

Oncolyn 对温石棉所致大鼠氧化损伤影响的实验研究

张艳淑¹, 姚林¹, Arthur H. K. Djang², 闫立成¹, 李清钊¹, 刘英莉¹, 王广增¹

(1. 华北煤炭医学院预防医学系, 河北 唐山 063000; 2. Sané International Inc, NY USA 14701)

摘要: 目的 探讨温石棉对实验大鼠氧化损伤的影响以及 Oncolyn 的缓解作用。方法 Wistar 大鼠随机分为对照组、石棉组和 Oncolyn 组, 应用支气管灌注的方法给予大鼠温石棉 5 mg/ml, 同时经口给入 Oncolyn 40 d, 剂量为 1.5 g/(kg·d), 检测肺泡巨噬细胞中 DNA 损伤状况以及血液和肺脏中 NO、NOS 和抗氧化酶 SOD、CAT、GSH-Px、G-ST 的活性。结果 石棉组肺泡巨噬细胞 DNA 链断裂增加, 表现为彗星出现率和 DNA 迁移长度增加; 血液中 NO 和 NOS 水平和 SOD、GSH-Px 活性增加, 而 G-ST 活性下降; 而肺组织中 NOS、SOD、GSH-Px 和 G-ST 的活性均下降, MDA 含量增加。应用 Oncolyn 预防后, 肺泡巨噬细胞 DNA 损伤下降; 血液中 NO、NOS 的水平以及 SOD 活性下降, 而 GSH-Px、G-ST、CAT 活性上升; 肺组织中抗氧化酶活性增加, MDA 含量下降。结论 Oncolyn 对温石棉所致机体氧化损伤有一定的缓解作用。

关键词: 温石棉; 氧化损伤; 大鼠; Oncolyn

中图分类号: R979.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)04-0196-03

Effect of Oncolyn on oxidative damage caused by chrysotile in rats

ZHANG Yan-shu¹, YAO Lin¹, Arthur H. K. Djang², YAN Li-cheng¹, LI Qing-zhao¹, LIU Ying-li¹, WANG Guang-zeng¹

(1. Dept of preventive medicine, North China Medical College Affiliated to Ministry of Coal Industry, Tangshan 063000, China; 2. Sané International Inc, NY 14701, USA)

Abstract Objective To explore the neutralization of Oncolyn on oxidative damage in rats induced by chrysotile. **Method** Male Wistar rats weighing 200—250 g were divided into three groups: control group, chrysotile exposure group and Oncolyn intervening group. Animals were intratracheally instilled with sterile saline (control group) or saline suspensions of chrysotile (chrysotile group and Oncolyn group), the rats of Oncolyn group were also administrated with Oncolyn [dissolved in saline, 1.5 g/(kg·d)] by oral after instillation of chrysotile. The status of DNA damage in AM, the level of NO and the activities of NOS, SOD, CAT (catalase), G-ST (glutathione transferase), GSH-Px were measured both in blood and lung tissue were measured. **Result** The DNA chain break (percent of comet cells 63.2% and the length of DNA migration 51.17 μ m) in AM of rats from chrysotile group was more serious than that of control group (9.2% and 24.45 μ m), and the NO level and the activities of NOS, SOD, CAT, GSH-Px in blood were higher than that of the controls but the activity of G-ST was lower than that of the control group. Meanwhile in lung tissue the activities of NOS, SOD, GSH-Px, G-ST in chrysotile group were lower than the corresponding values in control group. When rats were administered with Oncolyn, the percent of comet cell (29.3%) and length of DNA migration (33.11 μ m) decreased than the values of chrysotile group, the levels of NO, NOS, MDA decreased and the activities of anti-oxidative enzymes such as SOD, GSH-Px, G-ST were increased compared with chrysotile group. **Conclusion** Oncolyn shows good effect in inhibiting generation of NO, NOS, elevating the activity of antioxidation enzyme etc., then exerted the oxidative damage on DNA of AM induced by chrysotile in some degree.

