

## • 实验研究 •

## 电焊尘颗粒物致 NIH/3T3 细胞遗传物质损伤作用的研究

## Injury effect of electric welding dust particles on genetic material in NIH/3T3 cell

周簪荣, 刘艳明, 王玥, 吴永会

ZHOU Zan-rong, LIU Yan-ming, WANG Yue, 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:** 以某电机厂电焊尘采集物为受试物(受试物浓度分别为 100.00  $\mu\text{g/ml}$ 、200.00  $\mu\text{g/ml}$ 、300.00  $\mu\text{g/ml}$ 、400.00  $\mu\text{g/ml}$ 、500.00  $\mu\text{g/ml}$ 、0.00  $\mu\text{g/ml}$ ), 用噻唑蓝(MTT)染色的方法检验作用 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 的细胞 DNA 损伤情况。结果显示, 随着染毒时间的延长和染毒剂量的增加, 细胞存活率下降, 在浓度为 500.00  $\mu\text{g/ml}$  的颗粒物作用细胞 36 h 后, 细胞的存活率仅为 19.02%; 电焊尘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 ( $P < 0.05$ )。提示电焊尘颗粒物可以降低哺乳动物细胞的相对存活率, 并导致 NIH/3T3 细胞不同程度的 DNA 损伤。

**关键词:** 电焊尘颗粒物; DNA 损伤; 细胞毒性

**中图分类号:** R994 **文献标识码:** B

**文章编号:** 1002-221X(2013)03-0195-03

随着我国经济的持续高速发展, 电焊工艺在机械加工、建筑、冶金、造船等领域应用愈加广泛。而电焊作业对健康的危害也引起了广泛关注, 国内外多方面的研究表明, 长期的电焊作业会诱发机体多系统病变<sup>[1]</sup>, 对神经系统<sup>[2]</sup>、呼吸系统<sup>[2]</sup>、眼睛<sup>[3]</sup>、生殖系统<sup>[4]</sup>、免疫系统<sup>[5]</sup>、心血管系统<sup>[6]</sup>均产生不良影响。电焊作业产生的烟尘成分十分复杂<sup>[7]</sup>, 其中化学性有害因素主要有一氧化碳、臭氧、一氧化氮、氧化锰、氧化铁、二氧化硅和硅酸盐等, 物理性有害因素主要有电弧光、高频电磁场等。不同物质对机体作用方式和结果也不一样。我们采用噻唑蓝(MTT)比色法和彗星试验(单细胞凝胶电泳试验), 以某电机厂电焊尘颗粒物为受试物, 检测其对哺乳动物细胞(NIH/3T3 细胞)的毒性作用。

## 1 材料与与方法

### 1.1 受试物与靶细胞

受试物来源于某电机厂电焊作业场所的沉降尘, 使用的焊条是 D107 堆焊, 型号是 1Mn3 22, 主要成分为锰、铁、硅等, 采集的沉降尘用玛瑙研钵磨细后, 检测分散度, 受试物颗粒  $< 5 \mu\text{m}$  者占 99.5%, 受试物用紫外线照射灭菌, 用磷酸盐缓冲液(PBS)配制成 1 mg/ml 母液, 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用,

临用前摇匀, 稀释至一定浓度备用; NIH/3T3 细胞(购自北京市肿瘤研究所)接种于含体积分数为 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养液中, 在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中培养, 用质量分数为 0.25% 的胰酶消化、传代、备用。

### 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  $\mu\text{g/ml}$ , MTT 1.0 mg/ml, 二甲基亚砜(DMSO), 肌氨酸钠; 培养箱(Thermo Scientific Forma Series II 水套  $\text{CO}_2$  培养箱, 美国热电有限公司), 倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司), 医用超净工作台(SW-CI-HFD, 苏州安泰空气技术有限公司), 电泳仪(Bio-RAD200/2.0, 美国 Bio-RAD 公司), 电泳槽(DYCP-31DN, 北京六一仪器厂), 荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。

