

# 三种氯代烯烃对人角质形成细胞的细胞毒性作用

周承藩, 甄, 沈彤, 涂登云, 朱启星

(安徽医科大学公共卫生学院毒理中心, 安徽 合肥 230032)

**摘要:** 目的 探讨三氯乙烯 (trichloroethylene, TCE)、四氯乙烯 (perchloroethylene, PCE) 和二氯乙烯 (dichloroethylene, DCE) 对人角质形成细胞 (keratinocyte, KC) 的细胞毒性作用以及其时间-剂量-效应关系。方法 利用中性红吸收 (neutral red uptake, NRU) 试验测定 TCE、PCE 和 DCE 对人 KC 的中性红半数吸收浓度 (50% neutral red uptake, NR<sub>50</sub>), 用乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放试验研究三者对人 KC 细胞毒作用, 并探讨其时间-剂量-效应关系。结果 TCE、PCE 和 DCE 对人 KC 的 NR<sub>50</sub> 分别 4.53 mmol/L、2.16 mmol/L 和 5.57 mmol/L, LDH 释放试验表明三者对人角质形成细胞具有明显的细胞毒作用, 且具有时间-剂量-效应关系。结论 TCE、PCE 和 DCE 都对人 KC 具有细胞毒性, 且 PCE > TCE > DCE。这可能与三者对人 KC 的细胞膜损伤有关。

**关键词:** 三氯乙烯; 四氯乙烯; 二氯乙烯; 角质形成细胞; 细胞毒性

中图分类号: R994.1 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2005)02-0076-04

## Cytotoxicity of trichloroethylene, perchloroethylene and dichloroethylene on human keratinocytes

ZHOU Cheng-fan, DING Rui, SHEN Tong, TU Deng-yun, ZHU Qi-xing

(Center of Toxicology, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the cytotoxicity of trichloroethylene (TCE), perchloroethylene (PCE) and dichloroethylene (DCE) on human keratinocytes (KC) and its time-dose-effect relationship (TDER). **Method** Using 50% neutral red uptake test (NR<sub>50</sub>) and lactate dehydrogenase (LDH) release assay to study the cytotoxicity of TCE, PCE, DCE on human KC and their TDER. **Result** TCE, PCE and DCE all could inhibit the uptake ability of human KC to neutral red, the NR<sub>50</sub> was 4.53 mmol/L, 2.16 mmol/L and 5.57 mmol/L, respectively. LDH release assay also showed that the release rate of LDH increased with the increase of concentration of TCE, PCE, DCE and incubation time. **Conclusion** TCE, PCE and DCE could produce cytotoxicity on human KC that might be related to their damage effect on cell membrane of KC.

**Key words:** Trichloroethylene; Perchloroethylene; Dichloroethylene; Keratinocyte; Cytotoxicity

三氯乙烯 (trichloroethylene, TCE)、四氯乙烯 (perchloroethylene, PCE) 和二氯乙烯 (1, 1-dichloroethylene, DCE) 是工业上广泛使用的常温常压下呈液态的 3 种氯代烯烃。TCE 和 PCE 在工业上作为清洗剂、溶剂和去脂剂广泛应用于五金、电子、玩具、印刷等行业; DCE 则作为单体原料广泛应用于塑料制造业中。TCE、PCE 和 DCE 除对神经系统、肝脏、肾脏和肺脏等器官损害以及致癌作用外<sup>[1~4]</sup>, 还可引起皮肤损害, 主要表现为原发性刺激、职业性皮炎、脱脂等<sup>[5]</sup>; TCE 引起的职业性皮肤损伤尚可表现为过敏性接触性皮炎 (allergic contact dermatitis, ACD) 和刺激性接触性皮炎 (irritant contact dermatitis, ICD)<sup>[6]</sup>。研究发现无论在 ACD 或 ICD 的发病中, 角质形成细胞 (keratinocyte, KC) 损伤都具有重要作

