· 实验研究 ·

乙二醛对大鼠淋巴细胞活力的影响及诱导凋亡的作用

Studies on effect of glyoxal on lymphocytic activity and its apoptosis inducing action in rat

于光¹, 王璐²

YU Guang, WANG Lu

(1. 沈阳市疾病预防控制中心, 辽宁 沈阳 110034; 2. 沈阳市预防医学会, 辽宁 沈阳 110031)

摘要: 分离大鼠淋巴细胞, 经不同浓度的乙二醛作用后, 采用 AlamarBlueTM 摄入量检测细胞活力, 采用流式细胞术 (FCM) 检测细胞凋亡。结果显示, 乙二醛浓度在 125 μmol/L 以上时, AlamarBlue 的还原率明显低于对照组, 差异有统计学意义; 乙二醛浓度为 0.5、1、2 mmol/L 时, 凋亡百分率明显高于对照组。提示乙二醛可抑制大鼠淋巴细胞的活力和诱导凋亡发生。

关键词: 乙二醛; 淋巴细胞; 细胞活力; 凋亡; AlamarBlue

中图分类号: R994.3 O623.513 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2008)03-0181-02

乙二醛广泛应用于造纸、纺织、制药、染料生产等工艺, 还存在于水和食物中。在水和大气芳香烃的臭氧化产物中^[1,2], 加热后的糖和咖啡中^[3]及烟草中也发现其存在^[4]。以前的研究认为乙二醛的毒性较低, 主要表现为对眼及呼吸道黏膜的刺激作用。近年来发现它还有致突变性和致癌性^[5], 能引起淋巴细胞 DNA 单链断裂, 导致 DNA 损伤^[6]。目前有关乙二醛诱导细胞凋亡的研究很少。本研究检测了乙二醛对大鼠淋巴细胞活力的影响和诱导凋亡的作用, 为探讨乙二醛的毒作用机制提供实验依据。

1 材料与方

1.1 材料

健康 Wistar 雄性大鼠, 体重 (200±10) g 由中国医科大学实验动物部提供。常规饲养, 观察 1 周后, 健康者供实验用。主要试剂: 40% 乙二醛, 天津市博迪化工有限公司, 分析纯; RPMI640 培养液, Sigma 公司; 小牛血清, 华美试剂公司; AlamarBlueTM, International Biosource; 淋巴细胞分离液, 上海试剂二厂; 碘化丙啶, PI 华美试剂公司。主要仪器: 超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 二氧化碳培养箱, Heraeus (荷兰); 全自动酶标仪, Lab systems (芬兰); 三用恒温水箱, 北京长安科学仪器厂; XJH 型离心机, 上海医用分析仪器厂; 倒置相差显微镜, Olympus (日本); 流式细胞仪, BD 公司 (美国)。

1.2 方法

1.2.1 淋巴细胞活力测定 从大鼠下腔静脉取血后, 用无血清 RPMI640 稀释, 用淋巴细胞分离液密度梯度离心法分离淋

巴细胞 (3 000 r/min, 30 min), 离心后吸取中间乳白色絮状的淋巴细胞, 用 RPMI640 液洗 2 次 (1 000 r/min, 10 min)。然后加入含 10% 小牛血清的 RPMI640 培养液, 调整悬液的细胞密度为 1×10⁵ 个/ml, 接种于 96 孔板, 加入乙二醛, 使其终浓度分别为 31.25 μmol/L, 62.5 μmol/L, 125 μmol/L, 250 μmol/L, 500 μmol/L, 1 mmol/L 和 2 mmol/L。对照组加入等量培养液, 每组 8 个平行样, 置于 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中培养 24 h。结束培养前 4 h 每孔加入 10 μl AlamarBlue, 在培养箱中继续孵育至培养结束。用酶标仪在 540 nm 和 620 nm 波长下分别测定各孔吸光度。

