

• 实验研究 •

碳化硅冶炼烟尘对 NIH/3T3 细胞的影响

Effect of silicon carbide smelting dust on NIH/3T3 mammalian cells

焦冬, 吴永会, 王玥, 巴婧翀, 冯小雨

JIAO Dong, WU Yong-hui, WANG Yue, BA Jing-chong, FENG Xiao-yu

(哈尔滨医科大学公共卫生学院, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要: 以小鼠肺成纤维细胞 (NIH/3T3) 为靶细胞, 以某碳化硅冶炼车间沉降尘为受试物, 采用中性红染料滞留 (neutral red dye retention) 实验和噻唑蓝 (MTT) 实验检测碳化硅冶炼烟尘对 NIH/3T3 细胞活性与增殖的影响。碳化硅冶炼烟尘未使细胞生长受到抑制, 随染毒浓度的增加, 作用时间的延长, 细胞相对存活率逐渐升高, 呈剂量-反应和时间-反应关系。中性红实验作用 48 h, 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度组的细胞相对存活率达到最大值 164.23%。MTT 实验作用 48 h, 12.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度组的细胞相对增殖率达到最大值 155.48%; MTT 实验 1 600.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 浓度组的吸光度值与阴性对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示碳化硅冶炼烟尘对 NIH/3T3 细胞的毒性较弱, 对 NIH/3T3 细胞的增殖有影响。

关键词: 碳化硅冶炼烟尘; 中性红滞留实验; MTT 实验; 细胞毒性

中图分类号: R135 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2013)06-0432-03

碳化硅具有耐高温、耐腐蚀和耐磨性能好等优点, 是应用广泛的传统磨料^[1]。最近挪威学者 Bugge MD 报道^[2], 在碳化硅冶炼过程中, 会产生大量的烟尘, 接触工人的肺癌发病率明显升高。碳化硅冶炼烟尘致工人肺癌发病率升高的原因目前尚不清楚, 且有关细胞毒性方面的研究也少见报道。本次实验我们采用中性红染料滞留实验以及 MTT 实验方法探讨碳化硅冶炼烟尘的细胞毒性。

1 材料与方法

1.1 受试物与靶细胞

受试物来自于某碳化硅冶炼车间沉降尘, 用玛瑙研钵研磨, 检测分散度, 粒径 $\leq 5 \mu\text{m}$ 者占 99%, 受试物紫外灯照射灭菌, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 配成一定浓度的混悬液, 备用, 使用时稀释。靶细胞为 NIH/3T3 细胞 (购自北京肿瘤研究所), 接种于含体积分数为 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的 CO_2 培养箱中, 传代备用。

1.2 主要试剂和仪器

1.2.1 试剂 中性红 (上海试剂三厂), 噻唑蓝 (MTT) [3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐] (上海碧云天生物

物技术研究所), PBS 粉 (博士德生物有限公司), 二甲基亚砷 (DMSO) (北京化工试剂厂), 胰蛋白酶细胞消化液 (上海碧云天生物技术研究所), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 美国 GIBCO 公司), SiO_2 (化学纯, 上海奉贤奉城试剂厂)。

1.2.2 仪器 倒置生物显微镜 (OLYMPUS IM, 日本), CO_2 培养箱 (Thermo SCIENTIFIC, 美国), 高速离心机 (Kaida TG16G, 湖南省凯达实业发展有限公司), 医用型洁净工作台 (DL-CJ-2N, 北京东联哈尔仪器制造有限公司), 电热恒温振荡水槽 (DKZ-2 型, 上海福玛实验设备有限公司), 全自动酶标仪 (BioTek Instruments, 美国)。

