

三氯乙烯和四氯乙烯对体外培养人皮肤角质形成细胞脂质过氧化的影响

董, 沈彤, 朱启星

(安徽医科大学劳动卫生与环境卫生学系, 安徽 合肥 230032)

摘要: 目的 探讨有机溶剂三氯乙烯 (trichloroethylene, TCE)、四氯乙烯 (perchloroethylene, PCE) 对体外培养的角质形成细胞 (keratinocyte, KC) 的脂质过氧化的作用。方法 利用中性红吸附 (neutral red uptake, NRU) 实验确定 TCE 和 PCE 对人 KC 的中性红半数吸收浓度 (50% neutral red uptake, NR₅₀), 并根据此确定染毒浓度。分别使用 2.0、1.0、0.5、0.25、0.125 mmol/L 的 TCE 或 0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 mmol/L 的 PCE 对体外培养的人 KC 染毒 4 h, 利用 MDA、SOD 和 ROS 试剂盒测定细胞中 MDA、SOD 和 ROS 水平。结果 TCE、PCE 对人 KC 的 NR₅₀ 分别为 4.53 mmol/L 和 2.16 mmol/L。经不同浓度 TCE、PCE 作用 4 h 后, 细胞内 MDA 水平和 ROS 水平随 TCE 或 PCE 浓度增加呈上升趋势, 而 SOD 活性呈下降趋势, 与溶剂对照组相比较差异有显著性, 且存在浓度-反应关系。结论 TCE、PCE 对人 KC 有氧化损伤作用。

关键词: 角质形成细胞; 三氯乙烯; 四氯乙烯

中图分类号: O623.221 文章标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)03-0129-04

Effect of trichloroethylene and perchloroethylene on lipid peroxidation in cultured human keratinocytes

DING Rui, SHEN Tong, ZHU Qi-xing

(Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract Objective To explore the effects of different concentrations of trichloroethylene (TCE) and perchloroethylene (PCE) on lipid peroxidation in cultured human keratinocyte (KC). **Method** Neutral red uptake assay was used to determine the NR₅₀ of TCE and PCE, thereby the exposure concentrations of TCE were ascertained as 2.0, 1.0, 0.5, 0.25 and 0.125 mmol/L, and the concentrations of PCE were ascertained as 0.8, 0.4, 0.2, 0.1 and 0.05 mmol/L, which were respectively cultured with KC for 4h; then the levels of MDA, SOD and ROS in cultured cells were determined with special kits. **Result** It was shown that the NR₅₀ of KC to TCE and PCE were 4.53 mmol/L and 2.16 mmol/L respectively, and the levels of MDA and ROS in cultured cells were gradually risen with the concentration of TCE or PCE used four hours after exposure to TCE or PCE. **Conclusion** TCE or PCE could induce oxidative damage to cultured KC.

Key words: Keratinocyte; Trichloroethylene; Perchloroethylene

三氯乙烯 (trichloroethylene, TCE) 和四氯乙烯 (perchloroethylene, PCE) 作为有机溶剂被得到广泛应用。其人体损伤共同特点之一是可引起职业性剥脱性皮炎、重症多形红斑、大疱性表皮坏死松解症和多形红斑等严重疾病^[1~3]。对于其引起的职业人群皮肤损害的机制, 目前的研究多集中于过敏性接触性皮炎 (allergic contact dermatitis, ACD)。但大量研究结果和临床资料提示免疫因素并不能完全解释其皮肤损害的发病机理^[4,5]。本研究采用 TCE 和 PCE 对体外培养的角质形成细胞 (keratinocyte, KC) 作用, 从刺激性接

触性皮炎角度探讨 TCE 和 PCE 皮肤毒作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

DMEM 培养基和 Keratinocyte-SFM 培养基 (Cat. No. 17005) 为 Gibco 公司产品; 24 孔培养板和 96 孔培养板为 Corning 公司产品; TCE、PCE 和中性红 (neutral red, NR) 染料为 Sigma 公司产品, 其中 TCE 和 PCE 均采用丙酮作为助溶剂, 丙酮在培养液中终浓度为 0.1%; 丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 试剂盒为南京建成生物研究所的产品。鼠尾胶原根据文献 [6] 的方法制备。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 取人体皮肤标本用 0.25% 的胰蛋

收稿日期: 2005-09-30; 修回日期: 2006-01-18

基金项目: 国家自然科学基金 (30471469); 安徽省教育厅自然科学基金 (03043801); 安徽省人才开发基金 (2004Z032)

