

## 乙酸铅对脑脉络丛 Z310 细胞毒性作用

王红梅<sup>1,2</sup>, 刘羽<sup>1,2</sup>, 刘君丽<sup>1,2</sup>, 谭壮生<sup>1</sup>, 马玲<sup>1,2</sup>, 赵超英<sup>1,2</sup>, 李国君<sup>1,2</sup>

**摘要:**目的 初步探讨乙酸铅诱导大鼠脑脉络丛 Z310 细胞的低剂量兴奋作用和高剂量抑制作用。方法 以浓度为 0、0.000 2、0.002、0.02、0.2、2、20、200、500  $\mu\text{mol/L}$  的乙酸铅分别染毒 Z310 细胞 12 和 24 h,用噻唑蓝 (MTT) 法和 2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐 (WST-8) 法检测细胞生存情况,并观察各剂量组细胞形态变化。结果 0.02  $\mu\text{mol/L}$  乙酸铅染毒 24 h,MTT 法检测 Z310 细胞存活率为 107.06%。0.2  $\mu\text{mol/L}$  染毒组 24 h 时细胞存活率升高为 110.91%; >2  $\mu\text{mol/L}$  乙酸铅染毒时,细胞存活率随剂量增加而降低;染毒 24 h 时,200、500  $\mu\text{mol/L}$  乙酸铅组细胞存活率 (MTT 法) 分别下降至 79.37% 和 76.81% ( $P < 0.01$ );染毒 12、24 h 时,200、500  $\mu\text{mol/L}$  乙酸铅组细胞存活率 (WST-8 法) 分别下降至 81.67% 和 72.36% 及 56.89% 和 44.05% ( $P < 0.05$ )。结论 低剂量乙酸铅可引起 Z310 细胞兴奋效应;高剂量乙酸铅引起 Z310 细胞抑制效应;WST-8 法检测细胞存活率较 MTT 法更敏感。

**关键词:** 乙酸铅; Z310 细胞; 细胞毒性; WST-8 法; 噻唑蓝 (MTT) 法

中图分类号: R 994.6

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2012)09-1202-03

### Lead acetate-induced cytotoxicity in Z310 cells

WANG Hong-mei<sup>\*</sup>, LIU Yu, LIU Jun-li, et al (*Department of Hygienic Toxicology, Beijing Municipal Center for Disease Prevention and Control, Beijing 100013, China*)

**Abstract: Objective** To detect hormesis effects of lead acetate on Z310 cells. **Methods** Z310 cells were treated with lead acetate at concentrations of 0, 0.000 2, 0.002, 0.02, 0.2, 2, 20, 200 and 500  $\mu\text{mol/L}$  for 12 hours and 24 hours. The proliferation viability of Z310 cells was measured by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) and 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt (WST-8) assay. And morphological changes in Z310 cells were observed under optical microscope. **Results** Lead acetate stimulated cell survival rate (107.06%) at lower concentration (0.02  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 hours. Compared with the control, a significant survival rate increase (110.91%  $P < 0.05$ ) was observed following exposure to 0.2  $\mu\text{mol/L}$  lead acetate for 24 hours, but at higher concentrations (over 2  $\mu\text{mol/L}$ ), the survival of the cells was inhibited. The survival rates significantly decreased (79.37% and 76.81%) only at 200 and 500  $\mu\text{mol/L}$  lead acetate for 24 hours tested by MTT ( $P < 0.01$ ). The same effects were observed by WST-8 at the same concentration, with the survival rates of 81.67% and 72.36% for 12 hours ( $P < 0.01$ ) and 56.89% and 44.05% for 24 hours ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Lead acetate can induce the hormesis of Z310 cell proliferation. There is a higher sensitivity in cell survival rate test with WST-8 than MTT.

**Key words:** lead acetate; Z310; cytotoxicity; WST-8; MTT

铅不是人体和动物机体生长所必需的元素,而是一种对人体和动物有积累性危害的重金属污染物质<sup>[1]</sup>,可导致生物体多个系统疾患<sup>[2]</sup>。神经系统是铅毒性作用的主要靶系统,主要毒性表现在对血脑屏障的损害<sup>[3]</sup>,而脉络丛上皮细胞是血-脑脊液屏障的物质基础。低剂量兴奋效应是指任何作用因子当以低剂量作用于生物体时会产生兴奋效应,而在较高剂量时产生抑制效应<sup>[4]</sup>。低剂量兴奋效应的现象已在大量研究中得以证实<sup>[5-6]</sup>,但对铅是否存在此效应的报导较少。Z310 细胞系是大鼠的脑脉络丛永生生化上皮细胞,是近年来体外研究中较成熟应用的具有脉络丛上皮典型屏障与分泌功能的细

