

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20180906004

安洁然, 江清英, 李福宏, 等. 诱导型 Hsp70 在外源性甲醛对小鼠肝肾氧化损伤中的保护作用[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(2): 222-230

An J R, Jiang Q Y, Li F H, et al. Inducible Hsp70 protected liver and kidney of mice from the oxidative damage induced by exogenous formaldehyde [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(2): 222-230 (in Chinese)

## 诱导型 Hsp70 在外源性甲醛对小鼠肝肾氧化损伤中的保护作用

安洁然<sup>1</sup>, 江清英<sup>2</sup>, 李福宏<sup>1</sup>, 赵云<sup>1</sup>, 丁书茂<sup>1,\*</sup>

1. 华中师范大学, 遗传调控与整合生物学湖北重点实验室, 武汉 430079

2. 重庆市开州中学, 开州 405400

收稿日期: 2018-09-06 录用日期: 2018-11-05

**摘要:** 为探讨外源性甲醛是否会对小鼠肝脏和肾脏的热休克蛋白 70(heat shock protein 70, Hsp70)产生影响, 选雄性 Balb/c 小鼠为研究对象, 采用动态吸入方式染毒 2 周, 每周 5 d, 每天 8 h, 随机分为空白对照组、3 mg·m<sup>-3</sup> 甲醛染毒组。染毒结束后, 计算肝脏和肾脏的脏体比, 检测各器官中活性氧(reactive oxygen species, ROS)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)的含量, 同时用实时荧光定量 PCR(real-time PCR, RT-PCR)法检测 *Hsp70* 的基因表达, 并通过 H & E 染色观察形态学变化。结果表明: 与对照组相比, 2 种器官的脏体比均显著下降( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); ROS、MDA 含量上升、GSH 含量下降, 出现显著性差异( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); *Hsp70* 基因表达水平下降且差异显著( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); H & E 切片显示, 甲醛暴露使肝脏的中央静脉窦的破损程度增加、细胞核变大, 肾脏中肾小中肾小球基底膜变窄、体积缩小甚至分解。上述结果表明, 甲醛暴露会对小鼠的肝脏和肾脏造成不同程度的氧化损伤, 小鼠可通过上调 *Hsp70* 的基因表达以增强机体的抗氧化能力。

**关键词:** 外源性甲醛; 诱导型 Hsp70; 氧化性损伤

文章编号: 1673-5897(2019)2-222-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Inducible Hsp70 Protected Liver and Kidney of Mice from the Oxidative Damage Induced by Exogenous Formaldehyde

An Jieran<sup>1</sup>, Jiang Qingying<sup>2</sup>, Li Fuhong<sup>1</sup>, Zhao Yun<sup>1</sup>, Ding Shumao<sup>1,\*</sup>

1. Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, Central China Normal University, Wuhan 430079, China

2. Kaizhou Middle School, Kaizhou 405400, China

Received 6 September 2018 accepted 5 November 2018

**Abstract:** In order to explore the role of heat shock protein 70 (Hsp70) in the toxic effect of exogenous formaldehyde (FA), male Balb/c mice were exposed to FA (3 mg·m<sup>-3</sup>) or clean room air by nose-only inhalation for 8 h·d<sup>-1</sup>, 5 days per week for two weeks. At the next day of the last-day exposure, the live and kidney tissues were collected for the terminal detection. Compared with the control group, the organ coefficients of liver or kidney tissues in the FA group significantly decreased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). The content of reactive oxygen species (ROS) and ma-

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(No. 21577045)

作者简介: 安洁然(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境生物医学, E-mail: 765450866@qq.com;

\* 通讯作者( Corresponding author), E-mail: dingsm@mail.ccnu.edu.cn

londialdehyde (MDA) both significantly increased ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ), while the level of glutathione (GSH) decreased significantly ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Meanwhile, the gene expression level of *Hsp70* was detected by real-time PCR (RT-PCR), and reduced significantly ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Pathological data of the H & E staining slices showed that FA exposure aggravated the damage on the central venous sinus, and the nucleuses were enlarged in the liver. What's more, the glomerular basement membrane of kidney became narrower, and its volume was reduced or even decomposed. The results indicated that the oxidative stress induced by FA in kidney and liver tissues could be reversed by up-regulating *Hsp70* gene expression.

**Keywords:** exogenous formaldehyde (FA); inducible heat shock protein 70; oxidative damage

甲醛(formaldehyde, FA)是一种应用广泛的工业化工原料,同时也是常见的室内空气污染物。甲醛可由呼吸道进入生物体内,并与肺、脑、肝、肾等器官直接接触后对其造成严重损伤,引起生殖毒性<sup>[1]</sup>、神经毒性<sup>[2]</sup>、心血管毒性<sup>[3]</sup>、免疫毒性<sup>[4-6]</sup>、呼吸毒性<sup>[7]</sup>等多种毒性,对人体的健康产生极大影响。一般情况下,机体细胞为了降低甲醛所带来的损伤会激发氧化应激反应将其降解,但如果涉入的甲醛过多,降解甲醛产生的活性氧自由基会因组织细胞清除能力有限而积累,使组织中的细胞膜发生脂质过氧化反应,出现氧化性损伤<sup>[8-9]</sup>。

