

0.05), 两法的符合率为 0.817。PCR 法的灵敏度为 0.926 特异性为 0.207, 假阴性为 0.074, 假阳性为 0.793。

### 3 讨论

自 1985 年 Mallis 首创 PCR 以来, 该技术在分子生物学的各个领域展现出了广阔的前景。刘洁等<sup>[2]</sup>将 PCR-RFLP 用于甲真菌病的快速诊断, 其敏感性高于镜检和培养, 特异性也较好。林俊萍等<sup>[3]</sup>首次采用聚合酶链反应检测角化型手癣的真菌 DNA, 收到良好效果, 指出 PCR 可用于角化型手癣的临床诊断。冯义国等<sup>[4]</sup>应用 PCR 建立鉴定真菌菌型的方法, 扩增产物电泳分析发现不同菌种间产生的 DNA 带型存在明显差异, 说明 PCR 用于真菌鉴定比较可靠、稳定。

本研究通过对 191 名临床诊断为浅部真菌病的酿酒工人所感染的真菌进行 PCR 法和培养法的检测, PCR 法检出的阳性率为 90.58%, 培养法检出的阳性率为 84.82%, 两种方法真菌的检出率差别不大, 检出的真菌菌种也基本相同。PCR 检测的优点主要是大大缩短了真菌检测的时间, 从标本收集到最终诊断仅需要 12 h, 且不依赖活菌体、生长状态及生化和形态学表型, 与传统的形态学方法即真菌培养比较, 较易操作, 而且敏感性高, 可以检测少量 DNA, 且可明确菌种。由于皮肤癣菌的基因型是稳定不变的, 其核苷酸组成和序列长度在同种内存在保守性, 在种间又有着高度特异性<sup>[5]</sup>, 因此从 DNA 水平分类和鉴定可以克服表型多变造成的鉴定困难<sup>[7]</sup>。然而 PCR 检测的关键问题是避免假阳性, 提高特异性和敏感性。首先, 要避免环境中真菌的污染, 取材时要迅速将标本放在有盖的无菌试管或其他容器中, 同时也要注意防止在实验操作过程中的污染。用培养法检测真菌, 是皮肤科

一种传统的诊断和鉴定真菌的方法, 因此法具有准确可靠的优点, 现仍然广泛应用于浅部和深部真菌的诊断和鉴定, 但其培养的时间长, 需要约半个月的时间, 且其操作过程较复杂, 因此寻求更好的诊断方法成为医务工作者的努力方向。

我国川南地区酿酒业生产规模大、从业工人较多, 酿酒工人患浅部真菌病的发病率较高<sup>[7]</sup>。生产环境的温度偏高、湿度大, 工人劳动强度大, 出汗多, 是其高发病率的原因之一。用 PCR 法快速检测酿酒工人所患浅部真菌病, 及时进行诊治, 有利于降低酿酒工人浅部真菌病的发病率。

### 参考文献:

- [1] Liu D, Coloe S, Baird R, et al. Molecular determination of dermatophyte fungi using the arbitrarily primed polymerase chain reaction [J]. Br J Dermatol, 1997, 137: 351-355.
- [2] 刘洁, 雷鹏程, 应建明, 等. PCR-RFLP 用于甲真菌病病原菌诊断和鉴别 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2001, 15 (6): 264-267.
- [3] 林俊萍, 王雅坤, 白兆震, 等. 聚合酶链反应检测角化型手癣的病原菌 DNA [J]. 中国皮肤性病学杂志, 1999, 13 (3): 178-179.
- [4] 冯义国, 肖生祥, 谭升顺, 等. 应用 AP-PCR 进行真菌菌型鉴定的方法建立 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2000, 14 (3): 157-158.
- [5] Leclerc M C, Philippe H, Gueho E. Phylogeny of dermatophytes and dimorphic fungi based on large subunit ribosomal RNA sequence comparisons [J]. J Med Vet Mycol, 1994, 32: 331-341.
- [6] Jackson J, Barton C, Evans E, et al. Species identification and strain differentiation of dermatophyte fungi by analysis of ribosomal DNA intergenic spacer regions [J]. J Clin Microbiol, 1999, 37: 931-936.
- [7] 颜丹, 李焯, 陈德宇. 酿酒工人感染皮肤癣菌的现状与对策 [J]. 中国临床康复, 2006, 10 (24): 27-29.

