

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): L51-58.
- [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-S321.
- [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-L136.

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。

砷酸钠 (NaAsO₂, Fluka 公司, 美国), DMEM 培养基 (Hy-clone 公司, 美国), 胎牛血清 (Hyclone 公司, 美国), 胰蛋白酶 (Gibco 公司, 美国), MTT (Sigma 公司, 美国), mouse anti-GFAP 抗体 (Millipore 公司, 美国), Rh123 (Sigma 公司, 美国), fura2-AM (日本同仁化学研究所)。

1.2 AST 原代培养与纯化

无菌条件下取出生 1~3 d 的 Wistar 大鼠仔鼠的双侧大脑半球, 分离出大脑皮质, 仔细剔除脑膜和表面血管, 剪碎后用含 20% 胎牛血清的 DMEM 培养液反复吹打分散细胞, 100 目筛网过滤, 差速贴壁 1 h, 以 1 × 10⁶/ml 的密度加入预先铺有多聚赖氨酸的培养皿中, 置 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养, 24 h 后更换含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 每 3 d 换液 1 次。至第 7 天细胞基本长满皿底后进行传代培养。每 4 d 传代 1 次, 共传 2 次, 经胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 免疫荧光染色进行鉴定, 荧光显微镜下对 GFAP 免疫阳性反应细胞进行计数, 纯度达到 95% 进行下一步实验研究。

1.3 染毒及分组

以 NaAsO₂ 为受试物。将纯培养的 AST 随机分为 5 组, 待细胞形成单层后, 分别换成含 0、5、10、20、30 μmol/L NaAsO₂ 的培养液, 培养 24 h 后进行各指标的检测。

1.4 检测指标

1.4.1 AST 形态观察 将纯化的 AST 接种于 6 孔板中, 按上述方法染毒培养 24 h, 倒置相差显微镜下观察各组细胞形态的变化。

1.4.2 细胞活力 采用 MTT 法, 将 AST 悬液接种于 96 孔板中, 按上述方法染毒培养 24 h 后, 每孔加入 20 μl MTT 试剂, 继续培养 4 h 后弃去培养液, 每孔加入 150 μl 二甲基亚砷 (DMSO) 溶液, 于酶标仪上 490 nm 处测定 OD 值, 通过与对

照组 OD 值的比较, 计算各实验组细胞的相对活力。

1.4.3 线粒体膜电位 将纯化的 AST 接种于 6 孔板中, 按上述方法染毒培养 24 h, 换成含 Rh123 染液的无血清 DMEM, 37 °C 避光孵育 40 min, 弃掉染液, PBS 洗 2 次, 经 0.25% 胰酶消化后 800 r/min 离心 5 min, 制成细胞悬液, 调整细胞密度为 1 × 10⁶/ml, 流式细胞仪检测。激发波长为 488 nm, 发射波长为 525 nm。

1.4.4 细胞内游离钙离子浓度 (intracellular free Ca²⁺ concentration, [Ca²⁺]_i) 将纯化的 AST 接种于 6 孔板中, 按上述方法染毒培养 24 h, 换成含 fura2-AM 染液的无血清 DMEM, 37 °C 避光孵育 45 min, 弃掉染液, PBS 洗 2 次, 经 0.25% 胰酶消化后 800 r/min 离心 5 min, 弃上清后 PBS 洗 1 次, 弃上清, PBS 定容至 1 ml, 荧光双波长分光光度计检测。以激发波长 340 nm 和 380 nm, 发射波长 510 nm 测定荧光强度比值, 加入 10% 的 Triton X-100, 测定最大荧光强度值 F_{max}, 加入 0.3 mol/L 的 EDTA 测定最小荧光强度值 F_{min}, 样品 [Ca²⁺]_i 由日立 F-4500 钙定量测定软件自动输出。

1.5 统计分析

实验数据采用 SPSS 13.0 进行统计分析。多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间两两比较采用 *q* 检验 (SNK)。以 *P* < 0.05 作为差异有统计学意义的判定标准。

2 结果

2.1 AST 形态观察

由图 1 可见, 20 μmol/L 砷暴露后, 少量细胞开始脱壁, 细胞呈圆形; 随着砷暴露浓度的增加, 脱壁细胞数量明显增多, 细胞间隙增大; 30 μmol/L 染砷组细胞变大, 突起变短或消失。5、10 μmol/L 染砷组细胞形态与对照组相比未见明显改变。

