

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20190814001

张瑞萍, 魏倩, 高霞, 等. 丙烯腈暴露通过 NF- κ B 信号通路诱导大鼠脑组织氧化应激[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(6): 186-194

Zhang R P, Wei Q, Gao X, et al. Acrylonitrile exposure induced oxidative stress in rat brain tissues through the NF- κ B signaling pathway [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(6): 186-194 (in Chinese)

丙烯腈暴露通过 NF- κ B 信号通路诱导大鼠脑组织氧化应激

张瑞萍, 魏倩, 高霞, 赵粉线, 薛红丽, 李芝兰*

兰州大学公共卫生学院, 兰州 730000

收稿日期: 2019-08-14 录用日期: 2020-01-16

摘要: 探究丙烯腈(ACN)暴露对大鼠脑组织 NF- κ B 信号通路相关基因和蛋白的影响。选取 60 只 SPF 级健康成年雄性 SD 大鼠, 随机分为对照组(玉米油)、11.5 mg·kg⁻¹ ACN 组、23.0 mg·kg⁻¹ ACN 组、46.0 mg·kg⁻¹ ACN 组、N-乙酰半胱氨酸(NAC)组(46.0 mg·kg⁻¹ ACN+300 mg·kg⁻¹ NAC), 灌胃染毒, 每天 1 次, 每周 6 次, 连续 28 d。通过分光光度法检测大鼠脑组织中谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)含量以及谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)酶活性; ELISA 法测定脑组织内炎症细胞因子浓度; RT-qPCR 法检测脑组织中 NF- κ B 信号通路相关基因 *IKK α* 、*I κ B*、NF- κ B 和 *TLR4* mRNA 相对表达水平; Western Blot 法检测脑组织 NF- κ B 信号通路相关蛋白 TLR4、NF- κ B、IKK α 、p-IKK α / β 、I κ B α 和 p-I κ B α 相对表达水平。ACN 染毒后, 与对照组相比, 各暴露组大鼠脑组织 MDA 含量均升高($P<0.05$); 23.0 mg·kg⁻¹ 和 46.0 mg·kg⁻¹ 的 ACN 暴露导致大鼠脑组织 GSH 含量降低($P<0.05$); 46.0 mg·kg⁻¹ 的 ACN 导致 GSH-Px 活性下降($P<0.05$); 11.5 mg·kg⁻¹ 的 ACN 暴露导致 CAT 活性下降($P<0.05$)。而抗氧化剂 NAC 的加入后, 使得大鼠脑组织 SOD 活性升高, MDA 含量和 CAT 活性均下降($P<0.05$)。与对照组比较, 各暴露组大鼠脑组织 TNF- α 浓度均升高($P<0.05$); 23.0 mg·kg⁻¹ 和 46.0 mg·kg⁻¹ 的 ACN 暴露导致 IL-1 β 浓度均升高($P<0.05$); 46.0 mg·kg⁻¹ 的 ACN 暴露导致 IL-6 浓度升高($P<0.05$); 而抗氧化剂 NAC 的加入后, 使得大鼠脑组织中 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 浓度水平均降低($P<0.05$)。RT-qPCR 结果表明, 23.0 mg·kg⁻¹ 和 46.0 mg·kg⁻¹ ACN 暴露导致大鼠脑组织 *IKK α* 和 NF- κ B mRNA 表达均上调($P<0.05$), 46.0 mg·kg⁻¹ 的 ACN 暴露导致 *TLR4* mRNA 表达上调; 而抗氧化剂 NAC 的加入后, 大鼠脑组织 *IKK α* 和 NF- κ B mRNA 表达均下调($P<0.05$)。Western Blot 结果表明, 各暴露组 p-IKK α / β 、IKK α 和 NF- κ B 蛋白相对表达量均升高($P<0.05$); 23.0 mg·kg⁻¹ 和 46.0 mg·kg⁻¹ 的 ACN 暴露导致 p-I κ B α 蛋白相对表达量升高($P<0.05$), 46.0 mg·kg⁻¹ ACN 暴露导致 *TLR4* mRNA 和蛋白相对表达水平升高; 而抗氧化剂 NAC 的加入后, 大鼠脑组织中 p-IKK α / β 和 NF- κ B 蛋白相对表达量均升高($P<0.05$)。结果表明, ACN 通过诱导大鼠脑组织氧化/抗氧化失衡和炎症反应, 进而激活 NF- κ B 信号通路, NAC 干预可拮抗 ACN 诱导脑组织发生氧化应激, 抑制 NF- κ B 的活化。

关键词: 丙烯腈; 大鼠; 氧化应激; 炎症反应; NF- κ B 信号通路

文章编号: 1673-5897(2020)6-186-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Acrylonitrile Exposure Induced Oxidative Stress in Rat Brain Tissues through the NF- κ B Signaling Pathway

Zhang Ruiping, Wei Qian, Gao Xia, Zhao Fenxian, Xue Hongli, Li Zhilan*

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

Received 14 August 2019 accepted 16 January 2020

第一作者: 张瑞萍(1991—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生殖毒理学, E-mail: zhangrp15@lzu.edu.cn