胞。本研究以 Z310 细胞系为研究对象,用噻唑蓝 [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 法和 2-(2-甲氧基-4-硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐法 [2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulphophenyl)-2H-tetrazolium, monosodium salt, WST-8] 初步探讨乙酸铅诱导细胞的低剂量兴奋作用和高剂量抑制作用。

#### 1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 将乙酸铅( $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 分子量 379.33 (美国 Sigma 公司)) 用去离子水配成 50 mmol/L 的乙酸铅储备液,以 0.2  $\mu\text{m}$  的滤器过滤除菌,实验时用培养液调至需要浓度。普通液体培养基 (Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM, 美国 GIBICO 公司); MTT (美国 Sigma 公

作者单位: 1. 北京市疾病预防控制中心卫生毒理所, 100013; 2. 首都医科大学公共卫生与家庭医学学院

作者简介: 王红梅 (1974 -), 女, 江苏宿迁人, 主管医师, 硕士, 研究方向: 细胞毒理学。

通讯作者: 李国君, E-mail: guojunli88@yahoo.com

司); 二甲基亚砷(dimethyl sulfoxide, DMSO)、WST-8(日本同仁化学研究所); Spectramax plus384 酶联免疫光谱分析系统(美国 Molecular Devices 公司)。

1.2 细胞 大鼠脉络丛细胞系 Z310 细胞(美国 Purdue University, Wei Zheng 教授惠赠)。Z310 细胞在加入 10% 胎牛血清(美国 GIBICO 公司)、100 U/mL 青霉素、100 μg/mL 链霉素、40 μg/mL 庆大霉素和 10 ng/mL 上皮生长因子的达尔伯克改良伊格尔(dulbecco's modified eagle's medium, DMEM)培养基中, 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的环境下培养, 每隔 2~3 d 传代 1 次。待细胞呈对数生长时开始实验。

1.3 细胞染毒 乙酸铅共设 9 个剂量组 终浓度分别为 0(对照)、0.000 2、0.002、0.02、0.2、2、20、200、500 μmol/L。用胰蛋白酶消化, 再用培养液将其配制成浓度为 7 × 10<sup>4</sup> 个/mL 细胞悬液, 加入 96 孔板(100 μL/孔), 将培养板放入 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 培养 24 h, 向培养板中加入不同浓度乙酸铅溶液 100 μL, 空白对照组加入 100 μL 培养液。在培养 12、24 h 后测定细胞毒性。

1.4 指标及方法

1.4.1 MTT 法检测细胞存活率 染毒结束 4 h 前每孔加 MTT 溶液(50 mg/mL) 20 μL, 继续培养 4 h, 培养板以 1 000 r/min 离心 5 min, 弃培养液, 每孔加入 DMSO 150 μL, 充分振荡完全显色后, 用酶联免疫光谱分析系统于波长 570 nm, 参比波长 630 nm 测每孔吸光度(A) 值。每个剂量做 3 孔平行样, 重复 3 次试验, 取平均值。以溶剂对照组细胞存活率为 100% 细胞存活率 = 染毒组 A 值/溶剂对照组 A 值 × 100%。

1.4.2 WST-8 法检测细胞存活率 染毒结束 4 h 前每孔加 WST-8 溶液 20 μL, 继续培养 4 h, 用酶联免疫光谱分析系统于波长 450 nm, 参比波长 630 nm 测每孔吸光度(A) 值。每个剂量做 3 孔平行样, 重复 3 次试验, 采用吸光度平均值进行计算。

1.4.3 细胞形态观察 在试验结束后(染毒 12、24 h) 分别在光镜下比较观察各剂量组的一般细胞形态并拍照。

1.5 统计分析 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 SPSS 13.0 进行统计分析, 组间比较采用方差分析, 检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 乙酸铅对细胞存活率影响(表 1) 乙酸铅染毒 Z310 细胞 12 h 时组间差异有统计学意义( $F =$

7.122  $P < 0.01$ ); 与对照组比较 0.2 μmol/L 组细胞存活率(WST-8 法) 明显增加( $P < 0.05$ ); 浓度增加到 200、500 μmol/L 时, 细胞存活率下降( $P < 0.05$ )。染毒 24 h 时 0.2 μmol/L 乙酸铅组细胞存活率(MTT 法) 增加最明显( $P < 0.05$ ), 而 0.02、0.2 μmol/L 乙酸铅组细胞存活率(WST-8 法) 明显增加( $P < 0.01$ ); 当乙酸铅为 200、500 μmol/L 时, MTT 和 WST-8 法检测均可见细胞存活率明显下降( $P < 0.01$ )。当乙酸铅染毒剂量  $< 200$  μmol/L 时, WST-8 法检出的细胞存活率值均高于 MTT 法。

表 1 MTT 法和 WST-8 法检测乙酸铅剂量与细胞存活率关系( %  $n = 9$ )

