

胸腹内压变化等因素有关。脂肪肝患者脂肪变性与纤维化过程中,随着病变时间的增加,肝内纤维结缔组织逐渐增加,使肝实质顺应性降低;同时肝内纤维结缔组织的增加和肝实质僵硬程度加重,使肝静脉狭窄或变细;肝静脉管道结构变模糊,使肝静脉的顺应性降低,从而影响肝静脉的血流频谱和血流动力学变化。本研究中脂肪肝组与无脂肪肝组造模前、后肝右静脉最大流速差异无统计学意义 ( $P>0.05$ ),可能与本研究中大鼠造模时间短、脂肪肝程度较轻有关外,还可能与麻醉致不同个体大鼠呼吸周期中胸腹内压变化不同有关。

综上,NAFL致肝脏体积增大,超声测量肝脏各径线也随之增大,可为NAFL研究提供有力的基础数据,但剪切波V值、E值以及肝脏血流动力学的改变对于脂肪肝的诊断价值有待进一步研究。

#### 参考文献

[1] 王羚,董梁,夏国园,等.高脂高糖低蛋白构建大鼠非酒精性脂

肪肝模型的实验研究[J].职业与健康,2015,31(2):190-192.

[2] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组.中国非酒精性脂肪性肝病诊疗指南(2010年修订版)[J].中国医学前沿杂志(电子版),2012,4(7):4-10.

[3] 刘绍生,赵永军,张琳静,等.前脂肪细胞增殖分化在高脂膳食诱导大鼠肥胖及运动预防肥胖中的作用[J].中国运动医学杂志,2017,36(8):667-674.

[4] 宋倩.剪切波组织定量技术在非酒精性脂肪肝诊断中的意义[J].中国超声医学杂志,2021,37(2):157-159.

[5] 姚明解,文夏杰,王雷婕,等.基于瞬时弹性成像技术检测参数的非酒精性脂肪性肝病进展评估模型的建立[J].临床肝胆病杂志,2021,37(7):1614-1618.

[6] 李陶,史洪涛,熊秀琴,等.非酒精性脂肪肝患者肝静脉血流多普勒频谱形态的观测[J].中国医学影像技术,2006,22(2):266-268.

[7] 王青,毛钊兰,邓日锋.不同病情非酒精性脂肪肝患者的超声波形特征分型及血流动力学表现[J].影像研究与医学应用,2021,5(24):51-53.

(收稿日期:2022-11-09;修回日期:2023-02-13)

# 丙烯酰胺对人神经母细胞瘤 NB-1 细胞一氧化氮、一氧化氮合酶、谷氨酸水平的影响

## Effect of acrylamide on expression levels of NO, NOS, Glu in human neuroblastoma NB-1 cells

韩伟<sup>1</sup>,李冲<sup>2</sup>,王茜<sup>3</sup>

(1.唐山市疾病预防控制中心,河北唐山063000;2.邢台市疾病预防控制中心;3.华北理工大学公共卫生学院)

**摘要:**为研究丙烯酰胺(ACR)对NB-1细胞一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)及谷氨酸(Glu)表达水平的影响,将NB-1细胞诱导分化成熟后,用不同浓度ACR(0、40、80、120  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )对NB-1细胞染毒48 h,检测细胞内外NO、NOS及Glu的含量。结果显示,ACR可以降低和减少细胞内NOS活性和NO分泌,细胞内、外Glu含量降低,其机制可能与ACR抑制 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 的合成有关。

**关键词:**NB-1细胞;丙烯酰胺(ACR);一氧化氮(NO);一氧化氮合酶(NOS);谷氨酸(Glu)

中图分类号:R994 文献标识码:B

文章编号:1002-221X(2023)03-0241-03

DOI:10.13631/j.cnki.zggyyx.2023.03.013

研究发现<sup>[1-3]</sup>,丙烯酰胺(acrylamide, ACR)具

有遗传、生殖和发育毒性。近年来,虽有大量研究致力于探讨ACR的神经毒性机制,但具体机制尚未阐明。本研究选择性状稳定的NB-1细胞株,研究ACR对NB-1细胞一氧化氮(NO)、一氧化氮合酶(NOS)及谷氨酸(Glu)表达水平的影响,以期在细胞水平上为ACR神经毒性机制研究提供线索。

