

## 基于体外消化/PBET细胞模型测定地龙中镉和砷的生物可给性及风险评估

左甜甜<sup>#</sup>, 罗飞亚<sup>#</sup>, 金红宇, 邢书霞, 余坤子, 孙磊<sup>\*</sup>, 马双成<sup>\*</sup>

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

**摘要:** 为了考察动物药地龙中镉 (Cd) 和砷 (As) 的生物可给性, 并对 Cd 和 As 的风险进行评估, 本研究采用电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 法测定了地龙中 Cd 和 As 的残留量; 建立 *in vitro* PBET (physiologically based extraction test) 体外模拟消化/MDCK 细胞模型考察地龙中 Cd 和 As 的生物可给性; 分别采用危害指数法 (HI) 和暴露限值法 (MOE) 对于地龙中 Cd 和 As 的残留总量以及生物可给量的风险进行评估。结果表明: 6 批地龙中 Cd 和 As 的残留总量范围分别为 8.319~33.606 mg·kg<sup>-1</sup> 和 0.532~16.412 mg·kg<sup>-1</sup>。经过 MDCK 细胞转运后, 地龙中 Cd 的生物可给性在 10.13%~64.16% 之间; As 的生物可给性在 2.72%~46.57% 之间。风险评估的结果表明: MDCK 细胞转运前, 所有批次地龙中 As 的 MOE 值以及 Cd 的 HI 值均大于 1, As 的风险可接受, Cd 的风险不可接受; MDCK 细胞转运后, 除了 1 批地龙外, 其余 5 批地龙中 Cd 的 HI 值均小于 1 (风险降低至安全范围内)。本研究为更加客观、科学地评估中药中重金属对人体的健康风险, 制定更加科学、合理的重金属限量标准提供重要的技术支撑。

**关键词:** 地龙; PBET 体外消化/MDCK 细胞模型; 生物可给性; Cd; As; 风险评估

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)05-1004-06

## Determination of the bioaccessibility of cadmium and arsenic in earthworms by PBET digestion *in vitro* / MDCK cell model with risk assessment

ZUO Tian-tian<sup>#</sup>, LUO Fei-ya<sup>#</sup>, JIN Hong-yu, XING Shu-xia, YU Kun-zi, SUN Lei<sup>\*</sup>, MA Shuang-cheng<sup>\*</sup>

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**Abstract:** Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) was used to determine the content of cadmium (Cd) and arsenic (As) in earthworms. A physiologically-based extraction test (PBET) digestion *in vitro* / MDCK cell model was established to investigate the bioaccessibility of Cd and As in earthworms. The hazard index (HI) method and the margin of exposure (MOE) method were used to assess the risks of the total content and the bioaccessible content of Cd and As. The results showed that the total content of Cd and As in six batches of earthworms ranged from 8.319 to 33.606 mg·kg<sup>-1</sup> and from 0.532 to 16.412 mg·kg<sup>-1</sup>, respectively. After uptake by MDCK cells, the bioaccessibility of Cd in earthworms ranged from 10.13% to 64.16%, and the bioaccessibility of As was from 2.72% to 46.57%. The results of risk assessment showed that before uptake by MDCK cells, the MOE values of As and HI values of Cd for all batches of earthworms were greater than 1, which suggests that the risks of As are acceptable but the risks of Cd are unacceptable. After transportation by MDCK cells, except for one batch of

收稿日期: 2019-11-21; 修回日期: 2020-02-06.

基金项目: 国务院药品医疗器械审评审批制度改革项目 (ZG2016-1); 国家十三五“重大新药创制”课题 (2018ZX09735006).

<sup>#</sup>共同第一作者.

\*通讯作者 Tel: 86-10-67095994, Fax: 86-10-67023650, E-mail: dasunlei@sina.com;

Tel: 86-10-67095272, Fax: 86-10-67023650, E-mail: masc@nifdc.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2019-0930

earthworms, the HI values of Cd in the other five batches were less than 1, which suggests that the risks are at a safe level. This study provides important technical support for a more objective and scientific assessment of the health risks of heavy metals in traditional Chinese medicines, and for a more scientific and reasonable standard limit of heavy metals.

