

## 煤焦油致哺乳动物细胞转化作用的实验研究

Experimental study on effect of coal tar on mammalian cell transformation

陈丽丽, 王玥, 赵光\*, 于翠平, 吴永会

CHEN Li-li, WANG Yue, ZHAO Guang\*, YU Cui-ping, WU Yong-hui

(哈尔滨医科大学公共卫生学院, 黑龙江 哈尔滨 150081)

**摘要:** 采用转化细胞灶法, 观察煤焦油致小鼠肺成纤维细胞的形态学转化, 并以刀豆球蛋白 A凝集实验进一步验证其转化活性。结果煤焦油剂量为 0.1  $\mu$ g/ml、1.5  $\mu$ g/ml、22.5  $\mu$ g/ml 的转化率分别为 7.80%、9.88%、12.06%, 煤焦油处理的 NH<sub>3</sub>T3 细胞均可与刀豆球蛋白 A 发生凝集反应。提示煤焦油具有细胞转化活性。

**关键词:** 细胞转化; NH<sub>3</sub>T3 细胞; 刀豆球蛋白 A

**中图分类号:** R135.1 **文献标识码:** B

**文章编号:** 1002-221X(2008)04-0251-03

煤炭作为我国的基础能源和重要原料, 在国民经济中具有重要的战略地位。煤焦油不仅可以引起接触性皮炎、毛囊炎、脓疱性或角囊肿反应<sup>[1]</sup>, 而且还可以引起癌症。煤焦油的成分比较复杂, 主要成分为多环芳烃, 已有研究证实多环芳烃是导致焦炉工肺癌的主要原因<sup>[2-3]</sup>。研究表明煤焦油可对体外培养的小鼠 NH<sub>3</sub>T3 细胞产生毒性, 并抑制细胞生长, 降低线粒体代谢活性<sup>[4]</sup>。炼焦工人接触的煤焦油是否具有细胞转化活性的生物学效应, 尚未见报道。本研究着重检测煤焦油的细胞转化活性, 同时, 为从其他生物学特征方面为细胞转化充实客观证据, 进行了刀豆球蛋白 A (ConA) 凝集实验。本研究旨在为煤焦油的致癌危险性以及炼焦工人肺癌的病因学研究提供新的实验室证据。

## 1 材料与方

### 1.1 材料

NH<sub>3</sub>T3 细胞接种于含 10% RPMI 1640 培养液中, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 0.02% EDTA 消化, 传代, 备用。将煤焦油 (采自某炼焦厂) 配成浓度为 56.25 mg/ml 的溶液 25 ml, 4℃ 保存, 备用。试剂: DMSO (Sigma 公司产品), 小牛血清 (Gibco 公司产品), RPMI 1640 培养粉 (天象人生物工程有限责任公司), 刀豆球蛋白 A (Sigma 公司产品), 苯并(a)芘 [日本光纯药工业株式会社, B(a)P], 配成浓度为 1 mg/ml 的贮备液, 4℃ 保存, 备用。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞的制备

取进入指数生长期的 NH<sub>3</sub>T3 细胞, 收稿日期: 2008-04-15  
基金项目: 黑龙江省自然科学基金项目 (D200619)  
作者简介: 陈丽丽 (1979-), 女, 在读硕士, 助教, 主要从事工业毒理学研究。

\*: 责任作者, 教授。

制成悬液。浓度为  $1 \times 10^5$  个/ml 接种于 25ml 培养瓶中, 共分 5 组, 每组 6 瓶, 3 瓶用于转化灶的判定, 另 3 瓶用于 ConA 凝集实验, 每瓶接种 1.8 ml 培养 24 h 后, 加入不同浓度的受试物, 使其终浓度分别为 0.1、1.5、22.5  $\mu$ g/ml。同时设阴性对照组加入等体积的 5  $\mu$ l 的 DMSO 稀释液, 阳性对照组加入等体积的 B(a)P, 终浓度为 1  $\mu$ g/ml。染毒 24 h 后终止染毒并更换培养液, 此后每 3 d 换培养液 1 次, 至第 21 天终止培养, 细胞层以甲醇固定 10 min, Giemsa 染色 15 min, PBS 冲洗 3 次, 倒置显微镜下观察, 转化灶的判定采用“第二届全国细胞和组织培养专题讨论会”通过的鉴定指标<sup>[5]</sup>和 Dipaolo (1977 年) 提出的标准<sup>[6]</sup>, 由两人认定。

1.2.2 ConA 凝集实验 将 ConA 配成浓度为 1 mg/ml 的贮备液, 在转化实验结束时, 从各组取出 3 个培养瓶, 制备成细胞悬液, 向 24 孔板的每孔中各加 0.1 ml 细胞悬液, 再分别加入 0.1 ml 不同浓度 ConA 应用液, 使各孔中 ConA 的终浓度依次为 500、250、100、50 和 0  $\mu$ g/ml (空白对照), 混匀, 显微镜下观察凝集反应。结果判定参考文献 [7]。

