

- comparison of metabolism and hemoglobin adducts in roents following dermal, intraperitoneal, oral, or inhalation exposure [J]. Toxicol Sci, 2003, 75 (2): 260-270.
- [6] Miyake S, Kitamura T, Shimko Y. Morphological differentiation in vitro of human continuous and functional neuroblastoma cell line NB-I [J]. Neurosurgery (Japan), 1975, 3: 407-414.
- [7] 杨翠香, 陈婉蓉. MTT 法检测丙烯酰胺对神经细胞的毒性作用 [J]. 上海铁道大学学报, 1998, 19 (1-2): 7-9.
- [8] 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.
- [9] Lee J Y, Shin J W, Lee E H, et al. Comparison of the effects of propofol and pentobarbital on hydrogen peroxide-stimulated hepatic SNU761 cells [J]. Korean Anesthesiol, 2010, 58 (3): 277-282.
- [10] Steen E, Terry B M, Rivera E J, et al. Impaired insulin and insulinlike growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease is this type 3 diabetes [J]. Alzheimers Dis, 2005, 7 (1): 63-80.

镍精炼烟尘致 NIH/3T3 细胞生长抑制作用的实验研究

Study of the growth suppression effect of nickel-refining fume on NIH/3T3 cell

安学军, 王玥, 胡雪莹, 陈丽丽, 吴永会

AN Xue-jun, WANG Yue, HU Xue-ying, CHEN Li-li, WU Yong-hui

(哈尔滨医科大学公共卫生学院, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要: 研究镍精炼工人接触镍精炼烟尘的生物学效应。通过 MTT 染色法观察细胞形态, 用四甲基偶氮唑蓝 (MTT) 法检测细胞生长抑制率。结果发现, 不同浓度下, 作用一定时间细胞生长均受到抑制, 且随作用时间增长, 受试物浓度增加, 细胞抑制作用增加, 呈现出时间-反应关系和剂量-反应关系, 且细胞在形态学上也出现不同程度的改变。提示镍精炼烟尘能使 NIH/3T3 细胞凋亡, 细胞的生长受到抑制。

关键词: 镍精炼尘; 细胞形态; 细胞毒性

中图分类号: R135.1 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2012)02-0125-03

我国职业性镍所涉及的作业达 30 余种^[1]。镍及其化合物被广泛应用于现代工业如硬币、珠宝和其他金属合金的生产和电镀^[2]。在职业环境中, 镍暴露主要发生在镍精炼、电镀和焊接等环节^[3]。镍化学物可能在生产、循环和处理的所有阶段以相当大的量扩散到环境中。已经有充分的证据表明镍是人类致癌物^[4]。镍的物理和化学性质比较复杂, 值得注意的是致癌危险性跟镍化物的形式有关系^[5]。人们对其致癌机制也做了大量研究, 但对镍精炼烟尘的研究却少见报道, 由于镍精炼烟尘中还存在其他金属污染物, 所以对于镍精炼烟尘与镍化学物引起的毒性作用是否一致还存在疑问。本研究通过检测镍精炼烟尘对细胞的毒性的影响, 探讨镍精炼烟尘的致癌危险性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 靶细胞 小鼠肺成纤维细胞 (NIH/3T3 细胞), 购自北京市肿瘤研究所, 接种于含体积分数为 10% 胎牛血清的

DMEM 培养液中, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, EDTA/胰蛋白酶混合液消化, 传代, 备用。

1.1.2 受试物与试剂 受试物来源于某镍精炼厂的精炼炉前沉降尘, 用玛瑙研钵磨细后, 检测分散度, 受试物颗粒 < 5 μm 者占 99.9%, 受试物用紫外线照射灭菌, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 配成一定浓度的混悬液, 备用, 再稀释时摇匀。噻唑蓝 [溴化-3-(4, 5-二甲基乙噻唑基)-2, 5-二苯基四氮唑, MTT] 购自上海华舜生物技术有限公司, 二甲基亚砜 (DMSO) 分析纯, 购自北京化工试剂厂, 正常熔点琼脂糖购自 Gibco 公司, 低熔点琼脂糖购自 Gibco 公司。

