

丙烯酰胺亚慢性染毒大鼠脑组织线粒体形态变化对能量代谢的影响

Effect of morphologic change in mitochondria of brain induced by subchronic acrylamide exposure on energy metabolism in rats

关亚丽, 张文丽, 张艳淑, 韩刚, 姚林

GUAN Ya-li, ZHANG Wen-li, ZHANG Yan-shu, HAN Gang, YAO Lin

(河北联合大学公共卫生学院, 河北省煤矿卫生与安全实验室, 河北 唐山 063000)

摘要: 观察丙烯酰胺亚慢性染毒大鼠脑组织线粒体形态变化与能量代谢的关系。42只大鼠随机分组, 丙烯酰胺亚慢性染毒。电镜观察脑组织线粒体形态变化, 检测ADP和ATP的比值。随染毒时间延长, 线粒体形态发生改变, ADP和ATP的比值也逐渐升高。丙烯酰胺可以损伤脑组织中线粒体形态结构, 从而影响其正常功能, 影响能量代谢。

关键词: 丙烯酰胺; 脑; 线粒体; 能量代谢

中图分类号: R994.3 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2013)04-0275-02

研究发现, 线粒体损伤在许多神经系统疾病的发病中起着重要的作用。丙烯酰胺(acrylamide, ACR)产生能量代谢抑制的机制已经受到一些研究者的关注, 如ACR抑制脑能量代谢, 是产生神经元损伤的生化基础, ACR先侵犯神经元, 继之产生远端轴突变性^[1]。本研究的目的是探讨ACR染毒后大鼠脑组织线粒体的形态变化对能量代谢的影响, 为揭示ACR中毒机制提供理论依据。

1 材料与方

1.1 试剂及仪器

取体重200~220g的健康雄性Wistar大鼠; 丙烯酰胺(Sigma产品), 纯度99.9%; H-7650型透射电镜(日本日立), ADP/ATP发光检测试剂盒(威格拉斯生物技术有限公司), 低温高速离心机(北京京立离心机有限公司), 发光闪烁计数仪(Luminescence Counter, 美国PerkinElmer公司)。

1.2 方法

42只健康雄性Wistar大鼠随机分为0、2、4、6、8、10周6组, 每组7只, 以0周为对照组。染毒组按40mg/kg腹腔注射ACR生理盐水溶液(2ml/kg), 每周3次。对照组同样方式注射生理盐水溶液^[2]。于0、2、4、6、8、10周电镜

观察大鼠脑组织线粒体的形态变化; 并按设定时间断头处死大鼠, 留取脑组织进行线粒体提取, 检测ATP、ADP的含量。

1.2.1 线粒体超微结构观察 大鼠腹腔注射麻醉后, 用2%多聚甲醛-2.5%戊二醛固定液进行灌流, 待大鼠全身肌肉僵硬后, 取出脑组织, 置于4%戊二醛固定液中, 将脑组织进行切片, 醋酸铀、枸橼酸铅双重染色后电镜观察。

1.2.2 线粒体的提取 按设定的时间断头处死大鼠, 留取脑组织, 经带冰渣的分离介质清洗, 剪碎后匀浆, 低温离心提取线粒体。

1.2.3 蛋白浓度定量 考马斯亮蓝法, 以牛血清白蛋白为标准。

1.2.4 ATP和ADP相对比值的测定 脑组织线粒体提取物, 蛋白定量后按ADP/ATP发光检测试剂盒的说明方法操作, 用发光闪烁计数仪检测, 得到ADP与ATP的相对比值。

1.3 统计学分析

实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有数据采用SPSS 13.0统计软件进行t检验。

2 结果

2.1 线粒体的超微结构(图1, 见封三)

对照组大鼠脑组织线粒体均成圆形或卵圆形, 外膜光滑完整, 内嵴清晰可见, 基质均匀。直至实验第6周时线粒体开始出现形状不规则, 外膜模糊或断裂, 内嵴减少; 实验第8周时, 线粒体内嵴出现断裂, 基质不均匀, 变淡, 部分呈空泡样改变; 实验第10周时, 线粒体形态改变更加明显。

2.2 ATP和ADP相对比值的测定

染毒组大鼠脑组织中ADP和ATP相对比值(ADP/ATP)在第2周与对照组均有差异, 第4周虽然略有降低, 但第6~10周仍明显高于对照组。见表1。

表1 ACR染毒后大鼠脑组织线粒体中的ADP/ATP比值的变化($\bar{x} \pm s$)

