素与柠檬黄各自的IC<sub>50</sub>、IC<sub>25</sub>、IC<sub>10</sub>分别作为单独组的高剂量组、中剂量组、低剂量组, 其对应的浓度分别为11.37、7.20、4.77 g/L及1.21、0.42、0.18 g/L; 联合组将取甜蜜素与柠檬黄各自的IC<sub>5</sub>与IC<sub>25</sub>分别作为低剂量与高剂量两水平, 其对应的浓度分别为2.87、7.20 g/L及0.08、0.42 g/L, 按2 $\times$ 2析因设计实验, 对应的联合组的终浓度为甜蜜素IC<sub>5</sub>+柠檬黄IC<sub>5</sub>(2.87+0.08)、甜蜜素IC<sub>25</sub>+柠檬黄IC<sub>5</sub>(7.20+0.08)、甜蜜素IC<sub>5</sub>+柠檬黄IC<sub>25</sub>(2.87+0.42)、甜蜜素IC<sub>25</sub>+柠檬黄IC<sub>25</sub>(7.20+0.42)。每个剂量组设3个平行样本, 每组实验重复3次。

### 1.4 统计学方法

实验数据采用SPSS Statistics 19软件工具进行显著性方差分析, 数据结果用mean $\pm$ S.D.表示。P<0.05为差异具有显著性, P<0.01为差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 甜蜜素和柠檬黄对Caco-2细胞增殖的抑制作用

甜蜜素和柠檬黄均可抑制Caco-2细胞的增殖, 且呈现明显的剂量-效应关系(图1A和图1B)。柠檬黄对Caco-2细胞的抑制能力大于甜蜜素。由SPSS软件分析得出, 甜蜜素的IC<sub>50</sub>为11.37 $\pm$ 0.15 g/L, 柠檬黄的IC<sub>50</sub>为1.21 $\pm$ 0.12 g/L。分析图1C可知, 联合组对Caco-2细胞增殖的抑制率较单独组有所上升, 尤其是高剂量联合组(甜蜜素IC<sub>25</sub>+柠檬黄IC<sub>25</sub>)对Caco-2细胞增殖的抑制率达到了57.01%, 比高剂量单独组(甜蜜素IC<sub>50</sub>与柠檬黄IC<sub>50</sub>)对Caco-2细胞增殖的抑制率高出了14.02%, 表明联合组比单独组对Caco-2细胞的增殖有更强的抑制作用。

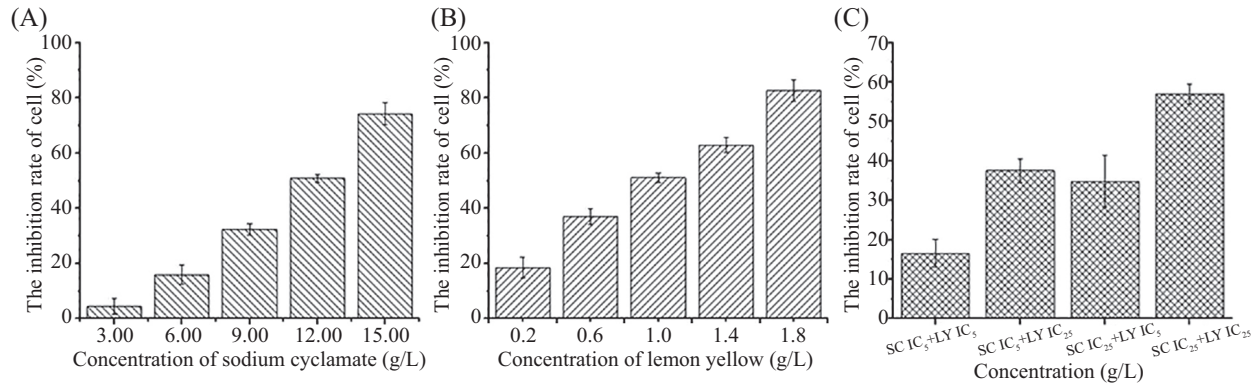
### 2.2 甜蜜素与柠檬黄对Caco-2细胞凋亡的影响

由图2可知, 与图2A相比, 单独组图2B、图2C及联合组图2D细胞核部分皱缩, 边界呈现出不规则

表1 用于qRT-PCR的引物序列

Table 1 Primers of qRT-PCR

基因名称 Gene	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
GAPDH	F: CGG AGT CAA CGG ATT TGG TCG TAT R: AGC CTT CTC CAT GGT GGT GAA GAC
Caspase-3	F: GTG GAG GCC GAC TTC TTG TA R: GTC GGC ATA CTG TTT CAG CA
Cytochrome c	F: CAG TGC CAC ACC GTT GAA R: GTT CTT ATT GGC GGC TGT G
Bax	F: ATG GAG GGG TCC GGG GAG R: TGG AAG AAG ATG GGC TGA
Bcl-2	F: CAG CTG CAC CTG ACG R: GCT GGG TAG GTG CAT

