

0.02<0.05)。

表 1 uPA、PAI-1 蛋白表达显色指数的比较 ($\bar{x}\pm s$)

分组	lg (uPA+1)	lg (PAI-1+1)
对照组	0.43±0.15	0.46±0.14
染尘 1d	0.47±0.10	0.51±0.12
染尘 3d	0.78±0.26*	0.57±0.19*
染尘 7d	0.89±0.21*	0.62±0.23*
染尘 14d	0.68±0.20*	0.82±0.23**
染尘 28d	0.64±0.16*	0.90±0.22**

注：与对照组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。uPA、PAI-1 方差参差不齐，进行对数转换后资料符合统计要求。

3 讨论

uPA 是一种丝氨酸蛋白酶，能催化无活性的纤溶酶原转化为纤溶酶，体内多种细胞可合成。活化的 uPA 主要作用于细胞迁移和组织修复，介导细胞周围基质蛋白的降解^[3]。

纤溶酶原激活物抑制剂 (PAI) 是纤溶系统的重要组成部分，是纤溶酶原活化系统 (PAs) 的重要调节物。其中 PAI-1 是主要的特异性抑制物，PAI-1 与纤溶酶原激活物 (PA) 的反应中结合形成可逆的复合物或两者共价形成不可逆的复合物，从而使 PA 失活。

本实验结果显示，矽肺模型组 uPA 的阳性表达较对照组明显增多，尤其在早期，主要分布在中性粒细胞及肺泡巨噬细胞中。因矽肺早期主要表现为炎性细胞浸润、增多，而纤维化较轻；随着时间推移，uPA 的阳性表达逐渐减少，但在

第 4 周时仍较对照组明显，以肺组织结节内阳性表达为主，此时肺组织纤维化明显加重。矽肺模型组 PAI-1 的表达自染尘起逐渐增多，持续增强至第 4 周。uPA、PAI-1 表达经相关性检验呈正相关关系。其机制可能是在纤维化的早期阶段，uPA 表达升高有利于降解 ECM，缓解肺组织纤维化；而到了后期阶段，PAI-1 的升高抵消了由 uPA 升高引起的基质降解，从而使 ECM 增多，促进了肺纤维化的发生、发展。

尘肺造成的肺纤维化严重影响肺功能，因此对肺纤维化的病理过程的深入研究可为临床治疗及改善肺功能提供理论依据。PAI-1 和 uPA 在肺纤维化中的作用越来越受到人们的重视，uPA 的缺失或 PAI-1 的过度表达与肺纤维化的发病密切相关。uPA 诱导的纤溶系统的活化在肺纤维化中发挥作用，对 uPA/PAI-1 在肺纤维化中作用的深入研究，阻断或增强相应基因的表达可为将来治疗肺纤维化提供新的策略。

参考文献：

[1] 李才. 器官纤维化基础与临床 [M]. 北京：人民卫生出版社，2003：225-226.

[2] Knaapen A M C, Albrecht A, Becker D, *et al.* DNA damage in lung epithelial cells isolated from rats exposed to quartz: role of surface reactivity and neutrophilic inflammation [J]. Carcinogenesis, 2002, 23 (7): 1111-1120.

[3] Fubini B A, Hubbard. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis [J]. Free Radic Biol Med, 2003, 34 (12): 1507-1516.

氟对链脲佐菌素诱导的 2 型糖尿病大鼠肝脏氧化应激水平的影响

Effect of fluoride on oxidative stress in liver of rats with type 2 diabetes mellitus induced by streptozotocin

许金秀，付冬霞，王光亚，郭宁宁，张云娜
(沧州市中心医院内分泌二科，河北 沧州 061001)

