

由基和脂质过氧化自由基, 从而起到保护骨组织的作用。

Blaszczayk 等人的研究表明^[2], 对氟中毒的大鼠补充 VitE 可减少骨和牙齿中氟的含量。本实验结果提示, VitE 虽然能够降低氟中毒大鼠血清氟、尿氟含量以及血清 ALP 活性, 但对全身骨骼和胫骨 BMD 并无显著影响。

将硒和 VitE 联合作用于染氟大鼠后发现, 联合用药对骨损伤的各指标均有明显变化, 表明硒和 VitE 对氟中毒大鼠骨损伤具有协同保护作用。硒除了具有抗氧化、促进蛋白质合成等作用外, 它还可调节 VitE 的吸收与利用。同样, VitE 也能减少机体对硒的需要量, 防止硒在机体内的损失和保持其活性形式^[8]。对于硒和 VitE 联合作用的分子生物学机制将是未来深入研究的方向。

参考文献:

- [1] 边建朝, 咸树梅, 叶平, 等. 硒对氟致机体损伤的保护作用及其机理研究 [J]. 地方病通报, 2004, 19 (4): 19-41.
[2] Blaszczayk I, Birkner E, Gutowska I, et al. Influence of methionine and vitamin E on fluoride concentration in bones and teeth of rats exposed to sodium fluoride in drinking water [J]. Biol Trace Elem Res,

2012, 146 (3): 335-339.

- [3] 刘秉慈, 许增禄, 缪庆, 等. 实验性氟中毒骨组织中 II 型胶原基因表达及结构的改变 [J]. 中华预防医学杂志, 2003, 37 (4): 243-245.
[4] 林少凯, 张秀慧, 秦祥慧, 等. 大豆、硒、螺旋藻对氟铝联合中毒大鼠骨损伤干预效果 [J]. 现代预防医学, 2014, 41 (14): 2588-2590.
[5] Ebesunun M O, Umahoin K O, Alonge T O, et al. Plasma homocysteine, B vitamins and bone mineral density in osteoporosis: a possible risk for bone fracture [J]. Afr J Med Sci, 2014, 43 (1): 41-47.
[6] Rocha A S, Ramos-Perez F M, Bóscolo F N, et al. Effect of sodium selenite on bone repair in tibiae of irradiated rats [J]. Braz Dent J, 2009, 20 (3): 186-190.
[7] 高彦辉, 付松波, 徐春蓓, 等. 大豆、硒对饮茶型氟中毒大鼠抗氟能力的影响和骨保护作用 [J]. 中国地方病学杂志, 2005, 24 (1): 11-13.
[8] 刘玉娥. 硒与维生素 E 的协同作用 [J]. 内蒙古地方病防治研究, 1994, 19 (3): 114-115.

壬基酚对仔鼠皮质部星形胶质细胞 GFAP 的影响

Effects of nonylphenol on GFAP in cerebral cortex astrocytes of newborn rats

俞捷¹, 汪洋², 杨雪松¹, 李克彬¹, 封校亚¹, 徐卫红¹, 许洁¹

(1. 遵义医学院公共卫生学院, 贵州 遵义 563000; 2. 重庆医科大学公共卫生学院, 重庆 400010)

摘要: 将交配成功的 31 只孕鼠根据妊娠日期分层后随机分为 4 组: 对照组, 壬基酚 (NP) 低、中、高剂量 (25、50、100 mg/kg) 染毒组; NP 暴露时间为受孕第 6 天到出生后 21 d 哺乳期结束。Real Time PCR 和免疫组织化学法检测胶质原纤维酸性蛋白 (GFAP) mRNA 和蛋白的表达, 并分析上述变化与 NP 暴露之间的关系。高剂量组 21 d、60 d 海马 GFAP mRNA 表达增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 21 d、60 d 仔鼠皮质部 GFAP mRNA 表达与 NP 暴露剂量呈正相关 ($r = 0.670, 0.588, P < 0.05$), 免疫组化切片可见仔鼠皮质部星形胶质细胞体肥大, 细胞分支增多, 染色较深, 高剂量组 GFAP 阳性细胞数与 NP 暴露剂量呈正相关 ($r = 0.624, 0.713, P < 0.05$); GFAP 光密度与 NP 暴露剂量呈正相关 ($r = 0.733, 0.679, P < 0.05$)。各暴露组 21 d 仔鼠海马 GFAP 阳性细胞数低于 60 d ($t = -5.525, P < 0.05$)。提示 NP 孕期暴露影响子代大鼠脑组织 GFAP 的表达, 且剂量越高, GFAP 表达越低。