作者简介: 丁锐 (1979-), 男, 助教, 硕士, 主要从事皮肤病毒理学研究。

白酶经冷温两步消化分离后^[7], 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%CO₂、37℃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2×10⁵/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。

1.2.2 NR₅₀测定 按照中性红吸附实验 (neutral red uptake assay, NRU) 标准化操作程序 (standard operating procedure, SOP) 对TCE和PCE的KC毒性进行测定^[8], 同时使用月桂基磺酸钠 (sodium lauryl sulphate, SLS) 作为阳性对照, 详见参考文献[9]。

1.2.3 染毒分组 根据NR₅₀测定结果确定染毒浓度。(1) 对照组: 使用含1%丙酮的培养液作用于细胞作为溶剂对照, 无其他物质的新鲜培养液作用于细胞作为空白对照; (2) TCE处理组: NHEK与含终浓度为2.0、1.0、0.5、0.25、0.125 mmol/L TCE的DMEM培养液于5%CO₂、37℃共同作用4 h后, 换入无血清 Keratinocyte-SFM 培养液继续作用至24 h; (3) PCE处理组: NHEK与含终浓度为0.8、0.4、0.2、0.1、0.05 mmol/L PCE的DMEM培养液于5%CO₂、37℃共同作用4 h后, 换入无血清 Keratinocyte-SFM 培养液继续作用至24 h。

1.2.4 脂质过氧化指标测定 将药物处理的KC破碎后, 于100 000 g离心1 h, 收集上清, 参照试剂盒说明书进行MDA、SOD和ROS水平的检测。同时按照Lowry^[10] 等方法进行蛋白定量, 并以蛋白量对检测结果进行校正。

1.3 统计方法

数据用 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。利用Excel对数据进行录入和绘图, 利用SAS6.12对资料进行统计分析。使用的统计方法主要为回归分析和方差分析, 显著性水平取P=0.05。

2 结果

2.1 NR₅₀测定

利用中性红吸附实验测定TCE、PCE对体外培养人KC的中性红半数吸收浓度, 经回归分析, 确定其NR₅₀分别为4.53 (3.92~5.13 mmol/L)和2.16 (1.27~3.07 mmol/L)。阳性对照显示SLS的NR₅₀为0.28 (0.20~0.36 mmol/L), 在中性红吸附实验SOP提供的标准值的质量控制范围 (0.24~0.4 mmol/L)之内 (图1, 表1)。

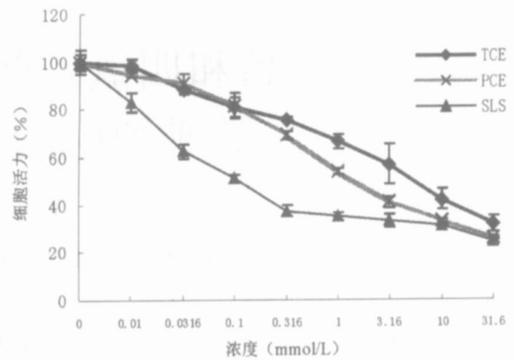


图1 中性红吸附实验测定TCE、PCE对体外培养KC的NR₅₀

表1 用中性红吸附实验测定的TCE、PCE和SLS的NR₅₀

染毒物质	NR ₅₀ (mmol/L)	95%可信限 (mmol/L)
TCE	4.53	3.92~5.13
PCE	2.16	1.27~3.07
SLS	0.28	0.20~0.36

2.2 溶剂对照组与空白对照组间氧化损伤与抗氧化酶指标差异

细胞培养至24 h后, 经分析发现溶剂对照组与空白对照组间KC内MDA、ROS、SOD水平差异均无显著性 (P>0.05)。

2.3 TCE对KC的脂质过氧化作用

方差分析结果显示, 当TCE浓度达0.25 mmol/L时, TCE作用组与溶剂对照组间细胞内ROS含量及SOD活性差异有显著性 (P<0.05); 而当TCE浓度达0.5 mmol/L时, 两组间细胞内MDA含量差异也有显著性 (P<0.05) (图2~4)。

2.4 PCE对KC的脂质过氧化作用

方差分析结果显示, 当PCE浓度达0.1 mmol/L时, PCE作用组与溶剂对照组间细胞内ROS含量及MDA含量差异有显著性 (P<0.05); 而当PCE浓度达0.2 mmol/L时, 两组间细胞内SOD活性差异也有显著性 (P<0.05) (图2~4)。

