

苯污染对大鼠肝肾功能及血核苷酸水平的影响

俞发荣, 杨博, 李登楼, 张诗爽, 薛源, 连秀珍, 谢明仁*

(甘肃省证据科学技术研究与应用重点实验室 甘肃政法学院, 兰州 730070)

【摘要】 目的 探索苯对 Wistar 大鼠肝肾功能及血核苷酸水平的影响。方法 给予 Wistar 大鼠不同浓度苯 21 d, 用全自动生化仪检测血液不同成分的水平, 用酶联免疫吸附法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 检测血液中环磷酸腺苷 (cAMP)、环磷酸鸟苷 (cGMP) 和热休克蛋白-70 (HSP-70) 的水平。结果 给予 Wistar 大鼠不同苯剂量 0.19、0.38、0.76 g/(kg·bw), 连续 21 d, 动物血浆中总胆红素水平比对照组升高了 134.40%、173.63%、254.75%, 谷草转氨酶升高了 70.76%、85.44%、106.61%, 肌酐升高了 24.54%、67.46%、84.50%, 肌酸激酶升高了 151.35%、180.85%、245.54%, 尿素 [0.38、0.76 g/(kg·bw) 组] 升高了 0.48%、23.43%; 丙氨酸转移酶水平超过了检测值上限, 均为 1185.60%; cAMP 水平比对照组升高了 41.84%、264.02%、314.23%, cGMP 升高了 31.29%、40.46%、272.14%, HSP-70 升高了 82.11%、187.37%、1484.21%; 淀粉酶水平比对照组分别降低了 62.03%、63.66%、64.45%。结论 苯污染使血液中 cAMP 和 cGMP 比值发生变化, 引起新陈代谢的紊乱, 导致肝肾功能损伤或病变。

【关键词】 苯; 血液; 环磷酸腺苷; 环磷酸鸟苷; 热休克蛋白-70; Wistar 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)06-0654-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.06.019

Effects of benzene pollution on the liver and kidney function and blood nucleotide level in rats

YU Fa-rong, YANG Bo, LI Deng-lou, ZHANG Shi-shuang,
XUE Yuan, LIAN Xiu-zhen, XIE Ming-ren*

Key Laboratory of Evidence of Science and Technology Research and Application,
Gansu Institute of Political Science and Law, Lanzhou 730070, China

【Abstract】 Objective The aim of the present study is to investigate the effect of benzene on the liver and kidney function and blood nucleotide level in Wistar rats. **Methods** The Wistar rats were treated with benzene (0.19, 0.38, 0.76 g/kg body weight) for 21 days. Different blood components were detected by an automatic biochemical analyzer. The blood cyclic adenosine monophosphate (cAMP), cyclic guanosine monophosphate (cGMP) and heat shock protein-70 (HSP-70) levels were determined by enzyme linked immunosorbent assay method (ELISA). **Results** When Wistar rats were administered with benzene at the of 0.19, 0.38, or 0.76 g/kg body weight for 21 days, the total serum bilirubin level was increased than the control group by 134.40%, 173.63% and 254.75%, respectively; aspartate aminotransferase (AST) was increased by 70.76%, 85.44% and 106.61%, creatinine was increased by 24.54%, 67.46% and 84.50%, creatine kinase was increased by 151.35%, 180.85% and 245.54%, urea (0.38 and 0.76 g/kg body weight groups) was increased by 0.48% and 23.43%; alanine transaminase level exceeded the upper limit of the readings, (1185.60%); cAMP level was increased by 41.84%, 264.02% and 314.23%, respectively, cGMP was increased by

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (编号:31060283); 甘肃省基础研究创新群体项目 (编号:145RJIA333); 兰州市科技计划项目 (2014-1-182; 2015-3-80); 甘肃省教育厅创新团队项目; 西北民族地区侦查理论与实务研究中心资助; 兰州市人才创新创业项目; 甘肃政法学院重大科研项目。

【作者简介】 俞发荣 (1959-), 男, 博士, 研究员。研究方向: 法医学生物学、社会环境压力对人类健康的影响、药理学和毒理学实验及实验动物学。E-mail: tim9898@163.com

【通讯作者】 谢明仁 (1977-), 男, 硕士, 讲师, 研究方向: 物证科学技术。E-mail: xmr7600@gsli.edu.cn

31.29%, 40.46% and 272.14%, HSP-70 was increased by 82.11%, 187.37% and 1484.21%; amylase level was reduced by 62.03%, 63.66% and 62.03%, respectively, than the control group. **Conclusion** Our results demonstrate that benzene pollution affects the plasma cAMP and cGMP ratio, causing metabolic changes even structural damages in liver and kidney function.