1.1.3 主要仪器 TE-HE 型 CO₂ 培养箱, 倒置荧光显微镜 (OLYMPUS-IX71 型), 全自动酶标仪 (BIO-RAD 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞制备 将细胞密度为 1×10^5 个/ml 的 NIH/3T3 细胞接种到含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液的细胞培养瓶中, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 NIH/3TE 细胞形态学观察 选取生长良好的细胞, 接种于 24 孔细胞培养板上, 每孔加入 800 μl 不同浓度的染毒液, 终浓度分别为 100.00、50.00、25.00 μg/ml。37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 在倒置显微镜下观察细胞形态。

1.2.3 MTT 染色法观察 NIH/3T3 细胞凋亡及坏死 取对数生长期的细胞, 接种到 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 加入含不同浓度的镍精炼烟尘的 10% 的胎牛血清的 DMEM 培养液, 使其终浓度分别为 6.25、12.50、25.00、50.00 和 100.00 μg/ml, 同时设阴性对照组和不加细胞的空白对照组, 分别培养 24 h。倒置显微镜下观察细胞形态。

1.2.4 镍精炼烟尘对 NIH/3T3 细胞增殖作用的影响 取对数生长期的细胞, 接种到 96 孔板中, 待细胞贴壁后, 加入含不同浓度镍精炼烟尘的胎牛血清 (质量分数 10%) 的 DMEM 培养液, 使其终浓度分别为 6.25、12.50、25.00、50.00 和 100.00 μg/ml, 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℃、5% CO₂ 条件下分别培养 6、12、

收稿日期: 2011-09-26; 修回日期: 2012-02-10
基金项目: 国家自然科学基金项目 (81072283); 教育部博士学科点基金 (20102307110019)

作者简介: 安学军 (1968—), 男, 硕士研究生。

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

24、48 h。在酶标仪 490 nm 波长下测定各孔吸光度 (A) 值。

1.3 数据分析

MTT 实验所得吸光度值以平均值 $\pm$ 标准差表示, 数据均使用 SPSS17.0 软件分析, 组间差异性检验采用单因素方差分析的方法进行。

2 结果

2.1 镍精炼烟尘作用于 NIH/3T3 细胞的形态学变化

镍精炼烟尘与 NIH/3T3 细胞共培养 24 h 后, 倒置显微镜下可见: 空白对照组细胞贴壁生长, 细胞呈梭形, 生长良好, 边界清楚, 大小均一, 胞浆均匀, 细胞核圆形或椭圆形, 位于细胞中央, 细胞相互融合成单层网状铺于孔底 (见封三图 1. A)。处理组 NIH/3T3 细胞形态发生明显改变, 低浓度使细胞收缩体积变小、分离, 部分细胞变成圆形或者椭圆形, 少量细胞悬浮; 高浓度明显看到细胞间隙增大, 胞浆不均匀, 胞突消失、脱落, 空泡样细胞增多 (见封三图 1. B、C、D)。

表 1 不同浓度镍精炼烟尘不同作用时间 NIH/3T3 细胞的吸光度值 ($n=8$)

浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	6 h	12 h	24 h	48 h
0	0.384 ± 0.014	0.298 ± 0.034	0.466 ± 0.097	0.800 ± 0.042
6.25	0.354 ± 0.014	$0.262 \pm 0.027^*$	$0.387 \pm 0.015^*$	$0.584 \pm 0.062^*$
12.50	$0.347 \pm 0.041^*$	$0.274 \pm 0.029^*$	$0.332 \pm 0.072^*$	$0.524 \pm 0.053^*$
25.00	$0.333 \pm 0.023^*$	$0.233 \pm 0.045^*$	$0.280 \pm 0.198^*$	$0.377 \pm 0.018^*$
50.00	$0.321 \pm 0.014^*$	$0.184 \pm 0.027^*$	$0.240 \pm 0.031^*$	$0.138 \pm 0.017^*$
100.00	0.278 ± 0.033	$0.150 \pm 0.019^*$	0.278 ± 0.033	$0.038 \pm 0.004^*$

注: 与阴性对照组比较, $* P < 0.05$ 。

表 2 不同浓度镍精炼烟尘不同作用时间 NIH/3T3 细胞的相对成活率 %

浓度 ($\mu\text{g/ml}$)	6 h	12 h	24 h	48 h
0	100.00	100.00	100.00	100.00
6.25	92.19	87.92	83.05	73.00
12.50	90.36	91.95	71.24	65.50
25.00	86.72	78.19	60.09	47.13
50.00	83.59	61.74	51.50	17.25
100.00	72.40	50.33	15.45	4.75

