

甲基叔丁基醚对小鼠肝细胞周期及 DNA 含量的影响

杨 红, 赵进顺, 李红艳, 高锦伍

(东南大学公共卫生学院, 江苏 南京 210009)

摘要: 目的 探讨甲基叔丁基醚 (MTBE) 对小鼠肝细胞生长周期动力学及细胞 DNA 含量的影响。方法 昆明种小鼠经呼吸道静式染毒, MTBE 浓度为 108.0、1 440.0 及 4 968.0 mg/m³, 每日 1 次, 每次 4 h, 连续染毒 20 d。流式细胞仪技术研究 MTBE 对小鼠肝细胞周期、细胞增殖及细胞 DNA 含量的结果。结果 MTBE 各染毒组小鼠肝细胞的 G₀/G₁、S、G₂/M 期细胞数及增殖指数 PI 与对照组相比差异未见显著性 ($P > 0.05$); MTBE 1 440.0 与 4 968.0 mg/m³ 染毒组小鼠肝细胞 DNA 指数低于对照组 ($P < 0.05$)。结论 MTBE 对小鼠肝细胞周期、细胞增殖无显著影响, 可以引起小鼠肝细胞 DNA 含量的减少。

关键词: 甲基叔丁基醚; 肝细胞周期; DNA 含量

中图分类号: R135.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2002)06-0328-03

Effects of methyl tertiary butyl ether on cell cycle and DNA content of hepatocytes in mice

YANG Hong, ZHAO Jin-shun, Li Hong-yan, GAO Jin-wu

(School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, China)

Abstract: Objective To study the effects of methyl tertiary butyl ether (MTBE) on cell cycle kinetics and DNA content of hepatocytes in mice. **Methods** Mice of Kunming strain were exposed to MTBE at concentrations of 108.0 mg/m³, 1 440.0 mg/m³ and 4 968.0 mg/m³ for four hours daily in consecutive 20 days via respiratory tract. Flow cytometry technique was used to study cell cycle, cell proliferation and DNA content in hepatocytes. **Results** No significant increase in cell number and proliferation index (PI) were found in the phases of G₀/G₁, S and G₂/M of hepatocytes in all exposed mice, as compared with the controls ($P > 0.05$). DNA index lowered significantly in hepatocytes of the mice exposed to 1 440.0 mg/m³ and 4 968.0 mg/m³ of MTBE, as compared with the controls ($P < 0.05$). **Conclusions** MTBE had no significant effect on cell cycle and cell proliferation in hepatocytes, but could cause decrease in their DNA content.

Key words: Methyl tertiary butyl ether; Cell cycle; Hepatocyte; DNA

甲基叔丁基醚 (methyl tertiary butyl ether, MTBE) 是一种新型的汽油添加剂, 用来提高汽油燃烧效率, 减少一氧化碳和其他一些有害物质的排放, 并可替代铅用作汽油防爆剂, 在世界各国已得到广泛应用。目前的研究结果显示, MTBE 具有一定的动物致癌性, 但其机制还不清楚^[1]。已知化学物质致癌与细胞周期改变、细胞增殖之间的平衡失调有着密切关系^[2]。本次实验应用流式细胞仪技术, 通过对 MTBE 染毒小鼠肝细胞细胞周期及细胞 DNA 含量的分析, 来探讨其可能的毒作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验动物为健康昆明种小鼠, 由东南大学医学院实验动物中心提供。MTBE 由南京炼油厂提供, 纯度为 97.7%。流式细胞仪 (美国 B-D 公司, FACS Calibur