Key words: Chrysotile; Oxidative damage; Rat; Oncolyn

长期接触石棉不仅可以导致急性肺损伤, 而且还可以引起不可逆转的肺纤维化、肺癌等。进入机体的石棉和肺泡巨噬细胞膜相互作用被认为是石棉引起肺损伤的关键环节。研究证实石棉可直接损伤肺泡巨噬细胞, 诱导其释放活性氧、活性氮以及炎症介质, 从而启动肺损伤的发生, 这可能在石棉致肺纤维化和致癌过程中起着重要的作用^[1, 2]。Oncolyn 是从植物中提取的天然活性物质, 可增强机体抗氧化酶的活性。

本研究旨在通过实验大鼠接触温石棉的同时经口给入 Oncolyn, 观察温石棉对大鼠肺泡巨噬细胞 DNA 的损伤以及血液和肺组织中 NO 的释放和抗氧化酶 SOD、GSH-Px、CAT、G-ST 的损伤状况以及 Oncolyn 对温石棉所致机体氧化损伤的缓解的状况。

1 材料与方法

1.1 材料

温石棉由北京大学医学部公共卫生学院劳动卫生教研室提供, 采用青海茫崖棉 (石棉纤维直径 < 1.2 μ m, 其中长度 < 5 μ m 占 5%, 5 ~ 10 μ m 占 30%, 10 ~ 20 μ m 占 40%, ≥ 20 μ m 占 25%), 临用前用生理盐水稀

收稿日期: 2004-09-03; 修回日期: 2004-11-13

作者简介: 张艳淑 (1970—), 女, 副教授, 研究方向: 尘肺防治和神经毒理学

释到 5 mg/ml, 高压灭菌备用。加入青霉素和链霉素各 3 000 U/ml。

1.2 实验动物及分组处理

Wistar 大鼠 27 只, 体重 200~250 g, 随机分为对照组、石棉组和 Oncolyn 组。对照组: 气管灌注生理盐水 1 ml, 左右两肺各 0.5 ml; 石棉组: 气管灌注温石棉悬液 1 ml (5 mg/ml), 左右两肺各 0.5 ml; Oncolyn 组: 气管灌注温石棉悬液 1 ml (5 mg/ml), 左右两肺各 0.5 ml, 温石棉灌注 3 d 后灌胃给予 Oncolyn, 剂量为 1.5 g/(kg·d), 共给予 40 d。

1.3 肺泡巨噬细胞的获得

实验大鼠在给予 Oncolyn 40 d 后, 用 25% 的乌拉坦麻醉后, 股动脉放血, 分离气管做气管插管。每次用 15 ml 的生理盐水灌洗肺脏, 共 10 次。将收获的肺灌洗液用 3 000 r/min 离心 15 min 后, 倾去上清液, 用无血清的 RPMI-1640 稀释成浓度为 2×10^6 个/ml 的细胞液, 进行 DNA 损伤的检测。DNA 损伤的检测采用单细胞凝胶电泳法, 参照王起恩^[3]的方法进行。

1.4 抗氧化酶的检测

超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、过氧化氢酶 (CAT)、一氧化氮 (NO) 和一氧化氮合酶 (NOS) 的检测试剂盒由南京建成生物工程公司提供。

1.5 数据处理

表 2 Oncolyn 对实验大鼠血液中 NO、NOS、MDA 水平以及 SOD、CAT、GSH-Px、G-ST 的影响

组别	NOS (U/ml)	NO (μ mol/L)	MDA (nmol/L)	SOD (NU/ml)	CAT (U/ml)	GSH-Px (U)	G-ST (U/ml)
对照组	8.47 $\pm$ 1.20	14.33 $\pm$ 1.80	10.50 $\pm$ 1.40	340.5 $\pm$ 33.1	6.27 $\pm$ 1.10	59.23 $\pm$ 3.40	292.23 $\pm$ 29.70
石棉组	11.38 $\pm$ 1.10*	21.20 $\pm$ 3.40*	10.98 $\pm$ 0.80	414.5 $\pm$ 38.1*	9.91 $\pm$ 2.20*	75.51 $\pm$ 6.50*	205.42 $\pm$ 21.77*
Oncolyn 组	9.32 $\pm$ 1.00#	9.56 $\pm$ 1.40*#	11.70 $\pm$ 0.90*	332.5 $\pm$ 24.2#	10.87 $\pm$ 1.90*#	86.97 $\pm$ 5.60*#	328.44 $\pm$ 31.42*#

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与石棉组比较, # $P < 0.05$

2.3 肺组织中 NO、MDA、NOS、GSH-Px、G-ST、SOD 的变化

实验结束后, 用 5 ml 生理盐水分 2 次肺泡灌洗,

表 3 Oncolyn 对大鼠肺组织中 NO、MDA、NOS、GSH-Px、G-ST、SOD 的影响

组别	NO (μ mol/L)	NOS (U/mg Pro)	MDA (nmol/mg Pro)	SOD (NU/mg Pro)	GSH-Px (U/mg Pro)	G-ST (U/mg Pro)
对照组	33.12 $\pm$ 3.30	1.38 $\pm$ 0.30	0.86 $\pm$ 0.20	38.81 $\pm$ 3.90	16.67 $\pm$ 3.70	52.09 $\pm$ 5.00
石棉组	30.00 $\pm$ 3.20*	1.04 $\pm$ 0.20*	1.44 $\pm$ 0.20*	19.94 $\pm$ 1.90*	12.16 $\pm$ 1.40*	35.98 $\pm$ 4.70*
Oncolyn 组	30.50 $\pm$ 4.20*	1.12 $\pm$ 0.30	0.82 $\pm$ 0.130#	22.74 $\pm$ 2.00*#	14.81 $\pm$ 2.20#	40.74 $\pm$ 4.63*#

