

结果基本一致,表明在所选剂量下,DNTF未改变小鼠染色体的完整性。而Ames试验所反映的遗传学终点是DNA碱基序列的改变,本次试验结果为阴性,表明在所选择的剂量水平下,DNTF不会引起DNA碱基序列的改变。表明DNTF为非遗传毒物,因此对接触人员不会产生突变性。由于DNTF是一种新型的高能量密度化合物,是否具有致癌性,有待进一步的人体试验和流行病学调查研究。

参考文献:

- [1] 郑伟,王江宁,韩芳,等. DNTF-CMDB推进剂的化学安定性[J]. 火炸药学报,2010,33(4):10-13.
- [2] 胡焕性,张志忠,赵凤起,等. 高能量密度材料3,4-二硝基咪唑基氧化咪唑性能及应用研究[J]. 兵工学报,2004,25(2):155-158.
- [3] 李寿祺. 卫生毒理学基本原理和方法[M]. 成都:四川科学技术出版社,1987:68,499-505.

豚鼠染毒三氯乙烯后淋巴细胞凋亡基因表达水平的改变

Change of expression level of lymphocytic apoptosis gene in GP after exposure to TCE

陈红锋,甘露,蔡日东,刘灵辉

CHEN Hong-feng, GAN Lu, CAI Ri-dong, LIU Ling-hui

(深圳市宝安区福永预防保健所,广东深圳 518103)

摘要:将18只豚鼠随机分为3组,采用豚鼠最大值试验法(GPMT),设立TCE实验组、阴性对照组、阳性对照组,用皮内注射的方式分别注射三氯乙烯(TCE)、橄榄油、2,4-二硝基氯苯(DNCB)。并收集豚鼠外周血和脾淋巴细胞,用Real-time荧光定量PCR检测凋亡基因表达水平。TCE实验组和阳性对照组动物出现明显皮肤损害。TCE实验组和阳性对照组脾淋巴细胞Bax、Bad、Bcl-2的mRNA表达水平比阴性对照组显著升高($P < 0.01$);但TCE实验组和阳性对照组外周血淋巴细胞Bax、Bad、Bcl-2的mRNA表达水平与阴性对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示三氯乙烯可诱导豚鼠产生明显的迟发型皮肤变态反应,致豚鼠脾淋巴细胞凋亡基因表达水平发生明显改变。

关键词:三氯乙烯;豚鼠;外周血;脾;淋巴细胞;凋亡基因

中图分类号:R994.3 文献标识码:B

文章编号:1002-221X(2011)06-0447-03

三氯乙烯药疹样皮炎的报道较多,但其毒性作用的具体机制目前尚不完全清楚。本实验拟通过观察三氯乙烯引起豚鼠明显皮肤改变,并检测脾和外周血淋巴细胞的凋亡基因表达,探讨三氯乙烯的免疫毒性机制,为预防控制三氯乙烯的职业危害提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器设备

三氯乙烯购于美国Sigma公司,纯度大于99.5%;阳性对照组2,4-二硝基氯苯(DNCB)购于天津市光复精细化工研究所;橄榄油及福氏完全佐剂(FCA)(美国Sigma公司);淋巴细胞分离液EZ-Sep™(深圳达科为生物技术有限公司);

淋巴细胞总RNA提取试剂盒Trizol Reagent(美国Invitrogen公司);反转录及SYBR Green Q-PCR试剂盒DRR063A(大连宝生物公司)。凋亡基因Bax、Bad、Bcl-2的PCR引物由TaKaRa生物公司合成。MX4000型荧光定量PCR仪(美国Stratagene公司)。

1.2 实验动物及分组处理

取18只健康成年雌性豚鼠,体重250~280g,购自广东省医学实验动物中心,随机分为3组,每组6只,动物自由进食饮水。采用豚鼠最大值试验法(GPMT)^[6]。阴性对照组用橄榄油,阳性对照组用0.125% DNCB和福氏完全佐剂等量混合物,TCE实验组用5% TCE(TCE:橄榄油=5:95)。实验第1天各组动物皮内注射进行第一次致敏,第8天涂皮诱导,第15天涂皮激发。末次激发后24h,观察和记录受试区的皮肤反应情况,按下列标准对皮肤反应进行评分:红斑根据大小记0~4分,水肿根据严重程度记0~3分。

