

对苯二甲酸对 NIH-3T3 细胞间隙连接通讯功能的影响

张恒东, 张正东, 王心如

(南京医科大学公共卫生学院, 江苏 南京 210029)

摘要: 目的 研究对苯二甲酸 (TPA) 对 NIH-3T3 细胞间隙连接通讯 (GJIC) 功能的影响。方法 采用噻唑蓝 (MTT) 比色法及划痕标记示踪技术 (scrape-loading and dye transfer, SLDT), 以 0、125、250、500、1 000、2 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的剂量染毒细胞, 同时设立溶剂对照及阳性对照, 观察 TPA 对 GJIC 的影响。结果 TPA 对细胞 GJIC 功能抑制随着染毒剂量增大和染毒时间延长而逐渐增强, 呈现剂量-效应和时间-效应关系, 在 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 或更高剂量染毒 1 h 或更长时间时, 细胞 GJIC 功能被明显抑制, 在染毒 8 h 时各剂量组细胞 GJIC 功能抑制效应均最显著; 去除 TPA 后, GJIC 功能有恢复倾向, 但在 12 h 内仍不能恢复至正常水平; 加入哺乳动物肝脏微粒体酶 (S9) 能加重 TPA 对细胞 GJIC 功能抑制作用。结论 TPA 原形及其代谢产物对 NIH-3T3 细胞 GJIC 功能均具有抑制作用。

关键词: 对苯二甲酸 (TPA); 噻唑蓝 (MTT) 比色法; 间隙连接通讯; 致癌性

中图分类号: Q291; R992 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2003)05-0264-04

Effect of terephthalic acid on the function of gap junctional intercellular communication of NIH-3T3 cell

ZHANG Heng-dong, ZHANG Zheng-dong, WANG Xin-ru

(The Public Health School of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China)

Abstract; Objective To assess the effect of TPA on GJIC function of NIH-3T3 cell. **Method** TPA was added to NIH-3T3 cell suspensions with the doses of 0, 125, 250, 500, 1 000 and 2 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively 24 h after culture, MTT assay and SLDT assay were used for the detection of GJIC function. **Result** TPA could inhibit GJIC function of NIH-3T3 cell which was not only dose-dependent but also time-related; even at a dose of 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ TPA, the obvious inhibition of GJIC function could still be observed 1 hour after administration, and the maximum inhibition occurred at 8 h after treatment of TPA. Although the inhibition of TPA on GJIC function of NIH-3T3 was reversible after ceasing exposure to TPA, but it still kept a lower level within 12 h after administration. The study also showed that the inhibition of TPA on GJIC function could be enhanced by the adding of S9 (microsome enzyme of mammal liver). **Conclusion** These results suggested that either TPA or its metabolites could inhibit the GJIC function of NIH-3T3 cells.

Key words: Terephthalic acid (TPA); MTT assay; Gap junctional intercellular communication; Carcinogenicity

对苯二甲酸 (terephthalic acid, TPA) 用于合成聚酯、涤纶、塑料薄膜等, 使用与生产十分广泛。早期研究认为 TPA 安全低毒, 在人体内不经过代谢而从泌尿系统以原形排出, 在体内没有蓄积作用; 已有的试验结果证实 TPA 具有遗传毒性的可能性极小; 在整体动物实验中, TPA 所诱导的大鼠膀胱肿瘤可能与结石机械刺激引起膀胱上皮的异常增殖效应有关^[1-3]。本研究借助划痕染料示踪技术 (scrape-loading and dye transfer, SLDT), 观察 TPA 对 NIH-3T3 细胞 GJIC 功能的影响, 以探讨 TPA 诱导膀胱肿瘤的可能机制。

1 材料与方法

收稿日期: 2003-06-11; 修回日期: 2003-07-23

基金项目: 卫生部 and 江苏省自然科学基金资助 (基金编号分别为 3-92-109 和 92033)

作者简介: 张恒东 (1970-), 男, 江苏扬州人, 硕士, 主治医师, 主要从事化学物中毒、致癌的诊断、治疗及科研工作, 现在江苏省疾病预防控制中心工作。

1.1 试剂和药品

对苯二甲酸仪征化纤集团公司提供; 细胞培养液 RPMI 1640 Gibco 公司产品; 噻唑蓝 (Thiazolyl blue, MTT) Sigma 公司产品; 罗氏黄 (Lucifer yellow CH, LY) Sigma 公司产品; 佛波酯 (12-*o*-tetradecanoylphorbol-13-acetate) Sigma 公司产品; S9 悬液江苏省药检所提供; 实验中其他试剂均为国产, 分析纯, 实验用水为三蒸水。

