

镍精炼烟尘致 NIH/3T3 细胞 NLRP3 炎性小体的表达

Expression of NLRP3 inflammatory body in NIH/3T3 cells induced by nickel refining dusts

夏冰, 李吉平, 秦汝男, 王玥, 吴永会

(哈尔滨医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生教研室, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要: 采用某镍精炼厂沉降尘对 NIH/3T3 细胞进行染毒, 染毒浓度分别为 12.5、25、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 以未染毒组 (0 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 作为对照。染毒 48 h 后, 通过 Cell-counting Kit-8 实验检测细胞存活率, ROS 试剂盒检测细胞内活性氧的生成量, 蛋白免疫印迹 (Western blot) 法检测细胞内炎性因子 NLRP3 和 ASC 的表达水平, ELISA 试剂盒检测 caspase-1 和 IL-1 β 生成量。结果显示, 随着染毒浓度的增加, 细胞存活率逐渐下降, 且差异具有统计学意义 ($P<0.05$); 细胞内 ROS 生成量明显增加, NLRP3、ASC 表达量不断增加, caspase-1 和 IL-1 β 生成量不断增加, 且差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。提示镍精炼烟尘可以激活炎性小体, 促使炎性小体相关蛋白表达。

关键词: 镍精炼烟尘; ROS; NLRP3; IL-1 β

中图分类号: R994.3 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2019)03-0201-03

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2019.03.013

随着化工产业的发展, 金属镍在电镀、焊接、合金生产中的应用不断增加, 在生产回收、处理过程中, 大量含镍化合物被释放到环境中。镍化合物可以改变细胞内正常的抗氧化系统, 使细胞内的转录和翻译不能正常进行, 最终引起细胞癌变。镍精炼厂和镍冶炼厂作业人员是镍高暴露的主要人群, 他们接触的沉降尘中镍浓度一般在 0.1~1 mg/m^3 ^[1]。有研究发现镍精炼烟尘会对细胞产生明显的毒性作用^[2], 但关于镍精炼烟尘的致炎作用尚未有报道。本实验旨在对镍精炼烟尘可否激活 NLRP3 炎性小体相关蛋白从而引起炎症反应进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 靶细胞 小鼠胚胎成纤维细胞 (NIH/3T3), 购自北京市肿瘤研究所, 15% 胎牛血清 DMEM 培养液中 37℃、5% CO_2 培养箱中培养, 胰蛋白酶消化、传代, 备用。

1.1.2 受试物与试剂 镍精炼烟尘 (来自某镍精炼厂精炼炉前沉降尘) 用生长液稀释成浓度为 1 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的母液; CCK8 试剂盒、ROS 检测试剂盒, 碧云天生物技术公司; 胎牛血清, 美国 Hyclone 公司; 胰蛋白酶, Merck 公司; NLRP3 兔抗鼠多克隆抗体、ASC 兔抗鼠多克隆抗体、 β -actin 兔抗鼠多克隆抗

体、山羊抗兔抗体、caspase-1 检测试剂盒、IL-1 β 检测试剂盒, 美国 CST 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将 NIH/3T3 细胞以 2×10^6 个/ml 的密度接种于含 10% 胎牛血清和 1% 双抗的 DMEM 培养基上, 置于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养, 用胰蛋白酶消化传代。

1.2.2 CCK8 实验检测细胞存活率 将细胞接种于 96 孔板上, 每孔细胞数 1×10^4 个, 待细胞贴壁后, 用稀释后终浓度分别为 12.5、25、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的染毒液染毒, 以 0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 染毒组为对照组, 染毒 48 h 后, 每孔加入 10 μl 的 CCK8 工作液, 轻微震荡均匀, 置于培养箱中继续培养 2 h, 显色后, 用酶标仪 450 nm 处测量吸光度 OD 值。计算各染毒组的细胞存活率。