1.3 碳化硅冶炼烟尘对 NIH/3T3 细胞存活率的测定

取对数生长期的 NIH/3T3 细胞用胰蛋白酶消化后, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液制成细胞悬液, 调整细胞密度至 2.0×10^4 个/ml, 接种到 96 孔板中, 每孔 200 μm ; 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中, 待细胞贴壁后弃去旧培养液, 分别加入不同浓度实验组和阳性对照组的受试物, 实验组 (SiC 组) 终浓度分别为 50、100、200、400、800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的染毒液, 阳性对照组 (SiO_2 组) 终浓度分别为 200、400、800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的染毒液, 同时设阴性对照组和不加细胞的空白对照组, 每组均设 8 个重复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下分别培养 18、24、30、48、72 h。弃去染毒液, PBS 液洗涤 2 次后, 每孔加入中性红溶液 40 μl , 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 90 min。移去中性红溶液, PBS 洗涤 2 次, 每孔加入染料提取液 100 μl , 室温振荡 20 min, 全自动酶标仪测吸光度值 (波长 490 nm)^[3]。计算细胞相对存活率 (%) = (实验组吸光度值 - 阴性对照组吸光度值) / (阳性对照组吸光度值 - 空白对照组吸光度值) $\times 100\%$ 。

1.4 碳化硅冶炼烟尘对 NIH/3T3 细胞增殖作用的影响

将对数生长期的 NIH/3T3 细胞经胰酶消化后, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液制成细胞密度为 6.0×10^4 个/ml 的细胞悬液, 接种到 96 孔板中, 每孔 100 μl ; 96 孔板四周边缘不接种细胞, 加入 100 μl /孔的 PBS 液, 设为空白组; 放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱中培养, 待细胞贴壁后, 实验组分别加入 8 组不同浓度 SiC 的受试物, 实验组 (SiC 组) 终浓度分别为 12.50、25.00、50.00、100.00、200.00、400.00、800.00、1 600.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的染毒液, 同时设未经 SiC 处理的阴性对照组和不加细胞的空白对照组, 每组均设 8 个重复孔。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下分别培养 18、24、30、48、72 h。于各作用时间结束前 4 h 加入 50 μl MTT。弃去培养液, 每孔加入 150 μl DMSO, 水浴振荡 10 min, 全自动酶标仪测吸光度值 (波长

收稿日期: 2013-04-23

作者简介: 焦冬 (1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 工业毒理学。

通讯作者: 吴永会, 教授, 博士研究生导师, E-mail: wuyonghui777@163.com。

490 nm)。计算细胞相对增殖率^[4]。

1.5 统计学处理

采用 SPSS17.0 软件单因素方差分析方法进行细胞存活率和细胞增殖率的统计学意义检验。

2 结果

2.1 碳化硅冶炼烟尘作用于 NIH/3T3 细胞的形态学变化

倒置显微镜下观察, 阴性对照组细胞呈梭形, 贴壁生长, 胞质清亮, 边界清楚, 胞体丰满, 胞浆均匀, 大小均一, 细胞间排列紧密。染毒组细胞呈梭形、三角形或多角形不规则生长, 细胞体积变小, 大小不一, 细胞间排列分散, 生长不规则, 细胞数量与阴性对照组比较没有减少。

2.2 中性红染料滞留实验结果

受试物在不同染毒剂量下, 随染毒浓度的增加、作用时间的延长, 细胞相对存活率也随之上升, 呈现剂量-反应和时间-反应关系。作用 48 h 时, 细胞的相对存活率达到最大值为 164.23%。浓度在 100 μg/ml, 作用 30 h 时, 细胞相对存活率有明显下降的趋势。碳化硅冶炼烟尘染毒细胞相对存活率除 50 μg/ml 和 100 μg/ml 浓度组, 作用 72 h 无统计学意义外, 其他作用浓度和作用时间的相对存活率与阴性对照组比较, 差异均有统计学意义 (P < 0.05), 见表 1。

表 2 不同浓度碳化硅冶炼烟尘不同作用时间 NIH/3T3 细胞的吸光度值 (n=6)