诱导型热休克蛋白 70(inducible heat shock protein, Hsp70)是生物体在应激状态下诱导合成的一组高度保守的蛋白质,属于 Hsp70 家族中重要的一员,也是热休克蛋白家族中最受关注的蛋白质。Hsp70 具有多种功能,它可作为分子伴侣,参与蛋白质的折叠、运输、解离、降解、变性蛋白的清除以及特定构象的维持<sup>[10]</sup>,还能对抗 DNA 损伤<sup>[11]</sup>、抑制细胞凋亡<sup>[12]</sup>、提高细胞对热应激的耐受性<sup>[13]</sup>以及维护神经系统的结构和功能<sup>[14-15]</sup>。值得注意的是,研究还表明,Hsp70 具有较高的抗氧化能力,可以通过多种途径抵抗外来化合物造成的氧化性损伤和遗传性损伤,并增加生物体内源性抗氧化剂的合成和释放<sup>[16]</sup>。

肝脏是机体最大的解毒器官,是有毒物质转化和积累的场所。肾脏则是主要的排泄器官,也是排毒的场所。小鼠经甲醛暴露后,其肝脏和肾脏内的氧化损伤情况已有研究,但甲醛暴露对这 2 种器官中 *Hsp70* 的基因表达水平是否会产生影响,这种影响与甲醛引起的氧化损伤之间的关系如何,相关的文献报道却很少。*Hsp70* 与肝脏抗氧化方面的研究同样鲜有报道。本实验以 Balb/c 小鼠为研究对象,通过气态甲醛染毒,以验证小鼠肝脏和肾脏组织中的氧化损伤情况,并测定 2 种器官中 *Hsp70* 基因的表达量,探讨外源性甲醛能否对小鼠 *Hsp70* 的表达

水平产生影响。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 Balb/c 小鼠,5~6 周龄,体重 20 g 左右,购于湖北省疾病预防控制中心,购买后先饲养 1 周左右,待小鼠适应环境后再进行实验。

### 1.2 实验试剂和仪器

4% 的甲醛原液 (Sigma 公司),Folin-酚试剂盒 (北京鼎国昌盛生物科技有限公司,FLF 01),GSH 测试盒 (南京建成生物工程研究所, A005),DCFH-DA 荧光染料 (Sigma 公司),小型智能环境气候仓 (WH-2 型,武汉市宇信科技开发有限公司),气态甲醛浓度测定仪 (4160-2 型,INTERSCAN 公司,美国),全波长酶标仪 (DNM-9602 型,北京普朗新技术有限公司),微量分光光度计 (ND-1000 型, Thermo Scientific 公司,美国),荧光酶标仪 (FLx-800, Bio-Tex 公司,美国),荧光定量 PCR 仪 (CPX96 Touch, Bio-Rad 公司,美国)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 甲醛染毒方案

将 12 只 Balb/c 小鼠随机分为 2 组,分别为:对照组和 3 mg·m<sup>-3</sup> 甲醛染毒组,每组 6 只。采用职业气态暴露方式 (每天 8 h,每周 5 d,持续 2 周),经 WH-2 小型智能环境气候仓调配后,保持进行甲醛染毒时的温度为 (22 °C ± 2 °C)、湿度为 (50% ± 5%)、气流速度为 (1.65 m<sup>3</sup>·h<sup>-1</sup> ± 0.15 m<sup>3</sup>·h<sup>-1</sup>),并每隔 2 h 用甲醛测定仪检测一次甲醛浓度。甲醛暴露所取浓度根据中华人民共和国卫生部规定的职业接触限值进行设定<sup>[17]</sup>。

#### 1.3.2 小鼠肝脏和肾脏的组织匀浆液制备

染毒结束后,将小鼠脱颈处死,取出肝脏和肾脏后称重,加入一定量的预冷的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS, pH 7.4) 中,用玻璃匀浆器在冰上充分匀浆,制成 10% 的组织匀浆液,并于 4 °C、

10 000 g,离心 15 min,留取上清备用。

### 1.3.3 小鼠肝脏和肾脏的脏体比计算

染毒结束后,处死小鼠,并称量、记录 2 组小鼠体重。取其肝肾后,准确称取每组小鼠肝脏、肾脏的质量,最后计算肝脏和肾脏的脏体比。计算公式如下:

$$\text{脏体比} = \frac{\text{肝脏或肾脏质量(g)}}{\text{体重(g)}}$$

### 1.3.4 小鼠肝脏和肾脏氧化损伤检测

活性氧(reactive oxygen species, ROS)含量检测:取一定量 10% 的小鼠肝脏和肾脏的组织匀浆液,用预冷的 PBS 溶液分别稀释 50 倍作为样液。将 100  $\mu\text{L}$  的样液和 100  $\mu\text{L}$  0.2  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 DCFH-DA 荧光染料混合均匀后,在 37  $^{\circ}\text{C}$  恒温箱中避光孵育 10 ~ 15 min。用 FLX800 荧光酶标仪在激发波长 499 nm 和发射波长 525 nm 下检测吸光度。

丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量检测:按照 Folin-酚试剂盒说明书步骤制作标准曲线以及测定小鼠肝脏和肾脏中的 MDA 含量。MDA 的计算公式如下:

$$\text{MDA 含量} = [6.45 \times (\text{OD}_{532\text{ nm}} - \text{OD}_{600\text{ nm}}) - 0.56 \times \text{OD}_{450\text{ nm}}] / \text{Prot}$$

其中  $\text{OD}_{450}$ 、 $\text{OD}_{532}$ 、 $\text{OD}_{600}$  表示在 450 nm、532 nm、600 nm 波长下的吸光度,Prot 表示总蛋白浓度。

还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量检测:严格按照微还原型谷胱甘肽试剂盒说明书,进行肝脏和肾脏中 GSH 含量的测定。