1.2 仪器

德国 HERAEUS CO₂ 细胞培养箱, 美国 CERES-900 酶标仪, 美国 Beckman DU650 型紫外分光光度计, 重庆光学仪器厂生产的 XDS-1 型倒置生物显微镜。

1.3 细胞株

NIH-3T3 细胞由南京医科大学病理生理教研室提供。

1.4 方法

1.4.1 TPA 对 NIH-3T3 的毒性作用 配制合适密度单细胞悬液, 培养 24 h 后分别加入含 TPA 溶度为 0、

156.25、312.5、625、1 250、2 500 $\mu\text{g/ml}$ 新鲜培养液,同时设溶剂对照。染毒 24、48、72 h 后测定各孔 OD 值,计算各孔 MTT 的还原量。

1.4.2 细胞间隙连接通讯功能测定 采用 EL-Fouly^[4]等提出的划痕标记染料示踪技术,并加以改进。TPA 的染毒浓度为 0、125、250、500、1 000、2 000 $\mu\text{g/ml}$,同时以终浓度为 10 ng/ml 的佛波酯为阳性对照,DMSO 为阴性对照,每组设 3 个平行样。每个剂量组观察 40 个点左右;荧光局限于划痕边缘单层细胞者判为未传递为(-),1~2 层细胞有荧光者为(+),2~3 层细胞有荧光为(++),3~4 层细胞有荧光为(+++),4 层细胞以上有荧光为(++++)。

1.4.3 统计方法 TPA 不同染毒剂量或不同染毒时间与细胞荧光传递层次的相关关系采用卡方检验中的非零相关(nonzero correlation,双向有序属性不同)方法检验,组间比较采用分割行列表后的卡方检验,取 Mantel-Haenszel 卡方值(χ^2_{M-H})进行比较。以上统计方法均由 SAS 统计软件完成。

2 结果

2.1 TPA 对 NIH-3T3 细胞的毒性作用

光镜下见细胞呈单层生长,无崩解、悬浮、死亡,细胞结构完整,细胞形态增大,细胞表面无明显中毒颗粒。MTT 的还原量在 TPA 浓度较低及短时间

作用时反而增高;但随着染毒时间的延长及剂量的加大,细胞生长有受抑制趋势。在最大溶解度下未能得到 IC_{50} 。

2.2 TPA 抑制 NIH-3T3 细胞 GJIC 功能的剂量-效应关系

从表 1 可见,阳性对照物佛波酯(10 ng/ml)作用 2 h 后,NIH-3T3 细胞 GJIC 功能明显受到抑制($P < 0.01$),荧光集中在划痕的边缘(见封三图 1),溶剂对照组细胞的 GJIC 功能几乎不受影响(见封三图 2),但在较长时间的情况下,GJIC 功能有一定的抑制,与阳性对照组相比,差异有显著性($P < 0.01$)。在不加 S9 时,TPA 在各时间点较低剂量(250 $\mu\text{g/ml}$)时,细胞 GJIC 即出现明显的抑制(见封三图 3, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),随着染毒剂量升高,抑制程度逐渐加重,非零相关检验存在极显著性差异($P < 0.01$),各剂量组在 8 h 左右,抑制程度最为显著。加 S9 后,TPA 在低剂量(125 $\mu\text{g/ml}$)染毒 2 h,细胞 GJIC 水平即明显抑制且低于同剂量不加 S9 组(见封三图 4, $P < 0.01$)。结果说明,TPA 及其代谢产物对 GJIC 均具有明显的抑制作用,随着剂量的增大,在各时间点,GJIC 的抑制基本上趋于加重,剂量-效应关系明显。

表 1 不同染毒剂量 TPA 对 NIH-3T3 细胞 GJIC 功能的影响 ($n = 31 \sim 40$)