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与石棉组比较, # $P < 0.05$

由表 3 可知, 温石棉组肺灌洗液中 NO 水平以及肺组织匀浆中 NOS、SOD、GSH-Px 和 G-ST 的活性均比对照组下降, MDA 含量增加。应用 Oncolyn 预防

所有数据由 Excel 建库, SAS6.0 进行方差分析和两两比较的 q 检验。

2 结果

2.1 实验大鼠肺泡巨噬细胞中 DNA 损伤状况

由表 1 可见, 大鼠接触温石棉后, 其肺泡巨噬细胞彗星出现率及 DNA 迁移长度增加, 且差异有显著性。经口给予 Oncolyn 后, 与石棉组比较彗星出现率降低, DNA 迁移长度缩短, 但与对照组相比, 彗星出现率和 DNA 迁移长度均增加。

表 1 Oncolyn 对大鼠肺泡巨噬细胞 DNA 损伤的影响

组别	检测细胞数 (个)	彗星细胞数		DNA 迁移长度 (μ m)
		数量 (个)	彗星细胞百分率 (%)	
对照组	141	13	9.2	24.45 $\pm$ 1.60
石棉组	133	84	63.2*	51.17 $\pm$ 1.40*
Oncolyn 组	181	53	29.3*#	33.11 $\pm$ 1.30*#

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与石棉组比较, # $P < 0.05$

2.2 血液中 NO、NOS、MDA 的水平以及抗氧化酶活性的变化

由表 2 可见, 实验大鼠接触温石棉后, 血液中 NO、NOS 的水平以及 SOD、GSH-Px、CAT 活性均增加, 而 G-ST 的活性下降。与石棉组比较, Oncolyn 组 NO、NOS 的水平以及 SOD 活性下降, 而 GSH-Px、ST、G-CAT 活性上升。但与对照组相比, 抗氧化酶的活性增加。

回收率大于 90%。检测肺泡灌洗液中 NO 含量。同时取大鼠肺组织用蒸馏水制成 10% 的组织匀浆, 2 000 r/min 离心后, 取上清液检测上述指标, 结果见表 3。

后, SOD、GSH-Px 和 G-ST 活性增加, 但均未达到对照的水平; MDA 含量下降, 与对照组水平相近。但对 NO、NOS 变化影响不大。

3 讨论

本研究的结果表明,大鼠接触温石棉后可以导致肺泡巨噬细胞 DNA 损伤,表现为彗星细胞出现率、DNA 迁移长度的增加。有研究表明石棉可以诱导8-羟基脱氧鸟嘌呤的产生,引起多种细胞如 HEL 细胞、V79 细胞的 DNA 链断裂^[4];另外石棉可能直接作用于 DNA,引起 DNA 损伤^[5]。这些石棉引起的 DNA 损伤和石棉诱导产生的过量自由基有关^[6]。本研究结果还显示,石棉组大鼠血液中 NO 和 NOS 水平增加, G-ST 活性下降,与文献报道一致;但 SOD、GSH-Px 活性呈增加的趋势,这可能是本实验中大鼠接触石棉的量少,在低剂量的石棉刺激下机体的应激反应所致。而肺组织中 NO、NOS、SOD、GSH-Px 和 G-ST 的活性均下降,MDA 含量增加,这与接触石棉的作业工人的趋势一致^[7];但肺组织和血液中的变化趋势不十分一致,可能是石棉首先和肺组织作用,消耗了抗氧化酶,破坏了肺组织的自我防御系统。应用 Oncolyn 预防后,肺泡巨噬细胞 DNA 损伤下降;血液中 NO、NOS 的水平以及 SOD 活性下降,而 GSH-Px、G-ST、CAT 活性上升;肺组织中抗氧化酶活性增加,MDA 含量下降。抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 在保护细胞免受或减轻活性氧损伤过程中起着重要作用。

