

丙烯腈对体外培养鼠胚中脑神经细胞增殖分化的影响

端礼荣¹, 吴全义¹, 王卉芳²

(1. 江苏大学医学院预防医学系, 江苏 镇江 212001; 2. 江苏大学医学院生物化学系, 江苏 镇江 212001)

摘要: 目的 研究丙烯腈 (ACN) 对大鼠胚胎中脑神经细胞增殖分化的影响。方法 16 d 的大鼠胚胎中脑组织经取材、分离、消化后作原代细胞培养, 加入不同浓度 (0.01, 0.1, 1.0, 10.0, 50.0, 100.0, 200.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的 ACN, 从细胞形态学及细胞计数角度观察细胞生长与分化过程, 同时测定蛋白质含量、丙二醛 (MDA) 含量和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性并与对照组进行比较。结果 不同浓度的 ACN 明显抑制胚胎中脑神经细胞的增殖和分化, 集落形成率明显减少, 细胞体积小; 其半数分化抑制剂量 (ICD₅₀) 为 29 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 半数存活抑制剂量 (ICV₅₀) 为 42 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 均显示剂量-效应关系。结论 ACN 能抑制胚胎中脑神经细胞增殖和分化, 可能与其能抑制蛋白质合成, 并引起脂质过氧化有关。

关键词: 丙烯腈; 胚胎中脑神经细胞; 增殖; 分化; 脂质过氧化

中图分类号: R135.99; R338.22 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)03-0137-03

Effect of acrylonitrile on proliferation and differentiation of rat embryo midbrain nerve cells

DUAN Li-rong¹, WU Quan-yi¹, WANG Hui-fang²

(1. Department of Hygiene, School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China; 2. Faculty of Biological Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212001, China)

Abstract Objective To study the effects of acrylonitrile (ACN) on proliferation and differentiation of embryo midbrain nerve cells in rats. **Method** Primary culture of embryo midbrain nerve cells from rats at 14 days old was performed after being separated and digested. ACN at doses of (0.01, 0.1, 1.0, 10.0, 50.0, 100.0 and 200.0) $\mu\text{g}/\text{ml}$ was added to the culture respectively. Proliferation and differentiation of the cultured cells were observed with cytomorphological method and cell counting. Contents of protein and malondialdehyde (MDA) and activity of superoxide dismutase (SOD) were determined for the culture and compared with the control. **Result** Proliferation and differentiation of embryo midbrain nerve cells in rats were obviously inhibited with ACN in a dose-dependent pattern, with significant reduction of cell colony formation and cell size. Median inhibitory concentration for differentiation (ICD₅₀) was 29 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and median inhibitory concentration for viability (ICV₅₀) was 42 $\mu\text{g}/\text{ml}$. **Conclusion** Inhibition of acrylonitrile on embryo midbrain nerve cells in rats might be associated with its impact on protein synthesis and lipid peroxidation.

Key words: Acrylonitrile; Embryo midbrain nerve cell; Proliferation; Differentiation; Lipid peroxidation

丙烯腈 (ACN) 是制造腈纶纤维、丁腈橡胶、工业塑料和合成树脂等的重要有机合成单体, 也是职业环境中重要的有害空气污染物之一^[1]。大量研究结果表明, ACN 在代谢活化系统的参与下具有致突变性和致畸性^[2]。流行病学调查研究表明, 长期接触 ACN 工人中发生肿瘤, 特别是患肺癌的危险度增高^[3]。另外, ACN 可能会对神经细胞间的信息传递产生影响, 并以中枢神经系统损害为主要表现。本研究基于 Flint 等的微团培养系统筛选化学毒性及致畸性, 该方法较简便, 重复性好, 系统的敏感度和特异性也较高^[4]。本文拟观察 ACN 对大鼠胚胎中脑神经细胞分化、增殖、蛋白质以及脂质过氧化的影响, 探讨 ACN 对胚胎神经细胞的影响及机制。

1 材料与方法

1.1 材料

ACN; F₁₂培养基 (GIBCO 公司产品); 胎牛血清 (GIBCO 公司产品); 胰蛋白酶 (1:250 SERVA 公司产品); CO₂ 培养箱 (NAPCO, USA); 马血清为浙江三利生物制品厂产品; 二甲基亚砜 (GIBCO 公司产品)。

