

三氯乙烯引起裸鼠刺激性接触性皮炎 细胞凋亡的信号传导途径

于均峰, 俞韵, 张军, 朱启星*

(安徽医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系, 安徽 合肥 230032)

摘要: 目的 研究有机溶剂三氯乙烯(TCE)引起BALB/c裸鼠皮肤组织发生细胞凋亡的程度以及凋亡相关蛋白caspase-9与凋亡的关系。方法 应用原位末端标记(TUNEL)法检测三氯乙烯染毒的50只BALB/c裸鼠皮肤组织的细胞凋亡, 应用免疫组化S-P法检测皮肤组织中caspase-9的表达, 并利用抗氧化剂维生素E研究三氯乙烯的损害作用。结果 各染毒剂量组皮肤组织的凋亡指数和caspase-9活性的差异有统计学意义, TCE浓度越高, 细胞凋亡和caspase-9的表达水平越高, 维生素E保护组低剂量下无保护作用, 高剂量组有保护作用。结论 TCE引起的早期皮肤组织损伤与细胞凋亡有关, caspase-9在凋亡过程中发挥了重要的作用, 以线粒体损伤为主要途径的细胞凋亡在三氯乙烯致皮肤组织损伤的过程中具有重要的意义。

关键词: 三氯乙烯; TUNEL; caspase-9

中图分类号: O623.221 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2007)05-0300-03

Apoptotic signaling pathway in nude mouse irritant contact dermatitis caused by trichloroethylene

YU Jun-feng, YU Yun, ZHANG Jun, ZHU Qi-xing*

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

Abstract: **Objective** To investigate the expression of apoptosis and apoptosis-related gene caspase-9 in the skin of the BALB/c nude mice after trichloroethylene (TCE) exposure. **Method** Apoptotic cells were detected by TUNEL method, expressions of caspase-9 were detected in 50 nude mice by immunohistochemical method, and researched the protective effect of vitamin E against skin damage. **Result** The higher concentration of trichloroethylene, the higher expressions of caspase-9 and apoptosis displayed in this study. A high concentrations of vitamin E has a significant protective effect on TCE-induced skin damage. **Conclusion** Apoptosis plays an important role in the skin damage by various concentrations of TCE, this results indicate that mitochondrial apoptotic pathway is the main signaling pathway of apoptosis.

Key words: Trichloroethylene; TUNEL; Caspase-9

三氯乙烯(trichloroethylene, TCE)是一种重要的工业有机溶剂, 常常作为金属清洗剂、脱脂剂等应用于五金、电子等行业。长期接触TCE可以引起神经系统、肝脏、肾脏和皮肤等器官损害甚至具有潜在的致癌作用^[1], 三氯乙烯引起的皮肤损伤, 主要表现为接触性变应性皮炎、重症多形红斑, 甚至可致大疱性表皮坏死松解症等^[2]。对于TCE引起的职业人群皮肤损害的作用机制, 目前多集中于过敏性变应性皮炎^[3], 然而部分工人出现的皮肤红斑、水肿等却是刺激性皮炎的表现, 对接触TCE而导致的职业性药疹样皮炎的病人进行斑贴试验时, 有的病例呈阳性, 有的病例呈阴性, 这些结果提示仅用变应性皮炎尚不能

完全解释三氯乙烯引起皮肤损伤的作用机制, 刺激性接触性皮炎也发挥了一定的作用^[4]。体外实验表明, 三氯乙烯可引起人皮肤角质形成细胞氧化应激水平升高^[5], 线粒体膜电位和呼吸功能改变, 出现以线粒体途径为主的细胞凋亡。本次实验欲从整体动物实验角度探索三氯乙烯急性染毒引起动物皮肤组织的细胞凋亡以及凋亡信号的传导通路。

1 材料与方法

1.1 材料

三氯乙烯、维生素E(α -生育酚)均为Sigma公司产品, 橄榄油、TUNEL试剂盒, Roche公司生产, Caspase-9抗体, Lab-Vision公司生产, 链霉素抗生素-过氧化酶(S-P)法试剂盒, 福州迈新生物有限公司生产。