关键词: 壬基酚 (NP); 仔鼠; 胶质原纤维酸性蛋白

中图分类号: R994.6 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2014)06-0435-03

DOI: 10.13631/j.cnki.zgggyx.2014.06.015

壬基酚 (nonylphenol, NP) 是具有雌激素样作用的环境内分泌干扰物, 我国环境中污染严重^[1]。研究表明, NP 对人和动物生长发育有一定的影响^[2,3]。本课题组前期研究发现 NP 可使成年仔鼠学习记忆能力降低, NP 所致神经毒性的机制目前尚不清楚。

胶质原纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 是星形胶质细胞的主要成分, 可作为星形胶质细胞的特异性标记物^[4,5]。研究表明, 海马内的星形胶质细胞参与了学习记忆过程^[6-8]。本研究通过建立孕哺期暴露 NP 的仔鼠模型, 观察仔鼠断乳期 (21 d) 及 60 d 时脑组织皮质部神经元细胞 GFAP 的表达, 并判断 NP 暴露剂量与 GFAP 蛋白表达的相关性, 初步探讨 NP 引起认知功能障碍的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物分组及处理 清洁级 SD 大鼠 60 只, 雌雄 (2:1) 同笼交配, 次日晨经阴道涂片检查发现精子者为受孕鼠, 将交配成功的 28 只孕鼠根据妊娠日期分层后随机分为 4 组, 即对照组和 NP 低、中、高 (50、100、200 mg/kg) 剂量染毒组, 每组 6~7 只, NP 暴露时间为受孕第 6 天到出生后 21 天哺乳期结束 (GD6~PND21), 对照组花生油灌胃。

1.1.2 试剂 NP 纯度 99% (东京化成株式会社), Trizol (美国 Invitrogen 公司), RNA 提取试剂盒 (大连宝生物公

收稿日期: 2013-12-16; 修回日期: 2014-01-30
基金项目: 国家自然科学基金 (201381360439); 贵州省教育厅青年基金 (黔教合 KY 字 [2013] 198); 贵州省教育厅大学生创新项目 (201410661011); 贵州省卫生厅基金 (gzwkj20131127); 贵州省科技厅遵义医学院联合基金重点项目 (黔科合 LH 字 [2014] 7543)
作者简介: 俞捷 (1974—), 男, 副教授, 从事环境卫生学研究。
通讯作者: 许洁, 女, 博士, 教授, E-mail: xujie360@sina.com.

司), 目的基因和内参基因前后引物混合液 (美国 Invitrogen 公司), 逆转录试剂盒 (大连宝生物公司), 引物合成 (海英俊公司), 一抗 GFAP 为兔抗鼠亲和纯化抗体和兔抗鼠 GFAP 多克隆抗体 (北京中山生物试剂制品有限公司), 二抗羊抗兔 (北京中杉金桥生物科技有限公司), DAB 显色试剂盒 (DAKO 公司)。

1.1.3 实验器材 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 BIO-RAD), RNA 逆转录仪 (德国 Eppendorf), 微型台式离心机 (日本 Sanyo 公司), Tu-4810 紫外分光光度计 (北京普析通用分析仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 RT-PCR 法检测 GFAP mRNA 表达 雄鼠 21、60 d 处死后, 冰上迅速分离取右侧皮质组织约 100 mg 剪碎后放入 Trizol 试剂中进行 RNA 的提取, 逆转录成 cDNA (宝生物逆转录试剂盒说明进行), 实时荧光定量 PCR 引物见表 1, 相对定量法进行结果分析。

表 1 Real-time PCR 的引物

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
GFAP	GCCCACCAGTAACATGCA	CAGTTGGCGCGGATAG
β -action	GCCAACACAGTGCTGTCT	AGGAGCAATGATCTTG

