

表 2 ES生物烯丙菊酯原药子一代生长情况表

出生 天数	组别	窝重 (g)	仔鼠体重 (g)	仔鼠身长 (cm)	仔鼠尾长 (cm)
第 4 天	对照组	123.9±17.0	9.36±0.95	5.8±0.2	2.2±0.2
	低剂量组	121.5±18.5	9.66±1.25	5.8±0.3	2.1±0.2
	中剂量组	118.5±19.5	9.70±1.11	5.9±0.3	2.2±0.2
	高剂量组	105.8±25.0*	9.27±1.56	5.8±0.3	2.1±0.2
第 7 天	对照组	124.0±9.6	15.5±1.6	6.8±0.3	2.8±0.2
	低剂量组	127.7±14.4	16.0±2.0	6.8±0.3	2.9±0.2
	中剂量组	128.0±12.8	16.0±2.0	6.8±0.3	3.0±0.3
	高剂量组	116.8±20.2	15.0±2.6	7.0±4.2	2.9±0.3
第 14 天	对照组	255.5±17.0	32.0±2.6	8.9±0.4	4.6±0.3
	低剂量组	258.4±23.8	32.3±3.4	9.1±0.4	4.4±0.3
	中剂量组	262.7±33.2	32.2±3.3	9.2±0.5	4.5±0.3
	高剂量组	240.2±22.3	30.9±3.5**	9.1±0.9	4.4±0.4
第 21 天	对照组	418.6±27.5	52.4±4.2	11.1±0.5	6.8±0.5
	低剂量组	416.5±37.5	52.2±5.3	12.2±10.4	6.5±0.5
	中剂量组	419.8±29.1	52.5±4.5	11.0±0.5	6.6±0.5
	高剂量组	397.7±51.8	51.2±5.4	10.8±0.6	6.4±0.6

注：与对照组比较，* P<0.05 ** P<0.01.

2.4 病理学检查

亲代及子代雌、雄动物大体解剖观察和脏器的病理组织学检查未见有毒理学意义的改变。

3 讨论

本试验结果表明，在 ES生物烯丙菊酯原药实验剂量达到 70 mg/ (kg·d) 时对亲代、子代大鼠的交配成功率、受孕率、活产率、出生存活率及哺育成活率等繁殖发育功能未造成明显影响。在实验期间观察到雌雄动物出现震颤、流涎中毒表现，少数动物死亡，表明实验在 70 mg/ (kg·d) 的设计剂量

下引起了亲代中毒，在这样高的剂量下得出对生殖系统无毒性作用的结论是可靠的。本试验得到的对生殖机能和子代发育的 NOAEL 为 70 mg/ (kg·d)，这与美国 EPA^[4]报道的大鼠两代繁殖毒性试验的 NOAEL 为 50.4 mg/ (kg·d) 接近。众所周知，拟除虫菊酯类农药毒性作用的靶器官是神经系统，其机制是通过延迟神经膜钠离子通道的关闭，使神经细胞处于去极化状态而兴奋性增高，动物出现兴奋、步态蹒跚、抽搐、震颤和流涎等^[5]，本研究也证实了这一毒性作用。值得注意的是本研究中亲代高剂量组雄性大鼠血红蛋白含量和雌性大鼠中、高剂量组红细胞计数以及子一代雄性大鼠高剂量组的红细胞计数与对照组比较差异均有统计学意义，提示大鼠在亚慢性接触情况下可能会对血液的红细胞系造成危害^[6]。

曾有报道，烯丙菊酯原药可引起子代行为改变^[3]。可见，要阐明 ES生物烯丙菊酯原药的安全性，还需要作进一步研究。

参考文献：

[1] 中国农业百科全书编辑部. 中国农业百科全书, 农业卷 [M]. 北京: 农业出版社, 1993 26-27

[2] 谢广云, 崔涛, 孙金秀, 等. ES生物烯丙菊酯大鼠致畸毒性试验研究 [J]. 中华卫生监督与健康杂志, 2005 (4): 12-13

[3] Eriksson P, Fredriksson A. Neurotoxic effects of two different pyrethroids: bioallethrin and deltamethrin on immature and adult mice: changes in behavioral and muscarinic receptor variables [J]. Toxicol Appl Pharmacol 1991, 108 (1): 78-85.

