

• 实验研究 •

丙烯酰胺对人神经母细胞瘤 NB-1 细胞的毒性

Toxic effect of acrylamide on human neuroblastoma NB-1 cells

韩伟¹, 王茜¹, 曹燕花¹, 刘楠¹, 关维俊¹, 王学生¹, 肖经纬², 李斌², 李忠生²HAN Wei¹, WANG Qian¹, CAO Yan-hua¹, LIU Nan¹, GUAN Wei-jun¹, WANG Xue-sheng¹, XIAO Jing-wei², LI Bin², LI Zhong-sheng²

(1. 河北联合大学公共卫生学院, 河北 唐山 063000; 2. 中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京 100050)

摘要: 分析丙烯酰胺 (ACR) 对人神经母细胞瘤 NB-1 细胞毒作用的剂量-效应和时间-效应关系, 进一步探讨丙烯酰胺的神经毒性机制。将 NB-1 细胞诱导成熟后, 设置正常对照及染毒浓度组、时间组, 采用 MTT 法和 LDH 法检测各组细胞存活和生长情况, 分析 ACR 对 NB-1 细胞的毒性作用。MTT 结果表明, >60 $\mu\text{g/ml}$ 的 ACR 对 NB-1 细胞开始表现出明显的抑制作用, 浓度越大, 抑制作用越强。LDH 结果表明, 24 h、72 h 时间点, ACR 浓度 >60 $\mu\text{g/ml}$, LDH 释放率明显增高; 而 48 h 则在 ACR 浓度 >40 $\mu\text{g/ml}$, LDH 释放率明显增高, 且均随浓度的加大, LDH 释放率逐渐升高。时间上, LDH 结果与 MTT 一致, 均以 48 h 表现最为显著。提示在一定浓度范围内, ACR 显示出对 NB-1 细胞的毒性作用。

关键词: NB-1 细胞; 丙烯酰胺; MTT; LDH**中图分类号:** R99 **文献标识码:** B**文章编号:** 1002-221X(2012)02-0123-03

丙烯酰胺对人体造成的伤害越来越被人们所了解, 低浓度长期和高浓度短期接触丙烯酰胺可导致作业工人神经、遗传和生殖系统的损伤, 其中尤以神经系统的损害为重^[1-4]。鉴于体外细胞培养易控制干扰, 因而成为了机制研究的重要手段。本实验选择性状稳定的 NB-1 细胞株, 观察丙烯酰胺对 NB-1 细胞毒作用的剂量-效应和时间-效应关系, 以期在细胞水平上为丙烯酰胺神经毒性机制提供线索。

1 材料与方法

1.1 主要仪器及试剂

CO₂ 培养箱 (THERMO), 倒置显微镜 (OLYMPUS), VERSA 型酶标仪 (美国分子仪器公司 Molecular Devices)。ACR (国药集团化学试剂有限公司), db-cAMP、MEM 培养基 (Sigma), 胎牛血清 (Hyclone), 马血清 (GIBCO 公司), 细胞培养板 (costar), BCA 蛋白定量试剂盒 (北京艾德莱生物科技有限公司), 噻唑兰 (MTT)、二甲亚砜 (DMSO) (Amresco), LDH 试剂盒 (南京建成生物技术公司)。

1.2 实验方法

收稿日期: 2011-11-07; 修回日期: 2011-12-12

基金项目: 国家自然科学基金青年基金 (30901219)

作者简介: 韩伟 (1984—), 女, 在读研究生, 研究方向: 分子毒理学。

通讯作者: 王学生, 教授, E-mail: xswang64@163.com。

1.2.1 细胞培养 细胞培养基由 80% MEM、10% 小牛血清、10% 马血清、100 IU/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素组成, pH 为 7.4。培养箱设置为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、95% O₂、5% CO₂, 在此环境下, 每 4 天换液 1 次。待细胞达到其对数生长期时对其传代。NB-1 细胞在实验培养条件下生长稳定后对其进行诱导分化。使用的诱导剂 db-cAMP, 终浓度为 1 mmol/L, 隔 2 天换液 1 次。在 db-cAMP 诱导下, 幼稚细胞向成熟细胞分化。本实验使用的是经 db-cAMP 处理 10 d 后的细胞, 几乎所有的幼稚细胞都能够分化成熟。