### 1.3.5 实时荧光定量 PCR(real-time PCR, RT-PCR)法测定 Hsp70 的相对表达量

总 RNA 的提取:取 0.1 g 肝肾组织加入液氮后迅速碾磨至粉末状,加入 1 mL Trizol 混匀,液体全部转移到 1.5 mL 无酶 EP 管,冰上放置 10 min。加 200  $\mu\text{L}$  氯仿混匀后剧烈震荡,并以 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 g 离心 15 min。取上层水相,加入 500  $\mu\text{L}$  异丙醇混匀

后,冰上放置 10 min,以 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 g 离心 10 min。弃去上清后,加入 75% 的乙醇(0.1% 的焦碳酸二乙酯(diethyl procarbonate, DEPC)水配制)后以 4  $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 g 离心 15 min,小心弃去上清。充分干燥后用 20  $\mu\text{L}$  0.1% 的 DEPC 水溶解沉淀。用微量分光光度计检测 RNA 的纯度和浓度。

逆转录:严格按照逆转录试剂盒说明书进行,在 200  $\mu\text{L}$  的无酶 EP 管中依次加入 7  $\mu\text{L}$  ddH<sub>2</sub>O、2  $\mu\text{L}$  反转录 mix、1  $\mu\text{L}$  RNA,混匀。反应条件为 25  $^{\circ}\text{C}$ 、10 min,50  $^{\circ}\text{C}$ 、30 min,85  $^{\circ}\text{C}$ 、5 min。最后用微量分光光度计检测 cDNA 的纯度和浓度。

RT-PCR:以逆转录形成的 cDNA 为模板,采用 Premier 5.0 软件设计 Hsp70 基因和内参基因的引物后,由南京金斯瑞生物科技公司合成(表 1)。RT-PCR 反应体系 20  $\mu\text{L}$ ,反应条件为 95  $^{\circ}\text{C}$ 、3 min,95  $^{\circ}\text{C}$ 、10 s,52  $^{\circ}\text{C}$ 、30 s,39 个循环,熔解曲线 65 ~ 95  $^{\circ}\text{C}$ ,增量 0.5  $^{\circ}\text{C}$ ,5 s 读数一次。

### 1.3.6 小鼠肝脏和肾脏组织切片制备

取小鼠新鲜肝脏和肾脏置于多聚甲醛固定液 48 h 后,经过脱色、清洗、苏木精-伊红(H & E)染色、脱水、石蜡包埋后制作成 10  $\mu\text{m}$  厚的切片,在光学显微镜下观察组织的形态特征变化。

## 1.4 数据分析

采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 q 检验对实验数据进行统计与整理。使用 Origin 6.0 软件制图。其中, $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义,用“\*”表示; $P < 0.01$  表示差异具有高度统计学意义,用“\*\*”表示。

## 2 结果(Results)

### 2.1 小鼠肝脏和肾脏的脏体比

经过 2 周的甲醛暴露后,在处死当天称量小鼠的体重及肝脏、肾脏的质量,并分别计算脏体比,如

表 1 Hsp70 基因、 $\beta$ -actin 引物序列

Table 1 Primer sequence of Hsp70 gene and  $\beta$ -actin

| 基因名称<br>The gene | 引物序列(5' -3')<br>Primer sequences (5' -3') | $T_m/^{\circ}\text{C}$ | 大小/bp<br>Size/bp |
|------------------|---|------------------------|------------------|
| Hsp70            | ATGAAGGAGATCGCTGAG                        | 50.9                   | 18               |
|                  | TGAGAGTCGTTGAAGTAGG                       | 50.9                   | 19               |
| $\beta$ -actin   | GCCAAATTCAACGGCACAGT                      | 57.1                   | 20               |
|                  | AGATGGTGATGGGCTTCCC                       | 56.2                   | 19               |

注: $T_m$  为退火温度。

Note:  $T_m$  stands for annealing temperature.

图 1 所示。图 1a 表示小鼠肝脏的脏体比,可以看出相比于对照组,3 mg·m<sup>-3</sup>的甲醛染毒降低了小鼠肝脏的脏体比,且差异具有统计学意义( $P<0.05$ );小鼠的肾脏脏体比由图 1b 显示,从中看出 3 mg·m<sup>-3</sup>的甲醛对肾脏造成了更明显的影响,小鼠的脏体比出现显著下降( $P<0.01$ )。

### 2.2 小鼠肝脏和肾脏氧化损伤情况

经染毒后,分别用 ROS、MDA、GSH 的含量变化反映小鼠肝脏和肾脏的氧化损伤情况。图 2 表示的是小鼠肝脏和肾脏中 ROS 含量的变化。由图 2a 可知,甲醛染毒使小鼠肝脏的 ROS 含量略有升高;在图 2b 中可以看出,小鼠肾脏在 3 mg·m<sup>-3</sup>的甲醛

作用下,其 ROS 含量较空白对照组上升幅度稍大,但也无明显统计学意义。

MDA 的含量变化在图 3 中展示。可以看到,肝脏(图 3a)和肾脏(图 3b)的 MDA 含量经甲醛处理后,均出现显著增加( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。

甲醛染毒对于小鼠肝脏和肾脏中 GSH 含量的影响如图 4 所示。由图 4 可知,甲醛染毒后,小鼠肝脏和肾脏 GSH 含量变化趋势与 ROS 和 MDA 含量相反。对于肝脏(图 4a),甲醛染毒组的 GSH 含量显著低于空白对照组( $P<0.05$ );同样,甲醛染毒后的肾脏(图 4b)中 GSH 含量大幅度减少,具有明显的统计学意义( $P<0.01$ )。