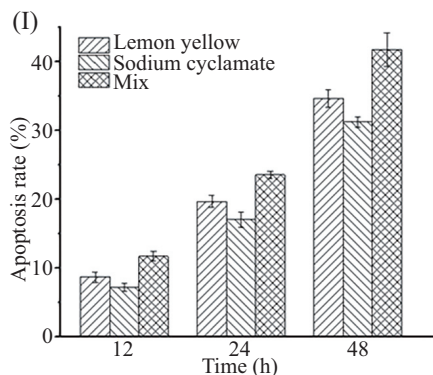
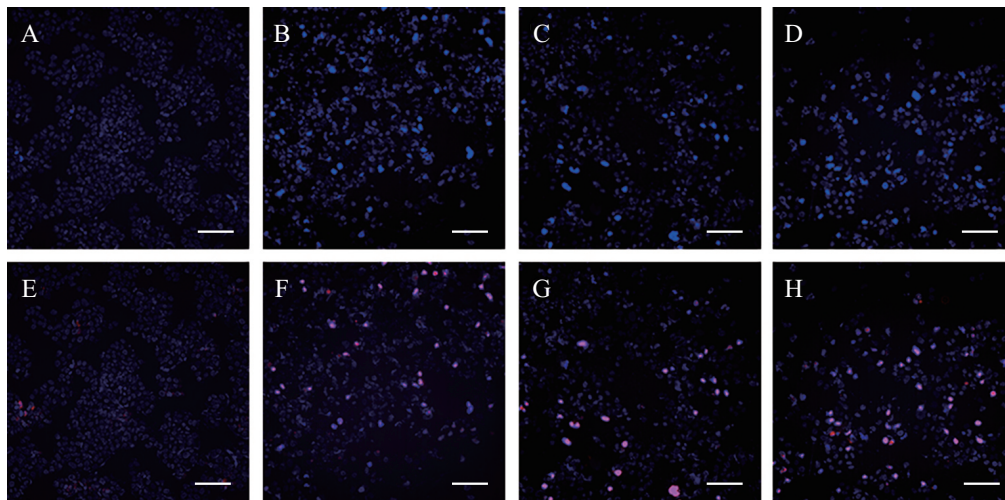


A: 甜蜜素(3.00~15.00 g/L)作用24 h后的Caco-2细胞增殖抑制率; B: 柠檬黄(0.20~1.80 g/L)作用24 h后的Caco-2细胞增殖抑制率; C: 甜蜜素与柠檬黄联合作用24 h后的Caco-2细胞增殖抑制率; SC: 甜蜜素; LY: 柠檬黄。数据表示为平均值±标准差。

A: the proliferation of Caco-2 cell inhibited by the treatment of sodium cyclamate (3.00-15.00 g/L) for 24 h; B: the proliferation of Caco-2 cell inhibited by the treatment of lemon yellow (0.20-1.80 g/L) for 24 h; C: the proliferation of Caco-2 cell inhibited by the treatment of sodium cyclamate and lemon yellow for 24 h, among them, SC and LY represents sodium cyclamate and lemon yellow, respectively. The data are represented as mean±S.D..

图1 甜蜜素与柠檬黄对Caco-2细胞增殖的影响

Fig.1 The effect of sodium cyclamate and lemon yellow on the proliferation of Caco-2 cells



A~D: 分别为空白对照组、甜蜜素组、柠檬黄组、联合组24 h细胞核; E~H: 分别为空白对照组、甜蜜素组、柠檬黄组、联合组24 h细胞凋亡变化; 标尺=100 μm; I: 高剂量单独组与联合组处理Caco-2细胞12、24与48 h后细胞凋亡率的变化; 数据表示为平均值±标准差。

A~D: effects of control group, sodium cyclamate group, lemon yellow group and mix group on cell nucleus of Caco-2 cells for 24 h; E~H: effects of control group, sodium cyclamate group, lemon yellow group and mix group on cell apoptosis of Caco-2 cells for 24 h; Scale bars=100 μm; I: effects of high dose sodium cyclamate group, lemon yellow group and mix group on apoptosis rate of Caco-2 cells for 12, 24 and 48 h. The data are represented as mean±S.D..

图2 甜蜜素与柠檬黄对Caco-2细胞形态和凋亡的影响

Fig.2 Effect of sodium cyclamate and lemon yellow on cellular morphology and apoptosis of Caco-2 cells

的形状。进一步通过Hochest 33342-PI双染发现,与对照组(图2E)相比,单独组图2F、图2G细胞密度有所下降,细胞凋亡数量显著增加。高剂量柠檬黄组、甜蜜素组与联合组处理细胞12 h后,Caco-2细胞凋亡率分别为 $8.72\% \pm 0.73\%$ 、 $7.28\% \pm 0.59\%$ 、 $11.73\% \pm 0.66\%$ ;处理24 h后,凋亡率分别为 $19.72\% \pm 0.89\%$ 、 $17.06\% \pm 1.07\%$ 、 $23.58\% \pm 0.54\%$ ;处理48 h后,凋亡率分别为 $34.64\% \pm 1.24\%$ 、 $31.22\% \pm 0.79\%$ 、 $41.73\% \pm 2.47\%$ 。

