亚急性砷暴露对小鼠海马区胶质纤维酸性蛋白表达的影响

孙迪，赵凤红，钟媛，于霄云，李革新，吕秀强，孙贵范，金亚平*

（中国医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室，辽宁 沈阳 110001）

摘要：目的 探讨亚急性砷暴露对小鼠海马各区星形胶质细胞的影响。方法 将昆明种小鼠随机分为对照组及低、中和高剂量染毒组。以自由饮水方式饮含砷水，对照组小鼠饮蒸馏水。染毒 8周后，心脏灌流固定，取大脑，进行胶质纤维酸性蛋白（GFAP）免疫组化染色，分析砷对小鼠海马各区 GFAP表达情况，判断其对星形胶质细胞的影响。结果 雌鼠海马 CA1、CA3和 DG区的 GFAP积分光密度（IOD）值均先升高而后下降；在海马 CA1和 DG区，低剂量组的 IOD值最高，并显著高于对照组，而高剂量组的 IOD值则显著低于对照组；但在海马 CA3区，低、中剂量组的 IOD值均显著高于对照组，以中剂量组的 IOD值最高，而高剂量组则显著低于对照组。雄鼠海马 CA1和 DG区 GFAP的 IOD值也先升高而后下降，中剂量组的 IOD值最高，并显著高于对照组；但在海马 CA3区，IOD值随染砷剂量的增加不断增高，高剂量组的 IOD值最高，并显著高于对照组。结论 低水平砷暴露可使小鼠海马星形胶质细胞活化，而高水平砷暴露会损伤海马星形胶质细胞；雌鼠海马星形胶质细胞对砷作用比雄鼠敏感；而无论雌、雄鼠，其海马 CA1和 DG区星形胶质细胞对砷的作用比 CA3区敏感。

关键词：砷暴露；海马；星形胶质细胞；胶质纤维酸性蛋白

中图分类号：R994.6；O613.63 文献标识码：A 文章编号：1002－221X(2009)06－0416－04

Influence of subacute arsenic exposure on expression of GFAP in hippocampal astrocyte of mice

SUN Di, ZHAO Feng-hong, ZHONG Yuan, YU Xiao-yun, LI Ge-xin, LV Xiu-qiang, SUN Gui-fan, JIN Ya-ping*

(Department of Occupational Health, School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective To explore the effect of arsenic on astrocyte in the hippocampal CA1, CA3 and DG of mice. Methods Mice were randomly divided into four groups, which were control group, low dose group, medium dose group and high dose group. Mice were exposed to arsenite through drinking water for eight weeks. Expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in hippocampal CA1, CA3 and DG of mice was determined by immunohistochemical staining method. Results In hippocampal CA1, CA3 and DG of female mice, the integral optical density (IOD) of GFAP was increased and then decreased along with the arsenic dose. IOD in CA1 and DG of low dose group was the highest and significantly higher than that in control, but was significantly lower in high dose group than that in control; however, IOD in CA3 of medium dose group was the highest and was significantly higher in both low and medium dose group than that in control, but was significantly lower in high dose group than that in control. In hippocampal CA1 and DG of male mice, IOD of GFAP was increased and then decreased, IOD in medium dose group was the highest and significantly higher than that in control; however, IOD of GFAP in CA3 male mice was increased along with arsenic dose, which was the highest in high dose group and significantly higher than that in control. Conclusions Exposure to low arsenic levels could activate astrocytes, however high levels of arsenic could injure astrocytes. Compared to that in male mice, astrocytes in hippocampus of female mice are more sensitive to the effects of arsenic. Effects of arsenic on astrocytes in CA1 and DG seemed to be more stronger than in CA3.