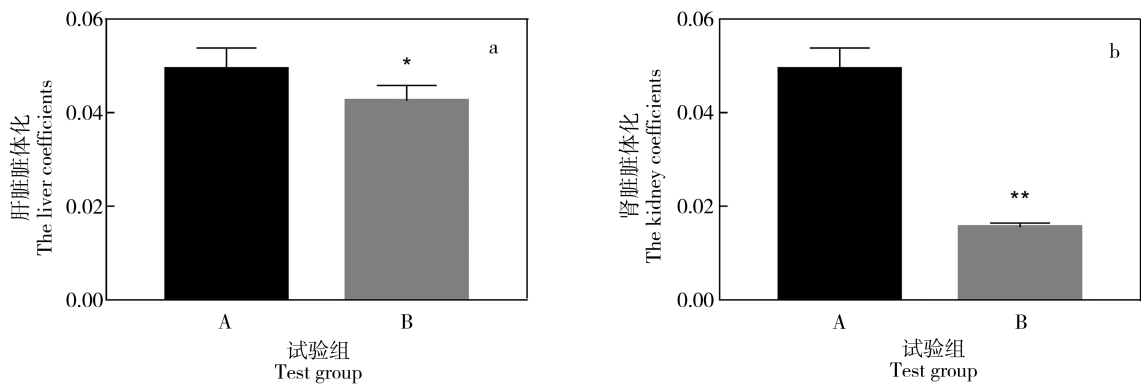


图 1 小鼠肝脏和肾脏的脏体比图

注:“\*”, $P<0.05$ ;“\*\*”, $P<0.01$ ,与空白对照组相比。A 为空白对照组,B 为 3 mg·m<sup>-3</sup>染毒组。

Fig. 1 The organ coefficients of liver and kidney with body weight of mice

Note: “\*”, $P<0.05$ ; “\*\*”, $P<0.01$ , compared with the control group. A, control group; B, 3 mg·m<sup>-3</sup> group.

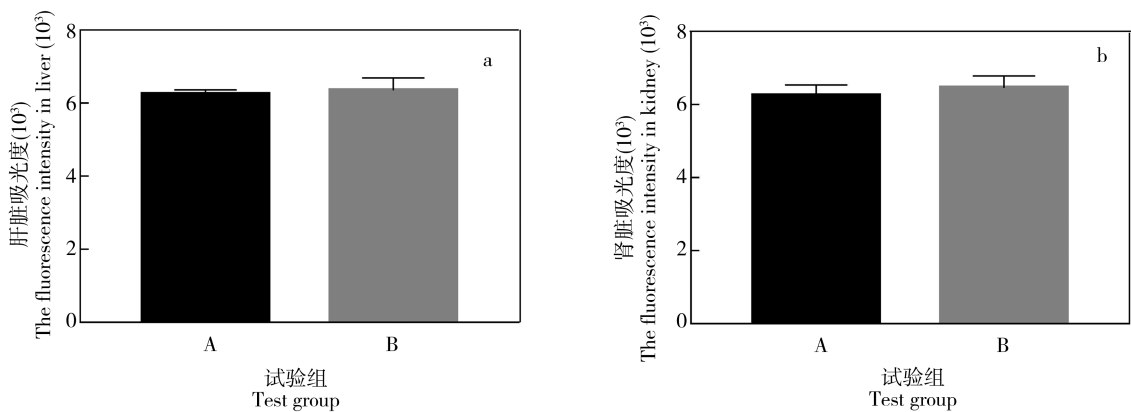


图 2 小鼠肝脏和肾脏 ROS 含量变化

注:用吸光度表征 ROS 含量的大小,吸光度越大,ROS 含量越高。

“\*\*”, $P<0.05$ ;“\*\*\*”, $P<0.01$ ,与空白对照组相比。A 为空白对照组,B 为 3 mg·m<sup>-3</sup>染毒组。

Fig. 2 The content of ROS in mice liver and kidney

Note: The fluorescence intensity is used to characterize ROS levels, and the larger fluorescence intensity indicates a higher ROS level.

“\*\*”, $P<0.05$ ; “\*\*\*”, $P<0.01$ , compared with the control group. A, control group; B, 3 mg·m<sup>-3</sup> group.

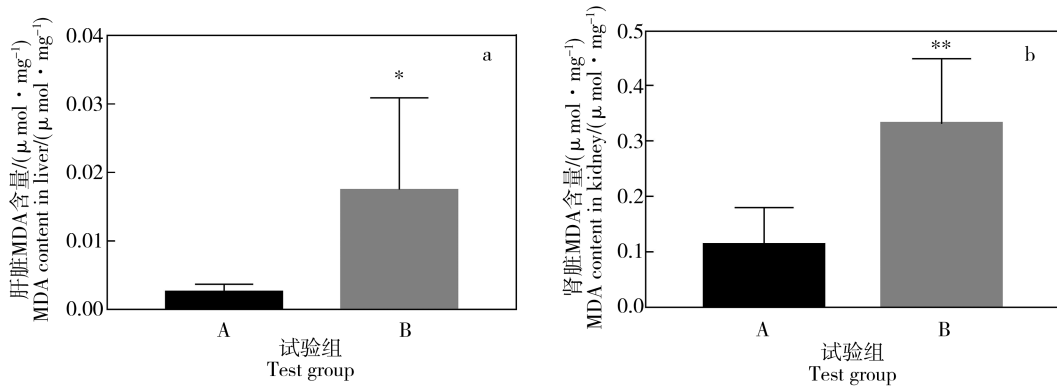


图3 小鼠肝脏和肾脏MDA含量变化

注：“\*”， $P < 0.05$ ；“\*\*”， $P < 0.01$ ，与空白对照组相比。A为空白对照组，B为 $3 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 染毒组。

Fig. 3 The content of MDA in mice liver and kidney

Note: “\*”， $P < 0.05$ ；“\*\*”， $P < 0.01$ ，compared with the control group. A, control group; B,  $3 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$  group.

