

3 200 mg/ kg 剂量组动物开始出现中毒症状, 表现为饮食活动减少, 被毛蓬松、口鼻分泌物增多、眼球突出充血, 体重增长缓慢, 体重与对照组相比明显降低 ($P<0.05$)。12 周后 800 mg/ kg 剂量组动物亦出现类似的中毒症状, 但动物体重与对照组相比无显著变化。

2.2 血液生化指标检查

给药 90 d 后, 3 200 mg/ kg 剂量组大鼠血清 ALT、AST 及 ALP 活性含量均出现明显增高 ($P<0.05$); 800 mg/ kg 剂量组

大鼠上述指标亦高于对照组, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见表 1。

2.3 脏器质量系数及脏器的病理组织学检查

脏器质量系数统计结果显示, 3 200mg/ kg 剂量组雌、雄性大鼠肝脏质量与脏器质量系数明显高于对照组 ($P<0.05$)。800 mg/ kg 剂量组大鼠肝脏质量亦高于对照组, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。200 mg/ kg 剂量组大鼠与对照组相比无显著变化。结果见表 2。

表 1 杀铃脲原药对大鼠血中 ALT、AST 及 ALP 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$) U/ L

浓度 (mg/kg)	n	ALT		AST		ALP	
		雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
0	10	42.87±4.75	39.19±7.47	101.26±9.28	141.55±16.09	251.28±48.92	269.27±56.01
200	10	43.14±5.59	40.29±6.07	104.72±9.31	143.85±13.47	262.75±38.42	286.29±37.77
800	10	43.25±4.64	42.66±8.27	118.57±10.86	148.53±10.09	335.17±58.69	294.61±35.93
3 200	10	48.78±4.09 *	50.87±5.64 *	129.04±11.51 *	173.82±13.02 *	348.37±62.71 *	348.13±64.28 *

与对照组比较, * $P<0.05$ 表 2 同。

表 2 杀铃脲原药对大鼠肝脏质量及脏器质量系数的影响 ($\bar{x}\pm s$)

浓度 (mg/kg)	n	90 d 动物体重 (g)		肝脏质量 (g)		肝脏系数	
		雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
0	10	446.90±19.09	319.20±16.91	14.09±0.92	11.42±1.81	3.28±0.16	3.70±0.52
200	10	453.20±43.74	317.50±15.81	14.52±1.23	11.44±1.51	3.42±0.34	3.73±0.54
800	10	429.80±10.49	313.70±7.54	14.89±0.70	11.88±1.11	3.57±0.21	3.89±0.35
3 200	10	413.00±27.16 *	303.20±10.83 *	15.03±0.76 *	12.77±0.56 *	4.08±0.56 *	4.51±0.37 *

2.4 病理组织学检查

高剂量组雌雄性动物肝脏出现单个肝细胞坏死, 肝小叶中心部有胆色素沉着, 肝细胞内可见嗜酸性小体。其他剂量组动物未见明显异常。

3 讨论

杀铃脲原药是一种广谱低毒低残留新型杀虫剂, 大鼠急性经口服 LD₅₀ 为 5 000 mg/ kg, 按照我国农药急性毒性分级标准, 杀铃脲原药属低毒类农药^[1]。研究发现, 染毒 13 周后, 3 200 mg/ kg 剂量组动物开始出现中毒症状, 体重与对照组相

比明显降低, 血清 ALT、AST 及 ALP 活性均出现明显增高, 肝脏质量与脏器质量系数明显高于对照组; 肝脏病理组织学检查亦有一定的改变。800 mg/ kg 剂量组动物有较轻的临床中毒症状, 200 mg/ kg 剂量组动物与对照组比较无明显差异。在实际生活中人们虽很难接触如此高浓度的农药, 但由于种属差异问题, 该药对人类健康是否安全仍需深入探讨。

参考文献:

[1] GB 15670—1995. 农药登记毒理学试验方法 [S] .

