

苯吸入对骨髓细胞凋亡和组蛋白去乙酰化酶影响

葛杭萍 俞 康 陈枫煜 施益芬 洪莉莉

摘 要 **目的** 观察苯吸入对小鼠骨髓细胞损伤情况以及去乙酰化酶水平的变化。**方法** 自制动式苯吸入装置中放 8~9 周龄 CD1 雄性小鼠实验组吸入苯,正常对照组吸空气,6h/d,5 天/周,300ml/m³ 及 900ml/m³ 维持 12 周。末次吸苯后第 2 天,获取小鼠骨髓单个核细胞,利用流式细胞仪测骨髓细胞凋亡情况及用去乙酰化酶(HDAC)试剂盒测去乙酰化酶(HDAC 酶)活性变化。**结果** 300ml/m³:实验组小鼠骨髓细胞中早期凋亡细胞(Annexin V + PI -)比例(13.80% ± 5.31%)是对照组(8.33% ± 0.61%)的 1.65 倍($P < 0.05$);晚期骨髓凋亡细胞(Annexin V + PI +)比例与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。900ml/m³:实验组小鼠骨髓细胞中早期凋亡细胞(Annexin V + PI -)比例(13.10% ± 5.39%)是对照组(7.16% ± 2.18%)的 1.83 倍($P < 0.05$);实验组晚期凋亡骨髓细胞(Annexin V + PI +)比例(7.11% ± 3.54%)是对照组(4.54% ± 0.84%)的 1.57 倍($P < 0.05$)。(2)900ml/m³ 苯浓度吸入小鼠骨髓单个核细胞去乙酰化酶活性[(7.89 ± 2.58) × 10⁻³ A 值/微克]是正常对照组[(5.00 ± 1.52) × 10⁻³ A 值/微克]的 1.58 倍($P < 0.05$)。**结论** 苯吸入可致小鼠骨髓细胞产生凋亡坏死。苯吸入致小鼠骨髓细胞组蛋白去乙酰化酶活性升高。

关键词 CD1 小鼠 细胞凋亡 去乙酰化酶 苯

中图分类号 R73

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.03.009

Influence of Bone Marrow Apoptosis and the Activity of Histone Deacetylase in Benzene Inhalation Muouse. Ge Hangping, Yu Kang, Chen Fengyu, et al. Hematology Department, Zhejiang Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Zhejiang 310006, China

Abstract **Objective** To observe the apoptosis and the activity of histone deacetylase (HDAC) in benzene inhalation mouse bone marrow mononuclear cells. **Methods** Acclimated CD 1 male mice were put in to a self-made benzene inhalation chamber for 6 hours/day, 5 days/week with 300ml/m³ and 900ml/m³ concentrations of benzene and normal air for 12 weeks. The apoptosis of the bone marrow mononuclear cells was detected by flow cytometry. The nuclear proteins were extracted and the activity of histone deacetylase was tested with the colorimetric HDAC assay kit. **Results** 1. 300ml/m³: the (Annexin V + PI -) bone marrow cells in model group (13.80% ± 5.31%) was 1.65 times higher than the control group (8.33% ± 0.61%) ($P < 0.05$), and there was no difference between two groups of (Annexin V + PI +) cells ($P > 0.05$). 900ml/m³: the (Annexin V + PI -) bone marrow cells in model group (13.10% ± 5.39%) was 1.83 times higher than the control group (7.16% ± 2.18%) ($P < 0.05$). The (Annexin V + PI +) bone marrow cells in model group (7.11% ± 3.54%) was 1.57 times higher than the control group (4.54% ± 0.84%) ($P < 0.05$). 2. The HDAC activity of bone marrow mononuclear cells in 900ml/m³ concentrations of model group [(7.89 ± 2.58) × 10⁻³ (A value/μg)] was 1.58 times higher than the control group [(5.00 ± 1.52) × 10⁻³ (A value/μg)] ($P < 0.05$). **Conclusion** Benzene inhalation in mouse can cause significantly increased apoptosis of bone marrow cells in CD1 mice. The activity of HDAC is increased in bone marrow cells with chronic benzene exposure.