摘要：将 45 只 Wistar 大鼠随机分为对照组、低氟组和高氟组，每组 15 只。对照组大鼠给予高脂饮食 4 周，一次性腹腔注射 50 mg/kg 的链脲佐菌素 (STZ)，复制 2 型糖尿病 (T₂DM) 大鼠模型，继续喂养 12 周，每天灌胃 0.1 ml/kg 生理盐水。低氟、高氟组大鼠每天分别灌胃给予 10 mg/kg、20 mg/kg 含氟水，连续 16 周，其余措施同对照组。比较三组大鼠肝脏组织匀浆中氧化应激指标丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 及总抗氧化能力 (T-AOC) 的变化。结果显示，低氟组和高氟组肝组织匀浆 MDA、NO 均明显高于对照组 ($P<0.05$)，SOD、CAT、GSH 及 T-AOC 均明显低于对照组 ($P<0.05$)；而以高氟组更加明显，与低氟组比较，差异也有统计学意义 ($P<0.05$)。提示氟能增加 STZ 诱导的 T₂DM 大鼠肝脏氧化应激损伤，降低肝脏抗氧化因子水平。

关键词：氟；2 型糖尿病；大鼠；氧化应激
中图分类号：R599.9 **文献标识码：**B
文章编号：1002-221X(2015)01-0039-03
DOI:10.13631/j.cnki.zggyyx.2015.01.017

有研究显示，高剂量氟可加剧糖尿病引起的大鼠体重质量下降和血糖升高，明显降低大鼠胰岛素敏感性^[1]。但目前尚无氟对糖尿病大鼠肝脏氧化应激作用的报道。本研究通过复制 2 型糖尿病 (T₂DM) 大鼠模型，观察氟对链脲佐菌素 (STZ) 诱导的 T₂DM 大鼠肝脏氧化应激指标的影响，以期对氟对糖尿病机体非骨相损害的研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

氟化钠 (NaF)，分析纯，北京化工厂出品；STZ 购自美国 Sigma 公司；丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、还原型谷胱甘肽 (GSH) 及总抗氧化能力 (T-AOC) 试剂盒购自南京建成生物科技有限公司。UV-1200 型紫外可见分光光度计，美析中国

仪器有限责任公司; HH-W420 型恒温水浴锅, 常州普天仪器制造有限公司; TG16-WS 型台式高速离心机, 上海耶茂仪器仪表有限公司。

1.2 实验动物分组

清洁级 Wistar 大鼠 45 只, 雄性, 体重 220~250 g, 河北医科大学实验动物中心提供, 饲养于 12 h 明暗交替, 室温 18~23℃ 洁净动物房内。随机分为三组, 每组 15 只。对照组大鼠普通饲料适应性喂养 1 周, 改为高脂饲料 (总热量 4.9 kcal/g, 蛋白质 20%, 碳水化合物 35%, 脂肪 45%, 蛋氨酸 1%) 4 周; 禁食 12 h, 一次性腹腔内注射 50 mg/kg STZ (现用现配, 溶于 0.1 mmol/L 柠檬酸缓冲液, pH4.5), 复制 T₂DM 大鼠模型 [造模成功标准为连续 2 次空腹血糖 ≥ 11.1 mmol/L, 查尿糖 (++) 以上, 胰岛素敏感指数降低, 且有多饮、多尿、多食现象^[2]]; 继续高脂饲料喂养 12 周, 每天灌胃给予 0.1 ml/kg 生理盐水。低氟组、高氟组大鼠饲养及造模方法同对照组, 每天分别灌胃给予 10 mg/kg、20 mg/kg 含氟水 (氟化钠浓度为 2.21 g/L)。

1.3 制备组织匀浆

干预结束后处死大鼠, 取出肝脏, 用 D-Hanks 液洗涤 2~3 次, 洗去血液, 沥干水分称重。将肝脏剪成 1.0 g 的小组织块, 用锡箔纸包裹分装, 置于 -70℃ 的低温冰箱冷冻保存。测试前自冰箱取出肝组织小块置于研钵中, 往研钵中加少许液氮, 将肝组织研碎, 注意防止组织溅出。充分研磨后, 肝组织转移至玻璃匀浆器中, 按质量、体积 1 : 9 的比例用生理盐水在冰浴下制成组织匀浆。考马斯亮蓝法测定蛋白浓度。