煤焦油对 NIH/3T3 细胞的毒性作用

Experimental study on the toxic effect of coal tar on NIH/3T3 cells

王军, 吴永会

WANG Jun, WU Yong-hui

(哈尔滨医科大学公共卫生学院, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要: 以某炼焦厂煤焦油为受试物, 采用噻唑蓝 (MTT) 比色法检测 NIH/ 3T3 细胞活性。结果不同浓度下的煤焦油作用一定时间后, NIH/ 3T3 细胞存活率下降, 随着浓度的增加和

作用时间的延长, 这种抑制作用也愈加明显, 同时细胞在形态学上也出现一系列的改变。接触受试物 24 h, 细胞生长半数抑制浓度 IC₅₀ 为 58.2 μg/ L。同时镜下观察细胞形态也发生了改变。提示煤焦油可以抑制 NIH/ 3T3 细胞生长, 降低其线粒体代谢活性。

关键词: 噻唑蓝比色测定法; NIH/ 3T3 细胞; 毒性作用

中图分类号: O625.15 **文献标识码:** B

文章编号: 1002—221X(2007)03—0187—02

收稿日期: 2006—10—13; 修回日期: 2007—01—23
基金项目: 黑龙江省卫生厅资助项目 (项目编号: 2005-96); 哈尔滨医科大学医学基础学科青年科学基金资助项目 (项目编号: 060005)
作者简介: 王军 (1978—), 女, 在读硕士, 助教, 从事劳动卫生与职业病学研究。

煤焦油的成分较复杂,对人体有一定的危害,煤焦油及其分馏产品不仅可以引起痤疮、毛囊炎、光毒性皮炎等,而且可以引起皮肤疣赘甚至恶化为皮肤癌^[1]。研究表明,煤焦油挥发物在外源代谢系统存在条件下,对鼠伤寒沙门氏菌具有致突变性^[2]。本研究以 NIH/3T3 细胞为受试对象,采用噻唑蓝(MTT)比色法,检测煤焦油对 NIH/3T3 细胞的毒性作用。

1 材料与方法

1.1 材料

NIH/3T3 (由北京交通大学生命科学部提供),接种于含 10% RPMI1640 培养液中,在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养,0.02% EDTA 消化,传代,备用。将煤焦油(采自某炼焦厂)配成浓度为 0.12 g/ml 的溶液 100 ml,4℃ 保存,备用。试剂:MTT (上海华舜生物工程有限公司),DMSO (Sigma 公司产品),小牛血清 (Gibco 公司产品),RPMI1640 培养粉 (天象人生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞制备 取指数生长期细胞消化后,用培养液吹打成单细胞悬液,调整细胞密度至 5.0×10⁶/ml,接种到 96 孔板中,每孔 2.0 μl;培养 24 h 后,加入不同浓度的受试物,使其成为终浓度分别为 0.6、3.0、15.0、75.0、375.0 μg/L,同时设空白对照组。阴性对照组中加入等体积 DMSO,分别培养 6 h、8 h、12 h、18 h 和 24 h。

1.2.2 MTT 配制 取 5mg MTT 溶于 1ml pH 7.2 的 PBS 液中,

表 1 不同浓度的煤焦油不同作用时间对 NIH/3T3 细胞增殖的影响(吸光度值, $\bar{x} \pm s$, n=8)

浓度 (μg/L 培养液)	作用时间 (h)				
	6	8	12	18	24
0.0	0.156±0.019	0.124±0.071	0.178±0.124	0.145±0.034	0.206±0.008
0.6	0.173±0.006	0.173±0.034	0.116±0.021	0.111±0.018	0.141±0.055
3.0	0.186±0.017	0.149±0.017	0.100±0.055	0.113±0.022	0.147±0.023
15.0	0.158±0.039	0.121±0.008	0.100±0.005	0.086±0.014 **	0.109±0.076 *
75.0	0.126±0.020	0.115±0.052	0.088±0.015	0.070±0.005 **	0.099±0.024 **
375.0	0.083±0.005 **	0.070±0.021	0.070±0.005 *	0.047±0.019 **	0.074±0.021 **

