

铜元素含量差异均无统计学意义 ($\chi^2 = 5.832$, $P = 0.120$)。

表 2 DEHP 对子代大鼠睾丸组织铜锌微量元素含量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Zn	Cu
对照组	29.12 ± 8.08	0.553 ± 0.063
染毒 10 mg/kg 剂量组	28.28 ± 6.04	0.615 ± 0.074
染毒 100 mg/kg 剂量组	26.47 ± 3.79	0.608 ± 0.066
染毒 500 mg/kg 剂量组	21.65 ± 1.65*	0.554 ± 0.042

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

3 讨论

大量的研究已经证实, DEHP 是一种过氧化物酶体增殖剂, 可能是通过激活生物体内的过氧化物酶体增殖物激活受体 (PAPR), 引起编码过氧化物酶体内各种酶的基因选择性转录, 使活性氧 ROS 为主的各种自由基增加, 产生氧化应激状态^[3]。超氧化物歧化酶、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶一起共同清除体活性氧, 减轻和阻止活性氧的过氧化作用, SOD 构成机体对 ROS 侵袭的第一道防线, 它将超氧阴离子转为过氧化氢和其他氢过氧化物。随着 DEHP 浓度升高, 经代谢后能产生大量的自由基引起脂质过氧化作用^[4-5]。诱导产生的自由基, 超过机体代偿清除能力, 未被及时清除, 对细胞产生毒性损伤, 引起包括抗氧化酶在内的细胞活性降低。本研究发现睾丸 MDA 水平随 DEHP 染毒剂量增加而升高, 而 500 mg/kg 剂量组 MDA 水平升高、SOD 活力下降, 说明 DEHP 或其代谢产物可以启动氧化应激机制, 使睾丸组织发生脂质过氧化, 可能导致睾丸损伤。

锌是机体必需微量元素之一, 与生殖系统发育和功能密切相关。缺锌大鼠睾丸及附睾发育不良, 附睾上皮细胞内有空泡形成, 部分细胞核被推向腔面, 细胞间隙增宽, 静纤毛融合, 管腔内精子数量稀少, 可见少量脱落的细胞核, 间质呈纤维化^[6]。有研究表明在器官形成的关键时期, DEHP 通

过影响与锌代谢有关的基因表达导致畸形。与锌代谢有关的基因有金属硫蛋白-1 (metallothionein, MT-1)、金属硫蛋白-2 (metallothionein, MT-2)、锌转运体蛋白 (zinc transporter, ZnT-1) 等, 研究结果显示在妊娠早期 DEHP 的暴露, 母体肝脏中 MT-1、MT-2 和 ZnT-1 表达上升, 胎鼠脑组织中 MT-1、MT-2 和 ZnT-1 表达下降, 内脏卵黄囊中表达情况未发生明显改变, 可以作为辅酶、辅助因子, 参与一系列生命活动, 因此锌代谢紊乱可能与 DEHP 的胚胎毒性有关^[7]。本实验表明 DEHP 可引起子代大鼠睾丸锌含量显著降低, 由此推测 DEHP 引起机体内锌代谢障碍是造成睾丸萎缩的可能原因之一。另外, 作为 Cu-Zn SOD 酶的必需微量元素之一, 锌含量降低与总 SOD 活性下降结果相对应, 故也可推测微量元素含量降低、抗氧化酶活性下降、脂质过氧化水平升高及 DEHP 所致睾丸发育毒性间存在某些必然联系, 使我们有兴趣在前期工作基础上值得进行深入研究。

参考文献:

- [1] 赵文红, 厉曙光. VitC、VitE 对 DEHP 致果蝇脂质过氧化作用的拮抗 [J]. 同济大学学报医学版, 2003, 24: 179-181.
- [2] Chael Joffel. Are problems with male reproductive health caused by endocrine disruption [J]. Occup Environ Med, 2001, 58: 281-288.
- [3] 王蕊, 王明燕, 李厚勇, 等. DEHP 致大鼠肝组织细胞凋亡的实验研究 [J]. 职业与健康, 2001, 17 (9): 9-10.
- [4] 张蕴晖. 邻苯二甲酸二乙基己酯对环境和生物体的危害 [J]. 国外医学卫生学分册, 2002, 29 (2): 73-77.
- [5] 宋晓峰, 魏光辉. 医用塑料增塑剂 DEHP 安全性研究及对策 [J]. 国外医学卫生学分册, 2005, 32 (6): 358-361.
- [6] Tuerk M J, Fazel N. Zinc deficiency [J]. Curr Opin Gastroenterol, 2009, 25 (2): 136-143.
- [7] Lee J, Park J, Jang B, et al. Altered expression of genes related to zinc homeostasis in early mouse embryos exposed to di-(2-ethylhexyl)-phthalate [J]. Toxicol Lett, 2004, 152 (1): 1-20.

