

# 二氯乙烯对体外培养人皮肤角质形成细胞的氧化损伤作用

丁锐, 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 探讨二氯乙烯 (dichloroethylene, DCE) 对体外培养的人皮肤角质形成细胞 (keratinocyte, KC) 的氧化损伤作用。方法 使用 2.800、1.400、0.700、0.350、0.175 mmol/L 的 DCE 对体外培养的人 KC 染毒 4 h, 检测细胞活力和细胞内 MDA、ROS 含量、SOD 活性, 以及线粒体内 8-羟基脱氧鸟嘌呤 (8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-OHdG) 水平。结果 经不同浓度 DCE 作用 4 h 后, 细胞活力无明显改变。随着 DCE 浓度升高, 细胞内 MDA 和 ROS 水平呈上升趋势, 而 SOD 活性呈下降趋势, 与溶剂对照组相比较差异有统计学意义; 线粒体内 8-OHdG 水平也随着 DCE 浓度增加而呈现上升趋势。结论 DCE 对人 KC 有氧化损伤作用。

**关键词:** 角质形成细胞; 二氯乙烯 (DCE); 线粒体 DNA (mtDNA); 8-羟基脱氧鸟嘌呤 (8-OHdG)

中图分类号: R758.22 O623.221 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2011)02-0083-03

Oxidative damage on cultured human keratinocytes induced by dichloroethylene

DING Rui, ZHU Qixing

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

**Abstract:** Objective To explore the oxidative damage on cultured human keratinocytes (KC) induced by dichloroethylene (DCE). Methods Cultured human KC were exposed to 2.800, 1.400, 0.700, 0.350 and 0.175 mmol/L of DCE for 4 hours; then cellular viability, levels of MDA and ROS and activities of SOD in cells, as well as 8-OHdG levels in mitochondria were all determined. Results Compared to the control group, the cellular viability in DCE exposed groups did not significantly change; however, cellular levels of MDA and ROS and 8-OHdG levels in mitochondria were increased significantly, whereas activities of SOD decreased significantly. Conclusion DCE could induce oxidative damage in cultured human KC.

**Key words:** keratinocyte; dichloroethylene (DCE); mitochondria DNA (mtDNA); 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (8-OHdG)

二氯乙烯 (dichloroethylene, DCE) 是聚合塑料生产过程中常见的一种单体, 也是三氯乙烯或四氯乙烯常见的一种分解产物<sup>[1,2]</sup>, 在环境中广泛存在。由于其分子量相对较小, 且具有较强的疏水性, 故有经过皮肤吸收的可能<sup>[3]</sup>。有研究对 DCE 通过免疫反应机制造成皮肤损害进行了探讨, 却得出了阴性结论<sup>[4]</sup>。本次研究以 DCE 作用于体外培养的人皮肤角质形成细胞 (keratinocyte, KC), 探讨其通过氧化损伤引起皮肤细胞损害的可能性。

## 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; DCE 和 MTT 为 Sigma 公司产品, 实验过程中 DCE 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) 和超氧化物歧化酶 (superoxide dis-

mutase, SOD) 试剂盒为南京建成生物研究所产品, 8-羟基脱氧鸟嘌呤 (8-hydroxy-2-deoxyguanosine, 8-OHdG) 试剂盒购自日本 JAIKA 公司。鼠尾胶原根据文献 [5] 的方法制备。

### 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 根据本课题组建立的人皮肤角质形成细胞培养方法进行细胞原代培养<sup>[6]</sup>。待细胞 80% 融合后, 收集细胞, 以  $2 \times 10^5$  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% 融合时用于以下实验。

1.2.2 染毒分组 根据本课题组前期实验结果确定染毒浓度<sup>[7]</sup>。(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) DCE 处理组: KC 与含终浓度为 2.800、1.400、0.700、0.350、0.175 mmol/L DCE 的 DMEM 培养液于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 共同作用 4 h 后, 换入无血清 Keratinocyte-SFM 培养液继续作用至 24 h。

