

· 论 著 ·

三氯乙烯致敏豚鼠皮肤组织中 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-1 的表达水平

冯晓亮, 戴丹, 周承藩, 沈彤, 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 $\text{TNF-}\alpha$ 及 IL-1 在三氯乙烯 (TCE) 致敏豚鼠皮肤组织中的表达情况, 探讨 TCE 药疹样皮炎发生过程中可能存在的机制。方法 选用体重 250 g 左右白色雌性豚鼠, 随机分成空白对照组、溶剂对照组、TCE 处理组、2,4-二硝基氯苯 (DNCB) 阳性对照组, 用豚鼠最大值实验 (guinea pig maximization test, GMT) 方法建立动物致敏模型, 并在终末激发后依据致敏结果以及取材时点的不同 (分别于 24 h、72 h 取材), 将 TCE 处理组分为 TCE 致敏 24 h 组、72 h 组和 TCE 未致敏 24 h 组、72 h 组; DNCB 阳性对照组分为 DNCB 24 h 组和 DNCB 72 h 组。采用 Elivison 二步法免疫组织化学法检测各组皮肤组织中 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-1 的表达。结果 TCE 处理组致敏率为 62.1%; TCE 致敏 24 h 组和 TCE 致敏 72 h 组的 $\text{TNF-}\alpha$ 及 IL-1 水平显著高于溶剂对照组, 差异有统计学意义; 同时 TCE 致敏与未致敏 24 h 组、TCE 致敏与未致敏 72 h 组比较差异也有统计学意义。结论 TCE 对豚鼠皮肤具有致敏作用, $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-1 在 TCE 药疹样皮炎发生过程中具有重要意义。

关键词: 三氯乙烯; 豚鼠; 肿瘤坏死因子- α ($\text{TNF-}\alpha$); 白细胞介素-1 (IL-1)

中图分类号: R994.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2009)06-0403-04

The expression of $\text{TNF-}\alpha$ and IL-1 in skin of TCE-sensitized guinea pig

FENG Xiaoliang, DAIDan, ZHOU Chengfan, SHEN Tong, ZHU Qixing*

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

Abstract: Objective To explore the expression status of $\text{TNF-}\alpha$ and IL-1 in skin of TCE-sensitized guinea pig and the mechanism of medicamentosa like dermatitis induced by trichloroethylene. Methods White female guinea pigs body weight around 250 g were randomly divided into four groups, which were blank control group, solvent control group, TCE treatment group and DNCB positive control group. The experimental model was set up using guinea pig maximization test (GMT), and the TCE treatment group was subdivided into TCE sensitized-24h group, TCE sensitized-72 h group, TCE unsensitized-24h group, TCE unsensitized-72 h group according to the sensitization situation at different time after exposure. DNCB positive control group was also subdivided into DNCB 24 h group and DNCB 72 h group. Expression of $\text{TNF-}\alpha$ and IL-1 in skin was examined by immunohistochemical technique. Results The sensitization rate in TCE treatment group was 62.1%, levels of $\text{TNF-}\alpha$ and IL-1 in TCE sensitized-24 h group and TCE sensitized-72h group were significantly higher than those in solvent control group. Additionally, the differences between TCE sensitized-24 h group and TCE unsensitized-24h group, as well as TCE sensitized-72 h group and TCE unsensitized-72 h group were also quite significant. Conclusions The results suggest that TCE has allergic effect on skin, and the high expression of $\text{TNF-}\alpha$ and IL-1 in skin may play an important role in DMLT induced by TCE.

Key words: Trichloroethylene; Tumor necrosis factor- α ($\text{TNF-}\alpha$); Interleukin-1 (IL-1)

三氯乙烯 (trichloroethylene, TCE) 作为清洗剂被广泛应用于工业, 是一种普遍存在的工业及环境污染物, 可引起皮肤、肝脏、肾脏等多脏器及神经系统的损害^[1-3]。目前, 我国报道较多且最为严重的是由于职业暴露引起的皮肤损害, 因其临床表现和发病特点与药疹皮炎相似, 故命名为 TCE 药疹样皮炎

