

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20180509003

魏琳颜, 高霞, 魏倩, 等. 丙烯腈诱导大鼠脾的氧化应激和免疫系统响应[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(6): 212-219

Wei L Y, Gao X, Wei Q, et al. Acrylonitrile-induced oxidative stress and immune system response in rats spleen [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(6): 212-219 (in Chinese)

丙烯腈诱导大鼠脾的氧化应激和免疫系统响应

魏琳颜, 高霞, 魏倩, 张瑞萍, 石影, 郑爱, 薛红丽*

兰州大学公共卫生学院, 兰州 730000

收稿日期: 2018-05-09 录用日期: 2018-07-06

摘要: 为探讨丙烯腈(acrylonitrile, ACN)诱导的氧化应激对大鼠脾核转录因子 NF- κ B(nuclear transcription factor- κ B, NF- κ B)信号通路的影响, 将 60 只无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级健康成年雄性大鼠随机分为 5 组: 对照组(玉米油), 低、中、高剂量染毒组(11.5、23、46 mg·kg⁻¹ ACN)和 N-乙酰-L-半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)干预组(46 mg·kg⁻¹ ACN + 300 mg·kg⁻¹ NAC), 1 次/天, 6 天/周, 连续灌胃 4 周。染毒结束后, 次日处死大鼠, 分离大鼠脾并称重。以分光光度法检测脾组织超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、过氧化氢酶(catalase, CAT)和总抗氧化能力(total antioxidant capacity, T-AOC)含量或活力; 以 Elisa 法检测大鼠脾白介素 6(IL-6)、白介素 1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平; 以 Western Blot 法检测脾 NF- κ B、I κ B、p-I κ B 蛋白表达水平; 以 RT-PCR 法检测 NF- κ B、I κ B mRNA 表达水平。结果显示, 与对照组比较, ACN 低、中剂量组大鼠脾湿重明显降低($P < 0.05$); ACN 中剂量组脾脏器系数降低($P < 0.05$)。中、高剂量组大鼠脾组织 MDA 含量显著增加($P < 0.05$); 高剂量组大鼠 SOD、GSH-Px 活力显著增加($P < 0.05$); 低剂量组大鼠 CAT 活力降低, 高剂量组大鼠 CAT 活力增加($P < 0.05$); 低剂量组大鼠 GSH 含量、T-AOC 活力均降低($P < 0.05$)。与高剂量组相比较, NAC 组大鼠 MDA、SOD、CAT、GSH、GSH-Px、T-AOC 均降低($P < 0.05$)。与对照组比较, ACN 中、高剂量组大鼠脾组织内 IL-1 β 含量降低($P < 0.05$), 低、中、高剂量组大鼠 TNF- α 含量增加($P < 0.05$)。与高剂量组比较, NAC 组 TNF- α 含量降低($P < 0.05$)。Western Blot 结果显示, 中、高剂量染毒组大鼠脾 NF- κ B、I κ B、p-I κ B 蛋白表达水平与对照组比较均升高($P < 0.05$)。NAC 组大鼠脾 I κ B、p-I κ B 蛋白表达水平与高 ACN 组比较降低($P < 0.05$)。RT-PCR 结果显示, ACN 各剂量染毒组大鼠脾 NF- κ B mRNA 表达水平与对照组比较均升高($P < 0.05$); 中、高剂量染毒组大鼠脾 I κ B mRNA 表达水平与对照组比较均升高($P < 0.05$)。NAC 组大鼠脾 NF- κ B mRNA 表达水平低于高剂量组($P < 0.05$)。结果表明 ACN 亚急性染毒可对大鼠脾产生氧化损伤和免疫系统响应, NAC 可通过拮抗作用减轻损伤的程度。

关键词: 丙烯腈; 大鼠; 脾; 氧化应激; NF- κ B

文章编号: 1673-5897(2018)6-212-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Acrylonitrile-induced Oxidative Stress and Immune System Response in Rats Spleen

Wei Linyan, Gao Xia, Wei Qian, Zhang Ruiping, Shi Ying, Zheng Ai, Xue Hongli*

School of Public Health, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

Received 9 May 2018 accepted 6 July 2018

Abstract: To investigate the effect of acrylonitrile (ACN)-induced oxidative stress on nuclear transcription factor-

作者简介: 魏琳颜(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为儿少卫生与妇幼保健, E-mail: weily16@lzu.edu.cn