1.2.2 细胞相对存活率的测定 诱导成熟后的细胞以 10⁵ 个/ml 接种于 96 孔培养板, 待其贴壁后小心吸弃全部培养液, 加入含丙烯酰胺的 MEM, 染毒终浓度分别为 0、10、20、40、60、80、100 $\mu\text{g/ml}$; 每个浓度设 5 个复孔, 共铺 4 块板, 分别在染毒 24、48、72 h 时各处理一块板, 每孔加入 15 μl MTT (5 mg/ml); 继续培养 4 h 后吸弃全部培养液; 每孔加入 150 μl DM-SO; 摇床振荡 10 min; 酶标仪 550 nm 波长下测定吸光度 (OD); 计算 OD 均值, 并按如下公式计算细胞的相对抑制率。

$$\text{细胞相对抑制率} = \frac{1 - (\text{OD}_{\text{染毒组}} - \text{OD}_{\text{染毒空白}})}{\text{OD}_{\text{对照组}} - \text{OD}_{\text{对照空白}}} \times 100\%$$

1.2.3 乳酸脱氢酶 (LDH) 的测定 诱导成熟后的细胞以 10⁵ 个/ml 接种于 96 孔培养板, 待其贴壁后, 小心吸弃全部培养液, 加入含丙烯酰胺的 MEM, 染毒丙烯酰胺终浓度分别为 0、10、20、40、60、80、100 $\mu\text{g/ml}$, 分别在染毒 24、48、72 h 测定 LDH 活力, 每个剂量组每个时点设 3 个复孔。实验终点从每孔吸取培养液 20 μl , 加入 1 ml 基质缓冲液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min, 等分成两管, 一管加 0.5% 辅酶 I (现用现配) 0.1 ml, 另一管 (对照管) 不加, 共同水浴 15 min 后, 对照管再加辅酶 I 和 0.5 ml 二硝基苯肼, 实验组只加 0.5 ml 二硝基苯肼, 水浴 15 min 后加 0.4 mol/L 的 NaOH 5 ml 显色, 440 nm 处比色。按照下述公式计算待测细胞的 LDH 释放率:

$$\text{LDH 释放率} = \frac{\text{LDH}_{\text{染毒组}} - \text{LDH}_{\text{对照组}}}{\text{LDH}_{\text{对照管}}} \times 100\%$$

同时用 BCA 蛋白定量试剂盒测定细胞培养液中蛋白的含量。

1.3 统计分析

用 SPSS13.0 软件进行统计分析, 计量资料采用 ANOVA 方差分析, 且各组之间的两两比较采用 LSD 检验; 计数资料采用卡方检验, 显著性水平均为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 细胞相对存活率测定

丙烯酰胺对诱导分化后神经母细胞瘤 NB-1 细胞具有明显的抑制作用。表 1 可见, 24 h 时间点除了 100 $\mu\text{g/ml}$ 染毒组 OD 值与对照组差异有统计学意义外, 其余各组 OD 值与对照组差异均无统计学意义, 而从 48 h 开始, 各染毒组 OD 值开始与对照组出现明显差异, 逐渐下降。同一时间点, 各染毒组与对照组比较, OD 值逐渐下降; 同一染毒组不同染毒时间, 则以 48 h OD 值最高。同一时间点, 随染毒浓度的增加, 增殖抑制率越来越高; 同一染毒组, 作用 24 h、48 h、72 h 三个时间点, 除了 10 $\mu\text{g/ml}$ 和 20 $\mu\text{g/ml}$ 两个染毒组外, 其余各组均以 48 h 增殖抑制率最高, 24 h、48 h、72 h 时间点均在 ACR 浓度 $>60 \mu\text{g/ml}$, 增殖抑制率开始明显增高, 其中以 48

h 最为显著, 72 h 与 48 h 比较稍微下降, 但比 24 h 高。

2.2 乳酸脱氢酶 (LDH) 测定结果

表 1 表明, 对照组各时点的 LDH 活力无明显差异。10 $\mu\text{g/ml}$ 染毒组在 24 h 和 48 h 两个测定点的 LDH 释放率与对照组无明显差异; 40、60、80 $\mu\text{g/ml}$ 三个染毒组在所有测定点的 LDH 释放率均以 48 h 最高, 而 20、100 $\mu\text{g/ml}$ 两个染毒组则在 72 h LDH 释放率最高。24 h、72 h 时间点均在 ACR 浓度 $>60 \mu\text{g/ml}$, LDH 释放率开始明显增高; 而 48 h 时间点则在 ACR 浓度 $>40 \mu\text{g/ml}$, LDH 释放率开始明显增高, 且均随着浓度的增大, LDH 释放率逐渐升高。总体趋势可见, 时间的延长也会使 LDH 释放率逐渐增大, 以 48 h 最为显著。