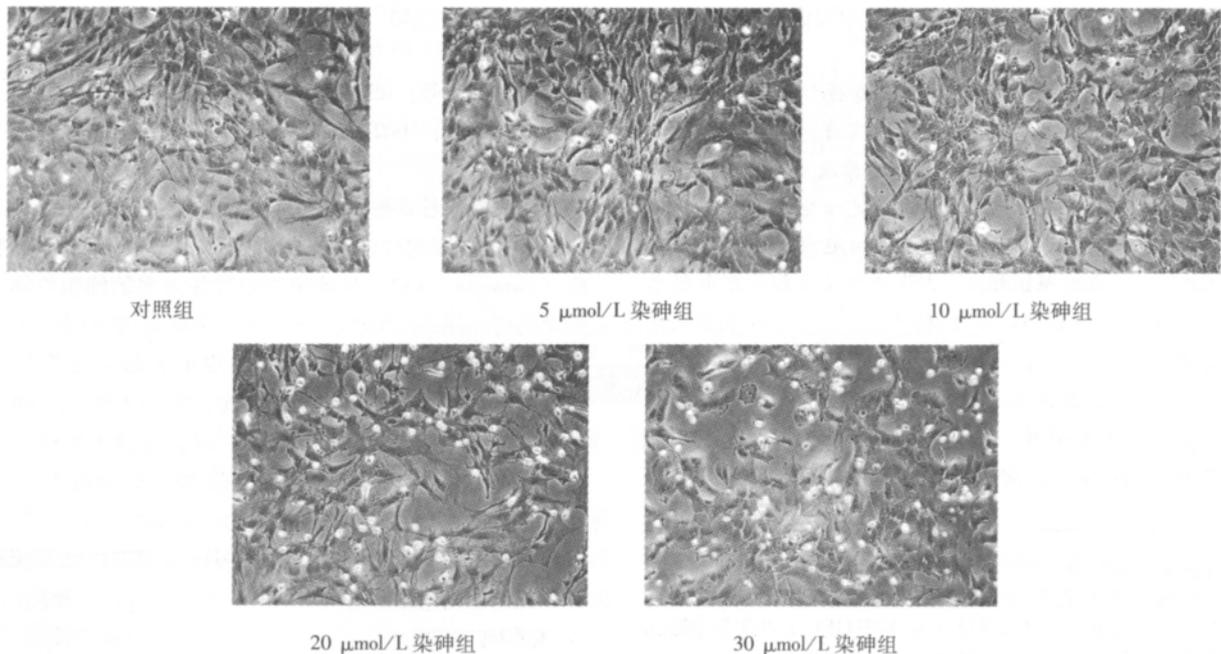


图 1 不同浓度砷暴露后 AST 形态变化 (免疫荧光染色, ×200)

2.2 AST 细胞活力

与对照组相比, 5 μmol/L 砷暴露可引起 AST 细胞活力显著下降, 随砷暴露浓度的增加, 细胞活力均显著下降。

2.3 AST 内线粒体膜电位及 [Ca²⁺]_i

表 1 显示, 不同浓度砷暴露后, AST 内线粒体膜电位随砷暴露浓度的增加而降低, 其中 20、30 μmol/L 染砷组的线粒体膜电位水平显著低于对照组。与对照组相比, 10 μmol/L 砷暴露可引起 AST 内 [Ca²⁺]_i 显著升高, 并随着砷暴露浓度的增加, AST 内 [Ca²⁺]_i 均显著升高。

表 1 不同浓度砷暴露后 AST 内线粒体膜电位及 [Ca²⁺]_i 的比较 (n = 5, $\bar{x} \pm s$)

组别	线粒体膜电位荧光强度	[Ca ²⁺] _i (μmol/L)
对照组	769.60 ± 55.94	0.20 ± 0.03
5 μmol/L 染砷组	746.83 ± 15.72	0.23 ± 0.02
10 μmol/L 染砷组	737.74 ± 15.24	0.26 ± 0.01* #
20 μmol/L 染砷组	580.72 ± 9.62*	0.29 ± 0.02* #Δ
30 μmol/L 染砷组	577.45 ± 15.17*	0.32 ± 0.01* #Δ

注: 与对照组比较, * P < 0.05; 与 5 μmol/L 染砷组比较, #P < 0.05; 与 10 μmol/L 染砷组比较, ΔP < 0.05。

3 讨论

AST 与神经元之间存在复杂的相互作用, 以维持中枢神经系统内环境的平衡。我们前期研究发现, 无机砷及其代谢产物能顺利通过胎盘屏障和血脑屏障进入胎、幼鼠的脑组织^[5], 因此, 发育早期的砷暴露会增加无机砷对中枢神经系统损伤的危险性。在体外细胞毒理实验研究中, 细胞活力的改变是反映有害因素对细胞毒性损伤的较敏感指标。本研究发现, 虽然 5 μmol/L 砷暴露的 AST 形态未发生明显改变, 但 5 μmol/L 砷暴露可明显抑制 AST 活力, 表明 5 μmol/L 砷暴露可对 AST 产生明显的毒性损伤, 且其对 AST 的损伤作用随砷暴露浓度的增加而增强。