### 1 材料与方法

**1.1 主要仪器及试剂**  $\text{CO}_2$ 培养箱(Thermo);倒置显微镜(Olympus);2S-3型酶标仪(北京新机电公司)。ACR(国药集团化学试剂有限公司),db-cAMP、MEM培养基(Sigma公司),胎牛血清(Hyclone),马血清(GIBCO公司),细胞培养板(costar),BCA蛋白定量试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司),Glu、NO、NOS测定试剂盒(南京建成生物技术公司)。

作者简介:韩伟(1984—),女,主管医师,从事疾病预防控制工作。

## 1.2 方法

**1.2.1 细胞培养** 实验所需 NB-1 细胞由中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所提供。细胞培养基由 80% MEM、10%胎牛血清、10%马血清、100 IU/ml 青霉素和 100  $\mu\text{g/ml}$  链霉素组成, pH 7.4。培养箱设置为 37  $^{\circ}\text{C}$ 、95% $\text{O}_2$ 、5% $\text{CO}_2$ , 在此环境下, 每 4 d 换液 1 次。待细胞达到其对数生长期时对其传代。NB-1 细胞生长稳定后对其进行诱导分化。使用诱导剂 db-cAMP, 终浓度为 1 mmol/L, 每隔 2 d 换液 1 次。本次实验使用经 db-cAMP 处理 10 d 后的细胞, 几乎所有的幼稚细胞均分化成熟。将诱导成熟的 NB-1 细胞用不同浓度 ACR 处理后使其终浓度分别为 0、40、80、120  $\mu\text{g/ml}$ , 培养 48 h 后进行试验。酶标仪 550 nm 波长下测定吸光度 (OD)。

**1.2.2 NO、NOS、Glu 含量测定** 将 NB-1 细胞反复冻融 3 次使其破碎, 按照试剂盒说明书要求进行操

作, 采用酶标仪分别测定各波长 OD, 根据试剂盒说明书中公式计算 Glu、NO、NOS 含量。细胞外直接用细胞培养液测定, 采用 Bradford 法测定蛋白含量。

**1.3 统计分析** 采用 SPSS 21.0 软件进行统计分析, 显著性检验采用 ANOVA 方差分析, 各组之间的两两比较采用 LSD 检验, 显著性水平为  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

随 ACR 浓度增高, NB-1 细胞内 NO、NOS 及细胞内、外 Glu 含量均降低, ACR 三个剂量染毒组与对照组相比较, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 以 80  $\mu\text{g/ml}$  染毒组减少最为显著; 当染毒浓度增至 120  $\mu\text{g/ml}$  时, 其抑制效应减退, 但与对照组相比仍有抑制作用。细胞外 NO 含量无明显改变, NOS 活性降低不明显, 仅 120  $\mu\text{g/ml}$  染毒组 NOS 表达水平显著低于对照组 ( $P<0.01$ )。详见表 1。

表 1 不同浓度 ACR 对 NB-1 细胞内外 NO、NOS、Glu 表达水平的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )

ACR 浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	NO		NOS		Glu	
	细胞外 ( $\mu\text{mol/L}$ )	细胞内 ( $\mu\text{mol/g prot}$ )	细胞外 ( $\mu\text{mol/L}$ )	细胞内 ( $\mu\text{mol/g prot}$ )	细胞外 ( $\mu\text{mol/L}$ )	细胞内 ( $\mu\text{mol/g prot}$ )
0 (对照)	16.121 $\pm$ 0.032	29.751 $\pm$ 0.008	3.746 $\pm$ 0.091	2.440 $\pm$ 0.005	22.746 $\pm$ 0.068	35.772 $\pm$ 0.057
40	15.938 $\pm$ 0.068	23.657 $\pm$ 0.036 <sup>a</sup>	3.815 $\pm$ 0.085	2.324 $\pm$ 0.029 <sup>a</sup>	15.339 $\pm$ 0.092 <sup>a</sup>	24.072 $\pm$ 0.010 <sup>a</sup>
80	16.073 $\pm$ 0.047	22.649 $\pm$ 0.037 <sup>a</sup>	3.669 $\pm$ 0.078	2.154 $\pm$ 0.025 <sup>a</sup>	9.779 $\pm$ 0.051 <sup>a</sup>	14.442 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>
120	15.879 $\pm$ 0.071	27.032 $\pm$ 0.002 <sup>a</sup>	2.436 $\pm$ 0.054 <sup>b</sup>	2.303 $\pm$ 0.476 <sup>a</sup>	17.003 $\pm$ 0.078 <sup>a</sup>	28.558 $\pm$ 0.064 <sup>a</sup>