### 2.3 甜蜜素与柠檬黄对Caco-2细胞钙离子浓度的影响

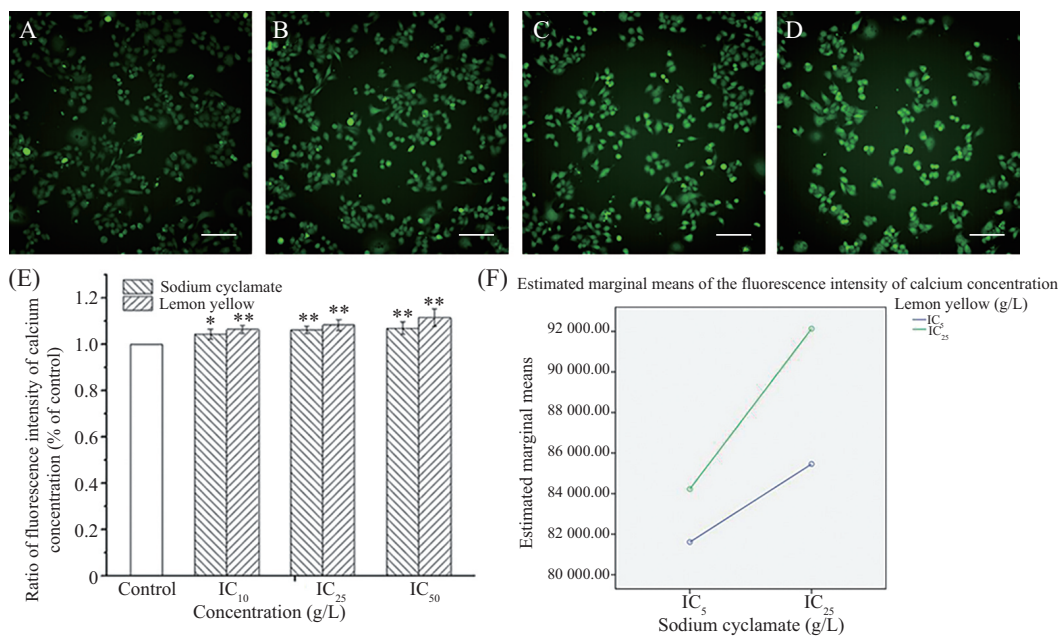
由图3A~图3D可知,与对照组(图3A)相比,甜蜜素组、柠檬黄组与联合组的钙离子荧光强度明显上升,表明经过甜蜜素与柠檬黄处理过后的Caco-2细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度有所上升。由图3E可知,甜蜜素与柠檬黄处理细胞24 h后,单独组与正常对照组相比,会导致Caco-2细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的显著升高( $P < 0.05$ ),且呈一定剂量依赖关系。低剂量组中,甜蜜素组与柠檬黄组处理细胞24 h后,细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的总荧光强度分别是对照组的 $104.43\% \pm 2.18\%$ 、 $106.37\% \pm 1.82\%$ 。

中剂量组中,甜蜜素组与柠檬黄组细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的总荧光强度分别是对照组的 $106.17\% \pm 1.56\%$ 、 $108.30\% \pm 2.24\%$ 。高剂量组中,甜蜜素组与柠檬黄组细胞内 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的总荧光强度分别是对照组的 $106.95\% \pm 2.69\%$ 、 $111.50\% \pm 3.75\%$ 。

析因设计实验方差分析表明,联合组均能使得 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度显著升高。同空白对照组比较,有显著性差异( $P < 0.01$ )。析因方差分析表明,两者交互作用显著( $P < 0.01$ )。进一步分析联合组对 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度影响的估计边缘均数图,发现两曲线随着剂量的增大而远离,得出结论为协同作用(图3F)。

### 2.4 甜蜜素与柠檬黄对Caco-2细胞的线粒体健康度检测

由图4A~图4D可知,与对照组图4A相比,甜蜜素组、柠檬黄组与联合组的细胞线粒体膜电位荧光强度明显降低,表明经过甜蜜素或柠檬黄处理过后会引Caco-2细胞线粒体膜电位降低。由图4E~图4H可知,与对照组图4E相比,甜蜜素组、柠檬黄组与联合组的一些细胞内DNA荧光强度明显上升,表



A: 空白对照组24 h  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度; B: 甜蜜素组24 h  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度; C: 柠檬黄组24 h  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度; D: 联合组24 h  $\text{Ca}^{2+}$ 浓度; 标尺=100  $\mu\text{m}$ ; E: Caco-2细胞分别以甜蜜素和柠檬黄( $\text{IC}_{10}$ 、 $\text{IC}_{25}$ 、 $\text{IC}_{50}$ )作用24 h并依次用Fluo-4 NW dye mix染色后的 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度变化; F: 甜蜜素与柠檬黄联合作用对Caco-2细胞 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度影响的估计边缘均数图。数据表示为平均值 $\pm$ 标准差。 $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ , 与对照组相比较。

A:  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of Caco-2 cells in control group for 24 h; B:  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of Caco-2 cells in sodium cyclamate group for 24 h; C:  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of Caco-2 cells in lemon yellow group for 24 h; D:  $\text{Ca}^{2+}$  concentration of mix group for 24 h; Scale bars=100  $\mu\text{m}$ ; E: Caco-2 cell treated with different doses of sodium cyclamate and lemon yellow ( $\text{IC}_{10}$ ,  $\text{IC}_{25}$ ,  $\text{IC}_{50}$ ) at 24 h, respectively, and then stained with Fluo-4 NW dye mix; F: estimated marginal means of the effect of sodium cyclamate and lemon yellow on  $\text{Ca}^{2+}$  release in Caco-2 cells. The data are represented as mean $\pm$ S.D.  $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$  compared with control group.