Key words: Arsenic exposure; Hippocampus; Astrocyte; Glial fibrillary acidic protein

砷是一个古老的毒物，其应用在我国至今有两千多年的历史。砷暴露的途径包括职业接触和环境污染，长期职业接触与环境暴露无机砷可以对人类健康造成严重的损伤。无机砷（Inorganic arsenic，iAs）主要有二个价态，分别是 iAs^{III}和 iAs^{V}，其中 iAs^{III}的毒性约是 iAs^{V}的 60倍。砷对机体的多个器官和系统具有毒性作用。新近的国内外流行病学调查显示，环境砷暴露可影响儿童的智力发育[1~3]。动物实验研究也证实，砷暴露对实验动物的智力发育具有明显毒性作用[4]。但砷智力损伤的机制目前尚不清楚。

胶质细胞是中枢神经系统内数量上占绝对优势的细胞群体，约占脑细胞总数的 90%，其中星形胶质细胞（astrocyte）是胶质细胞的主要组成部分，约占其总数的 70%[5]。胶质纤维酸性蛋白（glial fibrillary acidic protein，GFAP）仅存在于星形胶质细胞中，是

收稿日期：2009－09－28

基金项目：国家自然科学基金资助项目（No 30571590，No 30972441）

作者简介：孙迪（1983－）男，硕士在读，研究方向：砷的神经毒性。

*：通讯作者。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

公认的星形胶质细胞特征性标记物[6]。本研究以GFAP为检测指标，探讨亚急性砷暴露对小鼠海马星形胶质细胞的影响，以期为砷智力损伤机制的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

选用健康昆明种小鼠 24只，雌雄各半，体重（22.0±2.0）g，由中国医科大学实验动物中心提供。适应性喂养 1周后，将小鼠随机分为 4组：对照组及低、中和高剂量染砷组，每组各 6只小鼠，雌雄各半。将亚砷酸钠（$NaAsO_2$）溶于蒸馏水中，分别配成含砷 25 mg/L（低剂量组）、50 mg/L（中剂量组）和 100 mg/L（高剂量组）浓度的水溶液，且每 24 h新鲜配制。各染毒组小鼠以自由饮水的方式饮含砷水，对照组小鼠饮蒸馏水，染毒时间为 8周。

1.2 标本制备及 GFAP免疫组化染色

染毒结束 24 h后，乙醚吸入麻醉小鼠，暴露心脏，左心室插管。先用温生理盐水灌流，冲净血液后，用 4%多聚甲醛灌流固定，摘取大脑，置于固定液中 36～48 h，常规石蜡包埋，行冠状位连续切片，采用免疫组化 SP两步法染色：石蜡切片常规脱蜡，滴加兔抗大鼠Ⅰ抗（北京中杉金桥），4 ℃过夜，滴加Ⅱ抗（武汉博士德生物工程有限公司），37 ℃孵育 30 min，二氨基联苯胺（DAB）显色，蒸馏水冲洗终止反应，常规脱水、透明和封片，光学显微镜下观察并拍照。

1.3 免疫组化图像分析

在光学显微镜下，采用盲法观察并拍摄每张切片中不同海马分区（CA1、CA3和 DG）GFAP免疫反应物，每个分区拍摄 2个视野。采用 MetaMorph/DP10/BX41型图像分析系统（UIC/OLYMPUS, US/JP）进行定量分析，检测参数为积分光密度（integral optical density, IOD）。IOD越大表示视野内 GFAP阳性反应物的总色度越强，即视野内 GFAP的总量越多。

1.4 统计分析

采用 SPSS16.0统计分析软件进行实验数据的统计分析与处理。各组 IOD用 $\bar{x}\pm s$表示，采用单因素方差分析（ANOVA）及组间比较的 q检验（SNK法）进行各组间差异的统计学分析，以 $P<0.05$作为显著差异的判定标准。