(dermatitis medicamentosa like of trichloroethylene, DMLT)。自 1988 年广东发现首例因职业暴露引起的 TCE 药疹样皮炎^[3], 我国学者在近 20 年里做了大量研究, 但其具体发病机制仍然存在众多争议, 目前多认为是抗原特异性 T 淋巴细胞介导的迟发型 IV 型变态反应^[4-5]。本课题组前期研究显示, TCE 能够引起裸鼠皮肤角质形成细胞明显损伤, 局部炎症因子显著升高, 提示 KC 损伤后作为皮肤炎症反应的“前哨”, 可以通过释放前炎症细胞因子启动炎症反应。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , $\text{TNF-}\alpha$) 及白细胞介素-1 (IL-1) 是炎症因子中重要组成部分, 与炎症反应有着密切的关系, 因此推测在 DMLT 发生过程中

收稿日期: 2009-06-16 修回日期: 2009-08-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30671787, 30872147); 安徽省教育厅自然科学基金重点科研项目 (KJ2009A73); 安徽医科大学校基金资助项目 (2007k25)

作者简介: 冯晓亮 (1985-) 男, 硕士研究生, 研究方向: 皮肤毒理学。

* 通信作者, 教授, 博士生导师, E-mail: zckir@yeah.net

TNF- α 及 IL-1可能发挥重要作用。本研究按照豚鼠最大值实验 (guinea pig maximization test GMT) 建立 TCE动物致敏模型, 通过检测皮肤组织中 TNF- α 及 IL-1表达水平, 探讨 TCE药疹样皮炎发生严重免疫性损伤效应的机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

三氯乙烯、PCA为 Sigma公司产品, 十二烷基硫酸钠 (SLS)、DNCB (2,4-二硝基氯苯) 为上海化学试剂采购站从日本进口分装产品, 橄榄油为中国医药上海化学试剂公司产品, 即用型免疫组化 Elivison Plus试剂盒 (鼠/兔) 为福建迈新公司产品, IL-1以及 TNF- α 抗体均由北京博奥森公司提供, 无刺激胶布为 Neoplas公司产品, 生物图像分析系统 (Nikon-Eclipse80 生物显微镜)。

1.2 实验动物分组和处理

选用体重 250 g左右白色雌性豚鼠, 随机分成空白对照组、溶剂对照组、TCE处理组、DNCB阳性对照组, 用豚鼠 GMT方法建立动物致敏模型, 并在终末激发后依据致敏结果以及取材时点的不同 (分别在 24 h和 72 h取材), 将 TCE处理组分为 TCE致敏 24 h组、TCE致敏 72 h组和 TCE未致敏 24 h组、TCE未致敏 72 h组, DNBCB阳性对照组分为 DNBCB 24 h组和 DNBCB72 h组。实验前通过预实验确定 TCE诱导及激发浓度, 并在实验前 24 h 用小型电动剃刀剃去豚鼠颈背部被毛, 大小 4 cm $\times$ 6 cm。第 1天用 5% TCE (TCE 橄榄油 = 5 : 95) 和 0.25% DNBCB (DNCB 丙酮 橄榄油 = 1 : 3 : 397) 皮内注射进行初次诱导致敏, 于第 8天将 40% TCE涂皮和 0.50% DNBCB涂皮, 用两层纱布一层玻璃纸覆盖, 无刺激胶布封固 48 h进行第二次诱导致敏; 于第 15天用 20% TCE涂皮和 0.25% DNBCB涂皮, 用两层纱布一层玻璃纸覆盖, 无刺激胶布封固进行终末激发。在终末激发后 24 h观察和记录各组动物皮肤反应情况, 实验结束时处死动物, 无菌取皮肤进行常规石蜡包埋 (非结痂部位组织)。

1.3 视觉评分

末次激发后 24 h依据《化学品毒性鉴定技术规范》(卫监督发 [2005] 272号) 观察和记录受试区的皮肤反应情况并进行拍照, 对皮肤反应进行评分。受试样品组动物皮肤反应积分 ≥ 1 时, 应判为皮肤致敏反应阳性。

1.4 TNF- α 与 IL-1检测

采用 Elivison二步法免疫组织化学法检测。石蜡

切片常规脱蜡、水化, 抗原修复, 3% H₂O₂ 溶液去除内源性过氧化物酶后, 滴加特异性一抗, 4℃过夜。于第二天 PBS冲洗, 滴加聚合物增强剂, 室温孵育 20 min后, 滴加酶标抗鼠/兔聚合物 B液, 室温孵育 30 min, PBS冲洗后, DAB显色, 苏木素复染后, 脱水、透明、封片。