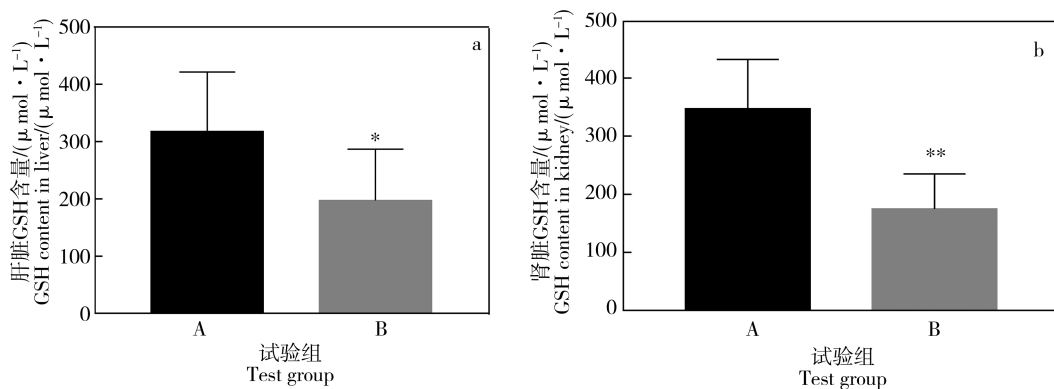


图4 小鼠肝脏和肾脏GSH含量变化

注：“\*”， $P < 0.05$ ；“\*\*”， $P < 0.01$ ，与空白对照组相比。A为空白对照组，B为 $3 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 染毒组。

Fig. 4 The content of GSH in mice liver and kidney

Note: “\*”， $P < 0.05$ ；“\*\*”， $P < 0.01$ ，compared with the control group. A, control group; B,  $3 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$  group.

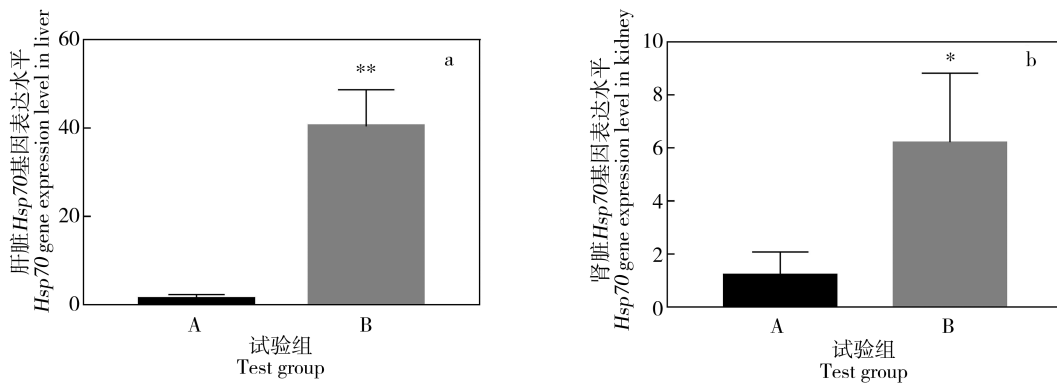


图5 小鼠肝脏和肾脏中Hsp70的表达情况

注：“\*”， $P < 0.05$ ；“\*\*”， $P < 0.01$ ，与空白对照组相比。A为空白对照组，B为 $3 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ 染毒组。

Fig. 5 The gene expression level of Hsp70 in mice liver and kidney

Note: “\*”， $P < 0.05$ ；“\*\*”， $P < 0.01$ ，compared with the control group. A, control group; B,  $3 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$  group.

### 2.3 小鼠肝脏和肾脏 Hsp70 的表达情况

采用 RT-PCR 法对小鼠肝脏和肾脏中 Hsp70 的基因表达情况进行测定,结果如图 5 所示。图 5a 表示小鼠肝脏中 Hsp70 的基因表达情况,空白对照组中该基因表达水平明显低于甲醛染毒组( $P < 0.01$ ),肝脏组织中 Hsp70 的表达量很低,在经过甲醛染毒处理后,组织中 Hsp70 的表达水平显著升高( $P < 0.01$ );小鼠的肾脏(图 5b)经过甲醛染毒处理后,

Hsp70 的表达水平同样出现显著升高的趋势( $P < 0.05$ )。对比两图,可以发现肝脏中 Hsp70 的表达水平明显高于肾脏。

### 2.4 小鼠肝脏和肾脏组织切片的 H & E 染色

甲醛染毒后小鼠肝脏的病理形态图,如图 6 所示,图 6a 和图 6b 均为小鼠肝脏组织中央静脉窦的横切面图,图 6c 和图 6d 则为小鼠肝脏细胞图。可以看到,空白对照组(图 6a)小鼠的中央静脉窦大多

