

- [10] 刘英华, 王静, 王晓军, 等. 大鼠卵巢颗粒细胞培养及分泌物测定条件的研究 [J]. 毒理学杂志, 2008, 22 (1): 5.
- [11] 解玮, 朱惠刚. 环境雌激素的男性生殖健康效应 [J]. 上海环境科学, 2003, 22 (2): 132-136.
- [12] Colonl, Caro D, Bourdony C J, *et al.* Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development [J]. Environ Health Perspect, 2000, 108: 895-900.
- [13] Cobellis L, Latini G, De Felice C, *et al.* High plasma concentrations of Di-(2-ethylhexyl) phthalate in women with endometriosis [J]. Hum Reprod, 2003, 18 (7): 1512-1515.
- [14] Davis B J, Maronpot R R, Heindel J J. Di-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol and ovulation in cycling rats [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1994, 128 (2): 216-223.
- [15] Noci I, Maggi M, Fuzzi B, *et al.* Effects of low day 3 luteinizing hormone levels on in vitro fertilization treatment outcome [J]. Gynecol Endocrinol, 2000, 14 (5): 321-326.
- [16] Lovekamp T N, Davis B J. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses aromatase transcript levels and estradiol production in cultured rat granulosa cells [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2001, 172 (3): 217-224.
- [17] Lovekamp S T, Davis B J. Mechanisms of phthalate esters toxicity in the female reproductive system [J]. Environ Health Perspect, 2003, 111 (2): 139-145.

柴油机废气颗粒物诱导哺乳动物细胞 DNA 损伤实验研究

Experimental study on DNA damage caused by diesel exhaust particles in mammalian cells

周雪松, 王军, 韩丹, 王声远, 吴永会

ZHOU Xue-song, WANG Jun, HAN Dan, WANG Sheng-yuan, 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: 以国产柴油机排气口废气采集物为受试物, 用噻唑蓝 (MTT) 染色的方法检验受试物各浓度作用 12 h、24 h、36 h 的细胞相对存活率; 单细胞凝胶电泳技术检测作用 2 h、4 h、8 h 受试物致细胞的 DNA 损伤。随着染毒时间的延长和染毒剂量的增加, 细胞存活率下降; 柴油机废气颗粒物引起细胞的拖尾率、尾矩和细胞尾部 DNA 含量增加。柴油机废气颗粒物的各浓度组在不同时间诱导的细胞拖尾率和尾部 DNA 含量均高于阴性对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示柴油机废气颗粒物可以降低细胞的相对存活率, 并不同程度地致 NIH/3T3 细胞的 DNA 损伤。

关键词: 柴油机废气; DNA 损伤; 细胞毒性

中图分类号: R994.6

文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2012)04-0280-02

近年来, 柴油机废气颗粒物已经成为大气污染的重要来源, 柴油机废气颗粒物成分十分复杂, 其中含有的有机成分多环芳香烃和多环芳香烃的硝基化合物已被证实有很强的致癌性和致突变性^[1]。1989 年国际癌症研究协会把柴油机排出颗粒物定为人可能致癌物^[2], 近年来研究发现, 长时间接触柴油机废气颗粒物还会对神经系统^[3]和心脑血管系统^[4]产生不良影响。本文采用噻唑蓝 (MTT) 比色法和彗星试验 (单细胞凝胶电泳试验), 以某工厂柴油机废气颗粒物为受试物, 检测其对哺乳动物细胞 (NIH/3T3 细胞) 的毒性作用。

1 材料与方法

收稿日期: 2011-11-28; 修回日期: 2012-03-16

基金项目: 黑龙江省卫生厅科研课题 (编号: 2009-225)

作者简介: 周雪松 (1983—), 男, 在读硕士, 主要从事工业毒理学研究。

通讯作者: 吴永会, 男, E-mail: 103071182@qq.com。

1.1 受试物与靶细胞

受试物采自国内某工厂柴油机尾部废气颗粒物, 经玻璃纤维滤膜阻留采样, 二氯甲烷索氏提取法提取。NIH/3T3 细胞购自北京市肿瘤研究所。

1.2 主要试剂和仪器

正常熔点的琼脂糖 (NMPA); 低熔点琼脂糖 (LMPA); 溴化乙锭 (EB) 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; MTT 1.0 mg/ml 。电泳仪 (Bio-RAD200/2.0, 美国 Bio-RAD 公司), OLYMPUS 荧光显微镜 (NIKONE600, 日本 OLYMPUS 公司)。

