

苯并[a]芘和高温及其联合作用对大鼠小脑颗粒细胞存活率及热应激蛋白水平的可能作用

涂白杰¹, 邬堂春², 贺涵贞²

(1. 重庆医科大学劳动卫生教研室, 重庆 400016; 2. 华中科技大学同济医学院职业医学研究所, 湖北 武汉 430030)

摘要: 目的 研究苯并[a]芘(BaP)、高温及其联合作用对大鼠小脑颗粒细胞存活率及热应激蛋白70与热应激蛋白90 β (HSP70、HSP90 β)表达水平的影响。方法 取8日龄SD大鼠小脑颗粒细胞原代培养, 将其分为空白对照组、溶剂对照组(等量DMSO平行处理)、低浓度BaP染毒组(BaP 5 μ mol/L+S9-mix)、高浓度BaP染毒组(BaP 50 μ mol/L+S9-mix)、高温处理组(40 $^{\circ}$ C, 45 min 预热)、高温处理+低浓度BaP染毒组、高温处理+高浓度BaP染毒组。染毒90 min, 胰酶消化法收集标本, 台盼蓝染色法检测存活率, 用同一样本进行Western blot法检测HSP70、HSP90 β 相对表达值。结果 高浓度BaP染毒、高温处理、高温处理+低浓度BaP染毒、高温处理+高浓度BaP染毒组均可降低细胞存活率($P < 0.05 \sim P < 0.0001$), HSP90 β 相对表达值升高。HSP90 β 相对表达值与细胞存活率间有线性相关关系($r = -0.7962$, $P < 0.05$), 而HSP70相对表达值与细胞存活率间无线性相关关系($r = 0.2174$, $P > 0.05$)。结论 高浓度BaP染毒或BaP与高温联合作用对体外培养神经元具有一定的损害作用。HSP90 β 相对表达值可用作体外培养神经元损害程度的标志。

关键词: 苯并[a]芘; 高温; 大鼠小脑神经元; 细胞存活率; 热应激蛋白

中图分类号: R594.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)02-0073-04

Combined effect of benzo[a]pyrene and high-temperature on survival of cerebellar granule neurons in rats and possible roles of heat stress protein in it

TU Bai-jie¹, WU Tang-chun², HE Han-zhen²

(1. Department of Occupational Medicine, Chongqing University of Medical Sciences, Chongqing 400016, China; 2. Tangji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To study the combined effect of benzo[a]pyrene (BaP) and high-temperature on survival of cultured cerebellar granule neurons and levels of expression of heat stress protein 70 (HSP70) and 90 β (HSP90 β) in rats. **Method** Primary culture of rat cerebellar granule neurons was prepared from 8-day-old SD rats which were divided into seven groups: blank control, vehicle control (with DMSO), low dose BaP (5 μ mol/L+S9-mix), high dose BaP (50 μ mol/L+S9-mix), high-temperature (40 $^{\circ}$ C, 45 min), high-temperature+low dose BaP, and high-temperature+high dose BaP. The neurons were collected by trypsin digestion after 90 min of administration, and survival was detected by Trypan-blue stain. Levels of expression of the HSP70 and HSP90 β were detected by Western blot and their relative values were estimated. **Result** Survival rate of neurons significantly lowered in the groups with high dose BaP, high-temperature, high-temperature+low dose BaP and high-temperature+high dose BaP compared with blank control and vehicle control ($P < 0.05$ or $P < 0.0001$), and relative expression of the HSP90 β increased in the corresponding groups. HSP90 β correlated to survival rate ($r = -0.7962$, $P < 0.05$), but no correlation between relative expression level of the HSP70 and survival rate ($r = 0.2174$, $P > 0.05$) could be found. **Conclusion** Administration of high-dose BaP or combined administrations of BaP and high-temperature could damage rat neurons in vivo. Relative expression of the HSP90 β could be used as a marker of neuron damage in vivo.