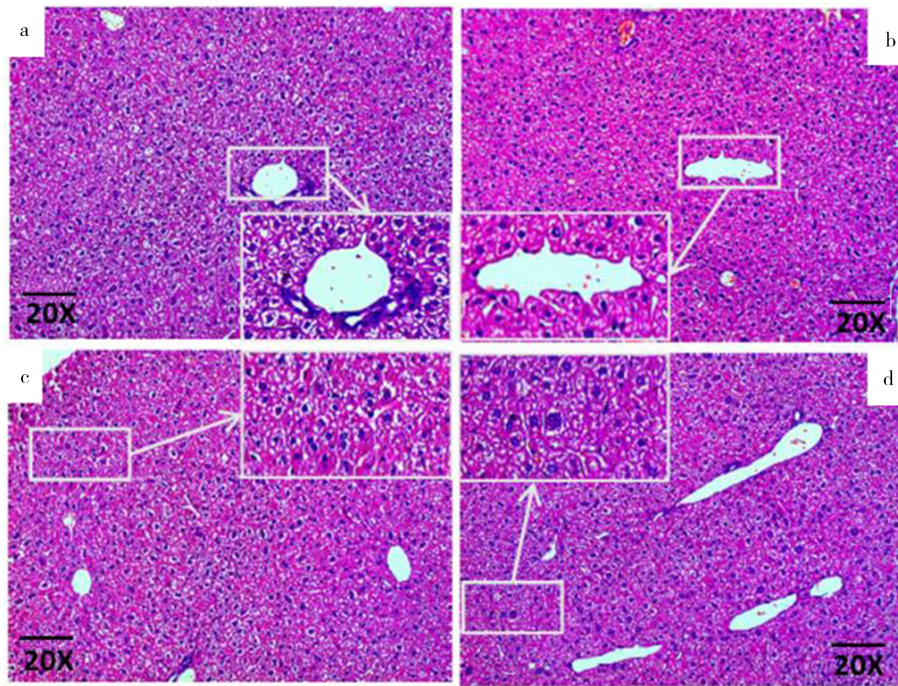


图 6 小鼠肝脏 H & E 染色

注:a 和 c 为空白对照组,b 和 d 为 3 mg·m<sup>-3</sup>染毒组。

Fig. 6 The hematoxylin-eosin staining of mice liver

Note: a and c, control group; b and d, 3 mg·m<sup>-3</sup> group.

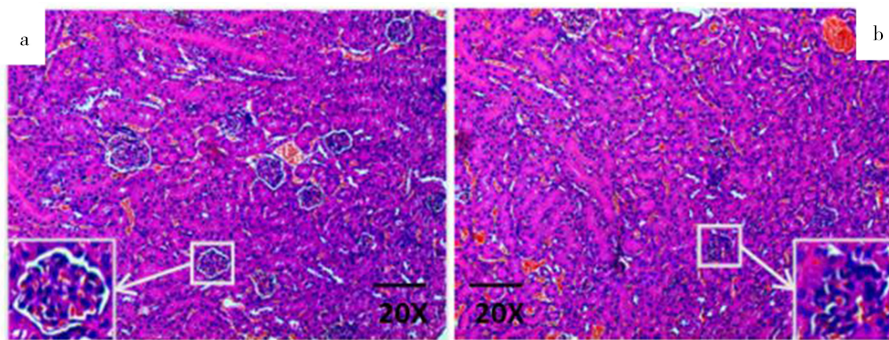


图 7 小鼠肾脏 H & E 染色

注:a 为空白对照组,b 为 3 mg·m<sup>-3</sup>染毒组。

Fig. 7 The hematoxylin-eosin staining of mice kidney

Note: a, control group; b, 3 mg·m<sup>-3</sup> group.

为圆形或椭圆形,而经甲醛染毒后,中央静脉窦却呈现不规则的形态,且管壁出现明显破损(图 6b);在细胞层面,无论哪组细胞,其外在形态和排列方式无明显差异,但  $3 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$  的甲醛染毒组(图 6d)细胞的细胞核体积增大,而空白对照组(图 6c)细胞核形态大小基本正常。

甲醛染毒后小鼠肾脏的病理形态图,如图 7 所示。从图 7b 可以看出,甲醛染毒后,小鼠肾脏血管的管腔中淤血(见图中橘红色区域)的堆积量明显多于空白对照组(图 7a)。此外,染毒组的小鼠肾小球(见图 7b 放大部分)基底膜明显变窄,呈松散状态,且肾小球体积缩小甚至消失,而正常形态下的肾小球(见图 7a 放大部分)基底膜较宽,体积较大。

### 3 讨论(Discussion)

#### 3.1 小鼠肝肾的脏体比

在正常情况下,动物的脏体比不会发生太大变化,但经过特殊处理后,脏体比会因动物体内器官的质量变化而发生改变<sup>[18]</sup>。若动物器官出现增生、肿胀、出血、积水或产生新生物等症状,则脏体比变大<sup>[19]</sup>;而当脏器明显呈现坏死、萎缩、脱水或腐离等状态时,脏体比减小<sup>[20]</sup>。因此脏体比可以比较综合地反映有毒物质对脏器的毒性,作为评判动物脏器受损程度和营养状态的一种指标。在本次实验中,甲醛染毒组的脏体比明显低于对照组,肝脏明显变小且颜色发黑,这说明甲醛暴露对肝脏造成了损伤,使脏体比减小;同时,甲醛及其代谢产物在排泄的过程中会在肾脏积累,对肾脏产生毒性作用,对其造成损害,也使肾脏的脏体比降低。