组别	n	0周	2周	4周	6周	8周	10周
对照组	6	0.18±0.04	0.17±0.06	0.19±0.05	0.18±0.03	0.20±0.04	0.21±0.02
染毒组	6	0.18±0.04	0.56±0.01**	0.34±0.01*	0.35±0.06*	0.41±0.09*	0.43±0.08*

注: 与0周对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

线粒体是产生ATP的主要细胞器, 脑缺血研究^[2-5]已显示脑线粒体功能变化与神经元死亡的关系。而神经细胞线粒体的结构改变、膜流动性变化与神经功能障碍也有密切关系^[3,4], 线粒体膜的正常流动性为膜发挥各种重要生理功能提供了必要条件。

收稿日期: 2012-09-13; 修回日期: 2012-11-14

基金项目: 国家自然科学基金资助(编号: 30771823)

作者简介: 关亚丽(1982—), 女, 讲师, 主要从事神经毒理学研究。

通讯作者: 姚林, 教授, E-mail: yaolin766@sohu.com。

线粒体是由外膜、内膜、膜间隙和基质构成，内含基质。线粒体嵴的数目与细胞本身的生理状态有密切关系，细胞需要能量越多，嵴也越多。在本次研究第 6 周，线粒体开始出现形状不规则，外膜模糊或断裂，内嵴减少等变化；随着染毒时间的延长，线粒体内嵴出现断裂，基质不均匀，变淡，呈空泡样改变。与对照组相比，染毒组大鼠脑组织中 ADP 和 ATP 相对比值 (ADP/ATP) 在实验第 2 周时明显升高，提示 ATP 含量降低，第 4 周比值虽然略有降低，但第 6 周至第 10 周仍明显高于对照组。可以推断，在大鼠染毒早期，线粒体的形态改变并不是影响脑组织 ATP 形成的主要原因，染毒后期线粒体形态改变可能是脑组织 ATP 形成的原因之一。

参考文献:

[1] 赫秋月, 韩漫夫, 饶明俐. 丙烯酰胺中毒后小鼠脑中肌酸激酶和三磷酸腺苷含量的改变及意义 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2002, 20 (3): 195-198.

[2] Gilland E, Puka-Sundvall M, Hillered L, et al. Mitochondrial function and energy metabolism after hypoxia-ischemia in the immature rat brain: involvement of NMDA-receptors [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 1998, 18 (3): 297-304.

[3] Vagnozzi R, Marmarou A, Tavazzi B, et al. Changes of cerebral energy metabolism and lipid peroxidation in rats leading to mitochondrial dysfunction after diffuse brain injury [J]. J Neurotrauma, 1999, 16 (10): 903-913.

[4] Keelan J, Bates T E, Clark J B. Heightened resistance of the neonatal brain to ischemia-reperfusion involves a lack of mitochondrial damage in the nerve termina [J]. Brain Res, 1999, 821 (1): 124-133.

[5] Verweij B H, Muizelaar J P, Vinas F C, et al. Impaired cerebral mitochondrial function after traumatic brain injury in humans [J]. J Neurosurg, 2000, 93 (5): 815-820.

• 健康监护 •

济南市部分中小企业职业健康检查情况分析

王海燕, 谷晓新, 王炎

(济南市职业病防治院, 山东 济南 250013)

为了更好地监护作业工人的身体健康状况, 现将济南市 2008—2011 年部分中小企业职工的健康查体和职业病检出情况分析如下。

1 对象与方法

辖区内 2000 人以下中小企业, 数据信息来源于济南市疾病预防控制中心和济南医院职业病科 2008—2011 年健康查体报告, 用 Excel 建立调查资料数据库进行统计分析。

2 结果

2.1 231 家中小企业开展了一线工人健康查体, 结果见表 1。

表 1 中小企业一线作业工人健康监护情况

企业规模	应检人数	实检人数	受检率 (%)	禁忌证人数	疑似职业病	
					人数	检出率 (%)
中型	4261	4157	97.56	241	33	0.79
小型	4103	3954	96.37	264	40	1.01
合计	8364	8111	96.98	505	73	0.90

2.2 中小企业的职业危害主要分布在煤炭开采和洗选及炼焦业 (28.75%), 其次为化学原料及化学品制造业 (13.64%), 见表 2。

表 2 中小企业职业危害行业分布

行业	应检人数	实检人数	受检率 (%)	禁忌证人数	疑似职业病人	检出率 (%)
煤炭开采和洗选及炼焦	2332	2278	97.68	134	42	1.96
化学原料及制造	1876	1806	96.27	147	12	0.72
通用、专用设备制造	1750	1691	96.63	87	6	0.37
金属冶炼及延压加工	980	935	95.41	60	7	0.80
电镀	1426	1401	98.25	77	6	0.45
合计	8364	8111	96.98	505	73	0.96