1.2.3 ROS 检测 37℃ 下对染毒 48 h 后的细胞进行 DCF-DA 探针装载, 30 min 后, 用荧光酶标仪在激发波长 488 nm 和发射波长 525 nm 处检测吸光度 OD 值。

1.2.4 Western blot 检测 NLRP3、ASC 蛋白表达 染毒 48 h 后的细胞用 PBS 液清洗 3 遍, 用细胞刷收集细胞, 加入细胞裂解液冰上裂解 50 min, 离心得到总蛋白, 并用 BCA 法进行蛋白定量。总蛋白于沸水中水浴 10 min, 备用。经聚丙烯酰胺分离胶电泳分离总蛋白, 电泳时间 100 min, 转膜时间 2 h, 室温下封闭 150 min, 4℃ 孵育一抗 NLRP3 (1:500), β -actin (1:1 000), ASC (1:1 000) 过夜, 洗膜后 37℃ 孵育二抗 (1:3 000) 1 h, 再次洗膜后用 ECL 显色液显色。Image Lab 软件分析灰度值, 以 NLRP3、ASC 与 β -actin 灰度值比值作为 NLRP3、ASC 蛋白相对表达量。

1.2.5 ELISA 试剂盒检测 caspase-1 含量 将染毒 48 h 后的细胞裂解, 得到裂解后上清液, 用 ELISA 试剂盒进行酶标记, 在 450 nm 处测量吸光度 OD 值, 利用标准曲线计算 caspase-1 浓度。

1.2.6 ELISA 试剂盒检测 IL-1 β 含量 取染毒 48 h 后的细胞上清液, 用 ELISA 方法进行酶标记, 在 450 nm 处测量吸光度 OD 值, 利用标准曲线计算 IL-1 β 浓度。

1.3 数据分析

结果用 $\bar{x}\pm s$ 进行描述, 采用 SPSS19.0 统计软件对数据进行单因素方差分析, Dunnett- t 检验进行组间比较, 以 $P<0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞存活率的比较

镍精炼烟尘对细胞染毒 48 h 后, 12.5、25、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 染毒组细胞存活率随着染毒浓度的升高逐渐下降, 且呈现剂量-

收稿日期: 2018-12-19; 修回日期: 2019-01-25

基金项目: 国家自然科学基金项目 (8167313)

作者简介: 夏冰 (1992—), 女, 硕士在读, 研究方向: 工业致癌物致癌机制研究。

通信作者: 吴永会, 教授, 博士生导师, E-mail: wuyonghui777@163.com。

反应关系。染毒组与对照组相比, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1。

2.2 细胞内 ROS 含量

以 0 $\mu\text{g/ml}$ 组荧光强度为 1, 12.5、25、50 $\mu\text{g/ml}$ 染毒组细胞内荧光强度与对照组的比值明显增高, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 1。

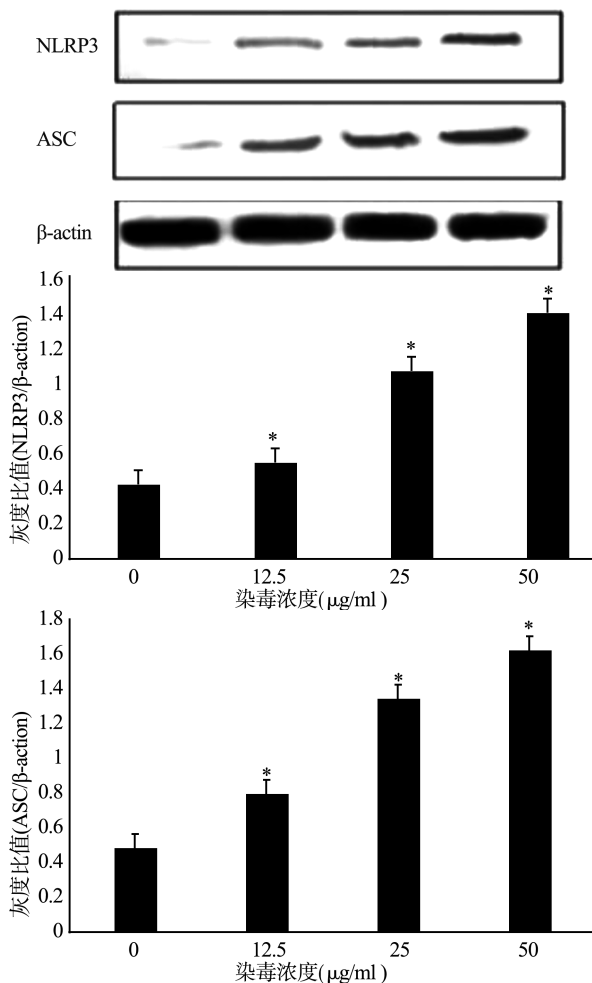
表 1 各组细胞存活率和细胞内 ROS 含量变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	细胞存活率 (%)	ROS 含量 (比值)
对照组	100.00 $\pm$ 3.41	1.00 $\pm$ 0.14
12.5 $\mu\text{g/ml}$ 染毒组	69.71 $\pm$ 2.57	1.26 $\pm$ 0.16
25.0 $\mu\text{g/ml}$ 染毒组	50.40 $\pm$ 2.89	1.47 $\pm$ 0.11
50.0 $\mu\text{g/ml}$ 染毒组	33.26 $\pm$ 3.85	1.59 $\pm$ 0.23