1.5 结果判定

免疫组化结果采用半定量方法, 所有切片由两位病理医师分开观察, 显微镜下 (400倍) 随机选取 5个视野, 阳性表达于细胞浆, 呈棕黄色或棕褐色, 阴性表达的组织内细胞浆呈淡蓝色, 实验结果根据染色强度 (阳性细胞呈现的染色特征) 和阳性细胞胞浆分布面积百分比进行综合分析, 首先对每张切片的 5个视野下的阳性结果进行评分, 得出平均评分, 然后再求出每个剂量组的平均评分。结果判定: 阳性细胞数 $< 5\%$ 为阴性, 5%~25%为 1分, 26%~50%为 2分, 51%~75%为 3分, $> 75\%$ 为 4分。染色强度以染色阴性或微弱的黄色为 0分, 淡黄色为 1分, 棕黄色为 2分, 棕褐色为 3分。两者相加为组织切片的最后综合评分。

1.6 统计分析

数据录入到 Excel数据库中, 用 SPSS 3.0软件进行分析, 所有计量资料均以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 各组组间的差异用单因素方差分析 (LSD法)。

2 结果

2.1 动物致敏情况

在本次致敏实验中, 空白对照组和溶剂对照组均未见红斑或水肿; TCE处理组 29只豚鼠有 18只致敏, 致敏率 62.1%, DNBCB阳性对照组则全部出现明显红斑或水肿。结果见表 1。

表 1 TCE致豚鼠皮肤免疫反应视觉评分

组别	动物数	致敏动物数				致敏率 (%)
		积分 0	积分 1	积分 2	积分 3	
空白对照	5	5	0	0	0	0
溶剂对照	5	5	0	0	0	0
TCE处理组	29	11	7	7	4	62.1
DNCB	15	0	2	7	6	100.0

2.2 皮肤组织 TNF- α 表达情况

采用免疫组化法检测, 阳性反应产物定位于细胞浆, DAB显色后可见胞浆呈棕色或棕褐色, 免疫组化结果见表 2、图 1。

对各剂量组反应评分进行方差齐性检验 ($P=0.343$), 方差分析 $F=18.63$ ($P<0.001$)。溶剂对照组与空白对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$), TCE处理组、DNCB阳性对照组同溶剂对照

组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)；同一时点比较，TCE致敏 24 h组同未致敏组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)，TCE致敏 72 h组同未致敏组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$)；不同时点，TCE致敏 24 h组同 TCE致敏 72 h组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 皮肤组织 IL-1 表达情况

采用免疫组化法检测，阳性反应产物定位于细胞浆，DAB显色后可见胞浆呈棕色或棕褐色，免疫组化结果见表 3、图 2

表 2 各组表皮中 TNF-α 表达程度评分 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	评分
空白对照	5	2.6±0.89
溶剂对照	5	2.6±0.55
TCE未致敏 24 h	5	4.0±0.82*
TCE致敏 24 h	9	6.2±1.09△*
TCE未致敏 72 h	6	3.4±0.52
TCE致敏 72 h	9	6.2±0.84*△
DNCB24h	7	5.7±0.49*
DNCB72h	8	5.3±0.52*