用。KC 作为表皮的主要组成细胞, 占表皮细胞的 80% 以上, 承担着屏障保护、吸收代谢、免疫反应等多种功能; 皮肤病学和毒理学研究证实 KC 的增殖、凋亡、坏死、角化异常等与不少皮肤病的发生、发展密切相关, 利用原代培养的 KC 进行细胞生理学、毒理学方面的研究可以较好地反映活体情况, 具有快速、灵敏的特点。本次实验通过中性红吸收试验 (neutral red uptake, NRU) 和乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 释放试验, 研究 TCE、PCE 和 DCE 对人 KC 细胞毒性以及剂量-时间-效应关系, 现报告如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

TCE、PCE 和 DCE (分析纯, 98.6%)、单克隆抗角蛋白抗体 (Monoclonal Anti-Pan Cytokeratin) 为 Sigma 公司产品, DMEM 培养基和 Keratinocyte-SFM 培养基 (Cat. No. 17005) 为 Gibco 公司产品, 皮肤标本为泌尿外科环切的正常无炎症的包皮, 鼠-IgG 免疫组化染色试剂盒为天津市灏洋生物制品有限责任公司产品。

收稿日期: 2004-09-27; 修回日期: 2004-11-10

基金项目: 安徽省自然科学基金项目 (03043801); 安徽省教育厅自然科学基金重点科研项目 (2003KJ036ZD)

作者简介: 周承藩 (1981-), 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 皮肤毒理学

中性红 (neutral red, NR) 染料为 Sigma 公司产品, LDH 试剂盒为南京建成生物研究所产品。

### 1.2 人 KC 的分离、培养与鉴定

取人体皮肤标本用 0.25% 的胰蛋白酶经冷温两步消化分离后<sup>[7]</sup>, 用单克隆抗角蛋白抗体和鼠-IgG 免疫组化试剂盒进行细胞鉴定, 将来源于 3 个个体标本的细胞混合, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液在 5%CO<sub>2</sub>、37 °C 培养于 60 mm 平皿中, 接种后每 2~3 d 换液 1 次。待细胞 80% 融合时, 收集细胞, 以 2×10<sup>5</sup>/孔转种至预铺鼠尾胶原的 24 孔培养板, 改用无血清 Keratinocyte-SFM 培养液继续培养, 每 2~3 d 换液 1 次, 待细胞 80% 融合时用于以下试验。

### 1.3 NRU 检测细胞活力

按照 NRU 试验的标准化操作程序 (standard operating procedure, SOP) 来检测 TCE、PCE 和 DCE 对人 KC 细胞活力的影响<sup>[8]</sup>。将人 KC 以 2.0×10<sup>5</sup>/孔接种于预铺鼠尾胶原的 24 孔培养板, 用 Keratinocyte-SFM 培养液于 37 °C 培养 3 d。第 4 天, 使用 0、0.01、0.0316、0.1、0.316、1、3.16、10、31.6 mmol/L 的 TCE、PCE 和 0、0.1、0.215、0.464、1.0、2.15、4.64、10、21.5 mmol/L 的 DCE 进行染毒处理, TCE、PCE 和 DCE 在使用前均用丙酮助溶 (丙酮在培养液中的终浓度为 1%)。分别用月桂基硫酸钠 (sodium lauryl sulphate, SLS)、含 1% 丙酮的培养液和 Keratinocyte-SFM 培养液作阳性对照、溶剂对照及空白对照, 每个剂量组重复 8 个孔。48 h 后, 弃去染毒液, 向各孔加入含质量分数为 5×10<sup>-6</sup> 的 NR 染料的 Keratinocyte-SFM 培养液, 继续培养 3 h, 小心吸去含 NR 染料的培养液, 用 PBS 迅速冲洗细胞单层 2 遍, 用 0.5% 甲醛 1% CaCl<sub>2</sub> 固定 2 min, 再向各孔加入 0.2 ml 1% 冰乙酸/50% 乙醇, 于摇床上振荡 20 min, 使细胞内吸收的 NR 染料释放出来, 用酶标仪于 540 nm 波长下测定其吸光度 (OD 值)。根据下式计算细胞存活率:

$$\text{存活率} \% (\text{NRU}) = \frac{\text{试验组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\%$$