## 六价铬对人胚肺细胞的毒性及绿茶对其拮抗作用的研究

### Study on cytotoxicity of Cr(VI) in HEL cells and the antagonism of green tea

寇琰<sup>1,2</sup>, 刘桂刚<sup>2</sup>, 于素芳<sup>1\*</sup>, 傅玉芹<sup>3</sup>, 高雷<sup>3</sup>, 张春玲<sup>1</sup>, 易超<sup>1</sup>, 李国珍<sup>1</sup>, 安丽红<sup>1</sup>, 刘国庆<sup>1</sup>

KOU Yan<sup>1,2</sup>, LIU Gui-gang<sup>2</sup>, YU Su-fang<sup>1\*</sup>, FU Yu-qin<sup>3</sup>, GAO Lei<sup>3</sup>, ZHANG Chun-ling<sup>1</sup>, YI Chao<sup>1</sup>, LI Guo-zhen<sup>1</sup>,

AN Li-hong<sup>1</sup>, LIU Guo-qing<sup>1</sup>

(1. 山东大学劳动卫生与环境卫生学研究所, 山东 济南 250012; 2. 山东省卫生厅卫生监督所, 山东 济南 250011; 3. 山东大学第二医院, 山东 济南 250033)

**摘要:** 采用 RT-PCR 技术检测细胞内 p53 及 bcl-2 基因的改变, 以观察六价铬 [Cr(VI)] 对人胚肺细胞 (HEL) 内癌基因和抑癌基因的影响及绿茶对其的拮抗作用。结果显示, 不同浓度的 Cr(VI) 溶液和绿茶浸泡液处理 HEL 细胞 24 h 后, 5 μmol/L 及 10 μmol/L Cr(VI) 单独处理组细胞内 p53 mRNA 和 bcl-2 mRNA 含量显著高于阴性对照组 (P < 0.05)。绿茶浸泡液处理组与 Cr(VI) 单独处理组相比, 细胞内 p53 mRNA 和 bcl-2

mRNA 含量降低 (P < 0.05)。提示六价铬可引起 p53 及 bcl-2 mRNA 水平升高, 绿茶浸泡液可以降低其表达水平。

**关键词:** 六价铬; 人胚肺细胞; p53; bcl-2; 绿茶

**中图分类号:** O612.6 **文献标识码:** B

**文章编号:** 1002-221X(2007)02-0116-03

六价铬 [Cr(VI), hexavalent chromium] 在工业上应用极广, 已被国际癌症研究机构 (IARC) 证实是一种强致癌剂, 可导致职业性肺癌<sup>[1]</sup>, 但其致癌机制还不是很明确。p53 基因是迄今发现与人类肿瘤相关性最高的抑癌基因, bcl-2 是研究最早的与凋亡有关的基因。有关 Cr(VI) 对于人胚肺细胞 (HEL) 内癌基因及抑癌基因改变的报道较少, 故我们采用 RT-PCR 技术

收稿日期: 2006-07-03; 修回日期: 2006-12-01

基金项目: 山东省自然科学基金 (Y2000C18); 山东省卫生厅资助项目 (99CAICAA13)

作者简介: 寇琰 (1978-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 工业分子毒理学。

\*. 通讯作者, 副教授, 硕士生导师。

检测不同浓度重铬酸钾染毒对人胚肺细胞 p53 和 bcl-2 mRNA 表达的影响, 观察绿茶浸泡液对Cr(VI) 毒性作用的拮抗作用, 为接触Cr(VI)化合物的职业人群提供保健性饮料提供科学的依据。

### 1 材料与与方法

#### 1.1 细胞培养及处理

HEL细胞株在 RPMI-1640 基质中培养, 其中加体积分数 10% 灭活小牛血清、青霉素 (1×10<sup>3</sup>U/L) 及链霉素 (1×10<sup>3</sup>mg/L), 于 37℃、5%CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 待细胞长满瓶底后, 用 0.25% 胰酶消化, 在细胞之间出现明显裂隙后, 加入含血清的培养液终止消化, 用细胞培养液将细胞吹打成单细胞悬液, 然后将细胞悬液按 1:3 传代, 待传代细胞将要长满瓶底后加入 Cr(VI) 溶液及绿茶, 分为阴性对照组、10 μmol/L Cr(VI) 组、5 μmol/L Cr(VI) 组、10 μmol/L Cr(VI) + 绿茶组、5 μmol/L Cr(VI) + 绿茶组 (绿茶终浓度为 1 mg/ml)。绿茶浸泡液: 称取 2 mg 日照绿茶 (春茶), 加入 200 ml 沸水浸泡 30 min, 过滤 (0.22 μm 滤膜), 现配现用。