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: xuehl@lzu.edu.cn

κ B (NF- κ B) signaling pathway in rats spleen, 60 specific pathogen free (SPF) grade healthy adult male rats were randomly divided into 5 groups: control group (corn oil), low-, medium-, and high-dose groups (11.5, 23, 46 mg·kg⁻¹ ACN) and NAC groups (46 mg·kg⁻¹ ACN + 300 mg·kg⁻¹ NAC), and were treated once/day, 6 days/week, by intragastric gavage for 4 weeks. The spleen was isolated and weighed. The activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), and catalase (CAT), the contents of glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA) and total antioxidant capacity (T-AOC) in spleen were detected by spectrophotometry. The interleukin 6 (IL-6), interleukin 1 β (IL-1 β), tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels were determined by Elisa. The expressions of NF- κ B, I κ B and p-I κ B were measured using western blotting and the expressions of *NF- κ B* and *I κ B* mRNA were determined by RT-qPCR. The results showed that the splenic wet weight of the rats were significantly decreased in the low- and middle-dose groups compared with the control group ($P < 0.05$). The splenic coefficient was also significantly decreased in the middle-dose group ($P < 0.05$). The contents of MDA in the spleen of rats were significantly increased in the medium- and high-dose groups ($P < 0.05$) and the activities of SOD and GSH-Px were significantly increased in the high-dose group ($P < 0.05$). The activity of CAT and the contents of T-AOC and GSH were all decreased in the low-dose group, whereas, the CAT activity was increased in the high-dose group ($P < 0.05$). Meanwhile, the activities of SOD, CAT and GSH-Px and the contents of MDA, GSH and T-AOC were significantly decreased in the NAC group compared with the high-dose group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the contents of IL-1 β were decreased in the middle- and high-dose groups, and the levels of TNF- α were increased significantly in all dose groups ($P < 0.05$). Compared with the high-dose group, the content of TNF- α was significantly decreased in the NAC group ($P < 0.05$). Western Blot results showed that the expressions of NF- κ B, I κ B, and p-I κ B were significantly increased in the medium- and high- dose groups compared with the control group ($P < 0.05$). The expressions of I κ B and p-I κ B in NAC group was decreased in the high ACN group ($P < 0.05$). RT-PCR results showed that the expression of *NF- κ B* mRNA were increased in the low-, medium- and high-dose ACN groups compared with the control group ($P < 0.05$). And the expressions of *I κ B* mRNA were increased in the medium- and high-dose ACN groups compared with the control group ($P < 0.05$). The expression of *NF- κ B* mRNA was decreased in the NAC group compared with the high-dose group ($P < 0.05$). Therefore, the present study suggests that subacute exposure to ACN could produce oxidative damage and immune system response in rats' spleen, and NAC might reduce the degree of injury through antagonism.

Keywords: acrylonitrile; rats; spleen; oxidative stress; NF- κ B

丙烯腈(acrylonitrile, ACN)是一种无色、苦杏仁味、易挥发的有机合成原料,在合成树脂、纤维、橡胶等高分子材料中被广泛使用^[1]。ACN 能通过消化道、呼吸道和皮肤等多种途径进入机体,引起多个器官的病理改变。单细胞凝胶电泳结果显示 25 mg·kg⁻¹ ACN 亚慢性染毒可使大鼠外周血淋巴细胞 DNA 损伤,表现为淋巴细胞 DNA 含量及尾长显著增加^[2]。Li 等^[3]发现 ACN 可以通过破坏脂筏,引起 B 细胞淋巴瘤-10 蛋白和脂筏分离,并通过抑制 Ras-Raf-ERK 通路引起免疫毒性。核转录因子 κ B(nuclear factor κ B, NF- κ B)是细胞核内重要的转录调节因子,不仅参与机体免疫、炎症、组织损伤修复和胚胎发育等过程,还可调节凋亡相关基因的表达^[4]。NF- κ B 通常与其抑制剂 I κ B(inhibitor of nuclear factor kappa-B)

结合,活性氧(reactive oxygen species, ROS)过量产生时激活 I κ B 激酶复合物 IKK(inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase),进而降解 I κ B 蛋白^[5],然后 NF- κ B 被游离出来而激活,激活后的 NF- κ B 转移至细胞核发挥其生物活性作用^[6],其激活程度也可以被抗氧化剂所调节^[7]。NF- κ B 还受 I κ B 的负反馈调节,因此 NF- κ B 被活化后可以上调 I κ B 的表达,这些新生成的 I κ B,一方面可与游离的 NF- κ B 结合,重新使 NF- κ B 的活性被抑制;另一方面,也可进入细胞核向外输出 NF- κ B 的功能。研究发现,ROS 激活的 NF- κ B 信号通路能被 N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)特异性地抑制^[8]。脾是人体最大的外周免疫器官,脾脏在机体免疫、抗感染、血液滤过等方面起着重要作用。目前关于 ACN 对其他脏器毒性和机制的研究较多,

而脾的研究资料较为缺乏。故本实验通过对大鼠亚急性染毒 ACN, 观察大鼠脾损伤的一般毒性表现, 测定炎症因子, 检测 NF- κ B(p65)、I κ B、p-I κ B 蛋白和基因表达水平变化, 探讨氧化应激激活的 NF- κ B 信号通路与 ACN 致大鼠脾损伤的关系, 为进一步研究 ACN 的脾脏毒性机制提供依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 主要试剂