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

Abstract: To investigate the acrylonitrile (ACN) induced alterations of genes and proteins related to NF- κ B signaling pathway in rat's brain, 60 SPF SD male rats were orally administrated with 11.5, 23.0 and 46.0 mg·kg⁻¹ ACN, and pretreated with 300 mg·kg⁻¹ NAC+46 mg·kg⁻¹ ACN, respectively. ACN or N-acetylcysteine (NAC) was diluted in corn oil and administrated once per day, 6 d per week for total 28 d. Vehicle control group was orally administrated with the same volume of corn oil at the same dosing frequency. At the end of the experiments, rats were euthanized and brain tissue was isolated for further examination. The contents of glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA), and the activities of glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were measured by biochemical kit according to the kit's instruction. The levels of inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β and TNF- α were determined by ELISA. Real-time PCR was used to detect the mRNA expression levels of *IKK α* , *I κ B* and NF- κ B. Western Blot was used to detect the protein expression of NF- κ B, *IKK α* , p-*IKK α / β* , *I κ B α* and p-*I κ B α* in brain tissue. Compared with the control group, the MDA content in each ACN single treated group increased, while GSH content and GSH-Px activity decreased in dose dependent manner ($P<0.05$). Pretreated with antioxidant NAC, the SOD content increased, while the MDA content and CAT activity decreased ($P<0.05$) accordingly. Compared with the control group, the level of IL-1 β and TNF- α increased in the exposure group of 23.0 mg·kg⁻¹ and 46.0 mg·kg⁻¹ ACN ($P<0.05$), and the level of IL-6 increased in the 46.0 mg·kg⁻¹ ACN group ($P<0.05$). Pretreated with antioxidant NAC, the level of inflammatory cytokines IL-6, IL-1 β and TNF- α in brain tissue decreased ($P<0.05$). Compared with the control group, the relative mRNA expression of *IKK α* and NF- κ B was upregulated in the 23.0 mg·kg⁻¹ and 46.0 mg·kg⁻¹ ACN group ($P<0.05$), and the *TLR4* mRNA expression increased in the 46.0 mg·kg⁻¹ ACN group. Pretreated with antioxidant NAC, the *IKK α* and NF- κ B mRNA expression in brain tissue was downregulated ($P<0.05$). Compared with the control group, the protein expression of p-*IKK α / β* , *IKK α* and NF- κ B in ACN single treated groups was increased ($P<0.05$), and the protein expression of p-*I κ B α* was increased in the 23.0 mg·kg⁻¹ and 46.0 mg·kg⁻¹ ACN treatment group ($P<0.05$). In addition, the protein expression and mRNA expression of *TLR4* were increased when rats were exposed to 46.0 mg·kg⁻¹ ACN. Pretreated with antioxidant NAC, the protein expression of p-*IKK α / β* and NF- κ B in brain tissue increased ($P<0.05$). ACN activates NF- κ B signaling pathway by inducing oxidative/antioxidative imbalance and inflammatory response in rat brain tissue. NAC pretreatment can antagonize can-induced oxidative stress in brain tissue thus inhibit the activation of NF- κ B.

Keywords: acrylonitrile; rat; oxidative stress; inflammatory response; NF- κ B signal pathway

丙烯腈(acrylonitrile, ACN)是一种高毒类有机氰化物,用于制造腈纶纤维、丁腈橡胶和 ABS 塑料等高分子材料,是职业环境中的常见污染物^[1]。脑组织是 ACN 毒作用的靶器官,动物实验研究表明,ACN 染毒后,大鼠海马区 and 大脑皮层区胶质增生,神经元排列不规则;胶质原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein, GFAP)阳性细胞数目增加,胞体肥大,突体增粗且不规则^[2]。通过 ACN 处理人星形胶质细胞发现,细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)和氧化型谷胱甘肽(oxidized glutathione, GSSG)含量增加,谷胱甘肽(glutathione, GSH)含量降低,过氧化氢酶(catalase, CAT)活性上升^[3]。罗波艳等^[4]以不同剂量 ACN 染毒 SD 大鼠也得出相似结果,提示 ACN 可诱导机体脑组织氧化损伤。国外有调查发现,长期接触 ACN 使神经衰弱综合征

的发生率较高,包括头晕、头痛、乏力、失眠多梦及心悸等症状。此外,3 年以上接触浓度接近 6 mg·m⁻³ 的 ACN 使部分工人发生头痛、全身无力、易激动、不自主运动和工作效率低下等神经精神症状^[5-6]。

核转录因子 κ B(nuclear factor kappa-B, NF- κ B)是存在于真核细胞中的重要转录因子,未激活状态下,与其抑制因子 I κ B 在非活化的形式存在于胞浆中,当细胞内 ROS 含量升高或处于氧化/抗氧化失衡过程中,其可激活 NF- κ B 信号通路,被称为氧化还原敏感转录因子。Dang 等^[7]研究发现,N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)作为一种有效的抗氧化剂,可抑制 ROS 介导的 NF- κ B 活化以及凋亡相关基因 *Bax* mRNA 表达水平。高玲等^[8]用 TNF- α 和 IL-1 β 处理大鼠脑皮层培养的神经细胞,可使 NF- κ B 蛋白相对表达水平升高,环孢素 A 预处理

可抑制 IL-1 β 诱导的 NF- κ B 活化。以上研究结果表明,ROS 和炎症细胞因子均可激活 NF- κ B 信号通路。

本研究通过不同剂量 ACN 灌胃染毒雄性 SD 大鼠,建立短期脑损伤模型,测定大鼠脑组织炎症细胞因子水平的变化,检测大鼠脑组织氧化应激水平、NF- κ B 信号通路相关基因 mRNA 和蛋白表达水平,探讨 ACN 通过诱导脑组织氧化/抗氧化失衡和炎症反应对 NF- κ B 信号通路的影响,为 ACN 的神经系统毒性机制提供依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验动物及分组

由甘肃中医药大学医学实验动物中心提供健康成年 SPF 级雄性 SD 大鼠(动物合格证编号:SYXK(甘)2015-0005)。将 60 只大鼠随机分为 5 组,每组 12 只,对照组灌胃玉米油,染毒组分别给予 11.5、23.0 和 46.0 mg·kg⁻¹ ACN 灌胃,NAC 干预组先给予 300 mg·kg⁻¹ NAC 灌胃,30 min 后再灌胃 46.0 mg·kg⁻¹ ACN。每天 1 次,每周 6 d,连续灌胃 28 d。染毒剂量主要依据本团队前期研究成果设定。

1.2 试剂

ACN(纯度>99%)购买于天津凯信化学工业有限公司,NAC 购买于美国 Amersco 公司,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、CAT、GSH、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)和丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒购买于南京建成生物工程研究所,IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 酶联免疫(Elisa)试剂盒购买于武汉 Elabscience 生物科技有限公司。BCA 总蛋白测定试剂盒购买于美国 Thermo 公司,IKK α 、p-IKK α / β 、p-I κ B α 、NF- κ B(兔抗)、I κ B α 和 TLR4(鼠抗)一抗购买于美国 CST 公司,GAPDH 一抗、HRP 标记山羊抗兔二抗购买于美国 SAB 公司,HRP 标记山羊抗小鼠二抗购买于美国 CST 公司,引物由日本 TAKARA 公司设计合成。