Key words: Benzo[a]pyrene; High-temperature; Cultured rat cerebellar granule neurons; Survival; Heat stress protein

在钢铁厂焦化车间、垃圾焚化等生产工序, 苯并[a]芘(BaP)与高温均是主要的职业有害因素, 而且在生产环境中同时存在。BaP的神经毒性目前已有零

星的研究报道, 如David Moir提到BaP及其代谢物可透过血脑屏障进入大鼠脑组织^[1], Tang Y最近报道BaP在一定条件下具有体外神经毒性^[2], 我们于2000年用小鼠所做的亚慢性染毒实验初步证实了BaP对小鼠中枢神经和外周神经具有一定的损伤作用^[3]。而高温引起的中暑, 中枢神经也是主要的靶器官。为研究

收稿日期: 2003-11-03; 修回日期: 2004-09-22

作者简介: 涂白杰(1963-), 男, 医学博士, 副教授, 主要研究方向为神经毒理。

BaP、高温单独及联合作用的体外神经毒性以及热应激蛋白 (heat stress proteins, HSPs) 在其中所起的作用, 本实验采用大鼠小脑粒细胞体外 BaP 染毒、高温单独及联合作用, 检测分析了细胞存活率及热应激蛋白 70 (HSP70) 和热应激蛋白 90 β (HSP90 β) 的表达情况。

1 材料与方法

1.1 试剂

1.1.1 BaP 购自 Sigma 公司, 纯度 98%, 商品 BaP 为黄色粉末, 称量后置于研钵中加少量 DMSO, 研至溶解, 移入容量瓶中配成 10% (mg/ml) 溶液, 密封避光保存备用。S9-mix 为高雅娟博士惠赠。

1.1.2 培养基配方 基础依格培养基 9.23 g/L, 15% 胎牛血清 (56 °C, 30 min 灭活), 25 mmol/L KCl, 2 mmol/L 谷氨酰胺, 100 U/ml 青霉素, 100 μ g/ml 链霉素。

1.1.3 细胞分离液配制 溶液 1: NaCl 124 mmol/L, KCl 5.37 mmol/L, NaH₂PO₄ 1 mmol/L, D-葡萄糖 14.5 mmol/L, HEPES 25 mmol/L, 酚红 27 μ mol/L, MgSO₄ 1.2 mmol/L, 牛血清白蛋白 3 mg/ml, 用 NaOH 调 pH 值 7.4。溶液 2: 在溶液 1 中加入胰蛋白酶 (II型) 0.25 mg/ml。溶液 3: 在溶液 1 中加入 DNA 酶 80 μ g/ml, 胰蛋白酶抑制剂 0.52 mg/ml, MgSO₄ 增至 2.8 mmol/L。溶液 4: 在溶液 1 中加入 I 型 DNA 酶 26.6 μ g/ml, 黄豆胰蛋白酶抑制剂 166.4 μ g/ml, MgSO₄ 增至 1.7 mmol/L。溶液 5: 在溶液 1 中加入 CaCl₂ 0.1 mmol/L, MgSO₄ 增至 2.5 mmol/L。

1.1.4 Western blot 试剂 抗 HSP70、HSP90 β 抗体为兔抗小鼠, 加拿大 Lavel 大学与华中科技大学同济医学院职业医学研究所联合研制, 二抗为羊抗兔, 购自北京中山生物制品公司。其余试剂为分析纯。

1.2 细胞分离与培养

(1) 剖取 10 只 8 日龄 SD 大鼠小脑并剪切成糊状。(2) 将上述糊状组织悬浮于 25 ml 溶液 1 中, 低速离心。(3) 将经上述处理的组织悬浮于 25 ml 溶液 2 中, 摇床 37 °C 孵育 12~15 min。(4) 加入 12.5 ml 溶液 4, 混匀、离心。(5) 将上步分离的细胞团悬浮于 2 ml 溶液 3 中, 用巴斯德移液管打碎。(6) 加入 1 ml 溶液 5, 将悬液轻轻混匀。(7) 静置 5~10 min, 将沉于管底的细胞团块与其余的细胞制备物分开。(8) 悬浮液低速离心 10 min (1 500 r/min) 将细胞团置于生长培养基中。(9) 当细胞增殖出现大量团块时将其重新悬浮于 2 ml 溶液 3 中, 将组织用巴斯德移液管打碎。(10) 加入 5 ml 溶液 5, 将悬液轻轻混匀。