2.3 NLRP3 和 ASC 蛋白的表达情况

随着染毒浓度增加, NLRP3 和 ASC 蛋白表达量增加, 各染毒组与对照组相比, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见图 1。

染毒浓度 0 $\mu\text{g/ml}$ 12.5 $\mu\text{g/ml}$ 25.0 $\mu\text{g/ml}$ 50.0 $\mu\text{g/ml}$



注: *, 与对照组比较, $P<0.05$

图 1 镍精炼烟尘染毒 48 h 后细胞内 NLRP3 和 ASC 蛋白表达情况

2.4 细胞内 caspase-1、IL-1 β 含量

随着染毒浓度的增加, caspase-1、IL-1 β 的含量不断增加, 各染毒组与对照组相比, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。见表 2。

表 2 各组细胞内 caspase-1 和 IL-1 β 含量变化 ($\bar{x}\pm s$)

组别	caspase-1 (ng/ml)	IL-1 β (pg/ml)
对照组	16.34 $\pm$ 1.65	9.60 $\pm$ 1.32
12.5 $\mu\text{g/ml}$ 染毒组	21.72 $\pm$ 1.59	11.41 $\pm$ 2.01
25.0 $\mu\text{g/ml}$ 染毒组	23.90 $\pm$ 1.85	13.88 $\pm$ 1.79
50.0 $\mu\text{g/ml}$ 染毒组	33.12 $\pm$ 2.07	15.68 $\pm$ 1.53

3 讨论

炎症小体的概念起自 2002 年由 Tschopp 研究小组首次提出^[3], 其中 NLRP 炎症小体是 NLP 家族中的一大亚族, 包括 NLRP1、NLRP3、NLRP4, 其中 NLRP3 是研究最为常见的一个炎性因子, 它主要由 NLRP3、ASC、caspase-1 三部分组成, 激活机制也较为复杂。NLRP3 可以被病原体、DAMPs、以及外界环境损伤等多种因素激活^[4]。激活后的 NLRP3 由于自身结构缺乏相应的结构域, 必须和 ASC 蛋白结合后才能激活 caspase-1。ASC 和 caspase-1 的 N 末端热蛋白结构域结合的同时还可以和 NLRP3 结合, 这表明 ASC 在复合体中是以一种连接蛋白而存在的^[5]。caspase-1 以无活性酶原形式 pro-caspase-1 存在于细胞质中, 当炎症发生时, pro-caspase-1 高浓度聚集, 此时酶原发生自体水解, 成为有活性的 caspase-1^[6]。有活性的 caspase-1 可以将 IL-1 β 前体切割成有活性的片段。具有活性的 IL-1 β 可以促进肿瘤的生长和转移^[7-9]。Srinivasula 等^[10]测量了 293 细胞中 IL-1 β 的水平, 结果显示 caspase-1 会引起 IL-1 β 的分泌变化, 从而引起炎症瀑布效应。