1.4 指标测定

采用硫代巴比妥酸 (TBA) 法测定各组大鼠肝脏中 MDA 含量, 硝酸还原酶法测定 NO 的含量, 黄嘌呤氧化酶法检测肝组织匀浆中 SOD 活力, 比色法测定 T-AOC、GSH、CAT 活力。所有检测均同批一次检测, 步骤严格按说明书进行。

1.5 统计学分析

采用 SPSS18.0 统计软件分析数据, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多个样本均数比较用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 及两两比较 *q* 检验; 以 *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肝组织匀浆 MDA、NO 及 T-AOC 的变化

低氟组和高氟组大鼠肝组织匀浆 MDA 和 NO 均明显高于对照组 (*P* < 0.05), T-AOC 则明显低于对照组 (*P* < 0.05); 与低氟组比较, 高氟组肝组织匀浆各指标变化更加显著 (*P* < 0.05)。详见表 1。

表 1 各组大鼠肝组织匀浆 MDA、NO 及 T-AOC 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	MDA (nmol/mg prot)	NO (μmol/g prot)	T-AOC (U/mg prot)
对照组	15	2.31 ± 0.15	6.35 ± 0.76	2.84 ± 0.06
低氟组	15	2.87 ± 0.13 [▲]	10.22 ± 1.15 [▲]	2.51 ± 0.03 [▲]
高氟组	15	3.24 ± 0.17 ^{▲#}	17.53 ± 1.69 ^{▲#}	2.17 ± 0.05 ^{▲#}

注: 与对照组比较, [▲]*P* < 0.05, ^{▲▲}*P* < 0.01; 与低氟组比较, [#]*P* < 0.05。

2.2 大鼠肝组织匀浆 SOD、GSH 及 CAT 的变化

低氟组和高氟组大鼠肝组织匀浆 SOD、GSH、及 CAT 均显著低于对照组 (*P* < 0.05); 高氟组肝组织匀浆 SOD、GSH、及 CAT 活力均低于低氟组 (*P* < 0.05)。详见表 2。

表 2 各组大鼠肝组织匀浆 SOD、GSH 及 CAT 的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	SOD (U/mg prot)	GSH (mg/mg prot)	CAT (U/mg prot)
对照组	15	452.30 ± 12.45	23.65 ± 1.01	15.60 ± 0.81
低氟组	15	413.72 ± 11.94 [▲]	19.25 ± 0.95 [▲]	13.75 ± 0.73 [▲]
高氟组	15	384.31 ± 11.06 ^{▲#}	15.34 ± 0.87 ^{▲#}	10.46 ± 0.69 ^{▲#}

注: 与对照组比较, [▲]*P* < 0.05; 与低氟组比较, [#]*P* < 0.05。

3 讨论

近年研究发现, 糖尿病动物及人体有明显的氧化损伤和自由基介导的过氧化作用^[3]。T₂DM 是一种以氧化应激为特征的疾病, 其线粒体氧化磷酸化能力受到损害, 只有正常人的 55.0%^[4]。T₂DM 肝脏受累的主要病变是脂肪肝, 其标准死亡率远高于其他并发症^[5]。氧化应激不仅直接损害肝细胞, 而且诱导炎症浸润, 激活肝星形细胞, 最终促进肝纤维化^[6]。

氟是地壳中较为丰富的元素, 氟通过促进自由基产生, 抑制抗氧化酶类活力, 导致脂质过氧化作用增强。在正常情况下, 动物体内存在一套有效的抗氧化防御系统如 SOD、GSH 等, 但病理情况下, 机体产生的自由基超过清除能力, 加重疾病的进展^[7]。本研究观察氟对 STZ 诱导的 T₂DM 大鼠肝组织氧化应激水平的影响, 结果显示: (1) 低氟组和高氟组大鼠肝组织匀浆 MDA 和 NO 均明显增高, 高氟组尤其显著。原因为 T₂DM 机体本身处于氧化应激状态, MDA 作为脂质过氧化的标志物, 其含量随之升高。高血糖可诱导肝细胞表达 iNOS, 而氟中毒进一步加重肝脏的氧化应激损伤, 产生大量的 NO^[8]。(2) 低氟组和高氟组大鼠肝组织匀浆 T-AOC、SOD、GSH 及 CAT 均降低, 而以高氟组为甚。提示氟能够降低 T₂DM 大鼠肝脏的抗氧化应激指标, 削弱其抗氧化能力。已有证据表明, T₂DM 大鼠机体处于氧化应激状态, 氧化应激不仅损伤胰岛 β 细胞, 而且损伤肝功能^[9]; 氟通过降低肝脏抗氧化应激指标, 进一步加剧肝脏的氧化-抗氧化失衡, 增加了肝脏的氧化应激损伤。