2.3 济南市中小企业疑似职业病人, 以尘肺病居首发, 其次为苯中毒, 见表 3、表 4。

表 3 中小企业疑似职业病人病种分类

病种	例数	构成比 (%)	病种	例数	构成比 (%)
矽肺	23	31.50	有机氟中毒	2	2.74
煤工尘肺	14	19.18	硫化氢中毒	3	4.11
苯中毒	10	13.70	职业性皮肤病	5	6.85
锰中毒	6	8.22	噪声性耳聋	3	4.11
汽油中毒	7	9.59	合计	73	100

表 4 2008—2011 年济南市职业病发病情况

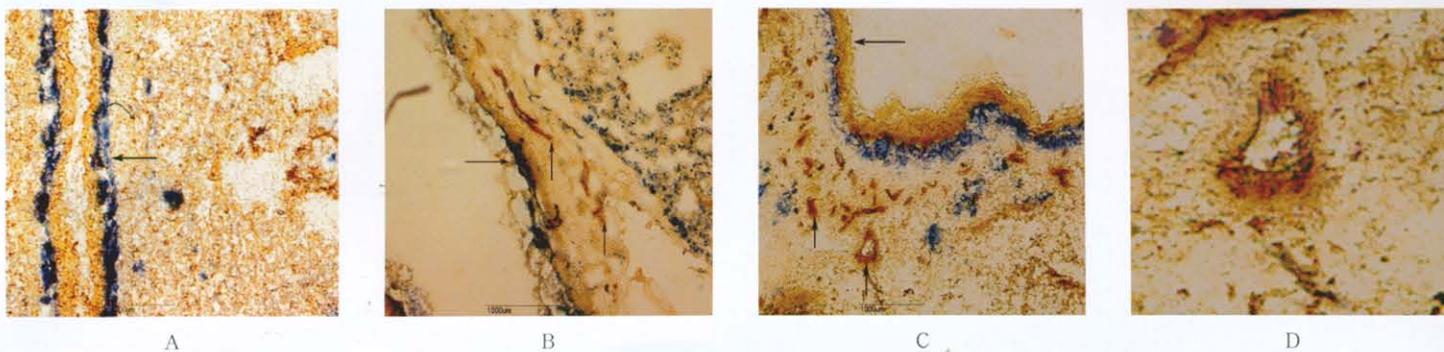
年份	尘肺	职业中毒	职业性噪声聋	职业性皮肤病	合计	构成比 (%)
2008	10	7	0	1	18	24.66
2009	11	10	2	2	25	34.25
2010	12	6	1	0	19	26.03
2011	4	5	0	2	11	15.06
合计	37(50.68%)	28(38.36%)	3(4.11%)	5(6.85%)	73(100%)	100

3 小结

济南市中小企业的职业危害较严重, 苯系物、有机化合物、金属是职业危害较严重的毒物。尘肺仍为职业病的首发, 可能是与本市各辖区内有煤矿、电厂、水泥、冶金等行业有关, 中小企业的设备较为简陋, 通风除尘效果欠佳, 以致尘肺发病率居高不下。故应重点加强对煤矿、发电厂、建材石场行业的整治和监管, 关闭无规划未经批准的煤矿、建材石材。各企业加强防尘设施管理与维护, 加强对接尘工人的个人防护和健康教育、岗前培训及健康监护。

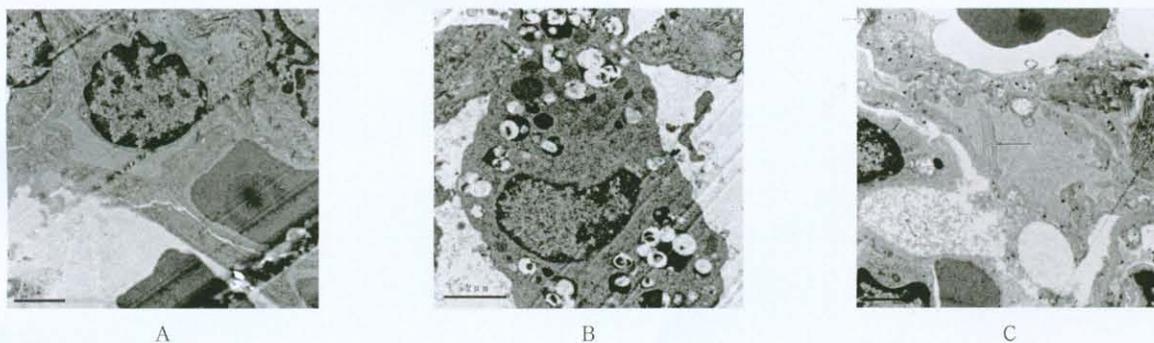
收稿日期: 2013-04-01; 修回日期: 2013-06-10
作者简介: 王海燕 (1969—), 女, 主管护师。

