

个时点的横断面调查,不能明确外周血淋巴细胞中 Hsp70 的动态变化,可能由于接触噪声时间的延长,导致细胞膜的通透性发生改变,淋巴细胞中的 Hsp70 逸出细胞膜进入外周血;或长期噪声刺激影响了 Hsps 的上游调控因子 hsf1 的活化和结合能力,使机体合成减少,从而导致淋巴细胞中的 Hsp70 表达水平随 CNE 的增加而下降。

本研究的结果还表明职业性噪声暴露工人外周血淋巴细胞 Hsp70 与 Hsp60 表达水平之间存在着显著正相关,而外周血淋巴细胞 Hsp60 的表达水平与累积噪声暴露量之间并无显著相关性。这一结果提示机体累积的噪声负荷并不能直接影响外周血淋巴细胞 Hsp60 的表达水平。蛋白表达调控是一个复杂的过程,当 Hsps 的上游调控因子 hsf1 活化和结合能力在长期的噪声刺激影响下发生变化时,可能会对 Hsp60 的合成也产生影响,从而使 Hsp60 和 Hsp70 的表达水平同时下降而表现出一定的相关性。

此外,我们并未发现外周血淋巴细胞 Hsp60 和 Hsp70 的表达水平在高频段或低频段噪声性听力损失中的显著性作用,提示二者可能并未与高频段或低频段噪声性听力损失的发生直接相关。噪声性听力损失的发生是受多因素影响的复杂过程,外周血淋巴细胞中的 Hsp70 和 Hsp60 随噪声刺激的动态变化规律和机制及其在噪声性听力损失发生过程中的可能作用仍有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] Morimoto R I, Tissières A, Georgopoulos C. Progress and perspectives on the biology of heat shock proteins and molecular chaperones [A]. In: Morimoto R I. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones

[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor NY, 1994: 1-30.

- [2] Yang M, Zheng J, Yang Q, et al. Frequency-specific association of antibodies against heat shock protein 60 and 70 with noise-induced hearing loss in Chinese workers [J]. Cell Stress Chaperones, 2004, 9: 207-213.
- [3] Fairfield D A, Kanicki A C, Lomax M I, et al. Expression and localization of heat shock factor (Hsf) 1 in the rodent cochlea [J]. Hear Res, 2002, 173: 109-118.
- [4] Faust F, Kassie Knasmüller S, et al. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies [J]. Mut Res, 2004, 566: 209-229.
- [5] Talbott E O, Gibson L B, Burks A, et al. Evidence for a dose-response relationship between occupational noise and blood pressure [J]. Arch Environ Health, 1999, 54: 71-78.
- [6] Morimoto R I, Tissières A, Georgopoulos C. Heat shock proteins and stress tolerance [A]. In: Morimoto R I. The biology of heat shock proteins and molecular chaperones [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor NY, 1994: 457-494.
- [7] Lindquist S. The heat shock responses [J]. Ann Rev Biochem, 1986, 55: 1151-1191.
- [8] Lindquist S, Craig E A. The heat-shock protein [J]. Ann Rev Genet, 1988, 22: 631-677.
- [9] Gething M J. Protein folding in the cell [J]. Nature, 1992, 355: 33-45.
- [10] Hightower L E. Heat shock, stress proteins, chaperones, and proteotoxicity [J]. Cell, 1991, 66: 191-197.
- [11] Bocharov A V, Vishnyakova T G, Baranova I N, et al. Heat shock protein 60 is a high-affinity high-density lipoprotein binding protein [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 277: 228-235.