Key words CD1 mice; Apoptosis; Acetylation; Benzene

苯是一种常见的具有工业及环境污染的芳香族化合物,针对人群开展的流行性病学调查显示,长期大量的接触苯及其系列物可造成多种骨髓造血

功能障碍,但其导致造血系统毒性的分子机制尚不清楚^[1]。Eastmond 等^[2]在苯暴露后小鼠体内发现染色体的改变,并观察到拓扑异构酶 II (TOPO II) 活性明显下降,提示 TOPO II 功能的改变在苯致血液毒性中的作用。近年来体外研究发现氢醌染毒可以使骨髓细胞组蛋白 TOPO II 乙酰化修饰水平降低。本研究采用苯吸入小鼠模型中,观察体内苯对小鼠骨髓细胞的影响以及调控组蛋白乙酰化修饰水平的去乙酰化酶活性(HDAC)的改变情

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81172613,81502793)

作者单位:310000 杭州,浙江省中医院血液科(葛杭萍、洪莉莉);325000 温州医科大学附属第一医院(俞康、陈枫煜、施益芬)

通讯作者:俞康,博士生导师,主任医师,电子信箱:yukang62@126.com

况^[3, 4]。

材料与方法

1. 动物分组及模型建立:(1)自制式苯吸入装置:取 50ml 无菌注射器抽取分析纯苯 35ml 左右,置于便携式微量注射泵上,速度 0.8cm/h,通过一软管针头滴注入一个 250ml 棕色玻璃瓶橡胶塞内,并连接一个小量程气泵提供带苯入装置的气流;玻璃瓶橡胶塞上另接出一塑料软管连接进入 100L 塑料箱中;再取一根连接电磁式空气压缩机的橡胶软管也接入 100L 塑料箱中,提供给小鼠呼吸的氧气,并可以通过内嵌在塑料箱中的风扇将苯气体带入塑料箱内;在第 1 个箱子排气孔处用直径 20cm 的塑料软管连接另一个相同的塑料箱,并从连接电磁式空气压缩机的橡胶软管中分接一根橡胶软管接入第 2 个塑料箱中,通过内嵌的风扇提供该装置内小鼠氧气及带动第 1 个箱子排进来的苯气体,装上空气调节阀以调控进入两个塑料箱的空气量以便调整两个箱子内苯浓度。启动整套装置时,用胶带将整个装置密封,接出一根塑料管供苯浓度检测仪监控装置内气体中苯浓度。(2)造模及实验方法:实验分组与处理:将小鼠随机分组:①300ml/m³ 组:实验组 $n = 17$ 只、正常对照组 $n = 3$ 只;②900ml/m³ 组:实验组 $n = 31$ 只、正常对照组 $n = 4$ 只。正常对照组:放置于苯浓度为 0ml/m³ 的箱子中,空气吸入,期间不予食物和饮水;实验组:放置于苯浓度 300ml/m³ 和 900ml/m³ 箱子中,苯吸入,期间不予食物和饮水。按照 6h/d,5 天/周,休息 2 天,共 12 周。

2. 动物与实验试剂与仪器:8~9 周龄 CD1 品系雄性小鼠 55 只(北京维通利华有限公司, Vital River 实验室),实验动物许可证号 SCXK(京)2012-0001。分析纯苯(衢州巨化试剂有限公司),鼠外周血淋巴细胞分离液(天津灏洋生物科技公司),核蛋白提取试剂盒(Thermo),组蛋白去乙酰化酶(HDAC)活性测定试剂盒(Millipore),Annexin V - FITC/PI 双染细胞凋亡试剂盒(联科生物试剂有限公司),苯浓度检测仪 GasaletmicrO5(BW 公司)。