表 1 丙烯酰胺对各染毒浓度 OD 值、细胞抑制率及 LDH 释放率的影响 ($\bar{x} \pm s$)

染毒浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	n	OD 值			细胞抑制率 (CI%)			LDH 释放率 (%)		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
0	5	0.272 5 $\pm$ 0.103 9	0.328 2 $\pm$ 0.029 4	0.312 0 $\pm$ 0.049 1	0.97	1.94	2.92	0.97	0.94	0.91
10	5	0.266 9 $\pm$ 0.277 0	0.309 1 $\pm$ 0.007 0	0.277 1 $\pm$ 0.160 1*	3.21*	5.48*	12.79*	0.94	0.99	3.17*
20	5	0.263 1 $\pm$ 0.041 8	0.279 2 $\pm$ 0.014 1*	0.254 6 $\pm$ 0.021 9*	6.94*	17.32*	24.34*	4.13*	4.39*	6.52*
40	5	0.230 8 $\pm$ 0.064 6	0.246 5 $\pm$ 0.007 9*	0.243 6 $\pm$ 0.014 5*	20.04*	36.76*	30.01*	6.84*	20.50*	18.68*
60	5	0.225 4 $\pm$ 0.035 5	0.237 1 $\pm$ 0.142 9*	0.236 4 $\pm$ 0.196 9*	22.94*	46.76*	33.80*	7.44*	35.70*	19.18*
80	5	0.204 4 $\pm$ 0.065 2	0.204 9 $\pm$ 0.125 2*	0.193 9 $\pm$ 0.017 2*	40.03*	52.57*	50.90*	13.53*	43.96*	43.88*
100	5	0.165 4 $\pm$ 0.027 7*	0.169 3 $\pm$ 0.008 2*	0.154 5 $\pm$ 0.179 4*	54.43*	69.87*	69.49*	16.30*	48.98*	60.26*

注: 与正常对照组比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨论

NB-1 细胞株是由 Miyake 等于 1973 年在日本建立的第一个人类神经母细胞瘤细胞系^[5], 能够表达出与神经元相似的生化、药理和功能方面的特性, 故可提供一个可以用来研究神经细胞各种功能在内的表达和调节的体外模型系统。

当 NB-1 细胞受到损伤时, 细胞线粒体功能就会发生异常, 氧化呼吸链受到损伤, 电子传递阻断, 造成 ATP 产生减少。琥珀酸脱氢酶是琥珀酸氧化呼吸链里重要的复合酶之一, 其活性可以反映神经细胞损伤的程度; MTT 法即是根据检测线粒体中琥珀酸脱氢酶的活性的高低来间接反映活细胞数量。本实验表明, 各时间点、各染毒组与正常对照组比较, 吸光度值均逐渐降低, 但作用 24 h 各染毒组 OD 值下降并不明显, 而从 48 h 开始明显下降, 且均与对照组差异有统计学意义, 提示 24 h 细胞内琥珀酸脱氢酶的活性并未受到太大的影响; 而从 48 h 开始, 细胞内琥珀酸脱氢酶的活性已经开始明显降低, 细胞呼吸功能受到损害, 提示丙烯酰胺已损害神经细胞代谢能力。其细胞增殖抑制率分析表明, 当丙烯酰胺浓度低于 60 $\mu\text{g/ml}$ 时, 细胞相对存活率大体上接近 80%, 表明细胞尚未受到明显影响; 而当丙烯酰胺浓度超过 60 $\mu\text{g/ml}$ 时, 本实验的半数存活抑制浓度为 80 $\mu\text{g/ml}$, 与杨翠香等关于 MTT 法检测丙烯酰胺对神经细胞的毒性作用的研究结果一致^[6], 提示细胞已明显受抑。此种现象可能是因丙烯酰胺引起神经细胞能量异常, 导致神经损伤。赫秋月等采用酶分析法发现 ACR 染毒后 6J 鼠脑组织匀浆中 ATP 水平明显降低, 脑能量负荷值降低, 认为能量代谢的抑制可能是 ACR 产生神经元损伤的生化基础^[7]。