#### 1.2 RT-PCR 检测 p53 和 bcl-2 基因的 mRNA 表达

收集细胞提取总 RNA, 紫外分光光度计测定 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub>, 比值在 1.7~2.0 之间, 计算 RNA 含量。引物设计用 Primer 3.0 设计。

(1) Human p53: P1 5'-GCGCACAGAGGAAGAGAATC-3'  
P2 5'-GGCCAACTTCCTCAGTGGAG-3'

(扩增产物 346 bp);

(2) Human bcl-2: P1 5'-TGTGGCCTTCCTTGAGTTCG-3'  
P2 5'-TCACTTCGTGCTCAGATAGG-3'

(扩增产物 280 bp);

(3) Human β-actin: P1 5'-GTGGGGCGCCCAAGGACCA-3'  
P2 5'-CTCCTTAATGTCACGACGATTTC-3'

(扩增产物 539 bp);

逆转录合成 cDNA 于 -20℃ 保存备用。取 5 μl cDNA, 采用 PTC-200 DNA 扩增仪扩增。目的基因反应参数为: 95℃ 5 min, 94℃ 1 min, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min, 共 33 个循环后, 最后 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离检测。

#### 1.3 统计学处理

实验数据均由 3 次以上独立的实验得出, 结果用 Mean ± SD 表示, 应用 SPSS 10.0 软件进行单因素方差分析。

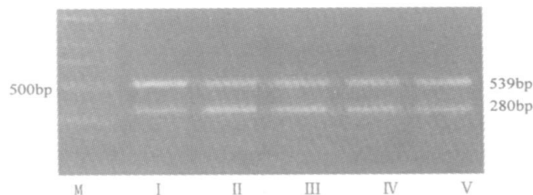
### 2 结果

#### 2.1 绿茶、Cr(VI) 对细胞内 p53 基因 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示, 用终浓度为 0、5、10 μmol/L Cr(VI) 处理细胞 24 h, p53 mRNA 的表达逐渐增加。绿茶与 5、10 μmol/L Cr(VI) 同时处理组细胞 p53 mRNA 与 Cr(VI) 单独处理组相比表达量下降。见图 1, 表 1。

#### 2.2 绿茶、Cr(VI) 对细胞内 bcl-2 基因 mRNA 表达的影响

RT-PCR 结果显示, 用终浓度为 0、5、10 μmol/L Cr(VI) 处理细胞 24 h, bcl-2 mRNA 的表达逐渐增加。绿茶与 5、10 μmol/L Cr(VI) 同时处理组细胞 bcl-2 mRNA 与 Cr(VI) 单独处理组相比表达量下降。见图 2, 表 2。



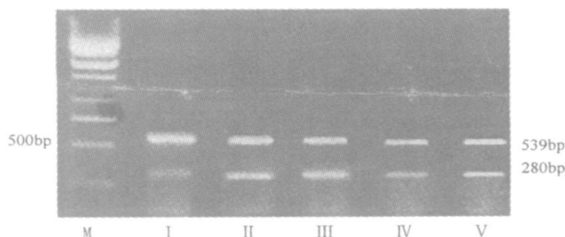
M: Marker; I: 对照; II: 10 μmol/L Cr(VI); III: 5 μmol/L Cr(VI); IV: 10 μmol/L Cr(VI)+绿茶; V: 5 μmol/L Cr(VI)+绿茶

图 1 Cr(VI)、绿茶对 HEL 细胞 p53 表达的影响

表 1 Cr(VI)、绿茶对 HEL 细胞 p53 mRNA 含量的影响

组别	n	比值 ( $\bar{x} \pm s$ )
对照组	5	0.6917 ± 0.0116
Cr(VI) 5 μmol/L	5	0.9276 ± 0.0187*
Cr(VI) 10 μmol/L	5	1.1128 ± 0.0324*
绿茶 + Cr(VI) 5 μmol/L	5	0.7703 ± 0.0258*△
绿茶 + Cr(VI) 10 μmol/L	5	0.9709 ± 0.0122*▲

与对照组比较, \*P < 0.05; 与 Cr(VI) 5 μmol/L 组比较, △P < 0.05; 与 Cr(VI) 10 μmol/L 组比较, ▲P < 0.05 表 2 同。



