

研究报告

应用原子力显微镜分析苯甲酸钠生物毒性

胡明铅¹, 王炯坤², 蔡继业¹, 吴扬哲¹, 王小平¹

¹ 暨南大学化学系, 广州 510632

² 暨南大学组织移植与免疫实验中心, 广州 510632

摘要: 应用原子力显微镜(Atomic force microscope, AFM)在单细胞水平上研究食品防腐剂苯甲酸钠(Sodium benzoate, SB)的生物毒性, 从可视化的角度分析了淋巴细胞与不同浓度 SB 作用不同时间后其形态及其膜超微结构的影响。结果与正常淋巴细胞相比, 随着与淋巴细胞作用的 SB 浓度和作用时间的增加, 细胞形态及细胞膜明显发生改变, 其超微结构也趋复杂。经 SB 作用后的细胞高低差 Rp-v、均方根粗糙度 Rq、平均粗糙度 Ra、平均高度 \bar{Z} 4 个几何参数值均明显发生改变。对经 SB 作用后的淋巴细胞进行统计学分析, 并探讨了其作用机制。

关键词: 原子力显微镜, 苯甲酸钠, 淋巴细胞, 形态结构

Analysis of Sodium Benzoate Biototoxicity by Atomic Force Microscope

Mingqian Hu¹, Jiongkun Wang², Jiye Cai¹, Yangzhe Wu¹, and Xiaoping Wang¹

¹ Chemistry Department, Jinan University, Guangzhou 510632, China

² Institute of Tissue Transplantation and Immunology, Jinan University, Guangzhou 510632, China

Abstract: Atomic force microscope (AFM) was used to study biotoxicity of food preservative sodium benzoate (SB) at the single cellular level. Lymphocyte morphology and membrane ultrastructure treated with SB at different concentrations and time were analyzed visually. As compared to the normal lymphocyte, the cell morphology and membrane was significantly changed and its ultrastructure was also complicated. After treated with SB, the Rp-v, Rq, Ra and \bar{Z} values were changed. The statistical analysis of lymphocytes after treated with SB was studied, and discussed its mechanism.

Keywords: atomic force microscope, sodium benzoate, lymphocyte, morphological structure

苯甲酸钠(Sodium benzoate, SB)又称安息香酸钠, 是广泛应用于食品及碳酸饮料产业中的防腐剂。多年来世界上大多数国家一直允许用 SB 作为食品防腐剂, 最大允许量在 0.15~0.25 wt%之间, 在美国, SB 的最大允许量为 0.1 wt%。随着食品工业的发展, 食品中使用防腐剂的现象十分普遍。过去曾认

为 SB 对人体无毒, 但最近的研究表明, 其可造成人体组织器官或机能的损害, 具有遗传毒性, 使染色体分裂出现异常^[1], 使染色体发生结构畸变以致断裂^[2]并且会产生肝硬化^[3]、肌肉损伤^[4]甚至致癌^[5], Tsay 等^[6]发现 SB 能使斑马幼虫发生畸变。长期饮用含有 SB 的碳酸饮料易使儿童产生多动症^[7]。因此,

Received: December 20, 2007; **Accepted:** February 25, 2008

Supported by: the Natural Science Foundation of China (No. 60578025) and Key Program of National Natural Science Foundation of China (No. 30230350).

Corresponding author: Jiye Cai. Tel: +86-20-85223569; Fax: +86-20-85223569; E-mail: tjycail@jnu.edu.cn

国家自然科学基金(No. 60578025)和国家自然科学基金重点项目(No.30230350)资助。

SB 的生物安全性和对人体的危害程度必然要引起我们的重视。

原子力显微镜(Atomic force microscope, AFM)是 1986 年由 G. Binning, C. F. Quate 和 C. Gerber 等发明的^[8]。自发明以来它就被广泛应用于对单细胞、细胞骨架、DNA、蛋白质等生物样品及其相互作用力的研究^[9-11]。目前在单细胞水平上研究 SB 致淋巴细胞形态及其膜超微结构损伤的影响尚未见报道。本研究利用 AFM 在单细胞水平提供有关 SB 毒性的可视化证据, 并探讨其损伤机制。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

苯甲酸钠(C_6H_5COONa), 分子量: 144.11, 分析纯, 天津市福晨化学试剂厂生产。Balb/c 系小鼠购自中山医科大学实验动物中心; RPMI-1640、胎牛血清(Fetal bovine serum, FBS) 及 β -巯基乙醇等细胞培养试剂购自 GibcoBRL 公司。

