

锰对新生鼠脑组织热应激蛋白合成的影响

张本延 叶方立 陈 胜 朱长才 王瑞波 肖成峰 张国高 邬堂春

摘 要 目的 研究大鼠染锰后对其子代新生鼠脑组织热应激蛋白合成的影响。方法 雌性大鼠随机分为4组,腹腔注射氯化锰两周,隔日一次,剂量分别为0、7.5、15、30mg/kg,受孕后以同样方法继续染锰一周。分娩后对其新生鼠脑组织用western 斑点印迹法检测热应激蛋白70,并测定超氧化物歧化酶(SOD)。结果 与对照组相比,SOD活性在各组间差异无显著意义($P>0.05$);热应激蛋白70,30mg/kg组明显高于对照组($P<0.01$),7.5和15mg/kg组略有增加,但差异无显著意义($P>0.05$)。结论 亲代高剂量染锰可诱导子代新生鼠脑组织热应激蛋白70合成增高,但这种效应在锰的胚胎毒性中的作用和机理仍有待进一步阐明。

关键词 锰 新生鼠 脑 热应激蛋白70

Effect of Manganese (Mn) on the Synthesis of Heat Stress Protein 70 in the Brain of New-born Rats

Zhang Benyan*, Ye Fangli, Chen Sheng, et al.* Department of Preventive Medicine, college of Medicine, Wuhan University of Science and Technology. Wuhan 430080

Abstract **Objective** To study heat stress protein 70 (HSP70) synthesis in the brain of new-born rats with Mn-exposed mother-rats. **Method** 32 female rats were divided into four groups, one group used as control, the other three intraperitoneally received manganese chloride ($MnCl_2$) 7.5, 15 and 30 mg/kg respectively every two days for two weeks. After pregnancy, the mother-rats were given $MnCl_2$ again, one time per two day for a week with the same dose as before. The levels of HSP70 in the brains of the new-born rats were determined with western-dot blotting, while the activity of SOD were also determined. **Results** The activity of SOD showed no significant difference among four groups ($P>0.05$), but the levels of HSP70 in the brains of new-born rats of the 30 mg/kg group increased significantly ($P<0.01$) compared with the control. **Conclusion** High-exposure to $MnCl_2$ of mother-rat could induce HSP70 synthesis increase in the brain of new-born rat, the mechanism of this effect still remains unclear.

Key words Manganese, New-born rat, Brain, Heat stress protein70 (HSP70)

锰是一种神经毒物,对中枢神经系统产生损害,且具有生殖毒性^[1];锰对子代发育也产生影响^[2],但其机制仍未阐明。众所周知,热应激蛋白(Heat Stress Proteins, HSPs)能被一系列职业因素所诱导,其主要生物学作用是参与热耐受和毒物耐受;HSPs作为“分子伴侣”还参与蛋白质的合成、折叠、装配和胞内蛋白质的运输^[3,4]。HSPs的这些功能和作用是否与锰的生殖发育毒性有关,尚未见报道。本文对染锰大鼠子代新生鼠脑组织中主要热应激蛋白HSP70的变化进行了测定,同时还测定了其脑组织中超氧化物歧化酶活性,报告如下。

1 材料和方法

1.1 动物与分组

健康成年Wistar雌性大鼠,体重200~240g(同济医科大学实验动物中心提供),随机分为4组,每

组8只。实验大鼠腹腔注射氯化锰($MnCl_2 \cdot 4H_2O$, AR级,上海金山试剂厂产品)两周,隔日1次,各组剂量分别为7.5、15、30mg/kg,每次注射前称体重,对照组腹腔注射0.85%生理盐水;然后雌雄按1:1同笼,次晨阴道涂片检查精子,阳性者为妊娠第零天。在妊娠1~7天,各组按原剂量隔日1次腹腔注射 $MnCl_2$,全程共染锰11次。大鼠自然分娩后24小时内断头处死,取新生鼠脑组织,立即于 $-20^\circ C$ 下冷冻待用。