【Key words】 Benzene; Blood; cAMP; cGMP; HSP-70; Wistar rats

Corresponding author: XIE Min-ren. E-mail: xmr7600@gsli.edu.cn

据世界卫生组织(WTO)调查报告结果,世界30%新建和重建的建筑物中均发现有苯,苯污染被世界卫生组织列为人类健康的十大危害之一^[1]。近年来,发展中国家有近300万例死亡可能由室内空气污染所致,全球约4%的疾病与室内环境有关^[2]。鉴于苯污染的社会普遍性和对健康的严重危害性,在提倡绿色生活、低碳环境的同时,加强预防保护措施更为必要。为了探索苯污染对人类健康的影响及其机制,用Wistar大鼠为实验对象,对苯的毒性作用进行了实验研究,为苯的合理应用、研究预防苯污染中毒和环境治理提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF级Wistar雄性大鼠40只,体重180~190g,购于甘肃省中医学院科研实验中心【SCXK(甘)2015-0001】。全部实验均在甘肃省证据科学技术研究与应用重点实验室 SPF级动物实验室完成【SYXK(甘)2015-0006】。

1.1.2 试剂和仪器

苯:分析纯 A.R,天津市东丽区天大化学试剂厂生产,实验时用菜籽油稀释成所需浓度;金龙鱼菜籽油:陕西省咸阳市兴平食品工业园生产;cAMP、cGMP、HSP-70试剂盒:上海生物科技开发公司生产;生化分析仪:SMT-100VET,成都斯马特科技有限公司生产;离心机,Minir12K,湖南湘立科学仪器有限公司生产;酶标仪:Thermo Scientific MK3型酶标仪,赛默飞世尔(上海)仪器有限公司生产;37℃电热恒温培养箱:HH.BLL.360-S-II,上海跃进医疗器械厂生产;移液器:0.1~10 μL,5~50 μL,100~200 μL,Transferrettes产品。

1.2 方法

1.2.1 动物分组和给药

将40只Wistar大鼠随机分为4组,每组10只。按苯对大鼠半数致死量LD₅₀3.80 g/(kg·bw)的1/5、1/10、1/20给药量分组。低剂量组:灌胃(ig)苯

0.19 g/(kg·bw);中剂量组:ig苯0.38 g/(kg·bw);高剂量组:ig苯0.76 g/(kg·bw);对照组:给予等量的菜籽油。每天称重,观察动物活动状态,连续给药21 d。

1.2.2 动物血液采集检测

末次给药后次日,乙醚吸入麻醉,打开胸腔,从心脏左心室抽血,入EDTA管中,离心2000 r/min,15 min,取血浆,用全自动生化仪测血液成分,用cAMP、cGMP、HSP-70试剂盒检测其含量。

1.2.3 统计学处理

实验数据采用SPSS 17.0软件进行统计学处理。苯对动物血液成分水平的影响用百分比表示,组间差异采用单因素方差分析,用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物的一般状况