组别(μmol/L)	细胞存活率(MTT 法)		细胞存活率(WST-8 法)	
	12 h	24 h	12 h	24 h
对照组	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
乙酸铅				
0.000 2	97.14 ± 4.49	98.50 ± 8.09	104.82 ± 13.54	101.85 ± 0.75
0.002	99.14 ± 4.53	98.12 ± 5.46	106.86 ± 4.27	104.13 ± 0.56
0.02	99.89 ± 1.70	107.06 ± 4.50	112.80 ± 7.91	111.59 ± 3.87 <sup>b</sup>
0.2	107.40 ± 14.12	110.91 ± 12.06 <sup>a</sup>	118.11 ± 14.48 <sup>a</sup>	115.65 ± 5.85 <sup>b</sup>
2	95.19 ± 7.77	98.25 ± 2.64	105.46 ± 8.93	106.72 ± 8.97
20	89.41 ± 9.07	93.14 ± 3.32	93.41 ± 9.55	97.90 ± 4.02
200	93.16 ± 6.83	79.37 ± 3.02 <sup>bc</sup>	81.67 ± 9.40 <sup>a</sup>	56.89 ± 5.16 <sup>bc</sup>
500	89.84 ± 4.68	76.81 ± 6.13 <sup>bc</sup>	72.36 ± 9.35 <sup>b</sup>	44.05 ± 2.56 <sup>bd</sup>

注: 与对照组比较, <sup>a</sup>  $P < 0.05$ , <sup>b</sup>  $P < 0.01$ ; 与 12h 比较, <sup>c</sup>  $P < 0.05$ , <sup>d</sup>  $P < 0.01$ 。

2.2 细胞存活率与乙酸铅剂量依赖性(图 1~4) 以乙酸铅 0~0.2 μmol/L(低剂量) 染毒 12 h, 随着剂量增加 Z310 细胞存活率也增加, MTT 法相关系数为 0.511( $P > 0.05$ ), WST-8 法相关系数为 0.443( $P > 0.05$ ) (图 1); 低剂量染毒 24 h, WST-8 法乙酸铅染毒剂量与细胞存活率相关系数为 0.726( $P < 0.01$ ) (图 2)。以乙酸铅 2、20、200、500 μmol/L(高剂量) 染毒 12 h, 随着剂量增加 Z310 细胞存活率随之下降, WST-8 法相关系数为 -0.781( $P < 0.01$ ) (图 3); 高剂量染毒 24 h 相关性分析发现, MTT 法相关系数为 -0.832( $P < 0.01$ ); WST-8 法检测相关系数为 -0.909( $P < 0.01$ ) (图 4)。