1.2 脑组织匀浆

按文献[5]制备脑组织匀浆,按Lowry法测定脑组织蛋白质含量。

1.3 SOD活性测定

取等量蛋白质的脑组织,用南京建成生物工程研究所提供的SOD试剂盒测定脑组织中SOD活性。

1.4 HSP70测定

取等量蛋白质的脑组织用western 斑点印迹法^[6]检测HSP70,第一抗体为兔抗人HSP70(Prof. Tangguay 惠赠),第二抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗

冶金部自然科学基金资助课题

作者单位:430080 武汉科技大学医学院预防医学教研室(张本延、叶方立、朱长才),同济医科大学职业医学研究所(陈胜、王瑞波、肖成峰、张国高、邬堂春)

兔 IgG (Sigma, 武汉博士德生物工程公司分装), 显色后用 CS-930 型双波段色谱扫描仪 (日本岛津) 进行图像分析, 用其积分光密度值大小反映 HSP70 的活性。

1.5 统计分析

全部结果在 IBM-PC 微机上用 SAS 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 锰对雌性大鼠繁殖的影响

如表 1 所示, 染锰各组妊娠期天数, 与对照组差别不大 ($P>0.05$)。分娩率似随着剂量增加而降低, 但差异无显著意义 ($P>0.05$)。分娩母鼠平均产仔数与对照组比较, 7.5mg/kg、15mg/kg 组也似有减少

的趋势, 但差异无显著意义 ($P>0.05$), 而 30mg/kg 组则差异有显著意义 ($P<0.01$); 受孕母鼠平均产仔数, 15mg/kg、30mg/kg 组比对照组明显减少 ($P<0.05$, $P<0.01$)。1 日龄仔鼠成活率, 30mg/kg 组明显低于对照组 ($P<0.01$)。初生仔鼠的体重、身长各组间差异无显著意义 ($P>0.05$)。见表 1。

2.2 锰对新生鼠脑组织 SOD 活性、HSP70 合成的影响

SOD 活性, 15mg/kg、30mg/kg 组有减少的趋势, 7.5mg/kg 组似略有增加, 但差异均无显著意义 ($P>0.05$)。HSP70 的积分光密度值, 7.5mg/kg、15mg/kg 组与对照组差异均无显著意义 ($P>0.05$), 而 30mg/kg 组则与对照组差异有显著意义 ($P<0.01$) (表 2)。

表 1 锰对雌性大鼠繁殖的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别 (mg/kg)	受孕 母鼠 (只)	妊娠期 (天)	分娩 母鼠 (只)	分娩率 (%)	总仔数 (只)	平均产 仔 数 (只)	1日龄仔 鼠存活率 (%)	初生仔 鼠体重 (g)	初生仔鼠身长 (cm)
对照组	8	21.3±0.8	7	87.5	68	9.7±2.1 (8.5±3.9)	98.52	5.89±0.49	5.2±0.25
7.5	8	21.8±1.16	6	75.0	41	6.8±3.1 (5.1±4.1)	95.12	5.47±0.54	5.1±0.36
15	8	22.2±0.83	5	62.5	33	6.6±2.7 (4.1±3.9)*	87.88	5.38±0.53	4.98±0.35
30	8	22.7±1.5	3	37.5	15	5.0±2.6* (1.8±2.9)**	73.33**	5.13±0.51	4.87±0.38

与对照组比较, * $P<0.05$ ** $P<0.01$ 。括号内为受孕母鼠平均产仔数

表 2 锰对新生鼠脑组织 SOD 活性、HSP70 合成的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别 (mg/kg)	仔鼠数 (只)	SOD (U/mg 蛋白)	HSP70 (积分光密度值)
对照	6	4.91±0.37	14.270.41±1.418.61
7.5	9	5.04±0.43	16.000.99±1.841.32
15	7	4.83±0.48	14.410.52±1.380.96
30	6	4.60±0.84	19.492.45±1.316.52**