1.3 大鼠脑组织氧化应激相关指标测定

染毒结束后,处死大鼠。每组随机选取 6 只大鼠脑组织,按脑组织质量(g):匀浆介质体积(mL)=1:9 的质量体积比在冰水浴下用玻璃匀浆器将其制成 10% 匀浆,12 000 g·min⁻¹、4℃ 下低温离心 10 min,分装上清用于后续实验。按照试剂盒说明书操作,测定氧化应激相关指标。

1.4 大鼠脑组织炎症细胞因子的测定

严格按照 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 酶联免疫(Elisa)

试剂盒步骤,测定炎症细胞因子浓度。

1.5 RT-qPCR 检测 mRNA 表达水平

采用 Trizol 法提取大鼠脑组织总 RNA,加入 30 μ L DEPC 水充分溶解总 RNA;测定总 RNA 浓度,选取吸光度比值(A_{260}/A_{280})在 1.8~2.2 的样品进行实验。按照 TaKaRa 反转录试剂盒说明,选择 20 μ L 的反转录体系,37℃ 反转录 15 min 后,85℃ 反转录酶失活反应 5 s,最终获得 cDNA 模板。RT-qPCR 检测大鼠脑组织 IKK α 、I κ B α 、NF- κ B 和 β -actin mRNA 相对表达水平,选择 25 μ L 反应体系进行 PCR 扩增反应(三步法),反应条件为:95℃ 预变性反应 30 s;95℃ 变性 5 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,共 50 个循环;60℃ 熔解反应 15 s,共 71 个循环(表 1)。

采用 Pfaffl 法计算基因 mRNA 相对表达水平,公式为

$$\text{Ratio} = E^{\Delta C_T \text{靶基因}} / E^{\Delta C_T \text{内参基因}}$$

式中: E 为扩增效率, $E = (R_{n,A}/R_{n,B})^{1/(C_{T,A}-C_{T,B})} - 1$, A 和 B 为荧光扩增曲线上的任意 2 个点, $R_{n,A}$ 、 $R_{n,B}$ 为 A 和 B 这 2 点对应的荧光值。 $E^{\Delta C_T \text{靶基因}}$ 为目标基因的扩增效率, $E^{\Delta C_T \text{内参基因}}$ 为内参基因的扩增效率; $\Delta C_T \text{靶基因}$ = 对照组目标基因 C_T 值 - 待测样本目标基因 C_T 值, $\Delta C_T \text{内参基因}$ = 对照组内参基因 C_T 值 - 待测样本内参基因 C_T 值。

1.6 Western-Blot 检测蛋白表达水平

随机提取 6 只大鼠脑组织总蛋白,测定脑组织匀浆总蛋白含量,根据测定结果加入 RIPA 裂解液和 5 $\times$ 上样缓冲液,调整样品蛋白浓度为 4 μ g· μ L⁻¹,

表 1 各基因引物序列及产物大小
Table 1 Primer sequence and product size of each gene

基因		引物序列(5' ~ 3')
Genes		Primer sequence (5' ~ 3')
IKK α	Forward	GGTCATCTAATGTCCCAGCCTTC
	Reverse	CTCCATCTGTAACCAGCTCCAGTC
NF- κ B	Forward	CGACGTATTGCTGTGCCTTC
	Reverse	TTGAGATCTGCCAGGTGGTA
I κ B α	Forward	TGACCATGGAAGTGATTGGTCAG
	Reverse	GATCACAGCCAAGTGGAGTGGA
β -actin	Forward	GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA
	Reverse	GACTCATCGTACTCCTGCTTGCTG
TLR4	Forward	CTCACAACCTTCAGTGGCTGGATTTC
	Reverse	GTCTCCACAGCCACCAGATTCTC

沸水变性 5 min。然后在各泳道内加入 15 μL 各组蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,根据彩虹 marker 标识裁取所需部分,将目的蛋白转移至 PVDF 膜上,封闭 2 h 后,孵育一抗,用含 BSA 的 5% 的封闭液配制 IKKα(1:1 000)、p-IKKα/β(1:1 000)、NF-κB(1:1 000)和 TLR4(1:1 000)一抗(鼠抗)。GAPDH(1:5 000)、IκBα(1:1 000)和 p-IκBα(1:1 000)用含脱脂奶粉的 5% 的封闭液配制,4 ℃ 水平摇床过夜,TBST 漂洗后孵二抗 2 h,显影成像并保存,采用 Image J 软件对目的蛋白进行半定量分析。

1.7 统计分析

采用 SPSS22.0 软件对结果数据进行分析,结果均用 $\bar{X} \pm S$ 表示,采用单因素方差分析法对数据进行分析,方差齐性均采用 LSD 检验方法,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果 (Results)

2.1 ACN 对大鼠脑组织抗氧化能力及脂质过氧化的影响

如表 2 所示,ACN 染毒后,与对照组比较,11.5、23.0 和 46.0 mg·kg⁻¹ ACN 组大鼠脑组织 MDA 含量均升高($P < 0.05$);23.0 mg·kg⁻¹ 和 46.0 mg·kg⁻¹ ACN 组 GSH 含量降低($P < 0.05$);46.0 mg·kg⁻¹ ACN 组 GSH-Px 活性下降($P < 0.05$);11.5 mg·kg⁻¹ 组 CAT 活性下降($P < 0.05$);各暴露组大鼠脑组织 SOD 活性与对照组比较差异均无统计学意义($P > 0.05$)。NAC 组大鼠脑组织 SOD 活性与 46.0 mg·kg⁻¹ ACN 组比较升高,MDA 含量和 CAT 活性与 46.0 mg·kg⁻¹ ACN 组比较均降低,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 ACN 对大鼠脑组织炎症细胞因子水平的影响