1.2.2 免疫组化检测 GFAP 蛋白表达 组织固定后, 石蜡包埋、切片, 梯度脱蜡至水, H₂O₂ 室温孵育 10 min, 0.01 mol/L PBS 洗 2 × 3 min; 枸橼酸缓冲液加热修复 40 min, 冷却, 0.01 mol/L PBS 洗 2 × 3 min; 滴加 1:100 稀释的 anti-GFAP 25 μ l, 37 °C 孵育 60 min, 滴加生物素标记羊抗兔 IgG, 室温 30 ~ 60 min; 0.01 mol/L PBS 洗 3 × 5 min, DAB 显色液染色约 5 min, 0.01 mol/L PBS 洗 3 × 2 min, 蒸馏水洗; 梯度乙醇脱水, 中性树脂胶封片。

1.2.3 免疫组化图像分析及处理 每张大鼠脑切片在皮质和海马区随机挑选 3 个 200 倍视野进行拍照。应用 Image-Pro Plus6.0 软件对照片进行分析得出阳性细胞数和累积光密度值 (integral optical density, IOD)。IOD 值越大, 阳性表达越强。

1.3 统计学分析

用 SPSS13.0 统计软件录入数据。采用单因素方差分析做差异比较, 有差异者进一步进行 LSD 两两比较, 采用 pearson 相关分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 GFAP mRNA 表达的 PCR 观察

高剂量染毒组 21 d、60 d 海马 GFAP mRNA 表达增加, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 仔鼠皮质部位 GFAP mRNA 表达与 NP 暴露剂量呈正相关 ($r = 0.670$ 、 0.588 , $P < 0.05$)。见表 2。

2.2 GFAP 蛋白表达的变化

中、高剂量染毒组 21 d、60 d 仔鼠皮质部星形胶质阳性细胞数量增加, 皮质部可见星形胶质细胞数多而密集, 胞体增大, 细胞突起粗长而多, 且突起彼此交叉相连。随着给药剂量和给药时间的增加, GFAP 免疫反应阳性细胞数目逐渐增多, 呈棕黄色染色, 着色部位在胞浆, 形态为典型的蜘蛛状,

见图 1、2 (封三)。

表 2 各组仔鼠脑组织 GFAP mRNA 表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别	21 d	60 d
对照组	4.16 ± 1.15	5.66 ± 1.10
低剂量染毒组	4.16 ± 1.97	6.84 ± 2.64
中剂量染毒组	5.71 ± 2.71	7.72 ± 0.85
高剂量染毒组	8.66 ± 2.39*	10.42 ± 2.44*
F 值	4.917	5.490
P 值	0.013	0.009

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

2.3 免疫组化图像分析

21 d、60 d 高剂量染毒组仔鼠皮质部位 GFAP 免疫反应阳性细胞平均数目、积分光密度高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); GFAP 阳性细胞数与 NP 暴露剂量呈正相关 ($r = 0.624$ 、 0.713 , $P < 0.05$); GFAP 光密度与 NP 暴露剂量呈正相关 ($r = 0.733$ 、 0.679 , $P < 0.05$)。各染毒剂量组 21 d 仔鼠皮质 GFAP 阳性细胞数低于 60 d ($t = -2.918$, $P < 0.05$), 见表 3。

表 3 各组仔鼠皮质 GFAP 蛋白表达分析

组别	阳性细胞数		积分光密度	
	21 d	60 d	21 d	60 d
对照组	13.12 ± 2.10	14.87 ± 4.05	142.75 ± 26.14	159.37 ± 26.07
低剂量染毒组	13.25 ± 2.81	14.37 ± 2.61	152.25 ± 32.04	171.75 ± 27.75
中剂量染毒组	15.75 ± 3.05	19.75 ± 1.58**	180.75 ± 31.72	183.12 ± 52.28
高剂量染毒组	19.37 ± 4.53**	22.50 ± 3.42**	225.75 ± 34.97**	249.62 ± 39.48**
F 值	6.493	13.141	11.275	9.045
P 值	0.002	0.001	0.001	0.001

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

GFAP 是星形胶质细胞的主要成分, 通过检测 GFAP 表达的变化, 可在一定程度上反映胶质细胞对外界刺激的反应。研究表明, 雌激素和环境雌激素样的化学物质可影响星形胶质细胞的生长和形态。Amateau 也报道^[9], 给予雌激素的新生大鼠, 视前区的星形胶质细胞的数量显著增加。星形胶质细胞在脑损伤中具有双重作用, 星形胶质细胞与神经元的联系及相互影响极其复杂, 因此, 不管是 NP 引起星形胶质细胞阳性表达升高还是降低, 很可能都会引发中枢神经系统的功能变化。