3 讨论

目前对于工业毒物TCE、PCE皮肤损害的研究, 主要集中于过敏性接触性皮炎。但研究显示仅通过免疫机制不能完全解释TCE、PCE的皮肤毒作用。本研究利用TCE、PCE对体外培养的NHEK作用, 试图从氧化应激着手, 探索TCE、PCE诱导刺激性接触性皮炎的作用。而溶剂对照组和空白对照组相比较, 细胞内各项指标差异没有显著性, 说明使用丙酮作为助溶剂对TCE、PCE的皮肤毒性作用没有影响。

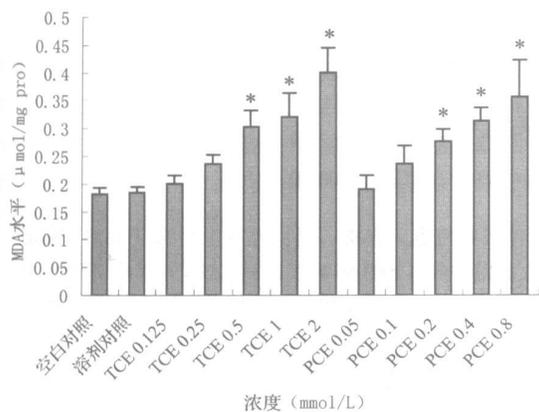


图2 TCE、PCE 对体外培养KC 细胞MDA 水平的影响

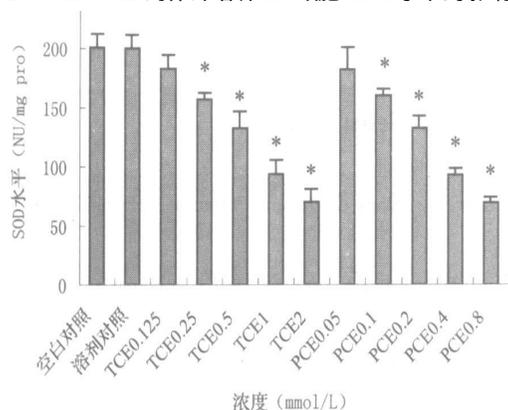


图3 TCE、PCE 对体外培养KC 细胞SOD 水平的影响

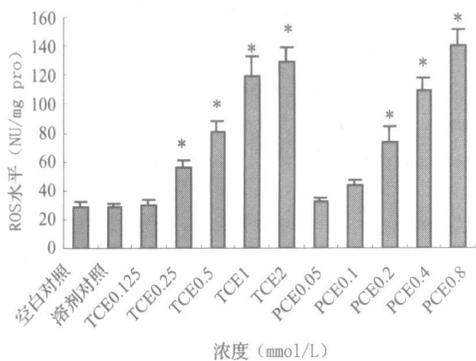


图4 TCE、PCE 对体外培养KC 细胞ROS 水平的影响

TCE、PCE 能导致机体发生氧化损伤作用^[11, 12]。Chen 等^[11]发现 TCE 暴露能使细胞内 H₂O₂ 大量蓄积, 从而造成细胞的氧化损伤作用。DuTeaux 等^[12]也发现, 摄入 TCE 后, 雄性小鼠精子与正常卵子结合能力下降, 而在其头部和中间部分发现被氧化的蛋白质存在。在 Beland^[13]的研究中, 也发现 PCE 可以导致 F344/N 小鼠和 B6C3F1 大鼠体内 MDA 水平显著上升。在本次研究中, 我们发现不同浓度 TCE 和 PCE 能导致体外培养的 KC 脂质过氧化终产物 MDA 水平上升, 而细胞内导致氧化应激的重要因子——ROS 水平也显著上升, 提示 TCE 和 PCE 可能会通过上调细胞内

ROS 水平而导致细胞内氧化应激。

有文献报道, TCE 在肝脏被代谢形成自由基引起脂质过氧化并造成肝损害^[14]。正常机体存在着 SOD 等抗氧化酶, 它们分别通过清除氧自由基等以减轻和阻断脂质过氧化的一级引发作用, 催化脂质过氧化物分解成相对无毒害作用的醇而发挥抗氧化作用。

