

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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ 、300 $\mu\text{g/ml}$ 、400 $\mu\text{g/ml}$ 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^[8]等,其中的锰已经被证实对遗传物质有损伤^[9],有研究表明锰对遗传物质损伤原理有可能是氧化应激^[10,11]。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¹, 王国忠², 贾兴元¹LEI Zhen¹, WANG Guo-zhong², JIA Xing-yuan¹

(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^[1]。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。

皮细胞粘附分子-1)、CD62p (GMP-140, P-选择素) 等成分。本研究拟应用流式细胞术观察 TBI 大鼠血小板膜糖蛋白 CD31 和 CD62p 表达的变化, 探讨血小板活化在 TBI 急性期的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物和分组

清洁级成年雄性 SD 大鼠 40 只, 购自北京大学医学部实验动物中心, 体重 220 ~ 250 g, 常规条件下标准饲料喂养。依抽签法将大鼠随机分为 5 组, 按损伤后不同时间点设 TBI 后 6 h 组 (TBI 6 h 组)、TBI 24 h 组、TBI 48 h 组和 TBI 96 h 组, 并设假手术组, 每组 8 只。

1.2 主要试剂和仪器

PE 标记的大鼠 CD31 抗体、FITC 标记的大鼠 CD62p 抗体, 美国 PHARMINGEN 公司产品; DWC150-300 型动物实验舱, 上海 701 所; Calibur 流式细胞仪, 美国 BD 公司; HPD-1700 创伤性脑外液压撞击仪, 美国 DRAGONFLY 研究与发展公司。

1.3 TBI 动物模型的建立

参照文献 [2], 建立侧位液压撞击致重度 TBI 大鼠模型。用 5% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠 (300 mg/kg 体重), 固定于立体定位仪上, 于右侧颅顶切开皮肤, 在右顶骨距颅骨人字缝 4 mm、矢状缝左侧 3 mm 处钻孔, 直径 4 mm, 硬脑膜保持完整。将孔径为 3 mm 的打击管粘接于钻孔处, 缝合皮肤, 24 h 后再次将动物麻醉, 于液压撞击仪的储液管中注满生理盐水, 将储液管与颅骨上打击管相连, 松开打击锤使生理盐水冲击大鼠脑组织。根据示波器波幅, 预先设置打击锤角度, 予以重度 TBI 打击力度; 取下打击管后缝合切口。假手术组只行颅骨钻孔及埋置打击管, 不行液压撞击。

1.4 取样和检测方法

TBI 组按相应时间点 (假手术组在手术后 24 h) 从大鼠心脏采血 0.5 ml (3.8% 枸橼酸钠 1:9 抗凝), 用流式细胞仪检测标本, 每管收集 10 000 个 CD31 阳性血小板, 记录 CD31 的平均荧光强度和 CD62p 阳性率。

1.5 统计学处理

用 SPSS11.5 统计软件, 实验数据以均数 ± 标准差表示, 组间均数比较采用方差分析, 两两比较加用 *q* 检验。

2 结果

TBI 48 h 组及 96 h 组各有 1 只大鼠死亡。TBI 6 h 组、24 h 组、48 h 组、96 h 组大鼠血小板膜糖蛋白 CD31 和 CD62p 表达均明显高于假手术组。见表 1。

表 1 TBI 大鼠血小板膜糖蛋白 CD31 和 CD62p 表达的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	CD31 (荧光强度)	CD62p (%)
假手术组	8	18.88 ± 5.52	19.49 ± 6.10
TBI 6 h 组	8	30.82 ± 8.97**	34.45 ± 9.12**
TBI 24 h 组	8	33.41 ± 7.16**	33.47 ± 7.86**
TBI 48 h 组	7	32.50 ± 9.16**	33.89 ± 7.52**
TBI 96 h 组	7	29.00 ± 5.03*	30.42 ± 6.39**

注: 与假手术组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

正常人的血小板在循环血液中基本处于静息状态, 但在多种病理因素如机械、高血压、高血糖、免疫或缺血再灌注等作用下, 血管内皮细胞受损, 内皮下胶原等成分暴露, 与流经此处的血小板粘附, 导致血小板活化。血小板活化包括粘附、聚集以及释放 β -血小板球蛋白 (β -TG) 和血小板第四因子 (PF-4) 等颗粒内容物 [3,4]。CD31 是一粘附分子, 属于免疫球蛋白超家族成员, 存在于内皮细胞、白细胞和血小板质膜上; CD31 在血小板的分布并不局限于质膜表面, 有 20% ~ 30% 分布在 α -颗粒膜上, 经凝血酶等因素激活后血小板质膜上 CD31 表达显著增加 [5]。CD62p 主要存在于静息血小板的 α -颗粒膜及血管内皮的 Weibel-Palade 小体上, 当血小板受到内皮下暴露的胶原、凝血酶、组织胺等因素刺激时, α -颗粒和 Weibel-Palade 小体迅速与细胞膜融合, CD62p 在细胞膜上表达增高, 继而参与血小板粘附、聚集反应, 是反映血小板活化的重要指标 [3,4]。