正己烷致大鼠过氧化损伤及肝细胞凋亡的实验研究

齐宝宁, 唐国慧, 易建华, 郭剑锋, 苗江丽

(西安交通大学医学院劳动卫生与环境卫生教研室, 陕西 西安 710061)

摘要:目的 研究正己烷 (*n*-hexane) 对大鼠的脂质过氧化损伤和肝细胞凋亡的影响。方法 40 只雄性 SD 大鼠随机分成 5 组, 即阴性对照组、染毒组 (75、150、300 mg/kg) 和阳性对照组 (环磷酰胺), 每组 8 只。经腹腔注射染毒 4 周后, 检测肝组织匀浆超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活力, 血清还原型谷胱甘肽 (GSH) 和丙二醛 (MDA) 含量; 用流式细胞仪检测肝细胞凋亡情况。结果 随着染毒剂量的增加, 肝组织匀浆中 SOD、GSH-Px 活力、血清 GSH 含量降低, 而血清 MDA 含量增大, 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 流式细胞仪检测结果显示, 肝细胞凋亡率 (AV^+/PI^-) 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 与染毒剂量作相关分析, 相关系数为 0.913, 无明显的相关性 ($P > 0.05$)。结论 正己烷可引起或增强机体氧自由基反应, 导致脂质过氧化损伤, 引起肝细胞凋亡和坏死。

关键词: 正己烷; 脂质过氧化; 细胞凋亡; 大鼠

中图分类号: O623.11 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2007)03-0177-03

Experimental study on the effect of *n*-hexane on lipid peroxidation damage and hepatic cell apoptosis in rats

QI Bao-ning, TANG Guo-hui, YI Jian-hua, GUO Jian-feng, MIAO Jiang-li

(Department of Occupational and Environmental Health, Medical School, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

收稿日期: 2006-06-06; 修回日期: 2006-08-02

作者简介: 齐宝宁 (1980-), 男, 硕士研究生, 研究方向: DNA 断裂的生物标记物, 现工作单位: 陕西中医学院公共卫生系 (陕西咸阳 712046)。

Abstract Objective To study the effect of *n*-hexane on lipid peroxidation damage and hepatic cell apoptosis in rats. **Method** 40 SD male rats were randomly divided into 5 groups, namely negative control group, 75 mg/kg *n*-hexane group, 150 mg/kg *n*-hexane group, 300 mg/kg *n*-hexane group and positive control group (cyclophosphamide), 8 rats for each group. Administrations had been given by intraperitoneal injection for four weeks, then the activities of GSH-Px and SOD in hepatic homogenate and the levels of GSH and MDA in serum, apoptosis rate of the hepatic cell were detected, respectively. **Result** The results showed that with the increasing of *n*-hexane dosage, the activities of GSH-Px and SOD in hepatic homogenate and the concentration level of GSH in serum were reduced, while the serum MDA level was increased, there were statistic significances among the groups ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The detection of hepatocytic apoptosis rate by FCM showed that there were also some differences existed among the groups, but no correlation between dosage and apoptosis rate was found ($r = 0.913$, $P > 0.05$). **Conclusion** *n*-Hexane could induce or enhance the lipid peroxidation damage, hepatocytic apoptosis or necrosis in rats.

Key words: *n*-Hexane; Lipid peroxidation damage; Apoptosis; Rat

正己烷 (*n*-hexane) 属于直链饱和脂肪烃类, 化学式为 C_6H_{14} , 分子式为 $CH_3(CH_2)_4CH_3$, 相对分子质量 86.18; 无色、常温下为微有异臭的液体, 几乎不溶于水, 易溶于氯仿、乙醚、乙醇^[1]。正己烷急性毒性分类虽属低毒类^[2], 但因其高挥发性、高脂溶性, 且有蓄积作用和神经系统的毒作用, 故被认为是高危害性毒物^[3]; 肝脏是正己烷生物代谢的主要场所, 也是反映脂质过氧化较为敏感的器官。

有文献表明, 体内代谢或外源性因素产生的活性氧类 (reactive oxygen species, ROS) 和 O_2^- , H_2O_2 , $^{\circ}OH$ 脂质过氧化等被证实是引起多种细胞凋亡的诱因^[4]。有人对大鼠静式急性吸入染毒, 测定了MDA、GSH、SOD和GSH-Px等体现脂质过氧化损伤的特异性指标, 结果表明, 正己烷的急性吸入导致机体氧化还原系统的变化, 削弱了机体消除自由基的能力, 发生了脂质过氧化损伤^[5]。本实验用不同剂量的正己烷染毒大鼠, 对其脂质过氧化和细胞凋亡进行检测, 旨在观察正己烷对大鼠的脂质过氧化损伤及其对细胞凋亡的影响。