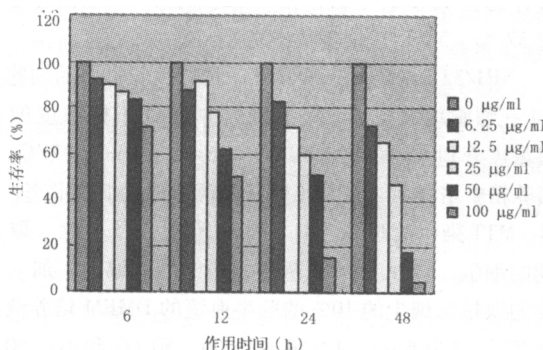


图 3 不同浓度镍精炼烟尘不同作用时间 NIH/3T3 细胞的相对成活率

3 讨论

长时间接触镍化合物已经被认为是肺癌发生的潜在原因之一, 但是镍诱导肺癌的分子机制尚不清楚^[6]。颗粒状镍化合物进入细胞主要是靠细胞的吞噬作用^[7]。大量的研究表明不溶性镍化合物通过细胞的吞噬作用进入细胞, 其对细胞的毒性与细胞对其的吞噬活性有关。Costa 等研究进一步发现不

2.2 MTT 染色法观察 NIH/3T3 细胞凋亡及坏死

细胞加入 MTT 培养 4 h 后在倒置显微镜下发现阴性对照组细胞呈圆形, 结构完整, 细胞大小较均一, 形成的蓝紫色结晶分布比较均匀, 在细胞边缘聚集, 细胞中央也有蓝紫色结晶分布, 形成眼睛状 (见封三图 2. A)。而处理组坏死细胞不着色, 细胞形态为不规则圆形, 体积变小或暂无变化, 或呈空泡状 (见封三图 2. B)。

2.3 镍精炼烟尘对 NIH/3T3 细胞增殖作用的影响

分别用镍精炼烟尘 0、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{g/ml}$ 作用 NIH/3T3 细胞 6、12、24、48 h 后, 用 MTT 法测定镍精炼烟尘对 NIH/3T3 细胞的抑制作用 (图 3、4)。呈现剂量-反应和时间-反应关系。镍精炼烟尘细胞吸光度值除浓度 6.25 $\mu\text{g/ml}$, 作用 6 h 无统计学意义外, 其他作用浓度和每个时间点细胞的吸光度值与阴性对照组比较, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 1、表 2。

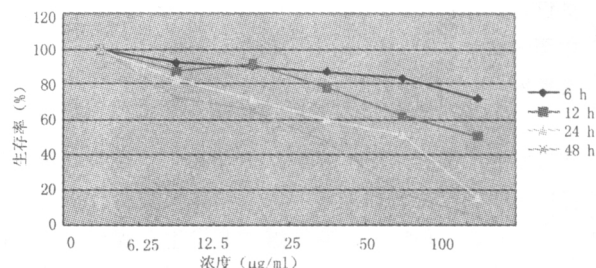


图 4 镍精炼烟尘对 NIH/3T3 细胞增殖抑制作用

溶性镍化合物的致癌性与细胞的摄入成正比^[8]。在自然界中, 不溶于水的镍化合物比可溶性的更为普遍^[9]。而不溶性镍化合物被细胞吞噬后在细胞内溶解而释放出的二价镍离子作用于细胞核, 引起染色质的改变, 而且这种形式的镍化合物在细胞内溶解的持久性是增强其致癌性的主要环节^[10]。

本实验直接观察正常细胞贴壁生长, 细胞呈梭形, 生长良好, 边界清楚, 大小均一, 镍精炼烟尘作用于 NIH/3T3 细胞 24 h 后, 细胞失去正常形态, 细胞变圆脱落; 细胞浆内聚集了黑色的镍精炼烟尘颗粒。

MTT 比色法, 即四唑盐比色实验是一种检测细胞存活和生长的方法。该方法灵敏度高, 已广泛用于细胞毒性实验。在一定细胞数范围内, MTT 结晶形成的量与细胞数成正比^[11,12]。在本次实验中, 镍精炼烟尘对 NIH/3T3 细胞的生长有抑制作用, 在形态学上均有不同程度的改变。镍精炼烟尘在 6.25 $\mu\text{g/ml}$ 时, 短时间作用对细胞的生长几乎没有影响。在浓度为 100.00 $\mu\text{g/ml}$ 时, 明显抑制细胞的生长; 作用 48 h