**Key words:** earthworm; physiologically based extraction test digestion *in vitro* / MDCK cell model; bioaccessibility; Cd; As; risk assessment

动物药是指动物的整体或某一部分、动物体的生理或病理产物、动物体的加工品等供药用的一类中药,具有来源广、活性强、疗效高等特点,药用价值大<sup>[1,2]</sup>。地龙是我国常用的动物药,《神农本草经》记载“地龙性味寒、咸,归肺、肾、肝经”,常用于高热、神昏、惊痫抽搐、肺热喘咳等症状<sup>[3]</sup>。目前,国内外学者对于地龙的研究主要集中在其活性成分及药理作用的开发,随着抗肿瘤、抗血栓、抗心律失常、免疫调节等新功效的不断发现,其临床应用也越发广泛。然而,对地龙中的有害物质的研究却鲜有报道。

镉 (Cd) 和砷 (As) 属于重金属,是国际公认的环境污染物,难以被降解。由于地龙喜好在土壤中生活,从而导致环境及土壤中的重金属易在地龙体内蓄积,通过食物链最终对人体产生严重的生理毒性,包括生殖毒性、肾功能损伤、糖尿病、骨质疏松症等<sup>[4-6]</sup>。因此,对于地龙中重金属的残留以及对人体健康风险的研究很有必要。

重金属的毒性评价不仅与其绝对量有关,更与实际被吸收而发挥作用的含量密切相关<sup>[7,8]</sup>。若将中药中本身重金属的含量用于评估其风险,可能会高估其对人体的危害,造成产业资源浪费。重金属的生物可给性 (bioaccessibility) 是重金属在胃肠环境中可以溶出的比例,是评价其最大经口生物利用度 (bioavailability) 的指标<sup>[9-12]</sup>。动物模型是评价重金属生物可给性最有效的手段,然而动物实验复杂繁琐、实验周期长、费用高。近年来发展起来的体外试验 (*in vitro*) 方法,可以在一定程度上评价生物体对物质的吸收状况。并且体外模拟试验结果可重复性好,具有高通量、省时、经济、不受医学研究伦理桎梏的优势。

犬肾小管上皮细胞系 (MDCK) 源自犬肾脏上皮细胞,最初是由 Madin SH 和 Darby NB 从成年雄性西班牙猎犬的肾脏中获得,这种细胞系是典型的分泌型上皮细胞株,除了用于肾小管上皮细胞的形态和功能的研究外,MDCK 细胞是美国食品药品监督管理局 (FDA) 和欧洲药品管理局 (EMA) 等权威机构广泛认可的评价药物吸收代谢特性的体外模型<sup>[13]</sup>。实验比证明 MDCK 细胞系在预测药物小肠通透方面具有较

好的人体相关性,并具有高通量、低成本、高效等特点而被广泛应用<sup>[14]</sup>。本实验采用 Transwell 培养技术,以我国传统动物药地龙为研究对象,首次建立 MDCK 肠吸收模型,并通过 *in vitro* PBET (physiologically based extraction test) 模拟胃、肠消化的二步消化法<sup>[9]</sup>建立体外消化/MDCK 细胞模型,并采用 ICP-MS 法测定地龙中 Cd 和 As 的生物可给性,以期科学、客观地评价中药中重金属的健康风险以及限量标准的制修订提供依据。