### 1.4 LDH 释放率的测定

根据 NRU 试验的结果, 取约 1/10 NR<sub>50</sub> (即 0.5 mmol/L TCE、0.2 mmol/L PCE 和 0.7 mmol/L DCE) 为中剂量, 以倍数关系分别上下外推两个剂量, 研究 TCE、PCE 和 DCE 对人 KC 的 LDH 释放率影响。即将 0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 mmol/L 的 TCE 和 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mmol/L 的 PCE 以及 0.175、

0.35、0.7、1.4、2.8 mmol/L 的 DCE 分别作用于人 KC 1、2、3、4 h 后, 每个剂量组重复 8 个孔, 按说明书进行操作, 检测细胞内 LDH 的释放率。用含 1% 丙酮的培养液作为溶剂对照, 新鲜 Keratinocyte-SFM 培养液作为空白对照。按下式计算 LDH 释放率:

$$\text{释放率} (\%) = \left[ \frac{\text{LDH}_{\text{上清}}}{\text{LDH}_{\text{上清}} + \text{LDH}_{\text{细胞}}} \right] \times 100\%$$

### 1.5 统计学处理

所得数据采用 SPSS 10.0 软件处理, 用 Excel 软件绘图。使用回归分析计算 NR<sub>50</sub>, 用 *t* 检验进行显著性检验、方差分析进行组间比较。显著性水平取 *P* = 0.05。

## 2 结果

用单克隆抗角蛋白抗体和鼠-IgG 免疫组化试剂盒对 KC 进行鉴定, 镜下可见表达角蛋白的细胞被染成棕黄色, 阴性对照细胞被染成浅蓝色, 观察结果表明 95% 以上的细胞为 KC, 未见成纤维细胞污染。

### 2.1 TCE、PCE 和 DCE 对细胞活力的影响

利用 NRU 试验检测经 0、0.01、0.0316、0.1、0.316、1、3.16、10、31.6 mmol/L TCE、PCE 和 SLS, 0、0.1、0.215、0.464、1.0、2.15、4.64、10、21.5 mmol/L DCE 作用 48 h 后, 其对人 KC 细胞活力的影响, 结果显示 (图 1A, B) 随着 TCE、PCE、DCE 和 SLS 浓度的增加, 活细胞的比例明显下降。

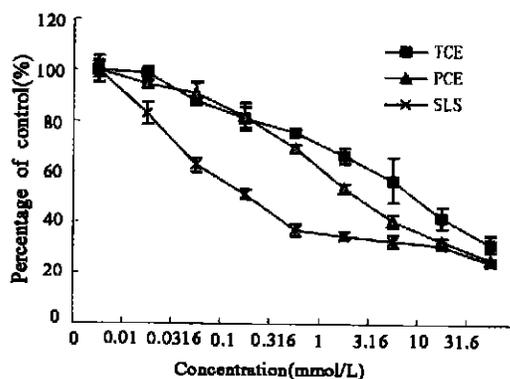


图 1A 中性红吸收试验检测不同浓度 TCE、PCE 和 SLS 对人角质形成细胞活力的影响

通过回归分析, 结果显示 DCE、TCE、PCE 的 NR 半数吸收浓度 (50% neutral red uptake, NR<sub>50</sub>) 分别为 5.57 mmol/L、4.53 mmol/L、2.16 mmol/L; SLS 的 NR<sub>50</sub> 为 0.28 mmol/L, 在 NRU 试验标准化操作程序所提供的标准值质量控制范围 (0.24~0.40 mmol/L) 之内<sup>[8]</sup> (表 1)。