大鼠吸入氯气后肺表面活性物质相关蛋白 - A 表达变化

Changes on pulmonary surfactant associated protein A expression in chlorine-inhaled rats

江俊康, 覃江纯, 许培培, 瞿建华, 王春, 陈刚

JIANG Jun-kang, QIN Jiang-chun, XU Pei-pei, QU Jian-hua, WANG Chun, CHEN Gang

(南通大学公共卫生学院, 江苏 南通 226019)

摘要: 取 40 只雄性 SD 大鼠随机分为 1 个对照组和 4 个不同浓度的氯气染毒组, 染毒 10 min, 6 h 后行血气分析, 取肺组织测湿重干重比 (W/D) 和病理切片观察, ELISA 法测支气管肺泡灌洗液 (BALF) 和血清 SP-A 蛋白表达水平, RT-PCR 法测肺组织 SP-A mRNA 相对表达。与对照组相比, 各染

毒组大鼠 BALF 中 SP-A 蛋白和肺组织 SP-A mRNA 水平均有降低, 血清 SP-A 蛋白水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果提示 SP-A 表达改变可能是大鼠吸入氯气后急性肺损伤 (ALI) 重要的发病机制之一。

关键词: 氯气; 肺表面活性物质相关蛋白-A; 急性肺损伤

中图分类号: R994.3 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2013)02-0109-03

收稿日期: 2012-12-20

作者简介: 江俊康 (1962—), 男, 硕士, 研究方向: 职业中毒防治及其机制研究。

氯气 (Cl_2) 是化学工业中常见的具有强烈刺激性气味的有害气体, 由于管理不善或操作不当所导致的群体性急性中毒事件时有报道^[1]。氯气中毒最常见和最重要的病理改变是 ALI 和肺水肿^[2]。本研究拟通过观察大鼠吸入氯气致 ALI 时 SP-A 蛋白及基因表达的变化, 探讨其发病的可能分子机制, 为临床治疗提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

氯气 (由南通江山农化股份有限公司的纯度 99.8% 液氯减压气化而成)、SP-A ELISA 试剂盒 (Bio-swamp 公司)、RT-PCR 引物及试剂盒 (上海英骏公司) 等。

1.2 实验动物

健康成年雄性 SD 大鼠 40 只, 体重 (200 ± 20) g, 南通大学实验动物中心提供。将实验动物随机分为 1 个对照组和 4 个氯气染毒组。

1.3 染毒

采用动式染毒方法, 大鼠分别吸入 (10.28 ± 1.73)、(42.00 ± 3.18)、(102.00 ± 6.96)、(160.14 ± 6.87) mg/m^3 不同浓度的氯气 10 min。对照组大鼠除吸入空气中不含氯气外, 其它操作与染毒组相同。所有大鼠均在染毒后 6 h 处死。

1.4 标本采集及指标测定

(1) 取腹主动脉血测动脉血氧分压 (PaO_2)。(2) 取右中肺组织, 准确称重后放入 80°C 烘箱, 72 h 后再称重, 计算 W/D 值。(3) 取右上肺组织, 10% 中性甲醛固定 24 h 以上, HE 染色后光学显微镜观察。(4) BALF、血清 SP-A 蛋白表达测定严格按照 Bio-swamp SP-A ELISA 试剂盒操作步骤进行。(5) 取右下肺组织, RT-PCR 法测定 SP-A mRNA 相对表达量。SP-A 引物序列: 上游: $5'-\text{TCTTTGGCCTTCACCCTCTT}-3'$, 下游: $5'-\text{TGGGTACCACTTGGTGTAGT}-3'$, 产物 627 bp; β -actin 引物序列: 上游: $5'-\text{TCTGGAGGCTGTGGTGGCT}-3'$, 下游: $5'-\text{AAGTGACTTCTCGAGCAGGGA}-3'$, 产物 344 bp。逆转录条件: 65°C 5 min, 37°C 2 min, 37°C 50 min 及 70°C 15 min。PCR 条件: 94°C 4 min, 94°C 30 s, 52°C 30 s, 72°C 1 min, 总循环 30 次, 最后延伸 72°C 10 min。于凝胶成像分析系统紫外灯下观察凝胶电泳结果, 用 Quantity One 图像采集系统对凝胶进行图像采集和扫描。