## 材料与方法

**仪器与试剂** Agilent 7700X ICP-MS (美国 Agilent 公司); Mars5 微波消解仪 (美国 CEM 公司); Millipore Mill-Q 超纯水机、Transwell 小室 (美国 Millipore 公司); CK2 型倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); 细胞培养箱 (美国 MMM 公司); Millicell ERS 跨膜电阻仪 (美国 WPI 公司)。Cd 和 As 单元素标准溶液购于国家标准物质研究中心,浓度为 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; 内标溶液为 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  的 Li、Sc、Ge、Rh、In、Tb、Lu、Bi 的混合内标溶液 (稀释 100 倍使用)、调谐溶液为 1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  Li、Y、Ce、Tl、Co 的混合标准溶液 (美国 Agilent 公司); 硝酸 (微电子级)、胃蛋白酶、胆酸钠和苹果酸钠为分析纯 (Sigma 公司); 胰酶、碳酸氢钠、柠檬酸钠、乳酸、冰醋酸、氢氧化钠均为分析纯 (国药集团); 胎牛血清 (FBS)、DMEM 高糖培养基、0.25% 胰酶-EDTA (美国 Gibco 公司)。

**材料** MDCK 细胞系由中国科学院上海生命科学研究院细胞资源中心提供; 地龙购买于药材市场和零售药店,由中国食品药品检定研究院余坤子副研究员鉴定,样品信息如表 1 所示。

**质谱条件** 等离子气流量: 15.0  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ; 雾化室温度: 2  $^{\circ}\text{C}$ ; 蠕动泵 0.20  $\text{r}\cdot\text{s}^{-1}$ ; 辅助气流量: 0.8  $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ;

**Table 1** Sample collection information in the study

No.	Batch No.	Location	Source
1	SH-1	Shanghai	Pharmacy
2	SH-2	Shanghai	Pharmacy
3	HN-1	Hainan	Pharmacy
4	GD-1	Guangdong	Production site
5	GD-2	Guangdong	Production site
6	GD-3	Guangdong	Pharmacy

载气流量: 0.8 L·min<sup>-1</sup>; He 气流量: 5 mL·min<sup>-1</sup>; 射频功率: 1 550 W; 采样深度: 10 mm; 重复次数: 3 次; 扫描次数: 100 次。

**供试品溶液和空白对照溶液的制备** 取药材粉碎, 精密称取药材粉末 0.5 g, 过三号筛, 置微波消解罐中, 加硝酸 8.0 mL, 按《中华人民共和国药典》2015 年版四部通则“2321 铅、镉、砷、汞、铜测定法”消解样品, 制备供试品溶液, 同法同时制备试剂空白溶液。

**检测方法的确认** 由于所采用的方法为《中华人民共和国药典》2015 年版四部通则通用方法, 因此仅以随行质量控制 (包括精密度实验、同位素内标实验及随行回收实验) 来确认方法的适用性, 结果均符合残留检测的要求。

#### 体外模拟胃肠消化

提取胃液的制备以及地龙中 Cd 和 As 溶出率的考察 样品粉碎, 过 50 目筛, 分别精密称取 6 批地龙, 每批 2 份, 每份 0.5 g, 加入模拟胃液 (由胃蛋白酶 1.25 g、柠檬酸钠 0.5 g、苹果酸钠 0.5 g、乳酸 420 μL 和乙酸 500 μL 配制而成, 溶解后定容至 1 L, 并用盐酸调节至 pH 2.0) 50 mL。通氮气 1~2 min, 模拟胃肠中的厌氧环境。在 37 °C 的恒温水浴中振荡 1 h (100 r·min<sup>-1</sup>), 离心 5 min (4 000 r·min<sup>-1</sup>), 精密量取上清液 25 mL, 电热板低温浓缩至约 3 mL, 冷却后加入硝酸 5 mL, 置微波消解仪中消解。待消解液冷却后用超纯水定容至 50 mL 量瓶中, 待测。同法同时制备试剂空白溶液。

