

镍冶炼烟尘对中国仓鼠肺细胞毒性作用的实验研究

吴永会, 周春凌, 王 军

(哈尔滨医科大学公共卫生学院, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要: 目的 观察镍冶炼烟尘对中国仓鼠肺细胞 (CHL) 的毒性作用。方法 以我国某镍冶炼厂电炉烟道尘为受试物, 采用噻唑蓝 (MTT) 比色法检测 CHL 细胞活性。结果 不同浓度下的镍冶炼烟尘 (6.25、12.50、25.00、50.00、100.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 作用一定时间后, CHL 细胞存活率下降, 呈现出时间-剂量-反应关系。接触受试物 36 h, 细胞生长半数抑制浓度 IC_{50} 为 21.36 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。同时镜下观察细胞形态也发生改变。结论 镍冶炼烟尘可以抑制 CHL 细胞生长, 降低线粒体代谢活性。

关键词: 烟尘; 镍冶炼; 噻唑蓝比色法; 肺细胞; 中国仓鼠

中图分类号: R135.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2003)05-0280-02

The toxic effect of nickel refining dusts on lung fibroblasts of Chinese hamsters

WU Yong-hui, ZHOU Chun-ling, WANG Jun

(School of Public Health, Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

Abstract: **Objective** To observe the toxicity of nickel refining dusts on CHL (Chinese hamster lung cells, CHL). **Method** MTT colorimetric assay was used for detecting of CHL activity. **Result** The survival rates of CHL were obviously decreased under the exposure of various concentrations (6.25, 12.50, 25.00, 50.00, 100.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$) of nickel refining dusts, which was dose-time dependent and the 50% inhibited concentration for cell growth was 21.36 $\mu\text{g}/\text{ml}$, while the morphological alterations could be observed, too. **Conclusion** Nickel refining dusts might inhibit the proliferation and the metabolic activity of mitochondria of CHL.

Key words: Dusts; Nickel refining; Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) colorimetric assay; Lung cells; Chinese hamster

镍冶炼工人肺癌高发在国内外的研究中已得到证实^[1], 多种镍化合物的细胞毒性以及转化细胞的生物学特征也已在外国学者和我们以往的研究中得到证实, 然而镍冶炼工人接触的烟尘是否具有同样的生物学效应至今未见报道。为探讨不溶性或难溶性镍化合物的细胞毒性, 以来自我国某镍冶炼厂的镍冶炼烟尘为受试物, 采用 MTT 颜色反应法, 检测镍冶炼烟尘对中国仓鼠肺细胞 (Chinese hamster lung cells, CHL) 的毒性作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 靶细胞 CHL 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 RPMI 1640 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 受试物为来源于某镍冶炼厂的电炉烟道尘, 用玛瑙研钵磨细后, 检测分散度, 受试物颗粒小于 5 μm 者占 99.9%, 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], 购自上海华舜生物工程有限公司, pH 7.2 的 PBS 稀释成 1.0 mg/ml; 小牛血清 (美国 Hyclone 公司); RPMI 1640 培养粉 (天象人生物工程有限责任公司); 二甲基亚砷 (DMSO, 北京化工试剂厂)。

1.1.3 主要仪器 TE-HER 型 CO₂ 培养箱, OLYMPUS 型倒置显微镜, 550 型酶标仪 (BIO-RAD 公司生产)。

1.2 方法

1.2.1 细胞制备 取指数生长期的 CHL 细胞用 EDTA-胰酶混合液消化后, 用含 10% 小牛血清的 RPMI 1640 培养液制成细胞悬液, 调整细胞密度至 5.0×10^4 个/ml, 接种到 6 块 96 孔板中, 每孔 100 μl ; 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 待细胞贴壁后, 加入不同浓度的受试物, 使其成为终浓度分别为 6.25、12.50、25.00、50.00 和 100.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的培养液, 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。该酶标仪能够自动计算出空白对照值, 检测其他样品时, 自动扣除空白对照值。37℃、5% CO₂ 条件下分别培养 6、12、18、24、30、36 h^[2,3]。

1.2.2 MTT 实验 于各作用时间结束前 4 h 加入 50 μl MTT, 弃去培养液, 每孔加 150 μl DMSO, 振荡

5 min, 充分混合以溶解细胞内紫色结晶物, 在酶标仪 550 nm 波长下测定各孔吸光度 (A) 值。以下式间接表示细胞相对存活率, 细胞相对存活率 (%) = (实验组的吸光度值/阴性对照组的吸光度值) × 100%^[2,3], 并以概率单位法计算细胞生长半数抑制浓度 IC₅₀^[4]。

1.2.3 统计学处理 数据采用 SPSS 10.0 软件处理, 组间比较采用方差分析。

2 结果

2.1 细胞形态的改变

倒置显微镜下观察, 溶剂对照组细胞呈梭形, 贴壁生长, 胞质清亮, 胞浆和胞核清楚。不同染毒浓度组细胞在 6 h 作用时间内, 细胞形态与对照组相比无明显改变, 随培养时间的延长, 细胞逐渐出现胞体肿胀、变圆、结构不清, 胞质中含有大量空泡和颗粒, 最终细胞悬浮或崩解死亡。至作用 36 h 观察时, 100.00 μg/ml 和 50.00 μg/ml 组细胞绝大部分崩解死亡, 仅存活极少量正常形态的细胞。