给药第7天后,0.38、0.76 g/(kg·bw)动物出现活动迟缓,体重减轻,体毛失去光泽、倒竖。

2.2 苯对大鼠血液成分水平影响的检测结果

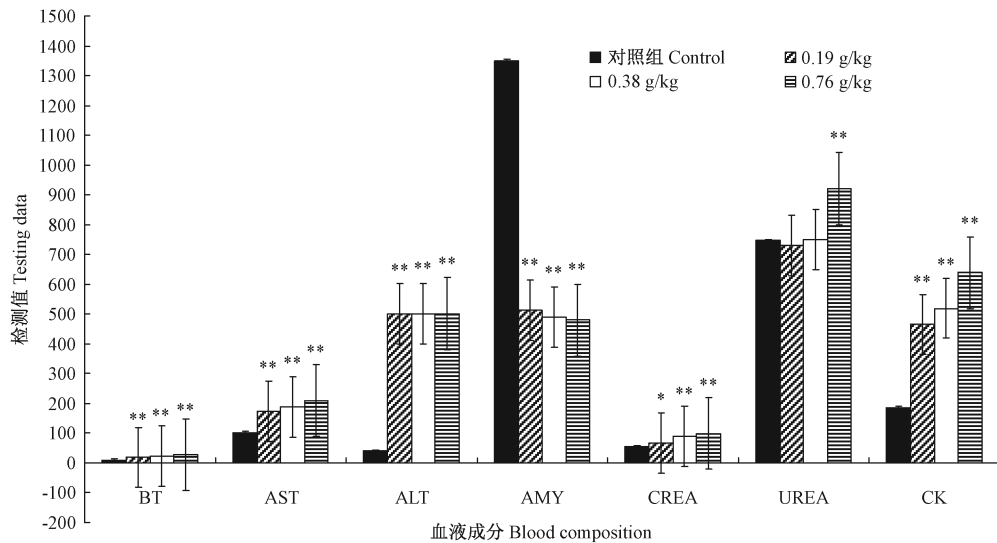
连续给予Wistar大鼠苯0.19、0.38、0.76 g/(kg·bw)21 d,采血检测,动物血总胆红素水平比对照组分别升高了134.40%、173.63%、254.75%,谷草转氨酶分别升高了70.76%、85.44%、106.61%,各组丙氨酸转移酶水平超过了检测值上限,均为1185.60%,肌酐分别升高了24.54%、67.46%、84.50%,肌酸激酶分别升高了151.35%、180.85%、245.54%,尿素[0.38、0.76 g/(kg·bw)组]分别升高了0.48%、23.43%;淀粉酶水平分别降低了62.03%、63.66%、64.45%。图1。

2.3 苯对大鼠血液cAMP水平的影响

连续给予Wistar大鼠苯0.19、0.38、0.76 g/(kg·bw)21 d,采血检测cAMP水平。

2.3.1 cAMP标准曲线的直线回归方程

以cAMP标准液浓度为横坐标,吸光度(A)为纵坐标做标准曲线和标准曲线的直线回归方程。结果见图2。



注: BT: 总胆红素 (100 $\mu\text{mol/L}$); AST: 谷草转氨酶 (U/L); ALT: 丙氨酸转氨酶 (U/L); AMY: 淀粉酶 ($\mu\text{mol/L}$); CREA: 肌酐 (10 $\mu\text{mol/L}$); UREA: 尿素 (100 $\mu\text{mol/L}$); CK: 肌酸激酶 (U/L)。与对照组比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 1 苯对 Wistar 大鼠血液成分的影响

Note. BT: Total serum bilirubin (100 $\mu\text{mol/L}$); AST: Aspartate aminotransferase (U/L); ALT: Alanine transaminase (U/L); AMY: Amylase ($\mu\text{mol/L}$); CREA: Creatinine (10 $\mu\text{mol/L}$); UREA: Urea (100 $\mu\text{mol/L}$); CK: Creatine kinase (U/L). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. the control group.

Fig. 1 Effect of benzene on blood component levels in the Wistar rats

2.3.2 Wistar 大鼠血液中 cAMP 水平检测结果

将动物血液样本 A 值代入直线回归方程, 计算出 cAMP 水平。连续给予 Wistar 大鼠苯 0.19、0.38、0.76 g/(kg·bw) 21 d, 大鼠血液中 cAMP 水平比对照组分别升高了 41.84%、264.02%、314.23%。结果见图 3。

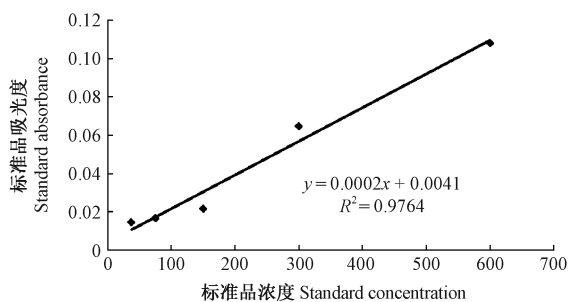


图 2 cAMP 标准曲线的直线回归方程

Fig. 2 Standard curve of linear regression equation for cAMP

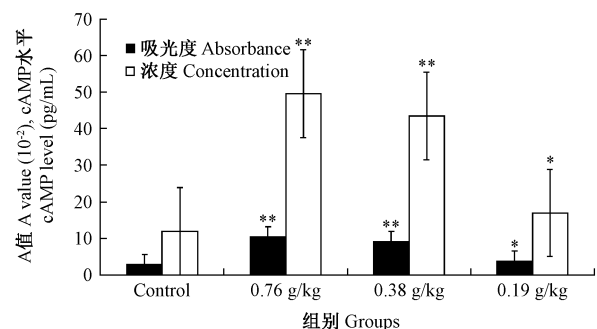
2.4 苯对大鼠血液 cGMP 水平的影响

2.4.1 cGMP 标准曲线的直线回归方程

以 cGMP 标准液浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标做标准曲线和标准曲线的直线回归方程。结果见图 4。

