

砷对大鼠胚胎神经系统发育和 HSP70mRNA 表达的影响

李 勇¹ 朱惠刚¹ 张天宝² 屈卫东³ 毛明珍¹

¹上海医科大学环境卫生学教研室 上海 200032 ²第二军医大学卫生毒理学教研室 ³华西医科大学

摘要 应用显微解剖、原位杂交组织化学、扫描电镜等技术深入研究了三氧化二砷对大鼠胚胎的发育毒性和神经毒性及 HSP70mRNA 表达与胚胎神经系统发育的关系。结果表明反映胚胎神经系统发育的头长,神经管未闭、体位异常和脑部形态异常发生率均与染砷剂量和作用时间呈正比关系 ($P < 0.05$)。扫描电镜观察发现大鼠胚胎脑部表皮细胞的微绒毛数量减少,回缩变短,细胞膜表面出现许多小的空洞性病理改变。原位杂交结果表明砷能激发大鼠胚胎产生应激反应,10mg/kg 砷诱导的神经管未闭发生率(35.7%)和 HSP70mRNA 原位表达强度均明显高于 4mg/kg 砷的作用,证明热休克反应具有双重作用,揭示了砷的发育毒性与其剂量和作用时间是否大于细胞内 HSP70 合成量的自我调控水平有关,同时亦与损害时间发生于胚胎器官形成期的那一时段密切关联。

关键词 砷;热休克蛋白 70mRNA;原位杂交;胚胎;神经毒性

EFFECTS OF ARSNIC ON DEVELOPING NERVOUS SYSTEM AND HSP70mRNA EXPRESSION DURING RAT NEURULATION PERIOD

Li Yong¹, Zhu Huigang¹, Zhang Tianbao², Qu Weidong³, Mao Minzhen¹

Department of Environmental Health, Shanghai Medical University, Shanghai 200032

²Department of Health Toxicology, Second Military Medical University, Shanghai 200433

Abstract In situ hybridization histochemistry (ISHH), scanning electron microscope (SEM) and microdissection were used to determine neurotoxicity and developmental toxicity and expression of HSP70mRNA during rat neurulation period in vivo. Following an increase in dose or active time of arsenic all indexes correlated with embryonic nervous system development and morphological differentiation were changed, which had an apparent dose-effect relationship ($P < 0.05$).

Atrophied and decreased microvilli, and cavernous damages of epidermic cells on embryonic brain were seen under SEM. The result of ISHH showed that arsenic could induce stress response of rat embryos. The incidence of open neural tube (35.7%) and gene overexpression of HSP70mRNA induced by 10mg/kg arsenic were higher than that action of 4mg/kg arsenic. It was the reason that HSP70 could have double action. Developmental and neural toxicity of different dose of arsenic was related to level of self-control and synthesis of HSP70 in embryonic cells and which specific phase of embryonic developmental processes.

Key words arsenic; HSP70mRNA; in situ hybridization; embryo; neurotoxicity

大量的流行病学调查和动物实验报道均证明砷是一种神经毒物⁽¹⁻³⁾,但有关研究As₂O₃对早期胚胎神经系统发育影响的报道较少。近年来随着对生殖/发育毒理研究的深入,人们认识到在胚胎发育过程中许多细胞因子在发育调控方面具有重要作用,例如热休克蛋白(HSPs)、神经营养因子、转化生长因子等。为从分子水平揭示在应激条件下HSP70和HSP70mRNA与胚胎神经系统发育的关系,本文应用显微解剖、组织化学、原位杂交和扫描电镜技术深入研究了As₂O₃对大鼠胚胎的发育毒性和神经毒性。

材料和方法

1 动物处理

雌性健康未生育SD大鼠,体重260 ± 30g,受孕日定为妊娠0d,随机分为对照组和实验组。As₂O₃剂量为0、1、4和10mg/kg(As₂O₃为日本产,分析纯),染毒时间在孕9.5d,一次性腹腔注射,对照组注射Hanks液。孕11.5d时脱颈处死母鼠,消毒后剖腹,解剖镜下依次剥离蜕膜、Reichert's膜、卵黄囊和羊膜,然后将分离的胚胎置于光镜下观

察,检测终点为:神经管未闭、体节紊乱及头部形态异常。

2 HSP70mRNA原位杂交

无菌和无RNA酶的环境条件下将11.5d龄胚胎制成冰冻切片(矢状面,6μ),DEPC、蛋白酶K、甘氨酸等处理后,4%多聚甲醛后固定,预杂交2h。弃去预杂交液,每张载片加50μl杂交液(含已变性的特异性HSP70cDNA探针),盖膜,42℃湿盒内杂交过夜。含50%甲酰胺的2×SSC、1×SSC和0.1×SSC洗片,Buffer和处理,抗Dig抗体(1:1000)室温作用30min。洗片后NBT/BCIP(酶促反应底物)室温避光显色反应,过夜,终止反应后封片镜检。