浓度(μg/ml)	18 h	24 h	30 h	48 h	72 h
0	0.553 ± 0.055	0.507 ± 0.034	0.576 ± 0.034	0.528 ± 0.080	0.613 ± 0.044
12.50	0.580 ± 0.046	0.554 ± 0.029*	0.582 ± 0.049	0.749 ± 0.105*	0.636 ± 0.037
25.00	0.554 ± 0.047	0.510 ± 0.034	0.566 ± 0.030	0.638 ± 0.138*	0.656 ± 0.047
50.00	0.528 ± 0.048	0.550 ± 0.017	0.547 ± 0.046	0.587 ± 0.087	0.644 ± 0.035
100.00	0.563 ± 0.072	0.567 ± 0.036*	0.609 ± 0.118	0.567 ± 0.064	0.640 ± 0.061
200.00	0.578 ± 0.043	0.592 ± 0.037*	0.595 ± 0.040	0.509 ± 0.031	0.643 ± 0.048
400.00	0.522 ± 0.046	0.550 ± 0.037*	0.568 ± 0.034	0.526 ± 0.030	0.670 ± 0.047
800.00	0.608 ± 0.041	0.687 ± 0.056*	0.653 ± 0.034*	0.556 ± 0.026	0.647 ± 0.052
1600.00	0.629 ± 0.049*	0.728 ± 0.036*	0.709 ± 0.061*	0.637 ± 0.027*	0.717 ± 0.078*

注: 与阴性对照组比较, * P < 0.05。

表 3 不同浓度碳化硅冶炼烟尘不同作用时间 NIH/3T3 细胞的相对增殖率

浓度(μg/ml)	18 h	24 h	30 h	48 h	72 h
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
12.50	105.91	111.41	101.27	155.48	104.44
25.00	100.22	100.73	97.88	128.31	108.30
50.00	94.53	110.44	93.84	115.82	105.98
100.00	102.19	114.56	107.01	111.03	105.21
200.00	105.47	100.20	104.03	96.90	105.79
400.00	93.22	110.44	98.30	101.10	111.00
800.00	112.04	119.35	116.36	108.42	106.56
1600.00	116.63	127.62	128.24	128.12	120.08

3 讨论

在 2010 年 3 月 25 日国际劳工组织第 307 届理事会上, 有关专家提出要关注碳化硅致肺癌的职业卫生问题。黄正林认为, 工人短间接接触碳化硅粉尘有罹患尘肺的趋势^[5]。Ro-

表 1 不同浓度碳化硅冶炼烟尘不同作用时间 NIH/3T3 细胞的相对存活率

浓度(μg/ml)	18 h	24 h	30 h	48 h	72 h
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
50	46.70*	32.92*	40.00*	65.00*	8.47
100	46.05*	32.60*	16.67	64.17*	16.10
200	54.77*	49.37*	35.42*	63.33*	62.71*
400	71.05*	69.23*	59.09*	130.65*	65.19*
800	82.36*	93.48*	115.00*	164.23*	149.07*

注: 与阴性对照组比较, * P < 0.05。

2.3 MTT 实验结果

分别用不同浓度碳化硅冶炼烟尘作用于 NIH/3T3 细胞 18、24、30、48、72 h 后, 用 MTT 法测定碳化硅冶炼烟尘对 NIH/3T3 细胞增殖的影响。作用 18、24、30 h 的相对增殖率变化趋势大致相似。在浓度 12.50 μg/ml 作用 48 h 时, 细胞相对增殖率达到最大值 155.48%。作用 18、24、30、72 h, 细胞增殖率随着浓度增加, 总体呈现上升趋势。作用 48 h 时, 不同浓度组的细胞增殖率呈现先下降后上升的明显变化。1600.00 μg/ml 浓度组的细胞吸光度值与阴性对照组比较, 差异均有统计学意义 (P < 0.05), 见表 2、3。