### 1.3 细胞相对存活率的 MTT 法检测

将 NIH/3T3 细胞接种于 6 块 96 孔板中, 每孔加入细胞浓度为  $6.0 \times 10^4$  个/ml 的细胞悬液。培养 24 h, 细胞贴壁后加入受试物, 每孔加入受试物的终浓度为 100.00  $\mu\text{g/ml}$ 、200.00  $\mu\text{g/ml}$ 、300.00  $\mu\text{g/ml}$ 、400.00  $\mu\text{g/ml}$ 、500.00  $\mu\text{g/ml}$ 、0.00  $\mu\text{g/ml}$  组作为阴性对照, 每个浓度组 10 孔。在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  培养箱中分别培养 12、24、36 h。于各作用时间结束前 4 h 加入 MTT 液 50  $\mu\text{l}$ 。培养结束弃去培养液, 每孔加 DM-SO 150  $\mu\text{l}$ , 振荡 5 min, 在酶标仪 490 nm 波长下测定各孔吸光度(A)值, 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 25 ml 培养瓶内, 每瓶接种  $2.0 \times 10^5$  个细胞, 24 h 细胞贴壁后加入受试物, 受试物分 5 个剂量组(100.00  $\mu\text{g/ml}$ 、200.00  $\mu\text{g/ml}$ 、300.00  $\mu\text{g/ml}$ 、400.00  $\mu\text{g/ml}$ 、500.00  $\mu\text{g/ml}$ ), 将 0.00  $\mu\text{g/ml}$  作为阴性对照组, 取未加受试物的细胞用超净工作台上的紫外灯照射 3 min 做阳性对照, 每组 3 瓶分别培养 2 h、4 h、8 h, PBS 冲洗终止染毒, 分别配制细胞悬液。在终止染毒时, 采用的彗星试验主要步骤如下: (1) 铺片, PBS 液配制质量分数为 0.6% 的 NMPA, 质量分数为 0.8% 的 LMPA, 加热溶解, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅中备用。取 NMPA 100  $\mu\text{l}$  滴加在磨砂载玻片上, 盖上盖玻片使胶均匀展开, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  固化 10 min, 去除盖玻片, 完成第一层胶。取新制备的细胞悬液, 细胞浓度为  $3.0 \times 10^5$  个/ml, 使之与 LMPA 按 1:4 比例混合均匀, 取 100  $\mu\text{l}$  滴加在第一层胶上, 立即盖上盖玻片使胶均匀展开, 在 4  $^{\circ}\text{C}$  固 15 min, 即完成第二层胶。(2) 裂解, 取下盖玻片, 将载玻片浸于新配制的裂

收稿日期: 2012-12-03

作者简介: 周簪荣(1984—), 男, 在读硕士, 主要从事工业毒理学研究。

通讯作者: 吴永会, 教授。

解液 (NaCl 2.5 mmol/ml, EDTA 100 mmol/L, Tris 10 mmol/L, 1% 肌氨酸钠, pH = 10, 用前加入 10% DMSO 和 1% 的 Triton X-100) 中, 在 4 °C 下避光静置 1 h。(3) DNA 解旋, 从裂解液中去除载玻片, 按一定的方向置于电泳槽中, 页面高于载玻片 2 mm, 4 °C 避光静置 30 min。(4) 在 4 °C 避光条件下, 电压 18 V, 电流 170 mA, 电泳 30 min。(5) 从电泳槽中取出载玻片, 置于中和液 (Tris-HCl 0.4 mol/L, pH = 7.5) 中 15 min。(6) RB 染色, 晾干, 每片胶上滴加 50 μl 的 EB, 24 h 内完成阅片。(7) 通过与荧光显微镜相连的电脑中的 comet system (Device: Matrox Meteor II) 软件对细胞进行观察与分析。将载玻片编为盲片, 计数每个视野下的所有细胞, 同一剂量和时间点共计数 200 个细胞, 尾部 DNA 含量大于 5% 的细胞为拖尾细胞, 使用软件分析拖尾细胞, 将数据存入数据库。

1.5 统计分析

应用 SPSS 18.0 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  $\chi^2$  检验。