与溶剂对照组相比 * $P<0.05$ ，与 TCE未致敏组相比，△ $P<0.05$ ，表 3同。

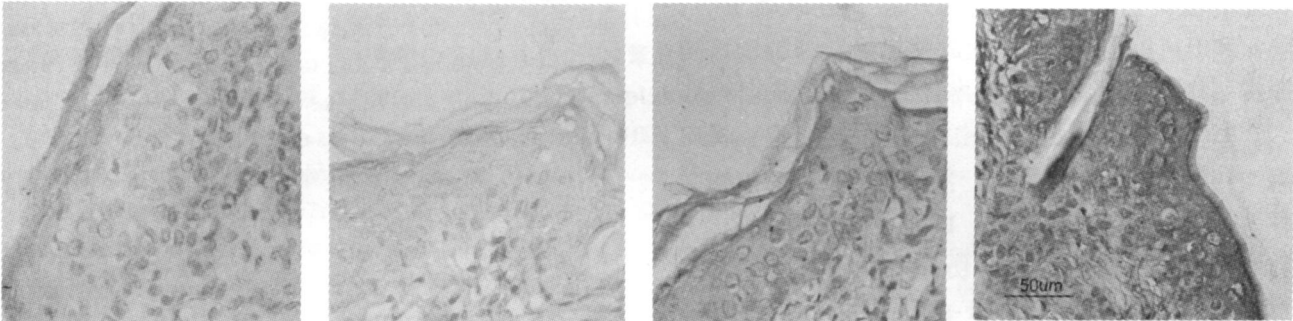


图 1 各组 TNF-α 免疫组化图片 (×400 倍)

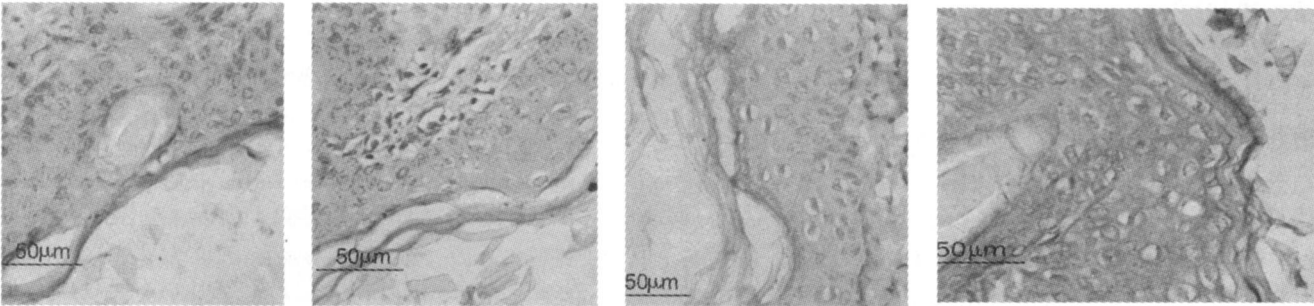


图 2 各组 IL-1 免疫组化图片 (×400 倍)

对各剂量组的反应评分进行方差齐性检验，检验结果 $P=0.642$ ，方差分析结果为 $F=25.96$ ($P<0.001$)。溶剂对照组与空白对照组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)；TCE处理组、DNCB阳性对照组同溶剂对照组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$)；同一时点比较，TCE致敏 24 h组同未致敏组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)，TCE致敏 72 h组同未致敏组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$)；不同时点，TCE致敏 24 h组同 72 h组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 3 各剂量组表皮 IL-1 表达程度的评分 ($\bar{x}\pm s$)

组别	动物数	评分
空白对照	5	2.8±0.84
溶剂对照	5	3.2±0.84
TCE未致敏 24 h	5	3.3±0.50
TCE致敏 24 h	9	6.1±0.60△*
TCE未致敏 72 h	6	3.3±0.52
TCE致敏 72 h	9	6.4±0.89*△
DNCB 24 h	7	6.3±0.49*
DNCB 72 h	8	5.5±0.53*

3 讨论

DML临床主要表现为十分严重的全身性皮肤损害,出现剥脱性皮炎、重症多形红斑、大疱性表皮坏死松解症或多形红斑等,眼、口、生殖器等处的黏膜红肿、糜烂。TCE引起的免疫反应,在皮肤局部免疫反应中是如何通过级联反应被进一步放大并过度激活,以至产生严重损害机制的探讨,无论对职业卫生、基础免疫学研究,还是指导 DML的防治均具有重大意义。

TNF α 和 IL-1是炎症反应出现最早且最为重要的炎症介质。当人体皮肤受到外界变应原刺激时,TNF α 和 IL-1 β 能够介导活化的朗格汉斯细胞迁移和抗原提呈作用并促使活化的淋巴细胞向皮肤组织募集^[9]。TNF α 来源广泛,可由单核吞噬细胞、表皮细胞、角质形成细胞等产生,具有极为广泛的生物学活性,在免疫应答效应阶段,能够活化巨噬细胞、中性粒细胞,增强其吞噬、杀伤等活性,通过与 T淋巴细胞表面受体结合调节 NF- κ B介导的胞内信号转导,从而活化 T淋巴细胞并促进大量促炎细胞因子(如 IL-1、IL-6)的产生。TNF α 和 IL-1还能刺激内皮细胞和白细胞释放一系列炎性介质(如 NO),改变凝血功能,导致组织损伤。可见,TNF α 和 IL-1在炎症反应以及皮肤组织损伤过程中起到重要作用。