综上所述, 氟能增加 STZ 诱导的 T₂DM 大鼠肝脏氧化应激损伤, 降低肝脏抗氧化因子水平, 加重 T₂DM 大鼠肝脏氧化应激损伤, 但其具体作用机制尚有待进一步深入研究。

参考文献:

[1] 李凤, 刘佰纯, 吕鹏, 等. 氟对链脲佐菌素诱导的 1 型糖尿病大鼠的毒性作用及其对糖尿病进程的影响 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2014, 40 (1): 55-59.

[2] George N, Kumar T P, Antony S, *et al.* Effect of vitamin D3 in reducing metabolic and oxidative stress in the liver of streptozotocin induced diabetic rats [J]. Br J Nutr, 2012, 108 (8): 1410-1418.

[3] Schmatz R, Perreira L B, Stefanello N, *et al.* Effects of resveratrol on bimoarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Biochimie, 2012, 94 (2): 374-383.

- [4] 徐文, 海春旭, 杨晨, 等. CLA 对 2 型糖尿病大鼠肝脏线粒体呼吸链酶活性及氧化应激的影响 [J]. 第四军医大学学报, 2005, 26 (23): 2138-2141.
- [5] Tahara A, Kurosaki E, Yokono M, *et al.* Effects of sodium-glucose cotransporter 2 selective inhibitor ipragliflozin on hyperglycaemia, oxidative stress, inflammation and liver injury in streptozotocin-induced type 1 diabetic rats [J]. J Pharm Pharmacol, 2014, 66 (7): 975-987.
- [6] 马山, 崔荣军. 翻白草对 2 型糖尿病肝脏大鼠氧化应激的实验性研究 [J]. 牡丹江医学院学报, 2008, 29 (4): 7-9.

- [7] 孙玉敏, 陈树君, 杨扬, 等. 慢性氟中毒大鼠血清总抗氧化能力与一氧化氮水平的变化 [J]. 中国工业医学杂志, 2009, 22 (6): 445-446.
- [8] 陈树君, 孙玉敏, 孟羽俊, 等. 慢性氟中毒对雄性大鼠肝脏的损伤及其抗氧化能力的影响 [J]. 环境与健康杂志, 2008, 25 (8): 714-715.
- [9] Romagnoli M, Gomez-Cabrera M C, Perrelli M G, *et al.* Xanthine oxidase-induced oxidative stress causes activation of NF-kappaB and inflammation in the liver of type I diabetic rats [J]. Free Radic Biol Med, 2010, 49 (2): 171-177.

2,4-二硝基苯甲醚的致突变性研究

Study on the mutagenicity of 2,4-dinitroanisole

卢青¹, 王鸿¹, 张盼红¹, 高俊宏¹, 刘志永¹, 岳红¹, 王延琦¹, 周群²

(1. 兵器工业卫生研究所, 陕西 西安 710065; 2. 西安近代化学研究所, 陕西 西安 710065)

摘要: 采用卫生部《化学品毒性技术鉴定规范》中试验方法对 2,4-二硝基苯甲醚 (DNAN) 的致突变性进行研究。Ames 试验结果显示, DNAN 在每皿 200~2500 μg 剂量范围引起 T98 菌株 (加 S_0) 回变菌落数增加 ($P<0.05$), 且超过溶剂对照菌落数的 2 倍, 存在剂量-效应关系; 微核试验结果显示, DNAN 在 6~22 mg/kg 剂量范围内不引起小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率增加。提示 DNAN 在 Ames 试验中有致突变作用, 但在小鼠体内试验中未发现致突变作用, 为可疑诱变剂。