1.2.3 统计学处理 全部数据采用 SPSS 10.0 统计软件进行  $\chi^2$  检验。

## 2 结果

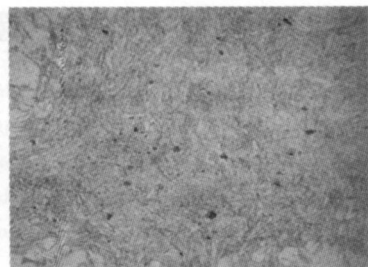
### 2.1 转化实验

阴性对照组在培养结束后, 可见生长状态良好的正常细胞灶。细胞灶外围区, 细胞呈单层生长, 束状、规则、无交叉和重叠, 无自发转化灶; B(a)P 组有典型细胞转化灶形成, 转化率为 18.27%, 煤焦油各剂量组可见有细胞转化灶形成, 转化率分别为 12.06%、9.88%、7.80%, 转化灶外围区细胞生长紊乱, 交叉、重叠, 细胞染色加深, 核仁增加; 阴性对照组转化率最低, 阳性对照组转化率最高。 $\chi^2$  检验显示, 煤焦油各剂量组、阳性对照组与阴性对照组细胞转化率差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 煤焦油各组之间差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。但煤焦油各剂量组之间存在剂量-反应关系, 随着煤焦油浓度的增大, 转化灶的形成率也逐渐增加 (见表 1、图 1)。

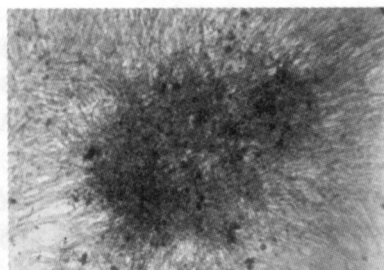
表 1 各受试物对 NH<sub>3</sub>T3 细胞的转化实验结果

受试物	受试物浓度 ( $\mu$ g/ml)	接种瓶数 (个)	克隆数 (个)	转化灶数 (个)	转化率 (%)
煤焦油	0.1	3	282	22	7.80*
	1.5	3	172	17	9.88*
	22.5	3	199	24	12.06*
B(a)P	1.0	3	186	34	18.28*
DMSO	5 $\mu$ l/ml	3	133	3	2.26

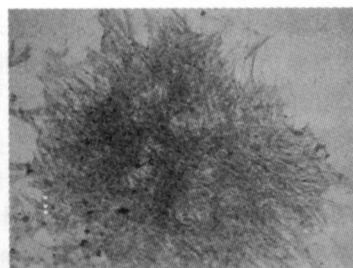
与溶剂对照组相比, \*  $P < 0.05$  ( $\chi^2$  检验)



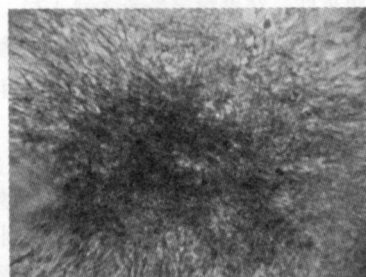
阴性对照



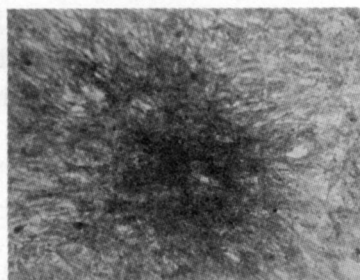
阳性对照



0.1 µg/ml 煤焦油



1.5 µg/ml 煤焦油



22.5 µg/ml 煤焦油

图 1 各组 NH<sub>3</sub>T<sub>3</sub> 细胞转化实验结果 (10×10)

2.2 ConA凝集实验结果

受试物与 ConA混匀 2~3 min 后 B(a)P和煤焦油组即可见絮状沉淀, 15 min后凝集块呈现类圆形, 细胞凝集块的大小与 ConA浓度相关, 相同受试物随着 ConA浓度的增加凝集反

应增强, 随着煤焦油浓度的增加凝集反应增强, B(a)P组出现很强的凝集反应, DMSO组未观察到细胞凝集现象 (见表 2)。

表 2 受试物处理的 NH<sub>3</sub>T<sub>3</sub>细胞与 ConA的凝集反应

受试物	受试物浓度 (µg/ml)	细胞数 (×10 <sup>6</sup> /ml)	ConA浓度 (µg/ml)				
			0	50	100	250	500
煤焦油	0.1	4.1	-	-	±	+	+
	1.5	4.1	-	-	+	+	++
	22.5	4.0	-	+	+	++	++++
B(a)P	1.0	4.2	-	+	++	++	++++
DMSO	5 µg/ml	4.3	-	-	-	-	-