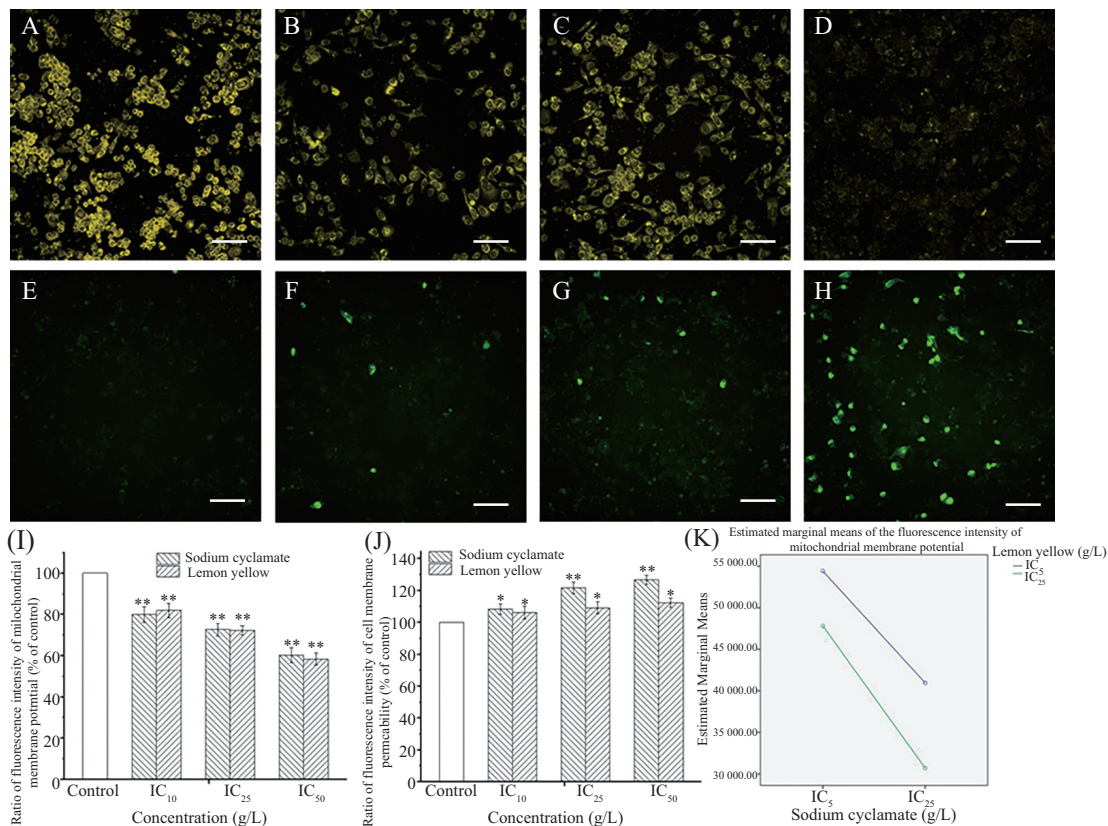
图3 甜蜜素与柠檬黄对Caco-2细胞 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度的影响

Fig.3 Effect of sodium cyclamate and lemon yellow on  $\text{Ca}^{2+}$  release in Caco-2 cells

明经过甜蜜素或柠檬黄处理过后会引起Caco-2细胞膜通透性的改变。由图4I和图4J可知, 甜蜜素或柠檬黄处理细胞24 h后, 单独组与对照组比较, 中、高剂量组均能显著降低线粒体膜电位, 增大细胞膜通透性( $P<0.05$ ), 两者呈一定剂量依赖关系。低剂量组中, 甜蜜素组与柠檬黄组处理细胞24 h后, 细胞线粒体膜电位的总荧光强度分别是对照组的79.96%±2.80%、81.95%±1.94%, 表征细胞膜通透性变化的细胞内DNA总的荧光强度分别是对照组的108.40%±3.37%、106.04%±2.97%。中剂量组中, 甜蜜素组与柠檬黄组在细胞线粒体膜电位的总荧光强度分别是对照组的72.74%±1.53%、72.21%±1.19%,

表征细胞膜通透性变化的细胞内DNA总的荧光强度分别是对照组的121.66%±3.62%、109.29%±3.75%。高剂量组中, 甜蜜素组与柠檬黄组在细胞线粒体膜电位的总荧光强度分别是对照组的60.24%±2.69%、58.37%±1.91%, 表征细胞膜通透性变化的细胞内DNA总的荧光强度分别是对照组的126.83%±2.94%、112.38%±3.01%。