ACN 购于天津凯信(纯度>99%), NAC 购于美国 Amersco 公司。p65 兔抗大鼠一抗, I κ B 兔抗大鼠一抗, p-I κ B 兔抗大鼠一抗, HRP 标记山羊抗鼠二抗均购于美国 CST 公司, GAPDH 一抗购于美国 SAB 公司, HRP 标记山羊抗兔二抗购于美国 SAB 公司。超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽(GSH)测试盒均购于南京建成生物工程研究所, BCA(bicinchoninic acid)蛋白定量试剂盒购于美国 Thermo 公司。白介素 6 (IL-6)、白介素 1- β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 试剂盒均购于 Elabscience 公司。

1.2 实验动物及分组

SPF 级健康成年 SD 雄性大鼠 60 只, 体重 180 ~ 220 g, 购于甘肃中医药大学 SPF 级实验动物中心(实验动物质量合格证编号 SCXK(甘)2015-0002)。随机分为 5 组, 每组 12 只, 饲养于兰州大学公共卫生学院实验中心(实验设施合格证编号 SYXK(甘)2015-0005), 自由进食及饮水, 适应性饲养 1 周后, 以 11.5(低剂量组)、23.0(中剂量组)、46.0(高剂量组) mg·kg⁻¹ ACN、46.0 mg·kg⁻¹ ACN + 300 mg·kg⁻¹ NAC(NAC 干预组)灌胃, NAC 干预组 NAC 灌胃 30 min 后再灌 ACN, 对照组大鼠给予玉米油, 1 次/天, 6 天/周。染毒剂量主要依据本团队前期研究结果和 Abdel Naim^[9]的研究设定, 连续灌胃 4 周后处死大鼠。

1.3 脾脏器系数测定

末次染毒结束后, 次日称重。乙醚麻醉处死大鼠, 分离大鼠脾并置于 0.9% 生理盐水中, 冲洗干净, 滤纸拭干后称重并记录。

1.4 氧化还原相关酶及炎症因子的测定

按照脾组织质量(g): 匀浆介质(mL) = 1: 9 的质量体积比加入适量预冷的 0.9% 的生理盐水, 冰浴研磨制成 10% 脾组织匀浆, 转速 2 500 r·min⁻¹ 离心 10 min, 取上清, 严格按试剂盒说明书要求检测 SOD、MDA、GSH-Px、GSH、过氧化氢酶(CAT)、总抗氧化能力(T-AOC)、BCA、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 水平。

1.5 Western Blot 检测脾组织 NF- κ B、I κ B、p-I κ B 蛋白表达水平

每组随机选取 6 只大鼠脾组织, 称取约 90 mg, 按组织质量(mg): RIPA 裂解液(mL)=1: 10 的质量体积比加入 RIPA(radio immunoprecipitation assay)裂解液, 再按照 PMSF(mL): RIPA(mL)=1: 100 的体积比加入相应体积的 PMSF(phenylmethanesulfonyl fluoride), 冰浴研磨, 直至组织充分裂解。裂解后的样品 4 °C、12 000 r·min⁻¹, 离心 15 min, 取上清, BCA 法测定总蛋白, 并按照比例加入 RIPA 稀释液和 5 × SDS(sodium dodecyl sulfate)上样缓冲液, 沸水浴变性 5 min, 制得蛋白样品。每条泳道加入 60 μg 蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳, 根据彩虹 marker 标识的目标蛋白位置将目标条带转移至 PVDF(polyvinylidene fluoride)膜, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST(Tris-buffered saline containing 0.1% Tween)室温封闭 1 ~ 2 h, 放入 GAPDH(1:5 000)、NF- κ B(1:1 000)、I κ B(1:1 000)、p-I κ B(1:1 000)特异性抗体中 4 °C 水平摇床过夜, TBST 漂洗后室温二抗(1:2 000)孵育 2 h。加适量发光液后凝胶成像仪曝光, 保存蛋白条带, 采用 Image J 图像分析软件分析蛋白条带灰度值。目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值。

1.6 Real Time PCR 反应检测脾组织 mRNA 表达水平

每组随机选取 4 只大鼠脾组织, 取 100 mg 左右进行 Trizol 一步法提取组织总 RNA, 反转录后得 cDNA, 以 cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 反应检测大鼠脾组织(β -actin、NF- κ B、I κ B)mRNA 相对表达水平。采用 25 μL 扩增反应体系, 进行三步法 PCR 扩增反应, 其中, 第一步: 预变性, 95 °C、30 s, 1 个循环; 第二步: 共 50 个循环, 95 °C、5 s(变性), 55 °C、30 s(退火), 72 °C、30 s(延伸); 第三步: 熔解反应, 60 °C、15 s, 71 个循环。引物设计表见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因名称	引物序列	
The name of gene	Primer sequence	
NF- κ B	Forward	CGACGTATTGCTGTGCCTTC
	Reverse	TTGAGATCTGCCAGGTGGTA
I κ B- α	Forward	TGACCATGGAAGTGATTGGTCAG
	Reverse	GATCACAGCCAAGTGGAGTGGA
β -actin	Forward	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA
	Reverse	GACTCATCGTACTCTGCTTGCTG

1.7 统计分析

采用 SPSS 20.0 软件进行统计分析,结果均采用 $\bar{x}\pm S$ 表示,多组之间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD 法,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果 (Results)