如图 1 所示,ACN 染毒后,与对照组相比,各剂量组大鼠脑组织 TNF-α 浓度均升高($P < 0.05$);23.0 mg·kg⁻¹ 和 46.0 mg·kg⁻¹ ACN 组 IL-1β 浓度均升高($P < 0.05$);46.0 mg·kg⁻¹ ACN 组 IL-6 浓度升高($P < 0.05$)。与 46.0 mg·kg⁻¹ ACN 组比较,NAC 组大鼠脑组织中炎症细胞因子 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 浓度均降低,差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 ACN 染毒对大鼠脑组织 NF-κB 信号通路相关基因表达的影响

RT-qPCR 结果显示(图 2),23.0 mg·kg⁻¹ 和 46.0 mg·kg⁻¹ ACN 组大鼠脑组织 IKKα 和 NF-κB mRNA

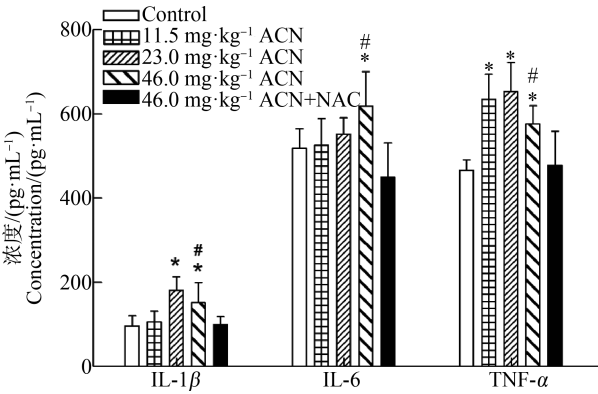


图 1 ACN 染毒后大鼠脑组织 IL-6、IL-1β 和 TNF-α 浓度变化

注:与对照组比较,* $P < 0.05$;与 NAC 组比较,# $P < 0.05$;n=6。

Fig. 1 Effects of ACN exposure on the changes of IL-6, IL-1β, TNF-α concentrations in rat brain

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

表 2 丙烯腈(acrylonitrile,ACN)染毒对大鼠脑组织抗氧化能力及脂质过氧化的影响($\bar{X} \pm S$)

Table 2 Effects of ACN (acrylonitrile) exposure on the anti-oxidative capacity and lipid peroxidation of rat brain tissues ($\bar{X} \pm S$)

组别 Group	SOD /(U·mg ⁻¹ prot)	GSH /(μmol·g ⁻¹ prot)	GSH-Px /(U·mg ⁻¹ prot)	MDA /(nmol·g ⁻¹ prot)	CAT /(U·mg ⁻¹ prot)
对照组 Control group	50.18±8.72	3.69±1.00	14.30±1.63	0.52±0.11	0.93±0.19
11.5 mg·kg ⁻¹ ACN 组 11.5 mg·kg ⁻¹ ACN group	58.56±6.53	2.60±0.38	13.30±2.20	0.82±0.11*	0.63±0.92*
23.0 mg·kg ⁻¹ ACN 组 23.0 mg·kg ⁻¹ ACN group	61.92±9.21	2.47±0.72*	11.84±2.93	0.86±0.21*	0.88±0.12
46.0 mg·kg ⁻¹ ACN 组 46.0 mg·kg ⁻¹ ACN group	54.97±3.38#	2.48±0.56*	10.52±1.72*	0.84±0.16*#	0.90±0.14#
NAC 组 NAC group	66.43±6.20	3.00±0.66	11.65±0.94	0.68±0.12	0.68±0.12

注:NAC 表示 N-乙酰半胱氨酸,SOD 表示超氧化物歧化酶,GSH 表示谷胱甘肽,GSH-Px 表示谷胱甘肽过氧化物酶,MDA 表示丙二醛,CAT 表示过氧化氢酶;与对照组比较,* $P < 0.05$;与 NAC 组比较,# $P < 0.05$ 。

Note: NAC stands for N-acetylcysteine; SOD stands for superoxide dismutase; GSH stands for glutathione; GSH-Px stands for glutathione peroxidase; MDA stands for malondialdehyde; CAT stands for catalase; compared with the control group, * $P < 0.05$; compared with the NAC group, # $P < 0.05$.

表达水平均上调,差异均有统计学意义($P<0.05$),各暴露组 *IκB* mRNA 表达水平与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。NAC 组大鼠脑组织 *IKKα* 和 *NF-κB* mRNA 表达水平与 46.0 mg·kg⁻¹ ACN 组比较均下调,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 ACN 染毒对大鼠脑组织 *NF-κB* 信号通路相关蛋白的影响

Western Blot 结果表明(图 3),各剂量染毒组大鼠脑组织 p-*IKKα/β*、*IKKα* 和 *NF-κB* 蛋白相对表达水平均升高,差异均具有统计学意义($P<0.05$);23.0 mg·kg⁻¹和 46.0 mg·kg⁻¹ ACN 组 p-*IκBα* 蛋白相对表达水平均显著升高($P<0.05$);各暴露组 *IκBα* 蛋白相对表达水平与对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$)。与 46.0 mg·kg⁻¹ ACN 组比较,NAC 组大鼠脑组织 p-*IKKα/β* 和 *NF-κB* 蛋白相对表达水平降低($P<0.05$)。

2.5 ACN 对大鼠脑组织 *TLR4* mRNA 和蛋白表达水平的影响

如图 4 所示,46.0 mg·kg⁻¹ ACN 组大鼠脑组织 *TLR4* mRNA、蛋白相对表达水平均升高($P<0.05$),与 46.0 mg·kg⁻¹ ACN 组比较,NAC 组 *TLR4* mRNA、蛋白相对表达水平差异均无统计学意义($P>0.05$)。

3 讨论 (Discussion)

机体在细胞呼吸和能量代谢过程中发生有氧化并产生 ROS,包括超氧根离子($\cdot\text{O}_2^-$)、羟自由基($\cdot\text{OH}$)和过氧化氢(hydrogen peroxide, H_2O_2)等。当