(11) 将细胞悬液加入生长培养基中。(12) 立即接种于经多聚赖氨酸包被的 35 mm 塑料培养皿中 (4.5 \times 10⁶/皿), 培养物置于 37 °C、5% CO₂、100% 湿度孵育。(13) 于 20~24 h 加入胞嘧啶阿拉伯糖苷 (cytosine arabinoside) (10 μ mol/L) 以预防非神经元细胞繁殖。

1.3 细胞染毒与处理

于对数生长期末 (细胞占皿底面积 80%~90%) 先将需高温处理的细胞置另一培养箱中, 40 °C 预热 45 min, 再将需染毒细胞按表 1 浓度将毒物加入培养基, 90 min 后换去有毒培养基, 再培养 90 min 后即收获。见表 1。

表 1 细胞分组与处理

组名	处理
空白对照组	不施加处理因素
溶剂对照组	等量 DMSO 平行处理
低浓度 BaP 染毒组	BaP 5 μ mol/L + S9-mix
高浓度 BaP 染毒组	BaP 50 μ mol/L + S9-mix
高温处理组	40 °C, 45 min 预热
高温处理 + 低浓度 BaP 染毒组	40 °C, 45 min 预热 + BaP 5 μ mol/L + S9-mix
高温处理 + 高浓度 BaP 染毒组	40 °C, 45 min 预热 + BaP 50 μ mol/L + S9-mix

1.4 观察、收获细胞并计算细胞存活率

在倒置显微镜下观察、对比染毒前后细胞的变化。染毒 90 min 后, 用 0.25% 胰蛋白酶消化贴壁细胞, D-Hanks 液清洗, 台盼蓝染色计数, 每组样本计数 5 次, 每次计数 1 μ l (细胞计数板 4 个视野)。按以下公式计算细胞存活率:

$$\text{存活率} = (\text{未染色细胞数} / \text{所计细胞总数}) \times 100\%$$

1.5 热应激蛋白相对表达值检测

1.5.1 收集样本 将长有神经细胞 (覆盖皿底 90%) 的培养皿用预冷的 PBS 洗 3 遍, 加入细胞裂解液 (0.25 ml/35 mm 培养皿), 用橡皮刮擦刮起细胞层, 收集样本, 低温离心 (4 °C, 10 000 r/min, 2 min)。

1.5.2 蛋白定量 微量 Lowry 法对匀浆进行总蛋白定量, 将少量匀浆上清稀释 30 倍, 加入显色剂, 490 nm 比色, 根据标准色列光密度值换算出蛋白含量, 然后将所有匀浆总蛋白浓度用 PBS 调整一致。

1.5.3 蛋白样品制备 将匀浆按 1:1 加入 2 倍样品缓冲液, 加热变性 (95 °C, 20 min), 离心 (10 000 r/min, 5 min), 取上清。

1.5.4 Western Blot 试验 将上述蛋白质样品 15 μ l 注入加样孔中, 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (120 V, 90 min), 待溴酚蓝接近底线时终止电泳, 将分离后

