

镍对雄性小鼠脾脏损伤的研究

Study on mechanism of spleen injury cause by nicke in male mice

孙应彪¹, 陈建华², 王学习¹, 宋援朝¹, 王俊玲¹

SUN Ying-biao¹, CHEN Jian-hua², WANG Xue-xi¹, SONG Yuan-chao¹, WANG Jun-ling¹

(1. 兰州大学公共卫生学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 兰州水泵总厂职工医院, 甘肃 兰州 730000)

摘要: 予小鼠腹腔注射硫酸镍 0.8、2.0、5.0 mg/kg 染毒, 连续 30 d。制备脾脏组织匀浆, 采用酶法测定一氧化氮合酶 (NOS) 活力、一氧化氮 (NO) 含量、超氧化物歧化酶 (SOD) 活力; 分光光度法测定还原型谷胱甘肽 (GSH) 和丙二醛 (MDA) 含量及总抗氧化能力 (T-AOC)。结果染镍各剂量组 NOS 活力显著低于生理盐水 (NS) 组, NO 含量亦低于生理盐水组; 镍可抑制 SOD 活力, 使 T-AOC、GSH 含量降低, 而引起 MDA 含量升高, 且随着染毒剂量的增加, 其效应逐渐增强。

关键词: 镍; 脾脏; 脂质过氧化; 一氧化氮合酶; 一氧化氮

中图分类号: O614.81 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2005)05-0295-02

镍既是人体的必需微量元素, 又是常见的环境污染物之一。据报道, 镍可导致免疫功能损伤, 表现为胸腺萎缩和脾脏增大, T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞数目的改变^[1,2]。本研究采用雄性小鼠腹腔注射硫酸镍染毒, 观察其对脾脏组织超氧化物歧化酶 (SOD) 活力、还原型谷胱甘肽 (GSH)、丙二醛 (MDA) 含量、总抗氧化能力 (T-AOC) 以及一氧化氮合酶 (NOS) 活力、一氧化氮 (NO) 含量的影响, 探讨镍对脾脏的毒作用机制。

1 材料与与方法

1.1 材料

健康昆明种雄性小鼠, 体重 18~22 g, 由兰州生物制品所提供。硫酸镍 (西安化学试剂厂), 分析纯, NOS、NO、SOD、GSH、T-AOC 试剂盒 (南京建成生物工程研究所), 722 型分光光度计 (上海精密科学仪器有限公司), 水浴恒温振荡器 (常州国华电器有限公司), 日立高速低温冷冻离心机。

1.2 方法

表 1 硫酸镍对雄性小鼠脾脏 NOS、NO、T-AOC、GSH、SOD、MDA 的影响 (n=10)

NiSO ₄ 剂量(mg/kg)	NOS(U/mg Pro)	NO(μmol/mg Pro)	T-AOC(U/mg Pro)	GSH(U/mg Pro)	SOD(U/mg Pro)	MDA(nmol/mg Pro)
0	0.49±0.06	0.67±0.05	0.45±0.04	18.54±1.07	38.65±5.52	1.46±0.38
0.8	0.33±0.05**	0.44±0.16*	0.32±0.09**	16.94±1.91	29.32±4.27*	2.53±0.32*
2.0	0.32±0.03**	0.40±0.07*	0.28±0.04**	14.54±2.26*	27.22±4.48**	3.14±0.51**
5.0	0.20±0.04**	0.26±0.08*	0.18±0.05**	10.86±1.82**	14.92±2.26**	4.81±0.87**

与对照组比较, * P<0.05 ** P<0.01

1.2.1 动物分组和剂量选择 健康昆明种雄性小鼠 40 只, 随机分为 4 组, 即生理盐水组 (NS) 组, 硫酸镍 (NiSO₄) 0.8 mg/kg、2.0 mg/kg、5.0 mg/kg 组, 腹腔注射染毒, 每日 1 次, 连续 30 d, 正常喂饲饮水。