型), 气相色谱仪 (北京分析仪器厂, SQ204 型)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及染毒方法 选用昆明种小鼠 32 只, 雌雄各半, 体质量 18~22 g, 随机分为 4 组, 每组 8 只, 其中 3 组为实验组, 1 组为阴性对照。实验组以 MTBE 经呼吸道静式染毒, 染毒浓度分别为 (108.0 ± 1.7) mg/m³, (1 440.0 ± 2.9) mg/m³, (4 968.0 ± 4.6) mg/m³ (分别于染毒开始、染毒 2 h 及 4 h 时在静式染毒柜中采样, 每一时间点采 3 个样品, 用气相色谱仪测定实际染毒浓度), 每日 4 h, 连续染毒 20 d。

1.2.2 测定指标及方法 各组均于末次染毒 24 h 后颈椎脱臼处死小鼠, 取其肝脏用机械法分离成单个细胞, 经 300 目丝网过滤, 单细胞样品加入磷酸缓冲液 (PBS) 震荡后以 1 500 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 加入 1% Triton-X-100 摇匀后静置 10 min, 离心 5 min, 弃上清液, 加入 0.01% RNA 酶消化 10 min 后离心 5

收稿日期: 2002-05-23; 修回日期: 2002-07-05

作者简介: 杨红 (1967-), 女, 医学硕士, 讲师。

min。弃上清液，加入 0.05%PI 染色 15 min，300 目丝网过滤后经 FACS Calibur 型流式细胞仪收集分析^[3]，CELLQuest 软件采集样本后，用 ModFit LT 软件进行分析，并计算出增殖指数 (PI)^[4]和 DNA 指数 DI^[5]。
 $PI = [(S + G_2/M) / (G_0/G_1 + S + G_2/M)] \times 100\%$
 $DI = \text{实验组 } G_0/G_1 \text{ 期细胞峰值道数} / \text{阴性对照组 } G_0/G_1$

期细胞峰值道数

2 结果

2.1 MTBE 对小鼠肝细胞周期及增殖指数的影响

结果见表 1。MTBE 对小鼠肝细胞细胞周期无明显影响，对细胞增殖也无明显影响 ($P > 0.05$)。

表 1 MTBE 对小鼠肝细胞周期及增殖指数的影响 ($\bar{x} \pm s$) (%)

浓度 (mg/m ³)	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	PI
0	63.2 ± 6.02	1.11 ± 0.58	35.7 ± 5.90	36.77 ± 6.02
108.0	73.0 ± 8.23	0.76 ± 0.67	26.2 ± 8.31	30.12 ± 6.89
1440.0	70.5 ± 10.98	1.17 ± 0.50	28.3 ± 10.8	33.10 ± 4.18
4968.0	65.3 ± 6.98	0.66 ± 0.48	34.0 ± 6.86	34.69 ± 6.98

注：与阴性组相比， $P > 0.05$ 。

2.2 MTBE 对小鼠肝细胞 DNA 含量及 DNA 指数的影响

结果见表 2，MTBE 中、高剂量组 G₀/G₁ 期细胞峰值道数和 G₂/M 期细胞峰值道数及 DI 均比阴性对照组降低，经统计学检验，差异有显著性 ($P < 0.05$)。

表 2 MTBE 对小鼠肝细胞 DNA 含量及 DNA 指数的影响

浓度 (mg/m ³)	G ₀ /G ₁ 期细胞峰值道数	G ₂ /M 期细胞峰值道数	DI (%)
0	66.84 ± 1.06	134.20 ± 2.34	1
108.0	66.79 ± 1.85	134.20 ± 4.85	0.9681 ± 0.0918
1440.0	59.02 ± 1.10*	120.02 ± 2.96*	0.8831 ± 0.0165*
4968.0	59.23 ± 1.22*	118.33 ± 2.39*	0.8720 ± 0.0437*