3 讨论

本教研室已对煤焦油的细胞毒性、DNA损伤进行过研究, 但对煤焦油的细胞转化作用, 目前尚未见研究报道。本研究所用受试物来自我省较大的炼焦生产厂家, 研究煤焦油对体外培养细胞的转化活性, 可以为进一步探讨煤焦油的生物学效应提供科学依据。此次实验中, 所用阴性对照 DMSO终浓度为 0.1%对细胞生长无影响, 因 B(a)P是公认的致癌物, 故选择了 B(a)P作为阳性对照物。

阴性对照无自发转化灶形成, B(a)P组和煤焦油对小鼠 NH<sub>3</sub>T<sub>3</sub>细胞有不同程度的转化活性, 有数量不等的转化灶形成, B(a)P组转化率最高, 煤焦油组的转化率次之, 但随浓度的增加转化率有增大的趋势, 煤焦油各剂量组与阴性对照组间差异有统计学意义 (P<0.05), 表明煤焦油能够诱发体外培养的 NH<sub>3</sub>T<sub>3</sub>细胞发生形态转化。为了进一步验证煤焦油处理的 NH<sub>3</sub>T<sub>3</sub>细胞是否发生了转化或恶性改变, 本次采用 ConA凝集实验对煤焦油作用下的细胞转化活性的确认补充了证据。

ConA凝集实验是目前检测转化细胞和肿瘤细胞最为常用的方法, 它与细胞恶性程度符合率很高。膜表面的糖基和糖蛋白结合, 产生凝集反应, 可从另一侧面反映转化或恶性细胞的生物学特性<sup>[8,9]</sup>。ConA凝集实验通过测定细胞与 ConA凝集反应的强弱反映细胞膜表面的糖基、糖蛋白数量是否增加, 进而可判定细胞是否发生转化。

本研究观察到 B(a)P和煤焦油处理的小鼠 NH<sub>3</sub>T<sub>3</sub>细胞与 ConA均发生凝集, 凝集程度呈现剂量-反应关系。结果显示, 煤焦油对小鼠 NH<sub>3</sub>T<sub>3</sub>细胞具有转化活性, ConA凝集实验亦验证了这一结果。本研究可为进一步揭示炼焦工人肺癌的病因提供科学依据。

参考文献:

[1] 程子权, 孙玉欣. 某厂焦油沥青车间职业性皮肤损伤调查 [J]. 工业卫生与职业病, 2004, 30: 28

[2] 舒平, 刘北辰. 职业性焦炉工肺癌 36例临床分析 [J]. 工业卫生与职业病, 2002, 28: 241

[3] WHO International Programme on Chemical Safety Environmental Health Criteria 202 selected non-teratogenic polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. Geneva: World Health Organization, 1998: 883.

[4] 王军, 吴永会. 煤焦油对 NH<sub>3</sub>T<sub>3</sub>细胞的毒性作用 [J]. 中国

工业医学杂志, 2007, 20 (3): 187-188.

- [5] 李申德. 细胞培养中正常细胞恶性转化的鉴定指标 [J]. 细胞生物学杂志, 1985, 2: 95-96.
- [6] 黄幸纾, 陈若星. 环境化学物致突变致畸致癌试验方法 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1985: 173-190.
- [7] 肖芸, 张忠义, 吴永会. 镍冶炼烟尘处理的  $\text{NH}_3/\text{T}_3$  细胞对刀豆素 A 的凝集反应 [J]. 工业卫生与职业病, 2001, 27 (1): 26-28.

- [8] Maschke S, Robert J, Coindre JM, et al. Malignant cells have increased levels of common glycoprotein ligands of the endogenous cellular soluble lectin CSL [J]. Eur J Cell Biol, 1993, 62: 163-172.
- [9] Sivridis E, Giannoulaki A, Koukourakis M, et al. Lectin binding patterns in normal hyperplastic and neoplastic endometrium: the prognostic value of concanavalin A [J]. Virchows Arch, 2000, 436: 52-58.