1.2.2 脾脏组织匀浆的制备 于染毒第 31 天, 动物称重, 颈椎脱臼法处死小鼠, 迅速剪开腹腔, 剥离脾脏, 洗净血污后称重, 按 1:9 加入 4℃ 预冷 0.01 mmol/L HCl-Tris 缓冲液 (内含 0.01 mmol/L 蔗糖, 0.1 mmol/L EDTA-Na₂) 于玻璃匀浆器中, 冰浴中进行匀浆, 制成 10% 脾脏组织匀浆, 于高速低温离心机 5 000 r/min 离心 20 min, 取上清液待测。

1.2.3 指标测定 采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒测定脾脏组织中 SOD、NOS 活力和 T-AOC、GSH、NO 含量, 采用 TBA 法^[3]测定 MDA 含量。

1.3 统计分析

采用 SPSS8.0 统计软件进行方差分析, 并对染毒组与对照组进行两两比较。

2 结果

2.1 染镍对小鼠脾脏脏体比值的影响

硫酸镍各染毒组间, 随染毒剂量的增加, 脾/体比值有降低趋势, 但与对照组比较无统计学意义 (P>0.05)。

2.2 镍对雄性小鼠脾脏 NOS 及 NO 含量及脂质过氧化指标的影响

表 1 显示, 各染毒组小鼠脾脏 NOS 活力及 NO 含量均低于对照组, 差异有显著性 (P<0.05)。各染毒组间, 随着染毒剂量的增加, NOS 活力及 NO 含量呈降低趋势。镍可抑制 SOD 活力, 使 T-AOC、GSH 含量降低, MDA 含量升高; 染毒组 T-AOC、SOD、MDA 与对照组比较差异均有显著性 (P<0.05); GSH 仅高、中剂量组差异有显著意义 (P<0.05)。

3 讨论

镍可抑制 SOD 活性, 使 GSH 含量减少, 破坏机体的氧化平衡状态, 从而使脾细胞抗氧化应激能力下降, 而氧化应激会进一步引起脂质过氧化、巯基耗竭等氧化性损伤。MDA 是活

收稿日期: 2004-09-03; 修回日期: 2004-10-20
作者简介: 孙应彪 (1967-), 男, 硕士, 副教授, 从事镍毒性及防治研究。

性氧引起的脂质过氧化反应的终产物之一，是反映氧化损伤最简洁、可靠的指标^[4]；而 T-AOC 是机体防御体系之一，该能力的强弱与健康程度存在着密切联系，这种机能的降低常常导致各种疾病的产生^[5]。镍进入机体可产生自由基^[6]，蓄积在脾脏组织中，引起脾细胞膜脂质过氧化，导致脾脏抗氧化能力受损，T-AOC 水平降低，脂质过氧化产物 MDA 含量升高。

NO 作为一种重要信使分子，参与机体各种复杂的病理生理过程，体内 NO 的合成不足必然引起机体许多生理功能的丧失，从而导致许多疾病^[7]。镍所致的 SOD 活力的降低可进一步引起超氧自由基的大量堆积，而超氧自由基可催化 NO 生成超氧亚硝酸根离子 (ONOO⁻)，其活性强于超氧自由基，从而加重脂质过氧化^[8]。因此，Ni²⁺ 抑制脾脏组织细胞 NOS 活力，使 NO 合成减少，引起细胞信息传递障碍和细胞内 Ca²⁺ 浓度升高及对 Ca²⁺ 敏感度增加^[9]，从而导致脾脏毒性。

参考文献:

[1] 刚葆琪, 庄志雄. 我国镍毒理学研究进展 [J]. 卫生毒理学杂志, 2000 14: 129-135.

[2] Kyungtae Kim, Sang Han Lee, Young Rok Seo, et al. Nickel (II) - induced apoptosis in murine T cell hybridoma cells is associated with

increased fas ligand expression [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2002, 185: 41-47.

[3] 向荣, 王鼎年. 过氧化脂质硫代巴比妥酸分光光度法的改进 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1990 17: 24.