1.5 统计学处理

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 应用 SPSS17.0 软件进行单因素方差分析。

2 结果

2.1 PaO_2 和 W/D 变化

与对照组相比, 各染毒组大鼠 PaO_2 都有所降低, W/D 值升高, $P < 0.05$ 。结果见表 1。

表 1 不同浓度氯气染毒后大鼠 PaO_2 和 W/D 的变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	染毒剂量 (mg/m^3)	PaO_2 (mm Hg)	W/D
对照组	0	141.60 ± 4.88	4.97 ± 0.08
染毒组	10.28 ± 1.73	$111.25 \pm 8.66^*$	$5.59 \pm 0.09^*$
	42.00 ± 3.18	$99.88 \pm 6.13^*$	$6.48 \pm 0.36^*$
	102.00 ± 6.96	$88.40 \pm 4.93^*$	$7.48 \pm 0.11^*$
	160.14 ± 6.87	$70.63 \pm 7.29^*$	$8.31 \pm 0.27^*$

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

2.2 病理改变

对照组大鼠肺组织结构完整, 间质血管无充血, 肺泡腔内未见炎性细胞浸润; 染毒组大鼠肺间质有不同程度的炎性细胞浸润、充血、水肿以及肺泡结构破坏, 甚至出血, 终末细支气管结构破坏。

2.3 BALF、血清 SP-A 蛋白表达变化

与对照组相比, 染毒组大鼠 BALF 中 SP-A 蛋白有所降低, 血清 SP-A 蛋白则升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果见表 2。

表 2 不同浓度氯气染毒后大鼠 BALF 和血清 SP-A 蛋白变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

组别	染毒剂量 (mg/m^3)	SP-A 蛋白	
		BALF	血清
对照组	0	9.76 ± 2.00	3.50 ± 0.50
染毒组	10.28 ± 1.73	$7.52 \pm 2.14^*$	$4.44 \pm 0.40^*$
	42.00 ± 3.18	$6.66 \pm 1.66^{**}$	$4.63 \pm 0.95^*$
	102.00 ± 6.96	$6.21 \pm 1.26^{**}$	$4.74 \pm 0.67^{**}$
	160.14 ± 6.87	$5.27 \pm 0.69^{**}$	$6.74 \pm 0.54^{**}$

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.4 肺组织 SP-A mRNA 表达变化

与对照组相比, 各染毒组大鼠肺组织 SP-A mRNA 表达均降低, 且随染毒浓度增加下降更明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 结果见图 1。

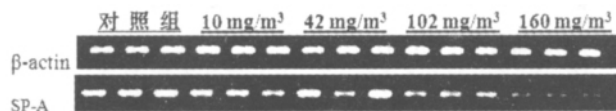


图 1 不同浓度氯气染毒后肺组织 SP-A mRNA 表达变化

3 讨论

SP-A (pulmonary surfactant associated protein A, SP-A) 是肺泡表面活性物质 (pulmonary surfactant, PS) 的重要组成部分, 由肺泡 II 型上皮细胞 (alveolar type II cell, AT II) 合成分泌, 主要生理功能是调节磷脂的分泌和摄取, 并具有免疫防御功能^[3]。有研究发现, 动物 ALI 后, BALF 和/或肺组织 SP-A 表达水平均明显降低^[4-6], 血清 SP-A 表达水平明显升

高^[7,8]。因此, SP-A 是反映 AT II 功能受损及判断预后的特异性指标之一^[9]。

本研究发现, 大鼠吸入氯气后, PaO_2 降低, W/D 升高, 病理检查显示不同程度的炎症细胞浸润、充血、水肿, 且随着染毒浓度升高, 病变加剧; 与对照组相比, 染毒大鼠 BALF 中 SP-A 蛋白和肺组织 SP-A mRNA 表达水平均降低, 血清 SP-A 蛋白水平升高 ($P < 0.05$), 提示 SP-A 参与了氯气中毒性

ALI 的发病过程。推测氯气可直接导致 AT II 受损, SP-A 合成和分泌减少; 或是氯气引起化学性炎症, 使 TNF- α 、IL-1、IL-6 等增多, 进一步抑制 SP-A 表达^[10], 由于氯气吸入可使肺泡-毛细血管膜通透性增加, 使 SP-A 通过损伤的肺泡-毛细血管膜进入血液引起血清中 SP-A 水平升高。

本研究并未观察到明确的氯气染毒浓度与 BALF 及肺组织 SP-A 蛋白水平的剂量依赖性变化, 可能低浓度 (10 mg/m³ 左右) 强烈的腐蚀作用迅速侵袭肺内 AT II, 导致广泛而持续的化学性炎症, 即使进一步提高氯气染毒浓度, 并不能观察到 SP-A 的相应改变; 氯气染毒停止 6 h 后也未见恢复, 其确切机制尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Van Sickle D, Wenck M A, Belflower A, *et al.* Acute health effects after exposure to chlorine gas released after a train derailment [J]. *Am J Emerg Med*, 2009, 27 (1): 1-7.
- [2] Leikauf G D, Pope-Varsalona H, Concel V J, *et al.* Functional genomics of chlorine-induced acute lung injury in mice [J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2010, 7 (4): 294-296.
- [3] Fisher A B, Dodia C, Ruckert P, *et al.* Pathway to lamellar bodies for surfactant protein A [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2010, 299 (1): 151-58.
- [4] 朱光发, 钮善福, 蔡映云, 等. 肺表面活性物质在急性油酸性肺

损伤时的变化 [J]. *中国危重病急救医学*, 2000, 12 (9): 525-528.