肺淋巴管增生在矽肺大鼠发病过程中的作用(正文见250~252页)



注: 淋巴管呈棕黄色, 血管内壁呈棕黄色, 外壁呈蓝色; 其中A为正常对照组大鼠肺组织, 可见外壁被染成蓝色的血管(“-”标记处), 未发现淋巴管阳性; B、C分别为模型组14d和28d大鼠肺组织, 图中“-”为血管, “↑”为淋巴管; D为模型组28d大鼠肺组织中淋巴管, 可见其管壁薄, 管腔呈不规则状。

图1 不同处理组的大鼠肺实质区经5'-核苷酸酶-碱性磷酸酶双重染色结果(×200)



注: A为正常对照组大鼠肺组织, 可见毛细血管紧贴肺泡壁; B为模型组大鼠肺组织内尘细胞, 可见大量溶酶体吞噬异物; C为模型组大鼠肺组织内增生的淋巴管, 图中“-”为淋巴管瓣膜。

图2 不同处理组大鼠肺组织透射电子显微镜观察结果(×8000)

氟中毒大鼠生长板Ihh、PTHrP mRNA及蛋白表达的变化(正文见253~255页)

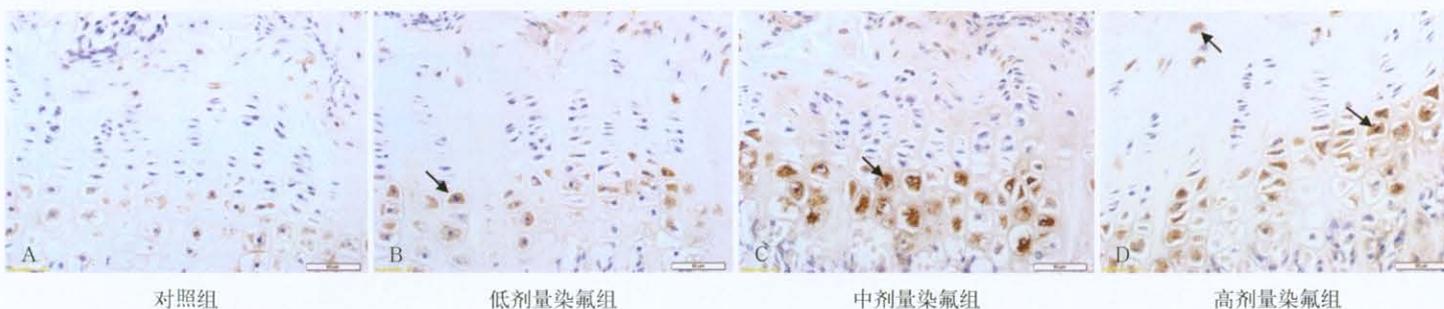


图1 大鼠生长板PTHrP蛋白表达结果(免疫组化, ×400)

丙烯酰胺亚慢性染毒大鼠脑组织线粒体形态变化对能量代谢的影响 (正文见275~276页)

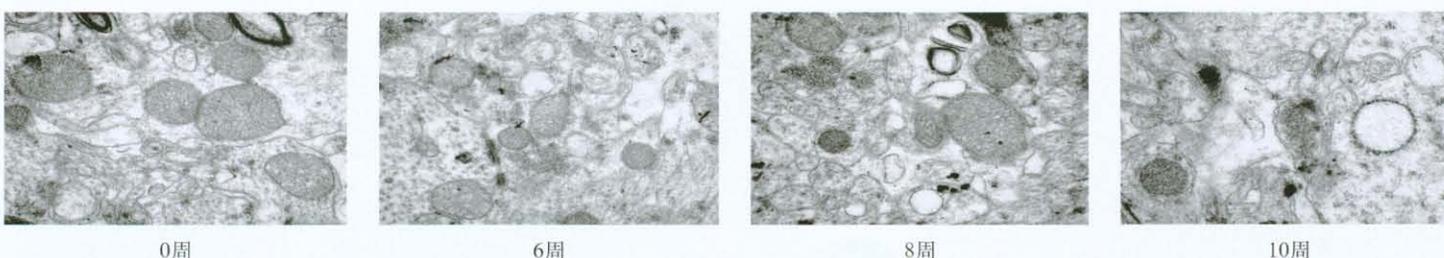


图1 不同时间点大鼠脑组织线粒体超微结构变化(×20.0k)