

【论著】

乙苯亚慢性吸入染毒对大鼠肾脏氧化应激损伤
和细胞凋亡影响的研究张明¹, 张鸿¹, 王延让¹, 杨德一¹, 王倩², 李建国¹, 姜锦³, 王晓军¹

1. 天津市疾病预防控制中心职业病预防控制所 天津 300011 2. 天津市医药科学研究所 3. 天津市第一中心医院口腔科

摘要 目的 观察亚慢性吸入染毒乙苯对大鼠肾组织的氧化应激损伤和细胞凋亡的影响。方法 将 40 只健康 3 周龄 SPF 级 Sprague-Dawley 雄性大鼠随机分为 4 组, 分别为对照(新鲜空气)组和低(433.5 mg/m³)、中(4 335 mg/m³)和高(6 500 mg/m³)剂量乙苯染毒组, 每组 10 只。大鼠以笼养方式放入 HOPE-MED 8050A 型动式染毒柜内, 采用吸入方式进行染毒, 每天 6 h, 每周 5 d, 连续染毒 13 周。检测肾组织还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量以及细胞凋亡情况, 并进行病理学观察。结果 与对照组相比, 各剂量组大鼠肾组织 MDA 含量和细胞凋亡率均升高, 中、高剂量乙苯染毒组大鼠肾组织 GSH 含量均降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。且随着乙苯染毒剂量的升高, 大鼠肾组织 MDA 含量和细胞凋亡率呈上升趋势, GSH 含量呈下降趋势。乙苯染毒大鼠肾组织出现肾小管水样变性、肾小管上皮细胞肿胀、坏死等病理变化, 肾小管上皮细胞呈现染色体浓缩、核碎片等凋亡形态学特征。结论 亚慢性吸入染毒乙苯可诱导大鼠肾组织氧化应激损伤及细胞凋亡。

关键词 乙苯; 肾脏; 细胞凋亡; 氧化应激

中图分类号 R994.6 文献标志码 A 文章编号 1001-5914(2011)10-0874-03

Effects of Subchronic Inhalation of Ethylbenzene on Oxidative Stress, Cell Apoptosis in Kidney in Rats ZHANG Ming, ZHANG Hong, WANG Yan-rang, et al. *Tianjin Centers for Disease Control and Prevention, Tianjin 300011, China*
Corresponding author: WANG Yan-rang, E-mail: wangyanrang@126.com

Abstract **Objective** To investigate the effects of sub-chronic inhalation of ethylbenzene on oxidative stress and apoptosis in rat renal tissues. **Methods** Forty healthy male Sprague-Dawley rats were divided randomly into four groups: control group (C), low group (L), moderate group (M) and high group (H), and treated with ethylbenzene through inhalation daily at doses of: 0, 433.5, 4 335 and 6 500 mg/m³ respectively, 6 h per day, 5 days per week for 13 consecutive weeks. The contents of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA), and cell apoptosis in renal tissues were assayed, and histopathological examination of the kidneys was conducted. **Results** Compared with the control group, the contents of MDA and percentages of cell apoptosis in all ethylbenzene-treated groups and GSH contents in M and H groups were significantly enhanced ($P < 0.05$). With respect to the control group, significant morphological abnormality in the kidneys in ethylbenzene-treated groups characterized by hydropic degeneration in renal tubules in the form of swelling, necrosis and lysis in renal tubular epithelial cells and irregular tubular lumens, as well as apoptotic morphological changes including chromatin condensation, nuclear fragmentation were found. **Conclusion** Sub-chronic inhalation of ethylbenzene can induce oxidative stress and cell apoptosis in the renal tissues in rats.

Key words: Ethylbenzene; Kidney; Apoptosis; Oxidative stress

乙苯是通过苯与乙烷的烷化工序合成的, 主要用于苯乙烯的生产。大量研究表明, 接触大剂量乙苯可引起听力下降、肝肾实质性损伤, 严重者可诱发肿瘤^[1-4]。国际癌症研究机构(IARC)将乙苯归为人类可疑的致癌物(2B)^[5]。目前, 乙苯诱发肿瘤的作用机制尚不清楚。但既往研究中, 凡具有良好的实验设计及剂量控制的乙苯毒作用研究, 无论体外、动物试验, 还是人群流行病学研究, 显示遗传毒性结果皆为阴性^[6-7]。因此, 提示乙苯可能通过非遗传毒性作用途径发挥毒效应。本研究拟通过亚慢性乙苯吸入染毒动物模型, 探讨乙苯非遗传毒作用模式(氧化损伤、凋亡等)在其肾毒性机制中的作用, 为乙苯职业暴露人群的防