3. 动物处理及标本采集:末次吸苯第 2 天用摘眼球取血,并处死各组小鼠,分离小鼠双侧股骨及胫骨,取出双侧股骨和胫骨的骨髓细胞。

4. 骨髓细胞凋亡检测:用 1ml 注射器冲洗骨髓腔,滤液经无菌筛网过滤,取部分骨髓细胞采用流式细胞仪进行骨髓细胞凋亡检测。利用 Annexin V - FITC/PI 双染细胞凋亡试剂盒检测正常细胞(Annexin

V - PI -)、早期凋亡细胞(Annexin V + PI -)、晚期凋亡和坏死细胞(Annexin V + PI +)、机械损伤细胞(Annexin V - PI +)。采用 Cellquest 软件获取原始数据,用 FlowJo7.6 软件分析图像结果。

5. 骨髓单个核细胞去乙酰化酶活性检测:分离制备单个核细胞悬液,提取核蛋白,测核蛋白浓度,应用组蛋白去乙酰化酶(HDAC)活性测定试剂盒检测 HDAC 酶活性。实验步骤:(1)根据说明书试剂配制说明,进行各个工作试剂配制,另自备去离子水 1ml。各项试剂置于冰上待用。(2)具体步骤:①使用试剂盒所配套的 96 孔板,各孔加入 2 × HDAC assay buffer 10μl;②加入各待测样品 20μl,阴性对照(去离子水),阳性对照(hela nuclear extract) 20μl 加入上述孔中,吹打混匀;③在上述各孔中加入 4mmol/L HDAC substrate 10μl,轻轻吹打混匀;④37℃,孵育 60~70min;⑤稀释 activator solution 液加入 20μl 至每孔,轻轻吹打混匀;⑥37℃放置 10~20min;⑦在酶标仪 450nm 波长处读取吸光度值(A 值)。实验设复孔 2 个,取平均值为最终结果。HDAC 的活性表示:HDAC 的活性 = (A 值实验组 - A 值空白对照)/微克。

6. 统计学方法:用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理,所有实验所得数据用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. 小鼠骨髓细胞凋亡结果,数据分析采用 FlowJo7.6.1 软件:(1)300ml/m³ 苯浓度吸入小鼠凋亡结果:①300ml/m³ 浓度苯吸入小鼠骨髓细胞早期凋亡细胞(Annexin V + PI -),结果显示实验组早期凋亡细胞所占比例 13.88% ± 5.31%,正常对照组早期凋亡细胞所占比例 8.33% ± 0.61%,二者比较,实验组骨髓细胞早期凋亡比例有所升高,为对照组的 1.65 倍($P < 0.05$,图 1,图 2);②300ml/m³ 浓度苯吸入小鼠骨髓细胞晚期凋亡细胞(Annexin V + PI +)比例与正常对照组相比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。(2)900ml/m³ 苯浓度吸入小鼠凋亡结果:①900ml/m³ 浓度苯吸入小鼠骨髓细胞早期凋亡细胞(Annexin V + PI -),结果显示实验组早期凋亡细胞所占比例 13.10% ± 5.39%,正常对照组早期凋亡细胞所占比例 7.16% ± 2.18%,两者比较,实验组骨髓细胞早期凋亡细胞比例升高,为正常对照组的 1.83 倍($P < 0.05$,图 3,图 4);②900ml/m³ 浓度苯吸入小鼠骨髓