LDH 实验结果进一步证实 ACR 的神经毒性。因当细胞严重受损时, LDH 从细胞中释放到细胞外的量增加, 通过测定 LDH 的释放量反映细胞的完整性^[8]。乳酸脱氢酶是参与细胞能量代谢的一个重要的酶, 同时产生 ATP。外界刺激导致细胞损伤时, 细胞膜完整性遭到破坏, 细胞通透性增加, LDH 将从胞浆中释放出来, 是反映胞膜完整性的重要检测指标^[9]。本实验结果显示, 不同浓度丙烯酰胺作用 NB-1 细胞后, 细胞膜通透性发生了改变, 各染毒浓度组 LDH 的渗出明显高于正常对照组, 总体趋势可见, 时间的延长会使 LDH 释放率逐渐增大。说明丙烯酰胺对 NB-1 细胞确实存在毒性作用, 能够造成细胞的损伤, 而且细胞损伤的形态学改变是与 LDH 的释放成正相关。产生毒性的原因也可用丙烯酰胺造成的能量代谢学解释。丙烯酰胺通过抑制能量代谢相关的酶, 使 ATP 酶的活性降低到一定水平后造成快速轴突转运障碍, 出现轴突变性肿胀, 继而表现出神经毒性。

(本研究使用的 NB-1 细胞株由 Kagoshima University 的 Masaki Kameyama 教授惠赠, 在此表示衷心的感谢!)

参考文献:

- [1] Rssen J, Hellenas K F. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Analyst, 2002, 127: 880-882.
- [2] Tareke E, Rydberg P, Karlsson S, et al. Acrylamide: a cooking carcinogen [J]. Chem Res Toxicol, 2002, 13: 517-522.
- [3] Wei-quan W, Marvin A. Acrylamide-regulated neurofilament expression in rat phenochromocytoma cell [J]. Brain Res 2000 852: 297-304.
- [4] Sumner S C, Williams C C, Snyder R W, et al. Acrylamide: a

- comparison of metabolism and hemoglobin adducts in roents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure [J]. *Toxicol Sci*, 2003, 75 (2): 260-270.
- [5] Miyake S, Kitamura T, Shimko Y. Morphological differentiation in vitro of human continuous and functional neuroblastoma cell line NB-I [J]. *Neurosurgery (Japan)*, 1975, 3: 407-414.
- [6] 杨翠香, 陈婉蓉. MTT 法检测丙烯酰胺对神经细胞的毒性作用 [J]. *上海铁道大学学报*, 1998, 19 (1-2): 7-9.
- [7] 赫秋月, 韩漫夫, 饶明俐. 丙烯酰胺中毒后小鼠脑中肌酸激酶和三磷酸腺苷含量的改变及意义 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2002, 20 (3): 195-198.
- [8] Lee J Y, Shin J W, Lee E H, *et al.* Comparison of the effects of propofol and pentobarbital on hydrogen peroxide-stimulated hepatic SNU761 cells [J]. *Korean Anesthesiol*, 2010, 58 (3): 277-282.
- [9] Steen E, Terry B M, Rivera E J, *et al.* Impaired insulin and insulinlike growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease is this type 3 diabetes [J]. *Alzheimers Dis*, 2005, 7 (1): 63-80.