2.2 镍冶炼烟尘对 CHL 细胞吸光度 (A) 值和 CHL 细胞相对存活率的影响 结果见表 1。

表 1 不同浓度的镍冶炼烟尘不同作用时间对 CHL 细胞增殖和相对存活率的影响 ($\bar{x} \pm s$, n=8)

质量浓度 (μg/ml 培养液)	CHL 细胞吸光度值						CHL 细胞相对存活率					
	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h	6 h	12 h	18 h	24 h	30 h	36 h
0	0.096 ± 0.005	0.101 ± 0.019	0.157 ± 0.008	0.224 ± 0.008	0.204 ± 0.005	0.451 ± 0.017	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
6.25	0.097 ± 0.008	0.113 ± 0.009	0.147 ± 0.011	0.237 ± 0.010	0.201 ± 0.007	0.339 ± 0.017 *	101.0	111.9	93.6	105.8	98.5	75.2 *
12.50	0.112 ± 0.007	0.098 ± 0.008	0.183 ± 0.015	0.246 ± 0.017	0.187 ± 0.011 *	0.315 ± 0.013 *	116.7	97.0	116.6	109.8	91.7 *	69.8 *
25.00	0.102 ± 0.009	0.094 ± 0.008	0.179 ± 0.007	0.176 ± 0.011 *	0.131 ± 0.019 *	0.194 ± 0.008 *	106.3	93.1	114.0	78.6 *	64.2 *	43.0 *
50.00	0.107 ± 0.014	0.109 ± 0.006	0.138 ± 0.011 *	0.171 ± 0.019 *	0.133 ± 0.016 *	0.084 ± 0.005 *	111.5	107.9	87.9 *	76.3 *	46.6 *	18.6 *
100.00	0.122 ± 0.012	0.105 ± 0.013	0.098 ± 0.007 *	0.120 ± 0.014 *	0.081 ± 0.008 *	0.072 ± 0.006 *	127.1	104.0	62.4	53.6 *	39.7 *	16.0 *

* 与对照组比较 P < 0.05

各浓度组在作用第 6 h、12 h 时细胞增殖情况与对照组相比较, 差异无显著性。在作用 18 h、浓度 ≥ 50.00 μg/ml 时, 可显著降低细胞存活率; 24 h、浓度 ≥ 25.00 μg/ml 时, 引起存活率的下降; 至作用 36 h 时, 所有浓度组细胞存活率均降低, 并呈现出剂量-反应和时间-反应的关系。其中, 在 100.00 μg/ml 浓度时, 作用 36 h 后细胞数目仅为对照组的 16.0%。运用概率单位法求得作用 36 h IC₅₀ 为 21.36 μg/ml。

3 讨论

MTT 法于 1983 年由 Mosmann 首次提出, 其工作原理是活细胞或增殖旺盛细胞的线粒体在代谢过程中, 使可溶性的 MTT 还原为不溶性蓝紫色结晶 Formazan (FM), 而死亡细胞无此功能。FM 溶解后在 550nm 附近有光吸收峰, 吸光度高低与存活细胞数目成正比, 因此, 通过测定吸光度的大小就可了解细胞增殖情况, 其实质是反映了线粒体代谢活性的破坏程度。与其他细胞毒性测试方法相比, MTT 法具有客观、准确、重复性好等优点, 避免同位素的使用, 由于结果容易读取, 可以快速分析和检测大量样品。但是这种方法的影响因素也较多, 细胞的种类、接种细

胞的数量、培养时间的长短、测定波长等都会影响吸光度 (A) 值的测定^[2,3]。

研究化合物对体外培养细胞的毒性作用, 是进一步探讨其各种生物学效应的基础。本研究所用受试物采自国内生产厂家, 因此, 具有重要的实际意义。在本实验中, 所设浓度对 CHL 细胞的生长均有不同程度的抑制作用, 随着浓度的增加和作用时间的延长, 这种抑制作用也愈加明显, 呈现出时间-反应和剂量-反应关系, 同时细胞在形态学上也出现一系列的改变。本研究显示, 镍冶炼烟尘可以对体外培养的 CHL 细胞产生毒性作用, 抑制细胞生长, 降低线粒体代谢活性。

参考文献:

[1] Cangul H, Broday L, Salnikow K, et al. Molecular mechanisms of nickel carcinogenesis [J]. Toxicol Lett, 2002, 127 (1-3): 69-75.
 [2] 贾光, 刘世杰. 应用台盼兰拒染法与 MTT 法判断 Cr (VI) 细胞毒性的比较 [J]. 中国职业医学, 2000, 27 (3): 49.
 [3] 吴静, 蒋颂辉, 陈约, 等. 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, 2004, 17 (11): 1019-1021.
 [4] 张正东, 金复生, 朱瑞娟, 等. 丙烯腈对中国仓鼠肺细胞活力和间隙连接通讯功能的影响 [J]. 中华预防医学杂志, 2001, 35 (3): 177-180.