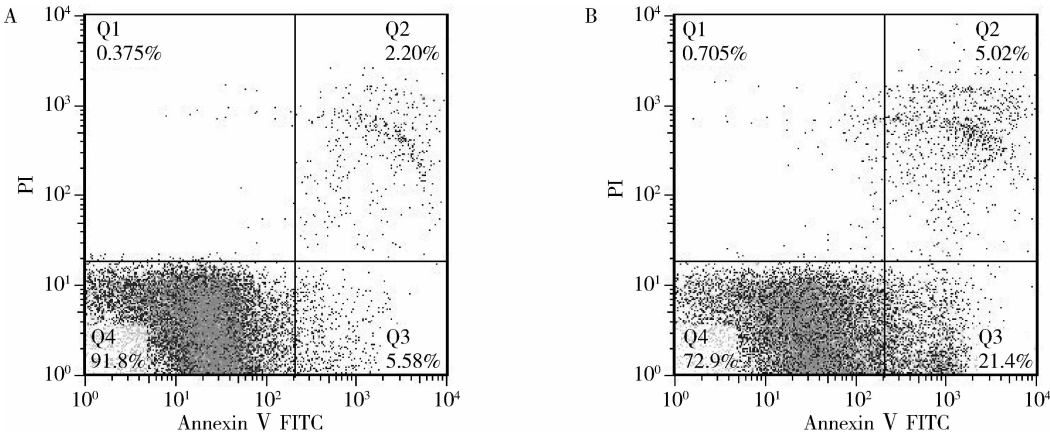


图 1 小鼠骨髓细胞早期凋亡结果

A. 正常对照组, Q3 区占 5.58% ; B. 实验组, Q3 区占 21.4%

细胞晚期凋亡细胞 (Annexin V + PI +), 实验组晚期凋亡细胞所占比例 $7.11\% \pm 3.54\%$ 正常对照组晚期凋亡细胞所占比例 $4.54\% \pm 0.84\%$, 两组比较, 实验组骨髓细胞比例升高, 为对照组的 1.57 倍 ($P < 0.05$, 图 5)。

2. $900\text{ml}/\text{m}^3$ 浓度苯吸入小鼠骨髓细胞 HDAC 酶活性结果: $900\text{ml}/\text{m}^3$ 浓度苯吸入小鼠骨髓单个核细胞 HDAC 酶活性检测, 结果显示实验组 HDAC 酶活性 $(7.89 \pm 2.58) \times 10^{-3} A$ 值/微克, 正常对照组 HDAC

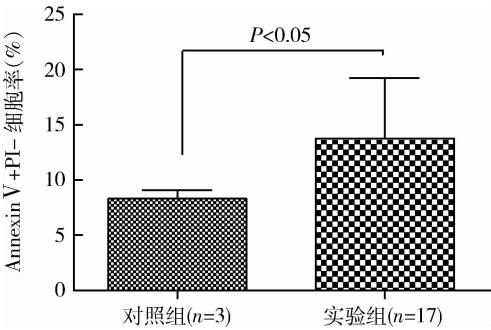


图 2 两组小鼠骨髓细胞早期凋亡细胞柱状图

苯吸入浓度 $300\text{ml}/\text{m}^3$

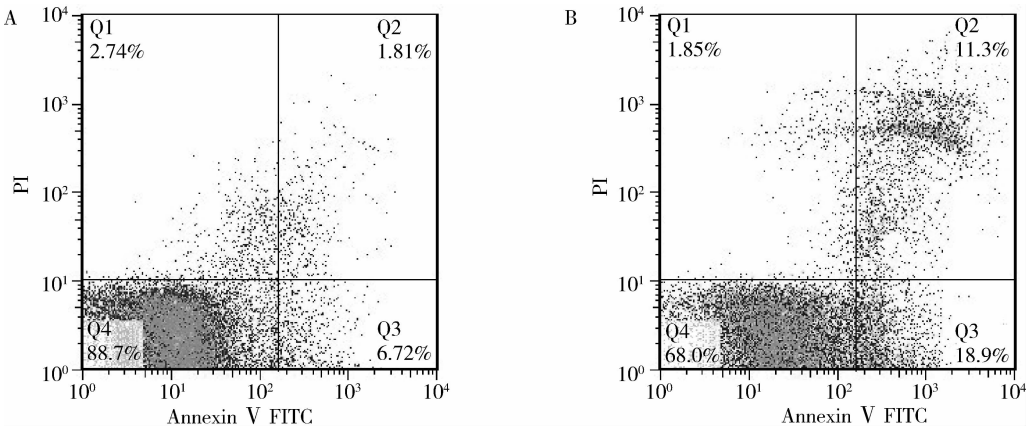


图 3 小鼠骨髓细胞早期凋亡结果

A. 正常对照组; B. 实验组

酶活性 $(5.00 \pm 1.52) \times 10^{-3} A$ 值/微克, 两组比较, 实验组明显升高, 为正常对照组的 1.58 倍 ($P < 0.05$, 图 6, 表 1)。