镍精炼烟尘致 NIH/3T3 细胞生长抑制作用的实验研究

Study of the growth suppression effect of nickel-refining fume on NIH/3T3 cell

安学军, 王玥, 胡雪莹, 陈丽丽, 吴永会

AN Xue-jun, WANG Yue, HU Xue-ying, CHEN Li-li, 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: 研究镍精炼工人接触镍精炼烟尘的生物学效应。通过 MTT 染色法观察细胞形态, 用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测细胞生长抑制率。结果发现, 不同浓度下, 作用一定时间细胞生长均受到抑制, 且随作用时间增长, 受试物浓度增加, 细胞抑制作用增加, 呈现出时间-反应关系和剂量-反应关系, 且细胞在形态学上也出现不同程度的改变。提示镍精炼烟尘能使 NIH/3T3 细胞凋亡, 细胞的生长受到抑制。

关键词: 镍精炼尘; 细胞形态; 细胞毒性

中图分类号: R135.1 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2012)02-0125-03

我国职业性镍所涉及的作业达 30 余种^[1]。镍及其化合物被广泛应用于现代工业如硬币、珠宝和其他金属合金的生产和电镀^[2]。在职业环境中, 镍暴露主要发生在镍精炼、电镀和焊接等环节^[3]。镍化学物可能在生产、循环和处理的所有阶段以相当大的量扩散到环境中。已经有充分的证据表明镍是人类致癌物^[4]。镍的物理和化学性质比较复杂, 值得注意的是致癌危险性与镍化物的形式有关系^[5]。人们对其致癌机制也做了大量研究, 但对镍精炼烟尘的研究却少见报道, 由于镍精炼烟尘中还存在其他金属污染物, 所以对于镍精炼烟尘与镍化学物引起的毒性作用是否一致还存在疑问。本研究通过检测镍精炼烟尘对细胞的毒性的影响, 探讨镍精炼烟尘的致癌危险性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 靶细胞 小鼠肺成纤维细胞 (NIH/3T3 细胞), 购自北京市肿瘤研究所, 接种于含体积分数为 10% 胎牛血清的

DMEM 培养液中, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, EDTA/胰蛋白酶混合液消化, 传代, 备用。

1.1.2 受试物与试剂 受试物来源于某镍精炼厂的精炼炉前沉降尘, 用玛瑙研钵磨细后, 检测分散度, 受试物颗粒 < 5 μm 者占 99.9%, 受试物用紫外线照射灭菌, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 配成一定浓度的混悬液, 备用, 再稀释时摇匀。噻唑蓝 [溴化-3-(4, 5-二甲基乙噻唑基)-2, 5-二苯基四氮唑, MTT] 购自上海华舜生物技术有限公司, 二甲基亚砜 (DM-SO) 分析纯, 购自北京化工试剂厂, 正常熔点琼脂糖购自 Gibco 公司, 低熔点琼脂糖购自 Gibco 公司。

1.1.3 主要仪器 TE-HE 型 CO₂ 培养箱, 倒置荧光显微镜 (OLYMPUS-IX71 型), 全自动酶标仪 (BIO-RAD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞制备 将细胞密度为 1×10^5 个/ml 的 NIH/3T3 细胞接种到含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液的细胞培养瓶中, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 NIH/3TE 细胞形态学观察 选取生长良好的细胞, 接种于 24 孔细胞培养板上, 每孔加入 800 μl 不同浓度的染毒液, 终浓度分别为 100.00、50.00、25.00 μg/ml。37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 在倒置显微镜下观察细胞形态。

1.2.3 MTT 染色法观察 NIH/3T3 细胞凋亡及坏死 取对数生长期的细胞, 接种到 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 加入含不同浓度的镍精炼烟尘的 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养液, 使其终浓度分别为 6.25、12.50、25.00、50.00 和 100.00 μg/ml, 同时设阴性对照组和不加细胞的空白对照组, 分别培养 24 h。倒置显微镜下观察细胞形态。

1.2.4 镍精炼烟尘对 NIH/3T3 细胞增殖作用的影响 取对数生长期的细胞, 接种到 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 加入含不同浓度镍精炼烟尘的胎牛血清 (质量分数 10%) 的 DMEM 培养液, 使其终浓度分别为 6.25、12.50、25.00、50.00 和 100.00 μg/ml, 同时设阴性对照组和不加细胞的空白对照组, 每组均设 8 个重复孔。37℃、5% CO₂ 条件下分别培养 6、12、

收稿日期: 2011-09-26; 修回日期: 2012-02-10
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81072283); 教育部博士学科点基金 (20102307110019)

作者简介: 安学军 (1968—), 男, 硕士研究生。

通讯作者: 吴永会, 教授, 博士生导师, E-mail: wuyonghui777@163.com。