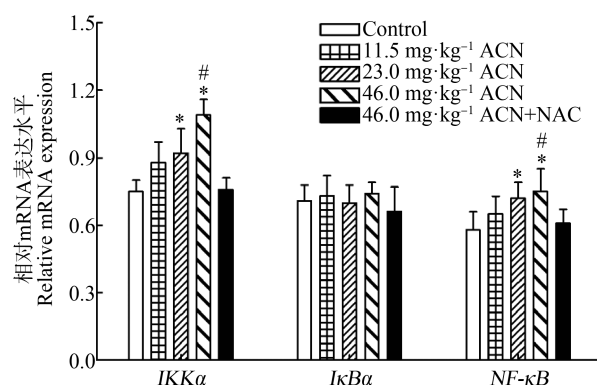


图2 ACN 染毒后大鼠脑组织 *IKKα*、*IκBα* 和 *NF-κB* mRNA 表达水平变化

注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 NAC 组比较,# $P<0.05$;n=6。

Fig. 2 Effects of ACN exposure on *IKKα*, *IκBα* and *NF-κB* mRNA expression in rat brain tissue

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

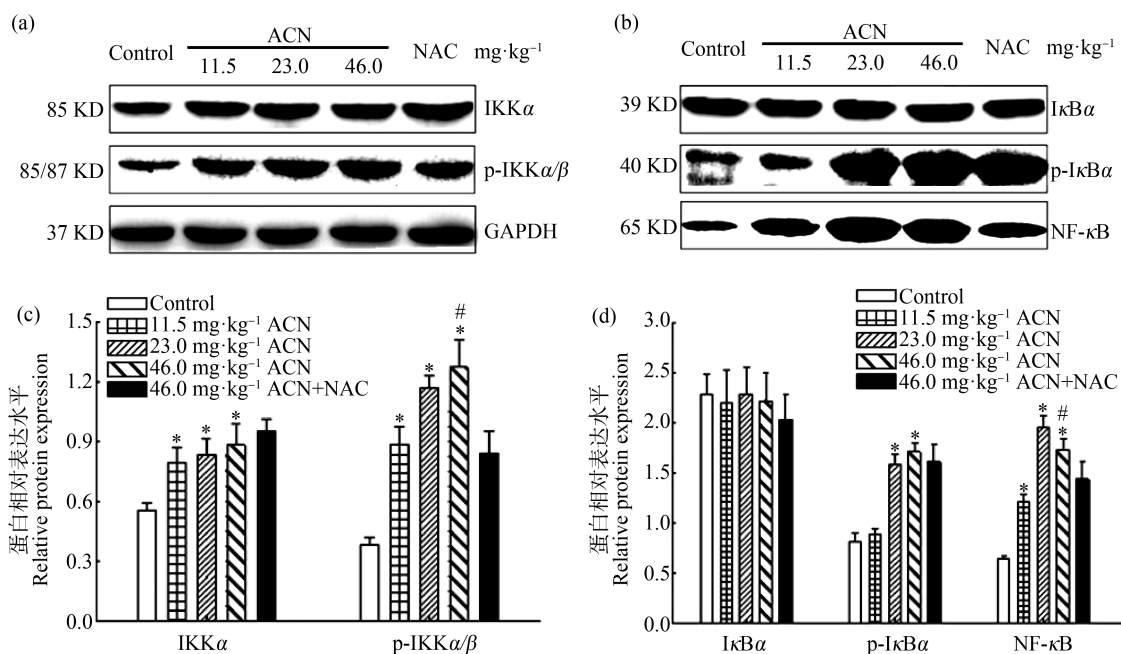


图3 ACN 染毒后大鼠脑组织 *NF-κB* 信号通路相关蛋白表达水平变化

注:(a)和(b)为蛋白免疫印迹条带((a)和(b)共用同一内参 GAPDH 条带);(c) p-*IKKα/β* 和 *IKKα* 蛋白相对表达水平;

(d) p-*IκBα*、*IκBα* 和 *NF-κB* 蛋白相对表达水平;n=6;与对照组比较,* $P<0.05$;与 NAC 组比较,# $P<0.05$ 。

Fig. 3 Effects of ACN exposure on protein expression related to *NF-κB* signaling pathway in rat brain

Note: (a) and (b) the immune printing strips ((a) and (b) share the same GAPDH strip); (c) relative protein expression of p-*IKKα/β* and *IKKα*;

(d) relative protein expression of p-*IκBα*, *IκBα* and *NF-κB*; n=6; compared with the control group, * $P<0.05$; compared with the NAC group, # $P<0.05$.

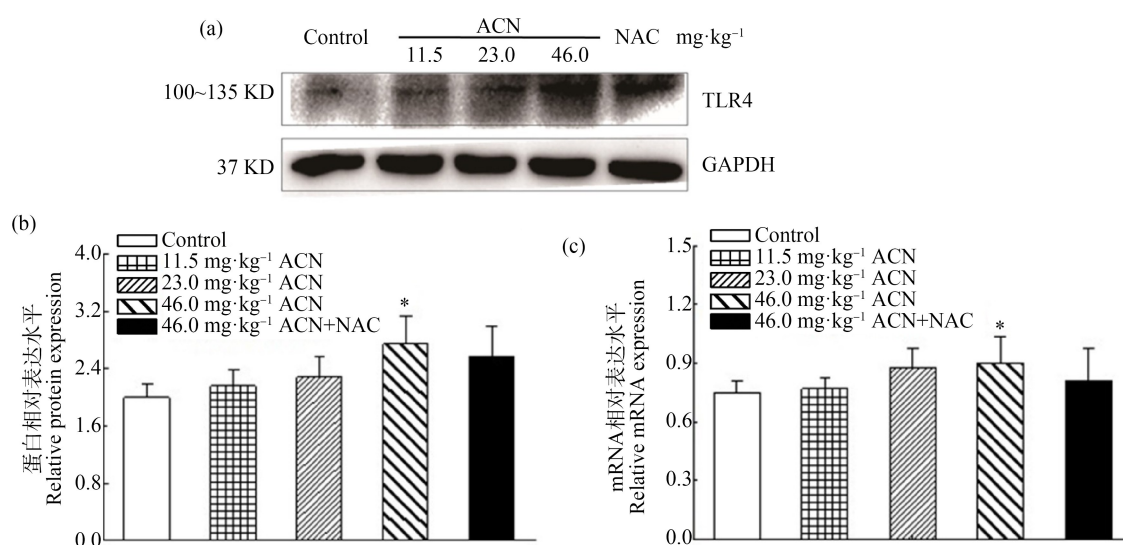


图4 ACN染毒后大鼠脑组织 TLR4 mRNA 和蛋白表达水平变化

注:(a)蛋白免疫印迹条带;(b)TLR4 蛋白相对表达水平;(c)TLR4 mRNA 相对表达水平;与对照组比较,* $P<0.05$;与 NAC 组比较,# $P<0.05$; $n=6$ 。

Fig. 4 Effects of ACN exposure on the TLR4 mRNA and protein expression in rat brain

Note: (a) the immune printing strips; (b) TLR4 relative protein expression; (c) TLR4 relative mRNA expression; compared with the control group, * $P<0.05$; compared with the NAC group, # $P<0.05$; $n=6$.