Oncolyn 是从大豆和茶叶等植物中提取的天然活性物质,其中含有黄酮、多酚类物质及花色素和皂角苷等其他天然植物成分,可以直接清除 O₂。在临床上应用于乳腺癌、前列腺癌等的辅助治疗。实验研究结果表明它能预防石英和温石棉对肺泡巨噬细胞的损伤^[8,9]。本研究表明 Oncolyn 可以降低温石棉引起的

实验大鼠 AM、DNA 断裂,提高抗氧化酶 SOD 及 GSH-Px 的活性。提示在接触温石棉的工人中给予抗氧化物质如 Oncolyn,对温石棉引起的氧化损伤有一定的预防作用。

参考文献:

- [1] Mossman BT, Bignon J, Com M, et al. Asbestos: scientific developments and implications for public policy [J]. Science, 1990 247: 294-301.
- [2] Kamp DW, Graceffa P, Prior WA, et al. The role of free radicals in asbestos induced disease [J]. Free Radic Biol Med, 1992, 12 (4): 293-315.
- [3] 王起恩,樊晶光,张侠,等.吸烟与温石棉单独及联合作用对人胚肺细胞 DNA 链断裂的影响 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1998 16: 273-276.
- [4] 刘灵奕,刘玉清,王国钦.彗星试验检测石棉对 V (79) 细胞 DNA 损伤的研究 [J]. 卫生毒理学杂志, 2002 16 (1): 14-17.
- [5] Wang NS, Jaurand MC, Magne L, et al. The interaction between asbestos fibers and metaphase chromosomes of rats pleural mesothelial cells in culture [J]. Am J Pathol, 1987 126: 343-349.
- [6] Janssen Y M, Marsh JP, Absher M P, et al. Expression of antioxidant enzymes in rat lung after inhalation of asbestos or silica [J]. J Biol Chem, 1992, 267 (15): 10623-10630.
- [7] 尹衍玲,王起恩,阎蕾,等.石棉作业对工人血浆中谷胱甘肽 S 转移酶活性的影响 [J]. 中华预防医学杂志, 2002 36 (5): 320-322.
- [8] 刘英莉,张艳淑,Arthur H. K. DJang,等. Oncolyn 对石英粉尘致肺泡巨噬细胞某些生化指标的缓解作用 [J]. 中国职业医学, 2003 30 (2): 30-31.
- [9] 张艳淑,姚林,Arthur H. K. DJang,等. Oncolyn 对温石棉所致肺泡巨噬细胞氧化损伤的缓解作用 [J]. 中国工业医学杂志, 2004 17 (1): 16-17.

·病例报道·

沥青致足跟部恶性黑色素瘤 1 例报告

Malignant melanoma on heel caused by tar—A case report

鲍艳¹, 王法一¹, 贺卫东²

BAO Yan¹, WANG Fa-yi¹, HE Wei-dong²

(1. 营口市卫生监督所, 辽宁 营口 115000; 2. 中国医科大学第一临床医院皮肤科, 辽宁 沈阳 110001)

患者,女,34岁,沥青拌合工,既往健康,双足无色素、色痣及皮损。3年前右足跟踩沥青后,未刮干净,一周后用汽油擦洗时,发现右足跟部一指甲大小的皮肤变黑,后逐渐增大至钱币大小,该皮损处长时间行走后,有疼痛感,并有糜烂、渗出,用抗菌素后好转。曾在厂卫生所“削切”表面,

术后皮损扩大。查体: T 36.4℃, P 84次/min, BP 120/75 mmHg (16/10 kPa), 心肺腹未见异常, 双侧腹股沟处可触及一豆粒大淋巴结, 右侧较硬, 活动度尚可。皮肤科检查: 右足跟部见一 3cm×2.5cm×2cm 大的黑色斑块肿物, 轻度浸润, 边界清楚, 不规则, 略高出皮面, 上有 2 处点状破溃, 少许渗液。组织病理: 角层内见成块的色素颗粒, 棘层明显增厚, 在棘层内可见成巢样的不典型黑素细胞, 细胞异型明显, 真皮中上层见成团及散在的不典型黑素细胞, 部分呈上皮样, 部分呈痣的细胞样, 真皮中下层及皮下未见。实验室检查: Hb 113g/L, WBC 9.8×10⁹/L, S 0.8, L 0.2; 尿蛋白(±); 肝功能正常; 肝胆脾 B 超未见异常, 胸片正常。

讨论 恶性黑色素瘤是皮肤科恶性肿瘤中恶性程度较高的一种, 且易发生血行及淋巴结转移, 预后不良, 死亡率高。目前在我国发病率呈上升趋势, 所以对恶性黑色素瘤的早期发现、诊断是十分必要的, 并对其诱发因素也应加强认识。