本实验结果显示, 仔鼠出生后 21 d 和 60 d, 高剂量染毒组 GFAP 蛋白表达阳性的细胞数量增多, 星形胶质细胞分支增多, 同时 GFAP mRNA 表达量增强, GFAP mRNA 表达量与 NP 剂量呈正相关。当暴露 NP 导致的星形胶质细胞数量急剧增多时, 在脑内占据了更大的空间, 一方面会影响星形胶质细胞的正常功能, 另一方面增生的星形胶质细胞会干扰神经元之间、神经元与星形胶质细胞之间的正常联系, 影响神经递质的释放, 使信号传递效率降低, 导致神经系统功能紊乱。各染毒组 60 d 仔鼠海马和皮质 GFAP 阳性细胞数高于 21 d 仔鼠, 说明尽管断乳期停止暴露 NP, 但 NP 对子代脑组织的影响仍然存在, 而且成熟期相对断乳期而言, 皮质中星形胶质细胞数量增多, 体积增大。NP 对胶质细胞的损伤作用是不可

逆转的, 极有可能是 NP 从孕期到哺乳期连续暴露, 在脑组织中蓄积引起。胶质细胞增生会形成神经胶质疤痕, 进而损害突触的可塑性, 也会有碍于神经元正常功能的发挥, 导致神经元功能持续异常, 进一步影响信息储存和记忆形成。

参考文献:

- [1] Jie X, Jianmei L, Zheng F, *et al.* Neurotoxic effects of nonylphenol: a review [J]. *Wien Klin Wochenschr*, 2013, 125 (3-4): 61-70.
- [2] Kim S K, Kim B K, Shim J K, *et al.* Nonylphenol and octylphenol-induced apoptosis in human embryonic stem cells is related to Fas-Fas ligand pathway [J]. *Toxicol Sci*, 2006, 9 (19): 1832-1835.
- [3] Zha J, Wang Z, Wang N, *et al.* Histological alternation and vitellogenin induction in adult rare minnow after exposure to ethynylestradiol and nonylphenol [J]. *Chemosphere*, 2006, 7(14): 1079-1081.
- [4] Eng L F. Regulation of Glial Intermediate Filaments in Astrogliosis. *The Biochemical Pathology of Astrocytes* [M]. New York: Liss, 1988: 79-90.

- [5] Janeczko K. Co-expression of GFAP and vimentin in astrocytes proliferating in response to injury in the mouse cerebral hemisphere. A combined autoradiographic and double immunocytochemical study [J]. *Int J Dev Neurosci*, 1993, 11 (2): 139-147.
- [6] De Keyser J, Mostert J P, Koch M W, *et al.* Dysfunctional astrocytes as keyplayers in the pathogenesis of central nervous system disorders [J]. *J Neurol Sci*, 2008, 267 (1-2): 163-166.
- [7] Van Den Bosch L, Robberecht W. Crosstalk between astrocytes and motoneurons: What is the message? [J]. *Exp Neurol*, 2008, 26 (12): 18-22.
- [8] Mong J A, Kurzweil R L, Davis A M. Evidence for sexual differentiation of glia in rat brain [J]. *Hormones and Behavior*, 1996, 30 (4): 553-562.
- [9] Amateau S K, McCarthy M. Sexual differentiation of astrocyte morphology in the developing rat preoptic area [J]. *Journal of Neuroendocrinology*, 2002, 14 (11): 904-910.