1.2 淋巴细胞的准备

将 Balb/c 系小鼠断髓处死, 在超净台内无菌分离双侧腋窝、锁骨下、腹股沟浅表淋巴结和肠系膜淋巴结, PBS 清洗, 去除被膜, 机械研磨, 于 200 目不锈钢网筛过滤。收集细胞, 用 4°C PBS 1200 r/min 离心 5 min。洗涤细胞 2 次, 重悬于 RPMI-1640 培养液(含 10% FBS 及 50 μ mol/L β -巯基乙醇), 调整细胞密度为 1×10^6 /mL。台盼蓝染色观察细胞活力, 活细胞数占 98%。添加 SB 溶液至淋巴细胞培养液中, 终浓度分别为 0 wt%、0.05 wt%、0.1 wt% 和 0.2 wt%。将细胞在 24 孔板接种后放置于 37°C、体积分数为 5%的 CO_2 培养箱中培养 1 h、6 h、12 h、18 h。

1.3 样品制备

分别取与不同浓度 SB 作用 1 h、6 h、12 h、18 h 后的淋巴细胞, 滴于新剥离的云母片上, 使其自然铺展, 吸附 10 min, 然后用 2.5%的戊二醛(日本京都产)固定 15 min, 用蒸馏水冲洗 3 次, 室温自然干燥。

1.4 AFM 成像

将制备好的样品置于 AFM(Autoprobe CP Research, Thermomicroscopes 公司, USA) 的 XY 扫描台上, 用监视器定位所要扫描的样品区域, 在空气中室温下利用接触或非接触模式成像。AFM 图像仅经过自带软件(IP2.1 版)的平滑处理, 以消除扫描

方向上的低频背景噪音。

2 实验结果

经 AFM 扫描成像, 获得了正常淋巴细胞、与不同浓度 SB 作用不同时间后的淋巴细胞的拓扑形貌图(Topography)和误差信号图(Error signal), 并分别对其表面超微结构进行了扫描分析, 观察细胞数超过 30 个。检测结果发现, 上述 3 种淋巴细胞均呈不同程度的形态结构改变。正常淋巴细胞呈较为规则的圆形, 中间隆起, 细胞表面总体较为平滑(如图 1(1)所示), 高度在 1.8~2.5 μ m 之间, 直径约为 8~10 μ m。而与不同浓度 SB 作用后的淋巴细胞体积明显发生变化。高度减少, 细胞表面形态结构更为复杂, 中间部位出现明显破裂并且凹陷, 呈“Y”型结构, 边缘能观察到有细微损伤分布(如图 1(2)b 箭头所示), 并且随着 SB 浓度的增加, 细胞形态进一步发生改变, 呈中间凹陷状, 细胞边缘向四周扁平铺展(如图 1(3)(4)a 和 b 所示)。细胞表面球状颗粒进一步增多, 表面粗糙度增大, 细胞高度明显减少, 直径增加(高度由 2 μ m 逐渐减少至 1 μ m, 直径由 6 μ m 逐渐增加至 12 μ m 如图 1e 所示)。对其局部小范围进行观察, AFM 能清楚地观察到细胞膜密集的颗粒状突起物以及大量的孔洞(如图 1(2~4) d 箭头所示), 其中凹凸不平的细胞表面分布着大量小颗粒。选取不同细胞膜超微结构图的整个区域(5 μ m \times 5 μ m)进行测量, 与 SB 作用后淋巴细胞的四个参数值均明显与正常淋巴细胞不同(如图 2 所示); 对淋巴细胞膜形成的大小不一的颗粒进行统计(如图 3 所示), 经 SB 作用后的淋巴细胞膜形成的颗粒逐渐增大。同时, 随着与 SB 作用时间的延长, 淋巴细胞出现的变化与上述情况类似, 即作用时间越长, 细胞损伤越严重, 淋巴细胞的表面粗糙度也逐渐增加(如图 4 所示)。

3 讨论

AFM 是样品表面信息的收集工具, 较易获得细胞的形貌、超微结构及其生化反应后细胞形态变化等信息, 是研究细胞损伤的有力工具^[12-14]。淋巴细胞是机体免疫应答功能的重要细胞成分, 其形态结构与其功能息息相关^[15]。因此利用 AFM 研究淋巴