时, 细胞的生存率仅为 4.75%。在各时间点低浓度 (6.25、12.50、25.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 时, 对细胞生长的抑制作用不明显, 在较高浓度 (50.00、100.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 时表现出明显的抑制作用, 细胞的生存率大大降低。在各个浓度点上, 作用 6、12 h, 细胞抑制作用变化不大; 作用 24 h 后, 随着时间的延长, 细胞的抑制作用明显增加。本实验结果显示, 镍精炼烟尘可以对体外培养的 NIH/3T3 细胞产生毒性, 抑制细胞生长, 随着作用时间的延长和作用浓度的增加, 这种作用也愈加明显。

参考文献:

- [1] 蔡跃华. 镍及其化合物对人和动物的毒性作用 [J]. 食品研究与开发, 2005, 25 (4): 192-194.
- [2] Li Qin, Suen Ting-Chung, Sun Hong. Nickel compounds induce apoptosis in human bronchial epithelial Beas-2B cells by activation of c-Myc through ERK pathway [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2009, 235: 191-198.
- [3] Zhao J, Shi X, Castranova V, et al. Occupational toxicology of nickel and nickel compounds [J]. J Environ Pathol Toxicol Oncol, 2009, 28: 177-208.
- [4] International Agency for Research on Cancer. Nickel and nickel compounds. In IARC Monographs on the Evaluation of Risks to Humans. Chromium, Nickel and Welding [J]. 1990, 49: 257-445.
- [5] Goodman, J E, Prueitt R L, Thakali S, et al. The nickel ion bio-availability model of the carcinogenic potential of nickel-containing sub-

stances in the lung [J]. Crit Rev Toxicol, 2011, 41: 142-174.

- [6] Ding Jin, He Guoping, Gong Wenfeng. Effects of nickel on cyclin expression, cell cycle progression and cell proliferation in human pulmonary cells [J]. Cancer Epidemiology & Biomarkers Prevention, 2009, 18 (6): 1720-1729.
- [7] Costa M, Abbraccio M P. Factors in influencing the phagocytosis, neoplastic transformation, and cytotoxicity of particulate nickel compounds in tissue culture systems [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1981, 60: 313-323.
- [8] Costa M, Mollenhauer H H. Phagocytosis of nickel subsulfide particles during the early stages of neoplastic transformation in tissue culture [J]. Cancer Research, 1980, 40: 2688-2694.
- [9] Oller A R, Cappellini D, Henderson R G, et al. Comparison of nickel release in solutions used for the identification of water-soluble nickel exposures and in synthetic lung fluids [J]. Environ Monit, 2009, 11: 823-829.
- [10] Costa M. Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 1991, 31: 321-337.
- [11] 贾光, 刘世杰. 应用台盼蓝拒染法与 MTT 法判断 Cr (VI) 细胞毒性的比较 [J]. 中国工业医学杂志, 2000, 14 (3): 49.
- [12] 吴静, 蒋颂辉, 陈约. 水体有机物和蓝藻对 BALB/c3T3 细胞的毒性作用 [J]. 中国公共卫生, 2001, 17 (11): 1019-1021.

NAC 对矽肺大鼠炎症介质的干预作用

Intervention effect of N-acetylcysteine on inflammation mediators in silica exposed rats

张华¹, 李鹏², 于维松¹, 徐静¹, 张春玲¹

ZHANG Hua¹, LI Peng², YU Wei-song¹, XU Jing¹, ZHANG Chun-ling¹

(1. 青岛市中心医院, 山东 青岛 266042; 2. 山东省职业卫生与职业病防治研究所, 山东 济南 250062)