视频显示终端工作人员干眼症的防护

胡艳

(辽宁省核工业二四六医院, 辽宁 兴城 125100)

随着高科技视频产品的流行, 干眼症发病率逐年升高, 且日趋年轻化, 视频显示终端 (VDT) 工作人员干眼症问题已引起专家学者的广泛关注。现就 132 名 VDT 作业者干眼症的防护分析如下。

1 对象与方法

1.1 对象

从 2010—2013 年我院眼科门诊接诊病例中筛选出视频显示终端工作 2 年以上、每天工作 5 h 以上人员 132 名 (264 只眼), 其中男性 50 人、女性 82 人, 年龄 25 ~ 45 岁、平均 29.5 岁。排除眼部其它疾病史、手术史, 以及导致干眼的全身性疾病及用药史。

1.2 方法

将 132 人随机分成干预组和未干预组, 每组均为 66 例。干预组给予滴眼液点眼、中药润燥明目代茶饮并进行用眼保健教育。未干预组不做任何防护。12 个月后两组同时进行问卷调查、泪液分泌试验 (Schirmer 试验)、裂隙灯、泪膜破裂时间 (BUT) 检查。

1.3 诊断标准

(1) 主观症状 (具有一项以上的为阳性): 干燥感、异物感、烧灼感、视疲劳、畏光、疼痛、流泪、视物模糊、眼红; (2) 泪膜不稳定: 泪膜破裂时间 ≤ 5 s 或 ≤ 10 s; (3) 泪液减少: 泪液分泌试验 (SIt) ≤ 10 mm/5 min 排除其他原因的同时, 具有 (1) + (2) (≤ 5 s) 或 (1) + (2) (≤ 10 s) + (3) 即可诊断为干眼症。

2 结果

2.1 问卷调查

未干预组 66 人中正常 4 人, 评分为 1 ~ 7 分 6 人、8 ~ 14 分 36 人, 15 ~ 21 分 20 人。干预组正常 14 人, 评分 1 ~ 7 分 36 人、8 ~ 14 分 14 人, 15 ~ 21 分 2 人。

2.2 Schirmer I 试验

一般认为, 泪液分泌试验 ≥ 10 mm/5 min 为正常, < 10 mm/5 min 为低分泌。本次未干预组和干预组 SIt ≤ 10 mm/5 min 的分别为 20 例和 2 例。

2.3 泪膜破裂时间

BUT < 10 s 为泪膜不稳定。未干预组 BUT ≤ 5 s 18 例、 ≤ 10 s 2 例; 干预组 BUT ≤ 5 s 和 ≤ 10 s 的各 1 例。

3 讨论

3.1 角结膜干燥症 (keratoconjunctivitis sicca) 又称干眼症 (dry eye)。目前多数学者认为患者干眼症状为一过性, 经过休息或短暂应用人工泪液可恢复正常, 通过积极的防护能有效控制。本文研究表明, 长期从事 VDT 作业人员干眼症发病率可达 30.3%, 经过防护干预后干眼症发病率为 3.03%。

3.2 防护措施

3.2.1 健康教育, 普及用眼知识 (1) 使用电脑时尽可能把字号放大, 字体放粗, 显示屏亮度适宜。(2) 工作 1 h 休息 10 min, 缓解眼肌痉挛紧张和疲劳。(3) 显示器的注视角在水平线 14° 以上, 眼与屏幕的距离至少 25 英寸; 显示器后倾一定角度; 键盘应摆在靠近屏幕位置, 使眼球暴露面积较小, 同时应用视保屏, 减少光反射。(4) 环境要舒适, 光线柔和, 通风良好, 适度的湿度, 减少眼表泪液蒸发。(5) 配戴合适的眼镜, 应根据操作者使用视频工作距离及习惯配镜, 尽量不戴角膜接触镜。

3.2.2 点用不含防腐剂的的人工泪液。近年研究发现海藻糖滴眼剂对中、重度干眼症有明显疗效。

3.2.3 饮用润燥明目代茶饮同时熏蒸。润燥明目代茶饮以养阴生津、清肝明目的石斛为君药, 佐以生地、女贞子、决明子、葛根, 研磨成粉状装入茶袋中, 茶袋外配菊花、枸杞子。菊花善于疏风清热、清肝泻火, 兼益阴明目。

碲化镉量子点对小鼠肾脏的氧化损伤作用 (正文见403~405页)