2 结果

2.1 小鼠脑海马 GFAP免疫组化图片观察

由图 1可见，低、中剂量染砷组小鼠海马星形胶质细胞的胞体肿大，突起增多、变粗，且细胞数量明显增加。而高剂量组的海马星形胶质细胞的胞体变小，突起变少。

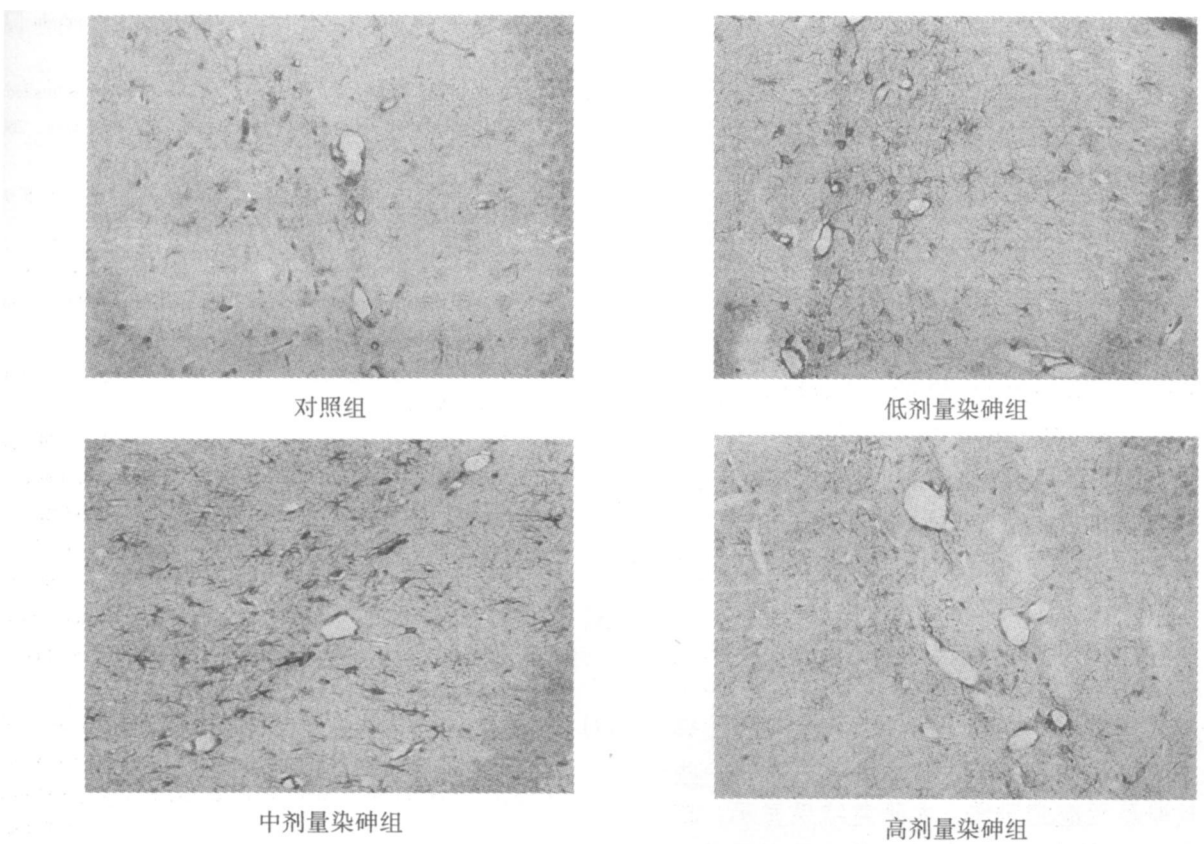

图 1 各组小鼠海马 CA1区 GFAP免疫组化检测结果（GFAP染色 ×40）

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2 雌、雄小鼠海马不同分区 GFAP的 IOD值比较

由表 1可见，雄鼠海马 CA1区与 DG区的 GFAP的 IOD值随着染砷剂量的增加均呈现先升高而后下降的变化趋势，中剂量组 GFAP的 IOD值最高，并与对照组比较差异显著。高剂量组 DG区 GFAP的 IOD值虽较中剂量组有所下降，但与对照组比较也显著升高。CA3区 GFAP的 IOD值随着染砷剂量的增加持续升高，高剂量组 GFAP的 IOD值最高，并与对照组比较差异显著。