*与阴性组相比 $P < 0.05$ 。

3 讨论

细胞周期也称为细胞增殖周期，分为 2 个阶段：即间期和分裂期。细胞在间期主要进行遗传物质 DNA 的合成，在分裂期 (M 期) 主要进行遗传物质的分配。不少研究发现，抗癌药物或因因子通常会阻滞 DNA 的合成，影响细胞的增殖能力；而致癌物质通常会诱导细胞进入分裂期，使细胞大量增殖^[6,7]。近几年来，DNA 含量测定作为肿瘤组织学诊断的补充手段，越来越引起人们的兴趣。肿瘤的 DNA 含量和增殖活性是评价其生物学特性的重要因素，异常 DNA 含量是恶性肿瘤的重要标志^[8]。本研究中流式细胞仪检测结果提示，MTBE 对小鼠肝细胞 DNA 含量有影响，中、高剂量组 G₀/G₁ 期细胞峰值道数和 G₂/M 期细胞峰值道数及 DNA 指数均比阴性对照组降低，说明 MTBE 可以引起小鼠肝细胞 DNA 含量的减少。

周伟等用流式细胞仪证实 MTBE 可使 NTH3T3 细胞周期发生改变，表现为 S 期细胞减少，而处于 G₂+M 期的细胞增多，可诱导细胞增殖^[9]。用免疫组织化学法和点杂交法证明 MTBE 可诱导 NIH3T3 细胞原癌基因 c-myc 表达活性增高，c-myc 的高表达可促进细胞增殖，抑制细胞分化^[10]。

MTBE 经呼吸道和消化道吸收快而且完全，在体内随血流迅速分布到全身组织，在组织中分布浓度最高的为肝脏和肾脏。MTBE 主要通过肝细胞色素 (CYP) P450 的代谢生成甲醛和 3-丁基醇 (TBA)，而对机体健康造成危害。本次实验细胞周期影响的结果与周伟的实验结果不一致，可能由于体内实验与体外实验的差异所致。

参考文献：

- [1] Belpoggi F, Soffritti M, Maltoni C. Methyl tertiary butyl ether (MTBE) a gasoline additive causes testicular and lympho haematopoietic cancers in rats [J]. Toxicol Ind Health, 1995, 11: 119-149.
- [2] Yoshikawa K. Anomalous nonidentity between Salmonella genotoxicants and rodent carcinogens: nongenotoxic carcinogens and genotoxic noncarcinogens [J]. Environ Health Perspect, 1996, 104: 40-46.
- [3] 宋平根. 流式细胞术的原理和应用 [M]. 北京: 北京师范大学出版社, 1992. 142.
- [4] Yin L, Jin X P, Yu X Z, et al. Flow cytometric analysis of the toxicity of nitrofen in cultured keratinocytes [M]. Biomed Environ Sci, 1999, 12: 144-149.
- [5] Johnson T S. Flow cytometric analysis of head and neck carcinoma DNA index and S-fraction from paraffin-embedded section; Comparison with malignancy grading [J]. Cytometry, 85 (6): 461.
- [6] Yanagami K, Matsubara M, Kitazawa Y, et al. Flow cytometric analysis of the direct toxic effects of paraquat on cultured MDCK cells [J]. J Appl Toxicol, 1994, 14: 155-159.
- [7] Langer EM, Rottgers HR, Schliemann MG, et al. Cycling S-phase

cells in animal and spontaneous tumors [J] . Acta Radiol Oncol, 1985, 24: [9] 周伟, 黄关麟, 张恒, 等. 甲基叔丁基醚对细胞周期及细胞凋亡影响 [J] . 中华预防医学杂志, 2000 34 (4): 221-222.

[8] Holm L.E. Cellular DNA amounts of squamous cell carcinomas of the head and neck region in relation to prognosis [J] . Laryngoscope, 1982, 92: [10] 周伟, 黄关麟, 张恒, 等. 甲基叔丁基醚对原癌基因和功能基因表达的影响. 卫生研究, 1999, 28 (3): 137-138.

1064.