2.1 大鼠脾湿重及脏器系数变化

单因素方差分析结果显示,与对照组比较,ACN 低、中剂量组大鼠脾湿重明显降低 ($P<0.05$); ACN 中剂量组大鼠脾脏器系数降低 ($P<0.05$)。与高剂量组比较, NAC 组大鼠脾湿重、脏器系数增加,但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.2 大鼠脾组织脂质过氧化指标变化

与对照组相比, ACN 中、高剂量组大鼠脾组织 MDA 含量增加 ($P<0.05$); 高剂量组大鼠 SOD、GSH-Px 活力显著增加 ($P<0.05$); 低剂量组大鼠 CAT 活力显著降低, 高剂量组大鼠 CAT 活力显著增加 ($P<0.05$); 低剂量组大鼠 GSH 含量、T-AOC 活力显著降低 ($P<0.05$)。与高剂量组比较, NAC 组大鼠 MDA 含量、SOD 活性、CAT 活性、GSH 含量、GSH-Px 活性、T-AOC 含量显著降低 ($P<0.05$)。

2.3 脾组织炎性因子水平变化

与对照组比较, ACN 中、高剂量组大鼠脾组织内 IL-1 β 含量降低 ($P<0.05$), ACN 各剂量组大鼠脾组织内 TNF- α 含量增加 ($P<0.05$)。与高剂量组比较, NAC 组大鼠脾 TNF- α 含量降低 ($P<0.05$)。

2.4 ACN 染毒后大鼠脾组织 NF- κ B(p65) 相关蛋白表达变化

Western Blot 结果示, ACN 中、高剂量组大鼠脾 NF- κ B、I κ B、p-I κ B 蛋白表达水平与对照组比较均升高 ($P<0.05$)。NAC 组大鼠脾 I κ B、p-I κ B 蛋白表达水平与 ACN 高剂量组比较降低 ($P<0.05$)。

表 2 大鼠脾湿重及脏器系数变化

Table 2 Changes of the rats spleen wet weight and organ coefficient

组别 Groups	脾湿重/g Wet weight of spleen/g	脾脏器系数/% Coefficient of spleen/%
对照组(Control)	0.76 \pm 0.04	0.21 \pm 0.01
低剂量组(11.5 mg·kg ⁻¹ ACN)	0.69 \pm 0.03*	0.19 \pm 0.01
中剂量组(23.0 mg·kg ⁻¹ ACN)	0.61 \pm 0.01*	0.19 \pm 0.01*
高剂量组(46.0 mg·kg ⁻¹ ACN)	0.70 \pm 0.09	0.22 \pm 0.02
NAC 组(46 mg·kg ⁻¹ ACN + 300 mg·kg ⁻¹ NAC)	0.74 \pm 0.07	0.23 \pm 0.02
<i>F</i>	7.227	7.618
<i>P</i>	0.001	0.000

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与高剂量组比较,# $P<0.05$; $n=6$ 。脏器系数(%)=脏器湿重(g)/体重(g) \times 100。ACN 表示丙烯腈, NAC 表示 N-乙酰半胱氨酸。

Note: compared with control, * $P<0.05$; compared with high dose group, # $P<0.05$; $n=6$. organ coefficient (%) = wet weight of organ (g)/weight (g). ACN stands for acrylonitrile; NAC stands for N-acetylcysteine.

表 3 大鼠脾组织脂质过氧化指标变化

Table 3 Changes of lipid peroxidation index in rat spleen

组别 Groups	MDA /(nmol·g prot ⁻¹)	SOD/ (U·mg prot ⁻¹)	CAT/ (U·mg prot ⁻¹)	GSH/ (μ mol·g prot ⁻¹)	GSH-Px/ (U·mg prot ⁻¹)	AOC/ (mmol·g prot ⁻¹)
对照组(Control)	1.34 \pm 0.22	69.97 \pm 18.72	3.47 \pm 0.59	2.18 \pm 0.83	1 215.13 \pm 302.04	36.08 \pm 3.48
低剂量组(11.5 mg·kg ⁻¹ ACN)	1.10 \pm 0.26	60.25 \pm 6.38	2.51 \pm 0.41*	1.01 \pm 0.28*	1 127.79 \pm 197.66	24.87 \pm 4.66*
中剂量组(23.0 mg·kg ⁻¹ ACN)	1.83 \pm 0.34*	91.71 \pm 25.08	2.79 \pm 0.62	1.73 \pm 0.31	1 374.49 \pm 67.43	32.10 \pm 2.26
高剂量组(46.0 mg·kg ⁻¹ ACN)	2.08 \pm 0.39* #	126.94 \pm 35.69* #	4.53 \pm 0.90* #	2.14 \pm 0.57#	1 486.58 \pm 169.65* #	31.85 \pm 5.48#
NAC 组(46 mg·kg ⁻¹ ACN + 300 mg·kg ⁻¹ NAC)	1.39 \pm 0.51	63.97 \pm 14.88	1.50 \pm 0.46	1.02 \pm 0.35	1 003.47 \pm 178.56	26.29 \pm 3.88
<i>F</i>	8.714	10.345	25.604	7.497	5.679	7.790
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000

注:MDA、SOD、CAT、GSH、GSH-Px、T-AOC 表示丙二醛、超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽、谷胱甘肽过氧化物酶和总抗氧化能力。与对照组比较,* $P<0.05$;与高剂量组比较,# $P<0.05$; $n=6$ 。

Note: MDA, SOD, CAT, GSH, GSH-Px, T-AOC stand for malondialdehyde, superoxide dismutase, catalase, glutathione, glutathione peroxidase and total antioxidant capacity. Compared with control, * $P<0.05$; compared with high dose group, # $P<0.05$; $n=6$.