mundstad P 研究表明^[6], 长期接触碳化硅粉尘的工人, 会出现多种呼吸系统症状, 也有患尘肺的趋势。肺成纤维细胞的扩增和胶原的大量分泌是尘肺形成的关键环节^[7]。章吉芳研究证明, 碳化硅粉尘致大鼠肺间质内有纤维细胞及胶原纤维形成, 碳化硅与石英的混合尘能增强对大鼠肺脏的致纤维化作用^[8]。研究化学物质对体外培养细胞的毒性作用, 是进一步探讨其各种生物学效应的基础, 中性红滞留实验和 MTT 实验是应用较多的检测细胞毒性的实验方法。

中性红是弱阳离子染料, 能与活细胞胞浆中的阴离子相结合, 浓缩于活细胞内, 不易被细胞洗涤液洗脱, 渗入活细胞的中性红的量与活细胞数量成正比, 增加或降低吸光度值, 利用这一特征可以测定和分析活细胞的数量^[9]。

MTT 染料的化学名简称四甲基偶氮唑盐, 活细胞中的线粒体琥珀酸脱氢酶能使 MTT 还原为不溶于水的蓝紫色结晶甲臞 (formazan) 并沉积在细胞中, 而死细胞失去此代谢功能^[4]。MTT 实验法是评定细胞增殖、细胞毒性的比色分析法。

在细胞毒理学实验中,受试物与细胞接触时间的长短是影响实验结果的一个因素。本实验倒置显微镜下观察细胞未发现异常的形态学改变,碳化硅冶炼烟尘对体外培养的 NIH/3T3 细胞毒性作用较弱,受试物在不同染毒剂量下,随染毒浓度的增加、作用时间的延长,细胞相对存活率和增殖率总体呈上升趋势,提示碳化硅冶炼烟尘对 NIH/3T3 细胞的生长可能有促进作用,此为进一步揭示碳化硅冶炼烟尘对细胞毒性作用的研究提供了依据。

参考文献:

- [1] FØreland S, Bugge M D, Bakke B, *et al.* A novel strategy for retrospective exposure assessment in the Norwegian silicon carbide industry [J]. *J Occup Environ Hyg*, 2012, 9 (4): 230-241.
- [2] Bugge M D, Kjærheim K, FØreland S, *et al.* Lung cancer incidence among Norwegian silicon carbide industry workers: associations with particulate exposure factors [J]. *Occup Environ Med*, 2012, 69 (8): 527-533.
- [3] 王心如,周宗灿,庄志雄. 毒理学实验方法与技术 [M]. 北京:

人民卫生出版社, 2007: 131-132.

- [4] Parajuli B, Shin S J, Kwon S H, *et al.* The synergistic apoptotic interaction of indole-3-carbinol and genistein with trail on endometrial cancer cells [J]. *J Korean Med Sci*, 2013, 28 (4): 527-533.
- [5] 黄正林. 碳化硅粉尘对工人健康危害调查 [J]. *化工劳动保护 (工业卫生与职业病分册)*, 1990, 11 (4): 162.
- [6] Romundstad P, Andersen A, Haldorsen T. Non-malignant mortality among Norwegian silicon carbide smelter workers [J]. *Occup Environ Med*, 2002, 59: 345-347.
- [7] Veerappan A, O'Connor N J, Brazin J, *et al.* Mast cells: a pivotal role in pulmonary fibrosis [J]. *DNA Cell Biol*, 2013, 32 (4): 206-218.
- [8] 章吉芳,郭晓芳,战秋岩. 加入 5% 石英的碳化硅粉尘对大鼠肺脏的致纤维化作用 [J]. *中国职业医学*, 1985, 12 (6): 11-13.
- [9] Danielle F, Eliza S, Renato C, *et al.* Cellular and transcriptional responses of *Crassostrea gigas* hemocytes exposed in vitro to brevetoxin (PbTx-2) [J]. *Marine Drugs*, 2012, 10: 583-597.