1.2 胚胎中脑神经细胞的制备

采用纯系健康 Wistar 大鼠, 雌雄 2:1, 体重 250~300 g, 由医学院动物中心提供。傍晚合笼, 次晨镜检精子为 0 d。用脱颈椎法处死妊娠 16 d 孕鼠, 在无菌条件下分离出胎鼠中脑, 浸入 37 °C 的胎牛血清 Hank's 平衡液 (V/V=1:1) 5~10 min, 用 Hank's 液漂洗 3 次后, 用眼科剪剪碎放入盛有 0.125% 胰蛋白酶的培养皿中, 室温下静止消化 10 min, 然后用含 10% 胎牛血清的 F₁₂ 培养基终止消化, 用培养基洗去多余的胰蛋白酶, 再用滴管反复吹打成细胞悬液, 经 200 目尼龙网过滤, 计数细胞存活率 (公式如下),

收稿日期: 2004-06-28; 修回日期: 2004-09-24

基金项目: 江苏省教育厅自然科学基金资助项目 (02KZ030004)

作者简介: 端礼荣 (1954-), 男, 南京市人, 副教授, 主要从事细胞生物学和环境毒理学研究。

采用台盼蓝计数活细胞^[5]。结果活细胞率为 92%，再用含 10% 胎牛血清的 F₁₂ 培养基将细胞密度调整至 4 × 10⁶ 个/L 的细胞悬液。

$$\text{活细胞率}(\%) = \frac{\text{活细胞总数}}{\text{活细胞总数} + \text{死细胞总数}} \times 100\%$$

1.3 胚胎中脑神经细胞原代培养

取上述制备的大鼠胚胎中脑神经细胞悬液加入 96 和 48 孔培养板，每孔加 20 μl，置 CO₂ 培养箱中 (37℃, 5% CO₂, 95% 空气, 100% 湿度) 培养 4 h。待贴壁后，分对照组 (二甲基亚砷, DMSO) 和 ACN 组，其染毒剂量为 0.01, 0.1, 1.0, 10.0, 50.0, 100.0, 200.0 μg/ml；每剂量组为 10 孔，ACN 用量每孔为 20 μl，最终液体总体积达到 200 μl。每 4 d 更换一次新鲜培养基，第 10 d 后吸掉每孔中的培养液，用等渗 2.5% 戊二醛固定，然后用苏木精染色，再放入 37℃ 培养箱内孵育过夜，次晨用磷酸缓冲液 (PBS) 冲洗 2 次，在倒置显微镜下观察染成蓝色的胚胎中脑神经细胞和集落形态，计数集落数，摄影分析，计算出集落形成率，以正常对照组集落数为 100%，确定胚胎中脑神经细胞分化抑制结果。

1.4 胚胎中脑神经细胞内蛋白质含量测定^[6]

中脑神经细胞培养 10 d 后用 0.1% 胰蛋白酶消化，离心，吸取沉淀物。采用考马斯亮蓝 G-250 方法测定中脑神经细胞内的蛋白质相对含量，以正常对照组为 100%，细胞存活率以蛋白质的相对含量来反映胚胎中脑神经细胞染毒 ACN 不同时间后对神经细胞的损伤程度，即蛋白质相对含量的变化可反映细胞毒性作用。

1.5 胚胎中脑神经细胞内丙二醛 (MDA) 含量测定

同样上述方法收集正常对照组调整细胞密度为 4 × 10⁵ 个/ml 制成单细胞悬液，以磷酸盐缓冲液 (pH = 7.4) 制备成匀浆，低温状态下离心 (4 000 r/min) 后，取出上清液待测。采用改进的硫代巴比妥酸法测定丙二醛含量^[7]。

1.6 胚胎中脑神经细胞内超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定

作用 10 d 后用 0.25% 胰蛋白酶消化收集细胞，再用 PBS 漂洗 3 次，调整细胞密度为 4 × 10⁵ 个/ml 制成单细胞悬液，低温超声粉碎细胞，采用改良的连苯三酚自氧化测定 SOD 的活性^[8]。

1.7 统计处理

以各剂量 ACN 染毒组与对照组进行比较，用 Stata 7.0 统计软件进行 F 检验。

2 结果

2.1 ACN 对胚胎中脑神经细胞体外存活率的影响

对照组胚胎中脑神经细胞培养初期呈圆形分散分布，4 h 开始贴壁，胞体呈圆形或菱形，部分细胞开始长出神经突起。随着时间延长，胞体增大，细胞之间有相连接现象，突起也逐渐发育生长，10 d 后形成明显的集落。从表 1 可见不同剂量 ACN，对大鼠胚胎中脑神经细胞影响程度不同。当 ACN 剂量为 50.0 ~ 200.0 μg/ml 时集落形成率较对照组明显降低 (P < 0.01)，而且出现细胞脱落、漂浮、明显崩解、细胞碎片等现象；在 0.01 ~ 10.0 μg/ml 时与对照组比较没有明显改变。

