

造成一定数量的精子中顶体反应率降低。本研究中精子顶体反应率的降低亦呈现浓度依赖性,而且在高浓度二氯苯胺作用下降低得非常明显,5 μg/ml与 10 μg/ml组间差异不明显,我们推测在精子发生顶体反应的过程中,有可能还有其他化学因素起到代偿作用,以降低外来化学物质的影响,保证精子顶体反应正常进行。但当外来化学物质超过一定浓度时,这种作用即会消失,顶体反应率则显著下降。

到目前为止,关于二氯苯胺导致精子顶体酶活性降低的机制和顶体反应率下降的根本原因还不清楚,这其中具体有哪些因素起了重要作用还需要进行更加深入的研究。

参考文献:

[1] Fishbein L. The handbook of environmental chemistry Vol 3 Part C. Anthropogenic compounds [M]. Berlin: Springer, 1984: 311
 [2] 周光召. 面向 21 世纪科技进步与社会经济发展 [M]. 北京:

中国科学技术出版社, 1999: 24-26
 [3] 中国环境科学研究院. 环境背景值和环境容量研究 [M]. 北京: 科学出版社, 1990: 129-133
 [4] 惠秀娟. 环境毒理学 [M]. 北京: 化学工业出版社, 科学与工程出版中心, 2003: 34-36
 [5] 肖春花, 王忠山, 左文静, 等. 精子顶体酶活性检测新方法 with 临床应用 [J]. 男性学杂志, 1994, 8 (4): 198-200
 [6] 许宗革, 刘睿智, 王忠山, 等. 精子顶体酶活性检测对诊断男性不孕症的价值 [J]. 吉林医学, 2004, 25 (6): 35-36
 [7] Lin De Y, Garrett C, Baker H W. Clinical application of sperm-oocyte interaction tests in vitro fertilization embryo transfer and intracytoplasmic sperm injection programs [J]. Fertil Steril 2004, 82 (5): 1251-1263
 [8] 张磊, 谢琪璇, 潘善培, 等. 人精子顶体反应 3 种检测方法的比较与评价 [J]. 中国男科学杂志, 2005, 11 (6): 419-425.

矽肺患者血液中转化生长因子 β₁ 表达水平的研究

马庆坤¹, 吴成秋²

(1. 唐山钢铁集团有限责任公司医院, 河北 唐山 063000 2 南华大学公共卫生研究所, 湖南 衡阳 421001)

摘要: 为探讨转化生长因子 β₁ (TGFβ₁) 与矽肺的关系, 采集 16 例矽肺患者和 15 例正常人的静脉血 8 ml 应用酶联免疫吸附法 (ELISA) 检测血液中 TGFβ₁ 的含量。提取外周血淋巴细胞中的总 RNA 以及血清中的总蛋白质, 分别用 RT-PCR 和 Western-blot 检测方法检验 TGFβ₁ 的 mRNA 和蛋白质表达水平。结果显示, 矽肺患者血清 TGFβ₁ 为 (203.14 ± 32.38) μg/ml 正常人血清 TGFβ₁ 为 (42.66 ± 15.50) μg/ml 两者差异有统计学意义 (t = 19.51, P < 0.01); 矽肺患者血液中 TGFβ₁ 水平明显高于正常人。TGFβ₁ 可作为矽肺患者的血清学检测指标。

关键词: 矽肺; 转化生长因子 β₁ (TGFβ₁); 表达水平

中图分类号: R135.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2008)02-0101-03

Research on the expression level of transforming growth factor β₁ in blood of silicosis patients

MA Qingkun, WU Chengqiu

(1. Affiliated Hospital of Tangshan Steel and Iron Company, Tangshan 063000, China; 2. Institute for Public Health, Nanhua University Hengyang 421001, China)

Abstract: To explore the relationship between TGFβ₁ and silicosis especially the possibility that TGFβ₁ expression level in blood to be a available clinical index for silicosis diagnosis 16 silicosis patients and 15 controls were selected as the objects of this study 8 ml blood were taken from those people for experimental detecting. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used for the detection of serum TGFβ₁ level the expression level of TGFβ₁ mRNA and TGFβ₁ protein in peripheral lymphocytes were detected by RT-PCR and Western blotting methods respectively. SPSS14.1 was applied for statistical analysis. The result showed that the serum expression level of TGFβ₁ of silicosis patients was (203.14 ± 32.38) μg/ml significantly higher than that of controls (42.66 ± 15.50) μg/ml (P < 0.01). The RT-PCR and Western blotting detecting results also showed that the lymphocytes TGFβ₁ mRNA expression level in silicosis patients was also obviously decreased compared with the controls. It indicated that serum TGFβ₁ level is closely related to silicosis suggests that it could be taken as a clinical index for the diagnosis of silicosis.