关键词: 2,4-二硝基苯甲醚 (DNAN); 致突变性

中图分类号: R994.6 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X (2015)01-0041-02

DOI: 10.13631/j.cnki.zgggxyx.2015.01.018

DNAN 是一种熔铸不敏感载体炸药^[1], 因其感度低、溶解性好等特性, 已成为 TNT 最有前景的替代物^[2]。本文采用卫生部《化学品毒性鉴定技术规范》^[3] 中鼠伤寒沙门杆菌回复突变试验 (Ames)、体内哺乳动物骨髓细胞嗜多染红细胞微核试验方法对 DNAN 的致突变性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

DNAN 为无色或淡黄色晶体, 微溶于水, 纯度 95%, 由西安近代化学研究所提供。实验动物 SPF 级 KM 小鼠, 由西安交通大学实验动物中心提供, 许可证号为 XK (陕) 2012—006。

1.2 方法

1.2.1 Ames 试验 菌株在试验前进行了生物特性鉴定, 鉴定结果为 TA97a、TA98、TA100、TA102 菌株。DNAN 采用二甲基亚砷溶解, 设每平皿 2500、1000、500、200、100 μg 共 5 个剂量组, 同时设置阳性和溶剂对照。每个剂量每个菌株各作 3 个平行皿, 在代谢活化 (加 S_0) 和非代谢活化 (不加 S_0) 两种条件下进行,

试验重复 1 次。平皿在 37℃ 培养 48 h 后人工计数回变菌落数, 并求平均值和标准差。若受试物的回变菌落数等于或大于溶剂对照回变菌落数的 2 倍, 并有剂量-反应关系判定结果为阳性。

1.2.2 微核试验 设 6、11、22 mg/kg 三个剂量组, 同时设阴性对照 (4% 淀粉溶液) 和阳性对照 (CP 30 mg/kg)。50 只健康 KM 小鼠, 体重 18~22 g, 随机分为五组, 采用 30 h 两次给药法, 第二次给药后 6 h 取材。取胸骨骨髓制片、固定、染色、阅片, 计算含有微核的嗜多染细胞数 (PCE) 及 PCE 与正染红细胞 (NCE) 的比值, 如受试物剂量组与对照组相比差异有统计学意义, 并有剂量-反应关系则可判定结果为阳性。

1.3 统计分析

应用 SPSS13.0 软件对数据进行统计分析。

2 结果

2.1 Ames 试验

在代谢活化或未代谢活化条件下, 阳性对照组各菌株的回变菌落数出现明显增多 ($P<0.01$), 说明本试验系统可靠。在加 S_0 状态下, 每皿各剂量组诱发 TA98 回变菌落数增加 ($P<0.05$), 且超过溶剂对照组菌落数 2 倍, 见表 1。说明在代谢活化条件下, DNAN 有致 TA98 菌株基因突变的作用。

2.2 微核试验

DNAN 各剂量组微核率与阴性对照组相比, 差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 2。说明在本试验条件下, DNAN 在 6~22 mg/kg 剂量范围内不引起小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率增加。

3 讨论

Dodd 等人曾用 TA98、TA100、TA102、TA1535 及 TA1537 菌株, 在代谢活化 (加 S_0) 和不活化 (不加 S_0) 的状态下检测了 DNAN 的致突变性, 结果发现 DNAN 能诱导 TA100 在未活化状态下回复突变增加^[4]。本次 Ames 试验结果表明, DNAN 在代谢活化时, 每皿 200、500、1000、2500 μg 浓度下可诱发 T98 回变菌落数增加 ($P<0.05$), 且超过溶剂对照

收稿日期: 2014-03-05; 修回日期: 2014-04-28

作者简介: 卢青 (1976—), 女, 在职硕士, 主要从事职业卫生与毒理研究。