表 1 ACN 对大鼠胚胎中脑神经细胞集落存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

组别	集落数	集落存活率 (%)
对照组 (DMSO)	122.9 ± 7.70	100
ACN 0.01 μg/ml 组	125.8 ± 9.64	102
ACN 0.1 μg/ml 组	119.7 ± 10.1	97
ACN 1.0 μg/ml 组	105.9 ± 8.84	86
ACN 10.0 μg/ml 组	98.5 ± 9.82	80
ACN 50.0 μg/ml 组	68.6 ± 4.3 **	56 **
ACN 100.0 μg/ml 组	46.3 ± 3.3 **	38 **
ACN 200.0 μg/ml 组	25.4 ± 2.8 **	21 **

与对照组比较 * * P < 0.01

2.2 ACN 对大鼠胚胎中脑神经细胞蛋白质相对含量的影响

实验结果显示，ACN 剂量为 50.0 ~ 200.0 μg/ml 时相对蛋白质含量较对照组明显降低，差异有显著性 (P < 0.05)，ACN 剂量为 0.01 ~ 10.0 μg/ml 相对蛋白质含量经分析差异无显著性 (P > 0.05)。见表 2。

表 2 ACN 对中脑神经细胞蛋白质相对含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 10)

组别	吸光度	蛋白质相对含量 (%)
对照组 (DMSO)	1.04 ± 0.11	100
ACN 0.01 μg/ml 组	1.09 ± 0.12	105
ACN 0.1 μg/ml 组	0.96 ± 0.53	92
ACN 1.0 μg/ml 组	0.94 ± 0.43	90
ACN 10.0 μg/ml 组	0.92 ± 3.20	85
ACN 50.0 μg/ml 组	0.55 ± 0.10	53 *
ACN 100.0 μg/ml 组	0.34 ± 0.16	33 *
ACN 200.0 μg/ml 组	0.19 ± 0.11	19 *

与对照组比较 * P < 0.05

2.3 ACN 对胚胎中脑神经细胞 MDA 含量及 SOD 活性的影响

表 3 显示，当 ACN 剂量为 10.0 ~ 200.0 μg/ml 时 MDA 的含量均增高，SOD 活性逐渐降低，有明显的剂量-效应关系，差异均有显著性 (P < 0.01, P < 0.05)。

表 3 ACN 对中脑神经细胞 SOD 活性和 MDA 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=10$)

组别	SOD (U/mg prot)	MDA (nmol/mg prot)
对照组 (DMSO)	13.43±1.38	0.52±0.02
ACN 0.01 μg/ml 组	12.19±2.12	0.51±0.04
ACN 0.1 μg/ml 组	11.60±0.53	0.54±0.20
ACN 1.0 μg/ml 组	10.42±0.43	0.62±0.11
ACN 10.0 μg/ml 组	9.94±3.20*	0.94±0.23**
ACN 50.0 μg/ml 组	7.52±0.10*	1.25±0.10**
ACN 100.0 μg/ml 组	5.24±0.16*	1.38±0.05**
ACN 200.0 μg/ml 组	3.57±0.14*	1.44±0.13**

与对照组比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$

3 讨论

ACN 主要损害中枢神经系统, 长期接触仍然存在丙烯腈对神经系统的慢性潜在影响^[9]。体外神经毒性研究可以发现丙烯腈神经毒性效应, 表现为神经细胞内的自由基活性及蛋白质含量的改变, 以致对自身造成氧化损害。SOD 活性和 MDA 含量变化可以反映自由基的产生和抗氧化系统的功能状况。实验结果表明, 当 ACN 剂量为 50.0~200.0 μg/ml 时集落形成率较对照组明显降低 ($P<0.01$), 而且出现细胞脱落、漂浮、细胞明显崩解、细胞碎片及死亡现象。同时, 神经细胞相对蛋白质含量较对照组明显降低, 差异有显著性 ($P<0.05$)。当 ACN 剂量为 10.0~200.0 μg/ml 时 MDA 的含量均增高, SOD 活性降低, 并且有明显的剂量-效应关系, 差异均有显著性 ($P<0.01$, P

<0.05)。该结果提示, 在一定浓度下 ACN 毒性可抑制胚胎中脑神经细胞增殖、分化, 使蛋白质含量降低和脂质过氧化平衡失调。

参考文献:

- [1] Environmental protection Agency (EPA). National emission standards for hazardous air pollutants from the synthetic organic chemical manufacturing industrial and seven other processes [J]. Fed Regist, 1992, 57: 62602-62608.
- [2] Butterw BE, Eldridge SR, Sprinkle CS, et al. Tissue specific genotoxic effect of acrylamide and acrylonitrile [J]. Environ Mol Mutagen, 1992, 3: 148.
- [3] 尤学筠, 译. 国际癌症研究中心 (IARC) 最近公布的对人致癌性总评价表 (2) [J]. 劳动医学, 1999, 16: 196-209.
- [4] Flint OP. An in Vitro test for teratogens: Desirable and points test batteries and current status of the micromass teratogen test [J]. Reprod Toxicol, 1993, 7: 103-111.
- [5] 司徒镇强, 吴军正. 细胞培养 [M]. 北京: 世界图书出版公司, 1996. 181-183.
- [6] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 54.
- [7] 张秀明, 严丽娟, 柴建开, 等. 改良硫代巴比妥酸荧光法测定血清过氧化脂质 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23 (2): 175-178.
- [8] 向荣, 王鼎年. 过氧化脂质硫代巴比妥酸分光光度法的改进 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1990, 17: 241-242.
- [9] 张正东, 金锡鹏. 丙烯腈毒性研究新进展 [J]. 职业卫生与应急救援, 1997, 15 (2): 79-82.

急性丙烯酰胺中毒 1 例报告

Acute acrylamide poisoning—A case report

黄爱英, 黄章耀

(齐鲁石化医院集团中心医院, 山东 淄博 255400)

患者, 男, 40 岁, 农民。因 16 h 前将丙烯酰胺液体 (浓度 40%) 当酒误服一口, 约 20 ml。当时感口苦, 但未做处理。约 4 h 后出现频繁的恶心、呕吐, 不能进食, 伴全身出汗、无力、头晕、手颤、持物不稳、行走不稳, 无腹痛、腹泻, 无肢体抽搐及意识障碍。在他人搀扶下来院就医。于 2003 年 11 月 21 日 10:20 以急性丙烯酰胺中毒收入院。既往身体健康。体检: T 36.5℃, P 70 次/min, R 17 次/min, BP 116/70 mmHg, 发育营养正常, 意识清楚, 面色萎黄, 精神差, 全身皮肤潮湿, 无发绀及瘀点, 巩膜无黄染。心肺听诊正常。腹软, 肝脾未触及, 脐周压痛, 无反跳痛, 肝肾区无叩击痛。神经系统检查: 脑神经正常, 无眼颤。四肢痛觉

及音叉震动觉正常, 四肢腱反射正常, 手颤 (+), 睁眼、闭眼指鼻试验不准, 呈终末震颤, 闭目站立、单足站立均不能, 独立行走不稳, 走直线不能。病理反射 (-)。实验室检查: 肝、肾功能及心肌酶谱正常。血、尿、大便常规, 甲状腺功能均正常。心电图正常。脑电图以低波幅慢波为主, 示轻度不正常。入院后给予 30% 硫酸镁导泻, ATP、辅酶 A、维生素、脑蛋白水解物改善脑细胞代谢等对症治疗 4 d。患者自觉症状完全缓解, 体检手颤 (+), 余神经系统均正常, 出院。

讨论 丙烯酰胺是蓄积性神经毒物, 皮肤、呼吸道、消化道均可吸收。对中枢及周围神经系统皆有损害, 当体内累积剂量达到 80~130 mg/kg 时引起中毒症状。损害特点取决于丙烯酰胺的剂量、浓度。皮肤接触是职业性丙烯酰胺中毒的主要途径, 临床上以慢性隐匿发病, 短期接触高浓度丙烯酰胺 1 个月左右可出现小脑功能障碍。临床主要表现为头晕、乏力、食欲差、多汗、手足脱皮、共济运动障碍。急性中毒时主要表现为中枢神经系统障碍, 如运动失调、震颤、兴奋、四肢强直、痉挛, 甚至死亡。但急性经口中毒尚未见报道。该患者误服丙烯酰胺 4 h 后出现的症状符合丙烯酰胺急性中毒的表现。给予导泻、维生素、脑蛋白水解物等对症治疗效果尚好。如果及时洗胃减少吸收, 可能会恢复得更快。

收稿日期: 2004-08-16; 修回日期: 2004-10-20