与对照组比较, ** $P<0.01$ 。

3 讨论

本次实验结果表明, 锰染毒似可引起雌性大鼠产仔数减少; 分娩率随着染锰剂量的增加, 也似有下降的趋势; 1 日龄仔鼠存活率, 随染锰剂量增加, 而明显减少, 均表明锰可影响雌性大鼠的繁殖, 与有关报道相似。

锰对中枢神经系统的损害以锥体外系为主, 这与黑质、纹状体特定的组织结构及神经元分布有关, 在黑质致密带中分布有大量黑质素神经元和胺能神经元, 它们具有聚集和蓄积胺类及锰等金属元素的特性。过量锰一方面通过激活细胞色素氧化酶 P-450 活

性, 产生自由基使巯基耗竭, 并降低细胞的抵抗力; 另一方面锰能产生大量自由基, 损伤线粒体, 干扰能量代谢, 继之引起兴奋性氨基酸毒作用, 导致细胞内钙增高, 激活钙依赖蛋白酶、核酸酶、磷酸酶, 促使细胞退行性变性, 而钙离子的增高又可促进自由基的生成, 形成恶性循环。因此过量蓄积的锰可破坏黑色素神经元的保护屏障。蓄积的锰不断释放, 引起持续性锥体外系毒性^[7]。

综上所述, 自由基在锰的神经毒性中起了至关重要的作用, 而 SOD 是清除自由基的重要酶体系之一, 本次研究实验各组 SOD 活性虽然有降低趋势, 但差异无显著意义, 可能是 SOD 对锰中毒所产生的自由基不敏感, 也可能有其他原因, 有待进一步研究。

HSPs 是一类在进化上高度保守, 具有保护机能的蛋白质。HSPs 赋予细胞或生物从各种应激中恢复的能力并保护它们免遭这些应激因素的损害。其中, 表现最为明显的是热耐受能力的形成, 即当细胞或生物接触亚致死温度后, 表现对致死温度的存活率明显增加; 在热耐受的形成中, 热应激蛋白 HSP70 起主

要作用。HSPs 对保护细胞内重要遗传物质 DNA 具有重要作用, 在生物生长、发育和分化过程中也起重要作用, 它与体内许多重要生物活性物质有着密切的联系, 参与体内许多调节过程。更重要的是 HSPs 作为分子伴侣, 可促进蛋白质的合成、折叠、装配、运输, 还参与变性蛋白质的清除, 这种重要功能可能与热耐受、毒物耐受作用有关^[8]。本次研究结果显示, 正常新生鼠脑组织中也有一定量的 HSP70 合成, 与对照组相比, 低、中剂量染锰组新生鼠脑组织中 HSP70 含量有所增加, 但差异无显著意义, 高锰剂量组则见增加。这些结果表明了 HSP70 在新生大鼠的正常生长发育过程中可能具有一定作用; 锰对新生鼠脑组织中 HSP70 含量有一定诱导效应。但在高剂量组中, 也有个别新生鼠脑组织中 HSP70 合成较低, 其高低与锰中毒的病理、临床, 锰中毒的易感性及其他生化变化的联系仍待进一步研究。文献报道, 锰可通过胎盘进入子代中枢神经系统, 染锰各组新生鼠脑组织锰含量明显高于对照组, 并有剂量依存关系^[9]。这表明亲代接触锰后, 其子代脑组织内锰也可大量蓄积, 使机体处于一种应激状态, 从而可对胚胎及子代的生长发育产生损害。由于 HSP 可作为一种筛选发育毒物的生物标志^[10], 故本研究提出高剂量锰可能