护和易感人群的筛选提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂 Model 680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司), HOPE-MED 8050A 型动式染毒柜(天津合普公司)。

乙苯(分析纯, 天津化学试剂公司), 还原型谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所, TUNEL 试剂盒(德国 Merk-Calbiochem 公司)。

乙苯染毒气体的制备: 乙苯通过雾化器混合空气逸入 HOPE-MED 8050A 型动式染毒柜中, 后经管道收集、排放。染毒柜内保持一定的负压, 避免毒物外泄, 每 3 h 采样 1 次, 气相色谱法监测染毒柜内的乙苯浓度, 适当校正流量以适应染毒浓度。

1.2 乙苯动式染毒动物模型的建立 选择健康 3 周龄 SPF 级 Sprague-Dawley 雄性大鼠 40 只, 体重为 60~75 g, 由军事医学科

基金项目: 天津市自然科学基金重点项目(07JCZDJC08500; 09JCZDJC20900); 天津市科技支撑重点项目(11ZCGYSY02100); 天津市疾病预防控制中心科技基金项目(CDCKY0902)
作者简介: 张明(1981-) 男, 主管医师, 从事职业毒理学研究。
通讯作者: 王延让, E-mail: wangyanrang@126.com

学院实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK-(军)2007-004。动物房温度为(22.5±1.0)℃ 相对湿度为(52±3)%。试验期间 动物禁止摄食及饮水。

将实验动物随机分为 4 组 ,分别为对照(新鲜空气)组和低(433.5 mg/m³)、中(4 335 mg/m³)和高(6 500 mg/m³)剂量乙苯染毒组 ,每组 10 只。大鼠以笼养方式放入 HOPE-MED 8050A 型 动式染毒柜内 ,采用吸入方式进行染毒 ,每天 6 h ,每周 5 d ,连续染毒 13 周。每天测量并记录大鼠体重。

1.3 肾组织重量及其脏器系数的测定 染毒结束后 ,颈椎脱臼处死大鼠 ,迅速分离肾组织 ,称重 ,并计算肾组织系数(肾组织系数=肾组织重量/体重×100%)。

1.4 肾组织内 GSH、MDA 含量的测定 将一部分肾组织匀浆 ,加入 0.5 ml 细胞裂解液(含 0.121%的 Tris ,0.372%的 EDTA ,1%的 Triton-100 ,0.4%的 SDS) ,4℃裂解 2 h 以上 ,以 2 000×g 离心 5 min ,吸出上清 ,每组设 3 个平行。采用 Beutler 改良法测定 GSH 含量 ,采用 TBA 比色法测定 MDA 含量 ,采用考马斯亮蓝染色法测定蛋白含量。

1.5 肾组织病理学观察 一部分肾组织经 10%的福尔马林固定液中固定 12 h ,经上行乙醇脱水、二甲苯透明、石蜡包埋后切成 5 μm 切片 ,进行 HE 染色后于光镜下观察。

1.6 肾组织凋亡的 TUNEL 测定法 将一侧肾组织切成 1 mm×1 mm×1 mm 组织块 ,置于 2.5%的戊二醛溶液中固定保存 ,经石蜡包埋后的肾组织切成 4 μm 切片 ,经硅烷化 ,检测方法参照 TUNEL 试剂盒说明书进行。在光镜下观察 ,以细胞核有棕黄色颗粒者为凋亡阳性细胞。每组选取 3 只大鼠 ,在一个视野下观察 200 个细胞 ,每个标本观察 1 000 个细胞 ,记录凋亡阳性细胞数 ,并计算细胞凋亡率(细胞凋亡率=凋亡阳性细胞数/总细胞数×100%)。

1.7 统计学方法 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 进行表示。采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析。多组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析(One Way ANOVA)。进一步进行组间两两比较时 ,若方差齐时 ,采用 SNK 检验(Student-Newman-Keuls 法) ,若方差不齐时 ,采用 Games-Howell 检验。率间的比较采用 χ^2 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠体重、肾组织重量及其脏器系数的测定结果 乙苯染毒大鼠体重、肾组织重量及其脏器系数的变化见表 1。