剂量 ($\mu\text{g/ml}$)	1 h	2 h		4 h		8 h	12 h
		-S9	+S9	-S9	+S9		
0	3.35	3.48	3.42	3.40	3.38	3.38	3.19
125	3.13	3.18	1.82 [#]	3.05 [*]	1.32 [#]	1.75 ^{**}	1.85 ^{**}
250	3.03 [*]	2.75 [*]	1.73 [#]	2.58 ^{**}	1.31 [#]	1.95 ^{**}	1.52 ^{**}
500	2.43 [*]	3.23 [*]	1.91 [#]	2.67 ^{**}	1.13 [#]	0.98 ^{**}	1.97 ^{**}
1 000	2.48 ^{**}	2.60 ^{**}	1.11 [#]	2.08 ^{**}	0.83 [#]	0.50 ^{**}	0.63 ^{**}
2 000	2.61 ^{**}	2.68 ^{**}	0.83 [#]	2.00 ^{**}	0.70 [#]	0.28 ^{**}	0.10 ^{**}
DMSO (10 $\mu\text{l/ml}$)	3.42	3.50		3.60		2.97 [*]	2.76 ^{**}
佛波酯 (10 ng/ml)	1.98 ^{*△△}	0.85 ^{**△△}		1.63 ^{**△△}		0.13 ^{*△△}	0.05 ^{**△△}
非零相关 χ^2	31.89	21.40	57.71	54.60	27.67	100.77	119.94
P 值	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:表中数据为 GJIC 平均水平,即将荧光传递强度(-)~(+++++)量化为 0~4 后取平均值。

与同时段对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与同剂量组同时段的 -S9 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; 阳性对照与 DMSO 组比较, $\Delta P < 0.05$, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

2.3 TPA 抑制 NIH-3T3 细胞 GJIC 功能的时间-效应关系

选取 250 $\mu\text{g/ml}$ 及 1 000 $\mu\text{g/ml}$ 两个剂量水平在不加 S9 情况下连续动态观察 12 h,然后分别加入含同样浓度的 TPA 及新鲜培养液,继续培养至 24 h。结果发现,250 $\mu\text{g/ml}$ 组在 2 h GJIC 即被抑制($P < 0.05$,

见表 2),1 000 $\mu\text{g/ml}$ 组在 1 h GJIC 被抑制($P < 0.01$),细胞 GJIC 功能的抑制程度随染毒时间的延长而持续加重,非零相关检验差异存在极显著性($P < 0.01$,见表 2)。若染毒 12 h 后换以相同浓度的新染毒液,继续培养至 24 h,细胞 GJIC 的抑制程度有加重趋势;换以不含 TPA 的新鲜培养液,细胞 GJIC 功能抑制程

表 2 不同时间 250 μg/ml、1 000 μg/ml TPA 对 NIH-3T3 细胞 GJIC 功能影响 (—S9)

时间 点(h)	观察细胞		荧光传递情况										平均水平	
	(n)		—		+		++		+++		++++			
	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II	I	II
0	40	34	0	0	0	0	2	3	27	22	11	9	3 22	3 18
0.5	35	36	0	0	1	0	2	4	27	28	5	4	3 03	3 00
1	40	40	0	0	0	0	8	22	23	17	9	1	3 03	2 48 **
2	40	40	0	0	1	4	10	11	27	22	2	3	2 75 *	2 60 **
4	37	36	0	0	2	9	11	16	18	10	6	1	2 58 **	2 08 **
8	40	40	0	24	16	12	13	4	8	0	3	0	1 95 **	0 50 **
12	31	38	1	17	18	18	10	3	3	0	0	0	1 52 **	0 63 **
24a	30	36	0	19	18	15	5	2	1	0	0	0	1 03 **	0 53 **
24b	30	33	1	0	10	2	19	19	0	11	0	1	1 60 * * * #	1 60 * * * #

注: I 代表 250 μg/ml TPA, II 代表 1 000 μg/ml TPA; 24 a 表示细胞染毒至 12 h 时换相同浓度 TPA 新鲜染毒液, 继续培养至 24 h; 24 b 表示细胞毒至 12 h 时换不含 TPA 新鲜培养液, 继续培养至 24 h。非零相关 $\chi^2=88.97$, $P<0.01$ 。