[4] US EPA esbiothrin pesticide Petition Filing [Z]. Federal Register October 15 1999 164 (199): 55914-55921

[5] IPCS Environmental Health Criteria 87 Allethrins Allethrin d-Allethrin B ioallethrin SB ioallethrin [M]. Geneva: WHO 1989 39-45

[6] 黄建勋, 李红艳, 梁丽燕, 等. 右旋反式烯丙菊酯慢性经口毒性实验研究 [J]. 中国职业医学, 2003 30 (4): 9-11

甲醛对淋巴细胞亚型影响及机制研究

Study on effect of fom aldehyde on subtype of lymphocyte and its mechanism

翟玲玲¹, 徐兆发¹, 赵剑²

ZHAILING ling, XU Zhao fa, ZHAO Jian

(1 中国医科大学公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110004; 2 沈阳药科大学 GLP中心, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 采用脾细胞体外研究方法, 用流式细胞仪法进行小鼠淋巴细胞亚型、细胞凋亡及细胞周期的检测。结果显示, 随着甲醛浓度的升高, CD₄⁺CD₈⁺ 细胞百分数呈先降低再升高的趋势, 与对照组比较差异无统计学意义; 细胞亚群 CD₄⁺CD₈⁺ 细胞百分数下调; 20、100 和 500 μmol/L 剂量组细胞凋亡发生率显著高于对照组; 与对照组相比, 500 μmol/L 组 G₀/G₁ 细胞明显减少, S 期细胞明显增多, 而 G₂/M 期细

胞基本不变。提示甲醛可能通过 G₂/M 期细胞周期阻滞引起脾细胞 CD₈⁺T 亚群凋亡的增加, 进而影响细胞的免疫功能。

关键词: 体外实验; 甲醛; 细胞凋亡; 细胞周期

中图分类号: R994.6 **文献标识码:** B

文章编号: 1002—221X(2011)01—0044—03

甲醛导致的免疫系统损伤和功能障碍, 可以在临床上引起多种免疫相关的疾病。有研究发现, 接触甲醛后, 机体中 CD₄⁺、CD₈⁺ 细胞以及 CD₄⁺/CD₈⁺ 的比值均明显下降^[1]。有研究认为这些免疫损伤与免疫细胞的凋亡有关^[2], 但究竟甲醛对免疫系统影响及损伤机制如何还不是很清楚, 值得我们进

收稿日期: 2010—06—28
作者简介: 翟玲玲 (1977—), 女, 讲师, 博士在读, 从事室内空气污染对人群健康影响研究。

通讯作者: 徐兆发, E-mail: zfx@mail.cnmu.edu.cn
©1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

一步的研究。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂: 甲醛(分析纯)用双蒸水配置成 0.08 4 20 100 500 $\mu\text{mol/L}$ 浓度备用; Hanks液 (H7.2) 1640 完全培养液 (含 10% 小牛血清、青霉素 100 U/ml 链霉素 100 $\mu\text{g/ml}$); 单克隆抗小鼠 $\text{CD}_3\text{-PE}$ $\text{CD}_8\text{-FITC}$ 购自 eBioscience 公司。Annexin V-FITC 试剂盒、细胞周期试剂盒, 南京凯基公司; FACSCAN 流式细胞仪, 美国 Becton Dickinson 公司。

1.2 动物分组与染毒

实验动物: 健康成年 ICR 清洁级昆明种小鼠 15 只, 体重 (20 ± 2) g 由中国医科大学实验动物中心提供, 自由饮食进水, 自然光照。实验分组: 加终浓度分别为 0 (对照组: 加不含任何处理因素的培养液)、0.8 4 20 100 500 $\mu\text{mol/L}$ 甲醛处理细胞至实验结束。