摘要: 观察 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 对矽肺大鼠早期炎症介质肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-8 (IL-8) 和高敏 C-反应蛋白 (hsCRP) 的干预作用, 并探讨炎症因素在矽肺发病过程中的作用。选取 Wistar 大鼠为研究对象, 随机分为模型组、治疗组、对照组 3 组, 每组 32 只。模型组以气管滴注二氧化硅混悬液建立矽肺大鼠模型。治疗组以大剂量 NAC 在成模前一周进行每天灌胃干预治疗。分别在染尘后的第 3、7、14、28 天分批处死大鼠取材。切取肺组织标本作病理切片, 行苏木精-伊红 (HE) 染色, Masson 染色, TNF- α 免疫组织化学染色, 观察肺组织病理变化, 用酶联免疫法 (ELISA) 测定血清和支气管肺泡灌洗液 (BALF) 中 TNF- α 和 IL-8 的含量, 用散射比浊法测定 hsCRP 含量。模型组大鼠血清和 BALF 中 TNF- α 、IL-8、hsCRP 的浓度明显高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组相比较, 治疗组各时间点血清和 BALF 中 TNF- α 、IL-8 和 hsCRP

浓度均低于模型组, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果表明, 在矽肺大鼠模型中, 大剂量 NAC 有助于减轻血清和 BALF 中 IL-8、TNF- α 、hsCRP 等炎症介质的升高, 提示 NAC 可能有助于延缓肺纤维化的发生。

关键词: 矽肺; NAC; 肿瘤坏死因子- α ; 白细胞介素-8; 高敏 C-反应蛋白

中图分类号: R135.2 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2012)02-0127-04

二氧化硅结晶体吸入肺部早期, 首先表现为急性炎症反应, 主要为氧化应激反应和炎症细胞的募集^[1]。氧化应激被认为是外界和内部信号引起炎症反应的一个重要组成部分, 能够激活转录因子, 如 NF- κ B、AP-1, 这些转录因子又可进一步增强有害刺激物引起的炎症反应。

本实验拟通过抗氧化剂 NAC 大剂量早期干预观察大鼠矽肺模型血清、BALF 中相关炎症因子的改变和肺组织的病理变化, 探讨 NAC 对矽肺大鼠模型肺脏及全身的炎症反应的干预作用。