与 0 h 组比较, * $P<0.05$ ** $P<0.01$; 24 a 与 24 b 相比, # $P<0.01$ 。

度减轻, 并有一定程度的恢复, 与换新染毒液组比较差异存在显著性 ($P<0.01$), 但抑制程度仍显著高于 0 h 组 ($P<0.01$)。说明 TPA 对 GJIC 功能抑制具有明显的时间-效应关系, 停止接触 TPA 后, GJIC 功能具有一定的可逆性 (见图 5)。

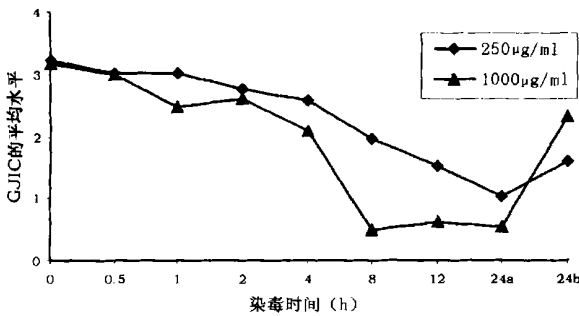


图 5 不同剂量组在不同时间段对细胞 GJIC 的影响

3 讨论

生物体内信号传递主要有两种方式: 一种是信号物质从特定细胞产生经过体循环作用于靶细胞; 另一种是细胞间隙连接通讯 (GJIC)。细胞间隙连接 (gap junctions, GJs) 是接触细胞之间, 细胞膜形成的通道结构, 能将小分子信号物如 cAMP、Ca²⁺ 等从一个细胞的胞质内传递到另一个细胞, 是组织或细胞群体内信号传递的主要通道, 它是细胞通讯的重要内容, 通过细胞间的离子和分子共享, 发挥细胞增殖和转化控制的重要调节作用^[3]。国外有学者利用电耦合技术、代谢协同试验和荧光染料示踪技术等多种方法, 对多种人和动物的肿瘤细胞及体外培养的肿瘤细胞的间隙连接及细胞间隙连接通讯进行了大量的研究, 结果发现, 大多数肿瘤细胞之间的 GJIC 降低或消失, 而且随着肿瘤细胞向恶性方向的进一步发展, 细胞的间隙连接功能进一步丧失^[6]; 正常细胞转化后的明显标志

是丧失接触性抑制, 间隙连接通讯减少或消失^[7]。在许多病理条件下均涉及到细胞 GJIC 功能的异常改变, 其中这种改变与细胞生长调控、转化和癌变, 特别是促癌之间的关系备受关注^[8,9]。因此, GJIC 的抑制已成为非遗传性致癌剂及促癌剂检测中的一个重要手段。

根据现有的实验结果推测, TPA 或其代谢产物不具有明显的非遗传毒性效应^[2,10], 非遗传机制 (epigenetic mechanism) 可能在 TPA 致癌过程中发挥重要作用。近年来的研究表明, 在 TPA 的慢性毒性实验中, 未检出膀胱结石的大鼠膀胱中也有肿瘤发生; 对膀胱和肾脏结石成分通过傅立叶变换红外光谱 (FT-IR) 和旋转阳极 X 衍射法进行分析, 结果发现在这两类结石中均含有亚硝基 (NO₂⁻) 和对位取代苯环两个基团^[11]。在整体动物实验中观察到, 染毒组大鼠尿 Ca²⁺、Mg²⁺、PO₄³⁻ 明显增高, 尿 pH 显著下降, 且高剂量的 TPA 可诱导大鼠产生泌尿系统结石和膀胱癌, 通过化学方法对结石的组分进行分析, 发现其主要成分为 CaTPA 和 Ca₃(PO₄)₂^[12,13]。种种迹象表明, TPA 能使机体内的 Ca²⁺ 大量丧失, 细胞钙稳态遭到破坏, 结果可能对细胞 GJIC 功能产生直接或间接地抑制作用。由于没有得到 TPA 的 IC₅₀, 以 TPA 最大溶解度剂量为最高染毒剂量^[14], 在实验中发现, 加入 S9 的剂量组与同剂量组相比, GJIC 功能的抑制效应明显增强 ($P<0.01$), 这可能与两方面原因有关: 一方面由于哺乳动物肝脏微粒体酶 (S9) 中含有多种代谢酶, 在外来化合物代谢中起着重要的作用, 在体外实验中加入该活化系统, 可以使一些间接致突变物产生新的代谢产物, TPA 可能经过代谢产生新的物质, 该物质具有较 TPA 更强的抑制 GJIC 功能的能力; 另一方