表 1 各组雄鼠不同海马分区 GFAP的 IOD值比较 ($\bar{x}\pm s$)

组 别	CA1	CA3	DG
对照组	9.20±0.67	8.17±1.59	7.88±0.37
低剂量组	9.91±1.16	8.26±1.11	9.00±0.38
中剂量组	11.91±0.45**	10.06±1.66	12.49±1.36**
高剂量组	9.28±1.33	12.45±0.01**	9.54±0.95*

与对照组比较，* P<0.05，** P<0.01，下同。

表 2可见，雌鼠海马 CA1区与 DG区 GFAP的 IOD值也随染砷剂量的增加呈现先升高而后下降的趋势。但低剂量组 GFAP的 IOD值最高，并与对照组比较差异显著；中、高剂量组呈下降趋势，并且高剂量组 GFAP的 IOD值显著低于对照组。CA3区 GFAP的 IOD值随着染砷剂量的增加也呈先升高而后下降趋势，但中剂量组 GFAP的 IOD值最高，低、中剂量组 GFAP的 IOD值均显著高于对照组，而高剂量组 GFAP的 IOD值显著低于对照组。

表 2 各组雌鼠不同海马分区 GFAP的 IOD ($\bar{x}\pm s$)

组 别	CA1	CA3	DG
对照组	10.49±1.17	6.99±1.03	11.19±0.76
低剂量组	13.96±0.68*	14.56±1.13**	15.53±0.70**
中剂量组	11.50±1.78	15.58±0.12**	11.26±0.69
高剂量组	7.33±1.87*	5.12±0.03*	7.95±1.86*

3 讨论

长期以来，星形胶质细胞被认为具有保护、营养和支持神经元的作用。然而，近年来的研究表明，星形胶质细胞还参与神经递质的代谢，并对神经元的发育与突触信号的传递具有重要调节作用[7,8]。

在一些外界病理因素的刺激下，星形胶质细胞会发生活化反应，称为反应性星形胶质细胞 (reactive astrocyte)。主要表现为细胞增生、细胞体积变大和突起增多，也可引起细胞内相关蛋白表达的增强等。GFAP作为星形胶质细胞的特征性标记物，其大量表达是星形胶质细胞活化的重要特征。活化的星形胶质细胞对神经元具有双重作用，既可保护神经元，减轻病理因素对神经元的损害[9~13]，又可通过释放一些炎性介质对神经元造成损伤。本研究结果显示，25 mg/L及 50 mg/L饮水砷浓度的亚急性砷暴露可引起小鼠海马星形胶质细胞的活化反应。但不同性别及不同海马分区内的星形胶质细胞对砷作用的敏感性不同。雌鼠的海马星形胶质细胞对砷作用较雄鼠敏感，在 25 mg/L的饮水砷暴露剂量下引起了雌鼠海马 CA1和 DG区星形胶质细胞的明显活化反应，而在 50 mg/L的饮水砷暴露剂量下雄鼠的海马 CA1和 DG区的星形胶质细胞才表现明显活化反应。在 100 mg/L的饮水砷暴露剂量下，雌鼠海马 CA1和 DG区 GFAP的 IOD值显著下降，提示高水平砷暴露对雌鼠的海马星形胶质细胞会产生一定的损伤作用。这提示雌鼠中枢神经系统对砷作用的敏感性高于雄鼠，我们前期对内蒙古学龄儿童的智力调查结果及康家琦等人[14~16]的调查结果均显示，长期饮用砷含量在 0.1 mg/L以上的高砷水对儿童的智力发育会造成不利影响，而女童对砷智力损伤的敏感程度高于男童。

本实验结果还显示，不同砷暴露剂量的雌、雄小鼠的海马 CA3区 GFAP的 IOD值变化与 CA1和 DG区略有不同，雄鼠 CA3区 GFAP的 IOD值随着染砷剂量增加而持续升高，而雌鼠 CA3区 GFAP的 IOD值在 50 mg/L染砷组才达到峰值。提示海马的 CA1和 DG区星形胶质细胞对砷作用较 CA3区敏感。

参考文献：

[1] Wasserman G A, Liu X, Parvez F, et al. Water arsenic exposure and children's intellectual function in araihazar, bangladesh [J]. Children's Health, 2004, 112 (13): 1329-1334.