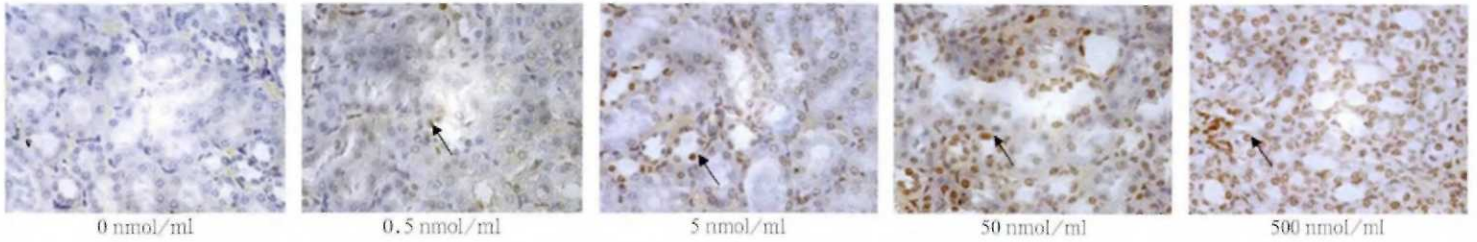


图1 小鼠肾细胞8-OHdG免疫组化检查结果(×400)

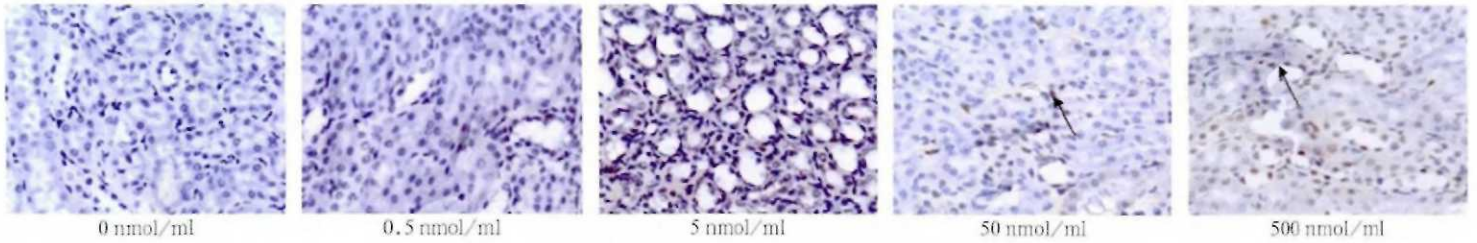


图2 小鼠肾细胞凋亡检查结果(×400)

壬基酚对仔鼠皮质部星形胶质细胞GFAP的影响 (正文见435~437页)

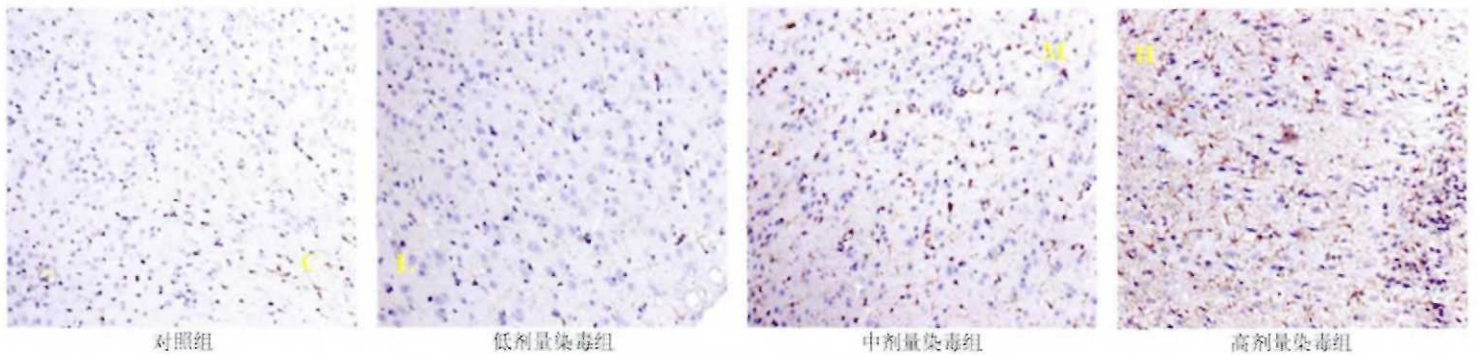


图1 各实验组21 d仔鼠皮质GFAP蛋白表达(×200)