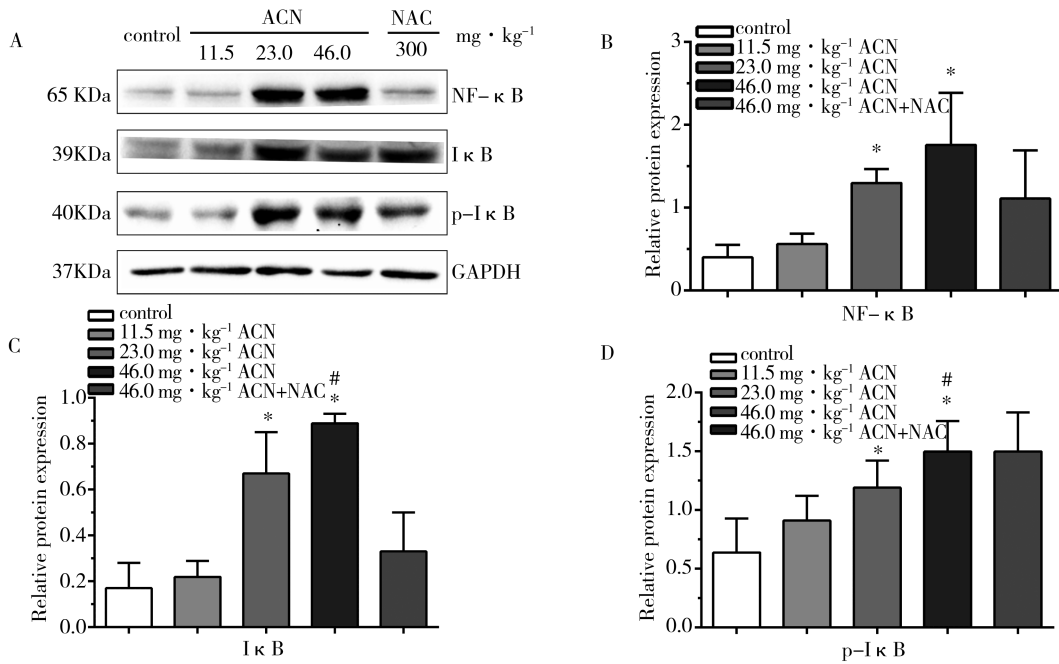


图1 ACN染毒后NF-κB激活的免疫印迹分析

注:A, Western Blot NF-κB、IκB、p-IκB 蛋白条带。B~D, Western Blot NF-κB、IκB、p-IκB 蛋白条带半定量分析。

与对照组比较, * P<0.05; 与高剂量组比较, # P<0.05; n=6。

Fig. 1 Western Blot analysis on activation of NF-κB induced by ACN

Note: A, Western Blot bands of NF-κB, IκB and p-IκB proteins; B~D, semi-quantitative analysis on Western Blot of NF-κB, IκB and p-IκB. Compared with control, * P<0.05; compared with high dose group, # P<0.05; n=6.

表4 脾组织炎症因子水平变化

Table 4 Changes in the level of inflammatory factors in spleen tissue of rats

组别 Groups	IL-6	IL-1β	TNF-α
对照组(Control)	1 011.29±302.59	485.87±112.13	1 105.79±562.60
低剂量组(11.5 mg·kg ⁻¹ ACN)	1 039.73±498.84	394.03±114.88	1 941.44±379.73*
中剂量组(23.0 mg·kg ⁻¹ ACN)	1 377.06±316.99	328.12±106.50*	1 786.43±283.08*
高剂量组(46.0 mg·kg ⁻¹ ACN)	1 244.23±539.61	365.35±56.33*	1 962.86±547.74* #
NAC组(46 mg·kg ⁻¹ ACN + 300 mg·kg ⁻¹ NAC)	1 210.66±391.20	286.21±77.72	1 211.38±616.73
F	0.848	3.688	4.861
P	0.508	0.017	0.004

注:与对照组比较, * P<0.05; 与高剂量组比较, # P<0.05; n=6。

Note: Compared with control, * P<0.05; compared with high dose group, # P<0.05; n=6.