Key words: Silicosis; Transforming growth factor β₁ (TGFβ₁); Expression level

矽肺病是由于在职业场所长期吸入游离二氧化硅粉尘而导致的肺部弥漫性纤维化。矽肺的发生是否与遗传因素有关目前还不清楚。近年来,在职业病因研究方面,研究者们

试图寻找其遗传易感因素^[1,2]。为此,本文以转化生长因子-β₁ (transforming growth factor β₁, TGFβ₁) 为靶基因,探讨矽肺患者与正常对照人群血液中 TGFβ₁ 的表达差异。

1 材料与方法

1.1 对象

16 例确诊的慢性矽肺患者 (无其他疾患) 中 II 期矽肺 11

收稿日期: 2007-12-28

作者简介: 马庆坤 (1964-), 女, 副主任医师。

例、III期矽肺 5例, 均为男性, 年龄 (54.2 ± 5.7) 岁。对照人群为健康的机关工作人员, 男性, 年龄 (54.8 ± 6.1) 岁。

1.2 标本采集及处理

在同一时间和地点采集研究对象早晨空腹静脉血 8 ml, 将采集到的标本分为 2份, 1份 3 ml 参照文献 [3] 分离外周血淋巴细胞, 用于 RT-PCR 检测 TGFβ₁ mRNA 表达水平。1份 5 ml 室温下放置 30 min 然后 1 000 g 离心 15 min 参照文献 [4] 分离血清用于 ELISA 和 Western blot 检测 TGFβ₁ 蛋白质表达水平。分离的外周血淋巴细胞应尽快提取 RNA 并立即进行 RT-PCR 实验, 用于 ELISA 和 Western blot 检测的血清 -20 °C 冻存。

1.3 试剂

TGFβ₁ ELISA 试剂盒购自美国 ADL 公司, 反转录试剂盒购自 Promega 公司, 蛋白质抽提试剂盒购自 Novagen TRIZOL 购自 Invitrogen 鼠抗人 TGFβ₁ mAb 购自晶美公司, 各种 DNA 和蛋白质 Marker 均购自 Takara 引物合成由上海生工生物工程技术服务有限公司合成 实验中所用的引物设计如表 1。

表 1 检测 TGFβ₁ 基因所用引物

基因	上游引物	下游引物	长度 (bp)	基因库
TGFβ ₁	5'-TCAACACAT-CAGAGCTCCGA-3'	5'-CACGATCATG-TTGACAGCT-3'	730	NM-000660
β-actin	5'-CTATCCCTGT-ACGCCTCTGG-3'	5'-CACAGACTC-CATGCCAGG-3'	400	NM-001101

1.4 实验方法

1.4.1 ELISA 检测 用纯化的抗体包被微孔板, 制成固相抗体, 向包被单抗的微孔中依次加入 TGFβ₁ 抗原、生物素化的抗人 TGFβ₁ 抗体、HRP 标记的亲合素, 经过彻底洗涤后用底物 TMB 显色。用酶标仪在 450 nm 波长下测定吸光度 (OD 值), 计算样品浓度。根据标准品先绘制标准曲线, 再根据每

个样品的 OD 值计算 TGFβ₁ 值^[5]。

1.4.2 RT-PCR 检测 参照文献 [6] 抽提外周血淋巴细胞总 RNA RT-PCR 按照说明书进行操作。

1.4.3 Western blot 检测 蛋白质抽提和纯化按照说明书进行, Western blot 参照文献 [7] 进行, 本实验随机选择 5 个病例和 4 个对照。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 14.1 中的成组 检验, 设显著性检验水平 α = 0.05

2 结果

2.1 ELISA 检测结果

经 ELISA 检测, 血清 TGFβ₁ 矽肺患者为 (203.14 ± 32.38) μg/ml 正常人群为 (42.66 ± 15.50) μg/ml 两者差异有统计学意义 (t = 19.51 P = 0.00)。见图 1。

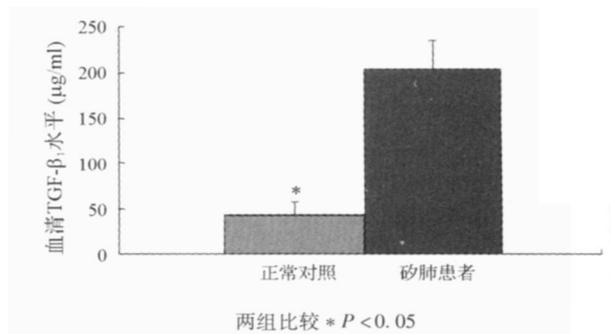
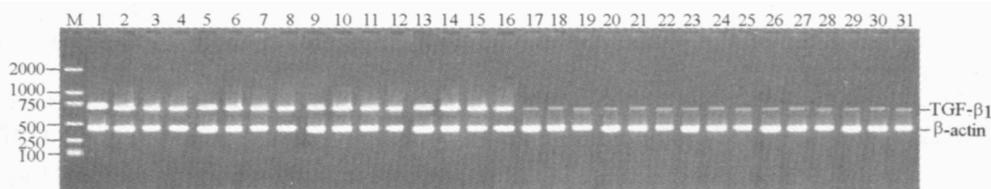