面, S9 本身对培养细胞具有一定的毒性, 在加入 S9 的平皿中, 有少许细胞悬浮, 表面颗粒增多, 细胞有轻度受损, 不能保持正常的融合状态, 细胞之间的正常连接必然受到影响, GJIC 势必受到抑制。

本实验中观察到 TPA 对 GJIC 抑制作用迅速且持续加重, 存在明显的剂量-反应和时间-反应关系, 当 TPA 剂量及染毒时间到了一定的极限, GJIC 功能的抑制不再明显增加, 在停止使用后, 加入新鲜培养液, 细胞通过自我调节, 有一定程度的恢复。TPA 对细胞 GJIC 功能抑制的确切机制及其在 TPA 致癌过程中的作用尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] Zeiger E, Haworth S, Speck W, et al. Phthalate ester testing in the national toxicology program's environment mutagenesis test development program [J]. *Environ Health Perspect*, 1982, 45: 99-101.
- [2] Kozumbo WJ, Krou R, Rubin RJ. Assessment of the mutagenicity of phthalate esters [J]. *Environ Health Perspect*, 1982, 45: 103-109.
- [3] Heck HD, Tyl RW. The induction of bladder stones by terephthalic acid dimethyl terephthalate, and melamine (2, 4, 6-triamino-s-triazine) and its relevance to risk assessment [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 1985, 5: 294-313.
- [4] El-Fouly MH, Trosko JE, Chang CC. Scrape-loading and dye transfer: a rapid and simple technique to study gap junctional intercellular

communication [J]. *Exp Cell Res*, 1987, 168: 422-430.

- [5] Loewenstein WR. Junctional intercellular communication the cell-to-cell membrane channel [J]. *Physiol Rev*, 1981, 62: 829-834.
- [6] Chaudhuri R, Sigler K, Dupont E, et al. Gap junctional intercellular communication in mouse lung epithelial cell lines: effect of cell transformation and tumor promoters [J]. *Cancer Lett*, 1993, 30: 11-18.
- [7] Linnaimma K, Pelin K, Vanhala E, et al. Gap junctional intercellular communication of primary and asbestos-associated malignant human mesothelial cells [J]. *Carcinogenesis*, 1993, 14 (8): 1597-1602.
- [8] Yanasaki H, Ashby J, Bignami M, et al. Nongenotoxic carcinogens; development of detection methods based on mechanisms: a European project [J]. *Muta Res*, 1996, 353 (12): 47-63.
- [9] Combettes L, Tran V, Tordjman TB, et al. Ca^{2+} -mobilizing hormones induce sequentially ordered Ca^{2+} signals in multicellular systems of rat hepatocytes [J]. *Biochem J*, 1994, 304: 585-594.
- [10] 龚楠, 徐锡坤, 王心如. 对苯二甲酸的遗传毒性 [J]. *中国公共卫生学报*, 1999, 18 (4): 203-204.
- [11] 漆少廷, 王心如, 徐锡坤, 等. 对苯二甲酸诱导大鼠膀胱结石与膀胱癌的研究 [J]. *卫生研究*, 2002, 31 (1): 10-12.
- [12] 邱清, 徐锡坤, 王心如, 等. 对苯二甲酸经口染毒大鼠早期生物学效应的探讨 [J]. *南京医科大学学报*, 1994, 14 (2): 131-134.
- [13] 漆少廷, 王心如, 徐锡坤, 等. 对苯二甲酸诱导大鼠泌尿系统结石的成分分析 [J]. *卫生研究*, 2002, 31 (2): 76-78.
- [14] 张恒东, 徐锡坤, 龚楠, 等. 对苯二甲酸对 NIH-3T3 细胞毒性的研究 [J]. *中国工业医学杂志*, 2001, 14 (2): 65-67.