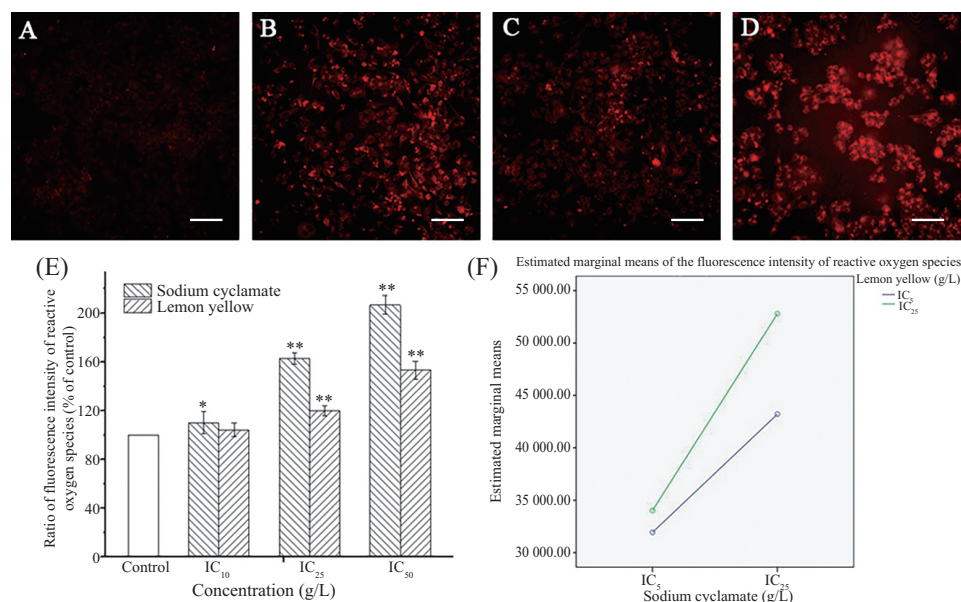
析因设计实验方差分析表明, 联合组能够降低线粒体膜电位。同空白对照组比较, 有显著性差异( $P<0.01$ )。析因方差分析, 两者交互作用不显著( $P>0.05$ )。进一步分析联合组对线粒体膜电位影响的估计边缘均数图, 发现两曲线几乎平行, 得出结论



A~D: 分别为空白对照组、甜蜜素组、柠檬黄组、联合组24 h细胞线粒体膜电位; E~H: 分别为空白对照组、甜蜜素组、柠檬黄组、联合组24 h细胞膜通透性; 标尺=100  $\mu$ m; I: Caco-2细胞分别以甜蜜素和柠檬黄(IC<sub>10</sub>、IC<sub>25</sub>、IC<sub>50</sub>)作用24 h并依次用MitoHealth stain染色后的线粒体膜电位变化; J: Caco-2细胞分别以甜蜜素和柠檬黄(IC<sub>10</sub>、IC<sub>25</sub>、IC<sub>50</sub>)作用24 h并依次用Image-iT<sup>®</sup> DEAD Green<sup>™</sup> viability stain染色后的膜通透性变化; K: 甜蜜素与柠檬黄联合作用对Caco-2细胞线粒体膜电位影响的估计边缘均数图。数据表示为平均值±标准差。\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , 与对照组相比较。

A~D: effects of control group, sodium cyclamate group, lemon yellow group and mix group on mitochondrial membrane potential of Caco-2 cells for 24 h; E~G: effects of control group, sodium cyclamate group, lemon yellow group and mix group on membrane permeability of Caco-2 cells for 24 h; Scale bars=100  $\mu$ m; I: Caco-2 cell treated with different doses of sodium cyclamate and lemon yellow (IC<sub>10</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub>) at 24 h, respectively, and then stained with MitoHealth stain; J: Caco-2 cell treated with different doses of sodium cyclamate and lemon yellow (IC<sub>10</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub>) at 24 h, respectively, and then stained with Image-iT<sup>®</sup> DEAD Green<sup>™</sup> viability stain; K: estimated marginal means of the effect of sodium cyclamate and lemon yellow on mitochondrial membrane potential in Caco-2 cells. The data are represented as mean±S.D.. \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$  compared with control group.

图4 甜蜜素与柠檬黄诱导Caco-2细胞引起的细胞线粒体膜电位、膜通透性变化图  
Fig.4 Imaging of cell mitochondrial membrane potential and membrane permeability of Caco-2 cells induced by sodium cyclamate and lemon yellow



A: 空白对照组24 h ROS水平; B: 甜蜜素组24 h ROS水平; C: 柠檬黄组24 h ROS水平; D: 联合组24 h ROS水平; 标尺=100  $\mu\text{m}$ ; E: Caco-2细胞分别以甜蜜素和柠檬黄(IC<sub>10</sub>、IC<sub>25</sub>、IC<sub>50</sub>)作用24 h并依次用CellROX<sup>®</sup> Deep Red reagent染色后的ROS水平变化; F: 甜蜜素与柠檬黄联合作用对Caco-2细胞ROS释放影响的估计边缘均数图。数据表示为平均值 $\pm$ 标准差。\* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01, 与对照组相比较。

A: ROS accumulation of Caco-2 cells in control group for 24 h; B: ROS accumulation of Caco-2 cells in sodium cyclamate group for 24 h; C: ROS accumulation of Caco-2 cells in lemon yellow group for 24 h; D: ROS accumulation of Caco-2 cells in mix group for 24 h; Scale bars=100  $\mu\text{m}$ ; E: Caco-2 cell treated with different doses of sodium cyclamate and lemon yellow (IC<sub>10</sub>, IC<sub>25</sub>, IC<sub>50</sub>) at 24 h, respectively, and then stained with CellROX<sup>®</sup> Deep Red reagent; F: estimated marginal means of the effect of sodium cyclamate and lemon yellow on reactive oxygen species in Caco-2 cells. The data are represented as mean $\pm$ S.D.. \* $P$ <0.05, \*\* $P$ <0.01 compared with control group.