图 1 矽肺患者和正常人血清 TGFβ₁ ELISA 检测结果

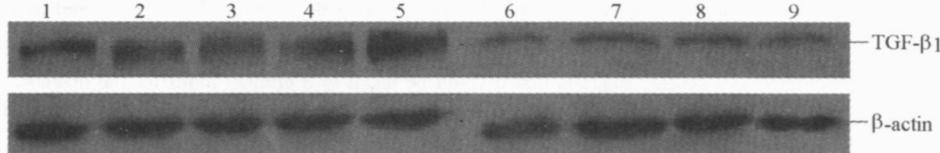
2.2 RT-PCR 与 Western blot 检测结果

以基因 β-actin 为对照, 应用 RT-PCR 与 Western blot 检测矽肺患者和正常人外周血淋巴细胞中 TGFβ₁ mRNA 和血清中 TGFβ₁ 蛋白水平, 可见矽肺患者 TGFβ₁ mRNA 表达水平明显高于正常对照组。见图 2、3。



M: Del 2000 Marker, 1~16: 矽肺, 17~31 正常人群

图 2 矽肺患者和正常人外周血淋巴细胞中 TGF-β₁ RT-PCR 检测结果



1~5: 矽肺, 6~9: 正常人群

图 3 矽肺患者和正常人外周血淋巴细胞中 TGF-β₁ Western-blot 检测结果

3 讨论

TGFβ 是一类功能复杂的细胞因子, 具有免疫调节、胚胎发育、细胞分化、细胞外基质 (ECM) 形成、血细胞及血管生成等多种作用^[8], 广泛参与哺乳动物的各种病理生理过程。目前 TGFβ

至少有 6 种亚型^[9], 在哺乳动物中只发现 3 种亚型 即 TGFβ₁、β₂、β₃, 人的 TGFβ₁ 的 ORF 含有 1 173 bp 编码 391 个氨基酸 是 TGFβ 的主要成分。

肺纤维化是一组由多种病因引起的肺破坏性疾病, 迄今

其发病机制尚未阐明,但一般认为早期肺部炎症及肺损伤、晚期 ECM的沉积是肺纤维化的必然发展过程^[10]。TGFβ可能通过下面几个途径导致肺纤维化。(1) TGFβ可以导致 ECM合成增加以及胶原纤维的沉积。Sime PJ等^[11]利用腺病毒载体将 TGFβ₁基因转染小鼠肺组织后发现肺纤维化,并且有大量 ECM沉积在肺部。(2) TGFβ不仅自身在肺炎发生和纤维化过程中具有重要作用,而且能诱导肺脏高水平表达结缔组织生长因子(connective tissue growth factor CTGF),而 CTGF已证实能导致肺纤维化^[12],二者一起加速肺纤维化的发生。(3) TGFβ受体活化。TGFβ有 3种受体,即 TβRI、TβRII、TβRIII,已有研究表明,TGFβ受体的活化可能介导 TGFβ促进 ECM合成与沉积效应^[13]。

本研究结果显示,矽肺患者血液中 TGFβ₁水平显著高于正常人群,说明矽肺患者与正常人群存在某些基因表达差异。然而,目前仍然没有充分的实验证实,TGFβ₁水平升高是发生在矽肺之前,还是发生在矽肺之后,因此,要证明 TGFβ₁是矽肺的易感基因还需要前瞻性的动物实验和分子流行病学研究证实。但是,本研究结果至少提示 TGFβ₁与矽肺密切相关,TGFβ₁可作为矽肺患者的血清学检测指标。

参考文献:

[1] Kleberger SR Peden D Gene environment interactions in asthma and other respiratory diseases [J]. Annu Rev Med 2005 56: 383-400.
 [2] Honski A Kazimirov A Baranckov M et al Genetic predisposition and health effect of occupational exposure to asbestos [J]. Neuro Endocrinol Lett 2006 27 (Suppl2): 100-103
 [3] Reinhold D Bank U Bihling F et al Transforming growth factor beta 1 inhibits interleukin-10 mRNA expression and production in pike-

weed mediated stimulated peripheral blood mononuclear cells and T cells [J]. J Interferon Cytokine Res 1995 15 (8): 685-690
 [4] Ghio M Ottoneillo L Contini P et al Transforming growth factor beta 1 in supernatants from stored red blood cells inhibits neutrophil locomotion [J]. Blood 2003 102 (3): 1100-1107
 [5] Rodriguez-Rodriguez E Sanchez Juan P Mateo J et al Serum levels and genetic variation of TGF-beta 1 are not associated with Alzheimer's disease [J]. Acta Neurol Scand 2007 116 (6): 409-412
 [6] 黄培堂,译. 萨姆布鲁克, DW拉塞尔,著. 分子克隆实验指南 [M]. 第 3版. 北京: 科学出版社, 2002: 518
 [7] Lee C Protein extraction from mammalian tissues [J]. Methods Mol Biol 2007 362: 385-389
 [8] Schuster N Krieglstein K Mechanisms of TGF-beta mediated apoptosis [J]. Cell Tissue Res 2002 307 (1): 1-14.
 [9] Boesen CC Radaev S Moutkha SA et al The 1.1 A crystal structure of human TGF-beta type II receptor Igand binding domain [J]. Structure 2002 10 (7): 913-919.
 [10] Baconi T Bodo M D'Alessandro A et al Silica and its antagonistic effects on transforming growth factor beta in lung fibroblast extracellular matrix production [J]. J Invest Med 2001 49 (2): 146-156
 [11] Sime PJ Xing Z Galis F L et al Adenovector mediated gene transfer of active transforming growth factor beta 1 induces prolonged severe fibrosis in rat lung [J]. J Clin Invest 1997 100 (4): 768-776
 [12] Lasky JA Ortiz LA Tompkins B et al Connective tissue growth factor mRNA expression is upregulated in bleomycin induced lung fibrosis [J]. Am J Physiol 1998 275 (2 Pt1): I365-371.
 [13] Khalil N Parekh TV O'Connor R et al Regulation of the effects of TGF-beta 1 by activation of latent TGF-beta 1 and differential expression of TGF-beta receptors (T beta R-I and T beta R-II) in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Thorax 2001 56 (12): 907-915

氯化锰致大鼠神经毒性机制的研究

邓宇¹, 徐冬辉², 徐斌¹, 冯雪英¹, 王飞¹, 关坤¹, 姜泓³, 徐兆发^{1*}

(1 中国医科大学公共卫生学院环境卫生学教研室, 辽宁 沈阳 110004; 2 中国医科大学附属第一医院临床药理教研室, 辽宁 沈阳 110004; 3 中国医科大学公共卫生学院卫生检验教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 为研究不同剂量的氯化锰对大鼠脑纹状体谷氨酰胺合成酶 (GS)、磷酸激活的谷氨酰胺酶 (PAG) 和大脑皮质 Na⁺-K⁺-ATPase和 Ca²⁺-ATPase活力的影响, 将 32只 SD大鼠, 按体重随机分成 4组。第 1组为对照组, 皮下注射生理盐水, 第 2~4组为不同剂量染锰组, 分别皮下注射 50、100和 200 μmol/kg的氯化锰溶液, 每周注射 5次, 连续染毒 4周。观察大鼠体重变化和一般表现。最后一次注射后 24 h处死大鼠, 切取纹状体, 测定 GS和 PAG的活力; 切取大脑皮质, 测定 Ca²⁺-ATPase和 Na⁺-K⁺-ATPase的活力。结果显示, 随着染锰剂量的增加, 脑纹状体 GS活力降低, PAG活力升高, 大脑皮质 Ca²⁺-ATPase和 Na⁺-K⁺-ATPase活力降低。与对照组比较, 在 50、100和 200 μmol/kg染锰组 GS和 Na⁺-K⁺-ATPase活力逐渐下降, 差异有统计学意义; 在 100和 200 μmol/kg染锰组 PAG的活力逐渐升高, Ca²⁺-ATPase活力逐渐下降, 且差异有统计学意义。说明不同剂量氯化锰可引起大鼠脑纹状体 GS活力降低, PAG活力升高; 大脑皮质 Na⁺-K⁺-ATPase和 Ca²⁺-ATPase活力降低, 由此可引起谷氨酸代谢失衡, 产生神经毒性。

关键词: 氯化锰; 谷氨酰胺合成酶; 磷酸激活的谷氨酰胺酶; Na⁺-K⁺-ATPase; Ca²⁺-ATPase

中图分类号: R99 O612.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2008)02-0103-03

收稿日期: 2007-12-03 修回日期: 2008-03-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (项目编号: 30771834)

作者简介: 邓宇 (1981-), 女, 博士研究生, 研究方向: 锰中毒机制与中毒预防。

* 通讯作者, 教授, 博士生导师, 研究方向: 重金属中毒机制与防治。