砷化氢中毒患者肾肝脾脏 B 超的动态观察

The dynamic observation on kidneys, livers and spleens of arsine poisoning patients by brightness mode ultrasonic scope

吴立文¹, 富博¹, 沈旭光¹, 邹天娇¹, 谷妍²

FU Bo¹, WU Li-wen¹, SHEN Xu-guang¹, ZOU Tian-jiao¹, GU Yan²

(1. 沈阳市第九人民医院, 辽宁 沈阳 110024; 2. 沈阳市铁西区六院, 辽宁 沈阳 110024)

患者, 男, 26 岁, 某冶炼厂工人, 在砷矿石冶炼过程中吸入砷化氢气体而致急性中毒, 临床诊断为急性肾功能衰竭和急性溶血性贫血。

1 B 超观察结果

应用 ALDKA SSD-630B 超仪对该患者肾、肝、脾脏进行了纵向实时动态观察, 结果见表 1。

表 1 砷化氢中毒患者肾、肝、脾脏 B 超动态检查结果

时间 (d)	肾 脏			肝 脏			脾 脏		
	体积 (cm ³)	反射强度	自身体积比较 *	厚度 (cm)	反射强度	自身厚度比较 **	厚度 (cm)	反射强度	大小
2	R 10.5×4.2×5.0 L 10.6×4.2×4.9	增强	增大	7.0	正常	正常	3.8	正常	正常
4	R 10.9×4.6×5.3 L 11.0×4.6×5.2	增强	增大	7.9	增强	增大	4.0	大致正常	脾面积大
12	R 11.2×4.7×5.5 L 11.4×4.6×5.4	增强	增大	7.8	增强	增大	4.9	增强	脾大
26	R 11.5×5.0×5.5 L 11.5×4.8×5.4	增强	增大	7.4	增强	增大	5.0	增强	脾大
150	R 10.1×4.1×4.6 L 10.2×4.1×4.7	正常	正常	6.8	正常	正常	3.0	正常	正常

* 与 150 d 肾脏体积比较, ** 与 150 d 肝脏厚度比较。

通过表 1 可以看出, 砷化氢中毒导致双肾、肝、脾脏体积的增大, 实质反射弥漫性增强, 随着病情的发展及转归, 其体积、厚度及反射强度逐渐恢复正常。对脏器损害发生的时间顺序也有不同, 首先为肾脏, 其次为肝脏, 最后为脾脏。

2 讨论

砷化氢经呼吸道进入机体后与 RBC 结合引起溶血, 形成砷血红蛋白复合物及砷的氧化物, 随血液循环蓄积在全身各脏器, 以肝、肾含量较高, 引起肝、肾功能明显异常^[1]。该患者双肾、肝脏及脾脏的声像图在演变过程中, 首先引起双肾体积增大, 肾皮质反射弥漫性增强, 认为是由于砷化氢中毒致 RBC 溶血, 使破碎的 RBC 堆积在肾小管所致。肝、脾的改变同样是由于破碎的 RBC 堆积在肝窦及脾窦内, 而致肝、脾体积增大和实质反射的弥漫性增强, 只是发生时间有所不同。

不同的致病因素, 相同的病理过程可造成相同的声像图改变^[2]。如有人对 67 例流行性出血热的肾脏声像图的变化进行了观察, 该病是由病毒引起的一种自然疫源性疾, 而同样造成 RBC 溶血及肾小管的阻塞、肾功能不全, 表现为双肾肿大, 肾实质反射增强。这与砷化氢中毒声像图改变相一致。

对于砷化氢中毒患者的诊断及治疗的观察, 以往都是靠实验室生化指标的检测, B 超对该患者的动态观察, 使我们直观地看到疾病的发生、发展及转归过程, 对治疗效果的评价具有客观、准确、迅速、方便及无痛苦等优点, 为临床的诊断和治疗提供了重要的检查手段。

参考文献:

[1] 吴执中. 职业病 [M] . 北京: 人民卫生出版社, 1984. 220-223.

[2] 毕君. B 超诊断流行性出血热之探讨 [J] . 中国超声医学杂志, 1995 11 (2): 149.

收稿日期: 2001-10-25; 修回日期: 2002-01-16