六苄基六氮杂异伍兹烷致大鼠急性经口毒性研究

Study on acute oral toxicity of hexabenzyl hexaazaisowurtzitane in rats

刘志永¹, 高俊宏¹, 王鸿¹, 岳红¹, 李江平¹, 刘黎阳¹, 孙成辉², 宋建伟³

LIU Zhi-yong¹, GAO Jun-hong¹, WANG Hong¹, YUE Hong¹, LI Jiang-ping¹, LIU Li-yang¹, SUN Cheng-hui², SONG Jian-wei³

(1. 兵器工业卫生研究所, 陕西 西安 710065; 2. 北京理工大学, 北京 100081; 3. 兵器工业集团公司 375 厂, 辽宁 辽阳 111000)

摘要: 为探讨六苄基六氮杂异伍兹烷 (HBIW) 对大鼠的急性经口毒性, 将 30 只成年 SPF 级 SD 大鼠按体重随机分为 2 组, 实验组 20 只, 给予 250 mg/ml 的 HBIW 混悬液; 对照组 10 只, 给予一定量的植物油。给药后观察动物一般表现、中毒症状和死亡情况, 隔天记录动物体重, 连续观察 14 d。实验结束后对其心、肝、脾、肺、肾等脏器进行病理检查。实验组和对照组在观察期内均未出现中毒症状和死亡, 仅实验组动物体重增长速度略低于对照组。病理检查结果显示实验组大鼠出现中度肝细胞肿胀, 其它脏器均无明显病理改变。提示 HBIW 的大鼠 LD₅₀ > 5000 mg/kg, 属于微毒物质。

关键词: 六苄基六氮杂异伍兹烷 (HBIW); 急性经口毒性; 重复测量方差分析

中图分类号: R994.6

文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2013)06-0434-03

六硝基六氮杂异伍兹烷 (CL-20) 是一种具有笼状结构的多环硝胺化合物, 于 1987 年由美国海军武器中心 (NWC) 的 Nielsen 等率先合成^[1]。其化学结构类似于某些单环硝胺类化合物, 但其能量和密度比其它单环硝胺类化合物高得多, 是

迄今为止研制出的综合性能最好的单质炸药。国内外研究机构对 CL-20 的合成已达到一定规模, 而六苄基六氮杂异伍兹烷 (HBIW) 作为其合成过程中必不可少的一种中间产物^[2], 有必要对其急性毒性进行研究, 为科研和生产人员的职业安全防护提供科学依据。

1 材料与与方法

1.1 受试物、主要仪器与试剂

六苄基六氮杂异伍兹烷为白色结晶粉末状固体, 样品来自于兵器工业集团 375 厂。溶剂选用金龙鱼牌玉米胚芽油。

JJ2000 天平 (常熟双杰测试仪器厂), MP1002 天平 (上海恒平科学仪器有限公司), TS-42U 生物组织自动脱水机、BM-VIII 生物组织包埋机和 CS-VI 摊片烤片机均产自孝感市宏业医用仪器有限公司, HM325 切片机 (美国 Thermo 公司), CX-21 显微镜 (奥林巴斯)。

二甲苯、95% 乙醇、无水乙醇、冰醋酸和盐酸均产自西安化学试剂厂, 苏木色精和伊红均产自上海蓝季科技发展有限公司。

HBIW 染毒液配制方法: 准确称取适量 HBIW 药品, 加入少量植物油研碎后, 再加入一定量植物油配制成 250 mg/ml 的混悬液。

苏木素配制方法: 准确称取适量苏木色精、硫酸铝钾和红色氧化汞, 量取一定量无水乙醇、冰醋酸和蒸馏水, 配制成 Harris 苏木素溶液。

收稿日期: 2013-03-20

作者简介: 刘志永 (1985—), 男, 硕士, 医师, 主要从事生物效应与毒理学研究工作。