提取肠液的制备以及地龙中 Cd 和 As 溶出率的考察 胃液提取结束后, 向残渣中加入 50 mL 模拟肠液 (由 0.5 g 胰酶和 1.75 g 胆酸钠配制而成, 溶解后定容至 1 L, 再用 NaOH 溶液将 pH 值调至 7.0)。在 37 °C 的恒温水浴中振荡 4 h (100 r·min<sup>-1</sup>), 离心 5 min (4 000 r·min<sup>-1</sup>), 精密量取上清液 25 mL, 电热板低温浓缩至 3 mL 左右, 冷却后加入硝酸 5 mL, 置微波消解仪中进行消解。待消解液冷却后用超纯水定容至 50 mL 量瓶中, 待测。同法同时制备试剂空白溶液。

#### 基于 MDCK 细胞模型的 Cd 和 As 生物可给性的考察

**MDCK 细胞培养** 将 MDCK 细胞置于 T75 培养瓶内, 以含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养液, 于 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、相对湿度 90% 的培养箱中培养, 培养液隔天更换。

**MDCK 细胞 Transwell 模型的建立** 当 MDCK 细胞生长融合至 80% 以上时, 以 0.25% EDTA-胰酶消化, 调整细胞密度至 4×10<sup>5</sup>·mL<sup>-1</sup>, 接种于 Transwell 聚碳酸酯膜于 24 孔板中培养。在肠腔室 (apical, AP) 每孔加入细胞悬液 0.5 mL, 基底室 (basolateral, BL) 每孔加入

0.5 mL 新鲜培养液, 培养 4 天后给药, 给药前 24 h 换液。

**跨膜电阻 (transepithelial electrical resistance, TEER) 值的测定** 从培养箱中取出 Transwell 24 孔板, 在室温条件下平衡 0.5 h, 将用培养液平衡过的电极垂直插入细胞培养小室内, 待示数稳定时记录读数。

**Cd 和 As 生物可给性的测定** 吸弃 Transwell 24 孔板中的培养液, 取“提取肠液”0.5 mL, 加入到肠腔室中, 基底室加入培养液 0.5 mL。将 Transwell 24 孔板在 37 °C、5% CO<sub>2</sub>、相对湿度 90% 的恒温培养箱中培养 2 h。吸出培养液过膜后引入 ICP-MS 分析。

#### 风险评估

**危害识别和危害特征描述** 食品添加剂联合专家委员会 (JECFA) 第 73 次会议将 Cd 的每月可耐受摄入量 (PTMI) 修改为每千克体重 25 μg·kg<sup>-1</sup><sup>[15]</sup>。As 的每周可耐受摄入量 (PTWI) 被 JECFA 撤销, JECFA 提出由无机砷导致肺癌发病率比背景值增长 0.5% 的基准剂量下限 (BMDL<sub>0.5</sub>) 为每千克体重 3.0 μg·kg<sup>-1</sup>。

**暴露评估** 每千克体重 Cd 或 As 日暴露量的计算公式: 
$$\text{Exp} = \frac{\text{EF} \times \text{Ed} \times \text{IR} \times \text{C}}{\text{W} \times \text{AT}} \quad (1)$$
 公式 (1) 中 Exp 为每千克体重 Cd 或 As 的日暴露量, 单位为 μg·kg<sup>-1</sup>; 其中, EF 为地龙的暴露频率, Ed 为人一生服用中药的年限, IR 为处方中地龙的日摄入量。根据国家食品安全风险评估中心在全国 11 个省份范围内 20 917 名调查者的有效消费调查问卷<sup>[16]</sup>, EF 的 P95 分位值为每年 90 天、Ed 为 20 年; IR 参照《中华人民共和国药典》取地龙的最大日摄入量 10 g; C 为地龙中 Cd 或 As 的残留总量或生物可给量, 单位为 mg·kg<sup>-1</sup>; W 为人体体重, 以 63 kg 计; AT 为平均寿命天数=365×70=25 550。