1.2.2 诱导细胞凋亡检测 从大鼠下腔静脉采血, 分离淋巴细胞, 用无血清 RPMI640 培养液调整细胞密度为 3×10⁶ 个/ml, 分别加入乙二醛溶液, 使其终浓度为 0.25 mmol/L, 0.5 mmol/L, 1 mmol/L, 2 mmol/L 和 4 mmol/L。对照组加入等量培养液, 每组 6 个平行样, 混匀后置 37℃ 水浴孵育 2 h。染毒完毕后用 PBS 洗细胞, 固定在 4℃、70% 的乙醇中过夜。洗掉固定液后, 加入 0.3 ml P 染液 (PI 5 mg, RNase 2 mg, 生理盐水 65 ml, 枸橼酸钠 100 mg 加蒸馏水至 100 ml, 调 pH 值至 7.2~7.6), 37℃ 孵育 30 min, 用 FACS 流式细胞仪检测, 收集 10 000 个细胞, CellQuest 软件获取并分析数据, 计算细胞凋亡百分率。

1.3 统计分析

采用 SPSS11.0 统计软件进行数据分析。

2 结果

2.1 乙二醛对淋巴细胞活力的影响

以 AlamarBlue 的还原率表示细胞活力。不同浓度乙二醛作用 24 h 后, 浓度为 31.25 μmol/L 和 62.5 μmol/L 的乙二醛对细胞活力无影响。浓度为 125 μmol/L ~ 2 mmol/L 时, AlamarBlue 的还原率下降, 与对照组相比差异有统计学意义 (P<0.01)。见表 1。

表 1 不同浓度乙二醛对淋巴细胞活力的影响

乙二醛浓度	AlamarBlue 还原率 (%)
对照组	37.40±0.20
31.25 μmol/L	37.03±0.44
62.5 μmol/L	36.94±0.46
125 μmol/L	33.18±0.40**
250 μmol/L	30.97±0.32**
500 μmol/L	26.15±0.77**
1 mmol/L	18.26±0.27**
2 mmol/L	12.72±0.11**

与对照组相比, ** P<0.01

2.2 乙二醛对淋巴细胞凋亡的影响

收稿日期: 2008-01-14 修回日期: 2008-04-02

作者简介: 于光 (1974-), 男, 主管医师, 医学硕士, 主要从事卫生毒理学研究。

乙二醛浓度为 0.25 mmol/L 时未显示出对细胞凋亡有影响。乙二醛浓度为 0.5、1、2 和 4 mmol/L 时凋亡细胞明显增多, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见表 2

表 2 乙二醛对大鼠淋巴细胞凋亡的影响

乙二醛浓度	凋亡率 (%)
对照组	6.20 ± 0.23
0.25 mmol/L	6.58 ± 0.02
0.5 mmol/L	8.86 ± 0.46*
1 mmol/L	12.17 ± 0.46**
2 mmol/L	17.30 ± 0.40**
4 mmol/L	23.54 ± 0.42**

与对照组相比, * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$

3 讨论

曾有报道, 乙二醛具有细胞毒性, 通过阻止人成纤维细胞 DNA 合成而影响其分化^[7]。本研究结果显示, 浓度在 125 $\mu\text{mol/L}$ 以上的乙二醛对淋巴细胞活力有抑制作用, 具有细胞毒性, 染毒浓度越高, 细胞毒性越大。

细胞凋亡是由基因控制的程序化细胞死亡, 对于机体稳态的维持、某些疾病的发生与发展、神经系统的正常发育以及机体对环境因素刺激的应答等方面具有重要意义^[8]。目前有关乙二醛诱导细胞凋亡的研究很少。Kasper 等^[9]研究了乙二醛对人胚肺上皮 L132 细胞的体外影响, 发现增加乙二醛的浓度能使凋亡细胞数增加。Roehlecke 等^[10]发现 200 mmol/L 乙二醛能诱导 L132 肺上皮细胞凋亡。在本实验中, 我们观察到乙二醛能诱导大鼠淋巴细胞发生凋亡, 经流式细胞仪分析, DNA 直方图上出现典型的细胞凋亡峰, 且凋亡率随乙二醛的剂量增加而逐渐加大。由于细胞内存在着多种信息传递方式, 相应地导致有许多条细胞凋亡的途径。而且刺激作用的起始点也不同, 有的起始于细胞信号水平, 有的起始于基因转录水平, 也有的起始于酶的活化水平, 但无论哪一条途径, 其最终结果都统一于具有特定形态变化的基因关启程序化过程。