1 材料与与方法

1.1 主要试剂和仪器

正己烷 (国产分析纯), 环磷酰胺 (上海华联制药有限公司), 戊巴比妥钠 (Sigma公司, 美国), 超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、丙二醛 (MDA) 和还原型谷胱甘肽 (GSH) 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, Annexin V 测细胞凋亡试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司, DY89-II 型电动玻璃组织匀浆器, LD4-2 水平离心机和 FACS-Calibur 型流式细胞仪。

1.2 实验动物分组及染毒

健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 40 只, 体重 180~220 g, 由西安交通大学医学院实验动物中心提供。将大鼠随机分为 5 组, 即阴性对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组和阳性对照组 (环磷酰胺), 每组 8 只, 采用腹腔注射染毒^[6]。阴性对照组仅用注射针刺刺腹腔, 不注射任何试剂, 低、中、高暴露组正己烷染毒剂量分别为 75 mg/kg、150 mg/kg、300 mg/kg, 阳性对照组为 50 mg/kg 环磷酰胺, 每日上午染毒 1 次, 每周 5 d 连续 4 周。染毒过程中所有大鼠均自由饮水、进食。

1.3 脂质过氧化及抗氧化指标测定

1.3.1 血清脂质过氧化指标的测定 染毒结束后, 用 2% 戊

巴比妥钠麻醉大鼠, 腹部开 U 型口, 暴露心脏, 从心尖抽取 5 ml 全血, 置于试管中, 37℃ 水浴 2 h, 离心 (3 000 r/min, 10 min), 分离血清检测 GSH 和 MDA 含量。MDA 含量测定按硫代巴比妥酸 (TBA) 比色法, GSH 含量测定按 Haffeman 微量法。

1.3.2 组织匀浆抗氧化酶活力测定 立即取新鲜肝脏组织块 (0.2~1 g), 除去血液, 滤纸拭干, 称重, 加入 9 倍重量的冷生理盐水, 用组织匀浆机制成 10% 匀浆液, 检测 SOD 和 GSH-Px 活力。SOD 活力测定按邻苯三酚自氧化法, GSH-Px 活力测定按二硫代二硝基苯甲酸 (DTNB) 直接法。

1.4 肝细胞凋亡检测

1.4.1 肝细胞悬液制备 剪一小块肝脏 (5 mm×5 mm) 装于盛有冷 PBS 小烧杯中, 洗去血液, 然后加入 RPMI 1640 培养液, 用眼科剪将肝脏剪碎, 静置, 吸弃上清, 加入 5~6 倍 0.25% 胰酶, 37℃ 消化 15 min, 每隔 5 min 振荡一次; 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液终止消化, 200 目网过滤, 4℃ 离心 (50 g, 3 min), 弃上清; 用 RPMI 1640 培养液洗涤 2 次 (2 000 r/min, 5 min), 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液 (约 4 ml) 重新悬细胞, 经台盼蓝染色检测细胞活力, 并调整细胞浓度为 1×10^6 。

1.4.2 凋亡检测方法 取上述制备好的肝细胞悬液 1 ml, 1 000 r/min 4℃ 离心 10 min, 弃上清; 加入 1 ml 冷的 PBS, 轻轻震荡使细胞悬浮; 1 000 r/min, 4℃ 离心 10 min, 弃上清; 重复洗涤 2 次; 将细胞重悬于 200 μ l Binding Buffer; 加入 10 μ l Annexin V-FITC 和 5 μ l PI, 轻轻混匀, 避光室温反应 15 min 或 4℃ 反应 30 min, 加入 300 μ l Binding Buffer, 在 1 h 内用 FACS-Calibur 型流式细胞仪检测。