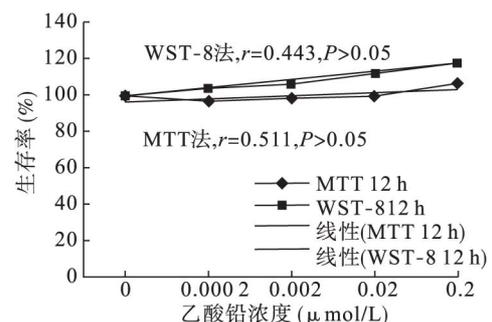


图 1 2 种方法检测乙酸铅染毒 12 h 的低剂量兴奋效应

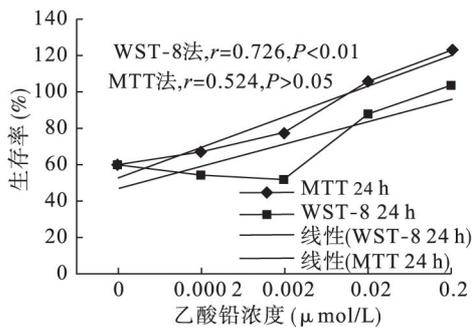


图 2 2 种方法检测乙酸铅染毒 24 h 的低剂量兴奋效应

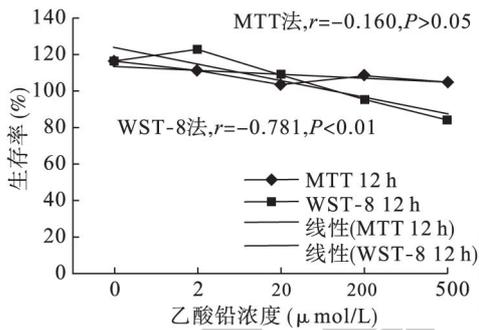


图 3 2 种方法检测乙酸铅染毒 12 h 的高剂量抑制效应

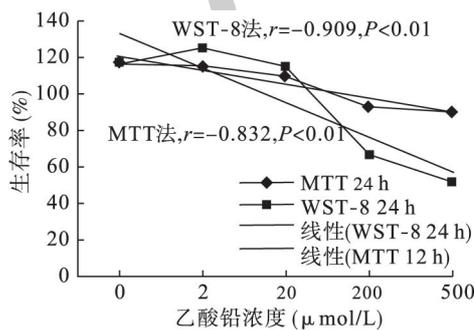


图 4 2 种方法检测乙酸铅染毒 24 h 的高剂量抑制效应

2.3 乙酸铅对 Z310 细胞形态影响 对照组细胞呈多边形贴壁生长,周边光滑,细胞分布均匀,细胞岛样聚集;与对照组比较,低剂量(0.02、0.2 μmol/L)乙酸铅染毒组的细胞数量增多,且呈生长状态的细胞岛增加。而高剂量组(200、500 μmol/L)染毒后,细胞数量明显减少,且多边形细胞所占比例下降,梭形和圆形细胞增多,细胞边界变得模糊,细胞间杂质增多,细胞肿胀。

### 3 讨论

铅是环境中普遍存在的一种有毒重金属<sup>[7]</sup>,对人体的各个系统和器官均有损伤作用,其中危害最大的是神经系统,可导致神经系统损伤包括铅毒性脑病、听力障碍、周围神经病变和认知缺陷等<sup>[8]</sup>。本研究结果表明,2~500 μmol/L 乙酸铅染毒 24 h 用 MTT 法和 WST-8 法检测均可见乙酸铅剂量与细

胞存活率高度相关( $r = -0.832$ 、 $-0.909$ ,  $P < 0.01$ ),而 0.000 2~0.2 μmol/L 乙酸铅在染毒 12 h 未发现有明显的剂量依赖作用,染毒 24 h 用 WST-8 法检测发现有明显的剂量依赖性兴奋作用( $r = 0.726$ )。这与近年来关于重金属的细胞毒性研究结果一致<sup>[5-6,9]</sup>。

Z310 细胞形态观察结果表明,与对照组比较,高剂量乙酸铅染毒组细胞数量明显减少,且细胞的多边形态不明显,成梭状生长;而低剂量乙酸铅染毒组与对照组比较数量增多,且生长状态的细胞岛增加。此结果与刘君丽等<sup>[10]</sup>研究的重金属锰对细胞形态的影响结果相同。

本研究采用 MTT 和 WST-8 2 种细胞毒性检验方法测定了乙酸铅对 Z310 细胞的存活率影响,结果表明,相同试验条件下,当染毒剂量 < 2 μmol/L 时,用 WST-8 法测定的 Z310 细胞存活率均高于 MTT 法,而当染毒剂量 ≥ 200 μmol/L 时,用 WST-8 法测定的存活率均低于 MTT 法值,且 WST-8 法较 MTT 法更容易检测出剂量依赖性,提示 WST-8 法灵敏度较高。铅是如何引起细胞存活率的改变以及对细胞周期的影响、发生的原因和分子机制尚有待进一步研究。

志谢 美国 Purdue 大学的 Wei Zheng 教授研究室提供 Z310 细胞系

### 参考文献

- [1] 陈朋利,何作顺. 铅与锌作用的研究[J]. 微量元素与健康研究, 2012, 29(1): 67-69.
- [2] 孟金萍,孙淑华,王艳蓉,等. 铅的生物学毒性效应[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(1): 58-61.
- [3] Balbuena P, Magnin-Bissel G, Meldrum JB, et al. Comparison of two blood brain *in vitro* system: cytotoxicity and transfer assessments of malathion/oxon and lead acetate[J]. Toxicol Sci, 2010, 114: 260-271.
- [4] 让欧艳,让蔚清. 低剂量兴奋效应及其医学应用[J]. 实用预防医学, 2009, 16(1): 300-303.
- [5] 郝长付,郝卫东. MAPK 信号转导通路在 CdCl<sub>2</sub>、HgCl<sub>2</sub> 诱导 RAW264.7 细胞低剂量兴奋效应中的作用[J]. 毒理学杂志, 2011, 25(3): 191-196.
- [6] 李时恩,周丽丽,董豪杰,等. 重铬酸钾染毒人胚肺细胞 A549 的 Hormesis 效应及对某些修复基因表达的影响[J]. 工业卫生与职业病, 2010, 36(5): 261-265.
- [7] 张军,金亚平,张扬,等. 铅神经毒性分子机制的研究进展[J]. 中国公共卫生, 2003, 19(8): 1004-1006.
- [8] 倪坤,唐久来. 铅对发育中的神经系统的影响[J]. 安徽医学, 2011, 32(5): 695-697.
- [9] 骆颖慧,魏雪涛,尚兰琴,等. JNK/SAPK 信号转导通路在镉引起的 Hormesis 中的作用[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(3): 190-193.
- [10] 刘君丽,胡雯若,李煜,等. 氯化锰对豚鼠 Z310 细胞生存及细胞周期的影响[J]. 毒理学杂志, 2011, 25(6): 30-35.