表5 ACN染毒后大鼠脾组织NF-κB(p65)相关蛋白表达变化

Table 5 Changes of NF-κB (p65) related protein expression in rat spleen after ACN exposure

组别 Groups	NF-κB	IκB	p-IκB
对照组(Control)	0.40±0.15	0.17±0.11	0.64±0.29
低剂量组(11.5 mg·kg ⁻¹ ACN)	0.56±0.13	0.22±0.07	0.91±0.21
中剂量组(23.0 mg·kg ⁻¹ ACN)	1.30±0.17*	0.67±0.18*	1.19±0.23*
高剂量组(46.0 mg·kg ⁻¹ ACN)	1.76±0.63*	0.89±0.04* #	1.50±0.26* #
NAC组(46 mg·kg ⁻¹ ACN + 300 mg·kg ⁻¹ NAC)	1.11±0.58	0.33±0.17	1.05±0.33
F	9.826	27.096	7.519
P	0.000	0.000	0.001

注:与对照组比较, * P<0.05; 与高剂量组比较, # P<0.05; n=6。

Note: Compared with control, * P<0.05; compared with high dose group, # P<0.05; n=6.

2.5 ACN 染毒后大鼠脾 *NF-κB* 相关基因表达变化

RT-PCR 结果显示,ACN 各剂量染毒组大鼠脾 *NF-κB* mRNA 表达水平均高于对照组 ($P<0.05$); ACN 中、高剂量组大鼠脾 *IκB* mRNA 表达水平与对照组比较均升高 ($P<0.05$)。NAC 组大鼠脾 *NF-κB* mRNA 表达水平低于 ACN 高剂量组 ($P<0.05$)。

3 讨论 (Discussion)

脏器系数能敏感地反映脏器受到毒物的毒性反应,其数值大小的改变与脏器的损伤程度有明显的相关关系^[10]。正常状态下,动物各脏器的脏器系数比较固定,免疫器官的脏器指数是衡量机体免疫功能的初步观察指标。本研究结果发现 ACN 染毒后脾脏器系数减小,提示该组织可能出现了萎缩、退行性变化。

氧化应激是由于机体内自由基过量产生导致机体氧化-抗氧化作用失衡的一种病理应激状态。GSH 是非酶自由基清除剂,其含量常作为机体抗氧化能力大小的指标之一^[11]。本研究发现低剂量染毒组大鼠脾 GSH 含量显著降低,可能是因为 ACN 及其代谢产物 2-氧环氧乙烷(CEO)与体内 GSH 结合,使机体内 GSH 含量下降。GSH-Px 是一种含有巯基的重要的抗氧化酶,本研究发现,高剂量组大鼠脾组织 GSH-Px 活性显著增加,可能是因为 ACN 染毒后在其代谢过程中产生了过多的自由基,机体为了维持其本身的氧化-抗氧化之间的平衡状态,代偿性增高抗氧化酶 GSH-Px。MDA 含量多少与体内细胞被破坏程度存在明显的相关关系,本研究发现中、高剂量染毒组大鼠脾 MDA 含量显著升高,与党瑜慧等^[12]结论相似,提示 ACN 能够引起脾脂质过氧化损伤。SOD 是生物体内清除大量自由基的关键物质,一旦 SOD 活性降低,积累过氧化氢,刺激脂质

过氧化反应和氧化反应来破坏细胞^[13],本研究结果显示,高剂量组大鼠脾 SOD 活力升高,可能原因是 ACN 在体内代谢过程中产生大量 $\cdot O^2$,机体内 SOD 升高清除 $\cdot O^2$ 来维持氧化-抗氧化平衡^[14]。CAT 是过氧化物酶体的标志酶,可减少体内 H_2O_2 的积累,一旦 CAT 受到外源化学物的刺激,其反应性会增加。本研究发现,低剂量组 CAT 活性显著低于对照组,高剂量组 CAT 活性显著高于对照组,提示低剂量染毒可使大鼠脾脏组织 CAT 活力降低,减弱了机体的抗氧化能力。T-AOC 是机体防御体系之一,此种机能的降低常常导致各种疾病发生。本研究发现,低剂量组大鼠脾组织 T-AOC 水平显著降低 ($P<0.05$)。此外,本研究中,与高剂量组相比,NAC 组大鼠脾脏 MDA、SOD、CAT、GSH、GSH-Px、T-AOC 水平显著降低,可能与 NAC 可以和活性氧直接发生作用,还可能与 NAC 能抑制 ACN 向其活性代谢产物 CN 转化及抑制 ACN 持续消耗 ATP 有关^[15]。

IL-6 是重要的促炎细胞因子,在炎症刺激下由单核细胞、淋巴细胞等炎症免疫细胞分泌,其分泌水平可反映炎症激烈程度。正常生理状态下 IL-6 一般不表达,但在炎症、病毒等刺激下分泌水平升高,呈高表达状态。本研究中,与对照组比较,低、中、高剂量组大鼠脾组织内 IL-6 含量增加,但差异无统计学意义。IL-6 有协调 IL-1,诱导肝细胞合成急性期反应蛋白,可催化、放大炎症反应及毒性作用,也可与 TNF- α 产生协同作用,作用于血管内皮细胞,造成微循环障碍^[16-17]。本研究发现,中、高剂量组 IL-1 β 分泌水平显著降低。此外,低、中、高剂量组 TNF- α 分泌水平显著增加,表明 ACN 引起促炎因子 TNF- α 异常释放。NAC 干预后,大鼠脾 TNF- α 分泌水平显著降低,说明 NAC 可使脾组织 TNF- α 表达降低,从而起到免疫调节作用。