2 结果

2.1 电焊尘颗粒物对 NIH/3T3 细胞相对存活率的影响

受试物在不同浓度下作用细胞一定时间后, 细胞的相对存活率下降, 随作用时间增长, 受试物浓度增加, 细胞的存活率随之下降, 在 12 h 作用时间除浓度为 100.00 μg/ml 组外, 其余细胞相对存活率与阴性对照组比较, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图 1。

2.2 电焊尘颗粒物致 NIH/3T3 细胞 DNA 损伤的程度

各组细胞给予不同浓度的受试物后, 均有不同程度的拖

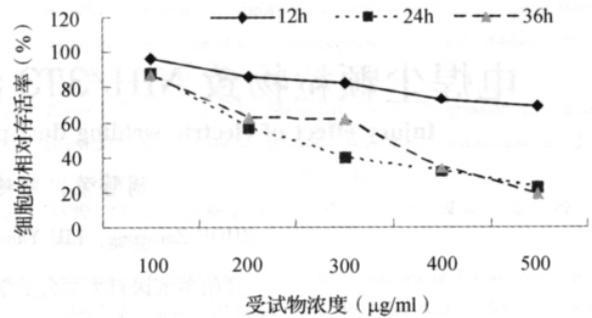


图 1 不同浓度电焊尘颗粒物不同作用时间 NIH/3T3 细胞的相对存活率

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。在低浓度组 (100.00 μg/ml 和 200.00 μg/ml) 电焊尘颗粒物作用 4 h 所致拖尾率最大; 随着作用时间的增加, 拖尾率稍有下降。在高浓度组 (400.00 μg/ml 和 500.00 μg/ml) 细胞拖尾率随时间的增加而增加, 且实验组与阴、阳性对照组比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。电焊尘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, 实验组与阴、阳性对照组比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

2.3 受试物对 NIH/3T3 细胞 DNA 损伤的特征

电焊尘颗粒物在低浓度 100.00 μg/ml 染毒组与高浓度 500.00 μg/ml 染毒组在 2 h、4 h、8 h 尾部 DNA 含量均变化较大; 随着作用时间和作用浓度的增加尾部 DNA 含量随之增加, 500.00 μg/ml 染毒组作用细胞 8 h 时, 尾部 DNA 含量增至 20.36%。本实验各浓度组细胞尾长与阴、阳性对照组比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表 2。

表 1 不同浓度电焊尘颗粒物不同作用时间 NIH/3T3 细胞的拖尾率、尾矩 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别	拖尾率 (%)			尾矩		
	2 h	4 h	8 h	2 h	4 h	8 h
阴性对照组	3.00	3.00	3.50	0.40 ± 0.05	0.41 ± 0.01	0.39 ± 0.12
100.00 μg/ml 染毒组	13.50 <sup>ab</sup>	20.50 <sup>ab</sup>	29.00 <sup>ab</sup>	1.08 ± 0.04 <sup>ab</sup>	1.21 ± 0.11 <sup>ab</sup>	1.27 ± 0.10 <sup>ab</sup>
200.00 μg/ml 染毒组	17.50 <sup>ab</sup>	31.50 <sup>ab</sup>	41.50 <sup>ab</sup>	1.13 ± 0.16 <sup>ab</sup>	1.24 ± 0.08 <sup>ab</sup>	1.43 ± 0.07 <sup>ab</sup>
300.00 μg/ml 染毒组	25.50 <sup>ab</sup>	34.00 <sup>ab</sup>	48.00 <sup>ab</sup>	1.20 ± 0.06 <sup>ab</sup>	1.40 ± 0.07 <sup>ab</sup>	1.57 ± 0.13 <sup>ab</sup>
400.00 μg/ml 染毒组	33.00 <sup>ab</sup>	44.00 <sup>ab</sup>	55.50 <sup>ab</sup>	1.40 ± 0.13 <sup>ab</sup>	1.55 ± 0.12 <sup>ab</sup>	1.72 ± 0.08 <sup>ab</sup>
500.00 μg/ml 染毒组	44.00 <sup>ab</sup>	53.00 <sup>ab</sup>	66.50 <sup>ab</sup>	1.61 ± 0.07 <sup>ab</sup>	1.78 ± 0.04 <sup>ab</sup>	1.87 ± 0.02 <sup>ab</sup>
阳性对照组	93.00	93.00	91.00	2.85 ± 0.12	2.83 ± 0.14	2.92 ± 0.03