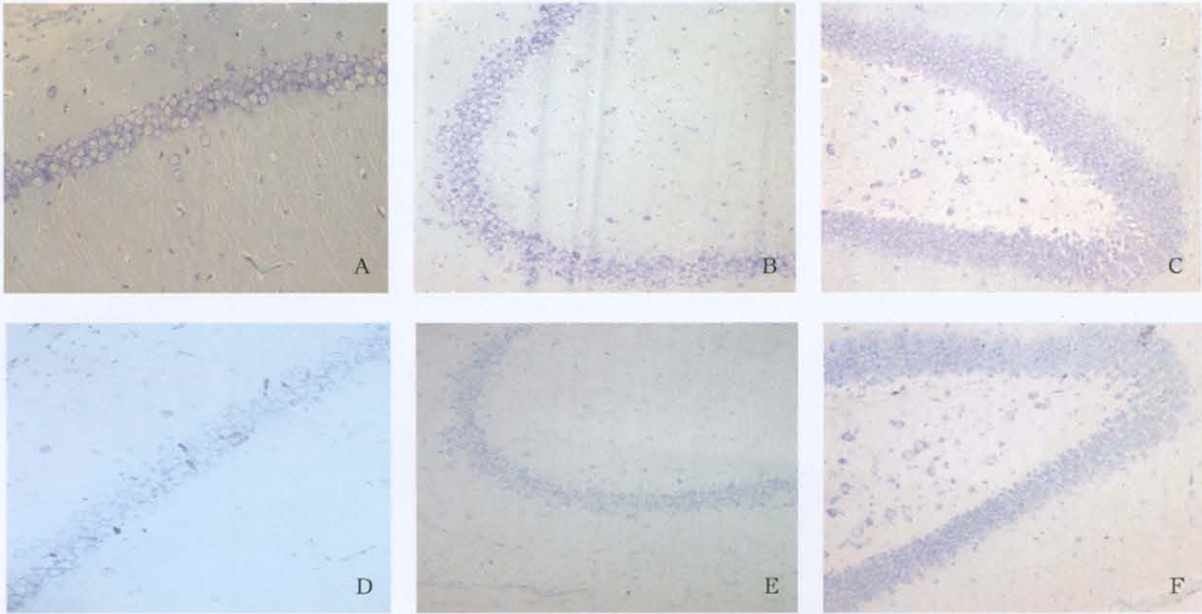
1 材料与方法

收稿日期: 2011-09-26; 修回日期: 2011-11-21

作者简介: 张华 (1971—), 女, 硕士, 从事职业病临床工作。

通讯作者: 张春玲 (1966—), 女, 硕士生导师, 教授。

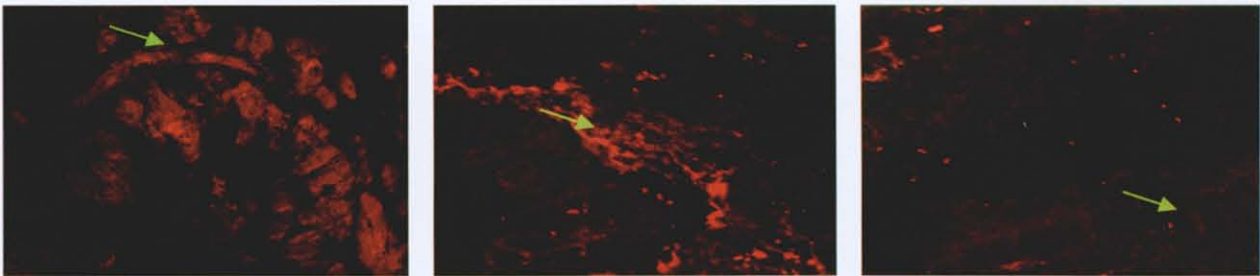
急性CO中毒大鼠脑海马区多巴胺类递质变化特点(正文见83~86页)



注：A、B、C为对照组大鼠模型海马，A——CA1区，B——CA3区，C——DG区；
D、E、F为迟发性脑病大鼠模型海马，D——CA1区，E——CA3区，F——DG区。

图3 大鼠脑海马Nissl染色 (×200)

水通道蛋白1在矽肺大鼠肺组织中的表达及意义初探(正文见91~93页)



正常对照组荧光 (+++) 生理盐水组荧光 (+++) 模型组42d荧光 (+)

图2 大鼠肺组织中AQP1蛋白免疫荧光染色法检测结果 (×1000)

镍精炼烟尘致NIH/3T3细胞生长抑制作用的实验研究(正文见125~127)

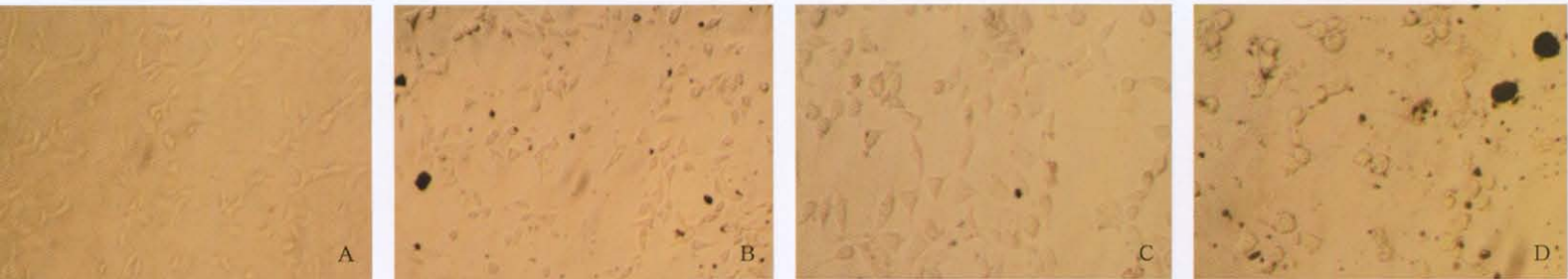


图1 镍精炼烟尘作用于NIH/3T3细胞的形态变化 (×400)

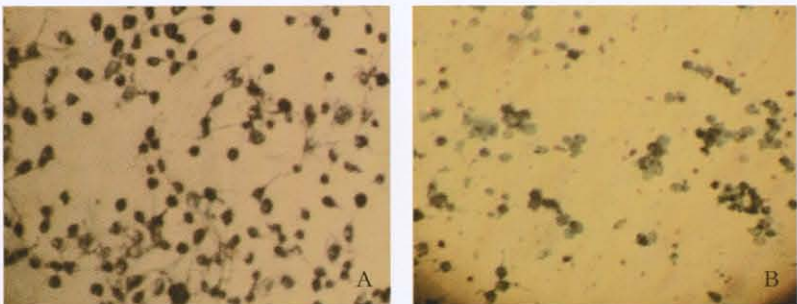


图2 镍精炼烟尘作用于NIH/3T3细胞MTT染色法形态学观察 (×200)