的蛋白质从 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电转泳 (300 mA, 45 min) 至硝酸纤维素滤膜上, 用丽春红进行染色, 以观察转泳效果, 并用印度墨汁标记出标准分子量蛋白位置, 用 PBS 洗净丽春红, 将硝酸纤维素滤膜放入塑料袋中, 根据滤膜面积以 0.1 ml/cm^2 的量加入封闭液并密封袋口, 室温下平缓摇动温育 1 h, 以封闭硝酸纤维素滤膜的免疫球蛋白结合位点; 用 PBS 洗净封闭液, 加入经 $1:5\ 000$ 稀释的抗 HSP70、HSP90 β 抗体, 37°C 平缓摇动温育 1 h; 用 PBS 洗净滤膜, 加入标记有辣根过氧化物酶的二抗, 37°C 平缓摇动温育 1 h; 洗净滤膜, DAB 显色; 岛津双波长光谱扫描仪 460 nm 测定积分光密度值。HSP70、HSP90 β 相对表达值的计算均以第 1 组的 blot 积分光密度值为基准, 用其余各组 blot 积分光密度值与第 1 组的 blot 积分光密度值进行比较而得。

1.6 统计

用 Excel 软件进行 t 检验及相关检验。

2 结果与分析

2.1 细胞形态观察及细胞存活率

高浓度 BaP 染毒、高温处理+高浓度 BaP 染毒组细胞在加入毒物以后, 有较多细胞出现局部透明度降低、空泡化及脱壁等改变, 其余各染毒组有不同程度的上述改变。高浓度 BaP 染毒、高温处理、高温处理+低浓度 BaP 染毒、高温处理+高浓度 BaP 染毒均可降低细胞存活率 ($P < 0.05 \sim P < 0.000\ 01$)。见表 2。

表 2 各组细胞存活率 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	细胞存活率
空白对照组	5	95.32 ± 2.79
溶剂对照组	5	92.45 ± 5.27
低浓度 BaP 染毒组	5	89.80 ± 6.99
高浓度 BaP 染毒组	5	77.97 ± 6.92 [△]
高温处理组	5	88.85 ± 4.76 [*]
高温处理+低浓度 BaP 染毒组	5	86.38 ± 4.67 [#]
高温处理+高浓度 BaP 染毒组	5	64.31 ± 7.43 [☆]

与空白对照组比较, $* P < 0.05$; 与溶剂对照组比较, $\# P < 0.01$, $\Delta P < 0.001$, $\star P < 0.000\ 01$

2.2 热应激蛋白表达值及其与细胞存活率的关系

小鼠脑组织 HSP70 相对表达值在高温单独作用、低浓度 BaP 单独作用、高温与低浓度 BaP 联合作用下升高。HSP90 β 相对表达值仅在高温与低浓度 BaP 联合作用及高温与高浓度 BaP 联合作用下升高。见表 3。HSP70 与细胞存活率间没有线性相关关系 ($r = 0.217\ 435$, $P > 0.05$)。HSP90 β 与细胞存活率间有线性相关关系 ($r = -0.796\ 18$, $P < 0.05$)。

表 3 各组细胞 HSP70、HSP90 β 相对表达值

组别	HSP70 相对表达值	HSP90 β 相对表达值
空白对照组	1	1
溶剂对照组	1.05	0.99
低浓度 BaP 染毒组	1.19	1.02
高浓度 BaP 染毒组	1.01	1.04
高温处理组	1.32	1.06
高温处理+低浓度 BaP 染毒组	1.36	1.16
高温处理+高浓度 BaP 染毒组	1.04	1.21

3 讨论

BaP 是由有机物高温燃烧或高温裂解而产生的, 因此 BaP 与高温这两种有害因素在生活和生产环境中也常同时存在, 故研究二者的联合神经毒性具有重要的意义。

神经元培养作为研究体外神经毒性的方法正逐渐为国内外实验室采用, 细胞存活率则是反映毒物毒性的一项较为客观可靠的指标。本研究结果表明高浓度 BaP 对体外培养大鼠小脑神经元具有明显的毒作用, 且 BaP 与高温联合作用使这种毒性增强, 作用机制有待深入研究。