M: Marker; I: 对照; II: 5 μmol/L Cr(VI); III: 10 μmol/L Cr(VI); IV: 5 μmol/L Cr(VI)+绿茶; V: 10 μmol/L Cr(VI)+绿茶

图 2 Cr(VI)、绿茶对 HEL 细胞 bcl-2 表达的影响

表 2 绿茶、Cr(VI) 对 HEL 细胞 bcl-2 mRNA 含量的影响

组别	n	比值 ( $\bar{x} \pm s$ )
对照组	5	0.2035 ± 0.0158
Cr(VI) 5 μmol/L	5	0.4802 ± 0.0304*
Cr(VI) 10 μmol/L	5	0.5282 ± 0.0213*
绿茶 + Cr(VI) 5 μmol/L	5	0.2551 ± 0.0189*△
绿茶 + Cr(VI) 10 μmol/L	5	0.3711 ± 0.0451*▲

### 3 讨论

Cr(VI) 能通过膜特异性离子通道进入细胞, 并在细胞内还原过程中产生活性氧 (ROS) 自由基, 引起细胞氧化损伤, 具有明显的细胞毒性<sup>[2,3]</sup>。同时 Cr(VI) 化合物具有基因毒性<sup>[4]</sup>, 可导致基因突变, 姐妹染色体交换, 染色体缺失等。茶多酚中的儿茶素对多种致癌物诱发的肿瘤、体外肿瘤以及转移性肿瘤均有抑制作用。研究表明经常饮用绿茶可以降低癌症死亡率<sup>[5~7]</sup>。

实验表明, 经 Cr(VI) 染毒后, 细胞内 p53 mRNA 与对照组相比表达增强, 说明染毒后有 p53 基因启动, 参与了 Cr(VI) 导致细胞损伤过程, p53 高表达被认为是 Cr(VI) 导致细胞损伤

的重要因素之一<sup>[8~10]</sup>, DNA 损伤积累到一定程度, 可能会引起 p53 代偿性增加。而铬与绿茶共同作用组测定 p53 mRNA 含量比单独铬作用组表达下降 ( $P < 0.05$ ), 提示绿茶可以拮抗 Cr(VI) 的毒性作用, 从而达到对细胞的保护作用。HEL 细胞经 Cr(VI) 处理后, bcl-2 mRNA 明显升高, 绿茶作用后细胞内 bcl-2 mRNA 的水平明显降低。

许多研究资料表明, 促癌因素在人类肿瘤发生中具有特别的意义<sup>[11]</sup>。促癌阶段在早期是可逆的, 抑制促癌因素对人类肿瘤的预防具有特殊意义。绿茶作为一种具有还原作用的物质, 可降低染毒细胞内这两种基因的表达, 其机制可能是绿茶在细胞外直接将 Cr(VI) 还原为 Cr(III), 使 Cr(VI) 毒性降低, 逆转了 Cr(VI) 的促癌作用。因此, 经常饮用绿茶是十分有益的。

参考文献:

[1] IARC: IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, chromium, nickel and welding fumes [J]. France: IARC, 1990, 49: 187.  
 [2] Liu K J, Shi X L. In vivo reduction of chromium (VI) and its related free radical generation [J]. Mol Cellular Biochem, 2001, 222: 41-47.  
 [3] Bagehi D, Sidney J. Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different

forms of chromium [J]. Toxicology, 2002, 180: 5-22  
 [4] Chen J, Thilly W G. Mutational spectrum of chromium (VI) in human cells [J]. Mutat Res, 1994, 323: 21-27.  
 [5] Heibrun L K, Nomura A. Black tea consumption and cancer risk: A prospective study [J]. Brit J Cancer, 1986, 54 (4): 277.  
 [6] 沈靖, 叶本法, 张振宇, 等. 绿茶与肝癌关系的流行病学调查 [J]. 中华预防医学杂志, 1989, 23 (2): 105.  
 [7] Kono S, Ikeda M, Tokkudome M, et al. A case-control study of gastric cancer and diet in northern kyushu [J]. Jpn J Cancer Res, 1998, 79 (2): 1067-1074.  
 [8] Carlisle D L, Pritchard D E, Singh J, et al. Apoptosis and p53 induction in human lung fibroblasts exposed to chromium (VI): effect of ascorbate and tocopherol [J]. Toxicol Sci, 2000, 55 (8): 60-68.  
 [9] Carlisle D L, Pritchard D E, Singh J, et al. Chromium (VI) induces p53-dependent apoptosis in diploid human lung and mouse dermal fibroblasts [J]. Mol Carcinog, 2000, 28 (5): 111-118.  
 [10] D'Agostini F, Izzotti A, Benmicelli C, et al. Induction of apoptosis in lung but not in the liver of rats receiving intra-tracheal instillations of chromium (VI) [J]. Carcinogenesis, 2002, 23 (4): 587-589.  
 [11] 程书钧. 绿茶多酚抑制突变和癌变的研究进展 [J]. 癌变·畸变·突变, 1989, 7 (1): 69-71.