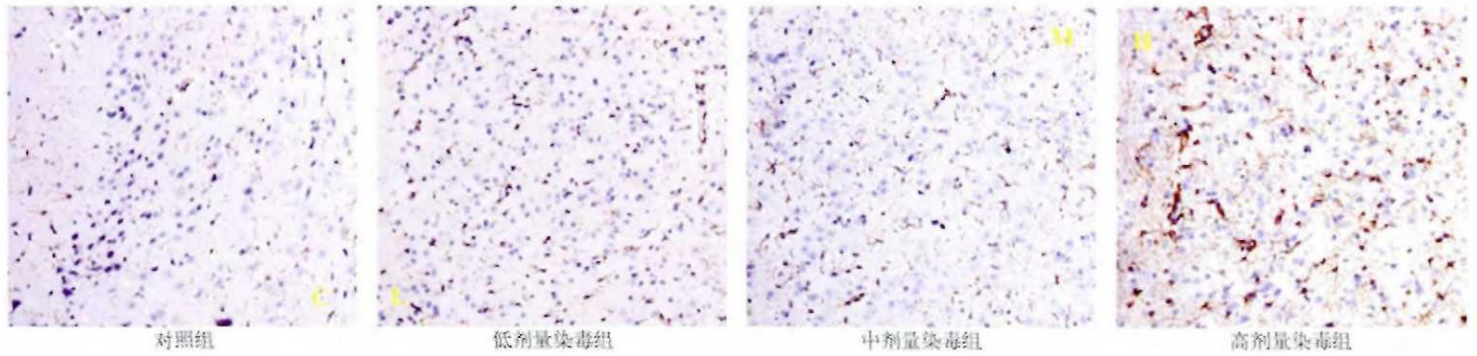


图2 各实验组60 d仔鼠皮质GFAP蛋白表达(×200)

基于MCSim软件的苯职业暴露健康风险分析方法及应用 (正文见438~440页)

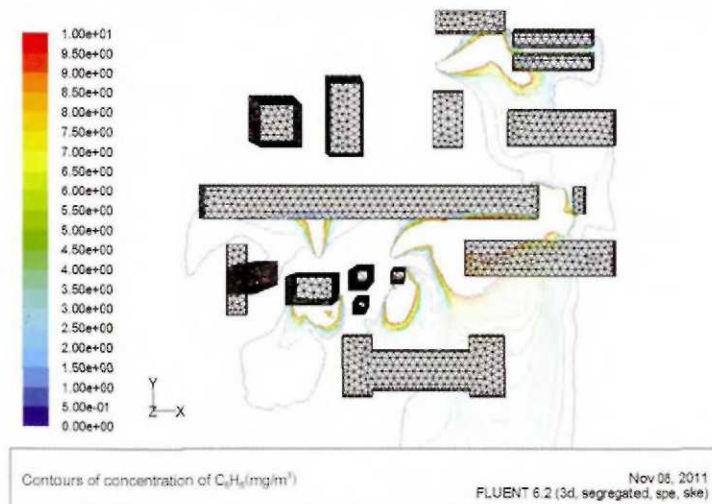


图1 8个点跑冒滴漏情况下装置区内的苯浓度场分布

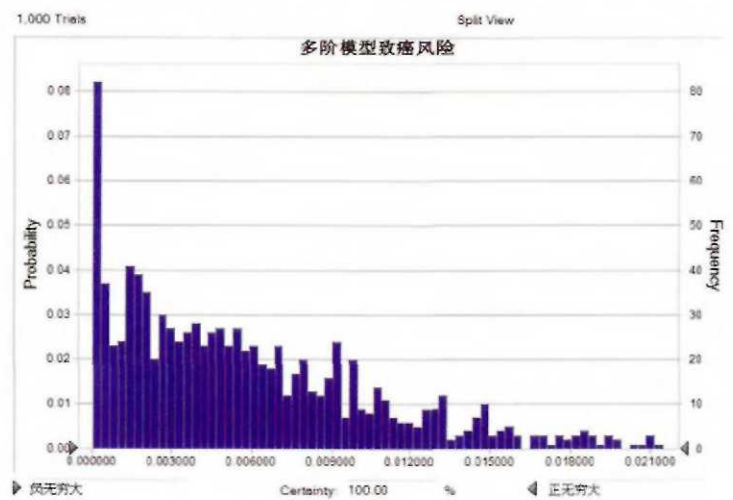


图4 多阶模型方法致癌风险分布频率