#### 3.2 甲醛染毒对小鼠肝脏和肾脏的氧化性损伤

生物体在正常情况下都有比较完善的活性氧清除机制,但当机体遭受到化学有毒物质或某些药物的侵害时就会打破这种平衡,使得自由基代谢失调以及机体抗氧化体系紊乱,倾向于氧化状态<sup>[21]</sup>。ROS 是指在代谢过程中需氧细胞产生的一系列活性氧簇,包括含氧自由基、氧离子和过氧化物等<sup>[22]</sup>。GSH 可以和 ROS 结合形成硫代半缩醛,并可通过抗坏血酸-谷胱甘肽循环生成更具更强抗氧化作用的抗坏血酸,清除脂质过氧化物、氧气、过氧化氢等,将机体中的有毒物质转化为无毒,排出体外<sup>[23]</sup>。丙二醛(MDA)是膜脂质过氧化的代谢产物,通常表示 ROS 对脂质的损害<sup>[24]</sup>。这 3 种指标均可作为有效评价氧化应激的重要指标。

本实验中,无论是肝脏还是肾脏,在经过甲醛染

毒后 ROS 含量都有升高,这说明甲醛暴露促进了机体内 ROS 代谢反应的进行,使得 ROS 含量增加,破坏了细胞内的大分子物质。此外,染毒后的肝脏和肾脏的 MDA 含量的增高趋势具有明显的统计学意义,表明甲醛确实在促进机体脂质过氧化反应时,产生了脂质过氧化产物,加重机体清除活性氧的负担,降低了细胞的抗氧化能力,从而造成细胞的氧化性损伤。同样,结果表明,空白对照组小鼠的 GSH 含量明显高于甲醛染毒组,说明甲醛暴露使小鼠组织中自由基和脂质过氧化物产生过多,从而造成 GSH 的大量消耗,细胞的抗氧化能力降低,氧化性损伤加重。

#### 3.3 甲醛染毒对 Hsp70 表达量的影响

正常情况下,Hsp70 的表达水平比较低。只有当机体遭受高温或者有害物质攻击时,体内 Hsp70 的合成量会在很短时间内达到较高水平,并且其他蛋白质合成相对减少,以此提升机体对外界不良环境的抗应激能力<sup>[13]</sup>。本实验中,对照组小鼠的肝脏和肾脏中 Hsp70 的表达量很低,呈现基础状态,而经甲醛染毒后,机体的应激体系被激活,启动了热休克蛋白基因的转录,使得 Hsp70 的表达量升高。

Hsp70 可通过抑制产生 NADPH 氧化酶,增强谷胱甘肽还原酶的活力,促进 GSH 的生成,减少细胞中自由基的含量<sup>[25-26]</sup>,同时也使细胞中的 MDA 含量上升<sup>[27]</sup>。在本研究中,甲醛暴露后肝脏中 Hsp70 的基因表达水平远高于肾脏中的表达水平,而同时肾脏中 GSH 含量下降幅度、MDA 含量上升幅度均比肝脏中多,与上述文献结果一致。

一般情况下,因 Hsp70 有一定的抗氧化作用,所以若 Hsp70 表达量显著升高,机体内 GSH 含量会上升,ROS、MDA 含量会下降,而在本实验中肝脏还是肾脏的 GSH 含量均下降,ROS、MDA 含量均上升,这可能是因为甲醛染毒引起的细胞应激系统的保护作用是有限的:当甲醛浓度过高时,Hsp70 产生的保护效用不足以抵抗甲醛所造成的损伤,从而会使自由基和脂质过氧化物积累过多,GSH 和 SOD 的消耗量高于生成量,细胞的抗氧化能力降低,ROS 和 MDA 的生成量增加。

综上,本研究表明甲醛暴露使小鼠肝脏和肾脏出现氧化性损伤,各组织出现较严重的病理性变化,同时肝脏和肾脏中 Hsp70 的基因表达水平被上调,促进该基因大量合成及表达来抵抗甲醛引起的氧化