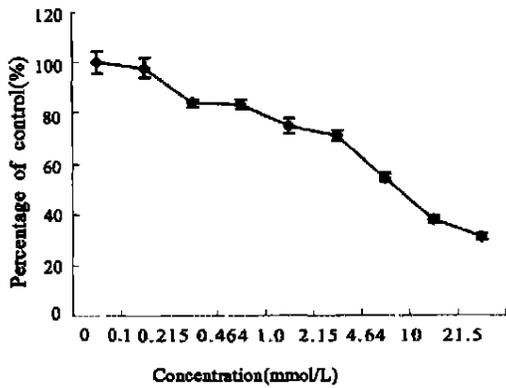


图 1B 中性红吸收试验检测不同浓度 DCE 对人角质形成细胞活力的影响

表 1 NRU 试验检测 DCE、TCE 和 PCE 对人 KC 的 NR<sub>50</sub>影响

化学物	NR <sub>50</sub> (mmol/L)	95%CI
DCE	5.57	3.26~7.88
TCE	4.53	3.92~5.13
PCE	2.16	1.27~3.07
SLS	0.28	0.20~0.36

### 2.2 TCE、PCE 和 DCE 对 LDH 释放率的影响

利用 LDH 释放试验研究经 0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 mmol/L TCE 作用 1、2、3、4 h 后，其对人 KC 细胞毒性的时间-剂量-效应关系，结果显示随着时间的延长和剂量的增加细胞内 LDH 的释放率都增加。方差分析结果显示，在相同浓度 TCE 作用不同时间时，当 TCE 浓度为 0.125 mmol/L 和 0.25 mmol/L、作用时间达 3 h 以上时，剂量组的 LDH 释放率与溶剂对照组差异有显著性 ( $P < 0.05$ )；当 TCE 浓度为 0.5 mmol/L、1.0 mmol/L 和 2.0 mmol/L，作用时间达 2 h 以上时，剂量组的 LDH 释放率与溶剂对照组差异就有显著性 ( $P < 0.05$ )。

经 0.05、0.1、0.2、0.4、0.8 mmol/L PCE 作用 1、2、3、4 h 后，结果显示随着时间的延长和剂量的增加细胞内 LDH 的释放率都增加。方差分析结果显示，在相同浓度 PCE 作用不同时间时，当 PCE 浓度为 0.1 mmol/L 和 0.2 mmol/L，作用时间达 3 h 以上时，剂量组的 LDH 释放率与溶剂对照组差异有显著性 ( $P < 0.05$ )；当 PCE 浓度为 0.4 mmol/L 和 0.8 mmol/L，作用时间达 2 h 以上时，剂量组的 LDH 释放率与溶剂对照组差异就有显著性 ( $P < 0.05$ )。

经 0.175、0.35、0.7、1.4、2.8 mmol/L DCE 作用 1、2、3、4 h 后，结果显示随着时间的延长和剂量的增加细胞内 LDH 的释放率都增加。方差分析结果显示，在相同浓度 DCE 作用不同时间时，当 DCE

浓度为 0.7 mmol/L，作用时间达 3 h 以上时，剂量组的 LDH 释放率与溶剂对照组差异有显著性 ( $P < 0.05$ )；当 DCE 浓度为 1.4 mmol/L 和 2.8 mmol/L，作用时间达 2 h 以上时，剂量组的 LDH 释放率与溶剂对照组差异就有显著性 ( $P < 0.05$ )。

### 3 讨论

近年来，TCE、PCE 和 DCE 所致的接触工人皮肤损伤的报道越来越多，其中个别病例甚至会发生严重的药疹样皮炎，主要表现为剥脱性皮炎、重症多形红斑、多形红斑和大疱性表皮坏死松解症<sup>[9]</sup>。许多学者认为其造成的皮肤损伤属于 T 淋巴细胞介导的 IV 型迟发性变态反应，然而临床上仅用 T 淋巴细胞介导的 IV 型迟发性变态反应尚不能完全解释其皮肤损伤机制<sup>[9]</sup>。KC 是表皮的主要构成细胞，大多数外源性或内源性化合物所致的皮肤损伤或皮炎都与其 KC 细胞毒性相关<sup>[10~12]</sup>，所以探讨化学物对角质形成细胞的细胞毒性机制对阐明其所致皮肤损伤或皮炎的发病机制具有重要意义。

