

乙醛对大鼠胚胎肢芽细胞增殖分化的影响研究

屈卫东 王 健 吴德生 周 颖 邓 莹 何雁红

摘 要 目的 研究乙醛的发育毒性和致畸性。方法 从 13 天龄大鼠胚胎中分离肢芽细胞, 体外施予不同剂量的乙醛 (0.1, 0.2, 0.5, 2.0, 8.0, 16.0, 32.0 mmol/L) 连续培养 5 天, 根据肢芽细胞蛋白质合成和集落形成抑制水平反映乙醛的致畸性。结果 乙醛在 0.1 mmol/L 即能影响肢芽细胞的增殖分化, 而在 2.0 mmol/L 以上时细胞则大量死亡, 显示其细胞毒性。其 IP_{50} , ID_{50} 分别为 6.84 mmol/L, 5.50 mmol/L。增殖分化抑制曲线经拟合后判断乙醛是一种非特异性增殖分化抑制物。结论 乙醛具有发育毒性作用和潜在的致畸作用。

关键词 乙醛 肢芽细胞 增殖 分化

Studies on Proliferation and Differentiation of Embryo Limb Bud Cell Induced by Acetaldehyde in Rats

Qu Weidong*, Wang Jian, Wu Desheng, et al. *Department of Environmental Health West China University of Medical Sciences Chengdu, Sichuan 610041

Abstract **Objective** Acetaldehyde is a widely used chemical, but its teratogenicity has been controversial. To study its effects on development and teratogenicity and their mechanisms, culture of rat embryo limb bud cells was used to examine their proliferation and differentiation. **Methods** Embryo limb bud cells were separated from rats of 13 days old and cultivated in 0.1, 0.2, 0.5, 2.0, 8.0, 16.0 and 32.0 mmol of acetaldehyde, respectively, for five days in vitro. The inhibition of protein synthesis and chondrogenesis was observed. **Results** Acetaldehyde at a concentration of 0.1 mmol could affect the proliferation and differentiation of the cultured cells, and that at 2.0 mmol over could cause cell death. IP_{50} of acetaldehyde was 6.84 mmol and ID_{50} 5.50 mmol. **Conclusion** Acetaldehyde is a chemical with developmental toxicity and potential teratogenicity.

Key words Acetaldehyde, Proliferation, Differentiation, Limb Bud cell

Flint^[1]等应用分化期胚胎肢芽细胞经高密度培养后, 分散细胞可形成分离细胞团, 并随着不断增殖最终分化为软骨细胞集落, 根据分化中的细胞可形成密集集落及致畸物能使微团培养中的细胞集落形成明显减少的特性判断化学物质的致畸性。

乙醛作为工业毒物, 其损害作用的靶器官和引起刺激的不良反应已广为人们所知, 但对其是否致畸和致畸的强度仍缺乏清楚的了解^[2]。因此, 本文采用胚胎肢芽细胞培养 (Limb cell bud, LCB) 技术研究乙醛的致畸性, 并为其机制的探讨提供初步试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂与仪器: 乙醛 (分析纯), D-Hanks, 胎牛血清 (Gibco 公司), 胰酶 (sigma 公司), 马血清 (Gibco 公司), F_{12} 培养基 (Gibco 公司), 紫外分光光度计, 倒置显微镜。

1.1.2 实验动物: 选用健康成年的 SD 大鼠, 雌鼠体重 200~230 克, 雄鼠体重 230~280 克, 均由华西医科大学实验动物中心提供。

1.1.3 实验培养基: 以 F_{12} 作为培养基, 按说明配制, 使用时加入胎牛血清 (10%, V/V), 并使培养基中含 50 单位/ml 的青霉素双抗抗菌。

1.2 方法

1.2.1 实验分组: 研究设对照组及实验组, 阴性对照组为不加任何受试物的 F_{12} 实验培养液, 实验组分别施与终浓度为 0.1, 0.5, 2.0, 8.0, 16.0, 32.0 mmol/L 的乙醛, 阴性对照为维生素 A, 以二甲基亚砷 (DSMO) 配制。

1.2.2 实验动物准备: 每日下午 18 时以雌雄 2:1 合笼, 次日早上 8 时检查阴栓, 镜检, 查到精子的当天定位怀孕的第 0 天 (G_{0d}), 妊娠的第 13 天 (G_{13d}) 脱颈椎处死大鼠。

1.2.3 胚胎肢芽细胞制备: 处死后的孕鼠以酒精 (75%, V/V) 浸泡 2~3 分钟消毒皮肤, 无菌条件下取出全部胚胎放入含马血清 (50%, V/V) 的 D-Hanks 缓冲液中清洗 2 次, 取出胚胎分离肢芽, 以 37℃

四川省计生委资助课题。

作者单位: 610041 成都 华西医科大学公共卫生学院 (屈卫东、吴德生、周颖、邓莹、何雁红), 乌鲁木齐石油化工厂医院 (王健)