本次研究通过免疫组织化学方法检测在 TCE致敏豚鼠模型皮肤组织中 TNF α 和 IL-1的表达情况,结果进行两个方面的比较分析。首先,同一时点比较,发现 TCE致敏 24 h组与未致敏组、TCE致敏 72 h组与未致敏组,TNF α 和 IL-1表达水平差异具有统计学意义,且致敏组水平平均高于未致敏组水平,提示 TNF α 和 IL-1在 TCE致敏过程中有重要作用;另外,不同时点的比较,TCE致敏 24 h组和 TCE致敏 72 h组分别与溶剂对照组、空白对照组相比较,TNF α 和 IL-1水平显著上升,而 TCE致敏 24 h组与 TCE致敏 72 h组之间 TNF α 和 IL-1水平差异无统计学意义,提示在终末激发后 TNF α 和 IL-1水平迅速上升,并在以后的致敏过程中保持相对稳定的水平。

本课题组前期研究发现,TCE能对皮肤表皮角质形成细胞(KC)产生明显的细胞毒性作用和凋亡

诱导作用,引起 KC氧化应激水平升高^[7,8]。Ping Cai等^[9]用 DCAC(TCE代谢产物之一)刺激小鼠,发现培养的脾细胞中 IL-1的水平明显增高;Kondo S^[10]则发现在给 DNCB致敏的 BALB/c小鼠局部注射 IL-1 α (IL-1受体拮抗物)可以显著减弱接触性超敏反应的强度。综上所述,通过本次实验可以推测,作为炎症细胞因子网络的关键部分,TNF α 和 IL-1在 TCE药疹样皮炎皮肤损伤的发病机制中具有重要意义。

参考文献:

- [1] Michihiro Kamijima, Haijian Wang, Tamie Nakajima, et al. Trichloroethylene causes generalized hypersensitivity skin disorders complicated by hepatitis [J]. *J Occup Health* 2008 50 (4): 328-338.
- [2] Pere Sanz, Santiago Nogué, Giancarlo Logroscino, et al. Myoclonic encephalopathy after exposure to trichloroethylene [J]. *Industrial Health* 2008 46 (6): 635-637.
- [3] 黄汉林, 李来玉. 职业性三氯乙烯药疹样皮炎研究概况 [J]. *中国职业医学*, 2006 33 (5): 323-325.
- [4] Iavicoli J, Marinaccio A, Carelli G. Effects of occupational trichloroethylene exposure on cytokine levels in workers [J]. *J Occup Environ Med* 2005 47 (5): 453-457.
- [5] Blossom S J, Pumbord N R, Gilbert K M. Activation and attenuation of apoptosis of CD4⁺ T cells following in vivo exposure to two common environmental toxicants: trichloroacetaldehyde hydrate and trichloroacetic acid [J]. *Autoimmun* 2004 23 (3): 211-220.
- [6] Griffiths C E, Dearman R J, Cumberbatch M, et al. Cytokines and langerhans cell mobilisation in mouse and man [J]. *Cytokine* 2005 32 (2): 67-70.
- [7] Zhu Q X, Shen T, Zhang X J, et al. Cytotoxicity of trichloroethylene and perchloroethylene on normal human epidermal keratinocytes and protective role of Vitamin E [J]. *Toxicology* 2005 209 (1): 55-67.
- [8] Shen T, Zhu Q X, Zhang X J, et al. Trichloroethylene induce nitric oxide production and nitric oxide synthase mRNA expression in cultured normal human epidermal keratinocytes [J]. *Toxicology* 2007 239 (3): 186-194.
- [9] Ping Cai, Rolf K. Nigam, Fioze Khan, et al. Autoimmune response in MRL^{+/+} mice following treatment with dichloroacetyl chloride or dichloroacetic anhydride [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2006 216 (2): 248-255.
- [10] Kondo S, Pastore S, Fujisawa H, et al. Interleukin-1 receptor antagonist suppresses contact hypersensitivity [J]. *J Invest Dermatol* 1995 105 (3): 334-338.

欢迎投稿

欢迎订阅