1.3 测定指标

1.3.1 淋巴细胞亚型检测 将 PE-CP-C5.5-CD_3 抗体、 FITC-CD_8 抗体和 PE-CD_4 抗体, 加入各待测流式管, 各管加入等量细胞悬液, 10^6 细胞混匀。在冰箱 (4°C) 中避光培养 20 min 各管加入 2 ml staining buffer 1 000 r/min 4°C 离心 5 min 弃上清, 将细胞团块弹开, 采用流式细胞仪进行检测。流式细胞仪的激发波长为 488 nm 利用 FACSCellQuest 软件获取细胞, 每个样品分析 10 000 个细胞; 使用前向散射角 (FSC) 及侧向散射角 (SSC) 确定淋巴细胞群, 以阴性对照参考, 将对照管所示的非特异荧光的 99% 以上作为本底扣除, 以二维点或直方图阵图显示, 记录 CD_4^+ T 细胞、 CD_8^+ T 细胞的个数百分比。

1.3.2 细胞凋亡和细胞周期检测 按照试剂盒说明书进行操作, 用流式细胞仪进行检测。

1.4 统计方法

所有数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。实验数据采用 SPSS 13.0 进行统计处理, 组间差异采用 One-way ANOVA 分析, 之后采用 SNK 法进行两两比较, 检验水准 $\alpha = 0.05$

2 结果

2.1 甲醛体外染毒对小鼠脾 T 淋巴细胞亚型的影响

随着甲醛浓度的升高, CD_4^+ CD_8^+ 细胞百分数以先降低再升高的趋势, 呈 V 型; 细胞亚群 CD_4^+ CD_8^+ 细胞百分数下调, 与对照组比较, 500 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组 CD_4^+ CD_8^+ 细胞百分数与对照组相比减少 56.03%, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 其它各剂量组 CD_4^+ CD_8^+ 细胞百分数显著下降 ($P < 0.01$)。见图 1、2

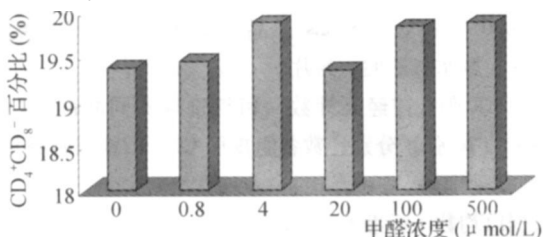
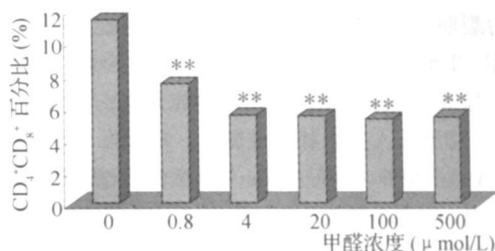


图 1 不同剂量甲醛对 CD_4^+ CD_8^+ 细胞百分数的影响。



注: 与对照组比较, * $P < 0.01$

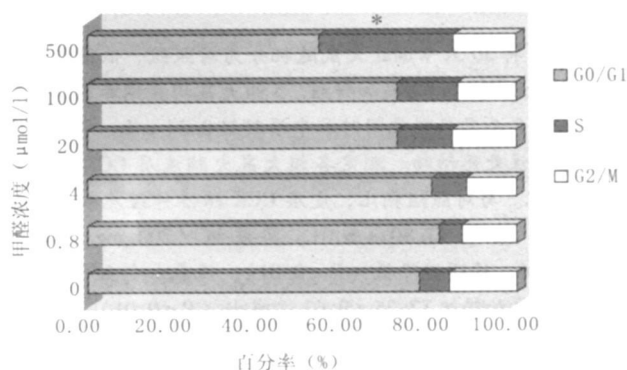
图 2 不同剂量甲醛对 CD_4^+ CD_8^+ 细胞百分数的影响

2.2 甲醛体外染毒引起 T 淋巴细胞凋亡情况

随着甲醛浓度的增加, 各剂量组的细胞凋亡率也随之升高。0.8 4 20 100 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组细胞凋亡发生率分别为 $(10.20 \pm 5.27)\%$ 、 $(9.80 \pm 6.77)\%$ 、 $(14.29 \pm 5.94)\%$ 、 $(16.97 \pm 1.95)\%$ 、 $(19.57 \pm 5.99)\%$ 。其中 20 100 和 500 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组细胞凋亡发生率显著高于对照组 ($5.33 \pm 0.61\%$), $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$