HSP70 是迄今为止研究得最为活跃、深入的一种热应激蛋白。但在实际工作中有害因素对热应激蛋白的诱导往往是一组而不止一种, 单纯研究 HSP70 在应用中也就不显得有所不足。一般认为 HSP70 的表达升高对组织细胞具有保护作用, 但实际情况是 HSP70 的表达水平并不总是与有害因素的作用强度平行 (亦即不与损害程度平行), 高雅娟及杨进波的研究都有类似现象。高雅娟用人胚肺上皮细胞培养研究表明 HSP70 的表达水平在低剂量 BaP 作用下升高, 而在高浓度 BaP 作用下反而降低^[4]。杨进波用猪动脉内皮细胞培养研究表明 HSP70 的表达水平受到高浓度 BaP 抑制^[5]。本研究的结果表明, 当机体受到低剂量 BaP、高温或二者联合作用时, HSP70 表达升高。而受到高剂量 BaP、高温或二者联合作用时 HSP70 表达水平反而没有明显的升高。这可以解释为热应激蛋白对化学性毒物损害的保护作用有一定的限度, 当损害强度较大时, 某些机制抑制了 HSP70 的诱导。有人提出高浓度的 BaP 是一种蛋白酶抑制剂, 而 HSP70 类属于蛋白酶家族成员, 但我们认为实际的机制可能要复杂得多, 因为 BaP 会产生多种代谢物, 到底是哪一种或几种代谢物起主要作用还有待研究。一般认为 HSP90 β 可诱导性不强, 而在本实验中则表现为 BaP 与高温联合作用时 HSP90 β 的相对表达值升高, (下转第 79 页)

胞所占比例。Lash 等^[14, 15]通过 LDH 释放试验研究 TCE 对 F344 大鼠肾皮质细胞损伤作用, 结果发现 TCE、PCE 对雄性大鼠肾皮质细胞毒性呈时间-剂量-反应关系。提示 TCE 和 PCE 都对雄性大鼠肾皮质细胞产生细胞毒性。本次实验中, 利用 LDH 释放试验研究 TCE、PCE 和 DCE 对人 KC 细胞毒性的时间-剂量-反应关系, 结果显示经 TCE、PCE 和 DCE 处理后人 KC 的 LDH 释放率与溶剂对照组相比也呈浓度、时间依赖性增加, 且当 TCE 浓度为 0.125 mmol/L、PCE 浓度为 0.1 mmol/L 和 DCE 浓度为 0.7 mmol/L 以上作用时间达 3 h 以上时, 处理组的 LDH 释放量与溶剂对照组差异有显著性; 当 TCE 浓度为 0.5 mmol/L、PCE 浓度为 0.4 mmol/L 和 DCE 浓度为 1.4 mmol/L 以上作用时间达 2 h 以上时, 处理组的 LDH 释放量与溶剂对照组差异有显著性, 与 Lash 等实验结果相似, 提示 TCE、PCE 和 DCE 对 KC 都具有细胞毒性作用, 且呈现时间-浓度-效应关系, 但其具体作用机制尚需进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] Stewart BW. Trichloroethylene and cancer: a carcinogen on trial [J]. *Med J Aust*, 2001, 174 (5): 244-247.
- [2] Mundt KA, Birk T, Burch MT. Critical review of the epidemiological literature on occupational exposure to perchloroethylene and cancer [J]. *Int Arch Occup Environ Health*, 2003, 76 (7): 473-491.
- [3] Forkert PG. Mechanisms of 1, 1-dichloroethylene-induced cytotoxicity in lung and liver [J]. *Drug Metab Rev*, 2001, 33 (1): 49-80.
- [4] Lee CC, Bhandari JC, Winston JM, et al. Carcinogenicity of vinyl chloride and vinylidene chloride [J]. *J Toxicol Environ Health*, 1978, 4 (1): 15-30.
- [5] Nakajima T, Yamanoshita O, Kamijima M, et al. Generalized skin

reactions in relation to trichloroethylene exposure: a review from the viewpoint of drug-metabolizing enzymes [J]. *J Occup Health*, 2003, 45(1): 8-14.