机体内产生过量的 ROS、抗氧化能力减弱引起 ROS 清除减慢时,会破坏机体的氧化/还原平衡状态,导致机体发生氧化应激。ROS 可引发组织细胞 DNA 氧化损伤、脂质过氧化、蛋白变性或失活,并参与细胞内信号通路转导^[9],衰老、神经退行性病变、炎症性疾病和癌症等其他重大疾病也与氧化应激有关^[10]。细胞内存在有效的抗氧化防御系统,抗氧化酶类如 SOD、CAT 和 GSH-Px 在消除 ROS 的过程中起着至关重要的作用^[11]。Mahalakshmi 等^[12]以 100 mg·kg⁻¹ ACN 经饮水染毒雄性 Wistar 大鼠,14 d 和 28 d 后大鼠脑组织 GST 含量显著减少,SOD、CAT 和 GSH-Px 活性均显著降低。本研究表明,11.5 mg·kg⁻¹ 的 ACN 暴露导致大鼠脑组织 CAT 活性降低,提示 CAT 可保护机体免受氧化损伤,但 23.0 mg·kg⁻¹ 和 46.0 mg·kg⁻¹ ACN 暴露组与对照组比较差异无统计学意义,其原因可能是 CAT 通过代偿性升高来催化 H₂O₂ 生成无毒的 H₂O 和 O₂,使 H₂O₂ 不会被金属离子催化分解为毒性更强的·OH。GSH-Px 是含有巯基催化过氧化物分解的酶,其活性的高低间接反映机体清除活性氧的能力。46.0 mg·kg⁻¹ ACN 组大鼠脑组织 GSH-Px 活性与对照组比较降低,其原因可能是 GSH-Px 在清除机体内过量的过氧化物过程中被大量消耗,同时自由基攻击 GSH-Px 的巯基部位引起酶活性的降低^[13]。GSH 是机体

内重要的非酶性小分子抗氧化剂,通过非酶促反应清除单线态氧和·OH,是机体抵抗氧化损伤的第一道防线^[14]。本次研究发现,23.0 mg·kg⁻¹ 和 46.0 mg·kg⁻¹ ACN 组大鼠脑组织 GSH 含量降低,这与金娜等^[15]的研究结果相一致,ACN 及其代谢产物 2-氰环氧乙烷(2-cyanoethyleneoxide, CEO)在体内与 GSH 结合,GSH 被消耗。CEO 经环氧化物水解酶水解后释放 CN⁻,CN⁻抑制线粒体呼吸链和抗氧化酶 CAT 和 GSH-Px 活性导致组织发生氧化损伤^[16-17]。MDA 是细胞膜脂质过氧化的终产物,其含量能间接反映生物膜系统受外源化学物氧化损伤的程度。本研究发现,各剂量染毒组大鼠脑组织 MDA 含量均明显升高,这与国外学者的研究结果相似^[18],说明 ACN 可致大鼠脑组织发生氧化应激。

NAC 是一种机体内清除自由基的强有力亲核试剂,也是细胞的巯基供应体,可竞争性地阻止自由基与抗氧化酶发生反应,同时也可促进机体内 GSH 的合成,减弱机体氧化损伤程度^[19-20]。Esmat 等^[21]以 5 mmol·L⁻¹ ACN 处理大鼠原代神经胶质细胞后,细胞内 GSH 含量降低,MDA 含量增加,并产生大量的 CN⁻,NAC 干预后可降低细胞内 MDA 含量、升高 GSH 含量,与 ACN 和/或其代谢产物反应,阻止其转化为 CN⁻以及随后的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)消耗。本研究发现,通过 300 mg·

kg^{-1} NAC 干预后,大鼠脑组织 SOD 活性升高,MDA 含量及 CAT 活性均降低,提示 NAC 可调节 ACN 引起的机体氧化还原失衡状态,使机体免受氧化损伤。

炎症反应是指当机体受到内外在刺激时产生的一种自我保护性应激反应。IL-6 在自然免疫向获得性免疫转变的过程中起着关键作用,可促进单核细胞趋化因子的产生,诱导 B 细胞分化产生抗体以及 T 细胞的活化和增殖。IL-1 有 IL-1 α 和 IL-1 β 这 2 种分子形式,正常生理状态下脑组织中 IL-1 β 浓度非常低,在发生创伤性脑损伤时,神经元和星形胶质细胞迅速释放 IL-1 β ,神经元发生肿胀、萎缩,随后消失溶解,神经元数目减少^[22]。TNF 有 2 种同源蛋白受体 TNFR1 和 TNFR2,可通过激活下游 NF- κ B 信号通路募集促炎症细胞因子,促进炎症反应^[23]。本研究发现,ACN 染毒后,大鼠脑组织 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 浓度均升高,提示 ACN 可诱导大鼠脑组织发生炎症反应。

Toll 样受体(toll-like receptors, TLRs)是吞噬细胞表面的一种模式识别受体(pattern recognition receptors, PRRs),可以识别一种或多种病原相关分子模式(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs),对侵入机体的病原体迅速产生应答,产生急性炎症,调节机体的获得性免疫反应^[24-25]。TLR4 属于 I 型跨膜蛋白受体,分为胞外段、胞内段和跨膜区 3 个部分,胞外段可识别 PAMPs;跨膜区由半胱氨酸组成,