是一种发育毒物, 其作用和机理有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 刘佳娟, 杨佰宁, 柯铭华, 等. 锰对雌性大鼠繁殖的影响. 广西预防医学, 1995, 1 (6): 346
- 2 师娟子, 武映东, 郭仁奥. 锰对仔鼠脑黑质 TH 免疫反应性神经元的影响. 西安医科大学学报, 1993, 14 (4): 331
- 3 张国高, 贺涵贞, 郭堂春. 热应激蛋白及其在职业医学中应用研究的展望. 中华劳动卫生职业病杂志, 1998, 16 (2): 67
- 4 Tangchun Wu, Ye Yuan, Yongyi Bi, et al. Plasma free amino acid in workers working under different stress conditions. J Occupa Health. 1998, 40 (3): 203
- 5 刘毓谷, 主编. 卫生毒理学基础. 北京: 人民卫生出版社, 1987. 180~183
- 6 何晓生, 潘秋萍, 郭堂春. Western 斑点印迹法检测主要热应激蛋白. 中华劳动卫生职业病杂志, 1996, 14 (6): 376
- 7 郑玉新. 锰的神经毒性研究进展. 国外医学卫生学分册, 1997, 24 (3): 129
- 8 Tangchun Wu, Ye Yuan, Yang Wu, et al. Presence of antibodies to heat stress proteins in workers exposed to benzene and patients with benzene poisoning. Cell Stress and Chaperone. 1998, 3 (3): 161
- 9 杨佰宁, 张德兴, 檀进发, 等. 孕期染锰对仔鼠脑内锰、锌、铜、铁的影响. 卫生毒理学, 1997, 11 (2): 101
- 10 李勇. 热应激蛋白在应激环境中对胚胎生长发育的影响. 国外医学卫生学分册, 1997, 24 (1): 20

(收稿: 1998-11-12 修回: 1998-12-28)

汽油吸入引起肺炎并发液气胸 1 例的 X 线观察

张振国 冯艳春

汽油所致吸入性肺炎, 国内曾有报道, 但并发液气胸的病例并不多见。现将我院 1998 年 4 月 26 日收治 1 例患者的胸部 X 线片的观察报告如下。

患者, 男性, 19 岁, 沈阳市某装卸运输公司司机。于入院当日中午, 用口吸导管从汽车油箱内往外吸油, 因用力过猛, 将汽油吸入肺内和胃中, 遂来我院就诊。患者自觉胸痛明显, 咳嗽加重, 痰中带血, 即由门诊收留住院观察治疗。14 时许摄胸部正位像。片号: 1065。摄片所见: 右肺下野呈大片状模糊阴影, 左肺下野纹理增多。心脏及大血管形态大小未见异常改变。诊断为吸入性肺炎。

1998 年 4 月 27 日, 摄片同前片对比无明显改变。

1998 年 4 月 29 日, 摄片同前二张对比, 片状模糊阴影渐小, 炎症有所吸收。

1998 年 5 月 2 日摄片同前三张比较变化较大, 可见右肺密

度明显增高, 中外带无肺纹理, 肺组织被压缩; 左肺纹理增粗, 呈主动性充血现象。诊断为右肺吸入性肺炎合并气胸。

1998 年 5 月 9 日摄片可见右侧出现胸腔积液, 液面呈水平状, 高达第四前肋间, 肺组织受压萎缩。诊断吸入性肺炎合并液气胸。

1998 年 5 月 30 日摄片可见被压缩的肺组织恢复正常, 双侧肋膈角锐利, 仅见右肺下野纹理增多。

讨论 吸入性肺炎是呼吸道吸入食物或其他物质所引起肺部一种炎症性病变。一般吸入物质进入呼吸道后, 由于吸入的物质刺激细支气管, 随之发生肺间质和肺实质的异物组织反应, 以及支气管和支气管周围的炎症性改变。根据吸入物质化学成分不同, 有些可以迅速吸收、消散, 有些则形成肺内上皮细胞纤维变性及支气管扩张。尤其是工业油脂类物质所致的吸入性肺炎, 对肺组织的损害较大, 而且在短期内病情变化较快。X 线检查是一种重要而可靠的手段, 所以, 放射科医师应密切结合临床, 观察各时期表现, 为临床提供治疗依据, 使患者早日康复。

(收稿: 1999-02-14 修回: 1999-04-21)

作者单位: 110024 沈阳市第九人民医院 (张振国), 辽宁省武警总队医院 (冯艳春)