实验动物为健康状况良好、体重范围为20~30g雌性成年BALB/c裸鼠, 上海市斯莱克动物实验有限责任公司, 实验动物质量许可证: 3CXK(沪)2003-0003; 实验环境为SPF清洁级动物房, 实验室认可编

收稿日期: 2007-03-16; 修回日期: 2007-06-11

基金项目: 国家自然科学基金资助(30471469、30671787); 安徽医科大学基金(522524)

作者简介: 于均峰(1979-), 男, 讲师, 硕士生, 研究方向: 皮肤毒理学。

*: 通信作者, 教授, 硕士生导师。

号为：安徽医动字第 010 号。

1.2 方法

1.2.1 剂量和分组 将50只雌性 BALB/c 裸鼠随机分成溶剂对照组（橄榄油）、10%TCE 组、20%TCE 组、40%TCE 组、80%TCE 组、100%TCE 组，每组 5 只，将受试物涂到裸鼠 2.5 cm×2.5 cm 大小的背部皮肤上。另选 3 组分别将 5%、10%和 20%VitE 涂到裸鼠背部皮肤上，1 h 后将 100%TCE 涂到同样的位置，用无刺激性的塑料膜和胶布固定，24 h 后用生理盐水清洗裸鼠背部皮肤除去受试物。

1.2.2 Caspase-9 活性检测

实验结束后将裸鼠迅速处死，取下染毒的皮肤进行常规石蜡包埋，然后连续切片，经过梯度乙醇脱蜡、水化，按照试剂说明书结合免疫组化 S-P 法进行实验，以 PBS 代替一抗作为阴性对照，操作过程中均用 PBS 冲洗。

1.2.3 细胞凋亡检测 采用原位末端标记（TUNEL）组织化学检测法。石蜡切片常规脱蜡、水化、蛋白酶 K 抗原修复，0.1%TritonX-100 作用 5 min，滴加 50 μl TUNEL 反应混合物，37℃孵育 1 h，以 PBS 液代替一抗作为阴性对照，以 DNase I 处理的切片作为阳性对照，PBS 洗涤后加入转化剂 POD，孵育冲洗后 DAB 显色，苏木素复染，常规脱水、透明、封片。

1.2.4 结果判定 所有切片由 2 位高级病理教学人员分开观察，显微镜下（400 倍）随机选取 5 个视野，活化的 caspase-9 表达于细胞浆，呈棕黄色改变，阴性细胞为淡蓝色，根据染色强度和阳性细胞面积百分比分析，阳性细胞数<5%为阴性，5%~25%为 1 分，26%~50%为 2 分，51%~75%为 3 分，75%以上为 4 分；阳性强度以淡黄色为 1 分，棕黄色为 2 分，棕褐色为 3 分；两者相加为最后评分。TUNEL 法检测结果由病理专业人员根据染色和细胞核形态鉴定凋亡细胞。凋亡指数（apoptosis index, AI）的计算：显微镜下（400 倍）随机选取 5 个视野，分别计数 100 个细胞，以凋亡细胞的平均值作为凋亡指数。

1.3 统计分析

用 SPSS 11.0 软件进行分析，所有计量资料均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，各组间的差异用单因素方差分析，采用 LSD 法。

2 结果

2.1 各剂量组细胞凋亡情况

TUNEL 法检测细胞凋亡结果见表 1。阴性对照为一抗对照，阳性细胞的胞核呈棕黄色，固缩成团或破裂，形成凋亡小体。多个剂量组比较前先进行方差齐

性检验， $P = 0.437$ ，方差分析 $F = 62.144$ ($P < 0.001$)，结果显示正常皮肤组织仅可见少量凋亡细胞，低剂量组凋亡指数较低，高剂量组凋亡指数较高，10%TCE、20%TCE 剂量组与溶剂对照组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)，40%TCE、80%TCE 和 100%TCE 剂量组与溶剂对照组的差异有统计学意义 ($P < 0.005$)。5%Vit E、10%Vit E 剂量组与 100%TCE 剂量组的差异无统计学意义，20%Vit E 保护组与 100%TCE 剂量组的差异有统计学意义 ($P < 0.005$)。