[2] Ehrenstein O S, Poddar S, Yuan Y, et al. Children's intellectual function in relation to arsenic exposure [J]. Epidemiology, 2007, 18 (1): 44-51.

[3] 李军，王三祥，王正辉，等. 砷中毒病区儿童智力水平调查 [J]. 中国公共卫生，2006, 22 (7): 856-857.

[4] Rodriguez V M, Carrizales L, Jimenez-Capdeville M E, et al. The effects of sodium arsenite exposure on behavioral parameters in the rat [J]. Brain Res Bull, 2001, 55 (2): 301-308.

[5] Temple S. The development of neural stem cells [J]. Nature, 2001, 414 (6859): 112-117.

[6] Gomes F C, Paulin D, Moura N V, et al. Glial fibrillary acidic protein (GFAP): modulation by growth factors and its implication in estrocyte differentiation [J]. Braz J Med Biol Res, 1999, 32 (5): 619-631.

[7] Takano T, Tian G F, Peng W, et al. Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow [J]. Nat Neurosci, 2006, 9 (2): 260-267.

[8] Zonta M, Angulo M C, Gobbo S, et al. Neuron-to-astrocyte signaling is central to the dynamic control of brain microcirculation [J]. Nat Neurosci, 2003, 6 (1): 43-50.

[9] Saura J, Pares M, Bove J, et al. Intrastriatal administration of interleukin-1 beta activates astrocytes and protects from subsequent 6-hydroxydopamine [J]. Neurotoxicity J Neurochem, 2003, 85 (3): 651-661.

(下转第 474页)

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

苯酚、丙酮混合物料灼伤猝死 1例报道

秦宏[1]，徐茜[2]

（1 无锡市疾病预防控制中心，江苏 无锡 214023；2 无锡职业病康复医院，江苏 无锡 214151）

2006年 4月 11日，我市某树脂厂发生一起接触苯酚、丙酮混合物料中毒死亡事故，现报告如下。

1 事故经过

2006年 4月 11日 9：20 我市某树脂厂双酚 A车间一名 19岁男性技校实习生，随同其他人员在距离地面约 15 m高的缩合反应釜装置处进行巡视操作训练。在向反应釜观察窗俯身观察釜内物料反应时，5 cm厚的观察窗玻璃突然爆裂，反应釜中的高温高压液体物料（苯酚 60%、丙酮 40%）直接喷溅到其头面部及胸部，具体数量不详。同伴迅速将其搀扶到地面，立即用清水冲洗。冲洗后回操作室途中尚能对话，但很快昏迷倒地抽搐不止，前后约 20 min。事故发生 40 min后，当急救站医生赶到时，该实习生已停止呼吸，在“120”救护车上经抢救无效宣告死亡。

2 现场调查和事故原因分析

该树脂厂双酚 A车间运用离子交换树脂法生产双酚 A已有多年，主要工艺：苯酚＋丙酮→缩合反应→双酚 A及副产物→脱水→苯酚蒸发→双酚 A结晶→回收苯酚、丙酮→返回缩合反应。事故当日，化工技校的学生正好在车间主任的带领下参观实习，发生事故的是 2号缩合反应釜，釜内工艺温度 120 ℃，设计压力 0.6 MPa。