**风险特征描述** 采用危害指数 (HI) 法对于 Cd 进行风险特征描述。按照下列公式计算 HI: 
$$\text{HI} = \text{Exp} \times 10 / \text{HBGV} \quad (2)$$
 公式 (2) 中 HI 为危害指数; Exp 为公式 (1) 计算得到的日暴露量 (μg·kg<sup>-1</sup>); 10 为安全因子<sup>[17]</sup>, 表示每日由中药材及其制品中摄取的重金属的量不大于日总暴露量 (包括食物和饮用水) 的 10%; HBGV 为 Cd 的健康指导值 (μg·kg<sup>-1</sup>), HBGV = PTMI/30。若 HI≤1, 中药材中重金属的健康风险较低; 若 HI>1, 风险应予以关注。采用暴露限制 (MOE) 法对于 As 进行风险特征描述, 按照下列公式计算: 
$$\text{MOE} = \text{BMDL} / (\text{Exp} \times 10) \quad (3)$$
 公式 (3) 中 MOE 为暴露限值; Exp 为公式 (1) 计算得到的日暴露量 (μg·kg<sup>-1</sup>); 10 为安全因子; BMDL 为 As 的基准剂量下限。若 MOE>1, 中药材中重金属的健康风险较低; 若 MOE≤1, 风险应予以关注。

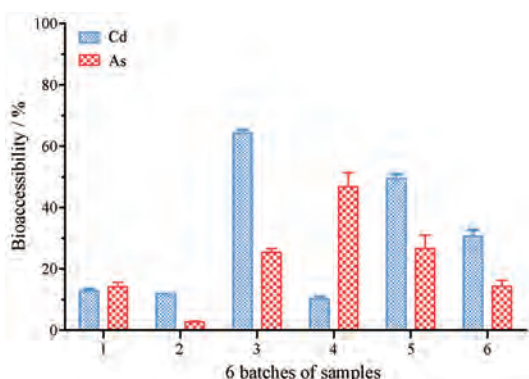
## 结果

### 1 MDCK Transwell细胞模型的评价

MDCK 细胞种植到 Transwell 培养板后 4 天后, TEER 值 $>200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ , 说明细胞单层的紧密性良好, 可用于下一步的实验。

### 2 Cd 和 As 的残留总量、生物可给量和生物可给性结果

提取前以及采用 PBET 法模拟胃肠消化提取后地龙中 Cd 和 As 的残留总量和胃相生物可给浓度结果如表 2 所示。地龙中 Cd 和 As 的残留总量分别为  $8.319 \sim 33.606 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  和  $0.532 \sim 16.412 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。模拟胃相消化后, 6 批地龙在胃相中 Cd 和 As 的生物可给浓度分别为  $4.168 \sim 12.624 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  和  $0.150 \sim 5.481 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。经 MDCK 细胞转运后, 地龙中 Cd 的生物可给浓度为  $1.334 \sim 21.562 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ; As 的生物可给浓度为  $0.021 \sim 7.644 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  (表 2)。经 MDCK 细胞转运后, 6 批地龙中 Cd 的生物可给性在  $10.13\% \sim 64.16\%$ ; As 的生物可给性在  $2.72\% \sim 46.57\%$  (图 1)。



**Figure 1** The bioaccessibility results of Cd and As in *Pheretima aspergillum* (E., Perrier).  $n = 2, \bar{x} \pm s$

**Table 2** The total and bioaccessible contents of Cd and As in *Pheretima aspergillum* (E., Perrier).  $n = 2, \bar{x} \pm s$

Batch No.	Total content/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		Bioaccessible content in gastric phase/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		Bioaccessible content after transportation by MDCK cells/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	
	Cd	As	Cd	As	Cd	As
SH-1	$24.774 \pm 0.006$	$2.483 \pm 0.013$	$10.249 \pm 0.107$	$0.388 \pm 0.020$	$3.160 \pm 0.165$	$0.352 \pm 0.037$
SH-2	$11.111 \pm 0.141$	$0.772 \pm 0.033$	$4.591 \pm 0.007$	$0.084 \pm 0.017$	$1.334 \pm 0.017$	$0.021 \pm 0.003$
HN-1	$33.606 \pm 1.420$	$0.532 \pm 0.008$	$12.624 \pm 0.509$	$0.127 \pm 0.003$	$21.562 \pm 0.547$	$0.135 \pm 0.004$
GD-1	$13.406 \pm 0.704$	$16.412 \pm 1.529$	$5.688 \pm 0.013$	$5.481 \pm 0.148$	$1.358 \pm 0.044$	$7.644 \pm 0.033$
GD-2	$8.319 \pm 0.057$	$0.619 \pm 0.081$	$4.168 \pm 0.051$	$0.158 \pm 0.028$	$4.112 \pm 0.105$	$0.163 \pm 0.006$
GD-3	$16.691 \pm 1.421$	$0.594 \pm 0.007$	$6.581 \pm 0.154$	$0.150 \pm 0.011$	$5.090 \pm 0.088$	$0.085 \pm 0.010$