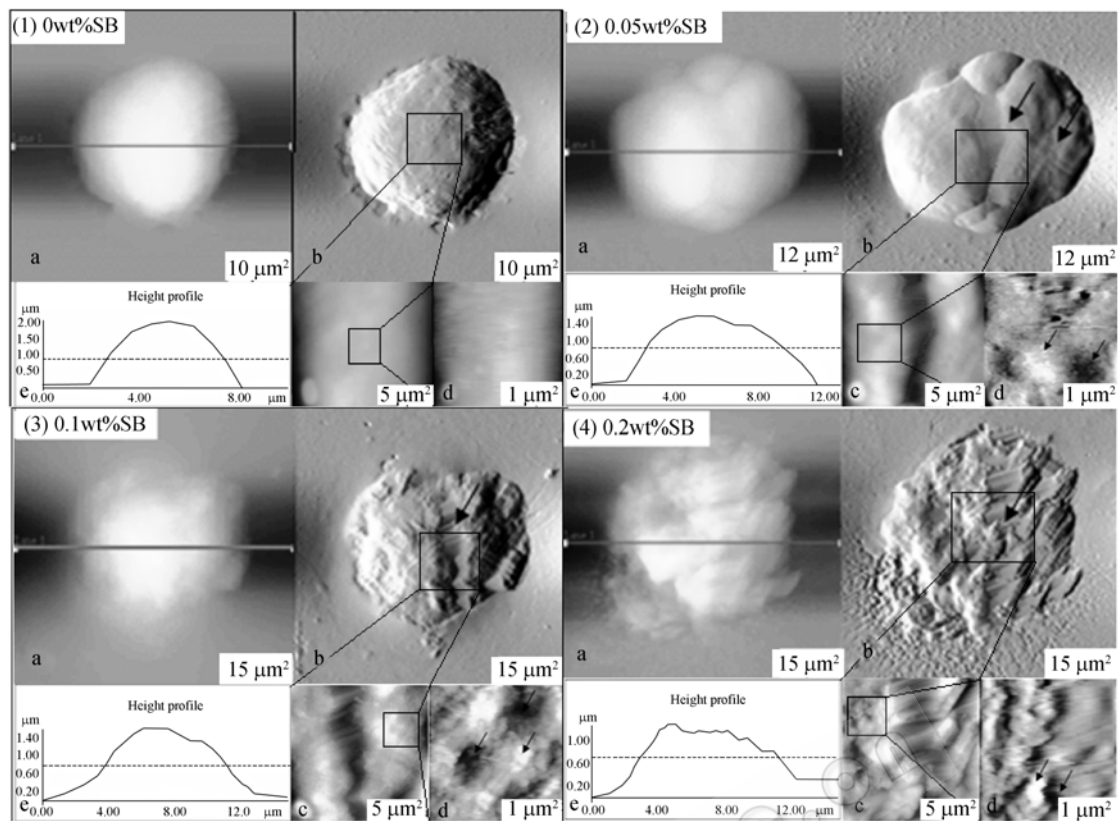


图 1 与不同浓度 SB 作用 12 h 后淋巴细胞的 AFM 图像

Fig. 1 The AFM images of a lymphocyte treated with SB at different concentrations after 12 h

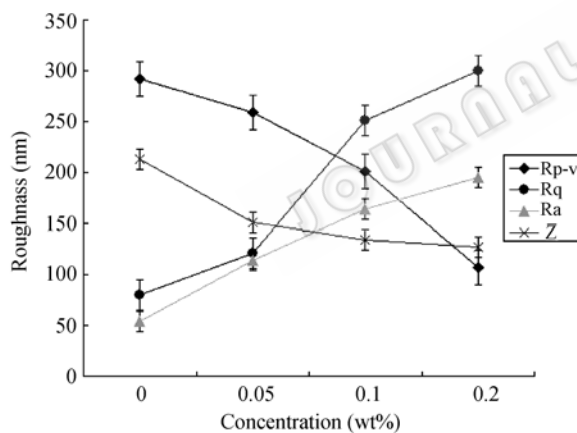


图 2 与不同浓度 SB 作用 12 h 后淋巴细胞 Rp-v、Rq、Ra、 \bar{Z} 的比较

Fig. 2 Four parameters of lymphocyte characteristics treated with SB at different concentrations after 12 h (the scan range: $5 \mu\text{m} \times 5 \mu\text{m}$)

Rp-v: given by the highest data point on the height profile minus the lowest point. $Rp-v = Z_{\text{max}} - Z_{\text{min}}$