表 1 乙苯染毒对大鼠肾组织重量及其脏器系数的影响 (n=10 $\bar{x} \pm s$)

组别	体重(g)	肾组织重量(g)	肾组织系数(%)
对照组	433.61±43.32	2.67±0.29	0.63±0.09
低剂量乙苯染毒组	408.04±34.17 ^a	2.53±0.27	0.62±0.07
中剂量乙苯染毒组	414.24±19.52 ^a	2.69±0.13	0.65±0.05
高剂量乙苯染毒组	467.20±34.31 ^a	2.78±0.33	0.60±0.06

注 :与对照组比较 $P<0.05$ 。

表 1 可见 ,与对照组比较 ,中、高剂量乙苯染毒组大鼠体重较低 ,高剂量乙苯染毒组体重较高 ,差异均有统计学意义($P<0.05$)。各剂量乙苯染毒组大鼠的肾脏重量及其脏器系数与对照组比较 ,差异均无统计学意义。

2.2 大鼠肾组织内 MDA、GSH 含量的测定结果 乙苯染毒大鼠肾组织 MDA、GSH 含量的变化见表 2。

表 2 乙苯染毒对大鼠肾组织 MDA、GSH 含量的影响 (n=10 $\bar{x} \pm s$)

组别	MDA 含量(nmol/mg Pro)	GSH 含量(mg/g Pro)
对照组	0.79±0.11	83.2±4.25
低剂量乙苯染毒组	0.92±0.06 ^a	73.6±7.04
中剂量乙苯染毒组	1.22±0.13 ^a	70.2±5.35 ^a
高剂量乙苯染毒组	1.51±0.17 ^a	62.7±6.28 ^a

注 :与对照组比较 $P<0.05$ 。

由表 2 可见 ,与对照组相比 ,各剂量组大鼠肾组织 MDA 含量均升高 ,中、高剂量乙苯染毒组大鼠肾组织 GSH 含量均降低 ,差异有统计学意义($P<0.05$)。且随着乙苯染毒剂量的升高 ,大鼠肾组织 MDA 含量呈上升趋势 ,GSH 含量呈下降趋势。

2.3 病理学观察结果 乙苯染毒大鼠肾组织病理变化见封三图 1。

封三图 1 可见 ,与对照组(封三图 1A)相比 ,高剂量乙苯染毒组大鼠肾组织出现肾小管水样变性 ,肾小管上皮细胞肿胀、坏死等 ,管腔不规则等病理变化(封三图 1B)。

2.4 大鼠肾组织细胞凋亡的测定结果 乙苯染毒大鼠肾组织细胞凋亡率的变化见表 3。

表 3 乙苯染毒对大鼠肾组织细胞凋亡率的影响 (n=10 $\bar{x} \pm s$)

组别	细胞凋亡数(个)	细胞凋亡率(%)
对照组	59±12	5.9±1.2
低剂量乙苯染毒组	156±25	15.6±2.5 ^a
中剂量乙苯染毒组	214±40	21.4±4.0 ^a
高剂量乙苯染毒组	380±61	38.0±6.1 ^a

注 :与对照组比较 $P<0.05$ 。

表 3 可见 ,与对照组相比 ,各剂量组大鼠肾组织细胞凋亡率均升高 ,差异有统计学意义($P<0.05$)。且随着乙苯染毒剂量的升高 ,大鼠肾组织细胞凋亡率呈上升趋势。

乙苯染毒大鼠肾组织细胞凋亡情况的病理变化见封三图2。

封三图 2 可见 ,与对照组(封三图 2A)相比 ,高剂量乙苯染毒组大鼠肾组织的肾小管上皮细胞呈现染色体浓缩、核碎片等凋亡形态学特征 ,凋亡细胞明显增多(封三图 2B)。

3 讨论

在正常情况下 ,由于各种抗氧化酶 [谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)等]和非酶性抗氧化物质(GSH、维生素 C、维生素 E 等)的存在 ,机体内自由基的产生和清除系统处于动态平衡状态。当机体处于氧化应激状态时 ,由于自由基生成增多 ,消耗大量抗氧化酶和非酶性抗氧化物质 ,机体组织脂质过氧化水平升高 ,引起多种生物大分子结构和功能的改变 ,对机体造成损伤^[9]。MDA 是脂质过氧化产物 ,是反映机体氧化损伤的最具代表性的指标之一。本次试验结果显示 ,与对照组相比 ,各剂量组大鼠肾组织 MDA 含量均升高 ,中、高剂量乙苯染毒组大鼠肾组织 GSH 含量均降低 ,差异有统计学意义($P<0.05$) ;且随着乙苯染毒剂量的升高 ,大鼠肾组织 MDA 含量呈上升趋势 ,GSH 含量呈下降趋势。表明一定剂量的乙苯可引起大鼠肾组织氧化损伤。