表 1 各剂量组细胞凋亡指数 ($\bar{x} \pm s$)

标本编号	n	细胞凋亡指数	标本编号	n	细胞凋亡指数
阴性对照	2	0	80%TCE	5	8.7±0.7
溶剂对照	5	1.24±0.59	100%TCE	5	9.0±1.4
10%TCE	5	1.84±0.74	5%VitE	5	6.4±0.5
20%TCE	5	2.16±0.95	10%VitE	5	6.0±0.6
40%TCE	5	6.36±0.95	20%VitE	5	3.4±0.5

2.2 各剂量组 Caspase-9 的表达

Caspase-9 阳性反应产物呈棕黄色，定位于细胞浆，各组表皮 caspase-9 的表达根据阳性细胞染色强度和阳性面积的百分比进行评分，结果见表 2。方差齐性检验 $P = 0.354$ ，10%TCE 剂量组与溶剂组的差异无统计学意义 ($P = 0.115$)，20%TCE 剂量组与溶剂组的差异有统计学意义 ($P = 0.012$)，40%TCE、80%TCE、100%TCE 三组与溶剂对照组相比较差异有

表 2 各剂量组表皮 caspase-9 表达程度的评分 ($\bar{x} \pm s$)

标本编号	n	阳性		染色		结果判定
		百分比	评分	程度	评分	
阴性对照	2	0	0	0	0	
溶剂对照	5	2%	0	0	0	0.6±0.3
10%TCE	5	15%~20%	1	淡黄	1	1.8±0.8
20%TCE	5	18%~27%	2	棕黄	2	3.8±0.8
40%TCE	5	20%~30%	2	棕褐	3	4.4±0.5
80%TCE	5	60%	3	棕褐	3	5.2±0.5
100%TCE	5	70%	2	棕黄	2	5.1±0.5
5%VitE	5	65%	2	棕黄	2	4.8±0.6
10%VitE	5	60%	3	棕褐	3	4.9±0.8
20%VitE	5	30%	2	淡黄	1	3.4±0.4

统计学意义，但 3 组之间差异无统计学意义，5%Vit E、10%Vit E 保护组与 100%TCE 剂量组的差异无统计学意义，20%Vit E 保护组与 100%TCE 剂量组的差异有统计学意义 ($P = 0.034$)，对各组的 caspase-9 与凋亡指数做 Pearson 相关分析， $r = 0.74$ ($P < 0.005$)，

呈高度的正相关。

3 讨论

TCE作为一种脱脂剂、去污剂广泛应用于现代工业生产中,近年来广东沿海一带有关TCE中毒的案例时有报道,毒作用表现主要是以肝脏、肾脏、神经、皮肤损害为主^[8,9]。有资料表明接触TCE的工人其体内血清氧化应激水平明显升高,肝、肾功能不全^[10];体外实验也提示氧化应激在TCE引起的皮肤损伤中有很重要的作用^[5,11]。本课题组前期的研究结果表明三氯乙烯可引起皮肤组织刺激性损伤,表现为红斑、水肿,甚至有明显的结痂,体内氧化应激水平升高,电镜观察发现皮肤组织内有一定的细胞出现凋亡现象。本次实验是在前期实验的基础上应用免疫组织化学的方法并选用非酶性抗氧化剂维生素E作为保护性因素,研究TCE引起的皮肤组织细胞凋亡的可能的作用机制。Caspase家族是一种半胱氨酸蛋白酶家族,被认为是细胞凋亡的中心环节和执行者,通过蛋白酶级联反应顺序激活,在细胞凋亡的分子机制中发挥着非常重要的作用^[6,7],caspase-9是其中重要的成员之一,是细胞凋亡过程中重要的起始分子,在凋亡的线粒体途径中,外源化学物首先引起细胞色素C从线粒体释放到胞浆,并与ATP、caspase-9等结合形成大的复合物引起caspase-9前体的活化,进一步激活下游caspase-3等,引起DNA片段化等凋亡级联反应。