图5 甜蜜素与柠檬黄对Caco-2细胞ROS的影响

Fig.5 Effect of sodium cyclamate and lemon yellow on reactive oxygen species release in Caco-2 cells

为简单的相加作用(图4K)。

## 2.5 甜蜜素与柠檬黄对Caco-2细胞氧化应激检测

由图5A~图5D可知, 与对照组(图5A)相比, 甜蜜素组、柠檬黄组与联合组的ROS荧光强度明显上升, 表明经过甜蜜素与柠檬黄处理过后的Caco-2细胞内ROS水平有所上升。由图5E可知, 甜蜜素与柠檬黄处理细胞24 h后, 单独组与正常对照组相比, 低剂量组甜蜜素就会显著地引起ROS的水平升高( $P$ <0.05), 且呈现一定的剂量依赖关系。中、高剂量组柠檬黄也会显著引起ROS的水平升高( $P$ <0.01), 其低剂量组引起ROS的水平升高不显著( $P$ >0.05)。低剂量组中, 甜蜜素组与柠檬黄组处理细胞24 h后, 细胞内ROS的总荧光强度分别是对照组的110.06% $\pm$ 1.07%、104.19% $\pm$ 0.69%。中剂量组中, 甜蜜素组与柠檬黄组细胞内ROS的总荧光强度分别是对照组的162.77% $\pm$ 0.85%、119.82% $\pm$ 0.51%。高剂量组中, 甜蜜素组与柠檬黄组细胞内ROS的总荧光强度分别是对照组的206.67% $\pm$ 0.64%、153.05% $\pm$ 1.14%。

析因设计实验方差分析表明, 联合组能使得

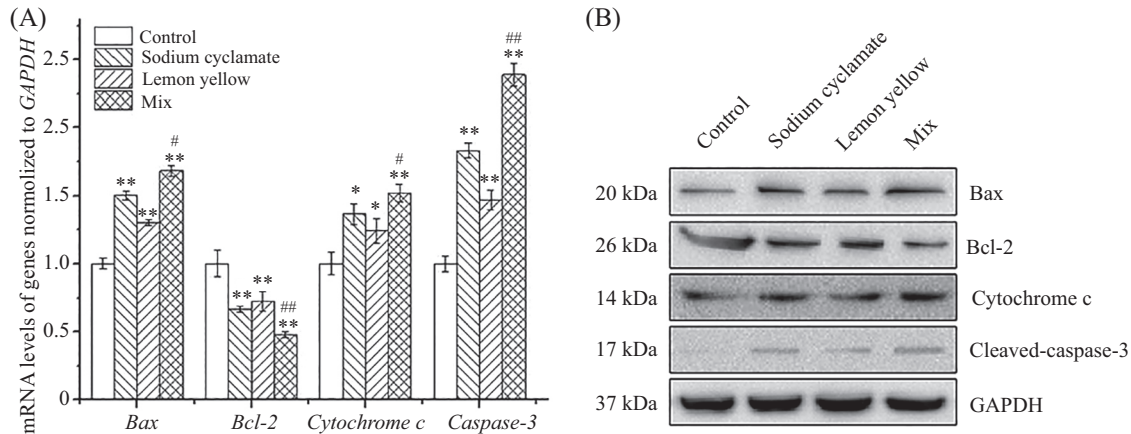
ROS的水平升高。与空白对照组相比, 有显著性差异( $P$ <0.01)。析因方差分析, 两者交互作用显著( $P$ <0.05)。进一步分析联合组对ROS水平影响的估计边缘均数图, 发现两曲线随着剂量的增大而远离, 得出结论为协同作用(图5F)。

## 2.6 甜蜜素与柠檬黄对Caco-2细胞相关目的基因的mRNA与蛋白质水平检测

由图6A可知, 与对照组相比, 高剂量单独组与联合组均能够显著影响Caco-2细胞内Bax、Bcl-2、细胞色素c、胱冬肽酶-3基因的mRNA水平。由图6B分析可知, 联合组能够显著上调Bax和下调Bcl-2的蛋白质水平, 同时上调细胞色素c、剪切胱冬肽酶-3的蛋白质水平, 与高剂量单独组相比, 联合组具有显著性差异( $P$ <0.05)。

## 3 讨论

人工甜味剂和人工合成色素是现代食品加工生产过程中大量使用的两类食品添加剂。随着近几年甜蜜素在国内及出口食品中屡次被检出超标,



A: qRT-PCR检测经高剂量单独组与联合组处理后的Caco-2细胞内Bax、Bcl-2、细胞色素c、胱冬肽酶-3基因的mRNA水平变化; B: Western blot检测经高剂量单独组与联合组处理后的Caco-2细胞内Bax、Bcl-2、细胞色素c、剪切胱冬肽酶-3蛋白质水平。数据表示为平均值±标准差。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 与对照组相比较; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , 与甜蜜素组和柠檬黄组相比较。

The mRNA and protein levels of Bax, Bcl-2, cytochrome c, caspase-3 and cleaved-caspase-3 in various groups were analyzed by qRT-PCR (A) and Western blot (B). GAPDH was used as a loading reference. The data are represented as mean±S.D.. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  compared with control group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  compared with sodium cyclamate group and lemon yellow group.