讨 论

苯及其代谢物 (如氢醌、苯醌) 是公认的对人体

造成血液毒性的化学物质^[5]。慢性高浓度职业苯暴露与骨髓干细胞损伤息息相关^[6]。20 世纪 80 年代就有文献报道苯在人体内首先经过肝脏微粒体的 P450 细胞色素酶系统的 2E1 酶 (CPY2E1) 的氧化产生一系列代谢产物, 但是这些代谢产物随后会积累在

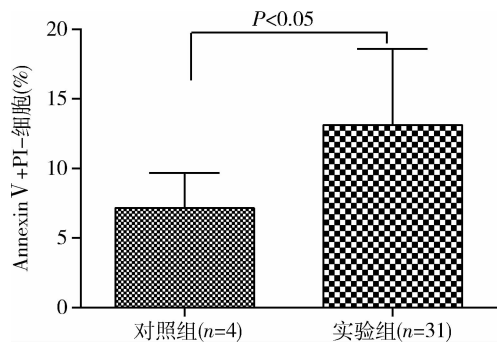


图4 两组小鼠骨髓细胞早期凋亡细胞
苯吸入浓度 900ml/m³

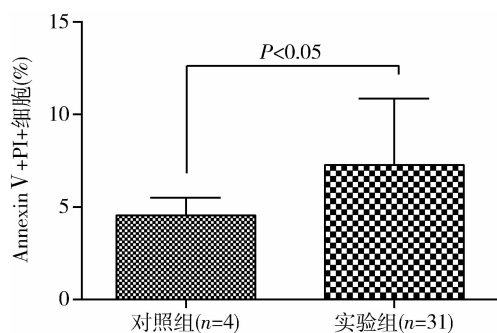


图5 两组小鼠骨髓细胞晚期凋亡细胞
苯吸入浓度 900ml/m³

表1 正常对照及苯处理小鼠骨髓单个核细胞
HDAC 活性值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HDAC 酶活性(A 值/微克 $\times 10^{-3}$)
正常对照组	4	5.0 $\pm$ 1.52
苯实验组	31	7.89 $\pm$ 2.58

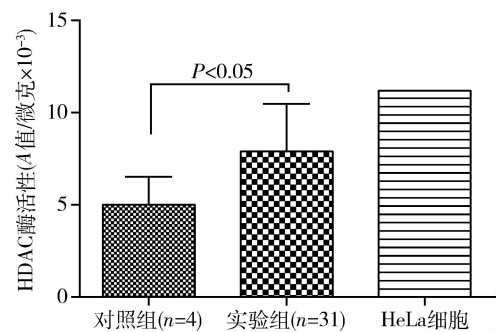


图6 两组小鼠 HDAC 酶活性
苯吸入浓度 900ml/m³

人体的各个靶器官中,其中最重要的就是骨髓细胞^[7]。

1996年 Frantz 等^[8]体外细胞实验中首次提出苯的活性代谢产物可以抑制拓扑异构酶 II (TOPO II α)

的活性,引起拓扑异构酶功能失常,影响 DNA 的拓扑状态,继而损伤 DNA,最终诱导细胞凋亡。前期体外细胞实验研究也显示,正常人骨髓单个核细胞氢醌中培养后出现明显的细胞凋亡以及 TOPO II 表达水平明显下降,同时伴随 TOPO II α 启动子组蛋白 H4 乙酰化水平降低^[9],结果提示苯代谢产物氢醌致造血损伤可能与组蛋白乙酰化状态改变存在一定相关性。进一步体外细胞实验研究证实氢醌染毒的人骨髓单个核细胞组蛋白去乙酰化酶活性及其 mRNA 表达水平均明显升高,表明在一定时间范围内,苯在体内引起造血损伤过程中伴随细胞内去乙酰化酶活力升高,提示体内低乙酰化水平与 HDAC 活力升高有关^[10]。