注: 与对照组比较, a,  $P<0.05$ ; b,  $P<0.01$ 。

## 3 讨论

NB-1 细胞株是日本学者于 1973 年建立的第一个人类神经母细胞瘤细胞系, 其提供了一个离子通道在分化过程中的表达和调节的体外模型系统<sup>[4]</sup>, 能够表达出与神经元相似的生化、药理和功能方面的特性。

NO 广泛分布于生物体各组织中, 是一种重要生物信使分子和效应分子, 具有多种生理功能<sup>[5]</sup>。NO 在细胞内由 NOS 催化精氨酸而成, 包括神经细胞性 NOS (nNOS)、诱导性 NOS (iNOS) 和内皮细胞性 NOS (eNOS) 三种亚型。所有 NOS 均有钙调蛋白 (CaM) 结合位点, 与 CaM 结合后才能够活化, 当  $\text{Ca}^{2+}$  进入细胞与 CaM 结合形成  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  复合物, 与 eNOS 结合而激活 eNOS, 使其活性及 NO 合成增加<sup>[6-7]</sup>。

本研究表明, ACR 浓度在 40~120  $\mu\text{g/ml}$  时均可抑制 NB-1 细胞产生 NOS 和 NO, 以 80  $\mu\text{g/ml}$  作用最为明显。推测 ACR 可能直接作用于 CaM, 抑制  $\text{Ca}^{2+}/$

CaM 复合物的形成, 使 NOS 激活受阻而导致 NO 合成减少, 表明 ACR 对 NB-1 细胞有毒性作用。李冲等<sup>[8]</sup>研究证实, ACR 可导致 NB-1 细胞内  $\text{Ca}^{2+}$  紊乱, 进而引发一系列的细胞损伤效应; 与 LoPachin<sup>[9]</sup>、Nordin-Andersson 等<sup>[10]</sup>的研究结果一致。尽管在 ACR 120  $\mu\text{g/ml}$  时细胞内 NOS 和 NO 含量呈升高趋势, 但相对于正常对照组仍有抑制作用, 提示大量  $\text{Ca}^{2+}$  只能活化部分被抑制的 CaM, 高浓度 ACR 对 CaM 有较强的抑制作用, 在一定程度上促进了 NOS 和 NO 释放。

随着 ACR 浓度的增高, 细胞内、外 Glu 含量均减少, 且 ACR 高剂量组较低、中染毒剂量组有升高趋势, 推断其机制仍与神经组织中的 CaM 有关。CaM 对突触功能有重要的调节作用,  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  可通过激活一些神经递质合成所需的酶系而调节神经递质的合成, 影响神经递质的释放。ACR 直接作用于 CaM, 使  $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$  复合物合成受阻, 导致 Glu 合成及释放减少。神经递质释放是一精细复杂的过程, 关于 ACR 影响神经递质释放的机制尚有待进一步研究。

(下转第 270 页)

剂量监测值均 $<1$  mSv/年;放疗技师、放疗医师与病人接触时间较长,个人剂量监测值高于其他临床岗位,如放疗医师岗位个人剂量监测最大值达2.97 mSv/年。运行维护人员的受照剂量主要来自对治疗设备的直接接触,终端运维岗有3人次个人剂量监测值 $>1$  mSv/年,加速器运维岗、电源辅助运维岗各有2人次 $>1$  mSv/年。提示临床工作人员中放疗医师、放疗技师及运行维护人员需加强个人辐射防护。