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

表 2 不同浓度电焊尘颗粒物不同作用时间 NIH/3T3 细胞的尾部 DNA 含量、尾长 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别	DNA 含量 (%)			尾长 (μm)		
	2 h	4 h	8 h	2 h	4 h	8 h
阴性对照组	5.63 ± 0.23	5.69 ± 0.32	5.73 ± 0.14	7.86 ± 0.33	8.04 ± 0.72	7.36 ± 0.58
100.00 μg/ml 染毒组	10.82 ± 0.76 <sup>ab</sup>	11.94 ± 0.80 <sup>ab</sup>	13.01 ± 0.34 <sup>ab</sup>	8.87 ± 0.31 <sup>b</sup>	9.01 ± 0.35 <sup>b</sup>	13.03 ± 0.22 <sup>ab</sup>
200.00 μg/ml 染毒组	12.56 ± 0.57 <sup>ab</sup>	13.98 ± 0.65 <sup>ab</sup>	15.88 ± 0.64 <sup>ab</sup>	10.90 ± 0.74 <sup>ab</sup>	13.85 ± 0.12 <sup>ab</sup>	14.00 ± 0.17 <sup>ab</sup>
300.00 μg/ml 染毒组	13.01 ± 0.35 <sup>ab</sup>	15.63 ± 0.77 <sup>ab</sup>	18.22 ± 0.82 <sup>ab</sup>	12.58 ± 0.51 <sup>ab</sup>	13.95 ± 0.21 <sup>ab</sup>	13.76 ± 0.67 <sup>ab</sup>
400.00 μg/ml 染毒组	15.29 ± 0.44 <sup>ab</sup>	16.36 ± 0.46 <sup>ab</sup>	18.52 ± 0.52 <sup>ab</sup>	13.88 ± 0.42 <sup>ab</sup>	15.05 ± 0.73 <sup>ab</sup>	15.11 ± 0.34 <sup>ab</sup>
500.00 μg/ml 染毒组	17.26 ± 0.63 <sup>ab</sup>	19.65 ± 0.79 <sup>ab</sup>	20.36 ± 0.71 <sup>ab</sup>	14.01 ± 0.33 <sup>ab</sup>	15.67 ± 0.52 <sup>ab</sup>	15.77 ± 0.36 <sup>ab</sup>
阳性对照组	26.66 ± 0.83	27.15 ± 0.19	25.90 ± 0.30	17.01 ± 0.31	18.17 ± 0.40	18.77 ± 0.25

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

## 3 讨论

不同浓度的受试物对 NIH/3T3 细胞存活率的影响呈剂量-反应关系。相同时间下,受试物浓度越高,细胞成活率越低;受试物浓度相同,作用时间越长,细胞成活率越低;空白对照组的细胞数量明显高于各实验组,并且受试物浓度越高,这种差别越明显。在浓度为 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  作用 36 h 时,细胞的存活率仅为 19.02%。表明电焊尘颗粒物可明显降低细胞的存活率,但随着作用时间的延长存活率变化的幅度减小,尤其在浓度为 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、300  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、400  $\mu\text{g}/\text{ml}$  作用 36 h 时存活率甚至有所增加。

我们用拖尾率和尾矩表示细胞的损伤程度,用尾部 DNA 含量和尾矩反映细胞损伤特征,电焊尘颗粒物在不同的浓度和不同的作用时间可引起细胞 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,细胞有拖尾率增多和尾矩加大的趋势;细胞的尾部 DNA 含量也随着作用时间的增加而增大。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,虽然各剂量组尾长与阴、阳性对照组尾长差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),但同一剂量不同时间的尾长差异并不明显,考虑其可能是随着时间的延长和作用浓度的增加,特别是 4 h 后, DNA 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。