乙二醛可能经过多种途径介导了淋巴细胞的凋亡, 具体机制尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Ueno H, Segawa T, Nakamura K, et al. Mutagenicity and identification of products formed by aqueous ozonation of humic acids of different origins [J]. Chemosphere 1989; 19 (1): 1843-1852
- [2] Tuazon E, Atkinson C B, Leed H M, et al. Yields of glyoxal and methylglyoxal from the NO_x -air photo oxidations of toluene and m-xyl-xylene [J]. Environ Sci Technol 1984; 18: 981-984
- [3] Kasa H, Nishimura S. Hydroxylation of guanine in nucleosides and DNA at the C-8 position by heated glucose and oxygen radical forming agents [J]. Environ Health Perspect 1986; 67: 111-116
- [4] Moree-Tessa P, Saint-Jahn U. Determination of α -dicarbonyl compounds in cigarette smoke [J]. Chromatogr 1981; 217: 197-208
- [5] Furuhata C, Hata A, Sato Y, et al. Alkaline elution of DNA from stomach pyloric mucosa of rats treated with glyoxal [J]. Mutat Res 1989; 212 (2): 227-231
- [6] 王路, 张颖, 刘勇, 等. 乙二醛致大鼠淋巴细胞 DNA 损伤的实验研究 [J]. 中国工业医学杂志, 2005; 18 (6): 353-354
- [7] Zimmermann F K, Mohr A. Formaldehyde, glyoxal, urethane, methyl carbamate, 2,3-butanedione, 2,3-hexanedione, ethyl acrylate, dibromooxetone, and 2-hydroxypropionitrile induce chromosome loss in Saccharomyces cerevisiae [J]. Mutat Res 1992; 270 (2): 151-166
- [8] Schmitt C A, Lowe S W. Apoptosis and therapy [J]. J Pathol 1999; 187: 127-137.
- [9] Kasper M, Roehlecke C, Witt M, et al. Induction of apoptosis by glyoxal in human embryonic lung epithelial cell line L132 [J]. Am J Respir Cell Mol Biol 2000; 23 (4): 485-491
- [10] Roehlecke C, Kuhnt A K, Fehrenbach H, et al. Resistance of L132 lung cell clusters to glyoxal induced apoptosis [J]. Histochem Cell Biol 2000; 114 (4): 283-292

苯乙烯对仔鼠生理和行为发育的影响

Effect of styrene on physiology and behavior development in pups

杨衍凯, 秦宝昌, 王宏

YANG Yan-kai, QIN Bao-chang, WANG Hong

(抚顺市卫生监督所, 辽宁 抚顺 113006)

摘要: 本实验研究发现, 染毒苯乙烯后的母鼠生长发育良好, 未见有意义的中毒症状; 500、1000 mg/kg 染毒组分别有 2 只和 5 只母鼠难产, 剖腹均为死胎; 仔鼠出生后 1、7、14 d 的存活率明显低于对照组, 大部分生理发育指标出现时间晚于对照组, 行为发育指标阳性率明显低于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。说明接触较高剂量苯乙烯对子代的生理、神经行为发育造成明显的损害。

关键词: 苯乙烯; 大鼠; 生理; 行为发育

中图分类号: R994.3 O625.12 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2008)03-0182-03

本研究旨在探讨妊娠大鼠围生期接触苯乙烯对子代生理和神经行为发育的影响, 为深入了解苯乙烯对仔代发育可能造成的损害作用提供毒理学实验资料。

1 材料与方法

1.1 试剂

苯乙烯由抚顺化工塑料厂提供, 纯度为 99.96%。溶剂油

收稿日期: 2007-04-24 修回日期: 2008-03-01

作者简介: 杨衍凯 (1962-), 男, 主管医师。