3 扫描电镜观察

11.5d龄的胚胎经固定、脱水后临界点干燥,喷镀后用Hitachi-S520扫描电镜观察并拍照。

结果

1 砷对胚胎神经系统发育的影响

不同浓度砷在不同时间染毒后对SD大鼠胚胎神经系统发育的损害见表1。

表1 不同时间染毒后砷对大鼠胚胎神经系统发育的影响

| 剂量(mg/kg) | 胚胎数(n) | 头长(mm) | 神经管未闭 (%) | 体位异常 (%) | 脑形态异常 (%) |
|-----------|--------|--------|-----------|----------|-----------|
| 对照 | 98 | 2.0 | 0 | 1.0 | 0 |
| 第9.5d染毒 | | | | | |
| 1 | 94 | 1.9 | 2.1 | 2.1 | 4.3 |
| 4 | 87 | 1.4* | 7.4 | 8.5 | 18.4 |
| 10 | 84 | 1.0* | 35.7 | 38.1 | 36.9 |
| 第10.5d染毒 | | | | | |
| 1 | 64 | 2.0 | 0 | 1.6 | 3.1 |
| 4 | 57 | 1.8 | 7.0 | 5.3 | 12.3 |
| 10 | 68 | 1.5* | 27.9 | 25.0 | 30.9 |
| 第11d染毒 | | | | | |
| 1 | 71 | 2.0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | 62 | 1.9 | 1.6 | 3.2 | 3.2 |
| 10 | 66 | 1.8 | 6.1 | 7.6 | 13.6 |

* 与对照组比较, $P < 0.05$ 趋势性²检验, $P < 0.05$

从表 1 可见,随着染毒剂量和作用时间的增加及延长,砷的发育毒性和神经毒性就愈加明显,呈剂量反应关系。

2 砷致 11.5d 龄胚胎的病理变化

扫描电镜下,砷组(4mg/kg)胚胎与对照组相比出现明显病理改变(图 1-3 见封二)。胚胎脑部表皮细胞的微绒毛变短,数量减少;膜表面出现许多小洞,多分布于核区隆起周围和细胞间隙处(图 4 见封二)。

3 砷对 HSP70mRNA 表达的影响

对照组未见阳性染色细胞;砷浓度 1mg/kg 和 4mg/kg 组偶见散在分布的弱阳性细胞;但在 10mg/kg 组,无论是第 9.5d、10.5d 染毒还是第 11.0d 染毒,均可见深染的阳性细胞且数量也较多,主要分布在中脑和后脑(图 4),其它部位亦可观察到 HSP70mRNA 阳性表达的细胞。

讨 论

本研究结果揭示砷既是发育毒物亦是神经毒物,对 SD 大鼠胚胎的致畸性与其剂量和染毒时间呈正比关系,4mg/kg 砷作用 48h,反映胚胎脑发育的重要指标头长明显低于对照组;10mg/kg 砷作用 24h 结果同上,但 4mg/kg 砷作用 48h,反映胚胎脑发育的重要指标头长明显低于对照组;10mg/kg 砷作用 24h 结果同上,但 4mg/kg 砷作用 12h 时,头长指标与对照相比无显著性差异,此结果与我们以前用体外全胚胎培养所获结果类同⁽⁴⁾。

在母体无明显中毒症状的前体下,胚胎神经系统并非砷作用的唯一靶器官,心脏、前肢芽、眼等器官均有受累及的表现,这是因为出生前的发育过程十分复杂,在胚胎期不同器官的形成具有重叠性⁽⁵⁾,故当孕第 9.5d 和 10.5d 时染毒可诱发胚胎多种畸形,但以神经系统受损最为严重和所占构成比最高。扫描电镜观察发现的胚胎表皮细胞膜空洞样变、微绒毛数量减少和变短提示:砷的致畸机制与其直接攻击胚胎细胞有一定关联。

本实验在国际上首次应用了 Dig 标记

HSP70cDNA 探针原位杂交免疫细胞化学技术,结果显示 10mg/kg 砷能诱发胚胎神经系统 HSP70mRNA 大量表达,细胞阳性反应率为 85.7%(12/14),证明砷能激发大鼠胚胎产生应激反应。进化上属高度保守的 HSP70 是胚胎、组织器官和细胞对各种异常生理环境做出应答反应的主要产物之一^(6,7),被 HSP70mRNA 所编码。各种应激环境下 HSP70 合成增加的实质是阻遏细胞不受应激原(例如高温、砷等)的损害,因为新合成的 HSP70 能识别和结合某些未折叠的多肽链并阻止其不可逆的变性和聚集;作为分子伴侣介导新生的多肽链穿过细胞内的各种膜;通过 ATP 水解供能帮助折叠错误的蛋白质解开并促进其正确装配。但这一作用并非无止境,在刺激过强和持续时间较长的环境中可产生相反作用^(8,9)。本实验结果表明 10mg/kg 砷诱发的神经管未闭发生率和 HSP70mRNA 原位反应强度均明显高于 4mg/kg 砷的作用,有力的证明热休克反应具有双重作用,揭示了砷的发育毒性与其剂量和作用时间是否大于胚胎细胞内 HSP70 合成量的自我调控水平有关,同时也与损害时间发生于胚胎发育的那一时段密切相关。因此,我们支持 HSP_s(尤其是 HSP70)可作为一种筛检发育毒物的生物标志(biomarker)的观点⁽¹⁰⁾。