胞内段与 IL-1 受体同源,被称为 Toll/IL-1 受体(Toll/interleukin-1 receptor, TIR),即 TIR 区域,该结构域招募下游衔接蛋白形成复合体,将信号传导至细胞核内^[26]。TLR4 信号通路分为 MyD88 依赖性和 MyD88 非依赖性/TRIF 依赖性 2 条细胞信号传导途径,TLR4 的 TIR 与 MyD88 连接,MyD88 与 IRAK-1 及其配体结合,IRAK-1 在激酶的作用下高度磷酸化,脱离 MyD88 与 TNF 受体相关因子 6(TRAF-6)结合, TAK-1 被 TRAF-6 激活后介导 NF- κ B 抑制因子 I κ B 磷酸化,激活 NF- κ B,与炎症反应调节基因启动子区域的 NF- κ B 结合位点相结合,启动细胞因子如 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 和 IL-12 基因的转录^[27-28]。

NF- κ B 是细胞核内重要的转录调节因子,细胞未受刺激时,NF- κ B 二聚体 p65/p50 与其抑制蛋白 I κ B 以无活性的三聚体复合物 p65/p50·I κ B 存在于胞质中,阻止 NF- κ B 活化后向核内转移。当受到紫外线、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、IL-6、IL-1 β 、TNF- α 及 ROS 等多种刺激时,该三聚体被激活,进而激活 IKK,使 I κ B 磷酸化并发生泛素化,最后被 26S 蛋白酶小体识别并降解,NF- κ B 从胞质易位到细胞核,活化后的 NF- κ B 可上调下游多种促炎性因子(如 IL-1、IL-6、TNF- α 和 IL-8)、黏附分子和趋化因子 mRNA 表达水平并产生次级炎症介质的酶(图 5)。同时 NF- κ B 可被这些下游细胞因子再次刺激,造成炎症反应的持续或放大^[29]。

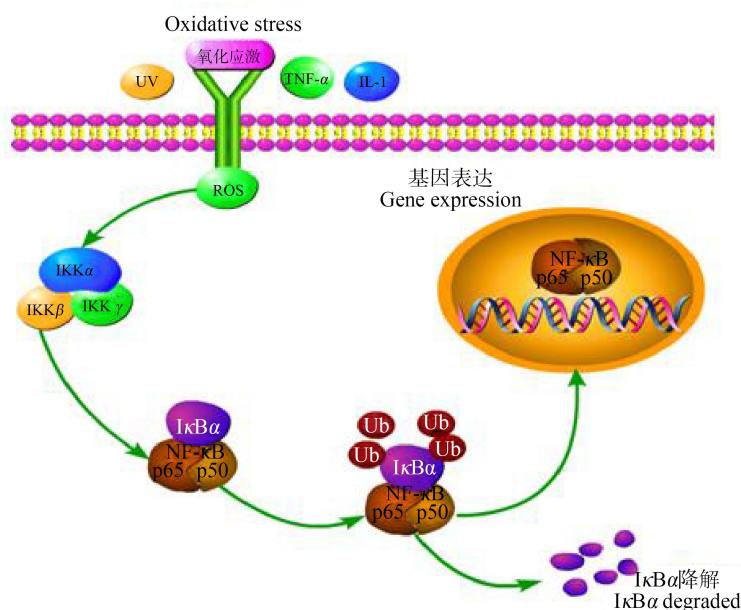


图5 NF- κ B 信号通路机理图

Fig. 5 Mechanism diagram of NF- κ B signaling pathway

本次研究表明, ACN 染毒后, 大鼠脑组织 *IKK α* 、*NF- κ B* 和 *TLR4* mRNA 相对表达水平均上调, *IKK α* 、*p-IKK α / β* 、*I κ B α* 、*p-I κ B α* 、*NF- κ B* 和 *TLR4* 蛋白相对表达量均升高, 提示 ACN 诱导大鼠发生氧化应激、炎症反应, 进而激活 NF- κ B 信号通路, TLR4 参与了 ACN 染毒后 NF- κ B 的活化。本研究发现, *I κ B α* mRNA 和蛋白相对表达量与对照组比较差异无统计学意义, 其可能原因是 *I κ B α* 基因启动子中的 NF- κ B 结合位点诱导 *I κ B α* 基因表达迅速上调, 当胞浆内 *I κ B α* 浓度减少后, *I κ B α* 通过自身的负反馈调节 NF- κ B 的活性, 维持细胞的自身稳定性^[30-31]。经 300 mg·kg⁻¹ NAC 干预后, 与 46.0 mg·kg⁻¹ ACN 组比较, 大鼠脑组织 *IKK α* 和 NF- κ B mRNA 表达水平均下调, *p-IKK α / β* 和 NF- κ B 蛋白相对表达量均下降, 说明 NAC 通过拮抗 ACN 诱导脑组织发生氧化应激, 抑制 NF- κ B 的活化。

综上所述, 在本研究的实验条件下, ACN 通过诱导大鼠脑组织氧化/抗氧化失衡和炎症反应, 进而激活 NF- κ B 信号通路, 这可能是 ACN 致大鼠脑损伤的机制之一。NAC 干预可拮抗 ACN 诱导脑组织发生氧化应激, 抑制 NF- κ B 的活化。

通讯作者简介: 李芝兰(1962—), 女, 教授, 主要研究方向为妇女劳动卫生与生殖健康及生殖毒理学。

参考文献 (References):