(上接第 263 页)

起的外源性 CO 侵入可能导致病理性信号传导通路的持续紊乱, 从而在时间、空间上造成多层次、多环节的病理性改变。

本实验摒弃原有的、仅将 CO 视作窒息性气体的研究套路, 将外源性 CO 与新近发现的气态信使分子 NO、CO 从生理学和毒理学角度进行了细致比较, 并引入 NOS、HO 等上述气态信使分子的合成酶系统作为深入推进此一领域研究的新视角, 从而使急性 CO 中毒分子机制的研究进入一个全新的领域, 此一探索可能具有重要的理论价值和实际意义, 值得进一步追踪拓展。

参考文献:

- [1] Raub JA, Mathieu NF, Hampson NB, et al. Carbon monoxide poisoning—a public health perspective [J]. *Toxicology*, 2000, 145 (1): 1-14.
- [2] Walker E, Hay A. Carbon monoxide poisoning [J]. *BMJ*, 1999, 319: 1082-1083.
- [3] Hirabayashi H, Takizawa S, Fukuyama N, et al. Nitrotyrosine generation

via inducible nitric oxide synthase in vascular wall in focal ischemia reperfusion [J]. *Brain Res*, 2000, 852: 319-325.

- [4] 陈莉, 赵金垣. 一种新的细胞信息分子——一氧化碳 [J]. *中华内科杂志*, 1999, 38 (4): 270-272.
- [5] 冯仁丰. *实用医学检验学* [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996. 72.
- [6] Christova T, Duridanova D, Braykova A, et al. Heme oxygenase is the main protective enzyme in rat liver upon 6-day administration of cobalt chloride [J]. *Arch Toxicol*, 2001, 75 (8): 445-451.
- [7] Puisieux F, Deplanque D, Pu Q, et al. Differential role of nitric oxide pathway and heat shock protein in preconditioning and lipopolysaccharide-induced brain ischemic tolerance [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2000, 389: 71-78.
- [8] Bolanos JP, Almeida A. Roles of nitric oxide in brain hypoxia-ischemia [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1999, 1411: 415-436.
- [9] Maines MD. The heme oxygenase system and its functions in the brain [J]. *Cell Mol Biol*, 2000, 46 (3): 573-585.
- [10] Inagaki T, Ishino H, Seno H, et al. A long-term follow-up study of serial magnetic resonance images in patients with delayed encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning [J]. *Psychiatry Clin Neurosci*, 1997, 51 (6): 421-423.

对苯二甲酸对 NIH-3T3 细胞间隙连接通讯功能的影响

(正文见第 264 页)



图 1 阳性对照组荧光传递局限在划痕边缘($\times 40$)



图 2 溶剂对照组荧光传递至4层以上($\times 40$)



图 3 在 $1\ 000\ \mu\text{g}/\text{ml}$ TPA 染毒 4 h 时荧光传递情况(-S9, $\times 40$)



图 4 在 $1\ 000\ \mu\text{g}/\text{ml}$ TPA 染毒 4 h 时荧光传递情况(+S9, $\times 40$)

丙烯腈对大鼠骨髓象、血清 IL-2、G-CSF、EPO 含量的影响

(正文见第 294 页)

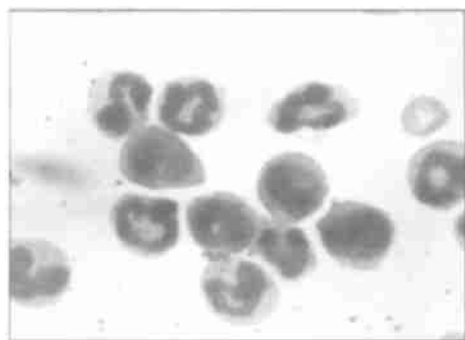


图 1 染毒后大鼠骨髓中性粒细胞核固缩,核有突出物(油镜下)HE $\times 400$

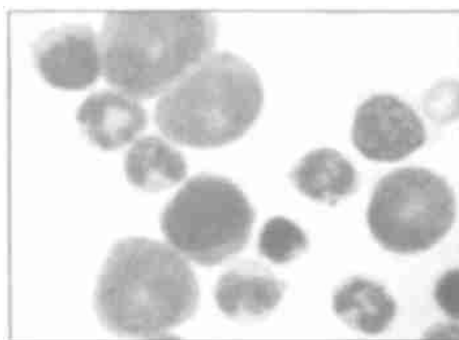


图 2 染毒后大鼠骨髓中早期粒细胞增生活跃(油镜下)HE $\times 400$