

三氯乙烯对人角质形成细胞 NO合成及细胞活力的影响

叶良平¹, 汪立杰¹, 沈彤², 朱启星^{1,2*}

(1 安徽医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生系, 安徽 合肥 230032 2 安徽医科大学皮肤病研究所, 安徽 合肥 230032)

摘要: 目的 研究三氯乙烯 (TCE) 对人角质形成细胞 (KC) 一氧化氮 (NO) 合成以及细胞活力的影响, 探讨三氯乙烯引起皮肤细胞毒性的机制。方法 体外培养的人角质形成细胞以 0.125、0.25、0.5、1.0、2.0 mmol/L 浓度的 TCE 染毒 4 h, 另以诱导型一氧化氮合酶 (NOS) 抑制剂氨基胍 (AG) 100 μ mol/L 预处理细胞 30 min 后再行 TCE 处理, 分别于染毒后 12 h、24 h、48 h、72 h 时检测细胞上清中 NO 的含量, MTT 法观察细胞活力。结果 低剂量的 TCE 不引起 NO 含量改变 (与溶剂对照比较, $P > 0.05$), 0.5、1.0、2.0 mmol/L 浓度的 TCE 染毒组 NO 含量分别在染毒后的 24 h、48 h 和 72 h 开始升高 ($P < 0.05$), 对应的细胞活力则相应下降 ($P < 0.05$); AG 预处理的 0.5、1.0 和 2.0 mmol/L TCE 染毒组在处理 48 h 后 NO 含量开始下降 (与对应的 TCE 染毒组比较, $P < 0.05$), 且回复到正常溶剂对照水平 ($P > 0.05$), 其所对应的细胞活力逐步回升 (与对应的 TCE 染毒组比较, $P < 0.05$)。结论 TCE 以剂量和时间依赖方式诱导人 KC 产生 NO, 而过量的 NO 可能介导了 TCE 的 KC 细胞毒性。

关键词: 三氯乙烯 (TCE); 角质形成细胞 (KC); 一氧化氮 (NO); 氨基胍

中图分类号: R758.22 O623.221 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2008)02-0079-03

Effect of trichloroethylene on nitric oxide synthesis and cell activity of human keratinocytes

YE Liangping, WANG Lijie, SHEN Tong, ZHU Qixing^{2*}

(1. Dept of Occupational & Environmental Health School of Public Health Anhui Medical University Hefei 230032 China; 2. Institute of Dermatology of Anhui Medical University Hefei 230032 China)

Abstract: Objective To observe the effect of trichloroethylene (TCE) on nitric oxide (NO) and cell activity in human keratinocytes (KC), and further explore the mechanism of dermatotoxicity caused by trichloroethylene. Methods Cultured human keratinocytes were exposed to 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mmol/L trichloroethylene for 4 h with or without the 30 min pretreatment with 100 μ mol/L aminoguanidine (AG), a specific inhibitor of NOS. After 12 h, 24 h, 48 h and 72 h incubation, the NO concentrations in the mediums were detected, the cell viability was determined by MTT test as well. Results It was shown that there was no obvious increase in NO level when KC treated with lower concentrations of TCE such as 0.125 mmol/L and 0.25 mmol/L ($P < 0.05$ compared with the controls), while higher doses of TCE (such as 0.5 to 2.0 mmol/L) might induce the rise of NO levels ($P < 0.05$), meanwhile cell viability was also markedly decreased. The pretreatment with aminoguanidine might effectively lower the rise of NO level in higher dosage groups especially at 48 h and the cell viabilities were also restored to baseline levels. Conclusions Trichloroethylene can induce keratinocytes to produce NO in the dose and time dependent manner, and the overdose of NO might play a role in the cytotoxicity of TCE on keratinocytes.

Key words: Trichloroethylene (TCE); Keratinocyte (KC); Nitric oxide (NO); Aminoguanidine

在生产和使用三氯乙烯 (trichloroethylene, TCE) 过程中, 少数接触者会发生职业性三氯乙烯药疹样皮炎 (occupational medicamentosa like dermatitis induced by trichloroethylene), 表现为迅速出现的表皮剥脱、松解和皮肤细胞的损伤、死亡, 而多数皮肤接触三氯乙烯的工人, 则有不同程度的皮肤刺激性损伤, 其发病机制亟待探讨^[1,2]。NO 是一种由一氧化氮合酶 (nitric oxide synthase, NOS) 催化