## 沙参对肺纤维化大鼠 FN、LN 的影响

### Effect of straight ladybell root on FN and LN in pulmonary fibrosis rats

姚岚<sup>1</sup>, 盛丽<sup>1</sup>, 王莉<sup>2</sup>, 李东书<sup>1</sup>, 马智<sup>3</sup>

YAO Lan<sup>1</sup>, SHENG Li<sup>1</sup>, WANG Li<sup>2</sup>, LI Dong-shu<sup>1</sup>, MA Zhi<sup>3</sup>

(1. 沈阳市中医院, 辽宁 沈阳 110004; 2. 沈阳市九院, 辽宁 沈阳 110024; 3. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110032)

**摘要:** 将大鼠按照性别、体重随机分为正常组、模型组、激素组、沙参 1.5 g/kg 组和 3.0 g/kg 组。按照博来霉素 (BLM) 5 mg/kg 体重复制大鼠肺纤维化模型。结果显示模型组肺组织羟脯氨酸 (HYP)、血清层粘连蛋白 (LN) 含量不断升高, 28 d 达最高峰; 血清纤维连接素 (FN) 含量第 7 天明显升高, 14 d 达最高峰。用药各组上升幅度较模型组低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。提示沙参可降低肺组织的 HYP、血清 FN、LN 含量, 对肺纤维化有一定的治疗作用。

**关键词:** 沙参; 博来霉素; 肺纤维化; HYP; FN; LN

**中图分类号:** R563 **文献标识码:** B

**文章编号:** 1002-221X(2007)02-0118-02

肺纤维化的主要表现为肺间质细胞增生及细胞外基质 (ECM) 过度沉积, 在这一过程中, 作为 ECM 糖蛋白成分的纤维连接素 (FN)、层粘连蛋白 (LN) 参与了肺纤维化的发生、发展, 已被许多研究证明<sup>[1~3]</sup>。细胞外基质最主要的有形成分是胶原蛋白, 而羟脯氨酸 (HYP) 是胶原中的一种特有的氨

基酸。当胶原代谢发生异常时, 组织内 HYP 含量发生相应的变化, 故肺组织 HYP 的含量在一定程度上反应了肺胶原的合成水平<sup>[4]</sup>。中药沙参是临床应用治疗肺纤维化常用的组方用药。但单味沙参治疗肺纤维化的实验研究尚未见报道。通过观察沙参治疗肺纤维化的作用机制, 为单味药的探索应用提供理论依据。

#### 1 材料与与方法

##### 1.1 实验动物

健康 Wistar 大鼠 150 只, 雌雄各半, 体重 180~200 g, 沈阳药科大学实验动物室提供 [动物许可证编号: SYXK (辽) 2003-0012]。

##### 1.2 药品与主要试剂

盐酸平阳霉素 (BLM): 哈尔滨博莱制药有限公司生产, 批号: 04040201, 8 mg/支; 北沙参: 沈阳市中医院药局, 批号: 20050411; 醋酸泼尼松片 (醋酸强的松片): 吉林制药股份有限公司生产, 批号: 20041001。羟脯氨酸测试盒, 南京建成生物工程研究所生产, 批号: 05061705; 大鼠纤维连接蛋白 ELISA 试剂盒, 批号: EK0350, 层粘连蛋白 ELISA 试剂盒, 批号: EK0435, 均由武汉博士德生物工程公司生产。

##### 1.3 仪器设备

96 孔有盖酶标板: 武汉博士德生物工程公司生产, RT-

收稿日期: 2006-11-01; 修回日期: 2006-12-10

作者简介: 姚岚 (1970-), 女, 博士在读, 副主任医师, 主要从事呼吸疾病研究。