2.4.2 Wistar 大鼠血液中 cGMP 水平检测结果

将动物血液样本 A 值代入直线回归方程, 计算



注: 与对照组比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 苯对 Wistar 大鼠血 cAMP 水平的影响

Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. the control group.

Fig. 3 Effect of benzene on blood cAMP level in the rats

出 cGMP 水平。连续给予 Wistar 大鼠苯 0.19、0.38、0.76 g/(kg·bw) 21 d, 大鼠血液中 cGMP 水平比对照组分别升高了 31.29%、40.46%、272.14%。图 5。

2.5 苯对大鼠血液 HSP-70 水平的影响

2.5.1 HSP-70 标准曲线的直线回归方程

以 HSP-70 标准液浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标做标准曲线和标准曲线的直线回归方程。结果见图 6。

2.5.2 Wistar 大鼠血液中 HSP-70 水平检测结果

将动物血液样本 A 值代入直线回归方程, 计算

出 HSP-70 水平。连续给予 Wistar 大鼠苯 0.19、0.38、0.76 g/(kg·bw) 21 d, 血液中 HSP-70 水平比对照组分别升高了 82.11%、187.37%、1484.21%。见图 7。

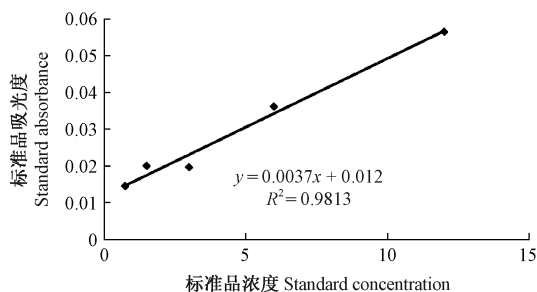
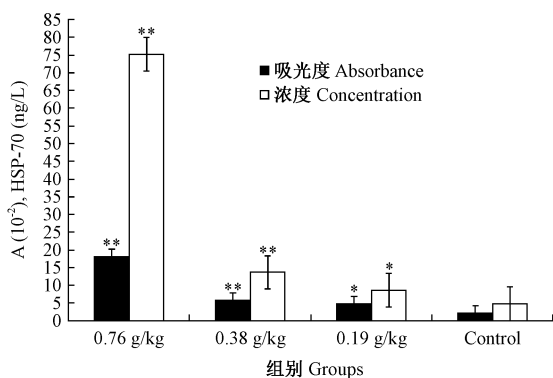


图 4 cGMP 标准曲线的直线回归方程

Fig. 4 Standard curve of linear regression equation for GMP



注:与对照组比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 5 苯对 Wistar 大鼠血液 cGMP 水平的影响

Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. the control group.

Fig. 5 Effect of benzene on blood cGMP level in the Wistar rats

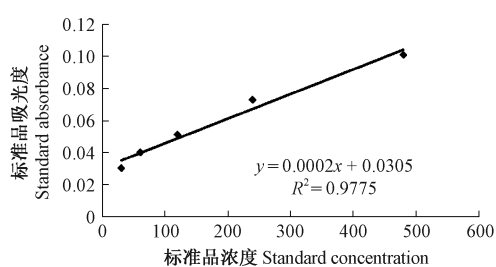
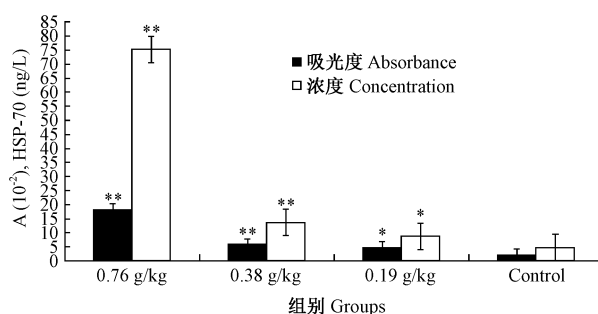


