

对苯二甲酸对 NIH-3T3 细胞毒性的研究

张恒东, 徐锡坤, 龚楠, 徐昌芬, 张正东, 王心如

(南京医科大学公共卫生学院, 江苏 南京 210029)

摘要: 目的 探讨对苯二甲酸的细胞毒性。方法 应用 MTT 比色法及电镜技术, 以 NIH-3T3 为靶细胞。结果 对苯二甲酸浓度在 156.25~625 μ g/ml 范围内, 短时间内对细胞生长有刺激作用; 随着染毒时间的延长及剂量的加大, 细胞生长出现抑制, 并有一定的剂量依赖趋势。电镜检测结果显示, 各染毒组细胞形态增大, 胞内出现大量空泡、自噬体及髓样变; 在浓度达到 625 μ g/ml 时, 核分裂相明显增多。结论 对苯二甲酸具有一定的细胞毒性, 其在 TPA 致膀胱肿瘤的机制研究中具有重要意义。

关键词: 对苯二甲酸; MTT 法; 电镜技术; 细胞毒性

中图分类号: Q2-06; 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2001)02-0065-03

Study on the toxicity of terephthalic acid to NIH-3T3 cells

ZHANG Heng-dong, XU Xi-kun, GONG Nan, XU Chang-fen, ZHANG Zheng-dong, WANG Xin-ru

(School of Public Health, Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract: **Objective** To study the cytotoxicity of Terephthalic acid (TPA). **Methods** MTT assay and electron micrograph were performed, the NIH-3T3 cell line was selected as target cell. **Results** TPA ranged from 156.25 to 625 μ g/ml could irritate cell growth in short time; the cell growth was inhibited with the increase of exposure dose and exposure time. The electron micrograph showed that the cell morphology was changed in all exposing groups, including cell enlargement, vacuolization, autophagic body and myeloid change, and karyokinesis phase was also increased when TPA dose reached 625 μ g/ml. **Conclusion** TPA shows some cytotoxicity which has some importance in the pathogenesis of bladder tumor.

Key words: Terephthalic acid (TPA); MTT assay; Electron micrograph; Cytotoxicity

对苯二甲酸 (Terephthalic acid, TPA) 是世界上生产和使用最为普遍的化学物之一, 主要用于合成树脂、薄膜和聚酯纤维等。随着现代化工业的发展, 我国 TPA 的生产及使用量猛增。长期以来, 人们认为 TPA 毒性较低, 因而在生产及使用中防护意识较薄弱; 近十年来的研究表明 TPA 并非安全低毒, 在动物实验中能诱导出膀胱结石甚至肿瘤^[1]。本研究旨在通过 TPA 对细胞及亚细胞水平的毒性研究, 并为制定 TPA 卫生标准提供科学依据, 深入探讨 TPA 诱导膀胱肿瘤的机制提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

NIH-3T3, 南京医科大学病生教研室提供; 对苯二甲酸, 纯度 99.9%, 仪征化纤集团公司提供; 二甲基亚砜 (DMSO), 美国 Sigma 公司产品; 胰蛋白酶, 美国 Sigma 公司产品; 噻唑蓝 (MTT), 美国 Sig-

ma 公司产品; PRMI 1640 培养基, 美国 Gibco 公司产品; 新生牛血清 (FBS), 上海高桥兽医站产品。

1.2 MTT 法检测 TPA 对 NIH-3T3 活力的影响

1.2.1 实验条件的选择 波长选择: 分别用含 10^4 的细胞悬液及不含细胞的 RPMI 1640 培养液 100μ l 接种 96 孔培养板, 每组 3 个复孔, 孵育 24h 后加入 5mg/ml MTT 25μ l 继续孵育 3h, 弃培养液, 加入 DMSO 150μ l, 振荡 10min 后用紫外分光光度计 (Beckman DU650, USA) 扫描, 测定还原型 MTT 的最大吸收峰。接种细胞数的选择: 配制 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 / 100μ l 不同密度细胞悬液, 以 100μ l 接种 96 孔培养板, 每组 6 个复孔, 设空白对照, 加 MTT 25μ l 孵育 3h, 弃培养液, 加入 DMSO 150μ l 振荡 10min, 使用酶标仪 (Beckman CERES900) 检测其吸光度 OD 值, 绘制不同接种细胞密度对应的 OD 值曲线, 选择合适的细胞接种密度。MTT 孵育时间的选择: 以 10^4 / 100μ l 密度接种细胞, 采用上述方法, MTT 孵育时间分别为 0、0.5、1、2、3、4、5h, 各点 3 个复孔, 测 OD 值, 绘制不同孵育时间对应的 OD 值曲线, 选择合适的 MTT 孵育时间。MTT 终浓度