表 6 ACN 染毒后大鼠脾 *NF-κB* 相关基因表达变化

Table 6 Changes of *NF-κB* related gene expression in rat spleen after ACN exposure

组别 Groups	<i>NF-κB</i>	<i>IκB</i>
对照组(Control)	0.43±0.06	0.50±0.05
低剂量组(11.5 mg·kg ⁻¹ ACN)	0.61±0.10*	0.80±0.22
中剂量组(23.0 mg·kg ⁻¹ ACN)	0.63±0.14*	0.87±0.12*
高剂量组(46.0 mg·kg ⁻¹ ACN)	0.71±0.11* #	0.92±0.11*
NAC 组(46 mg·kg ⁻¹ ACN + 300 mg·kg ⁻¹ NAC)	0.57±0.10	0.78±0.12
<i>F</i>	4.081	8.689
<i>P</i>	0.012	0.000

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与高剂量组比较,# $P<0.05$; $n=6$ 。

Note: Compared with control,* $P<0.05$; compared with high dose group, # $P<0.05$; $n=6$.

NF- κ B 信号通路可以调节基因表达,并控制细胞凋亡、病毒复制、肿瘤发生、炎症以及各种自身免疫性疾病^[18]。同时,NF- κ B 信号通路在免疫、炎症和肿瘤形成过程中还能协调、驱动细胞活化和增殖^[19]。NF- κ B 通常与其抑制因子 I κ B 结合,以非活性形式存在于细胞质中,当细胞受到上游刺激因子,如 ROS、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)、细菌脂多糖(LPS)等的作用时而激活^[20-22]。NF- κ B 还可反馈调节,通过迅速合成 I κ B 终止转录,维持细胞自身的稳定性^[23]。Dang 等^[24]研究发现,ACN 染毒后大鼠睾丸 NF- κ B 蛋白相对表达量升高,经 NAC 预处理后,NF- κ B 的活化受到抑制。本研究结果显示,中、高剂量染毒组大鼠脾 NF- κ B、I κ B、p-I κ B 蛋白表达水平与对照组比较升高($P<0.05$)。RT-PCR 结果显示,低、中、高 ACN 染毒组大鼠脾 NF- κ B mRNA 表达水平与对照组比较均升高($P<0.05$);中、高 ACN 染毒组大鼠脾 I κ B mRNA 表达水平与对照组比较均升高($P<0.05$)。可能是因为 NF- κ B 被活化后上调了 I κ B 的表达,而 I κ B 同时又被磷酸化。NAC 组大鼠脾 I κ B、p-I κ B 蛋白表达水平与高 ACN 组比较降低($P<0.05$),NF- κ B mRNA 表达水平与高剂量组比较降低($P<0.05$),NF- κ B 的激活显著受到抑制,这是因为 NAC 作为一种有效的抗氧化剂,可以通过抑制氧化应激,拮抗 NF- κ B 的活化和其在核内的表达^[8]。提示 ACN 染毒后大鼠脾 NF- κ B 信号通路的激活是由氧化应激引起。

综上所述,ACN 亚急性染毒可对大鼠脾产生氧化损伤和免疫系统响应,NAC 可通过拮抗作用减轻大鼠脾损伤程度。

参考文献 (References):