1.3 细胞相对存活率的 MTT 法检测

柴油机废气颗粒物浓度分别为 500.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、250.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、125.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、62.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组作为阴性对照组。在 37℃、5% CO_2 培养箱中分别培养 12、24、36 h。计算细胞相对存活率。

1.4 细胞 DNA 损伤的检测

将 NIH/3T3 细胞接种于培养瓶内, 24 h 细胞贴壁后加入受试物, 受试物分 5 个剂量组 (500.00、250.00、125.00、62.50、0 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 将 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 作为阴性对照组, 每组 3 瓶分别培养 2、4、8 h, PBS 冲洗终止染毒。取未加受试物的 3 瓶细胞用超净工作台上的紫外灯照射 3 min 做阳性对照。进行彗星试验并使用 EB 染色, 用软件对拖尾细胞进行分析, 将数据存入数据库。

1.5 统计分析

应用 SPSS18.0 统计软件对数据进行分析。细胞存活率和彗星试验结果数据组间差异比较采用单因素方差分析; 不同组细胞拖尾率采用 χ^2 检验。

2 结果

2.1 柴油机废气颗粒物对 NIH/3T3 细胞相对存活率的影响

受试物在不同浓度下, 细胞的相对存活率下降, 随作用

时间增长,受试物浓度增加,细胞存活率下降也随之增加。在浓度为 500 $\mu\text{g/ml}$ 时,细胞存活率明显降低;作用 36 h 时,细胞的存活率仅为 22.60%。

2.2 柴油机废气颗粒物致 NIH/3T3 细胞 DNA 损伤的程度

各组细胞给予不同浓度受试物后,均有不同程度的拖尾;随着作用时间的增加和作用浓度的增加,细胞拖尾率增高。高浓度组细胞拖尾率随时间延长而增加,且实验组与对照组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。柴油机废气颗粒物致细胞损伤的尾矩均随着作用时间和作用浓度的增加而增大,

表 1 柴油机废气颗粒物不同浓度、不同作用时间 NIH/3T3 细胞的拖尾率和尾矩

组别	拖尾率 (%)			尾矩 ($n=3, \bar{x} \pm s$)		
	2 h	4 h	8 h	2 h	4 h	8 h
阴性对照组	4.00	4.00	3.50	0.45 $\pm$ 0.05	0.48 $\pm$ 0.05	0.40 $\pm$ 0.04
染毒 62.50 $\mu\text{g/ml}$ 组	15.50 ^{ab}	30.50 ^{ab}	36.50 ^{ab}	1.17 $\pm$ 0.14 ^b	1.20 $\pm$ 0.10 ^b	1.37 $\pm$ 0.06 ^{ab}
染毒 125.00 $\mu\text{g/ml}$ 组	22.50 ^{ab}	41.50 ^{ab}	43.50 ^{ab}	1.14 $\pm$ 0.14 ^b	1.24 $\pm$ 0.09 ^{ab}	1.53 $\pm$ 0.09 ^{ab}
染毒 250.00 $\mu\text{g/ml}$ 组	31.50 ^{ab}	47.00 ^{ab}	49.00 ^{ab}	1.27 $\pm$ 0.16 ^b	1.40 $\pm$ 0.09 ^{ab}	1.57 $\pm$ 0.11 ^{ab}
染毒 500.00 $\mu\text{g/ml}$ 组	42.50 ^{ab}	52.00 ^{ab}	66.50 ^{ab}	1.52 $\pm$ 0.16 ^{ab}	1.58 $\pm$ 0.08 ^{ab}	1.82 $\pm$ 0.12 ^{ab}
阳性对照组	90.00	92.00	92.00	2.79 $\pm$ 0.15	2.79 $\pm$ 0.17	2.80 $\pm$ 0.14