1.2.3 细胞活力测定 将 KC 接种至 96 孔培养板, 将终浓度为 0.5 mg/ml 的 MTT 加至各孔, 并继续培

收稿日期: 2010-09-19 修回日期: 2010-12-03

基金项目: 安徽省教育厅青年教师基金 (2007 JH066)

作者简介: 丁锐 (1979-), 男, 讲师, 研究方向: 职业卫生与职业医学

养 4 h后小心吸去培养液，每孔加入 150 μL 二甲基亚砜 (DMSO)，振荡 10 min 使吸附在细胞上的蓝紫色结晶充分溶解。利用酶标仪测定吸光度，测定波长为 490 nm。以空白对照组细胞活力为 100%，计算各染毒组细胞相对活力<sup>[8]</sup>。

1.2.4 氧化损伤测定 将 DCE处理的 KC破碎后，于 100 000 离心 1 h收集上清，参照试剂盒说明书进行 MDA和 SOD水平的检测。同时按照 Lowry等<sup>[9]</sup>的方法进行蛋白定量，并以蛋白量对检测结果进行校正。

参照 Michala等的方法<sup>[10]</sup>进行活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 的测定。将到达染毒终点的细胞用 PBS迅速冲洗一次，于避光环境下加入终浓度为 40 μmol/L的 2',7-二乙酰二氯荧光素 (2',7-dichlorofluorescein diacetate, DCFH-DA)，37 °C避光孵育 20 min后收集细胞，PBS迅速洗 2次，立即用流式细胞仪进行检测，激发波长 485 nm，发射波长 535 nm。结果用不同浓度 DCE染毒组荧光强度与溶剂对照组荧光强度比值表示。

1.2.5 线粒体 DNA (mtDNA) 损伤的检测 按照 Mecoccc等<sup>[11]</sup>的方法提取出 mtDNA后，向其中加入 DNase I (200 U/mg DNA)、Nuclease P1、碱性磷酸酶 (10 U/mg DNA)、40 mmol/L TrisHCl (pH8.5)、10 mmol/L MgCl<sub>2</sub>，于 37 °C共同孵育 4 h 然后按照试剂盒说明书对 8-OHdG水平进行检测。

1.2.6 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，以 SAS6.12对资料进行统计分析。使用的统计方法为方差分析 (Dunnett's 法)，显著性水平取 P=0.05。

## 2 结果

### 2.1 细胞活力测定

如图 1所示，不同浓度 DCE染毒 4 h后，KC细胞活力呈现浓度依赖的下降趋势。但是方差分析显示，各处理组细胞活力与溶剂对照组差异无统计学意义 (P>0.05 图 1)。

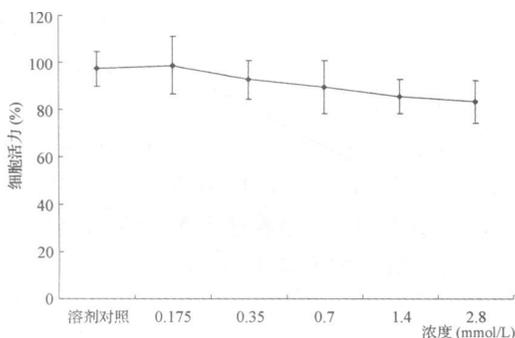


图 1 不同浓度 DCE对体外培养人皮肤 KC细胞活力的影响

### 2.2 脂质过氧化测定

方差分析显示，细胞内 MDA含量和 SOD水平随 DCE浓度改变而呈现相应的变化。当 DCE浓度达 0.350 mmol/L时，DCE处理组与溶剂对照组细胞内 ROS含量及 SOD活性差异有统计学意义 (P<0.05)；而当 DCE浓度达 1.400 mmol/L时，两组间细胞内 MDA含量差异也有统计学意义 (P<0.05)，见表 1。