图6 甜蜜素与柠檬黄联合作用对Caco-2细胞相关目的基因mRNA和蛋白质水平的影响

Fig.6 Effect of sodium cyclamate and lemon yellow on related gene mRNA and protein levels in Caco-2 cells

以及对其致癌性、致畸性等安全性问题的诸多争议, 现已成为全世界关注的热点。日本学者Sasaki等<sup>[9]</sup>研究了6类共39种食品添加剂损伤ddY小鼠DNA的能力, 发现合成色素与甜味剂的遗传毒性较强, DNA损伤率较高。付佳等<sup>[10]</sup>研究发现, 柠檬黄联合苯甲酸钠对L-929细胞呈现拮抗作用, 同时也发现, 对DNA损伤和引起诱变存在较复杂的机制。英国Liverpool大学Lau等<sup>[11]</sup>研究亮蓝与L-谷氨酸、喹啉黄与阿斯巴甜两组混合物诱导NB2a细胞神经毒性的能力, 发现前者联合毒性是单独作用相加的3倍, 后者为2.5倍。以上的研究报导均表明, 人工甜味剂和人工合成色素在一定剂量下具有一定的联合毒性。

本研究中, MTT实验表明, 甜蜜素与柠檬黄对Caco-2细胞增殖的抑制呈现剂量-效应关系, 两者联合作用对Caco-2细胞的增殖有更强的抑制作用, 其抑制率达到了57.01%, 比高剂量单独组抑制率高出了14.02%。后续实验发现, 高剂量柠檬黄组、甜蜜素组以及联合组均会不同程度的导致细胞凋亡, 并且呈现时间-剂量效应关系, 为了进一步探究两者联合作用时导致细胞凋亡的毒性机制, 在此基础上对细胞内 $Ca^{2+}$ 浓度变化、线粒体膜电位变化、细胞膜通透性变化、氧化应激水平变化、胱冬肽酶家族基因表达水平以及Bax、Bcl-2、细胞色素c蛋白质水平进行检测。

$Ca^{2+}$ 作为多种死亡信号转导的第二信使, 参与

了细胞凋亡的调控, 同时, 与线粒体功能及ROS之间有着错综复杂的关系<sup>[12]</sup>。细胞凋亡的调控由十分复杂的信号网络系统调控, 目前已知的有3条信号通路, 这其中就有线粒体通路与内质网通路。线粒体作为细胞凋亡调控的中心位置, 其中的关键性分子是细胞色素c, 当细胞受到损害时, 细胞色素c从线粒体释放出来, 并与细胞凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF)结合, 活化胱冬肽酶-9前体, 进一步激活胱冬肽酶-3从而引发胱冬肽酶级联反应, 最终导致细胞凋亡<sup>[13-16]</sup>。内质网不仅是 $Ca^{2+}$ 的主要储存库, 其同时在处理细胞凋亡信号的过程中也发挥着重要作用。凋亡蛋白中的Bcl-2家族在细胞凋亡中起着重要作用, 其主要位于线粒体外膜与内质网膜上, 主要分为抑制凋亡的家族(包括Bcl-2、Bcl-xl等)和促进凋亡的家族(包括Bax、Bak、Bid等), 这两类物质相互结合、彼此抑制, 往往由其数量的相对多少决定凋亡发生与否<sup>[17-18]</sup>。正常状态下, ROS的产生与代谢在细胞内维持平衡, 当细胞受到外源化合物刺激时, ROS积累量达到足够高的水平, 平衡遭到破坏, ROS就会破坏细胞器, 如内质网、线粒体以及细胞膜<sup>[19-20]</sup>。本研究结合了 $Ca^{2+}$ 浓度、线粒体膜电位以及ROS水平这三种指标的结果, 认为是由ROS介入线粒体通路, 调节相关基因的表达, 导致细胞凋亡。根据研究结果, 推测可能的机制如下: 外源性的药物诱导细胞发生氧化应激后, 细胞内ROS增多, 从而破坏细胞

器, 如线粒体、内质网。线粒体受损, 导致其膜通透性增加, 膜电位下降; 内质网受损会发生内质网应激, 导致其储存的Ca<sup>2+</sup>释放, 释放的Ca<sup>2+</sup>会被受损的线粒体过量摄入, 线粒体Ca<sup>2+</sup>超载时会释放细胞色素c, 其与AIF结合, 进一步活化胱冬肽酶-9, 剪切胱冬肽酶-3, 启动胱冬肽酶级联反应, 导致细胞走向凋亡。同时, ROS破坏线粒体与内质网, 可能最终会导致附着在两者膜上的Bcl-2家族中促凋亡基因的高表达与抑凋亡基因的低表达, 最终导致细胞凋亡, 这也可能是导致细胞凋亡的一个重要原因。

本研究发现, 甜蜜素联合柠檬黄在Ca<sup>2+</sup>浓度变化、线粒体膜电位变化和ROS水平上分别表现为协同作用、相加作用和协同作用, 会提高*Bax*、*Bcl-2*、细胞色素c、胱冬肽酶-3等基因的表达, 并上调*Bax*和抑制*Bcl-2*的蛋白质水平, 同时上调细胞色素c、剪切胱冬肽酶-3的蛋白质水平, 提示可能是由ROS介入线粒体通路, 调控细胞的凋亡。这可能是甜蜜素联合柠檬黄抑制细胞增殖的主要毒性机制之一。