动物实验研究显示,在小鼠皮下注射苯溶液染毒后观察到小鼠外周血细胞数目明显减少,且骨髓细胞形态学和组织病理学均显示造血细胞减少,非造血细胞增加,呈现出骨髓衰竭象,且骨髓组织 TUNEL 检测显示骨髓细胞凋亡^[11]。本研究模拟呼吸道吸入途径染毒,经处理后获得小鼠骨髓单个核细胞,一部分行细胞凋亡检测,实验结果显示苯吸入后小鼠骨髓细胞凋亡明显增加,与前期文献苯可致小鼠骨髓细胞损伤研究结论一致,结果显示高浓度时骨髓细胞晚期凋亡和坏死更加明显。文献研究显示苯进入体内后在肝脏中进行代谢,经磺基转移酶作用生成苯酚,但该酶 Km 值较低,故当苯浓度过高时,磺基转移酶达到饱和状态,此时苯酚经过葡萄糖醛酸化作用产生具有更大毒性的二羟基类,即氢醌或苯酚^[12]。故 900ml/m³ 可能超出了磺基转移酶的作用苯浓度,而是葡萄糖醛酸酶起了主要作用后产生了大量具有更大毒性的二羟基类而对骨髓细胞产生了更大的损害,具体机制仍需进一步研究。

Eastmond 等^[2, 13]将 B6C3F1 雄性小鼠 440mg/kg 苯灌胃 3 天后获得小鼠骨髓单个核细胞中的拓扑异构酶,发现其酶活性明显下降,证实苯可以抑制小鼠骨髓单个核细胞 TOPO II 功能,但具体从何位点影响的机制并未作进一步的研究。后有体外研究显示在人白血病细胞系以及氢醌染毒后的人骨髓单个核细胞中观察到 TOPO II α 活性及含量均明显下降,并同时伴随着 TOPO II α 启动子组蛋白 H₄ 乙酰化水平的降低,故认为乙酰化水平的降低可能是 TOPO II α 活性和含量下降的机制之一^[14, 15]。

为了开展进一步的体内研究,笔者将上述另一部分骨髓单个核细胞行 HDAC 酶活性检测,本实验结果显示 900ml/m³ 浓度苯吸入小鼠组骨髓单个核细胞

TOPO II α 启动子的组蛋白的去乙酰化酶(HDAC)的活性较正常对照组明显增高。笔者虽未从正面验证小鼠骨髓单个核细胞组蛋白乙酰化修饰的水平高低,但文献显示组蛋白的乙酰化修饰水平可由组蛋白去乙酰化酶和组蛋白乙酰转移酶共同调节的,而 Sonnemann 等认为组蛋白乙酰化水平的下降主要受去乙酰化酶活性高低的影响^[16,17]。故去乙酰化酶活性升高理论上可以使组蛋白的乙酰化水平降低,故下一步研究目标将继续观察检测小鼠体内 TOPO II α 启动子组蛋白乙酰化水平的变化,从而来验证两者之间的联系,以及在体内对小鼠 TOPO II 活性和含量产生的影响,以及在模型小鼠中注入去乙酰化酶抑制剂后再观察是否能降低骨髓细胞凋亡及去乙酰化酶活性是否降低来反面证明苯小鼠骨髓细胞损伤机制。

综上所述,结合课题组前期研究,笔者发现苯及其代谢产物所致造血毒性与乙酰化水平降低相关,这可能是通过 HDAC 活性进行调控。本实验进一步加深了对苯代谢产物致造血损伤机制的认识,同时为去乙酰化酶抑制剂在治疗苯致造血损伤的临床应用提供一个新的思路。