**Table 3** The risk assessment results of Cd and As in *Pheretima aspergillum* (E., Perrier). MOE: Margin of exposure; HI: Hazard index

Batch No.	Exposure dosage/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		MOE	HI	Bioaccessible exposure dosage/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$		Bioaccessible MOE	Bioaccessible HI
	Cd	As			Cd	As		
1	0.273	0.027	11.0	3.3	0.035	0.004	77.5	0.4
2	0.122	0.008	35.3	1.5	0.015	0.000	1298.7	0.2
3	0.370	0.006	51.3	4.4	0.237	0.001	202.0	2.8
4	0.147	0.181	1.7	1.8	0.015	0.084	3.6	0.2
5	0.092	0.007	44.1	1.1	0.045	0.002	167.3	0.5
6	0.184	0.007	45.9	2.2	0.056	0.001	320.9	0.7

### 3 风险评估结果

根据公式 (1), C 分别取地龙中 Cd 和 As 的总量和生物可给量用于计算相应的暴露量, 进一步计算相应的 HI 和 MOE 的值 (表 3)。由表 3 结果可知, 以生物可给浓度计算得到的暴露量均小于以地龙中 Cd 的初始浓度计算得到的结果。提取前, 所有批次地龙中 As 的 MOE 值均大于 1, 说明采用总量进行评估得到 As 对于人体的健康风险可以接受; 然而所有批次地龙中 Cd 的 HI 值均大于 1, 说明采用总量进行评估得到 Cd 对于人体的健康风险不可忽视。经过 MDCK 细胞转运后, 除了 1 批地龙外, 其余 5 批地龙中 Cd 的 HI 值均小于 1, 风险降低至安全范围内。可见, 地龙的 Cd 和 As 可能不能被人体完全吸收, 采用生物可给量结果用于人体健康风险评估, 得到的结果更加接近实际情况, 科学合理。

### 讨论

近年来, 采用体外的方法研究人体通过食品、土壤等途径暴露有害物质的经口生物利用率引起了各国学者的关注, 模拟污染物经胃和小肠消化过程的体外消化模型也成为探究污染物生物可给性和代谢的热点<sup>[18,19]</sup>。国际上较为公认的体外消化模型包括 PBET 法、英国地质调查局推荐的 SBET 法、荷兰公共卫生学院推荐的 RIVM 法等。其中 PBET 法由 Ruby 提出<sup>[9]</sup>, 该方法在模拟胃相消化时加入有机酸和胃蛋白酶, 模拟肠相消化时加入胰酶和胆汁, 非常接近人体胃肠道生理环境, 并在动物体内验证的结果较为理想, 因此本研究选择 PBET 法作为体外消化的前处理方法。

MDCK、Caco-2、HT-29-H、LLC-PK1 等细胞作为

肠道体外通透性模型,应用广泛<sup>[20,21]</sup>。尽管 MDCK 细胞系来源于犬肾小管上皮细胞,但是 MDCK 细胞模型作为研究药物转运和代谢的体外模型,具有独特的优势,是理想的单层上皮细胞模型:首先,MDCK 细胞株生长速度快,培养周期短,从接种开始至达到稳定融合期再到形成完整的柱状细胞单层一般只 3~4 天;其次,跨上皮电阻低,其值接近人体小肠<sup>[22]</sup>;再次,MDCK 细胞易于培养,无需特殊细胞培养条件,试验重复性好。因此本研究选择 MDCK 细胞进行培养,建立该细胞模型。