产生的具有重要生理和病理功能的信使分子, 参与皮肤疾病中的细胞损伤和炎症反应。NOS 分为结构型 NOS (cNOS) 和诱导型 NOS (iNOS), 在人角质形成细胞 (keratinocyte, KC) 中 cNOS 通常固有表达, 催化产生少量的 NO (pmol), 对细胞产生一种生理性的保护作用; 而 KC 中 iNOS 正常状态下多不表达, 一经促炎性细胞因子和环境损伤因子 (如紫外线、LPS 等) 刺激激活后可催化合成超量的 NO, 促进皮肤细胞损伤, 更多地参与机体的病理过程^[3,4]。本实验拟通过 TCE 直接作用于人皮肤 KC 以及用 NOS 抑制剂氨基胍 (aminoguanidine, AG) 预处理细胞再行 TCE 染毒后, 观察 TCE 诱导体外培养的 KC 合成 NO 的量, 以及细胞活力的变化状况, 探讨 TCE 引起 KC 细胞毒性的作用机制。

收稿日期: 2007-11-02 修回日期: 2007-12-28

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30471469 No. 30671787)

作者简介: 叶良平 (1982-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 皮肤毒理。

*: 通讯作者, 教授, 医学博士, 博士生导师, E-mail: zqxinq@yeah.net

©1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

三氯乙烯 (99.5% AR 美国 Alfa Aesar公司), 胰蛋白酶、DMEM Defined Keratinocyte-SFM培养基 (KC专用无血清培养基) 均购自 GIBCO公司, 胎牛血清 (FBS) 为杭州四季青生物工程材料有限公司产品, 96孔细胞培养板 (美国 Corning公司), 甲基噻唑基四唑 (MTT)、氨基胍 (AG) 为美国 Sigma公司产品, NO检测试剂盒 (南京建成生物工程有限公司), uQuantTM 酶标仪 (美国 Bio-Tek公司)。

1.2 角质形成细胞的分离和培养

临床泌尿外科包皮环切术后的正常皮肤用 D-Hank 液漂洗 3次并去除皮下组织后, 剪成 1 cm×0.5 cm大小的皮片, 经 0.25%胰蛋白酶在 4℃消化 10 h分离出表皮, 再以 0.25%胰蛋白酶 37℃消化 10 min 吹打、过滤、离心后分离 KC 用含 10% FBS 的 DMEM培养基于 37℃、5% CO₂ 条件下进行培养, 贴壁后换成 Defined Keratinocyte-SFM培养基继续培养, 待细胞长至 80%汇合后用于实验研究。

1.3 细胞处理

调整细胞密度为 5×10⁴ 个/ml 将细胞悬液以每孔 0.1 ml 接种至 96孔培养板中。实验分两组, 染毒组以 0、0.125、0.25、0.5、1.0和 2.0 mmol/L 浓度的 TCE染毒 4 h 弃去染毒液换新鲜培养基孵育至 12 h、24 h、48 h和 72 h 使用含 1%体积分数的丙酮 (助溶剂) 的培养基作为溶剂对照, 新鲜培养基作为空白对照, 每个组别设 3个重复孔; AG预处理组, 于染毒前 30 min加入 100 μmol/L 的 AG 弃去含 AG的培养基后, 按上述方法染毒。

1.4 NO测定

染毒结束后每孔取细胞培养上清 0.1 ml 按照一

氧化氮试剂盒说明书测定 NO含量。

1.5 细胞活力检测

吸去细胞上清的 96孔板, 每孔加入 50 μl 0.5 mg/ml 的 MTT工作液孵育 4 h 加入 50 μl 10%的 SDS0.1N HCl溶液终止反应, 置培养箱内放置过夜后, 酶标仪上 590 nm处测定吸光度, 计算细胞存活率 (细胞存活率=处理组 A_{590 nm}/对照组 A_{590 nm}×100%)。

1.6 统计学处理

所有数据采用 SPSS12.0统计软件包进行录入和处理, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计方法采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 NO含量变化

1%丙酮 (溶剂对照) 作用于角质形成细胞 12、24、48 和 72 h未见 NO活力改变, 与空白对照组比较, 差异无统计学意义 (P>0.05)。0.125和 0.25 mmol/L TCE组在各时间段 NO的含量与溶剂对照组比较差异无统计学意义; 0.5和 1.0 mmol/L TCE组 NO含量于染毒后 72 h和 48 h开始升高, 与对应的溶剂对照组相比, P<0.05。2.0 mmol/L TCE组则在作用 24 h后 NO含量升高, 与溶剂对照比较, P<0.05。随着 TCE浓度增加和作用时间延长, NO含量呈总体上升趋势。

用 AG预处理细胞, 可以明显降低 TCE诱导的 NO的表达。作用至 48 h和 72 h AG预处理的 0.5、1.0和 2.0 mmol/L TCE染毒组 NO含量下降, 与对应的 TCE染毒组比较, P<0.05 且回复到正常细胞水平 (与溶剂对照相比, P>0.05), 见表 1。