1.5 统计分析

测定值以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 并采用 SPSS11.5 软件对数据进行分析, 多组均数之间的比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 两组之间的多重比较分别采用 Dunnett-*t* 检验和 SNK-*q* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 正己烷对大鼠血清 MDA 和 GSH 含量的影响

血清中 MDA 含量随染毒剂量增加而增大, GSH 含量则随染毒剂量增加而减少, 作方差分析, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 各实验组与阴性对照组作 Dunnett-*t* 检验, 中、高

剂量组与阴性对照组之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 实验组之间再作 SNK- q 检验, 低剂量组和高剂量组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组大鼠血清中 MDA、GSH 含量变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	MDA (nmol/mg Hb)	GSH (mg/g Hb)
阴性对照组	8	5 266.4 ± 0.628 46	572.926 4 ± 15.726 37
低剂量组	8	5 655.7 ± 0.361 29 [#]	549.882 8 ± 21.422 87 [#]
中剂量组	8	7 069.7 ± 0.376 26 [*]	462.226 9 ± 21.093 61 [*]
高剂量组	8	10 450.8 ± 0.731 83 [*]	429.920 7 ± 29.356 84 [*]

与对照组比较, * $P < 0.05$; 与高剂量组比较, # $P < 0.05$

2.2 正己烷对大鼠肝组织匀浆 SOD 和 GSH-Px 活力的影响

肝组织匀浆中 GSH-Px、SOD 活力随染毒剂量增加而减小, 作方差分析, 组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 各实验组与阴性对照组作 Dunnett- t 检验, 高剂量组与对照组之间差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 实验组之间再作 SNK- q 检验, 低剂量组和高剂量组差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 各剂量组大鼠肝组织匀浆 GSH-Px、SOD 活力 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	GSH-Px (U/mg Pro)	SOD (U/mg Pro)
阴性对照组	8	55 901.98 ± 7.169 33	142.676 9 ± 10.724 81
低剂量组	8	52 601.16 ± 6.291 216 [#]	131.510 1 ± 9.905 311 [#]
中剂量组	8	43 139.78 ± 5.009 716	110.148 6 ± 14.236 36
高剂量组	8	39 993.57 ± 4.248 912 [*]	82.205 18 ± 10.167 08 [*]

与对照组比较, * $P < 0.01$; 与高剂量组比较, # $P < 0.05$

2.3 正己烷对肝细胞凋亡的影响

各组间肝细胞凋亡率 (AV^+/PI^-) 作方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 各实验组与阴性对照组作 Dunnett- t 检验, 低、中、高剂量组和阳性对照组差异均有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组肝细胞坏死 (AV^+/PI^+) 作方差分析, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 各实验组与对照作 Dunnett- t 检验, 高剂量组、阳性对照组与阴性对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 见表 3。

表 3 流式细胞仪检测各组肝细胞凋亡和坏死百分比 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	AV^+/PI^-	AV^+/PI^+	AV^-/PI^-
阴性对照组	8	2.34 ± 0.07	4.33 ± 0.68	91.73 ± 1.73
低剂量组	8	11.97 ± 0.72 [*]	5.42 ± 0.81	77.78 ± 3.56
中剂量组	8	13.12 ± 1.53 [*]	6.63 ± 0.94	78.85 ± 8.43
高剂量组	8	17.62 ± 1.45 ^{**}	8.73 ± 0.27 [*]	72.36 ± 6.41
阳性对照组	8	30.13 ± 6.03 ^{**}	18.67 ± 1.32 ^{**}	48.36 ± 3.55

与对照组比较, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

2.4 大鼠肝细胞凋亡结果相关分析

以染毒剂量为横坐标, 肝细胞凋亡率为纵坐标作散点图, 观察随正己烷染毒剂量的增加对大鼠肝细胞凋亡的剂量-效应关系。相关分析, $r = 0.913$, 无明显的相关性 ($P > 0.05$)。

3 讨论

正常生理条件下, 体内的酶系和非酶系抗氧化体系能迅速将机体内产生的少量自由基 (free radical, FR) 转化或清除, 保持体内的稳定状态, 不致产生危害。许多内外因素可削弱机体抗氧化系统清除自由基的能力, 使体内自由基水平升高, 导致自由基代谢出现失衡, 过多的氧自由基能攻击生