经现场调查和分析，2号缩合反应釜一年前进行了检修，并更换了观察窗玻璃，但未经有关部门验收合格即投入使用。由于生产过程中，釜内长时间持续高压，观察窗玻璃产生疲劳，最终导致突然爆裂，酿成事故。死者胸部、面部及下肢部位均有浅褐色灼伤痕迹，约占体表面积 20%。该事故是一起因设备疲劳物料泄漏而导致的急性苯酚中毒死亡事故。

3 讨论

常温下苯酚为白色针状结晶，具有一种特殊的芳香气味，溶于水，挥发性低。苯酚是具有高度毒性的细胞原浆毒物质，属高毒类。对皮肤和黏膜有强烈的腐蚀作用，并能经无破损皮肤和黏膜吸收而引起中毒，高温熔融状态下的苯酚灼伤皮肤更易吸收毒物。进入人体后引起全身中毒，对血管运动中枢、呼吸中枢、体温中枢等都有抑制作用，也可直接损害心肌和心脏毛细血管内皮细胞，使心肌变性和坏死。酚对中枢神经系统的作用主要在脊髓，由于刺激脊髓前角细胞而出现肌束颤动及阵挛性抽搐[1]。丙酮为无色透明液体，低毒，可通过破损皮肤吸收，个别严重中毒病例可出现昏迷。曾有因苯酚灼伤面积为 7%而在 2 h后猝死的病例报道[2]。一旦出现此类由于化学物的直接毒作用导致的急性化学源性猝死，应该迅速对受污染的部位进行清除，立即进行心、肺、脑复苏术等紧急处理；同时现场抢救和医院内抢救相结合，在送医院途中坚持抢救工作，并做好记录，到院后和医院医师合作，使抢救工作密切衔接，提高抢救成功率。

目前《职业性急性酚中毒诊断标准》（GBZ91—2002）中没有重度灼伤后造成死亡的描述内容，由此带来用人单位和医疗单位对酚灼伤的后果估计不足，希望有关部门在《职业性急性酚中毒诊断标准》修订过程中增添描述重度灼伤的内容，重视酚灼伤的严重后果，有利于用人单位采取更积极的预防措施。

参考文献：

[1] 何凤生. 中华职业医学 [M]. 北京：人民卫生出版社，1999：601.

[2] 刘薇薇. 皮肤接触苯酚致化学源性猝死 1例报告 [J]. 中国工业医学杂志，2004，17（1）：27.

收稿日期：2009－01－12；修回日期：2009－03－10

作者简介：秦宏（1968－），男，副主任医师，主要从事职业卫生评价与急性中毒处理工作。

（上接第 418页）

[10] Brown D R, Neurons depend on astrocytes in a coculture system for protection from glutamate toxicity [J]. Mol Cell Neurosci, 1999, 13（5）：379-389.

[11] Song H J, Stevens C F, Gage F H, Neural stem cells from adult hippocampus develop essential properties of functional CNS neurons [J]. Nat Neurosci, 2002, 5（5）：438-445.

[12] Joannides A, Gaughwin P, Schott M, et al. Postnatal astrocytes promote neural induction from adult human bone marrow-derived stem cells [J]. J Hematother Stem Cell Res, 2003, 12（6）：681-688.

[13] Sallmaggi A, Gelati M, Dufour A, et al. Expression and modulation of INF-γ-inducible chemokines（IP-10, Mig and I-TAC）in human brain endothelium and astrocytes: possible relevance for the immune invasion of the central nervous system and the pathogenesis of multiple sclerosis [J]. J Interferon Cytokine Res, 2002, 22（6）：631-640.

[14] 康家琦，金银龙，程义斌，等. 饮水砷对儿童智力的影响 [J]. 卫生研究，2007，36（3）：347-350.

[15] 王三祥，王正辉，程晓天，等. 砷氟中毒地区儿童智力水平及生长发育调查与评价 [J]. 中国地方病学杂志，2005，24（2）：179-182.

[16] 袁瑛. 砷对儿童智力的影响 [J]. 中国地方病防治杂志，2009，24（1）：26-27.

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net