收稿日期: 2000-10-24 修回日期: 2001-02-18

基金项目: 卫生部和江苏省自然科学基金资助 (3-92-109 92033)

作者简介: 张恒东 (1970-), 男, 江苏扬州人, 硕士, 主治医师,

主要从事化学物中毒、致癌的诊断、治疗及科研工作。

的选择: 采用同样的方法, MTT 的终浓度分别为 0.25、0.5、1、1.5、2、2.5、3.0 mg/ml, 测 OD 值, 绘制不同 MTT 浓度对应的 OD 值曲线, 选择合适的 MTT 浓度。

1.2.2 TPA 对 NIH-3T3 的毒性作用 配制合适密度单细胞悬液, 培养 24 小时后分别加入含 TPA 浓度为 0、156.25、312.5、625、1250、2500 μ g/ml 新鲜培养液, 同时设溶剂对照。染毒 24、48、72h 后测定各孔 OD 值, 计算各孔 MTT 的还原量。

1.3 TPA 对细胞超微结构的影响

以 3.5×10^4 /ml 的密度接种 25cm^2 培养瓶, 细胞进入对数生长期后, 分别加入含 TPA 浓度为 156.25、625、2500 μ g/ml 的新鲜培养液, 同时设 DMSO 溶剂对照组, 染毒 3 天, 以 PBS 清洗 3 次, 加入新鲜培养液继续培养 7 天, 小心消化离心, 收集沉淀细胞, 以 4°C 的 2% 戊二醛固定, 电镜备检。

2 结果

2.1 TPA 对 NIH-3T3 活力的影响

2.1.1 MTT 的检测条件 扫描结果见图 1, 发现有两个最大吸收峰, 分别为 510nm 和 575nm, 选用最接近的 490nm 滤光片作为测定波长。接种细胞数的选择结果见图 2, 在 $10^3 \sim 10^5$ 范围内细胞数与 OD 值有较好的线性关系, 故选择 10^4 为接种密度。MTT 孵育时间的选择见图 3, 随着孵育时间的延长, OD 值逐渐升高, 3h 达到最高, 之后趋于平稳, 选择 3h 为最佳孵育时间。MTT 终浓度的选择见图 4, OD 值随着 MTT 的浓度升高而上升, 当达到 1mg/ml 后, OD 值呈下降趋势, 选择 1mg/ml 为最适浓度。

2.1.2 TPA 对 NIH-3T3 细胞的毒性作用 见图 5。光镜下见细胞无崩解、悬浮、死亡, 细胞结构完整, 细胞形态增大, 细胞表面无明显中毒颗粒。MTT 的还原量在 TPA 浓度较低及短时间内反有增高; 但随着染毒时间的延长及剂量的加大, 细胞生长有抑制趋势。