为进一步做好职业病危害防护工作,降低医用重离子相关放射工作人员个人受照剂量,保护其身体健康,结合相关研究<sup>[7]</sup>现提出如下建议:(1)加强医用重离子相关工作人员职业素养和防护意识。医务工作人员避免在治疗室内治疗机头和治疗床区域停留过长时间;运行维护人员在原有加速器停机通风时间的基础上,增加通风间隔时间,减少在治疗室内的停留时间;减少临床工作人员在治疗结束后立刻与患者接触的时间。(2)加强医院内部重离子监督管理制度的建设。补充完善医院辐射安全管理制度;持续加强核安全文化宣贯,全面培植核安全文化素养,提高医用重离子相关工作人员的守法意识;高度重视辐射安全关键岗位人员的管理工作,落实岗位职责,加强对

各岗位人员的监督管理,加强辐射安全与防护的专业培训,避免不规范穿戴防护装备或其他原因造成的超剂量照射。

(志谢 中国科学院近代物理研究所苏有武研究员及兰州大学循证医学中心对本研究的帮助)

#### 参考文献

- [1] 杨莉,王丽姣,邵明刚,等.用于环境辐射水平监测的热释光测量系统的质量控制[J].中国辐射卫生,2021,30(4):457-462.
- [2] 郝述霞,邓君,刘晓惠,等.全国医疗机构放射工作人员2018年职业健康监测结果分析[J].中国职业医学,2020,47(6):701-704.
- [3] 王孝娃,杜宁,王岚,等.上海市质子碳离子放射治疗设施辐射防护管理浅谈[J].中国设备工程,2019(16):36-37.
- [4] 苏萌,赵健,米丽娟.2009—2011年天津市和平区医疗放射工作人员个人剂量监测结果分析[J].职业与健康,2012,28(22):2712-2714.
- [5] 孙全富,牛昊巍,李小娟.我国放射工作人员职业健康管理的几个问题[J].中华放射医学与防护杂志,2014,34(3):161-163.
- [6] 王岚,王孝娃.上海市质子重离子医院辐射防护管理实践探索[J].中国医院建筑与装备,2021,22(1):41-43.
- [7] 杨克虎.循证社会科学的生产、发展与未来[J].图书与情报,2018(3):1-10.

(收稿日期:2022-09-08;修回日期:2022-10-30)

(上接第242页)

(志谢 本研究使用的NB-1细胞株由Kagoshima University的Masaki Kameyama教授惠赠)

#### 参考文献

- [1] 张雁林,赵金垣,徐希娟,等.丙烯酰胺毒性研究进展[J].中国工业医学杂志,2014,27(5):353-356.
- [2] 鲁静,周催,孙娜,等.丙烯酰胺生殖和发育毒性及其生物标志物的研究进展[J].食品安全质量检测学报,2014,5(2):457-462.
- [3] 田素民,马宇昕,刘靖,等.丙烯酰胺亚急性染毒对断乳期雄性大鼠精子形态的影响[J].广东药学院学报,2014,30(1):63-66.
- [4] Catterall WA. From ionic currents to molecular mechanisms: The structure and function of voltage-gated sodium channels[J].Neuron,2000,26(1):13-25.

- [5] Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S, et al. Nitric oxide and cardiac function[J].Life Sci,2007,81(10):779-793.
- [6] 钟慈声,孙安阳.一氧化氮的生物医学[M].上海:上海医科大学出版社,1997:15-24.
- [7] 刘景生.细胞信息与调控[M].北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社,1998:212-226.
- [8] 李冲,王茜,曹燕花,等.丙烯酰胺对NB-1细胞钙稳态的影响[J].中国工业医学杂志,2012,25(3):194-196.
- [9] LoPachin RM, Castiglia CM, Lehning E, et al. Effects of acrylamide on subcellular distribution of elements in rat sciatic nerve myelinated axons and Schwann cells[J].Brain Res,1993,608(2):238-246.
- [10] Nordin-Andersson M, Walum E, Kjellstrand P, et al. Acrylamide-induced effects on general and neurospecific cellular functions during exposure and recovery[J].Cell Biol Toxicol,2003,19(1):43-51.

(收稿日期:2022-04-19;修回日期:2023-01-13)