Rq: root-mean-squared roughness. $Rq = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (Z_i - \bar{Z})^2}{N-1}}$ Ra: average

roughness; $Ra = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |Z_i - \bar{Z}|$

\bar{Z} : given by the average height within the included areas defined by a region group. $\bar{Z} = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N Z_i$

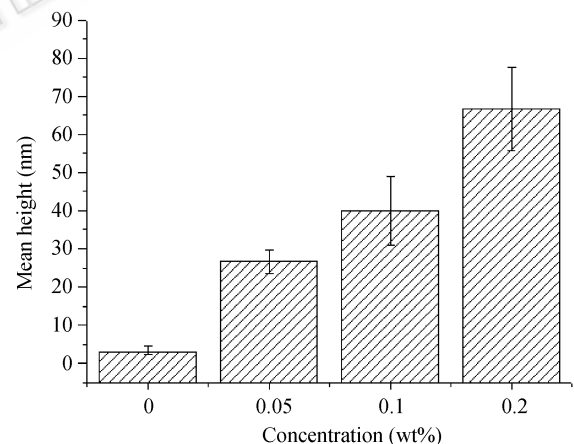


图 3 与不同浓度 SB 作用 12 h 后淋巴细胞表面颗粒平均高度的变化和比较

Fig. 3 The change and comparison of the mean height of lymphocyte membrane surface particle treated with SB at different concentrations after 12 h (the scan range: $1 \mu\text{m} \times 1 \mu\text{m}$)

细胞与外界环境相互作用前后细胞形态结构及其细胞膜的变化, 对了解淋巴细胞的生理功能具有十分重要的意义。

3.1 SB 致淋巴细胞及其膜损伤程度的依赖关系

从结果可知, SB 引起淋巴细胞及其膜损伤, 作用浓度的强弱和作用时间的长短决定着损伤的程

度。随着浓度的增强和作用时间的延长, 淋巴细胞膜的破损变得越来越严重, 细胞膜形成网状结构和孔洞, 同时膜上形成大小不一的颗粒状物质, 这是由脂质、蛋白质、糖类等堆积而成的(如图 1 (2)~(4) d 箭头所示)。

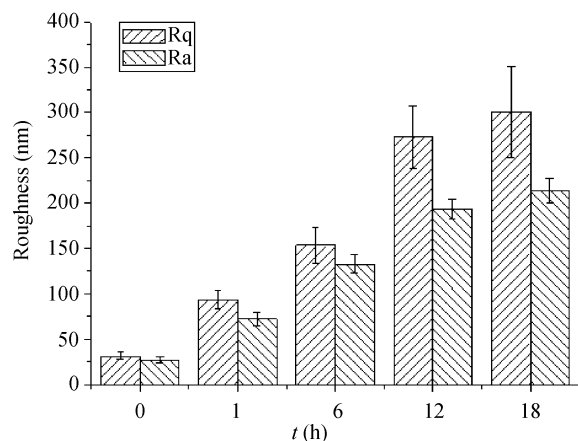


图 4 与 0.1 wt%SB 作用不同时间后淋巴细胞 Rq 和 Ra 的比较

Fig. 4 Lymphocyte Rq and Ra comparison after treated with 0.1wt%SB at different time (the scan range: $5\ \mu\text{m}\times 5\ \mu\text{m}$)