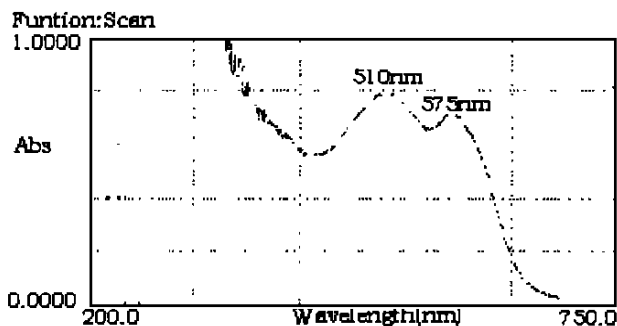


图 1 紫外分光光度计扫描最大吸收峰

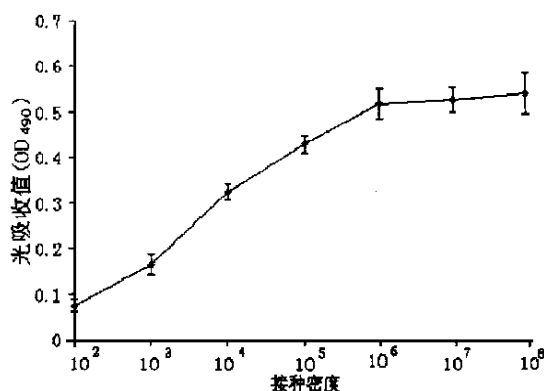


图 2 不同接种密度下的 OD 值

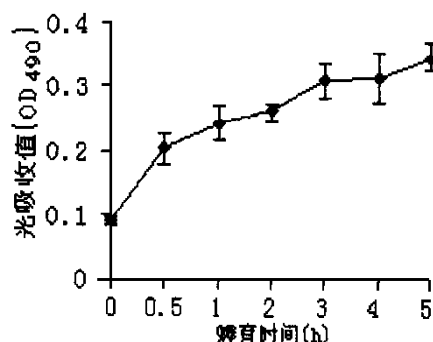


图 3 MTT 不同孵育时间下的 OD 值

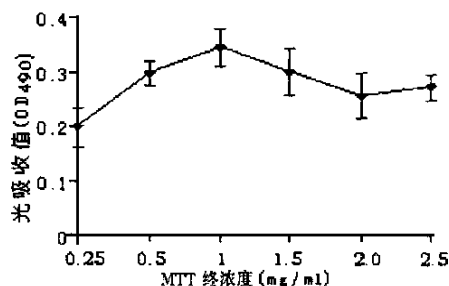


图 4 不同 MTT 终浓度下的 OD 值

2.2 电镜检测结果

在低浓度组 (156.25 ~ 625 μ g/ml) 空泡及自噬体增多, 有髓样变化, 细胞形态较对照组增大, 随着剂量的增大, 空泡、自噬体及髓样变明显增多, 同时出现多核大细胞; 在 2500 μ g/ml, 除出现上述改变外, 核分裂相增多, 呈凋亡核分裂征象。

3 讨论

自 1983 年 Mosman T 用 MTT 比色法, 检测存活细胞和细胞增殖以来, 该方法已广泛用于一些生物活性因子的活性检测、大规模的抗肿瘤药物的筛选、细胞

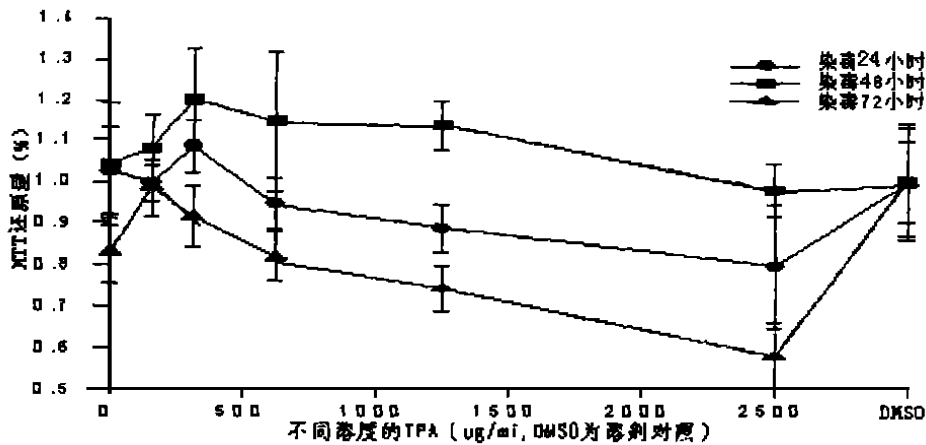


图5 不同时间段下MTT 的还原量 (各组以溶剂对照MTT 的还原量为参照)