Dig 标记 cDNA 探针被认为是当今原位杂交组织化学技术中最敏感的方法之一⁽¹¹⁾,我们在实验过程中体会到胚胎组织的新鲜程序是本技术获得成功的关键,冰冻切片上检测胚胎的 mRNA 表达水平要明显高于石蜡切片这可能与胚组织含水量高,结构疏散及细胞内 mRNA 易于降解有关;但细胞形态的清晰程序不如石蜡切片高。

参考文献

1. 李勇,肖碧玉,王国荃. 慢性砷中毒地区居民心电图变化. 中国地方病学杂志,1991;10(增刊):10
2. Golub MA. Maternal toxicity and the identification of inorganic arsenic as a developmental toxicant. *Reprod Toxicol*, 1994;8(4):283

^{137}Cs 事故受照人员外周血淋巴细胞微核的随访观察

白玉书¹ 曹家珍² 黄绮龙¹ 张秀霞¹ 关树荣¹ 柴文¹
许绵文³ 李敬君³ 王华² 段汝萍⁴

¹卫生部工业卫生实验所 北京 100088 ²黑龙江省卫生防疫站

³哈尔滨医科大学 ⁴牡丹江市职业病防治所

摘要 本文报道了 39 例在 5 个月内多次受到 ^{137}Cs 射线源照射(累积当量剂量为 5 ~ 2105mSv),受照人员外周血淋巴细胞微核的随访观察。结果表明,照后 1 年直接法微核率受照和对照组接近,差异无显著性意义。此时,常规培养法微核率,受照组高于对照组,差异接近显著($0.1 > P > 0.05$),并且微核率与剂量之间存在相关关系。在照后 5 年,采用 CB 法测试微核,结果受照组微核率明显高于对照组,差异有非常显著性意义($P < 0.01$)。表明 CB 法提高了微核测试的灵敏度和可靠性。

关键词 ^{137}Cs ;事故照射;微核;松胞素 - B;随访观察

A FOLLOW-UP STUDY ON MICRONUCLEI OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE IN PERSONS EXPOSED TO ^{137}Cs RADIATION ACCIDENT

Bai Yushu¹, Cao Jiazhen², Huang Qilong¹, Zhang Xiuxia¹, Guan Shurong¹, Chai Wen¹, Xu Mianwen³, Li Jingjun³, Wang Hua², Duan Ruping⁴

¹Laboratory of Industrial Hygiene, Ministry of Health, Beijing 100088

²Heilongjiang Province Hygiene and Epidemic Station, ³Haerbin Medical University

⁴Mudanjiang City Institute of Occupational Disease

Abstract This paper reports micronuclei of peripheral blood lymphocyte of 39 cases exposed to

3. Morrissey RE, Mottet NK. Arsenic-induced exencephaly in the mouse and associated lesions occurring during neurulation. *Teratology*, 1983;28:399
4. 李勇,孙棉龄,吴德生. As_2O_3 对体外培养胚胎致畸作用的时效关系研究. *新疆医学院学报*, 1995;18(3):166
5. Manson JM, Wise LD. Teratogens. In: Amdur MO, et al. eds. Casare and Doull's Toxicology. The Basic Sciences of Poisons. 4th ed. New York: Pergamon Press, 1991:226 - 256
6. Buckiova D, Jelinek R. Heat shock proteins and teratogenesis. *Reprod Toxicol*, 1995;9(6):501
7. Morimoto RI. Cell in stress: transcriptional activation of heat shock genes. *Science*, 1993,259:1409
8. Mirkes PE, Doggett B, Cornel L. Induction of a heat shock response(HSP72) in rat embryos exposed to selected chemical teratogens. *Teratology*, 1994;49:135
9. 李勇,朱惠刚. 热休克蛋白在应激环境中对胚胎生长发育的影响. *国外医学卫生学分册*, 1997;24(1):20
10. Finnell RH, Ager PL, Englen MD, et al. The heat shock response potential to screen teratogens. *Toxicol Lett*, 1992;60:39
11. 姜泊,张亚历,周殿元. 分子生物学常用实验方法. 第一版. 北京:人民军医出版社,1996;128 - 162