- [5] 李立萍, 张建新, 李兰芳. 氨基胍对脂多糖诱导的大鼠肺表面活性物质和肺泡巨噬细胞的影响 [J]. *中国药理学通报*, 2009, 25 (7): 876-880.
- [6] Xinmin D, Yunyou D, Chaosheng P, *et al.* Dexamethasone treatment attenuates early seawater instillation-induced acute lung injury in rabbits [J]. *Pharmacol Res*, 2006, 53 (4): 372-379.
- [7] Ishikawa N, Hattori N, Tanaka S, *et al.* Levels of surfactant proteins A and D and KL-6 are elevated in the induced sputum of chronic obstructive pulmonary disease patients: a sequential sputum analysis [J]. *Respiration*, 2011, 82 (1): 10-18.
- [8] Maeda H, Fujita M Q, Zhu B L, *et al.* Pulmonary surfactant-associated protein A as a marker of respiratory distress in forensic pathology: assessment of the immunohistochemical and biochemical findings [J]. *Leg Med (Tokyo)*, 2003, 5 (Suppl 1): S318-321.
- [9] Xiao B, Xu J, Wang G, *et al.* Troglitazone-activated PPAR γ inhibits LPS-induced lung alveolar type II epithelial cells injuries via TNF- α [J]. *Mol Biol Rep*, 2011, 38 (8): 5009-5015.
- [10] Alcorn J F, Wright J R. Surfactant protein A inhibits alveolar macrophage cytokine production by CD14-independent pathway [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2004, 286 (1): L129-136.

砷对脑星形胶质细胞的毒性作用

Toxic effects of arsenite on brain astrocytes

王艳¹, 赵凤红², 金亚平², 马越娇³, 李革新², 吕秀强², 孙贵范²

WANG Yan¹, ZHAO Feng-hong², JIN Ya-ping², MA Yue-jiao³, LI Ge-xin², LV Xiu-qiang², SUN Gui-fan²

(1. 沈阳医学院公共卫生学院职业卫生与职业医学教研室, 辽宁 沈阳 110034; 2. 中国医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 辽宁 沈阳 110001; 3. 辽宁卫生职业技术学院病理解剖教研室, 辽宁 沈阳 110101)

摘要: 探讨砷对脑星形胶质细胞的毒性作用。以原代培养脑星形胶质细胞 (astrocyte, AST) 为实验对象, 在含砷浓度分别为 0、5、10、20、30 $\mu\text{mol/L}$ 的培养液中培养 24 h, 采用 MTT 法检测细胞活力, 流式细胞仪测定细胞线粒体膜电位的水平, 荧光双波长分光光度计法检测细胞内游离钙离子浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$)。与对照组相比, AST 活力及线粒体膜电位水平随砷暴露浓度的增加而明显下降; $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 随砷暴露浓度的增加而显著升高。砷对 AST 具有明显的毒性作用, 在 5 ~ 30 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围内其毒性作用随砷暴露浓度的增加而增强, 可引起 AST 内钙超载, 并破坏线粒体功能。

关键词: 砷; 星形胶质细胞; 线粒体膜电位; 钙离子

中图分类号: R994.6 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2013)02-0111-03

研究显示长期砷暴露可引起实验对象的行为异常和智力障碍^[1,2], 但其毒性作用机制目前尚未完全阐明。星形胶质细胞 (astrocyte, AST) 是脑组织中数量最多的细胞群体, 其功能除支持、保护和营养神经元外, 还参与突触间隙神经递质的清除与代谢、促进突触形成与维护突触的正常功能^[3,4]; AST 还是血脑屏障的结构基础, 在血管和神经元之间形成屏障, 将神经元与外界环境隔离。因此, 血液中的砷透过毛细血管后首先进入 AST, 成为砷在脑组织中初始损伤的靶细胞。本研究以体外原代培养的 Wistar 大鼠的脑 AST 为研究对象, 探讨砷对 AST 的毒性作用, 为阐明砷对中枢神经系统损伤的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要动物和试剂

Wistar 大鼠仔鼠由中国医科大学实验动物中心提供。亚

收稿日期: 2012-06-27; 修回日期: 2012-09-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30972441, 81202158); 辽宁省教育厅资助项目 (No. L2011184); 沈阳医学院优秀人才启动基金资助项目 (No. 20123050)

作者简介: 王艳 (1978—), 女, 讲师, 博士, 研究方向: 砷的神经毒性机制研究。