血管内微血栓形成在 TBI 后脑组织中普遍存在。Stein 等 [6] 报道 TBI 死亡患者的创伤侧脑组织以及没有直接受创伤的部分均可见到大量血管内微血栓形成, 而且微血栓密度与神经元坏死程度密切相关。张军等 [7] 发现液压撞击伤后大鼠脑血管内有大量微血栓形成, 伤后 12 h 即有微血栓形成, 此后逐渐增多, 伤后 7 d 逐渐下降, 并发现在脑内微血栓相对集中区域有大量的变性神经元。作者认为 TBI 后脑内广泛微血栓形成可能是外伤后脑梗死的原因之一。

TBI 后微血栓的形成是多种因素共同作用的结果, 这些因素包括脑血管直接损伤、组织因子释放、凝血异常和血小板活化等, 血小板活化是微血栓形成过程中的重要环节。Jacoby 等 [8] 发现急性期 (创伤后 24、48、72 h) TBI 患者血小板膜糖蛋白 CD62p 表达增高, 提示血小板活化增强。Lu 等 [9] 报道 TBI 大鼠在创伤 1 h 后血浆血小板第四因子 (PF-4) 水平开始增高, 3 d 达高峰, 8 d 后开始下降, 15 d 后降至正常; 研究并发现微血栓在损伤区周边及海马分布相对集中, 在损伤后微血栓在 1 ~ 4 h 开始出现, 在 1 ~ 3 d 达到高峰, 8 ~ 15 d 开始消退, 而在损伤区以外的皮层、胼胝体、纹状体也有散在分布; 证实 TBI 后大鼠血小板活化增强, 并与微血栓形成密切相关。

本研究发现 TBI 大鼠血小板膜糖蛋白 CD31 和 CD62p 表达在创伤后 6 h 时开始明显增高, 到 96 h 时仍处较高水平; 尽管本研究的具体方法与上述研究不尽相同, 但研究结果仍有一定的一致性, 均提示 TBI 急性期血小板活化增强, 从而有利于微血栓形成。近来一些研究发现血小板膜糖蛋白 CD31 表达可抑制胶原、凝血酶诱导的血小板活化, 对血小板的粘附、聚集反应起负反馈调节作用 [10]。因此本研究中 CD31 在创伤后表达增高既反映血小板活化有所增强, 同时也可能是机体的一种负反馈调节, 有助于限制过度血小板活化。

现有的医疗措施均不能有效改变原发性脑损伤, 但适当的治疗可以减轻或避免某些继发性脑损伤, 这也是提高临床疗效的切入点。及时预防、治疗继发性脑缺血是减轻继发性脑损伤、改善 TBI 预后的关键。本研究提示抗血小板药物由

于可抑制 TBI 后微血栓形成,因而亦有助于减轻继发性脑缺血;但用药时机及是否会诱发或加重出血等问题还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Stein S C, Graham D I, Chen X H, *et al.* Association between intravascular microthrombosis and cerebral ischemia in traumatic brain injury [J]. *Neurosurgery*, 2004, 54 (3): 687-691.
- [2] Bartnik-Olson B L, Oyoyo U, Hovda D A, *et al.* Astrocyte oxidative metabolism and metabolite trafficking after fluid percussion brain injury in adult rats [J]. *J Neurotrauma*, 2010, 27 (12): 2191-2202.
- [3] Smyth S S, Monroe D M 3rd, Wysokinski W E, *et al.* Platelet activation and its patient-specific consequences [J]. *Thromb Res*, 2008, 122 (4): 435-441.
- [4] Blann A D, Draper Z. Platelet activation as a marker of heart attack [J]. *Clin Chim Acta*, 2011, 412 (11-12): 841-842.
- [5] Mahooti S, Graesser D, Patil S, *et al.* PECAM-1 (CD31) expression modulates bleeding time in vivo [J]. *Am J Pathol*, 2000, 157: 75-81.
- [6] Fateh-Moghadam S, Htun P, Tomandl B, *et al.* Hyperresponsiveness of platelets in ischemic stroke [J]. *Thromb Haemost*, 2007, 97 (6): 974-978.
- [7] 张军, 许百男, 李冲, 等. 大鼠侧向液压脑损伤后脑血管内血栓形成的实验研究 [J]. *解放军医学杂志*, 2006, 31 (10): 991-993.
- [8] Jacoby R C, Owings J T, Holmes J, *et al.* Platelet activation and function after trauma [J]. *J Trauma*, 2001, 51 (4): 639-647.
- [9] Lu D, Mahmood A, Goussev A, *et al.* Delayed thrombosis after traumatic brain injury in rats [J]. *J Neurotrauma*, 2004, 21 (12): 1756-1766.
- [10] Crockett J, Newman D K, Newman P J. PECAM-1 functions as a negative regulator of laminin-induced platelet activation [J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8 (7): 1584-1593.