NRU 试验最初由 Borenfreund 和 Puerner 建立<sup>[13]</sup>，它是一种细胞活力化学敏感试验，利用体外活细胞吸收并结合 NR 染料的数量来检测细胞活力。目前 BALB/c 小鼠 3T3 细胞株和正常人 KC 细胞株 (normal human keratinocyte, NHK) 的 NRU 试验被 ICCVAM、NTP 和 NICEATM 推荐为检测外源化学物细胞毒性试验的国际标准方法，已用于对大量化学物的细胞毒性评价，但在已建立的化学物细胞毒性数据库中尚没有 TCE、PCE 和 DCE 对 KC 的细胞毒性数据。本次实验利用 NRU 试验，研究不同浓度 TCE、PCE 和 DCE 处理 48 h 后细胞活力的变化，进而研究 TCE、PCE 和 DCE 对 KC 的细胞毒性作用，结果显示 KC 细胞活力随着 3 种化学物浓度的增加明显下降，提示该 3 种化学物都能明显地抑制人 KC 的细胞活力。通过回归分析，结果显示 DCE、TCE、PCE 和 SLS 的 NR<sub>50</sub> 分别为 5.57 mmol/L、4.53 mmol/L、2.16 mmol/L 和 0.28 mmol/L，表明化学物对细胞活力影响程度顺序为 PCE > TCE > DCE，这提示氯代烯烃的人角质形成细胞毒性可能与取代的氯原子数相关，氯原子数越多毒性越强。

LDH 则是细胞质内存在的一种酶，能够催化乳酸生成丙酮酸，丙酮酸能与 2,4-二硝基苯肼反应生成丙酮酸二硝基苯肼，其在碱性溶液中呈棕红色。通过比色可反映细胞释放 LDH 的量，通过比较培养液中 LDH 量与总 LDH 量的比例可反映总细胞中损伤细

胞所占比例。Lash 等<sup>[14, 15]</sup>通过 LDH 释放试验研究 TCE 对 F344 大鼠肾皮质细胞损伤作用, 结果发现 TCE、PCE 对雄性大鼠肾皮质细胞毒性呈时间-剂量-反应关系。提示 TCE 和 PCE 都对雄性大鼠肾皮质细胞产生细胞毒性。本次实验中, 利用 LDH 释放试验研究 TCE、PCE 和 DCE 对人 KC 细胞毒性的时间-剂量-反应关系, 结果显示经 TCE、PCE 和 DCE 处理后人 KC 的 LDH 释放率与溶剂对照组相比也呈浓度、时间依赖性增加, 且当 TCE 浓度为 0.125 mmol/L、PCE 浓度为 0.1 mmol/L 和 DCE 浓度为 0.7 mmol/L 以上作用时间达 3 h 以上时, 处理组的 LDH 释放量与溶剂对照组差异有显著性; 当 TCE 浓度为 0.5 mmol/L、PCE 浓度为 0.4 mmol/L 和 DCE 浓度为 1.4 mmol/L 以上作用时间达 2 h 以上时, 处理组的 LDH 释放量与溶剂对照组差异有显著性, 与 Lash 等实验结果相似, 提示 TCE、PCE 和 DCE 对 KC 都具有细胞毒性作用, 且呈现时间-浓度-效应关系, 但其具体作用机制尚需进一步研究探讨。

#### 参考文献:

- [1] Stewart BW. Trichloroethylene and cancer: a carcinogen on trial [J]. *Med J Aust*, 2001, 174 (5): 244-247.
- [2] Mundt KA, Birk T, Burch MT. Critical review of the epidemiological literature on occupational exposure to perchloroethylene and cancer [J]. *Int Arch Occup Environ Health*, 2003, 76 (7): 473-491.
- [3] Forkert PG. Mechanisms of 1, 1-dichloroethylene-induced cytotoxicity in lung and liver [J]. *Drug Metab Rev*, 2001, 33 (1): 49-80.
- [4] Lee CC, Bhandari JC, Winston JM, et al. Carcinogenicity of vinyl chloride and vinylidene chloride [J]. *J Toxicol Environ Health*, 1978, 4 (1): 15-30.
- [5] Nakajima T, Yamanoshita O, Kamijima M, et al. Generalized skin

reactions in relation to trichloroethylene exposure: a review from the viewpoint of drug-metabolizing enzymes [J]. *J Occup Health*, 2003, 45(1): 8-14.