F₁₂培养液清洗3次,剪碎加入1%胰酶溶液适量,20℃消化20分钟,弃去胰酶液,加入含胎牛血清的培养基冲洗3次,充分吹打制成细胞悬液,以100目尼龙滤网过滤,离心,弃上清后加入培养液制成 2.5×10^7 个细胞/ml的细胞悬液备用。

1.2.4 细胞毒性实验:96孔培养板中每孔加入细胞密度为 2.5×10^7 个细胞/ml同时含有不同乙醛的细胞悬液200 μ l,置于CO₂培养箱(CO₂:空气=5%:95%),连续培养5天,到期后按Lowery法^[3]直接测定吸光度,以对照组蛋白质含量为100%,根据各自的吸光度值分别计算出各实验组蛋白质的相对含量,格局每孔中蛋白质含量与细胞数呈直线相关,以反映细胞增殖情况。

1.2.5 微团培养:取密度为 1×10^7 个细胞/ml的细胞悬液20 μ l加入24孔培养板置入CO₂培养箱预培养两小时,再加入含不同浓度乙醛的完全培养液至终体积2ml,连续培养5天。

1.2.6 结果观察

1.2.6.1 细胞增殖:以蛋白质的相对含量反映细胞增殖,并以其为纵坐标,乙醛浓度为横坐标绘制剂量-效应曲线,计算50%细胞增殖的抑制浓度IP₅₀。

1.2.6.2 细胞分化:细胞培养结束后,以戊二

醛(2.5%,V/V)固定30分钟,洗涤后加入阿利新兰(0.5%,V/V)染液染色2小时,冲洗,显微镜下计数蓝色的肢芽细胞集落数。细胞分化以软骨细胞集落数表示,绘制浓度-效应曲线,并计算出50%分化抑制浓度ID₅₀。

1.2.7 统计处理:采用Stata软件统计拟合乙醛作用下的肢芽细胞增殖和分化的抑制曲线,并做曲线斜率的显著性检验。以 t 检验判定实验组与对照组的差异。

2 结果

从表1中可见,乙醛对大鼠胚胎肢芽细胞增殖、分化具有抑制作用。存在明显的剂量-效应关系,并呈显著性负相关(r 值分别为-0.764, -0.816, $P < 0.05$)。当乙醛浓度为0.1mmol/L以上时,肢芽细胞各组吸光度值、集落数与对照组相比差异有显著意义($P < 0.05$)。2.0mmol/L以上时,细胞集落数急剧下降,增殖能力也进一步降低。由细胞增殖抑制曲线、细胞分化抑制曲线求得的IP₅₀、ID₅₀分别为6.84mmol/L、5.50mmol/L,两曲线斜率经显著性检验差异无显著意义($P > 0.05$),表明乙醛是肢芽细胞增殖和分化的非特异性抑制剂。

表1 乙醛对胚胎肢芽细胞增殖分化的影响

浓度 (mmol/L)	细胞分化(集落数)			细胞增殖		
	样本数	$\bar{x} \pm s$	占对照%	样本数	$\bar{x} \pm s$	占对照%
0	6	83 $\pm$ 4	100%	6	0.362 $\pm$ 0.007	100%
0.1	6	69 $\pm$ 3*	83.1%	6	0.316 $\pm$ 0.007*	87.3%
0.2	6	55 $\pm$ 4*	66.3%	6	0.287 $\pm$ 0.013*	79.3%
0.5	6	40 $\pm$ 2*	48.2%	6	0.210 $\pm$ 0.009*	58.0%
2.0	6	35 $\pm$ 2*	42.2%	6	0.172 $\pm$ 0.009*	47.5%
8.0	6	19 $\pm$ 1*	22.9%	6	0.086 $\pm$ 0.008*	28.8%
16.0	6	10 $\pm$ 1*	12.0%	6	0.030 $\pm$ 0.004*	8.3%
32.0	6	7 $\pm$ 2*	8.4%	6	0.018 $\pm$ 0.003*	5.0%
$r = -0.764^{**}$				$r = -0.816^{**}$		

与相应对照组相比 * $P < 0.05$ 经相关性检验呈显著负相关 ** $P < 0.05$

3 讨论

乙醛作为广泛使用的工业化学品,常存在于生产作业环境中,因此,研究其致畸性及强度很有意义。但其致畸性长期以来一直存在着争议,Obel^[4]认为乙醛是一种遗传毒物,可通过干扰DNA合成和细胞有丝分裂而致胚胎出现畸形,也有人认为乙醛的细胞毒性可导致发育不良^[5]。

13天龄大鼠胚胎肢芽细胞经体外高密度培养后,

按一定时间和空间关系有序地分化增殖成为软骨细胞集落^[6]。由于大多数致畸原是细胞分化抑制剂,因而能干扰软骨细胞集落形成,故该体外短期致畸实验模型在快速筛选和鉴定致畸源方面具有较高的准确性和实用性。