此次研究是对甜蜜素和柠檬黄对Caco-2细胞联合毒性机理的探究。不同的化合物作用于不同种类的细胞可能有不同的表现形式, 因此, 为了更加深入地探究其特异性, 可以就不同种类的细胞进行对比研究, 以便进一步探究其作用机理, 为我国食品添加剂使用标准的制订提供实验理论基础。

### 参考文献 (References)

- 1 王 静, 孙宝国. 食品添加剂与食品安全. 科学通报(Wang Jin, Sun Baoguo. Food additives and food safety. Chin Sci Bull) 2013; 58(26): 2619-25.
- 2 张 婧, 张晓鹏, 贾旭东, 张立实, 王 君. 我国食品毒理学评价程序和方法标准现状与管理对策. 毒理学杂志(Zhang Jin, Zhang Xiaopeng, Jia Xudong, Zhang Lishi, Wang Jun. Our country food toxicology evaluation procedures and method standard status and management countermeasures. J Toxicol) 2015; 29(2): 109-13.
- 3 李 宁. 国内外甜蜜素限量标准及使用现状分析. 中国食品卫生杂志(Li Ling. Evaluation standard and the present situation of using sweet analysis at home and abroad. Chinese Journal of Food Hygiene) 2007; 19(5): 455-7.
- 4 Tolosa L, Carmona A, Castell JV, Gomez-Lechon MJ, Donato MT. High-content screening of drug-induced mitochondrial impairment in hepatic cells: Effects of statins. Arch Toxicol 2015; 89(10): 1847-60.
- 5 Kubben N, Brimacombe KR, Donegan M, Li Z, Misteli T. A high-content imaging-based screening pipeline for the systematic identification of anti-progeroid compounds. Methods 2016; 96: 46-58.
- 6 Zanella F, Lorens JB, Link W. High content screening: Seeing is believing. Trends Biotechnol 2010; 28(5): 237-45.
- 7 Persson M, Loye AF, Mow T, Hornberg JJ. A high content screening assay to predict human drug-induced liver injury during drug discovery. J Pharmacol Toxicol Methods 2013; 68(3): 302-13.
- 8 李 河. 析因实验设计资料的统计学分析. 循证医学(Li He. The statistical analysis of factorial experiment design data. Evidence-based medicine) 2005; 5(1): 35-8.
- 9 Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, et al. The comet assay with 8 mouse organs: Results with 39 currently used food additives. Mutat Res 2002; 519(1/2): 103-19.
- 10 付 佳, 吴赤蓬, 邹志飞. 苯甲酸钠与糖精钠、柠檬黄对L-929细胞联合毒性的研究. 毒理学杂志(Fu Jia, Wu Chipeng, Zou Zhifei. Sodium benzoate and saccharin sodium, citric yellow joint toxicity to the cells of L-929. J Toxicol) 2010; 24(1): 47-50.
- 11 Lau K, McLean WG, Williams DP, Howard CV. Synergistic interactions between commonly used food additives in a developmental neurotoxicity test. Toxicol Sci 2006; 90(1): 178-87.
- 12 Hsu SS, Chou CT, Liao WC, Shieh P, Kuo DH, Kuo CC, et al. The effect of gallic acid on cytotoxicity, Ca<sup>2+</sup> homeostasis and ROS production in DBTRG-05MG human glioblastoma cells and CTX TNA2 rat astrocytes. Chem Biol Interact 2016; 252: 61-73.
- 13 Suen DF, Norris KL, Youle RJ. Mitochondrial dynamics and apoptosis. Genes Dev 2008; 22(12): 1577-90.
- 14 Ma J, Feng Y, Liu Y, Li X. PUMA and survivin are involved in the apoptosis of HepG2 cells induced by microcystin-LR via mitochondria-mediated pathway. Chemosphere 2016; 157: 241-9.
- 15 Santos S, Silva AM, Matos M, Monteiro SM, Alvaro AR. Copper induced apoptosis in Caco-2 and Hep-G2 cells: Expression of caspases 3, 8 and 9, AIF and p53. Comp Biochem Physiol Toxicol Pharmacol 2016; 185-186: 138-46.
- 16 Zhang H, Luo X, Ke J, Duan Y, He Y, Zhang D, et al. Procyanidins, from *Castanea mollissima* Bl. shell, induces autophagy following apoptosis associated with PI3K/AKT/mTOR inhibition in HepG2 cells. Biomed Pharmacother 2016; 81: 15-24.
- 17 Fernandez-Blanco C, Juan-Garcia A, Juan C, Font G, Ruiz MJ. Alternariol induce toxicity via cell death and mitochondrial damage on Caco-2 cells. Food Chem Toxicol 2016; 88: 32-9.
- 18 Wang C, Li T, Tang S, Zhao D, Zhang C, Zhang S, et al. Thapsigargin induces apoptosis when autophagy is inhibited in HepG2 cells and both processes are regulated by ROS-dependent pathway. Environ Toxicol Pharmacol 2016; 41: 167-79.
- 19 Zhang B, Peng X, Li G, Xu Y, Xia X, Wang Q. Oxidative stress is involved in Patulin induced apoptosis in HEK293 cells. Toxicon 2015; 94: 1-7.
- 20 Zhang H, Wang J, Liu Y, Gong L, Sun B. Wheat bran feruloyl oligosaccharides ameliorate AAPH-induced oxidative stress in HepG2 cells via Nrf2 signalling. J Functional Foods 2016; 25: 333-40.