毒性试验以及肿瘤放射敏感性测定等^[4]。MTT (3 [4, 5-dimethylthiazol-2-yl] -2, 5-diphenyltetrazolium bromide, 氮兰四唑盐), 它能透过质膜被活细胞线粒体膜上的琥珀酸脱氢酶还原成难溶性的蓝紫色结晶并沉积在细胞中, 而死细胞无此功能。二甲基亚砜(DMSO)能溶解细胞中的紫色结晶物, 用酶联免疫检测仪在490nm波长处测定其光吸收值, 可间接反映活细胞的数量^[3]。本研究使用MTT比色法, 在选择的条件下检测结果较为稳定。

对苯二甲酸的细胞毒性研究目前报道不多, 原因可能在于早期的研究认为TPA安全低毒, 而且在体内无蓄积性^[4]。本次研究发现, TPA在低浓度下短时间内对细胞生长有刺激作用, 但在高浓度及长时间染毒的情况下对细胞生长有一定的抑制作用。可能有两方面的原因: 一方面, 高浓度的情况下培养液的渗透压有变化, 使得细胞的生长环境受到影响, 细胞生长抑制; 另一方面, TPA本身对细胞分裂有影响, 从图

5中可以发现在高浓度TPA的条件下, MTT的还原量均有一定程度的降低, 有一定的时间-剂量-效应关系; 电镜结果亦表明, 在各染毒组, 胞内均出现大量的空泡、自噬体及髓样变, 在高剂量组还出现大量核分裂相, 类似凋亡改变。

总之, TPA可引起细胞损伤, 干扰细胞正常分裂, 其对细胞及人体的远期损害有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Chin TY, Tyl RW, Heck HD. Chemical urolithiasis I. Characteristics of bladder stone induction by terephthalic acid and dimethyl terephthalate in weanling Fischer-344 rats [J]. Toxicol Appl Pharmacol. 1981; 58: 307-321.
- [2] Niks M, Otto M. Towards an optimized MTT assay [J]. J Immunol Methods. 1990; 130: 149-151.
- [3] Mossmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays [J]. J Immunol Methods. 1983; 65: 55-63.
- [4] Hoshi A, Kurekani K. Distribution of terephthalic acid in tissues [J]. Chem Pharm Bull. 1968; 16 (1): 131-135.

关于召开中华预防医学会第七次全国劳动卫生与职业病学术会议的征文通知

中华预防医学会第七次全国劳动卫生与职业病学术会议将于新世纪开始的2001年9月在四川省成都市召开, 本次大会的主题是“21世纪职业卫生的机遇与挑战”。现将学术会议征文的有关事项通知如下。

1. 征文内容: (1) 控制职业危害, 改善劳动条件和作业环境的劳动卫生学研究及实践; (2) 重大职业危害防治的基础、临床及流行病学研究; (3) 西部大开发中的职业卫生问题和防治对策; (4) 市场经济、世界经济一体化及加入WTO等新形势下的职业卫生; (5) 职业病防治立法、服务、监督、管理; (6) 高新技术应用于劳动卫生与职业病领域的研究及实践; (7) 其他有关劳动卫生与职业病方面的研究与实践。

2. 征文范围: 1998年第六次全国劳动卫生与职业病学术会议以来未公开发表的有关上述内容的实践及科研论文。

3. 征文要求: (1) 全文不超过5000字, 并附400~800字的论文摘要(内容包括: 目的、方法、结果和结论); (2) 文稿用计算机打印或用400字稿纸抄清, 标题下注明作者及第一作者的单位、通讯地址及邮编; (3) 来稿同时请交稿件审理费20元; (4) 截稿日期: 2001年7月15日。 (5) 稿件及稿件审理费请寄至: 北京市南纬路29号, 邮编100050; 中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所 黄金祥 研究员收。电话: (010) 63016891。传真: (010) 63014323。凡被会议录用的论文并参加会议者将给予国家继续教育学分。大会期间将公布吴执中职业医学奖励基金第二次评选结果并颁奖。

中华预防医学会劳动卫生与职业病分会