参考文献

- 1 Gasiewicz TA, Singh KP, Casado FL. The aryl hydrocarbon receptor has an important role in the regulation of hematopoiesis: implications for benzene - induced hematopoietic toxicity [J]. Chem Biol Interact, 2010, 184(1-2):246-251
- 2 Eastmond DA, Schuler M, Frantz C, *et al.* Characterization and mechanisms of chromosomal alterations induced by benzene in mice and humans [J]. Res Rep, 2001, 103:1-68;discussion69-80
- 3 Plappert U, Barthel E, Seidel HJ. Reduction of benzene toxicity by toluene [J]. Environ Mol Mutagen, 1994, 24(4):283-292
- 4 Snyder CA, Goldstein BD, Sellakumar A, *et al.* Toxicity of chronic benzene inhalation:CD-1 mice exposed to 300 ppm [J]. Bull Environ Contamin and Toxicol, 1982, 29(4):385-391
- 5 Wilbur S, Wohlers D, Paikoff S, *et al.* ATSDR evaluation of potential for human exposure to benzene [J]. Toxicol Indust Health, 2008, 24(5-6):399-442
- 6 Pyatt D. Benzene and hematopoietic malignancies [J]. Clin Occupational and environmental medicine, 2004, 4(3):529-555
- 7 Andrews LS, Sasame HA, Gillette JR. 3H - Benzene metabolism in rabbit bone marrow [J]. Life Sci, 1979, 25(7):567-572
- 8 Frantz CE, Chen H, Eastmond DA. Inhibition of human topoisomerase II in vitro by bioactive benzene metabolites [J]. Environ Health perspect, 1996, 104 Suppl 6:1319-1323
- 9 Yu K, Shi YF, Yang KY, *et al.* Decreased topoisomerase IIalpha expression and altered histone and regulatory factors of topoisomerase IIalpha promoter in patients with chronic benzene poisoning [J]. Toxicol Lett, 2011, 203(2):111-117
- 10 洪莉莉. 氢醌对人骨髓单个核细胞组蛋白去乙酰化酶的影响 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2016, 34(3):189-193
- 11 任行洲, 俞康, 王明山, 等. 苯诱发小鼠再生障碍性贫血模型建立的初步探讨 [J]. 温州医学院学报, 2004, 34(05):331-333
- 12 Wells MS, Nerland DE. Hematotoxicity and concentration - dependent conjugation of phenol in mice following inhalation exposure to benzene [J]. Toxicol Lett, 1991, 56(1-2):159-166
- 13 Eastmond DA, Mondrala ST, Hasegawa L. Topoisomerase II inhibition by myeloperoxidase - activated hydroquinone: a potential mechanism underlying the genotoxic and carcinogenic effects of benzene [J]. Chem Biol Interact, 2005, 153-154:207-216
- 14 施益芬, 俞康, 陈怡, 等. 氢醌对人骨髓单个核细胞 TOPO II α 表达的影响及其可能机制 [J]. 温州医学院学报, 2010, 34(02):164-167
- 15 Kurz EU, Wilson SE, Leader KB, *et al.* The histone deacetylase inhibitor sodium butyrate induces DNA topoisomerase II alpha expression and confers hypersensitivity to etoposide in human leukemic cell lines [J]. Mol Cancer Ther, 2001, 1(2):121-131
- 16 Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors [J]. Nat Rev Drug Discovery, 2006, 5(9):769-784
- 17 Sonnemann J, Gruhn B, Wittig S, *et al.* Increased activity of histone deacetylases in childhood acute lymphoblastic leukaemia and acute myeloid leukaemia; support for histone deacetylase inhibitors as antileukaemic agents [J]. B J Haematol, 2012, 158(5):664-666

(收稿日期:2016-07-18)

(修回日期:2016-08-02)

《医学研究杂志》启用远程稿件处理系统的启事

《医学研究杂志》已经启用远程稿件处理系统,请各位作者登录《医学研究杂志》网站:<http://www.yxyjzz.cn>,注册为作者后进行投稿。咨询电话:010-52328677(路编辑),52328679(单编辑)。

《医学研究杂志》编辑部