2.2 细胞活力变化

MTT法是经典的检测细胞活力的方法, 根据 OD_{590nm} 计算得到的细胞活力变化情况见表 1。

表 1 TCE作用 KC后及 AG预处理对 NO含量和细胞活力的影响 (n=3 $\bar{x} \pm s$)

组别	NO含量 (μmol/L)				细胞存活率 (%)			
	12 h	24 h	48 h	72 h	12 h	24 h	48 h	72 h
空白对照	19.80±2.81	20.23±2.99	22.20±3.11	24.12±3.18	—	—	—	—
溶剂对照	19.61±2.82	20.14±3.31	23.96±3.51	24.27±3.72	96.10±5.78	93.39±5.20	94.74±5.83	94.64±7.15
0.125 mmol/L TCE	19.22±2.99	21.66±2.82	24.22±3.31	25.13±4.68	99.45±4.99	97.34±7.99	90.29±8.04	88.52±7.55
0.25 mmol/L TCE	20.13±3.05	23.08±4.54	26.17±3.87	27.76±5.10	93.22±7.44	98.20±8.27	85.69±6.93	84.79±8.39
0.5 mmol/L TCE	20.92±3.47	23.84±3.89	30.21±4.42	35.29±5.75*	91.77±8.89	90.10±7.22	83.04±7.46	80.46±5.14*
1.0 mmol/L TCE	21.38±2.95	26.34±3.55	33.59±5.54*	38.30±5.49*	92.41±8.21	87.70±8.14	80.13±7.00*	74.48±6.34*
2.0 mmol/L TCE	22.63±3.28	28.17±3.91*	35.70±6.27*	42.22±5.45**	89.81±7.14	80.17±7.81*	75.92±6.70*	68.87±6.32**
Vehicle+100 μmol/L AG	18.16±3.26	19.51±3.51	19.19±2.55	21.85±3.56	95.40±7.02	93.88±6.55	94.24±6.21	93.91±6.69
0.125 mmol/L TCE+100 μmol/L AG	17.83±3.09	19.86±3.10	18.89±3.09	22.20±2.11	93.37±6.55	93.66±7.43	91.53±8.51	90.85±9.56
0.25 mmol/L TCE+100 μmol/L AG	18.50±3.65	20.88±4.22	19.62±4.22	21.57±3.65	93.60±8.88	96.85±6.29	90.81±5.52	90.68±9.89
0.5 mmol/L TCE+100 μmol/L AG	19.16±3.56	20.24±3.09	20.26±3.26#	23.58±3.51#	93.33±6.78	93.94±7.06	93.35±6.45	91.88±5.98#
1.0 mmol/L TCE+100 μmol/L AG	19.84±2.55	21.92±4.99	19.93±3.10#	22.76±3.26#	95.54±5.69	92.99±7.03	91.52±6.96#	90.39±7.25#
2.0 mmol/L TCE+100 μmol/L AG	20.18±2.93	22.22±3.65	22.96±4.53#	24.99±4.57#	93.28±8.06	89.24±8.64	91.34±6.84#	89.06±6.94#

与溶剂对照组比较, * P<0.05, ** P<0.01; 与对应的 TCE染毒组比较, # P<0.05

0.125和0.25 mmol/L TCE组对细胞活力无明显改变,与相应的溶剂对照组比较, $P > 0.05$ 而0.5和1.0 mmol/L TCE组分别在染毒72 h和48 h后细胞活力较溶剂对照组明显降低 ($P < 0.05$), 2.0 mmol/L TCE组则在染毒24 h后,细胞活力出现下降 ($P < 0.05$)。

AG对TCE引起的细胞活力下降具有明显的保护作用。用AG预处理的0.5 mmol/L TCE的染毒组在72 h后细胞活力上升,而1.0和2.0 mmol/L TCE组则在48 h后细胞活力回升,与对应的TCE染毒组比较, $P < 0.05$ 且与溶剂对照组差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

KC是皮肤表皮的重要组成细胞,也是外来化学物产生皮肤损伤最早作用的靶细胞。通常KC合成的NO作为生物信使分子自由穿透细胞膜,传递信息用以维护皮肤稳态,但是经内源性和外源性刺激因子刺激后大量产生的NO却在炎症性和免疫性皮肤细胞损害中起着显著作用,而NOS则是体内NO过量产生的基础。在某些皮肤病如银屑病、紫外线皮肤损伤、遗传过敏性皮炎、接触性皮炎等其皮损表皮KC的NOS表达异常升高,NO大量合成,用NOS抑制剂治疗时均有一定的疗效,说明NO参与了这些疾病的病理过程^[3-5,6]。但是在TCE引起的皮肤损伤以及职业性三氯乙烯药疹样皮炎发病机制中NO究竟发挥何种作用尚不十分清楚。