TCE 接触工人 ROS、MDA 水平均较对照组工人升高, 而 SOD 活性有明显下降, 且有显著性差异^[15, 16]。胡立志等也发现 TCE 可引起新西兰白兔视网膜 MDA 水平升高。而 SOD 水平显著下降^[17]。高航等人的研究也证实 PCE 可以显著降低人体内 SOD 活性^[18]。在本次研究中发现, 细胞内抗氧化酶 SOD 水平随 TCE、PCE 浓度升高而呈下降趋势, 且存在浓度-反应关系, 提示 TCE、PCE 可降低 NHEK 细胞内 SOD 活性, 与相关报道相吻合。

综上所述, TCE、PCE 接触可引起体外培养的 NHEK 氧化应激水平上升; 职业人群接触 TCE、PCE 后出现的皮肤损伤除过敏性接触性皮炎外, 可能还存在经此途径引起的刺激性接触性皮炎。

参考文献:

- [1] Schwarcz L, Tulipart L, Bimingham A. Occupational diseases of the skin. 3rd edition [M]. Philadelphia: Lea & Febiger. 1947. 771.
- [2] 吴昆. 深圳市 1993~1997 年三氯乙烯中毒分析 [J]. 职业与健康, 2002, 18 (5): 24-25.
- [3] Tamie N, Osamy Y, Michihiro K, 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.
- [4] Tang XJ, Li LY, Huang JX, et al. Guinea pig maximization test for trichloroethylene and its metabolites [J]. Biomed Environ Sci, 2002, 15 (2): 113-118.
- [5] Goon AT, Lee IT, Tay YK, et al. A case of trichloroethylene hypersensitivity syndrome [J]. Arch Dermatol, 2001, 137(3): 274-276.
- [6] 鄂征. 组织培养和分子细胞技术 [M]. 北京: 北京出版社, 1995. 56.
- [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] 周承藩, 丁锐, 沈彤, 等. 三种氯代烯烃对人角质形成细胞的细胞毒性作用 [J]. 中国工业医学杂志, 2005, 18 (2): 76-79.
- [10] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent [J]. J Biol Chem, 2001, 193 (2): 265-275.
- [11] Chen SJ, Wang JL, Chen JH, et al. Possible involvement of glutathione and p53 in trichloroethylene and perchloroethylene-induced lipid peroxidation and apoptosis in human lung cancer cells [J]. Free Radic Biol Med, 2002, 33 (4): 464-472.

(下转第 135 页)

3 讨论

3.1 县及县以上医院收治急性农药中毒患者的现况分析

农药中毒一直是我国重要的职业卫生和公共卫生问题,其中应用最广泛的OP引起的中毒病例数,在各种农药中毒中占首位。从本次调查结果看,引起中毒的农药仍以OP杀虫剂为主(66.5%),其中有意接触占88.2%,这与国内外有关报告^[1,2]的结果相似。敌敌畏和对硫磷两种OP引起的中毒例数占总中毒人数的近1/3,其他尚有乐果、甲胺磷、甲拌磷等。农药中毒死亡病例同样是OP杀虫剂引起的居首位,占76.1%。由此可见,毒性较高价格相对便宜的OP类杀虫剂仍是我国引起农药中毒和死亡的主要品种。另外,本调查中杀鼠剂中毒185例,病死率5.9%;其中毒鼠强中毒111例,占60.0%;死亡9例,占81.8%。据卫生部统计^[3],2003年全国共报告重大剧毒鼠药中毒事件75起,造成1316人中毒,121人死亡。因此应加强杀鼠剂类农药的管理,尤其应避免儿童接触,减少中毒的发生。

农药中毒一般呈明显的季节性^[4]。调查结果显示生产、非生产性农药中毒的高峰均出现在6~8月,这与夏季农业生产和农药使用高峰季节家家户户购买和储存农药,农药易于获得,导致接触机会大大增加有关。从本调查还可看到,女性农药中毒的比例高于男性,其中非生产性中毒女性比男性增加74.6%,尤其是女性有意接触中毒者为男性的1.9倍,有意接触农药的地点88.8%在家里。这主要是由于近年来随着大量男性劳动力出外务工,女性承担农活,喷洒农药的机会增加,女性生产性中毒发生率也比原来增高;同时女性在家庭充当的多方位角色,面临各种家庭矛盾,且自身情感相对较脆弱,易于冲动而自服农药。因此,应根据男女中毒的不同特点采取不同防治措施。