- [1] 田原,郭中阳,陆书来. 丙烯腈生产、市场与技术进展 [J]. 化工科技, 2012, 20(6): 63-68
Tian Y, Guo Zh Y, Lu Sh L. Production, market and technical development of acrylonitrile [J]. Science & Technology in Chemical Industry, 2012, 20(6): 63-68 (in Chinese)
- [2] 张洁,潘丽,樊俏荣,等. 丙烯腈对雄性大鼠外周血淋巴细胞 DNA 损伤和氧化应激的影响 [J]. 兰州大学学报: 医学版, 2016, 42(2): 11-16
Zhang J, Pan L, Fan Q R, et al. Study on effect of acrylonitrile on DNA damage and oxidative stress in peripheral lymphocyte of male rats [J]. Journal of Lanzhou University: Medical Sciences, 2016, 42(2): 11-16 (in Chinese)
- [3] Li X J, Li B, Huang J S, et al. Effects of acrylonitrile on lymphocyte lipid rafts and RAS/RAF/MAPK/ERK signaling pathways. [J]. Genetics & Molecular Research, 2014, 13(3): 7747-7756
- [4] Varfolomeev E, Goncharov T, Maecker H, et al. Cellular inhibitors of apoptosis are global regulators of NF- κ B and MAPK activation by members of the TNF family of receptors [J]. Science Signaling, 2012, 5(216): 1618-1619
- [5] Esmat A, El-Demerdash E, El-Mesallamy H, et al. Toxicity and oxidative stress of acrylonitrile in rat primary glial cells: Preventive effects of N-acetylcysteine [J]. Toxicology Letters, 2007, 171: 111-118
- [6] Balood M, Mesbah-Namin S A, Sanati M H, et al. Inhibitor I κ B- α promoter functional polymorphisms in patients with multiple sclerosis [J]. Molecular Biology Reports, 2014, 41(2): 613-616
- [7] van den Berg R, Haenen G R, van den Berg H, et al. Transcription factor NF- κ B as a potential biomarker for oxidative stress [J]. British Journal of Nutrition, 2001, 86 (S1): 121-127
- [8] 李燕,万汝根. N-乙酰半胱氨酸对心衰兔氧化应激和核因子 NF- κ B 的干预研究 [J]. 中国生化药物杂志, 2015, 35(2): 55-58
Li Y, Wan R G. Effect of N-acetylcysteine on oxidative stress and NF- κ B in heart failure rabbits and its mechanism [J]. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2015, 32(2): 55-58 (in Chinese)
- [9] Abdel Naim A, Hamada F, Abdel Aziz A, et al. Acrylonitrile (VCN)-induced testicular toxicity in the rat [J]. Toxicologist, 1994, 14(1): 87
- [10] 孙建新,安娟,连军. 影响实验动物脏器重量及脏器系数因素分析 [J]. 实验动物科学, 2009, 26(1): 49-52
- [11] 耿江. 丙烯腈对雄性精子质量的影响及 genistein 拮抗丙烯腈致睾丸 Leydig 细胞毒性的实验研究 [D]. 上海: 复旦大学, 2009: 14-20
Geng J. The effect of acrylonitrile exposure on male sperm quality and experimental study on genistein antagonize testicular Leydig toxicity induced by acrylonitrile [D]. Shanghai: Fudan University, 2009: 14-20 (in Chinese)
- [12] 党瑜慧,薛红丽,陈亚,等. 丙烯腈对雄性小鼠生殖细胞毒性作用的研究 [J]. 毒理学杂志, 2014, 28(6): 460-462
- [13] Noor R, Mittal S, Iqbal J. Superoxide dismutase—Applications and relevance to human disease [J]. Medical Science Monitor, 2002, 8(9): 210-215
- [14] 赵乾龙,罗波艳,潘丽. 丙烯腈诱导的氧化应激对大鼠睾丸 NF- κ B 信号通路的影响 [J]. 生态毒理学报, 2016, 11(4): 155-160
Zhao Q L, Luo B Y, Pan L. Effects of oxidative stress in-

- duced via acrylonitrile on NF- κ B signaling pathway in rats testis [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(4): 155-160 (in Chinese)
- [15] Esmat A , El-Demerdash E M H, Abdel-Naim A. Toxicity and oxidative stress of acrylonitrile in rat primary glial cells: Preventive effects of N-acetylcysteine[J]. *Toxicology Letters*, 2007, 171(3): 111-118
- [16] Beaux A C D , Ross J A , Maingay J P , et al. Proinflammatory cytokine release by peripheral blood mononuclear cells from patients with acute pancreatitis [J]. *British Journal of Surgery*, 2010, 83(8): 1071-1075
- [17] Cybulsky M I, Chan M K, Movat H Z. Acute inflammation and microthrombosis induced by endotoxin, interleukin-1, and tumor necrosis factor and their implication in gram-negative infection [J]. *Laboratory Investigation*, 1988, 58(4): 365-378
- [18] Wu J, Xue X, Wu Z, et al. Antitumor effect of paeonol via regulating NF- κ B, AKT and MAPKs activation: A quick review [J]. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 2014(4): 9-14
- [19] Tornatore L . The nuclear factor kappa B signaling pathway: Integrating metabolism with inflammation [J]. *Trends in Cell Biology*, 2012, 22(11): 557-566
- [20] Beuke K, Schildberg F, Pinna F, et al. A computational multi-scale model for the integration of paracrine stimuli activating NF- κ B signalling in hepatocytes after lipopolysaccharide (LPS) treatment [J]. *Zeitschrift für Gastroenterologie*, 2015, 53(12): A1-A4
- [21] Andrew V, Li J, Zhang J, et al. Blocking TNF and IL-1 sensitizes AML stem cells to NF- κ B inhibitor treatment [J]. *Blood*, 2014, 124(21): 2302
- [22] Wei H. Dual-parallel inhibition of IL-10 and TGF- β 1 controls LPS-induced inflammatory response via NF- κ B signaling in grass carp monocytes/macrophages [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2015, 44(2): 445-452
- [23] Scwabas G M, Fujioka S, Schmidt C, et al. NF-kappaB in pancreatic cancer [J]. *International Journal of Gastrointestinal Cancer*, 2003, 33(1): 15-26
- [24] Dang Y, Zhao Q, Luo B, et al. Effects of acrylonitrile-induced oxidative stress on testicular apoptosis through activation of NF- κ B signaling pathway in male sprague dawley rats [J]. *American Journal of Translational Research*, 2017, 9(9): 4227-4235 ◆