从本研究结果看:乙醛对胚胎肢芽细胞属非特异性增殖分化抑制剂,但在低浓度时即可对细胞的增殖分化产生明显抑制,并与剂量呈显著性负相关,显示

出乙醛的细胞毒性作用。本研究根据细胞毒作用大小作为致畸性的判定标准^[7]，乙醛的致畸性呈弱阳性，故乙醛具有潜在的致畸性。

由于细胞增殖分化的分子基础是亲代全套遗传基因的选择性激活、转录、翻译，在基因表达过程中，这些环节可受内外环境的影响而发生变化，当超过细胞生理耐受阈值时即可导致其整体调控失常，结果出现细胞异常分化并最终导致胚胎的组织器官发育异常。本研究在最低剂量即在不导致细胞大量减少、死亡的剂量下，乙醛即能抑制细胞分化，显示出乙醛对肢芽细胞具有较强的抑制作用。最低剂量(0.1mmol/L)时，细胞分化及增殖抑制为对照组的83%~87%，显然表现出细胞毒性。因此，乙醛的潜在致畸性很可能是乙醛干扰了细胞增殖期的DNA合成，导致细胞的功能受到破坏，但其进一步的机制尚有待于从分子水平深入探讨。

4 参考文献

1 Flint OP. and Orton T. C An in vitro assay for tetragens with rat embryos in cultures of rat embryo midbrain and limb bud cells. Toxicol and appi pharma-
co, 1984 76 383~395

2 Blakley P. M, Scott W. J. detemination of proximate teratogen I d the mouse fetal alcohol syndromi. Teratogenicity of eth anol and acetaldehyde. Toxicol appli pharmacol, 1984, 72: 355~363

3 Lowery O. h, Rosebrough N. J, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem, 1951, 88 265~275

4 Obel G. acetaldehyde not alcohol is mutagenic in": Progress in environment mutagenesis and carcinogenesis. 1 (apps A~ ed.) Elsevier I north-Hol-land, Amsterdam, 1981: pp19~23

5 Dreosti L. E, Ballard j, Bellin G. B et al. The effect of ethanol and ac-etaldehyde on DNA synthesis in growing cells and fetal development in the rat. Alcohol. Clin. Exp. Res 1981, 5 357~362

6 Flint OP. The effect of sodium salicylate, cytosine arabinoside, and eserine sulfate on rat limb buds in culture. Teratology, 1980, 32: 325~338

7 Renault J. Y. Limb bud cell culture for in vitro teratogen screening: valida-tion of an improved assessment method using 51 compounds. Teratog carcinog mutag, 1989, 9: 83~86

(收稿: 1998-11-08 修回: 1998-11-25)

。来稿摘登。

健康成人尿 δALA 正常参考值上限的探讨

何 彩

测定尿中 δALA 含量对诊断铅中毒有一定意义。为探讨深圳市成人尿 δALA 正常参考值上限水平，我们测定了 169 名健康成人尿 δALA 含量，为确定本地区成人尿中 δALA 正常参考值提供了参考依据。

1 对象与方法

1. 1 对象

选择 169 名健康成年人，其中有医生、护士、工人，年龄 19~48 岁，无铅接触史，近期未服用任何药物。其中男性 104 名，女性 65 名，进行尿中 δALA 测定。

1. 2 测定方法

采取一次性晨尿，按全国统一方法——《生物材料中有毒物质分析方法手册》中对二甲氨基苯甲醛比色法测定。结果经统计学分析处理。

2 结果

169 名健康成人尿 δALA 含量测定结果见表 1。

从频数分布表中看，无论男女分组，还是合计，均呈偏态分布。男女组无显著性差异 ($P>0.05$)。

3 讨论

关于尿 δALA 含量正常值上限，我国过去一直采用 45.76

表 1 169 名健康成人晨尿 δALA 含量测定结果 $\mu\text{mol/L}$

性别	人数	范围	均值	标准差	上限值 (单侧)	
					95%	99%
男	104	2.90~47.20	11.96	1.266 2	32.79	49.78
女	65	3.04~45.29	12.06	0.251 2	31.24	46.32
合计	169	2.90~47.20	12.02	0.259 8	32.14	47.86

$\mu\text{mol/L}$ 作为上限。但近年来国内许多地区都有测定报道，结果都低于 45.76 $\mu\text{mol/L}$ 。因此，国家在新修订的职业性慢性铅中毒诊断标准中，将尿中 δALA 参考值上限修订为 30.50 $\mu\text{mol/L}$ 。据国内有关资料报道，由于地区条件、对象选择、采样方法、测定方法及统计方法等不同，测定结果也各有差异。

本次测定结果表明，尿中 δALA 范围为 2.9~47.20 $\mu\text{mol/L}$ ，均值为 12.02 $\mu\text{mol/L}$ ，95% 上限为 32.14 $\mu\text{mol/L}$ ，99% 上限为 47.86 $\mu\text{mol/L}$ ，与国家新修订参考值上限 30.50 $\mu\text{mol/L}$ 相近，故建议可用 30.50 $\mu\text{mol/L}$ 作为深圳市健康成人尿 δALA 参考值上限。

(收稿: 1996-11-15 修回: 1997-03-17)

作者单位: 518020 深圳市卫生防疫站