2.3 甲醛体外染毒引起 T 淋巴细胞周期变化情况

共育 48 h 后, 与对照组相比, 500 $\mu\text{mol/L}$ 组 G0/G1 细胞明显减少, S 期细胞明显增多, 而 G2/M 期细胞基本不变, 见图 3



注: 与对照组同期比, * $P < 0.05$

图 3 甲醛体外染毒引起 T 淋巴细胞周期变化情况

3 讨论

正常情况下, T 细胞及其亚群的数目在周期组织中相对稳定。机体维持正常的免疫功能状态, 有赖于各种免疫细胞, 特别是各类 T 细胞亚群之间的相互协作或相互制约。 CD_4^+ T 和 CD_8^+ T 淋巴细胞的数目或比值发生改变 (< 1.0 或 > 2.0), 可导致免疫调节功能异常, 且其失调是许多疾病的主要特征^[3]。本实验发现随甲醛染毒剂量的升高, CD_8^+ T 细胞百分数减少, CD_4^+ T 细胞百分数变化不大, 呈现先升高后下降的趋势, 结果导致 $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 比例升高。人群调查发现长期暴露于甲醛气体可导致 CD_4^+ 和 CD_8^+ T 细胞数量明显下降, 同时 $\text{CD}_4^+/\text{CD}_8^+$ 的比值显著增大^[4]。

本次实验发现, 与对照组相比, 不同剂量甲醛实验组 G0/G1 期细胞相对减少, S 期明显相对增多, 而 G2/M 期细胞数基本不变, 由此可见不同剂量甲醛可能会诱导静止期细胞进入 DNA 复制和蛋白质合成期 (S 期), 但却不能最终使细

胞进入分裂期 (G₂/M期), 不同剂量甲醛可能具有不完全的活化作用。T细胞活化后有两种不同结果: 一是T细胞的完全活化, 导致T细胞的增殖并发挥功能效应; 另一种是不完全活化, T细胞进入无能状态或凋亡。本文发现当体外脾细胞用 ConA刺激培养时, 每个 ConA刺激组脾细胞凋亡率显著高于对照组, 说明不同剂量的甲醛促进了脾淋巴细胞的凋亡。由于脾淋巴细胞是不均一的细胞群体, 其接受活化信号刺激的应答也不相同, 本实验 CD₈⁺ 细胞百分数下降显著, 提示可能 CD₈⁺ T细胞在体外甲醛作用下凋亡数量增加。一般认为, 在体外绝大多数不成熟的 CD₄⁺/CD₈⁺ 细胞接受刺激信号后进入凋亡^[4], 是否甲醛促进了这两群细胞的凋亡, 或主要促进 CD₈⁺ 细胞凋亡, 这对T细胞研究将有重要意义。

牛磺酸锌对长期染氟大鼠皮层胆囊收缩素阳性神经元的保护作用

Protective effect of taurine zinc on cholecystokinin positive neurons
of cortex in long term fluoride exposed rat

周红军¹, 张戟风¹, 李积胜²

ZHOU Hong-jun¹, ZHANG Ji-feng¹, LI Ji-sheng²

(1. 沧州医专中医教研室, 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: 将 30 只 Wistar 大鼠随机分为对照组、低氟组、高氟组、低氟加锌组和高氟加锌组。5 组大鼠均在饲养前 5 个月单纯给氟, 5 个月后将氟同时加牛磺酸锌 0.34 g/L 喂养至第 6 个月后将灌注处死动物。测定各组大鼠大脑皮层 CCK 阳性神经元的变化。与对照组相比, 皮层 CCK 阳性神经元数低氟组 (100 mg/L NaF) 71.80 ± 6.01, 高氟组 (200 mg/L NaF) 71.20 ± 8.36 均明显降低 (P < 0.01); 低氟加锌组 78.20 ± 10.32 和高氟加锌组 77.35 ± 8.62 亦减少 (P < 0.01); 两两比较, 高氟加锌组较高氟组明显升高 (P < 0.01), 低氟加锌组较低氟组亦明显升高 (P < 0.01)。提示不同浓度染氟均能使皮层 CCK 蛋白表达减少, 且与染氟剂量成正相关; 补锌后能明显改善皮层 CCK 蛋白表达减少。