适宜的接种密度对于细胞的生长状态具有至关重要的作用。若接种细胞密度过低,会影响细胞的生长速度,导致细胞活力下降,不利于细胞单层的形成。反之,若接种细胞密度过高,细胞之间会因培养液中营养成分等的竞争而导致细胞倍增速度减弱,使细胞分裂停止,甚至死亡。本研究 MDCK 细胞在多微孔膜上的接种密度是其增殖分化形成单层并达到紧密联结所需时间的决定性因素,通过实验比对,最终选择  $4 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$  的接种密度。

细胞单层的完整性是决定药物转运和吸收能否成功的关键因素,通常采用测定细胞单层 TEER 值的方法来判断细胞单层的完整性。TEER 值会随着细胞生长天数的增加而增大,最后达到一个相对恒定值,TEER 值越高说明细胞单层的紧密性即完整性越好。文献报道若 MDCK 细胞的 TEER 值大于  $90 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ,则认为细胞单层的紧密性良好<sup>[23]</sup>。本研究 MDCK 细胞接种到 Transwell 培养板 4 天后,TEER 值大于  $200 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ,符合实验要求。

目前对污染物(包括重金属)暴露量的计算大多是基于污染物的摄入量(外暴露)而非与污染物毒性密切相关的体内暴露量<sup>[24,25]</sup>。然而,消化过程中并非所有物质全部从基质中释放,因此生物可给量小于外暴露剂量,生物可给性小于 100%。若将中药中本身的重金属的总量用于评估中药重金属对人体的健康风险,往往会高估其对人体的危害,导致政府采取不必要的干预措施,造成资源浪费。因此,人体生物可给性的研究对于准确评价中药中重金属对于人体的健康风险具有重要的意义。本研究首次建立了体外模拟消化/MDCK 细胞模型测定动物药地龙中 Cd 和 As 生物可给性的方法,并评估其对人体的健康风险。体外模拟消化/MDCK 细胞模型是测定中药中重金属生物可给性的一种新的、有效的技术手段。本研究为客观、科学地评价中药中重金属对人体的健康风险提供新的思路,为制定科学、合理的重金属限量标准提供重要的科学依据,并促进中药产业发展,最大程度地节约资源。