本实验结果显示TCE可诱导人KC合成NO且呈剂量和时间依赖性,同时NO含量的升高伴随细胞活力的下降,两者有一定的相关性。研究还发现细胞活力的显著降低仅发生在高剂量TCE暴露所引起的NO含量升高的情况下,提示TCE引起的NO合成只有超过一定的阈值才可产生细胞毒性,低水平的NO不足以损伤细胞。这与Szabo等^[7]的研究结果相似。为进一步证实NO在KC细胞损伤中的作用,本课题组使用NOS抑制剂AG对细胞进行预处理,结果显示处理后的细胞NO含量下降,细胞活力回复到正常水平,提示NOS抑制剂AG可以拮抗TCE引起的细胞损伤,也表明NO在TCE引起KC的细胞毒性中发挥重要作用。

关于过量NO产生的毒作用机制,有学者认为NO及其衍生物(如ONOO⁻)可作用于线粒体,破坏线粒体结构的完整性,线粒体通透性转换孔(MPTP)开放导致线粒体膜间隙促凋亡蛋白CytoC释放,激活caspase级联反应诱导凋亡^[8]。NO和ONOO⁻还被证实可以可逆或不可逆地抑制线粒体呼吸链的中间反应,干扰细胞的能量代谢,影响ATP的合成^[9]。ATP合成量轻微减少且在细胞代偿范围

内,不影响细胞活性;细胞受损但仍可合成凋亡所需的ATP,那么细胞选择凋亡的方式死亡;ATP一旦衰竭,细胞将以坏死的方式消亡^[10-11]。这似乎可以解释NO引起细胞毒性中存在的阈值问题。本课题组前期的研究也发现TCE可通过线粒体途径诱使体外培养的KC发生损伤和凋亡^[12],结合本次研究结果可推测,TCE促使KC催化产生大量的NO,NO以及在氧化状态下转化生成的衍生物作用于线粒体,导致线粒体功能紊乱从而介导TCE对KC的细胞毒性。当然NO引起的细胞损伤是一个复杂的网络调控过程,NO生物学作用的广泛性和两面性使其作用机制更加复杂化,阐明NO在TCE诱导的KC细胞毒性中的作用还需要做大量的工作。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 徐新云. 职业接触三氯乙烯的皮肤损害特点及诊断探讨 [J]. 中国公共卫生, 2004, 20 (2): 251-252.
- [3] Páunel A N, Dejan A, Thelen S, et al. Enzyme independent nitric oxide formation during UVA challenge of human skin: characterization, molecular sources, and mechanisms [J]. Free Radic Biol Med, 2005, 38 (5): 606-615.
- [4] Nakai K, Kadiiska M B, Jiang J J, et al. Free radical production requires both inducible nitric oxide synthase and xanthine oxidase in LPS-treated skin [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103 (12): 4616-4621.
- [5] Omerod A D, Weller R, Copeland P, et al. Detection of nitric oxide and nitric oxide synthases in psoriasis [J]. Arch Dermatol Res, 1998, 290 (1-2): 3-8.
- [6] Ross R, Reske-Kunz A B. The role of NO in contact hypersensitivity [J]. Int Immunopharmacol, 2001, 1 (8): 1469-1478.
- [7] Szabo E, Vig G L, Bakondi E, et al. Peroxynitrite production, DNA breakage, and poly (ADP-ribose) polymerase activation in a mouse model of oxazoline induced contact hypersensitivity [J]. Invest Dermatol, 2001, 117 (1): 74-80.
- [8] Büttner B, Zhou J, Von Knebel A. Nitric oxide, oxidative stress, and apoptosis [J]. Kidney Int Suppl, 2003, (84): S22-24.
- [9] Piantadosi C A, Tatro L G, Whetton A R. Nitric oxide and differential effects of ATP on mitochondrial permeability transition [J]. Nitric Oxide, 2002, 6 (1): 45-60.
- [10] Brown G C. Nitric oxide and mitochondria [J]. Front Biosci, 2007, 12: 1024-1033.
- [11] Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, et al. Cytochrome c dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death [J]. Nature, 2005, 434 (7033): 652-658.
- [12] Zhu Q X, Shen T, Tu D Y, et al. Protective effects of ginkgo biloba leaf extracts on trichloroethylene induced human keratinocyte cytotoxicity and apoptosis [J]. Skin Pharmacol Physiol, 2005, 18 (4): 160-169.