## 慢性氟中毒大鼠皮层神经元型一氧化氮合酶蛋白的改变及牛磺酸锌的保护作用

Changes of cortical neuron nitric oxide synthase protein in chronic fluorine poisoned rats and the protective effect of zinc taurocholate

王国明<sup>1</sup>, 张秋雨<sup>1</sup>, 李积胜<sup>2</sup>, 陈俊荣<sup>1</sup>, 朱建忠<sup>1</sup>

WANG Guoming<sup>1</sup>, ZHANG Qiu yu<sup>1</sup>, LI Ji sheng<sup>2</sup>, CHEN Jun rong<sup>1</sup>, ZHU Jian zhong<sup>1</sup>

(1. 沧州医学高等专科学校科研科, 河北 沧州 061004; 2. 武警医学院军事预防医学研究所, 天津 300162)

**摘要:** 取 Wistar 大鼠 30 只, 随机分为对照组、低氟组、高氟组、低氟补锌组、高氟补锌组, 每组 6 只, 分别饮用自来水 (对照组), 100 mg/L (低氟组和低氟补锌组)、200 mg/L (高氟组和高氟补锌组) 的 NaF 溶液。5 个月后, 低氟补锌组、高氟补锌组在饮用含氟水中按 0.34 g/L 的浓度加入牛磺酸锌 (TZC), 继续喂养。1 个月 后采用 ABC 免疫组化法观察大鼠大脑皮层神经元型一氧化氮合酶 (nNOS) 阳性神经元的变化。与对照组比较, 各染毒组的 nNOS 阳性神经元数目均明显减少 ( $P < 0.01$ ), 且与染氟剂量呈量效关系 ( $P < 0.01$ ); 与单纯染氟组相比, 补锌组 nNOS 阳性神经元数目明显增多 ( $P < 0.01$ )。提示慢性氟暴露可抑制大鼠皮层 nNOS 阳性神经元的表达, 牛磺酸锌对慢性染氟大鼠神经系统损害具有一定的保护作用。

**关键词:** 氟; 皮层; 神经元型一氧化氮合酶; 牛磺酸锌

**中图分类号:** O613.41 **文献标识码:** B

**文章编号:** 1002-221X(2008)04-0253-02

目前, 比较认同的氟中毒的机制之一是脂质过氧化对神经系统的作用<sup>[1]</sup>。已有研究表明, 锌具有抗脂质过氧化的作用<sup>[2,3]</sup>。为了有效预防和治疗氟中毒, 观察了锌制剂对氟中毒的拮抗作用, 以为体内抗氟剂的选择和应用提供科学依据。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 动物分组

选用 6 周龄的 Wistar 大鼠, 体重 (25±3) g 由天津市实验动物中心提供。共 30 只, 随机分为对照组、低氟组、高氟组、低氟补锌组、高氟补锌组, 每组 6 只, 分别饮用自来水 (对照组), 100 mg/L (低氟组和低氟补锌组)、200 mg/L

(高氟组和高氟补锌组) 的 NaF 溶液, 各组均普通大鼠饲料 (天津市军粮城动物饲料加工厂) 喂养。5 个月后, 低氟补锌组交替饮用 100 mg/L 的 NaF 溶液和 TZC 溶液, 高氟补锌组交替饮用 200 mg/L 的 NaF 溶液和 TZC 溶液, 其他组不变, 继续饲养 1 个月, 饲养期为 6 个月。

#### 1.2 试剂

NaF (天津市化学试剂三厂产品, 分析纯) 用三蒸水配成 100 mg/ml 和 200 mg/ml 的 NaF 溶液。

#### 1.3 实验方法

**1.3.1 组织的制备** 将染氟 6 个月后的 Wistar 大鼠经腹腔麻醉, 剪开胸腔, 暴露心脏, 由心尖部进针至左心室并剪开右心耳形成灌注通道, 同时快速灌注生理盐水 100~150 ml 随后灌入 4℃ 的 4% 多聚甲醛 500 ml 于 30~40 min 完成, 至大鼠躯干、四肢僵直, 肝脏变硬。迅速断头取脑置于 4℃ 的 4% 多聚甲醛溶液中固定 6~9 h 后移入 20% 蔗糖溶液脱水, 12 h 后沿矢状面切开脑组织, 并于冰冻切片机内做连续冠状冰冻切片, 片厚约 50 μm。0.01 mol/L 的 PBS 接片后进行 ABC 免疫组化染色。

**1.3.2 免疫组化染色** 切片移入 37℃ Triton-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 反应 30 min, PBS 缓冲液漂洗后以 3% 正常羊血清封闭 30 min, 加入 nNOS 抗体 (1:1 000 Vector 公司), 4℃ 孵育 72 h, 漂洗后加二抗孵育 60 min, ABC 液 (1:100 Vector 公司) 孵育 60 min, 漂洗后以 0.05% DAB~0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 显色, 镜下控制反应强度, 裱片、脱水、透明、封片。

**1.3.3 结果观察及统计处理** 各选取免疫组化染色对应断面、结构完整并且染色效果好的皮层脑片 12 张, 镜下肉眼观察并计数染色 nNOS 阳性神经元。结果均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 统计学方法采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 及两两比较  $q$  检验, SPSS11.0 统计软件处理数据。

### 2 结果

收稿日期: 2007-12-28 修回日期: 2008-02-20

作者简介: 王国明 (1981-) 男, 助理讲师, 研究方向: 药理学。