与对照组比, *P<0.05 **P<0.01, 表 2 同。

表 2 不同浓度的煤焦油不同作用时间对 NIH/3T3 细胞相对存活率的影响 %

浓度 (μg/L 培养液)	作用时间 (h)				
	6	8	12	18	24
0.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
0.6	111.0	139.0	65.1	76.7	68.2
3.0	119.0	121.0	56.3	77.9	71.0
15.0	101.0	97.5	56.1	58.9 **	52.7 *
75.0	80.5	92.3	49.4	48.4 **	48.1 **
375.0	53.3 **	56.4	39.4 *	32.5 **	35.6 **

3 讨论

本研究所用受试物采自我省较大的炼焦生产厂家,研究煤焦油对体外培养细胞的毒性作用,可为进一步探讨煤焦油的生物学效应提供科学依据。在本实验中,所设浓度对 NIH/3T3 细胞的生长均有不同程度的抑制作用,随着浓度的增加和作用时间的延长,这种抑制作用也愈加明显。同时细胞在形

用不含小牛血清培养液以 1:10 (V:V) 稀释,过滤除菌, -20℃ 冻存。

1.2.3 MTT 实验 于各作用时间结束前 4 h 加入 MTT 50 μL,吸去上清液,每孔加 150 μL DMSO,振荡 5 min,用酶标仪测定在 550 nm 波长下各孔吸光度 (A) 值。下式可间接表示细胞相对存活率^[3], 细胞相对存活率 (%) = (实验组吸光度值/阴性对照组吸光度值) × 100%^[4], 并计算细胞生长半数抑制浓度 (IC₅₀)^[5]。

1.3 统计分析

全部数据用 SPSS10.0 软件进行统计学分析,使用方差分析进行组间比较。

2 结果

倒置显微镜下观察,空白对照组细胞呈梭形或不规则三角形,胞质向外伸出长短不一的突起,贴壁生长,胞质清亮,胞浆和胞核清楚。不同浓度给药组细胞在 2 h 作用时间内,细胞形态与对照组相比无明显改变,随培养时间的延长,细胞逐渐出现胞体肿胀、变圆、结构不清,最终细胞悬浮而死亡。作用 24 h 时,375.0 μg/L 组细胞大部分死亡,仅存活少数正常形态的细胞,其 IC₅₀ 为 58.2 μg/L。煤焦油处理的 0.6、3.0、15.0、75.0、375.0 μg/L 组 24 h 细胞相对存活率分别为 68%、71%、53%、48%、36%。不同浓度的煤焦油不同作用时间对 NIH/3T3 细胞增殖的影响,见表 1。不同浓度的煤焦油不同作用时间对 NIH/3T3 细胞相对存活率的影响,见表 2。

态学上也出现一系列的改变,随培养时间的延长,细胞逐渐出现胞体肿胀、变圆、结构不清。本研究显示,煤焦油可对体外培养的 NIH/3T3 细胞产生毒性作用,并抑制细胞生长,降低线粒体代谢活性。

参考文献:

[1] 何凤生. 中华职业医学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999: 1057-1058.
[2] IARC. IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. 1987, 175-176.
[3] 吴静, 蒋颂辉, 陈约, 等. 水体有机物和蓝藻对 BALB/c3T3 细胞的毒性作用 [J]. 中国公共卫生, 2001, 17 (11): 1019-1021.
[4] 庞慧民, 高久春, 邢沈阳. 葛根对中国仓鼠肺细胞的毒性作用 [J]. 吉林大学学报, 2005, 31 (6): 903-905.
[5] 张正东, 金复生, 朱瑞娟, 等. 丙烯腈对中国仓鼠肺细胞活力和间隙连接通讯功能的影响 [J]. 中华预防医学杂志, 2001, 35 (3): 177-180.