电焊作业产生的烟尘主要成分为二氧化锰、三氧化二铁、二氧化硅<sup>[8]</sup>等,其中的锰已经被证实对遗传物质有损伤<sup>[9]</sup>,有研究表明锰对遗传物质损伤原理有可能是氧化应激<sup>[10,11]</sup>。本次研究只是将电焊尘颗粒物作为整体,研究其细胞毒性和对 DNA 损伤,由于电焊尘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研究。

## 参考文献:

- [1] 王先良. 电焊对作业工人健康的影响 [J]. 国外医学·卫生学分册, 2003, 30 (1): 5-8.
- [2] 王薇, 林英, 朱瑞, 等. 北京某厂电焊作业职业卫生评价及对工人呼吸、神经系统健康的影响 [J]. 北京大学学报(医学版), 2010, 42 (3): 356-359.
- [3] 王江明, 卢新伟, 纪双丽. 电焊工外眼疾患的调查分析 [J]. 河南预防医学杂志, 2009, 20 (2): 115-124.
- [4] 牛心华. 锰作业女工生殖机能调查 [J]. 河南预防医学杂志, 2008, 19 (4): 264-277.
- [5] 李志刚, 杨雪飞. 电焊作业对接触人员脂质过氧化及体液免疫水平影响调查 [J]. 现代预防医学, 2009, 36 (19): 3641-3642.
- [6] 江兰, 刘移民. 电焊对作业人员心血管功能的影响 [J]. 职业与健康, 2011, 27 (12): 1356-1358.
- [7] 张军. 焊接操作中的职业危害因素及防护 [J]. 预防医学论坛, 2006, 12 (5): 573-574.
- [8] 傅吉全. 电焊烟尘的危害及其防护效果 [J]. 中国个体防护装备, 2012, (5): 11-15.
- [9] 郭松超, 陆彩玲, 李习艺, 等. 锰对神经元细胞 DNA 损伤作用 [J]. 中国公共卫生, 2008, 24 (9): 1101-1102.
- [10] 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.
- [11] 张杰, 李洁, 吴萍. 氧化应激在锰神经毒性中的作用 [J]. 首都医科大学学报, 2008, 29 (5): 664-667.

## 创伤性脑损伤大鼠血小板膜糖蛋白表达的变化

## Changes of expressions of platelet membrane glycoprotein CD31 and CD62p in rats with traumatic brain injury

雷箴<sup>1</sup>, 王国忠<sup>2</sup>, 贾兴元<sup>1</sup>LEI Zhen<sup>1</sup>, WANG Guo-zhong<sup>2</sup>, JIA Xing-yuan<sup>1</sup>

(1. 首都医科大学附属北京朝阳医院医学研究中心, 北京 100020; 2. 民航总医院氧疗医学科, 北京 100123)

**摘要:** 为探讨血小板活化在创伤性脑损伤 (TBI) 大鼠急性期的作用, 建立侧位液压撞击致重度 TBI 大鼠模型, 应用流式细胞术在相应时间点检测各组大鼠血小板膜糖蛋白 CD31 和 CD62p 的表达。结果显示, TBI 大鼠 6 h 组、24 h 组、48 h 组、96 h 组血小板膜糖蛋白 CD31 和 CD62p 表达均明显高于假手术组 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。提示 TBI 大鼠在急性期存在血小板活化增强, 利于微血栓形成, 加重继发性脑损伤。

**关键词:** 创伤性脑损伤; 血小板膜糖蛋白; 血小板活化; 流式细胞术

中图分类号: R826.62 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2013)03-0197-03

我国创伤性脑损伤 (traumatic brain injury, TBI) 发生率和因 TBI 致死致残的患者逐年增加。在 TBI 患者中, 脑缺血是继发性损伤中最常见的病理改变, 而且是最重要的预后影响因素; 而血管内微血栓形成则是导致脑缺血的一个重要原因<sup>[1]</sup>。血小板膜糖蛋白是血小板粘附到血管壁成分和血小板之间相互作用的关键物质, 它包括 CD31 (GP II a, 血小板内

收稿日期: 2013-01-17; 修回日期: 2013-03-18  
作者简介: 雷箴 (1963—), 女, 主管技师, 主要从事神经病学基础研究工作。  
通讯作者: 贾兴元, 副研究员, E-mail: jiaxy@hotmail.com。