不同粒径纳米硒化镉对雄性小鼠睾丸损伤的研究

Study of damage effect of different particle size nano-CdSe on testis in male mouse

郝玉兰, 李清钊, 王曼曼, 徐厚君

HAO Yu-lan, LI Qing-zhao, WANG Man-man, XU Hou-jun

(河北联合大学公共卫生学院, 河北 唐山 063000)

摘要: 将 30 只 SPF 级雄性昆明小鼠随机分为对照组、CdSe I 染毒组 (粒径 50 ~ 100 μm)、CdSe II 染毒组 (粒径 40 ~ 50 nm), 每组 10 只。腹腔注射染毒, 两染毒组染毒剂量为 40 mg/kg, 对照组给予等体积的生理盐水, 隔天染毒 30 d 处死, 取睾丸和附睾组织。观察小鼠精子存活率、畸形率及睾丸组织病理学变化。结果显示, 两染毒组精子存活率较对照组均下降, 畸形率上升 ($P < 0.05$), 且 CdSe II 组的精子存活率最低, 畸形率最高。病理学观察显示染毒组小鼠睾丸出现不同程度损伤, 纳米 CdSe II 组小鼠睾丸损伤最为严重。提示纳米硒化镉对雄性小鼠的睾丸组织有严重的损伤作用, 且粒径是决定纳米硒化镉毒性的主要因素, 粒径越小的纳米硒化镉材料的毒性越大。

关键词: 纳米硒化镉; 动物实验模型; 精子; 病理改变

中图分类号: R992 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2013)03-0199-02

纳米硒化镉是目前使用较为广泛的半导体材料, 由于其粒子尺寸接近电子相干长度, 在光吸收、催化和磁性方面性能卓越, 被应用于较常规硒化镉更广泛的领域。众所周知, 镉是常见的重金属, 可以直接诱导睾丸、附睾等组织器官发

生结构和功能上的退行性变化^[1]。所以纳米硒化镉被广泛应用的同时, 它所引起的安全性也不容忽视。以往研究表明, 纳米材料和常规材料在性质上有很大差别, 而且不同粒径纳米材料的毒性可能不同, 研究不同粒径纳米硒化镉雄性生殖毒性具有很重要的意义^[2,3]。本次研究建立不同粒径纳米硒化镉雄性小鼠中毒模型, 观察小鼠精子睾丸病理损伤情况, 探讨不同粒径纳米硒化镉雄性小鼠睾丸组织的损伤影响, 为进一步阐明纳米硒化镉的安全性评价提供资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

健康清洁级昆明种雄性小鼠 30 只, 购自北京动物实验中心, 动物批号: SCXK (京) 2009-0004, 体重 18 ~ 25 g。硒化镉纳米材料 (由南开大学环境科学与工程学院提供), 纳米硒化镉 I 组粒径为 50 ~ 100 nm (CdSe I), 纳米硒化镉 II 组粒径为 40 ~ 50 nm (CdSe II)。将纳米材料用高温灭菌生理盐水配制成 4 g/L 溶液, 高压灭菌备用。每次染毒前, 经超声震荡混匀。

1.2 动物模型的建立

实验开始前进行 1 周的适应性饲养, 自由进食饮水, 以 1/20 LD₅₀ 对小鼠进行染毒。小鼠随机分为 3 组, 每组 10 只, 即正常对照组、CdSe I 组 (40 mg/kg)、CdSe II 组 (40 mg/kg)。以 0.1 mg/10 g 对小鼠进行腹腔注射, 隔日 1 次, 染毒 30 d, 对照组给予等量生理盐水。末次染毒 24 h 后, 处死小鼠, 摘眼球取血, 分离小鼠的睾丸及附睾备用。

收稿日期: 2012-09-18; 修回日期: 2013-02-27

基金项目: 唐山市科技计划项目任务书 (12150203A)

作者简介: 郝玉兰 (1978—), 女, 讲师, 从事环境内分泌干扰物方面的研究。