图 6 HSP-70 标准曲线的直线回归方程

Fig. 6 Standard curve of linear regression equation for HSP-70

3 讨论

苯污染严重影响人类的健康^[3]和生育^[4]。长期接触低浓度苯会出现头痛、头晕^[5]、胸闷、记忆减退、睡眠障碍^[6], 血液中丙氨酸转氨酶(ALT)^[7]、碱性磷酸酶(ALP)^[8]、总胆红素^[9]、尿素氮(BUN)、肌酐^[5]比未接触人群显著升高。动物实验结果表明,



注:与对照组比: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 7 苯对 Wistar 大鼠血液 HSP-70 水平的影响

Note. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. the control group.

Fig. 7 Effect of benzene on blood HSP-70 level in the rats

连续给予 Wistar 大鼠不同浓度苯 21 d, 动物出现活动迟缓, 体重减轻, 体毛失去光泽、倒竖, 表现出明显的毒性作用。血液中总胆红素、谷草转氨酶、丙氨酸转氨酶、肌酐、肌酸激酶、尿素和 cAMP、cGMP、HSP-70 水平显著升高($P < 0.01$)。转氨酶是人体新陈代谢过程中必不可少的“催化剂”, 主要存在于肝细胞内。当肝细胞发生炎症、坏死、中毒等造成肝细胞受损时, 转氨酶便会释放到血液里, 使血清转氨酶升高。因此, 转氨酶水平可以比较敏感地监测到肝脏是否受到损害。当肝细胞受损时, 肝脏将间接胆红素转化为直接胆红素的能力下降, 引起总胆红素升高。丙氨酸氨基转移酶主要存在于肝细胞质中, 谷草转氨酶存在细胞核中, 当二者均偏高时, 提示肝细胞损害较为明显。血肌酐水平是衡量肾功能的主要指标之一, 血肌酐偏高意味着肾脏可能出现损伤。体内的肌酐主要是由肌肉产生, 通过肾脏排泄。一般情况下, 肌酐的生成量是恒定的, 血肌酐水平的高低主要取决于肾脏排出肌酐的多少。尿素氮和血肌酐同是肾功能的两个最重要的指标, 尿素氮数值的高低反映着肾脏功能的状况。肾功能损伤, 尿素氮不能较好地由尿中排出, 蓄积于血液中使尿素氮数值升高。cAMP 是生物体内最重要的一种调控信号分子。cAMP 的主要功能是激活 cAMP-依赖蛋白激酶。当细胞受到外界刺激时, 胞外信号分子首先与受体结合形成复合体, 然后激活细胞膜上的 G 蛋白, 被激活的 G 蛋白再激活细胞膜上的腺苷酸环化酶(AC), 催化 ATP 而生成 cAMP。生成的 cAMP 作为第二信使(second messenger)通过激活 cAMP 依赖性蛋白激酶(PKA), 使靶细胞蛋白磷酸化, 从而调节细胞反应。cAMP 和 cGMP 是相互拮抗的物质, 在正常生理状态下, 血浆中的 cAMP 和 cGMP 浓

度的比值保持相对恒定,二者浓度发生变化,可引起新陈代谢的紊乱,导致机体损伤或病变。HSP-70 是广泛存在于生物界的一类具有高度保守性的蛋白质,当细胞在受到某些不利因素(如高热、感染、缺血、缺氧、寒冷、饥饿、创伤及化学物质中毒等)刺激时,会迅速短暂地大量合成,并通过与细胞内部分变性的蛋白质结合,协助其复性或将其运送至溶酶体降解而发挥细胞保护功能。

实验结果发现,给予 Wistar 大鼠不同浓度苯,血液中 HSP-70 水平均比对照组升高。实验结果提示,HSP-70 水平升高,一方面保护肝脏免受苯的损伤,另一方面使已损伤的组织得以修复。

上述结果表明,苯污染使血液成分水平、cAMP 和 cGMP 比值发生明显地改变,引起新陈代谢紊乱,导致肝、肾功能损伤。实验结果为我国现行的苯职业性接触限值的修订提供了参考数据,对苯作业人员的健康监护具有一定的参考价值。