性损伤。

**致谢:**感谢国家自然科学基金面上项目(No. 21577045)对本研究的资助。

**通讯作者简介:**丁书茂(1966-),男,生物学硕士,副教授,硕士生导师,主要从事室内空气环境与健康、生态毒理学研究,包括甲醛、邻苯二甲酸酯、纳米材料等在整体、细胞和分子水平上的毒性发生机制和危险度评价等方面工作。

#### 参考文献 (References):

- [1] Askaripour M, Hasanpour A, Hosseini F, et al. The effect of aqueous extract of *Rosa damascena* on formaldehyde-induced toxicity in mice testes [J]. *Pharmaceutical Biology*, 2018, 56(1): 12-17
- [2] Mohammadi S. Effect of selenium on neurotoxicity in adult male mice exposed to formaldehyde [J]. *Electronic Physician*, 2014, 6(4): 939-943
- [3] Wu D, Jiang Z, Gong B, et al. Vitamin E reversed apoptosis of cardiomyocytes induced by exposure to high dose formaldehyde during mice pregnancy [J]. *International Heart Journal*, 2017, 58(5): 769-777
- [4] Abd-Elhakim Y M, Mohamed A A, Mohamed W A. Hemato-immunologic impact of subchronic exposure to melamine and/or formaldehyde in mice [J]. *Journal of Immunotoxicology*, 2016, 13(5): 713-722
- [5] Wen H, Yuan L, Wei C, et al. Effects of combined exposure to formaldehyde and benzene on immune cells in the blood and spleen in Balb/c mice [J]. *Environmental Toxicology & Pharmacology*, 2016, 45: 265-273
- [6] Wei H, Tan K, Sun R, et al. Aberrant production of Th1/Th2/Th17-related cytokines in serum of C57BL/6 mice after short-term formaldehyde exposure [J]. *International Journal of Environmental Research & Public Health*, 2014, 11(10): 10036-10050
- [7] Liu D, Zheng Y, Li B, et al. Adjuvant effects of gaseous formaldehyde on the hyper-responsiveness and inflammation in a mouse asthma model immunized by ovalbumin [J]. *Journal of Immunotoxicology*, 2011, 8(4): 305-314
- [8] Lima L F, Murta G L, Bandeira A C, et al. Short-term exposure to formaldehyde promotes oxidative damage and inflammation in the trachea and diaphragm muscle of adult rats [J]. *Annals of Anatomy*, 2015, 202: 45-51
- [9] Ciftci G, Aksoy A, Cenesiz S, et al. Therapeutic role of curcumin in oxidative DNA damage caused by formaldehyde [J]. *Microscopy Research & Technique*, 2015, 78(5): 391-395
- [10] Halasi M, Váraljai R, Benevolenskaya E, et al. A novel function of molecular chaperone HSP70 [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2016, 291: 142-148
- [11] Truman A W, Kristjansdottir K, Wolfgeher D, et al. The quantitative changes in the yeast Hsp70 and Hsp90 interactomes upon DNA damage [J]. *Data in Brief*, 2015, 2 (C): 12-15
- [12] Hu Y, Zhou Y, Yang G, et al. Sulforaphane-N-acetyl-cysteine inhibited autophagy leading to apoptosis via Hsp70-mediated microtubule disruption [J]. *Cancer Letters*, 2018, 431: 85-95
- [13] Wang X R, Bin Y, Min S, et al. Overexpression of a *Brassica campestris* HSP70 in tobacco confers enhanced tolerance to heat stress [J]. *Protoplasma*, 2016, 253(3): 637-645
- [14] Yi H, Huang G, Zhang K, et al. HSP70 protects rats and hippocampal neurons from central nervous system oxygen toxicity by suppression of NO production and NF- $\kappa$ B activation [J]. *Experimental Biology & Medicine*, 2018, 243(9): 770-779
- [15] Kowalczyk M, Owczarek A, Suchanek R, et al. Heat shock protein 70 gene polymorphisms are associated with paranoid schizophrenia in the Polish population [J]. *Cell Stress & Chaperones*, 2014, 19(2): 205-215
- [16] Padmini E, Geetha B V. Impact of season on liver mitochondrial oxidative stress and the expression of HSP70 in grey mullets from contaminated estuary [J]. *Ecotoxicology*, 2009, 18(3): 304-311
- [17] Tang X, Bai Y, Duong A, et al. Formaldehyde in China: Production, consumption, exposure levels, and health effects [J]. *Environment International*, 2009, 35(8): 1210-1224
- [18] 王爱华, 李继连, 张斌, 等. 苏丹红 I 对小鼠血液和脏器系数的影响[J]. *食品科学*, 2010, 31(5): 279-282  
Wang A H, Li J L, Zhang B. Effect of Sudan I on blood and organ coefficients of mice [J]. *Food Science*, 2010, 31(5): 279-282 (in Chinese)
- [19] 安松兰, 张善玉, 朴惠顺. 1 年生黄芪中黄芪多糖对小鼠免疫器官指数的影响[J]. *延边大学医学学报*, 2007, 30(1): 20-22  
An S, Zhang S, Piao H, et al. Effects of polysaccharides from the annual *Astragalus* on immuno-organs coefficients on mice [J]. *Journal of Medical Science Yanbian University*, 2007, 30(1): 20-22 (in Chinese)
- [20] Tang B, Liu X, Ma Y, et al. Measurement of organ weight, organ coefficients and blood indices in HSF<sub>1</sub> knockout mice [J]. *Chinese Journal of Laboratory Animal Science*, 2002, 12(3): 153-156



- [21] Storz G, Imlay J A. Oxidative stress [J]. *Current Opinion in Microbiology*, 1999, 2(2): 188-194
- [22] You B R, Park W H. Auranofin induces mesothelioma cell death through oxidative stress and GSH depletion [J]. *Oncology Reports*, 2015, 35(1): 546-551
- [23] Valko M, Rhodesb C J, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2006, 160(1): 1-40
- [24] Zhu Y, Li J, Wu Z. Acute exposure of ozone induced pulmonary injury and the protective role of vitamin E through the Nrf2 pathway in Balb/c mice [J]. *Toxicology Research*, 2015, 5(1): 268-277
- [25] Nardai G, Ti C S, Csermely P. Molecular chaperones, stress proteins and redox homeostasis [J]. *Biofactors*, 2010, 17(1-4): 249-257
- [26] Guo S, Wharton W, Moseley P, et al. Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities [J]. *Cell Stress & Chaperones*, 2007, 12(3): 245-254
- [27] 李晓泓, 宋晓琳, 徐莉莉, 等. 即刻针刺和“逆针”三阴交穴对痛经大鼠子宫 HSP70、MDA 及 SOD 的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2010(11): 1860-1863
- Li X, Song X, Xu L, et al. The change of HSP70, MDA and SOD in uterus of dysmenorrhea rats and the intervention of acupuncture and preventive acupuncture on Sanyinjiao point [J]. *China Journal of Traditional Chinese Medicine & Pharmacy*, 2010(11): 1860-1863 (in Chinese)
- ◆