- [1] Zuckerman A J. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans [J]. *Journal of Clinical Pathology*, 1995, 48(7): 691
- [2] 陆荣柱, 王苏华, 邢光伟, 等. 丙烯腈染毒大鼠脑病理形态学改变及其对神经特异蛋白质表达的影响[J]. *毒理学杂志*, 2007, 21(3): 183-186
Lu R Z, Wang S H, Xing G W, et al. Histopathology of neurotoxicity and expression of nerve specific proteins in male rats exposed to acrylonitrile [J]. *Journal of Toxicology*, 2007, 21(3): 183-186 (in Chinese)
- [3] Jacob S, Ahmed A E. Acrylonitrile-induced neurotoxicity in normal human astrocytes: Oxidative stress and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine formation [J]. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2003, 13(3): 169-179
- [4] 罗波艳, 张瑞萍, 王珂, 等. 丙烯腈暴露对大鼠脑组织损伤及 iNOS/p38 MAPK 信号通路关键蛋白表达的影响[J]. *生态毒理学报*, 2018, 13(2): 84-90
Luo B Y, Zhang R P, Wang K, et al. The effects of acrylonitrile-exposure on brain tissue and the key protein expression of iNOS/p38 MAPK signaling pathway in rats [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2018, 13(2): 84-90 (in Chinese)
- [5] Muto T, Sakurai H, Omae K, et al. Health profiles of workers exposed to acrylonitrile [J]. *The Keio Journal of Medicine*, 1992, 41(3): 154-160
- [6] Kaneko K, Omae K. Effect of chronic exposure to acrylonitrile on subjective symptoms [J]. *The Keio Journal of Medicine*, 1992, 41(1): 25-32
- [7] Dang Y H, Zhao Q L, Luo B Y, 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
- [8] 高玲, 黄鹏, 潘慧, 等. 促炎性细胞因子诱导 NF- κ B 激活促进神经细胞凋亡机制[J]. *中国病理生理杂志*, 2005, 21(8): 1648
- [9] Ray P D, Huang B W, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling [J]. *Cellular Signalling*, 2012, 24(5): 981-990
- [10] Sena L A, Chandel N S. Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species [J]. *Molecular Cell*, 2012, 48(2): 158-167
- [11] Yang Y C, Lin H Y, Su K Y, et al. Rutin, a flavonoid that is a main component of *Saussurea involucreata*, attenuates the senescence effect in D-galactose aging mouse model [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 2012: 980276
- [12] Mahalakshmi K, Pushpakiran G, Anuradha C V. Taurine prevents acrylonitrile-induced oxidative stress in rat brain [J]. *Polish Journal of Pharmacology*, 2003, 55(6): 1037-1043
- [13] Renugadevi J, Prabu S M. Naringenin protects against cadmium-induced oxidative renal dysfunction in rats [J]. *Toxicology*, 2009, 256(1-2): 128-134
- [14] Chakraborti A, Gulati K, Ray A. Age related differences in stress-induced neurobehavioral responses in rats: Modulation by antioxidants and nitrenergic agents [J]. *Behavioural Brain Research*, 2008, 194(1): 86-91
- [15] 金娜, 马国燕, 李福轮, 等. 丙烯腈染毒致小鼠脑组织氧化损伤的研究[J]. *环境与健康杂志*, 2010, 27(12): 1053-1055
Jin N, Ma G Y, Li F L, et al. Effect of acrylonitrile on oxidative damage in brain tissues of mice [J]. *Journal of Environment and Health*, 2010, 27(12): 1053-1055 (in Chinese)
- [16] Hariharakrishnan J, Satpute R M, Prasad G B K S, et al. Oxidative stress mediated cytotoxicity of cyanide in LLC-

- MK2 cells and its attenuation by alpha-ketoglutarate and N-acetyl cysteine [J]. *Toxicology Letters*, 2009, 185(2): 132-141
- [17] Satpute R M, Hariharakrishnan J, Bhattacharya R. Effect of alpha-ketoglutarate and N-acetyl cysteine on cyanide-induced oxidative stress mediated cell death in PC12 cells [J]. *Toxicology and Industrial Health*, 2010, 26(5): 297-308
- [18] El-Sayed E S M, Abo-Salem O M, Abd-Ellah M F, et al. Hesperidin, an antioxidant flavonoid, prevents acrylonitrile-induced oxidative stress in rat brain [J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2008, 22(4): 268-273
- [19] Huang Q Z, Aluise C D, Joshi G, et al. Potential *in vivo* amelioration by N-acetyl-L-cysteine of oxidative stress in brain in human double mutant APP/PS-1 knock-in mice: Toward therapeutic modulation of mild cognitive impairment [J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2010, 88(12): 2618-2629
- [20] Gonçalves J F, Fiorenza A M, Spanevello R M, et al. N-acetylcysteine prevents memory deficits, the decrease in acetylcholinesterase activity and oxidative stress in rats exposed to cadmium [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2010, 186(1): 53-60
- [21] 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(3): 111-118
- [22] Tong L Q, Balazs R, Soiaipornkul R, et al. Interleukin-1 beta impairs brain derived neurotrophic factor-induced signal transduction [J]. *Neurobiology of Aging*, 2008, 29(9): 1380-1393
- [23] Wang W Y, Tan M S, Yu J T, et al. Role of pro-inflammatory cytokines released from microglia in Alzheimer's disease [J]. *Annals of Translational Medicine*, 2015, 3(10): 136
- [24] Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity [J]. *Cell*, 2006, 124(4): 783-801
- [25] 李光照, 杭春华. Toll样受体在脑损伤中的作用机制和研究进展[J]. *医学研究生学报*, 2010, 23(12): 1319-1323
- Li G Z, Hang C H. Action mechanisms of Toll-like receptors in brain injury [J]. *Journal of Medical Postgraduates*, 2010, 23(12): 1319-1323 (in Chinese)
- [26] Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity [J]. *Immunity*, 2011, 34(5): 637-650
- [27] Carmody R J. Nuclear factor- κ B: Activation and regulation during Toll-like receptor signaling [J]. *Cellular & Molecular Immunology*, 2007, 4(1): 31-41
- [28] Verstrepen L, Bekaert T, Chau T L, et al. TLR-4, IL-1R and TNF-R signaling to NF-kappaB: Variations on a common theme [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008, 65(19): 2964-2978
- [29] 王晓晨, 吉爱国. NF- κ B 信号通路与炎症反应[J]. *生理科学进展*, 2014, 45(1): 68-71
- [30] 谭余庆, 张永祥. 蛋白激酶 C 和 I κ BNF κ B 在免疫调节中的作用[J]. *免疫学杂志*, 2000, 16(6): 464-467
- [31] Scwab G M, Fujioka S, Schmidt C, et al. NF-kappaB in pancreatic cancer [J]. *International Journal of Gastrointestinal Cancer*, 2003, 33(1): 15-26