TUNEL是分子生物学和形态学相结合的一种研究方法,用于石蜡包埋组织切片、冰冻切片、培养细胞的细胞形态测定,在细胞凋亡的研究中被广泛应用。细胞凋亡主要通过两条途径,一条是由死亡受体及配体系统激发的途径,凋亡信号下传至启动性caspase-8后激活效应性caspase蛋白酶;另一条为线粒体通路,细胞损伤后线粒体功能障碍,引起细胞色素C释放,导致caspase-9的活化。本次实验结果显示TCE染毒的各剂量组之间的细胞凋亡指数差异有统计学意义,低剂量组的细胞凋亡指数较低,高剂量组凋亡指数较高,表明三氯乙烯可以引起细胞凋亡。在凋亡的线粒体途径中caspase-9的活化是关键性的过程,是研究凋亡通路的重要分子。在本研究中10%TCE与溶剂对照组差异无统计学意义,20%TCE与溶剂对照组的差异有统计学意义,低剂量组表皮组织内caspase-9的表达较弱,而高剂量组的含量依次增高,但

是高剂量组之间的差异无统计学意义。维生素E保护组的细胞凋亡指数与caspase-9的活性具有相似性,都表现为低剂量维生素E保护组与溶剂组相比差异无统计学意义,而高剂量组与其比较差异有统计学意义,表明低剂量时不具有保护作用,高剂量组可以抵抗三氯乙烯的氧化损伤,具有保护作用。细胞凋亡与caspase-9活性表达的相关性分析表明,caspase-9参与了三氯乙烯引起表皮组织凋亡的过程,通过线粒体途径引起的细胞凋亡在三氯乙烯引起细胞损伤的作用机制里具有重要的意义,但是高剂量组之间caspase-9的活性差异并无统计学意义,这还有待于进一步的研究。通过本次实验可推测三氯乙烯引起的早期皮肤损伤与细胞凋亡有较大的关系,以线粒体损伤、caspase-9活化为主要的凋亡通路在细胞凋亡中具有重要的意义。

参考文献:

- [1] International Agency for Research on Cancer. Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals [J]. IRAC Monogr Eval Carcing Risks Hum. 1995. 63: 75-158.
- [2] 张坤海. 三氯乙烯对人体健康的影响 [J]. 职业与健康, 2003, 19 (3): 5-6.
- [3] Ian Kimber, Rebecca J. Deamania et al. Allergic contact dermatitis: the cellular effectors [J]. Contact Dermatitis. 2002, 46: 1-5.
- [4] 于均峰, 周承藩, 沈彤, 等. 三氯乙烯对裸鼠皮肤的刺激性损伤及维生素E的保护作用 [J]. 中国工业医学杂志, 2006, 19 (2): 78-80.
- [5] 丁锐, 沈彤, 朱启星, 等. 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 [J]. 中国工业医学杂志, 2006, 19 (3): 129-131.
- [6] Boatright K M, Salvesen G S. Mechanisms of caspase activation [J]. Curr Opin Cell Biol. 2003, 15 (6): 725-731.
- [7] 谭洁, 沈志祥. 凋亡相关基因caspase-9, Bcl-2在大肠腺瘤和大肠癌中的表达及意义 [J]. 胃肠病学和肝病杂志, 2004, 13 (6): 639-641.
- [8] HL Huang, Li Chen. New Problems caused by occupational trichloroethylene exposure [J]. J Immunopathol Pharmacol, 2002, 15: 30-32.
- [9] Nakajima T, Yamanoshita O. 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.
- [10] 杨翠婵, 李伯灵. 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.
- [11] QiXing Zhu, Tong Shen, Rui Ding, et al. Cytotoxicity of trichloroethylene on normal human epidermal keratinocytes and protective role of Vitamin E [J]. Toxicology, 2005, 209: 55-67.