参 考 文 献

- [1] 俞发荣,李登楼,谢明仁. 苯污染对人类健康影响研究进展[J]. 生态科学,2016, 35(2): 195-198.
- [2] Su J, Li Q, Liang GQ, et al. Effects of occupational exposure to low concentration of benzene series on serum oxidative stress levels in gas station workers [J]. J Environ Health, 2014, 31(3): 242-244.
- [3] 陈自然,凌均超,朱志良,等. 深圳市龙华新区低浓度苯职业危害现状分析[J]. 实用预防医学,2015,22(6): 724-726.
- [4] Katukam V, Kulakarni M, Syed R, et al. Effect of benzene exposure on fertility of male workers employed in bulk drug industries [J]. Genet Testing Molec Biomark, 2012, 16(6): 592-597.
- [5] Ma Q, Dong SQ. Influence of long-term exposure to low concentration of benzene, toluene and xylene on the health of workers in an electrical apparatus company [J]. Occup Health, 2013, 29(22): 2969-2971.
- [6] 陈铿铿,黄振烈,赖关朝,等. 低水平职业性苯接触人群健康效应及生物标志物研究[J]. 中国职业医学, 2015,42(6): 601-606.
- [7] Ning F, He BX, Jiang GG. Ultrasonographic and serum biochemical studies on liver damage of workers exposed to mixed benzene in low concentration [J]. Occup Health, 2015, 31(5): 598-600.
- [8] Egemen D, Ferda A. Effect of benzene on liver functions in rats [J]. Environ Monit Assess, 2009, 154, (1): 23-27.
- [9] 杜娟,陈长喜,张燕鸣,等. 低剂量苯及苯系物接触对肝功能指标的相关性研究[J]. 现代实用医学 2016,28(1): 53-54.
- [10] Steen S, Liao Q, Pierre L, et al. Evaluation of LUCAS, a new device for automatic mechanical compression and active decompression resuscitation [J]. Resuscitation 2002, 55(3): 285-299.
- [11] Rubertsson S, Karlsten R. Increased cortical cerebral blood flow with LUCAS; a new device for mechanical chest compressions compared to standard external compressions during experimental cardiopulmonary resuscitation [J]. Resuscitation 2005, 65(3): 357-363.
- [12] Axelsson C, Karlsson T, Axelsson AB, et al. Mechanical active compression-decompression cardiopulmonary resuscitation (ACD-CPR) versus manual CPR according to pressure of end tidal carbon dioxide (P(ET)CO₂) during CPR in out-of-hospital cardiac arrest (OHCA) [J]. Resuscitation 2009, 80(10): 1099-1103.
- [13] Gray WA, Capone RJ, Most AS. Unsuccessful emergency medical resuscitation—are continued efforts in the emergency department justified? [J]. N Engl J Med 1991, 325(20): 1393-1398.
- [14] 丘佩青. 心肺复苏成败原因的探讨[J]. 中国医药导报. 2012, 9(18): 165-167.
- [15] Rubertsson S, Lindgren E, Smekal D, et al. Mechanical chest compressions and simultaneous defibrillation vs conventional cardiopulmonary resuscitation in out-of-hospital cardiac arrest: The LINC Randomized Trial [J]. JAMA 2014, 311(1): 53-61.
- [16] Popp E, Vogel P, Teschendorf P, et al. Vasopressors are essential during cardiopulmonary resuscitation in rats: Is vasopressin superior to adrenaline? [J]. Resuscitation 2007, 72(1): 137-144.
- [17] Idris AH, Becker LB, Ornato JP, et al. Utstein-style guidelines for uniform reporting of laboratory CPR research. A statement for healthcare professionals from a Task Force of the American Heart Association, the American College of Emergency Physicians, the American College of Cardiology, the European Resuscitation Council, the Heart and Stroke Foundation of Canada, the Institute of Critical Care Medicine, the Safar Center for Resuscitation Research, and the Society for Academic Emergency Medicine [J]. Resuscitation 1996, 33(1): 69-84.
- [18] 田欣,王晶,赵芯晨,等. 2月龄和4月龄大鼠制备心肺复苏模型后神经功能评价及亚组评分的比较[J]. 中国比较医学杂志. 2014, 24(9): 53-58.
- [19] 朱军方,韶符,姜骏,等. 窒息法与室颤法心肺复苏动物模型比较研究[J]. 中华急诊医学杂志, 2011, 20(1): 14-19.

[收稿日期] 2016-06-30

[收稿日期] 2016-03-08

(上接第 638 页)