注:与阴性对照组比较, a $P < 0.05$; 与阳性对照组比较 b $P < 0.05$ 。

表 2 柴油机废气颗粒物不同浓度、不同作用

时间 NIH/3T3 细胞尾长 ($n=3, \bar{x} \pm s$) μm

组别	2 h	4 h	8 h
阴性对照组	8.14 $\pm$ 0.99	8.74 $\pm$ 0.93	8.36 $\pm$ 0.88
染毒 62.50 $\mu\text{g/ml}$ 组	9.83 $\pm$ 0.41 ^b	10.73 $\pm$ 0.38 ^b	12.53 $\pm$ 0.42 ^{ab}
染毒 125.00 $\mu\text{g/ml}$ 组	10.37 $\pm$ 0.53 ^b	10.92 $\pm$ 0.46 ^{ab}	12.23 $\pm$ 0.36 ^{ab}
染毒 250.00 $\mu\text{g/ml}$ 组	10.13 $\pm$ 0.49 ^b	11.25 $\pm$ 0.45 ^{ab}	11.24 $\pm$ 0.38 ^{ab}
染毒 500.00 $\mu\text{g/ml}$ 组	11.52 $\pm$ 0.61 ^{ab}	11.78 $\pm$ 0.52 ^{ab}	11.77 $\pm$ 0.40 ^{ab}
阳性对照组	15.44 $\pm$ 0.42	14.17 $\pm$ 0.40	15.92 $\pm$ 0.50

注:与阴性对照组比较, a $P < 0.05$; 与阳性对照组比较, b $P < 0.05$ 。

3 讨论

细胞拖尾率和尾矩表示细胞的损伤程度,用细胞尾部 DNA 含量和尾矩反映细胞损伤特征。柴油机废气颗粒物在不同的浓度和不同的作用时间可以引起细胞 DNA 不同程度的损伤,随着作用时间的延长和作用浓度的增加,细胞的拖尾率和尾矩有增多的趋势。细胞尾长也随着作用时间的增加而增大。

长期接触柴油机废气颗粒物可引起氧化应激反应^[5],同时还可以通过有丝分裂原活化蛋白激酶信号途径和转录因子(尤其是核因子和活化蛋白 1)削弱细胞的抗氧化能力,其干扰了 DNA 的正常代谢,特别是 DNA 修复酶的修复能力^[6]。本次研究结果表明,细胞尾部 DNA 含量随着受试物作用时间的延长和作用浓度的增加而增多;而尾长表现不明显,考虑其可能随着时间的延长和作用浓度的增加,特别是 4 h 后, DNA

仅 2 h 时 125.00 $\mu\text{g/ml}$ 染毒组的尾矩小于 62.50 $\mu\text{g/ml}$ 染毒组的尾矩,且实验组与对照组比较,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 受试物致 NIH/3T3 细胞 DNA 损伤的特征

柴油机废气颗粒物 500.00 $\mu\text{g/ml}$ 染毒组作用 2 h 细胞尾长与阴性对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);除 62.50 $\mu\text{g/ml}$ 染毒组作用 4 h 外,其余细胞尾长与阴性对照组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

修复酶激活,将小片段修复,从而在彗星图像中显示大碎片增多。本次研究只是将柴油机废气颗粒物作为整体,研究其细胞毒性和 DNA 损伤,由于柴油机废气颗粒物组成成分复杂,各组分之间是否有协同作用和毒性机制,还有待于进一步的探讨。

参考文献:

- [1] 陈薛,宋崇林,张延峰,等. 柴油机颗粒中直接致突变物对细胞 DNA 的损伤 [J]. 卫生毒理学杂志, 2001, 15 (4): 222-224.
- [2] Brita Bejjie. Diesel Exhaust [R]. Criteria Documents for the Nordic Expert Group, 1993.
- [3] Miriam E Gerlofs-Nijland, Damien van Berlo, Felming R Cassee, *et al.* Effect of prolonged exposure to diesel engine exhaust on proinflammatory markers in different regions of the rat brain [J]. Particle and fibre toxicology, 2010, 7: 12.
- [4] Li Rongsong, Ning Zhi, Cui Jeffrey, *et al.* Diesel exhaust particles modulate vascular endothelial cell permeability: Implication of ZO-1 expression [J]. Toxicology Letters, 2010, 197: 163-168.
- [5] Li Ying Ji, Hajime Takizawa, Arata Azuma, *et al.* The effects of oxidative stress induced by prolonged low-dose diesel exhaust particle exposure on the generation of allergic airway inflammation differ between BALB/c and C57BL/6 mice [J]. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2009, 31 (2): 230-237.
- [6] Hajime Takizawa. Diesel exhaust particles and their effect on induced cytokine expression in human bronchial epithelial cells [J]. Genetics and Epidemiology, 2004, 4: 355-359.