关键词: 氟化钠; 胆囊收缩素; 皮层

中图分类号: R994.6 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2011)01-0046-02

许多研究证实, 摄入过量氟可致机体多个系统损伤, 有文献报道长期摄入大剂量氟可造成动物大脑直接损伤, 包括神经细胞和神经纤维的退行性变或细胞凋亡^[1,2], 而脂质过氧化作用被普遍认为是氟中毒的重要机制之一^[3]。因此, 探讨抗氧化物质对氟中毒的影响日益受到重视。锌是机体必需的微量元素, 已有研究证实锌具有抗脂质过氧化作用^[4,5], 为了寻求拮抗氟中毒的新型锌制剂, 有效预防和治疗氟中毒, 特进行了本研究。

1 材料与方法

参考文献:

- [1] Ying Chen, Jiang Ye, Xiao Lei, Xie Hong et al. Lymphocyte subsets and sister chromatid exchanges in the students exposed to formaldehyde vapour [J]. Biomedical and Environmental Sciences 1999 12 (2): 88-94.
- [2] Sullivan H, Oh E et al. Gene expression profiling in lung tissues from rats exposed to formaldehyde [J]. Arch Toxicol 2007 81 (8): 589-597.
- [3] 龚非力. 医学免疫学 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 95-96.
- [4] Christopher A S, Gwyn T W, Rose K J et al. Antibodies to CD3/T cell receptor complex induce death by apoptosis in immature T cells in thymic cultures [J]. Nature 1989 337 (6203): 181-184.

1.1 动物分组及饲养方法

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 5 组, 每组 6 只, 即对照组, 自由饮用自来水; 低氟组, 自由饮 100 mg/L 的氟化钠 (天津市化学试剂三厂) 溶液; 高氟组, 自由饮 200 mg/L 的氟化钠溶液; 低氟加锌组和高氟加锌组均在饲养前 5 个月单纯给氟, 5 个月后将氟同时加牛磺酸锌 0.34 g/L 喂养至第 6 个月后将灌注处死动物。

1.2 实验方法

1.2.1 取材和切片 每只大鼠经 0.4% 戊巴比妥钠腹腔麻醉后, 从左心室快速依次灌注生理盐水 100 ~ 150 ml, 4℃ 的 4% 多聚甲醛 500 ml 于 30 ~ 40 min 灌毕。迅速取脑置 4℃ 的同样固定液中固定 7 ~ 9 h 后移入 20% 蔗糖浸泡 12 h 以上。恒冷箱冰冻切片 (50 μm), pH 7.4 的 0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液 (PBS) 切片, 切片进行 ABC 免疫组化反应。

1.2.2 免疫组化染色 切片移入 Triton-H₂O₂ 中 37℃、30 min 后用 PBS 漂洗, 再用 3% 正常羊血清封闭 30 min, 然后加 CCK 抗体 (1:2000 Sigma 产品) 4℃ 孵育 72 h, 漂洗后加二抗孵育 60 min, 漂洗, 然后入卵白素生物素酶复合物 (ABC Vector 公司) 孵育 60 min, 用 0.05% 二氨基联苯胺 (DAB) 0.01% H₂O₂ (Sigma 产品) 显色, 镜下控制孵育强度, 裱片、脱水、透明、封片。

1.2.3 CCK 阳性神经元计数 每组选取相同断面皮层结果清晰的脑片 20 张, 分别计数各组皮层 CCK 阳性细胞数目。

1.3 数据处理

数据以均数 ± 标准差 (x ± s) 表示, 输入 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析及两两比较 t 检验 (P = 0.05 水

收稿日期: 2010-05-06 修回日期: 2010-06-28

作者简介: 周红军 (1979-), 男, 主治医师。