急性农药中毒可发生于各年龄段,高峰集中在15~44岁。低龄儿童是意外中毒的高发年龄段,误服毒鼠强及氟乙酰胺中毒是主要原因,这与国内其他调查结果基本一致^[5]。值得注意的是,10~20岁青少年有意接触中毒占该年龄中毒人数的60.5%。该年龄段正处于

心理和生理向成人转变的过渡阶段,心理起伏较大,易于发生自杀行为。这表明,农药中毒问题已从职业医学转向急诊医学、中毒救援和社会医学等多方面。

3.2 医院农药中毒漏报情况

目前我国农药中毒报告的病例数主要来自各级医院,1997~2003年全国共报告农药中毒108372例,平均每年仅1万余例。其中非生产性农药中毒占74.61%^[6]。从本调查结果看,11家医院一年共收治急性农药中毒1551例,平均每个医院收治141例,其中6家县医院一年收治的农药中毒达1127例,平均每县医院收治187例。我国目前隶属卫生部门的县及县级以上医院有15000余家,即使以大量使用农药的省占1/3计算,每年收治的农药中毒病例数也将在数万至数十万以上。陈曙^[7]等^[1]2001年的调查同样显示了医疗机构漏报严重,25家医院急诊科1年中共收治急性农药中毒患者有2261例(不包括53例农药合并药物或饮酒中毒者),其中11家县级医院救治的患者就有1375例(占60.81%),14家城市综合医院救治的患者886例(占39.19%)。由此可见,我国目前农药中毒报告病例数严重低于实际发病人数。因此,应加强农药中毒的监测和报告,以获得真实的农药中毒发病资料,为预防和控制农药中毒提供可靠的依据。

(衷心感谢11家协作医院的通力合作和贡献。)

参考文献:

- [1] 陈曙,周静,李中杰,等.综合性医院急诊农药中毒的调查[J].中华劳动卫生职业病杂志,2004,22(5):364-367.
- [2] Abdollahi M, Jalali N, Sahzevari O et al. A retrospective study of poisoning in Tehran[J]. J Toxicol Clin Toxicol, 1997, 35(4): 387-393.
- [3] 卫生部新闻办公室. 卫生部公布2003年全国重大食物中毒情况(新闻稿) [EB/OL]. <http://www.moh.gov.cn/public/open>, 2004-02-12.
- [4] London L, Ehrlich RL, Rafudien S et al. Notification of pesticide poisoning in the western Cape, 1987-1991 [J]. S Afr Med, 1994, 84(5): 269-272.
- [5] 宋世良,丁小平,顾超,等.1997~2002年太仓市农药中毒流行病学调查与防治策略[J].实用预防医学,2003,10(6):838-841.
- [6] 陈曙,王鸿飞,尹英.我国农药中毒的流行特点和农药中毒报告的现状[J].中华劳动卫生职业病杂志,2005,23(5):336-339.

(上接第131页)

- [12] DuTeaux SB, Berger T, Hess RA, et al. Male reproductive toxicity of trichloroethylene: sperm protein oxidation and decreased fertilizing ability [J]. Biol Reprod, 2004, 70(5): 1518-1526.
- [13] Beland FA. NTP technical report on the toxicity and metabolism studies of chloral hydrate (CAS No. 302-17-0). Administered by gavage to F344/N rats and B6C3F1 mice [J]. Toxic Rep Ser, 1999, (59): 1-66.
- [14] Channell SR, Latendresse JR, Kidney JK, et al. A subchronic exposure to trichloroethylene causes lipid peroxidation and hepatocellular proliferation in male B6C4F1 mouse liver [J]. Toxicol Sci, 1998, 43(2):

145-154.

- [15] 杨翠婵,李伯灵,邹志方.低剂量三氯乙烯对作业工人脂质过氧化作用的影响[J].华南预防医学,2002,28(3):23-24.
- [16] 黄锦生,陈惠珍,吴平方,等.低浓度三氯乙烯对人体抗氧化酶系统影响[J].中国公共卫生,2002,28(3):23-24.
- [17] 胡立志,张宏,贺乐荷.三氯乙烯视网膜毒性脂质过氧化关系的初步研究[J].中国职业医学,2001,28(5):33-34.
- [18] 高航,叶琳,关平,等.四氯乙烯职业暴露人群脂质过氧化与抗氧化能力的观察[J].中国食品卫生与健康,2004,(2):66-68.