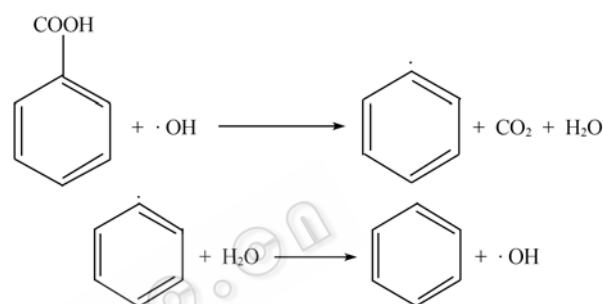
3.2 SB 诱导产生生物毒性的生物机制分析

由于 SB 亲油性较大, 易穿透细胞膜进入细胞体内, 干扰细胞膜的通透性, 抑制细胞膜对氨基酸的吸收; 进入细胞体内电离酸化细胞内的碱储, 并抑制细胞呼吸酶系的活性, 阻止乙酰辅酶 A 缩合反应, 从而破坏由磷脂、胆固醇、蛋白及糖分子等构成的细胞膜的有序结构, 改变膜的结构, 使膜发生功能性紊乱, 以致细胞发生破坏性断裂。细胞膜表面蛋白受体如同细胞的翻译, 能够根据外界刺激指导细胞的分裂或运动。细胞表面有许多这样的蛋白受体, 蛋白上携带着复杂的糖。这些糖的变化经常与癌症、糖尿病和自身免疫性疾病(如多发性硬化等)有关, 其控制着蛋白与外界信息相互作用的时间, 有效改变一个受体被激活的可能性, 阐释了细胞适应营养环境的机制。当这种正常的适应变得不平衡时, 会导致癌细胞生长和转移^[16]。细胞形态结构的变化与细胞核的缩小、碎裂甚至融解, 细胞骨架的融解而最终导致细胞膜的破裂, 细胞外基质外溢等过程有关。研究表明, 细胞形态结构的变化是细胞凋亡的早期现象^[17]。从 AFM 的图象可以看出 SB 明显损伤淋巴细胞, 致其死亡。因此 SB 引起的淋巴细胞损伤, 可能会导致人体免疫力下降。

3.3 SB 诱导产生生物毒性的化学机制分析

由于 SB 容易透过细胞膜进入细胞内, 其上的羧基是极性较强的亲水基团, 因此 SB 易溶于水, 在细胞体内会完全电离出苯甲酸根 $\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^-$ 和钠离子 Na^+ , $\text{C}_6\text{H}_5\text{COO}^-$ 进一步水解为苯甲酸 $\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$ 。

淋巴细胞是白细胞的一种, 其含有丰富的维生素 C(Vitamin C, VC), 并且人体每天摄取大量的 VC, 有研究报道, VC 会还原溶液中的铜离子为亚铜离子再与水进行三步反应产生氢氧自由基 ($\cdot\text{OH}$)^[18], 进而苯甲酸则会和氢氧自由基反应产生二氧化碳与苯。因此, 长期食用含有苯甲酸钠或苯甲酸的食品将会产生慢性苯中毒。其反应方程式为:



另外, 如果大量细胞外 Na^+ 进入膜内, 由于渗透压的关系, 必然会导致过多水分子进入膜内, 这将引起细胞的肿胀, 进而破坏细胞的结构和功能。细胞内 Na^+ 的急剧增加, 将会使人体内钠泵失调, 从而导致多种疾病的发生^[19]。如果钠泵受到抑制, 则 Na^+/H^+ 交换减少, 细胞内的 H^+ 浓度就会升高, pH 值降低。而 pH 值越低, 苯产生的越快。已有许多研究表明细胞内 pH 值的改变与细胞凋亡是密切相关的^[20], 并且研究证实, pH 值下降促进细胞凋亡, pH 值升高抑制凋亡的发生^[21]。各种物理和化学刺激诱导细胞凋亡时, 普遍存在细胞内酸化, 细胞内酸化已成为细胞凋亡的一个重要特征。另外, 研究人员怀疑酸化后细胞死亡的现象, 也有可能就是累积过多 Na^+ 所造成的^[22]。

4 结论

从 AFM 可视化的图象中, 我们可以很清楚的看到, SB 致淋巴细胞形态结构改变和膜的损伤, 说明其存在一定的毒性。其细胞毒性的强弱与作用浓度和作用时间均相关, 呈浓度和时间依赖关系, 浓度越大毒性越强, 作用时间越长毒性也越强。分析了 SB 产生毒性的生物学机制和化学机制, 发现 SB 能

破坏细胞膜的有序结构, 改变膜的结构, 使膜发生功能性紊乱, 以致细胞发生破坏性断裂, 从而破坏细胞平衡机制, 并与体内氢氧自由基结合生成苯, 产生毒物。同时指出 SB 也会影响钠离子浓度和 pH 值, 对人体产生损害。