乙苯的遗传毒性作用方式已有相关研究。Yuan 等^[9]研究发现 ,乙苯可以调节细胞色素 P(CYP)450 家族的表达。Serron 等^[10]通过单次注射乙苯观察大鼠肝脏自由基的产生 ,发现乙苯可通

过上调和阻遏 CYP 类蛋白经 H_2O_2 介导,生成大量自由基。乙苯的毒作用也有可能氧化损伤对肝内代谢酶的直接诱导有关。但目前,体外遗传毒性实验由于其对 CYP 表达变化的低敏感性,不能检测到 CYP 蛋白水平变化所介导的自由基损伤效应。此外,Midorikawa 等^[11]研究认为,乙苯通过生成其他代谢产物(如 3-乙苯酚和 4-乙苯酚),进一步被代谢为环状二羟基化代谢物,从而诱发氧化损伤。以上研究初步揭示了氧化损伤在乙苯肝毒性机制中的作用。而氧化损伤是否介导乙苯的肾毒性及其相关作用机制以及作用途径,需要在今后的研究中进一步进行探讨。

细胞凋亡是相关基因调控下按照一定的程序进行的细胞死亡,故又称程序性死亡(programmed cell death,PCD)。凋亡细胞具有一些典型的形态学改变,主要包括细胞膜出现囊泡、胞浆皱缩、内网膜扩张呈泡状并与细胞膜融合、核染色质密度增高呈半月形、并凝集在核膜周边、核仁裂解、核膜固话、DNA 有序片段化、细胞膜内陷将细胞分割成多个外有膜包裹、内含物不外泄的细胞凋亡小体^[12]。本研究结果显示,与对照组相比,各剂量组大鼠肾组织细胞凋亡率均升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);且随着乙苯染毒剂量的升高,大鼠肾组织细胞凋亡率呈上升趋势。这与笔者之前的研究结果相一致^[13]。

有研究表明,氧化应激在细胞凋亡中起着非常重要的作用。氧化应激可能通过以下途径介导细胞凋亡的发生:(1)氧自由基(ROS)可损伤线粒体,使线粒体跨膜电位降低、细胞色素 C 释放进入胞浆,进而在 ATP 存在的条件下细胞色素 C 协助凋亡蛋白酶激活因子(Apaf-1)激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-9(caspase-9)引起级联反应,导致 caspase-3 激活而引起细胞凋亡^[14-16];(2)ROS 直接作用于核酸,引起碱基的修饰和 DNA 单链或双链断裂,DNA 受损,激活凋亡相关基因,导致细胞凋亡^[17];(3)ROS 通过上调凋亡相关基因(Bax、Bcl-2、Cytochrome C 等)的表达,参与细胞凋亡^[18]。笔者的前期研究结果显示,乙苯可调控部分凋亡相关基因(Bax、Bcl-2、Cytochrome C、Caspase-3 和 Caspase-9),进而引起凋亡^[13]。但氧化应激在乙苯诱导细胞凋亡中所起的作用有待今后进一步进行深入研究。

综上所述,乙苯可导致大鼠肾组织氧化损伤和细胞凋亡,这可能是其肾毒性作用机制之一,但具体作用途径有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Mellert W, Deckardt K, Kaufmann W, et al. Ethylbenzene 4- and 13-week rat oral toxicity[J]. Arch Toxicol 2007, 81: 361-370.
- [2] Cappaert NL, Klis SF, Muijsers H, et al. The ototoxic effects of ethyl