表 1 不同浓度 DCE对体外培养人皮肤 KC细胞氧化应激作用

DCE浓度 (mmol/L)	n	MDA (nmol/mg Pro)	SOD (U/mg Pro)	ROS (%)
0	5	0.18±0.011	200.06±12.415	99.12±9.795
0.175	5	0.21±0.013	180.09±8.942	98.05±10.913
0.350	5	0.27±0.060	165.25±8.954*	102.41±16.933
0.700	5	0.27±0.044	126.42±10.846**	146.62±14.195**
1.400	5	0.33±0.081*	90.39±21.457**	189.09±25.773**
2.800	5	0.36±0.052**	74.83±6.846**	257.87±15.909**

注：与溶剂对照组比较。\* P<0.05 \*\* P<0.01

### 2.3 活性氧测定

DCFH-DA可以自由穿过细胞膜进入细胞，在细胞内可被酯酶水解而生成 DCFH。DCFH不能透过细胞膜，其在细胞内可被 ROS氧化为有荧光的 DCF。故检测 DCF的荧光强度可代表细胞内 ROS的水平。本次实验利用流式细胞仪对细胞内 DCF荧光强度进行了测定，经方差分析显示，荧光强度随着 DCE浓度增加而呈现上升趋势。当 DCE浓度高于 0.700 mmol/L时，荧光强度为空白对照组的 146%，与溶剂对照组相比差异有统计学意义 (P<0.01 表 1)。

### 2.4 mtDNA损伤检测

线粒体 DNA易受到氧化损伤，产生大量的 8-OHdG。本次研究中，不同浓度 DCE作用于体外培养的人 KC细胞后，线粒体内 8-OHdG含量与溶剂对照组相比出现增加。当 DCE浓度达到 0.700 mmol/L时，线粒体内 8-OHdG含量与溶剂对照组相比差异有统计学意义 (P<0.05 图 2)。

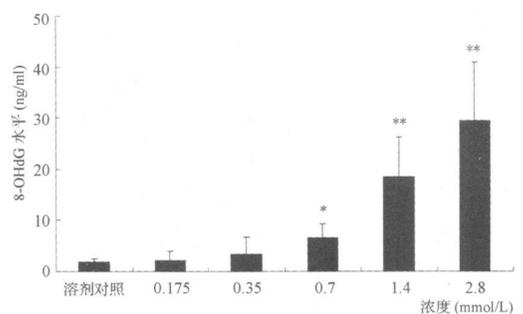


图 2 不同浓度 DCE对体外培养人皮肤 KC细胞 mtDNA的氧化损伤作用

### 3 讨论

DCE的毒性具有明显的组织特异性。目前大量的研究证实其对肝脏、肾脏和肺都具有毒性<sup>[12-13]</sup>，但是关于它皮肤毒性的研究却很少。虽然目前鲜有DCE导致皮肤损害的病例报道，但是由于其较小的分子量和较强的疏水性，DCE有可能经过皮肤吸收造成皮肤损害，甚至可能通过启动作用导致皮肤癌的发生<sup>[14]</sup>。

Warbrick等<sup>[4]</sup>对DCE的皮肤致敏作用进行了研究，但是得出了阴性结果，提示与其他氯代烯烃如三氯乙烯或四氯乙烯不同，DCE通过免疫反应而导致皮肤损害的能力有限。本次研究着重对DCE导致体外培养的人皮肤角质形成细胞氧化损伤进行了研究，试图探讨其通过直接刺激而导致皮肤损害的可能性。

在本次研究中，利用不同浓度DCE染毒4h未见明显的细胞活力改变，说明所使用的剂量不足以直接导致细胞死亡，这与工业生产或日常生活中较低剂量接触类似。对细胞内氧化损伤水平检测发现，细胞内MDA和ROS水平均有所上升，而SOD水平有所下降，且与溶剂对照组相比差异有统计学意义，这说明在此不直接引起细胞活性改变的剂量接触下，即可导致细胞内氧化损伤的发生。提示长期接触DCE有可能通过功能蓄积而导致皮肤的慢性损害，甚至导致皮肤癌的发生<sup>[14]</sup>。