REFERENCES

- [1] Turkoglu S. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutat Res-Gen*, 2007, **626**(1-2): 4–14.
- [2] Lü N, Shen MH. Research on mutagenicity of sodium benzoate in born marrow cells. *J Jilin Agri Univ*, 2006, **28**(4): 466–468.
吕娜, 沈明浩. 苯甲酸钠对小鼠骨髓细胞的致突变作用研究. 吉林农业大学学报, 2006, **28**(4): 466–468.
- [3] Kaboglu A, Aktac T. A study of the effects of sodium benzoate on the mouse liver. *Biologia*, 2002, **57**(3): 375–382.
- [4] Michalak A, Qureshi I A. Free and esterified coenzyme A in the liver and muscles of chronically hyperammonemic mice treated with sodium benzoate. *Biochem Mol Med*, 1995, **54**(2): 96–104.
- [5] Xing WJ, Que LC, Wen W. Detecting mutagenic effects of pesticides and food additives by using plant SCE. *Acta Acad Med Nei Mongol*, 2000, **22**(3): 141–144.
邢万金, 阙立成, 文为. 用植物 SCE 检测农药和食品添加剂的诱变性. 内蒙古医学院学报, 2000, **22**(3): 141–144.
- [6] Tsay HJ, Wang YH, Chen WL, *et al.* Treatment with sodium benzoate leads to malformation of zebrafish larvae. *Neurotoxicol Teratol*, 2007, **29**: 562–569.
- [7] McCann D, Barrett A, Cooper A, *et al.* Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *Lancet*, 2007, **370**(9598): 1560–1567.
- [8] Binnig G, Rohrer H. Scanning tunneling microscopy-from birth to adolescence. *Phys Rev Lett*, 1986, **56**(9): 930–933.
- [9] Hinterdorfer P, Dufrêne YF. Detection and localization of single molecular recognition events using atomic force microscopy. *Nat Methods*, 2006, **3**(5): 347–355.
- [10] Dvorak JA. The application of atomic force microscopy to the study of living vertebrate cells in culture. *Methods*, 2003, **29**: 86–96.
- [11] Berdyeva T, Woodworth CD, Sokolov I. Visualization of cytoskeletal elements by the atomic force microscope. *Ultramicroscopy*, 2005, **102**(3): 189–198.
- [12] Zhao T, Cai JY, Wang XY. Damaging effect of trichosanthin on red blood cell studied by AFM. *Biotechnol*, 2003, **13**(2): 8–9.
赵涛, 蔡继业, 王小燕. 天花粉蛋白对红细胞损伤作用的 AFM 研究. 生物技术, 2003, **13**(2): 8–9.
- [13] Chen Y, Cai JY, Xing SJ, *et al.* Observation of ultrastructures of membrane surface of various tumor cells and preliminary research on the effect of drugs on membrane surface of tumor cells by AFM. *J Chin Electr Micros Soc*, 2003, **22**(2): 100–104.
陈勇, 蔡继业, 邢少璟, 等. 多种肿瘤细胞表面超微结构的原子力显微镜观察及药物对细胞膜表面超微结构影响的初步研究. 电子显微学报, 2003, **22**(2): 100–104.
- [14] de Lozanne A. Atomic force microscopy: You may squeeze the atoms but don't mangle the surface. *Science*, 2001, **291**(5513): 2561–2562.
- [15] Krogsgaard M, Huppa JB, Purbhoo MA, *et al.* Linking molecular and cellular events in T-cell activation and synapse formation. *Semin Immunol*, 2003, **15**(6): 307–315.
- [16] Lau KS, Partridge EA, Grigorian A, *et al.* Complex N-Glycan number and degree of branching cooperate to regulate cell proliferation and differentiation. *Cell*, 2007, **129**(1): 123–134.
- [17] Hessler JA, Budor A, Putschakayala K, *et al.* Atomic force microscopy study of early morphological changes during apoptosis. *Langmuir*, 2005, **21**(20): 9280–9286.
- [18] Gardner LK, Lawrence GD. Benzene production from decarboxylation of benzoic acid in the presence of ascorbic acid and a transition-metal catalyst. *J Agric Food Chem*, 1993, **41**(5): 693–695.
- [19] Kometiani P, Liu LJ, Askari A. Digitalis-induced signaling by Na⁺/K⁺-ATPase in human breast cancer cells. *Mol Pharmacol*, 2005, **67**(3): 929–936.
- [20] Gottlieb RA, Giesing HA, Zhu JY, *et al.* Cell acidification in apoptosis: granulocyte colony-stimulating factor delays programmed. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**(13): 5965–5968.
- [21] Lagana A, Vadnais J, Le PU, *et al.* Regulation of the formation of tumor cell pseudopodia by the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1. *J Cell Sci*, 2000, **113**: 3649–3662.
- [22] Fuster D, Moe OW, Hilgemann DW. Lipid-and mechanosensitivities of sodium/hydrogen exchangers analyzed by electrical methods. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(28): 10482–10487.