## References

- [1] Wu T, Zhao Y, Liu MM, et al. Research progress in antitumor activities of traditional animal medicines [J]. *Asia-Pacific Tradit Med* (亚太传统医药), 2017, 13: 81-85.
- [2] Zhang J, Li JF, Du YJ, et al. Recent advances in animal medicine pharmacology research in last five years [J]. *Jilin J Tradit Chin Med* (吉林中医药), 2016, 36: 1136-1150.
- [3] Huang JW, Gao HW, Duan JF. Research on chemical composition and pharmacological effects of geosaurus [J]. *Guid J Tradit Chin Med Pharm* (中医药导报), 2018, 24: 104-107.
- [4] Chen X, Wang K, Wang Z, et al. Effects of lead and cadmium co-exposure on bone mineral density in a Chinese population [J]. *Bone*, 2014, 63: 76-80.
- [5] Tchounwou PB, Yedjou CG, Patlolla AK, et al. Heavy metals toxicity and the environment [J]. *EXS*, 2012, 101: 133-164.
- [6] Zuo TT, Li YL, Chen P, et al. Determination and preliminary risk assessment of heavy metals and harmful elements in American ginseng, the fruit of Chinese wolfberry and hawthorn [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2016, 36: 2016-2021.
- [7] Peng Q, Nunes LM, Greenfield BK, et al. Are Chinese consumers at risk due to exposure to metals in crayfish? A bioaccessibility-adjusted probabilistic risk assessment [J]. *Environ Int*, 2016, 88: 261-268.
- [8] Cheng JL, Zhang XH, Tang ZW, et al. Concentrations and human health implications of heavy metals in market foods from a Chinese coal-mining city [J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2017 50: 37-44.
- [9] Ruby MV, Schoof R, Brattin W, et al. Advances in evaluating the oral bioaccessibility of inorganics in soil for use in human health risk assessment [J]. *Environ Sci Technol*, 1999, 33: 3697-3705.
- [10] Koch I, Mcpherson K, Smith P, et al. Arsenic bioaccessibility and speciation in clams and seaweed from a contaminated marine environment [J]. *Mar Pollut Bull*, 2007, 54: 586-594.
- [11] Oomen AG, Hach A, Minekus M, et al. Comparison of five *in vitro* digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants [J]. *Environ Sci Technol*, 2002, 36: 3326-3334.
- [12] Ruby MV, Davis A, Link TE, et al. Development of an *in vitro* screening test to evaluate the *in vivo* bioaccessibility of ingested mine-waste lead [J]. *Environ Sci Technol*, 1993, 27: 2870-2877.
- [13] Dan M, Wen RH, Wen N, et al. Protective effects of diammonium glycyrrhizinate on permeability increasing and chromosome breakage induced by *triptolide* [J]. *Chin New Drug J* (中国新药杂志), 2015, 24: 750-770.
- [14] Volpe DA. Variability in Caco-2 and MDCK cell-based intestinal permeability assays [J]. *J Pharm Sci*, 2008, 97: 712-725.
- [15] Summary Report of the Seventy-Third Meeting of JECFA [EB/OL]. Geneva: Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, 2010 [2012-06-09]. <http://www.who.int/foodsafety/publications/jecfa-reports/en/>.

- [16] Wang YBN, Liu AD, Li JW, et al. The survey of traditional Chinese medicine consumption among adult residents in 11 provinces and cities [J]. Chin Pharm Aff (中国药事), 2017, 31: 666-672.
- [17] International NSF. Dietary Supplement-Standard 173: Metal Contaminant Accepted levels [S]. Michigan, USA: NSF International, 2003: 3.
- [18] Aziz R, Rafiq MT, He ZL, et al. *In vitro* assessment of cadmium bioavailability in Chinese cabbage grown on different soils and its toxic effects on human health [J]. BioMed Res Int, 2015, 2015: 285351-285363.
- [19] Hu JL, Wu FY, Wu SC, et al. Bioaccessibility, dietary exposure and human risk assessment of heavy metals from market vegetables in Hong Kong revealed with an *in vitro* gastrointestinal model [J]. Chemosphere, 2013, 91: 455-461.
- [20] Hidalgo IJ. Assessing the absorption of new pharmaceuticals [J]. Curr Top Med Chem, 2001, 1: 385-401.
- [21] Shah P, Jogani V, Bagchi T, et al. Role of Caco 2 cell monolayers in prediction of intestinal drug absorption [J]. Biotechnol Prog, 2006, 22: 186-198.
- [22] Li J, Wang Y, Hidalgo IJ. Kinetic analysis of human and canine Pglycoprotein mediated drug transport in MDR1-MDCK cell model: approaches to reduce false negative substrate classification [J]. J Pharm Sci, 2013, 98: 423-435.
- [23] Xu Z, Zhang C, Zhang Y, et al. Europium complexes as novel indicators of paracellular diffusion [J]. Chem Biodivers, 2012, 9: 1916-1922.
- [24] Ngo DM, Hough RL, Le TT, et al. Assessing dietary exposure to cadmium in a metal recycling community in Vietnam: age and gender aspects [J]. Sci Total Environ, 2012, 416: 164-171.
- [25] Zuo TT, Li YL, He HZ, et al. Refined assessment of heavy metal-associated health risk due to the consumption of traditional animal medicines in humans [J]. Environ Monit Assess, 2019, 191: 171.