氧化应激还有可能造成线粒体DNA(mDNA)的氧化损伤。由于线粒体是ROS产生的场所，一旦产生可直接对mDNA造成氧化损伤<sup>[15]</sup>，而线粒体内又缺乏有效的保护机制，其DNA损伤修复作用也比较弱<sup>[16]</sup>，因此mDNA更易受到氧化损伤的攻击。8-OHdG是mDNA发生氧化损伤后生成的一种常见的物质<sup>[17]</sup>，对其含量的检测可以反映mDNA的氧化损伤程度。本次研究的结果显示，不同浓度的DCE可导致体外培养的人KC细胞线粒体内8-OHdG大量生成，进一步论证了DCE可通过氧化损伤而造成皮肤细胞的损害。

综上所述，DCE接触可引起体外培养的人皮肤KC细胞氧化应激水平上升。人们在日常生活或职业接触DCE后，虽然不一定会迅速发现皮肤损害，但是有可能通过诱导活性氧等物质的产生而造成慢性皮肤损害。

### 参考文献:

[1] ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Toxicological profile for 1,1-dichloroethylene [R]. ATSDR 1994 Atlanta, GA

- [2] U.S. EPA (Environmental Protection Agency). Toxicological review of 1,1-dichloroethylene in support of summary information on the integrated risk information system (IRIS) (CAS No. 75-35-4 EPA/635/R02/002) [R]. 2002 Washington, DC
- [3] WHO (World Health Organization). 1,1-dichloroethene (vinylidene chloride) [R]. WHO 2003 Geneva
- [4] Warbrick E V, Deaman R J, Ashby J, et al. Preliminary assessment of the skin sensitizing activity of selected rodent carcinogens using the local lymph node assay [J]. *Toxicology* 2001; 163: 63-69.
- [5] 鄂征. 组织培养和分子细胞技术 [M]. 北京: 北京出版社, 1995: 56
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Mossman T. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. *Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.
- [9] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent [J]. *J Biol Chem* 2001; 193 (2): 265-275.
- [10] Michal A, Avch A F, Yael C. Active oxygen chemistry within the liposomal bilayer Part IV: Locating 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF), 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein (DCFH) and 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate [J]. *Chemistry and Physics of Lipids* 2004; 131: 123-133.
- [11] Mecucci P, MacGarvey U, Beal M F. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease [J]. *Ann Neurol* 1994; 36: 747-751.
- [12] Cavalier L, Bonnet P, Morel G, et al. Role of cysteine conjugation in vinylidene chloride induced nephrotoxicity and hepatotoxicity in fasted rats [J]. *Journal of Applied Toxicology* 1996; 16: 109-113.
- [13] Dowsley T F, Ulich J B, Bolton J L, et al. CYP2E1-dependent bioactivation of 1,1-dichloroethylene in murine lung: formation of reactive intermediates and glutathione conjugates [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology* 1996; 139: 42-48.
- [14] Van Duuren B L, Goldschmidt B M, Loewengart G, et al. Carcinogenicity of halogenated olefinic and aliphatic hydrocarbons in mice [J]. *Journal of the National Cancer Institute* 1979; 63: 1433-1439.
- [15] Liang F Q, Godley B F. Oxidative stress induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: a possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration [J]. *Exp Eye Res* 2003; 76: 397-403.
- [16] Cooke M S, Evan M D, Dizdarevic R J, et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation and disease [J]. *FASEB J* 2003; 17: 1195-1214.
- [17] Dizdarevic M, Janga P, Bjirncogev M, et al. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement [J]. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1102-1115.