物膜中的多不饱和脂肪酸 (polyunsaturated fatty, PUFA), 引发脂质过氧化作用, 引起一系列的损伤。SOD 和 GSH-Px 是体内两种十分重要的抗氧化酶, 是机体抗氧化防御系统的重要成员。GSH 是细胞中最重要的非酶性小分子抗氧化剂之一, MDA 是自由基攻击生物膜中的多不饱和脂肪酸而引发的脂质过氧化作用的最终分解产物, 其含量水平可反映机体内细胞脂质过氧化的程度。本次实验结果表明, 各正己烷染毒组与对照组相比较, 抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 活性降低, GSH 含量减少, MDA 含量增加, 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 且随着染毒剂量的增加, 呈现一定的剂量-反应关系, 与文献报道一致^[5], 进一步证实了正己烷的脂质过氧化作用。

近年来, 流式细胞分析术 (flow cytometry, FCM) 成为一种新的检测细胞凋亡的技术, 可以从多方面证实凋亡和坏死的区别, 同时还可以检测同一群体不同亚群细胞中的凋亡细胞并可对其进行分选。本次实验采用 AV/PI 双染分析, 结果显示阴性对照组以活细胞为主 (91.73 ± 1.73)%, 仅有少量的凋亡细胞数 (2.34 ± 0.07)% 和坏死细胞数 (4.33 ± 0.68)%。正己烷染毒各组和阳性对照组的凋亡细胞与坏死细胞的比例均高于阴性对照组。低剂量时, 主要引起细胞凋亡, 高剂量进一步引起细胞坏死, 随着染毒剂量的增大, 凋亡细胞和坏死细胞的比例增加。做相关分析, 无明显相关性 ($P > 0.05$)。提示正己烷对大鼠肝脏的损伤作用可能会引起肝细胞凋亡和坏死。

细胞凋亡的机制已有多种假说, 自由基损伤学说是比较重要的假说之一^[7]。氧化应激是导致化学的或代谢来源的活性氧 (ROS) 产生的一种细胞内或外的状态, 过量的 ROS 如 $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , $\cdot OH$, 脂质过氧化物等具有不同程度的细胞毒性, 并可导致瞬时的不可逆的细胞损伤^[8]。本实验结果表明正己烷对肝细胞的凋亡可能与其对肝脏细胞膜损伤引起脂质过氧化作用、削弱机体消除自由基的能力和降低机体抗氧化能力有关, 但具体损伤机制及其相关关系, 还需进一步的研究。

参考文献:

- [1] 金泰虞. 职业卫生与职业医学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2004: 212-213.
- [2] 夏元洵. 化学物质毒性全书 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1991: 223-224.
- [3] 任道凤. 正己烷的毒理学进展 [J]. 国外医学卫生学分册, 1985, 4: 211-214.
- [4] Basnakan A G, Kaushal G P, Shah S V. Apoptotic pathways of oxidative damage to renal tubular epithelial cells [J]. Antioxid Redox Signal, 2002, 4: 915-924.
- [5] 沈齐英, 刘录. 正己烷致大鼠脂质过氧化损伤的研究 [J]. 环境与健康杂志, 2001, 18 (2): 86-88.
- [6] Masotto S, Gabrielska K. Effects of acute *n*-hexane and 2,5-hexane treatment on the striatal dopaminergic system in mice [J]. J Neural Transm Suppl, 1995, 45: 281-285.
- [7] 于佳明, 徐兆发, 王家骏, 等. 谷胱甘肽对汞致肾细胞凋亡影响的实验研究 [J]. 工业卫生与职业病, 2005, 31 (5): 294-296.
- [8] Petrik J, Zanic-Gubisic T, Barisic K, et al. Apoptosis and oxidative stress induced by ochratoxin A in rat kidney [J]. Arch Toxicol, 2003, 77: 685-693.