线粒体是细胞能量代谢的重要亚细胞单位, 对于维持正常的细胞生理功能起着十分重要的作用。线粒体膜电位是由于线粒体内膜两侧质子及其他离子不平衡而形成的, 是保持线粒体功能所必需的。Rh123 是一种亲脂性阳离子荧光染料, 具有很好的膜通透性, 其荧光信号主要集中于线粒体, 故其荧光强度的变化反映线粒体膜电位的变化。本研究结果显示, 各砷暴露组 AST 的线粒体膜电位随砷暴露浓度的增加而呈下

降的趋势, 20 μmol/L 即引起 AST 内线粒体膜电位的明显改变, 提示砷可能对 AST 内线粒体具有明显的毒性作用, 导致 AST 内线粒体膜电位的下降, 引起 AST 能量代谢的障碍, 并最终对 AST 的生理功能产生毒性损伤作用。有研究表明线粒体在调控细胞凋亡中起关键作用^[6], 线粒体膜电位的降低可引起线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 形成, 导致线粒体通透性的改变, 这种改变是多种促细胞凋亡级联传导信号的枢纽, 本研究结果中砷暴露引起 AST 内线粒体膜电位下降, 可能会激活凋亡核心酶级联反应, 从而诱导细胞凋亡和死亡。

Ca²⁺ 作为细胞内重要的第二信使, 广泛参与细胞内外信息的传递。因此, 细胞内环境中 [Ca²⁺]_i 的稳态对于机体正常生理功能的维持具有重要作用。当细胞受到刺激时可导致细胞膜对 Ca²⁺ 的通透性改变和/或细胞内钙库释放增加, 引起 [Ca²⁺]_i 的变化, 触发一系列的生理、生化反应。本实验结果显示, 10 μmol/L 砷暴露即可引起 AST 内 [Ca²⁺]_i 明显升高, 随着砷暴露浓度的增加, AST 内 [Ca²⁺]_i 进一步升高, 提示砷暴露可导致细胞内钙超载, 从而引起细胞内信号传递的紊乱, 对 AST 产生毒性损伤作用。[Ca²⁺]_i 的变化与线粒体膜电位的变化是否存在相互的关联或影响, 尚需进一步的研究。

参考文献:

[1] Wasserman G A, Liu X, Parvez F, et al. Water arsenic exposure and intellectual function in 6-year-old children in Araihaazar, Bangladesh [J]. Environ Health Perspect, 2007, 115 (2): 285-289.
 [2] Yadav R S, Shukla R K, Sankhwar M L, et al. Neuroprotective effect of curcumin in arsenic-induced neurotoxicity in rats [J]. Neurotoxicology, 2010, 31 (5): 533-539.
 [3] Pirttimaki T M, Hall S D, Parri H R. Sustained neuronal activity generated by glial plasticity [J]. J Neurosci, 2011, 31 (21): 7637-7647.
 [4] Fellin T. Communication between neurons and astrocytes: relevance to the modulation of synaptic and network activity [J]. J Neurochem, 2009, 108 (3): 533-544.
 [5] Jin Y P, Xi S H, Li X, et al. Arsenic speciation transported through the placenta from mother mice to their newborn pups [J]. Environ Res, 2006, 101 (3): 349-355.
 [6] Kwong J Q, Beal M F, Manfredi G. The role of mitochondria in inherited neurodegenerative diseases [J]. J Neurochem, 2006, 97 (6): 1659-1675.

(上接第 97 页)

[8] Verrecchia F, Mauviel A. Transforming growth factor-beta and fibrosis [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13 (22): 3056-3062.
 [9] 卫张蕊, 周国峰. 炎症细胞和细胞因子在肺纤维化中作用的研究进展 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2005, 21 (z1): 85-87.
 [10] Ihn H. Pathogenesis of fibrosis: role off TGF-beta and CTGF [J]. Curr Opin Rheumatol, 2002, 14 (6): 681-685.
 [11] 肖清萍, 孙坚. 肺间质纤维化的发病机制研究进展 [J]. 江西医药, 2007, 42 (6): 569-572.
 [12] 易赛丽, 刘菱芬. III 型前胶原肽——肺纤维化诊断指标 [J].

临床荟萃, 2006, 21 (2): 146-148.

[13] 张志坚, 周从阳, 罗雅娟, 等. 乌司他丁对百草枯中毒大鼠肾脏损伤的保护作用及机制研究 [J]. 中国急救医学, 2011, 31 (8): 718-721.
 [14] Xi H, Akishita M, Nagai K, et al. Potent free radical scavenger edaravone, suppresses oxidative stress-induced endothelial damage and early atherosclerosis [J]. Atherosclerosis, 2007, 191 (2): 281-289.
 [15] 陈慧, 石汉文, 田英平. 百草枯中毒致肺损伤的研究进展 [J]. 临床荟萃, 2006, 21 (2): 146-148.