- benzene in rats[J]. Hear Res 1999, 137: 91-102.
- [3] Cappaert NL, Klis SF, Baretta AB, et al. Ethyl benzene-induced ototoxicity in rats: a dose-dependent mid-frequency hearing loss[J]. J Assoc Res Otolaryngol 2000, 1: 292-299.
- [4] Hard GC. Significance of the renal effects of ethyl benzene in rodents for assessing human carcinogenic risk [J]. Toxicol Sci 2002, 69: 30-41.
- [5] International Agency for Research on Cancer (IARC). Ethylbenzene. monograph on evaluation of carcinogenic risks to humans some industrial chemicals[R]. Lyon, France: IARC 2000, 77: 227-266.
- [6] National Toxicology Program (NTP). Toxicology and carcinogenesis studies of ethylbenzene (CAS No. 100-41-4) in F344/N rats and B6C3F1 mice (inhalation studies) [J]. Natl Toxicol Program Tech Rep Ser 1999, 466: 1-231.
- [7] 王延让, 杨德一, 张明. 乙苯遗传毒性的研究概述[J]. 中华劳动卫生职业病杂志 2007, 25: 702-704.
- [8] Mates JM. Effect of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology[J]. Toxicology 2000, 153: 83-104.
- [9] Yuan W, Serron SC, Haddican MM, et al. Ethylbenzene modulates the expression of different cytochrome P-450 isozymes by discrete multistep processes[J]. Biochim Biophys Acta 1997, 1334: 361-372.
- [10] Serron SC, Dwivedi N, Backes WL. Ethylbenzene induces microsomal oxygen free radical generation: antibody-directed characterization of the responsible cytochrome P450 enzymes [J]. Toxicol Appl Pharmacol 2000, 164: 305-311.
- [11] Midorikawa K, Uchida T, Okamoto Y, et al. Metabolic activation of carcinogenic ethylbenzene leads to oxidative DNA damage [J]. Chem Biol Interact 2004, 150: 271-281.
- [12] Chalah A, Khosravi-Far R. The mitochondrial death pathway [J]. Adv Exp Med Biol 2008, 615: 25-45.
- [13] 王延让, 杨德一, 张明, 等. 乙苯对大鼠尿中苯乙醇酸、苯乙醛酸、肾组织超微结构及线粒体凋亡相关蛋白表达的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志 2009, 27: 655-659.
- [14] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome C and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade[J]. Cell 1997, 91: 479-489.
- [15] Potter AG, Janick RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis [J]. Cell Death Differ 1999, 6: 99-104.
- [16] Zhan XA, Wang M, Xu ZR, et al. Evaluation of caspase-dependent apoptosis during fluoride-induced liver lesion in pigs [J]. Arch Toxicol 2006, 80: 74-80.
- [17] De Bruin EC, Meersma D, de Wilde J, et al. A serine protease is involved in the initiation of DNA damage-induced apoptosis [J]. Cell Death Differ 2003, 10: 1204-1212.
- [18] Kaufmann JA, Bickford PC, Tagliatella G, et al. Free radical-dependent changes in constitutive Nuclear factor Kappa B in the aged hippocampus[J]. Neuroreport 2002, 13: 1917-1928.

(收稿日期 2011-07-05 修回日期 2011-08-25)

(本文编辑 韩威)

张明, 等. 乙苯亚慢性吸入染毒对大鼠肾脏氧化应激损伤和细胞凋亡影响的研究 (正文见第 874 页)

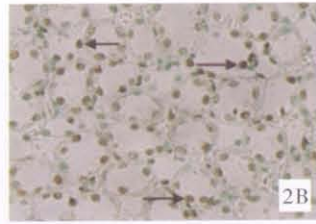
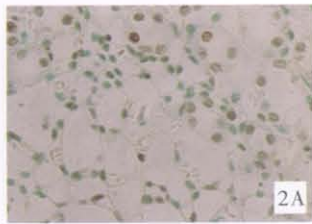
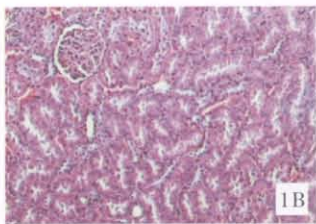
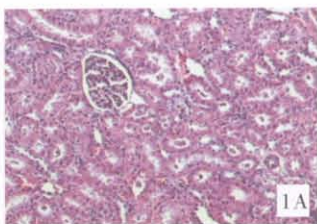


图1A(对照组)、B(高剂量组)分别为乙苯染毒大鼠肾组织病理变化(HE × 200); 图2A(对照组)、B(高剂量组)分别为乙苯染毒大鼠肾组织细胞凋亡情况的病理变化(TUNEL × 200)