- [6] 邱守仁, 孔凌珍, 刘惠芳, 等. 三氯乙烯所致药疹性皮炎 19 例分析 [J]. *中国职业医学*, 1999, 26 (4): 27-28.
- [7] 丁锐, 沈彤, 涂登云, 等. 人皮肤角质形成细胞的胰蛋白酶消化分离及无血清培养 [J]. *安徽医科大学学报*, 2003, 38 (6): 415-418.
- [8] NIH Publication No. 01-4500. Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity [S].
- [9] 黄汉林, 李来玉, 陈秉炯. 广东省三氯乙烯职业危害新问题研究进展 [J]. *中国职业医学*, 2002, 29 (3): 2-3.
- [10] Le M, Schalkwijk J, Siegenhaler G, et al. Changes in keratinocyte differentiation following mild irritation by sodium dodecyl sulphate [J]. *Arch Dermatol Res*, 1996, 288 (11): 684-690.
- [11] Trautmann A, Akdis M, Schmid-Grendelmeier P, et al. Targeting keratinocyte apoptosis in the treatment of atopic dermatitis and allergic contact dermatitis [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2001, 108 (5): 839-846.
- [12] Trautmann A, Altnauer F, Akdis M, et al. The differential fate of cadherins during T-cell-induced keratinocyte apoptosis leads to spongiosis in eczematous dermatitis [J]. *J Invest Dermatol*, 2001, 117 (4): 927-934.
- [13] Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption [J]. *Toxicology Lett*, 1985, 24: 119-124.
- [14] Lash LH, Qian W, Putt DA, et al. Renal and hepatic toxicity of trichloroethylene and its glutathione-derived metabolites in rats and mice: sex-, species-, and tissue-dependent differences [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2001, 297 (1): 155-164.
- [15] Lash LH, Qian W, Putt DA, et al. Renal toxicity of perchloroethylene and S-(1, 2, 2-trichlorovinyl) glutathione in rats and mice: sex- and species-dependent differences [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2002, 179 (3): 163-171.

(上接第 75 页) 其机制有待进一步探讨。本研究中 HSP90 $\beta$  与细胞存活率呈显著的负相关关系, 提示其在本实验中对体外培养神经元可能起保护作用, 亦可用作损害程度的标志。目前尚未见同类实验研究报道, 这种负相关关系是否存在于其他有害因素引起的应激过程中尚不清楚。

由于 BaP 神经毒性方面的研究资料很少, 许多问题尚无法定论, 但本研究的结果则表明有必要在这一方面进行深入的研究, 如选用更敏感的指标研究低剂量 BaP 对神经系统的损害情况及其机制, 进一步再研究如何预防、治疗等。另外, 由于 BaP 是环境中的常见毒物, 常与其他毒物及有害因素共同存在, 其联合毒作用是将来研究的主要方向。

#### 参考文献:

- [1] David Moin, Andre Viau, Ih Chu, et al. Pharmacokinetics of Benz[ a ] pyrene in the rat [J]. *J Toxicol Environ Health*, 1998, 53: 507-530.
- [2] Tang Y, Donnelly KC, Tiffany-Castiglioni E, et al. Neurotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons and simple chemical mixtures [J]. *J Toxicol Environ Health A*, 2003, 66 (1): 919-940.
- [3] 涂白杰, 陈胜, 肖成峰, 等. 苯并[ a ] 芘染毒小鼠神经组织的形态学改变及细胞凋亡 [J]. *中华劳动卫生与职业病杂志*, 2002, 20 (4): 296-299.
- [4] 高雅娟, 陈胜, 肖成峰, 等. 苯并[ a ] 芘代谢产物作用下人胚肺细胞热应激蛋白 70 表达与 DNA 损伤 [J]. *中华劳动卫生与职业病杂志*, 2000, 18: 321-323.
- [5] 杨进波, 肖成峰, 杨晓波, 等. 苯并[ a ] 芘对内皮细胞增殖活性的影响及与热应激蛋白 70 表达关系的研究 [J]. *卫生研究*, 2003, 32: 92-94.