- [6] 邝守仁, 孔凌珍, 刘惠芳, 等. 三氯乙烯所致药疹性皮炎 19 例分析 [J]. *中国职业医学*, 1999, 26 (4): 27-28.
- [7] 丁锐, 沈彤, 涂登云, 等. 人皮肤角质形成细胞的胰蛋白酶消化分离及无血清培养 [J]. *安徽医科大学学报*, 2003, 38 (6): 415-418.
- [8] NIH Publication No. 01-4500. Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity [S].
- [9] 黄汉林, 李来玉, 陈秉炯. 广东省三氯乙烯职业危害新问题研究进展 [J]. *中国职业医学*, 2002, 29 (3): 2-3.
- [10] Le M, Schalkwijk J, Siegenhaler G, et al. Changes in keratinocyte differentiation following mild irritation by sodium dodecyl sulphate [J]. *Arch Dermatol Res*, 1996, 288 (11): 684-690.
- [11] Trautmann A, Akdis M, Schmid-Grendelmeier P, et al. Targeting keratinocyte apoptosis in the treatment of atopic dermatitis and allergic contact dermatitis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 108 (5): 839-846.
- [12] Trautmann A, Altnauer F, Akdis M, et al. The differential fate of cadherins during T-cell-induced keratinocyte apoptosis leads to spongiosis in eczematous dermatitis [J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 117 (4): 927-934.
- [13] Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption [J]. *Toxicology Lett*, 1985, 24: 119-124.
- [14] Lash LH, Qian W, Putt DA, et al. Renal and hepatic toxicity of trichloroethylene and its glutathione-derived metabolites in rats and mice: sex-, species-, and tissue-dependent differences [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 297 (1): 155-164.
- [15] Lash LH, Qian W, Putt DA, et al. Renal toxicity of perchloroethylene and S-(1, 2, 2-trichlorovinyl) glutathione in rats and mice: sex- and species-dependent differences [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002, 179 (3): 163-171.

(上接第 75 页) 其机制有待进一步探讨。本研究中 HSP90 β 与细胞存活率呈显著的负相关关系, 提示其在本实验中对体外培养神经元可能起保护作用, 亦可用作损害程度的标志。目前尚未见同类实验研究报道, 这种负相关关系是否存在于其他有害因素引起的应激过程中尚不清楚。

由于 BaP 神经毒性方面的研究资料很少, 许多问题尚无法定论, 但本研究的结果则表明有必要在这一方面进行深入的研究, 如选用更敏感的指标研究低剂量 BaP 对神经系统的损害情况及其机制, 进一步再研究如何预防、治疗等。另外, 由于 BaP 是环境中的常见毒物, 常与其他毒物及有害因素共同存在, 其联合毒作用是将来研究的主要方向。

参考文献:

- [1] David Moin, Andre Viau, Ih Chu, et al. Pharmacokinetics of Benz[a] pyrene in the rat [J]. *J Toxicol Environ Health*, 1998, 53: 507-530.
- [2] Tang Y, Donnelly KC, Tiffany-Castiglioni E, et al. Neurotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and simple chemical mixtures [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2003, 66 (1): 919-940.
- [3] 涂白杰, 陈胜, 肖成峰, 等. 苯并[a] 芘染毒小鼠神经组织的形态学改变及细胞凋亡 [J]. *中华劳动卫生与职业病杂志*, 2002, 20 (4): 296-299.
- [4] 高雅娟, 陈胜, 肖成峰, 等. 苯并[a] 芘代谢产物作用下人胚肺细胞热应激蛋白 70 表达与 DNA 损伤 [J]. *中华劳动卫生与职业病杂志*, 2000, 18: 321-323.
- [5] 杨进波, 肖成峰, 杨晓波, 等. 苯并[a] 芘对内皮细胞增殖活性的影响及与热应激蛋白 70 表达关系的研究 [J]. *卫生研究*, 2003, 32: 92-94.