[4] Lee KU. Oxidative stress markers in korean subjects with insulin resistance syndrome [J]. Diabetes Res Clin Pract, 2001, 54: 29-33.

[5] 陈瑗, 周玫. 自由基医学基础与病理生理 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 50-149.

[6] Misra M, Rodriguez RE, Kasprzak KS. Nickel induced lipid peroxidation in the rat; Correlation with nickel effect on antioxidant defense systems [J]. Toxicology, 1990 64: 1-17.

[7] 钟慈声, 孙安阳. 一氧化氮的生物医学 [M]. 上海: 上海医科大学出版社, 1997. 8.

[8] Rubbo H, Radi R, Trujillo M, et al. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives [J]. J Biol Chem, 1994, 269 (42): 26066-26075.

[9] Donald JW, Robert AN. Inhibition of nitric oxide synthase isoforms by prothorins [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1996, 333 (1): 27-34.

乳腺癌组织中 O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶的表达

Expression of O⁶-Methylguanine-DNA Methyltransferase in breast cancer

谭纪伏¹, 孙茂民^{2*}, 夏春林²

TAN Ji-fu¹, SUN Mao-min^{2*}, XIA Chun-lin²

(1. 苏州市第二人民医院, 江苏 苏州 215002; 2. 苏州大学医学院解剖学教研室, 江苏 苏州 215007)

摘要: 采用原位杂交方法检测 30 例乳腺癌组织 O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (MGMT) 表达水平。结果显示, MGMT 阳性率为 93.4% (28/30), 其中高表达 28.6% (8/28), 中、低表达 71.4% (20/28)。乳腺癌组织 MGMT 的表达与临床分期无关。

关键词: 乳腺癌; O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶

中图分类号: R655.8 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X (2005)05-0296-02

乳腺癌是损害女性健康的主要恶性肿瘤之一，目前治疗主要以外科手术切除为主，辅以化疗或放疗，但许多患者在手术后化疗过程中对化学药物产生耐药性而影响预后，所以乳腺癌的耐药性研究受到越来越多的重视。肿瘤细胞内 O⁶-甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶 (MGMT) 能修复亚硝胺类药物 (CNU_s) 对肿瘤细胞 DNA 的烷基损伤，是阻止 CNU_s 杀伤肿瘤细胞的主要障碍，它可以使肿瘤细胞耐药^[1]。本研究通过原

位杂交方法检测乳腺癌组织中 MGMT 的表达，探讨乳腺癌组织中 MGMT 表达与 CNU_s 耐药的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

乳腺癌标本为我院 1999~2004 年外科乳腺癌根治术标本，共 30 例，均经病理诊断证实，其中浸润性导管癌 18 例，腺癌 8 例，低分化癌 4 例。患者年龄 31~65 岁，平均 51 岁。

1.2 方法

MGMT 原位杂交试剂盒由武汉博士德生物技术公司提供，乳腺癌石蜡切片常规脱蜡至水 (DEPC 处理)，胃蛋白酶室温消化 30 min，预杂交液 20 μl 预杂交室温 2 h (勿洗)，滴加 50 μl 含地高辛标记 MGMT 探针的杂交液，采用原位杂交专用盖玻片 42℃ 40 h，滴加封闭液室温 20 min (不洗)，滴加兔抗地高辛室温 60 min，滴加生物素化羊抗兔 IgG，室温 30 min，滴加 SABC 室温 30 min，DAB 显色，常规乙醇脱水，封片。用 TBS 代替一抗作阴性对照，用已知阳性的结肠癌组织作阳性对照。

1.3 结果判定

MGMT 阳性细胞为细胞浆染色，高倍视野下，计数 100 个癌细胞中阳性细胞达 10% 为高表达，低于 10% 为中低表达。

收稿日期: 2005-03-10; 修回日期: 2005-05-08

作者简介: 谭纪伏 (1957-), 男, 副主任医师, 研究方向: 乳腺癌的耐药机制。