镍精炼烟尘中含有金属镍以及其他多种金属, 大多通过呼吸系统吸入体内, 体内复杂的化学环境可以破坏金属镍表面的氧化膜, 从而造成镍离子的释放^[11]。研究发现镍离子对多种细胞具有不同程度的细胞毒性^[12]。我们的前期研究发现, 镍精炼烟尘会造成 NIH/3T3 细胞凋亡, 引起细胞毒性^[2], 但镍精炼烟尘是否可以导致炎性反应尚不清楚。本研究结果发现, 随着镍精炼烟尘染毒浓度的增加, 细胞存活率随着染毒浓度的增加不断降低, 并且细胞内的 ROS 浓度随着染毒剂量的增加而增加。ROS 是重要的氧化应激标志物, 表明镍精炼烟尘造成的细胞毒性可能与氧化应激之间有一定的联系。另外, ROS 作为 NLRP3 多种上游信号刺激物的一种^[13], 蓄积过多可以引起 NLRP3 借助接头蛋白 ASC 激活 caspase-1, 从而进一步激活 IL-1 β , 激发炎症反应。本实验结果还发现 NLRP3 蛋白以及 ASC 蛋白表达量也在增加, ELISA 试剂盒检测 caspase-1 含量也随染毒剂量增加而增加, 这表明镍精炼烟尘会诱导 NIH/3T3 细胞产生 NLRP3 炎性小体, 引起炎性因子 IL-1 β 分泌, 并且镍精炼烟尘染毒浓度越高, 炎性因子产生越多, 炎性反应越严重。

参考文献:

- [1] Denkhaus E, Salnikow K. Nickel essentiality, toxicity and carcinogenicity of nickel compounds [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2002, 42 (1): 35-56.
- [2] 安学军, 王玥, 胡雪莹, 等. 镍精炼烟尘致 NIH/3T3 细胞生长抑制作用的实验研究 [J]. 中国工业医学杂志, 2014, 25 (4): 125-127.
- [3] Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: A molecular

- platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta [J]. *Mol Cell*, 2002, 10 (2): 423-427.
- [4] Dowling JK, O'Neill LA. Biochemical regulation of the inflammasome [J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2012, 47 (5): 424-443.
- [5] 赵英男, 左云飞. 凋亡相关的斑点样蛋白 ASC [J]. *生命的化学*, 2006, 26 (3): 239-241.
- [6] 郭皓晨, 陈勇军, 徐易尘. Caspase-1 在炎症及程序性死亡过程中的作用 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33 (2): 182-189.
- [7] Vendramini-Costa DB, Carvalho JE. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer [J]. *Curr Pharm Des*, 2012, 18 (26): 3831-3852.
- [8] Cui G, Yuan A, Goll R, *et al.* Serum interleukin-6 levels reflect the disease status of colorectal cancer [J]. *J Surg Oncol*, 2003, 83 (4): 222-226.

- [9] Li Y, Wang L, Pappan L, *et al.* IL-1 β promotes stemness and invasiveness of colon cancer cells through Zeb1 activation [J]. *Mol Cancer*, 2012, 11 (1): 87.
- [10] Srinivasula SM, Poyet JL, Razmara M, *et al.* The PYRIN-CARD protein ASC is an activating adaptor for caspase-1 [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277 (24): 21119-21122.
- [11] Amini F, Rakhshan V, Mesgarzadeh N. Effects of long-term fixed orthodontic treatment on salivary nickel and chromium levels: A1-year prospective cohort study [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2012, 150 (1/2/3): 15-20.
- [12] 温贤涛, 王蕊, 贾璇, 等. 镍离子体外细胞毒性研究 [J]. *中国医疗器械杂志*, 2015, 39 (3): 212-215.
- [13] 雷国伟, 毛立明, 李华, 等. 炎症小体对抗微生物感染中的作用 [J]. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33 (12): 1301-1315.

邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯对初断乳雄性小鼠的毒性作用

Toxic effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate on early weaned male mice

白金, 张玉, 张元元, 赛林霖, 陈尚雅, 薄存香

(山东省职业卫生与职业病防治研究院/山东第一医科大学/山东省医学科学院, 山东 济南 250062)

摘要: 选用 ICR 初断乳雄性小鼠, 按体重随机分为对照组和 250、500、1 000 mg/kg 邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯(DEHP)染毒组, 连续染毒灌胃 8 周, 观察各组小鼠的一般状况、血液指标、脏器系数及病理组织学检查。结果显示, DEHP 能损伤小鼠肝脏和睾丸, 且睾丸损伤较明显。

关键词: 邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯 (DEHP); 小鼠; 生殖毒性; 脏器系数

中图分类号: R99; O625.523 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X (2019)03-0203-02

DOI:10.13631/j.cnki.zggyyx.2019.03.014

邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯[di-(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP] 属于邻苯二甲酸酯类(phthalate esters, PAEs)化合物, 是常用的塑化剂, 因 DEHP 与塑料间是氢键或范德华力结合, 易于扩散至大气、土壤和水域等造成环境污染^[1], 对人体健康造成危害。本研究选用初断乳 ICR 小鼠观察 DEHP 对小鼠的毒性作用, 为研究 PAEs 物质对幼儿及青少年生长发育的影响提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器

DEHP (国药集团化学试剂有限公司), 纯度 $\geq 99.0\%$, 溶剂为玉米油。HM325 轮转式切片机 (Thermo)、YT-7FB 摊烤片机、2T-12M 组织脱水机、YT-6LF 石蜡包埋机, 湖北亚光医用电子有限公司; OLYSIA-Bioreport 图像拍摄系统, 日

本奥林巴斯公司。

1.2 实验动物及处理

选择初断乳雄性 ICR 小鼠 40 只, 体重 16~18 g, 由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供, 动物合格证号: SCXK (鲁) 20140007。按体重随机分为对照组和 DEHP 染毒组 (250、500、1 000 mg/kg), 每组 10 只。DEHP 染毒组连续灌胃染毒 8 周, 6 次/周, 于末次染毒 24 h 后处死; 对照组给予等量的玉米油。实验在 SPF 级动物房内进行, 动物房温度 20~24℃, 湿度 40%~70%。

1.3 检测指标及方法

(1) 一般状况观察: 观察小鼠每天进食、饮水、行为活动、尿液、粪便等有无异常, 每周称重一次。(2) 血液学指标测定: 于末次给药后 24 h 检测小鼠血液 WBC、RBC、Hb 及 PLT。(3) 脏器系数: 称量小鼠肝脏、肾脏、睾丸湿重, 按脏器系数 (%) = 脏器湿重 (g) / 体重 (g) $\times 100\%$ ^[2] 计算。(4) 病理组织学检查: 各组随机选取 3 只小鼠的肝脏、肾脏、睾丸组织, 常规病理切片观察其改变。

1.4 统计处理

采用 SPSS 13.0 软件进行分析。数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, 进一步两两比较采用 Dunnett *t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

500、1 000 mg/kg 染毒组各有 1 只小鼠于给药后第 6 周出现小便失禁, 其它小鼠未见明显异常症状。给药后第 1 周 1 000 mg/kg 染毒组小鼠体重 $[(23.40 \pm 1.41) \text{g}]$ 低于对照组 $[(24.80 \pm 1.40) \text{g}]$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 250、500 mg/kg 染毒组与对照组比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

收稿日期: 2019-01-08; 修回日期: 2019-02-26

基金项目: 山东省医药卫生科技发展计划项目 (2016WS0539); 山东省自然科学基金 (ZR2017YL001); 山东省科技攻关项目 (2018GSF118212)

作者简介: 白金 (1981—), 男, 主治医师, 从事职业病临床。

通信作者: 薄存香, 副研究员, E-mail: bocunxiang@163.com。