1.3 动物脾淋巴细胞分离

应用淋巴细胞分离液分离脾淋巴细胞,在平皿中加入4ml EZ-Sep™淋巴细胞分离液,将脾脏通过70 μm细胞过滤网研磨过滤到EZ-Sep™淋巴细胞分离液中,然后将含有脾脏淋巴细胞的分离液移入15ml离心管内,缓慢加入500 μl RPMI1640培养基,使液面分层明显。室温下水平离心机中3000 r/min离心30 min,吸出淋巴细胞层,再加入10ml 1640培养基,颠倒洗涤。然后室温下1800 r/min离心15 min收集细胞;倾倒入上清,用1ml 1×PBS重悬细胞,移入1.5ml离心管内,1200 r/min离心10 min,倾倒入上清后加入1ml Trizol, -80℃冰箱保存。

1.4 提取外周血淋巴细胞

取豚鼠抗凝外周血2~4ml,用RPMI 1640培养基稀释1倍;取3ml EZ-Sep™淋巴细胞分离液置于15ml离心管内,向该离心管内缓缓加入2~3ml稀释的抗凝外周血,使得淋巴细胞分离液与外周血之间有明显的分层。其余步骤同脾淋巴细胞提取。

1.5 实时荧光定量PCR测定mRNA表达水平

收稿日期:2011-08-15

基金项目:深圳市科技计划项目(项目编号:200602177)

作者简介:陈红锋(1953—),男,副主任医师,从事公共卫生和疾病预防控制工作。

本实验包括提取总 RNA、将 RNA 反转录成 cDNA, 然后用实时荧光定量 PCR 方法测定凋亡基因 mRNA 表达, 共 3 个步骤。第一步: 取脾和外周血淋巴细胞, 加入 1 ml TRIzol 试剂, 按 TRIzol 试剂盒说明书提取总 RNA。第二步: 用 RNA 反转录成 cDNA, 按照 Takara 公司 RT-PCR 试剂盒说明书配制 RT 反应体系 (40 μ l): 5 \times PrimeScript Buffer 8 μ l, PrimeScript RT Enzyme Mix \times 1 2 μ l, Oligo dT Primer (50 μ mol/L) 2 μ l, Random 6 mers (100 μ mol/L) 2 μ l, 总 RNA 0.2 μ g, 加 RNase Free dH₂O 至 40 μ l。反转录条件: 37 $^{\circ}$ C 15 min, 85 $^{\circ}$ C 5 s, 4 $^{\circ}$ C 10 min, -20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。第三步: 使用 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒, 按照试剂盒说明书配制 PCR 反应体系 25 μ l。Bcl-2、Bax、Bad 和 β -actin 序列如下, Bcl-2: 5'-TGAACCGGCATCTGCACAC-3' (Up), 5'-CGTCTTCAGAGACAGCCAGGAG-3' (Down); Bax: 5'-GCAAAGTGGTGTCAAGG-3' (Up), 5'-TTCTTCCAGATGGTGAGC-3' (Down); Bad: 5'-GCTGACGTGGACACGGAC-3' (Up), 5'-TAGTGCACAGGGCCT-TGA-3' (Down)。 β -actin: 5'-TAAAGACCTCTATGCCAACACAG-3' (Up), 5'-CACGATGGAGGGCCGGACTCATC-3' (Down)。反应条件, Bcl-2 基因: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s, 1 cycle, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火延伸 30 s, 40 cycles。Bax 和 Bad 基因: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s, 1 cycle; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 58 $^{\circ}$ C 退火延伸 30 s, 40 cycles。

1.6 统计方法

所获得的实验数据用均值 \pm 标准差表示, 采用 SPSS13.0 软件分析, 用单因素方差分析 (ANOVA) 和 *t* 检验进行组间差异比较, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TCE 引起豚鼠皮肤致敏反应

豚鼠经皮肤染毒三氯乙烯后, 观察动物皮肤改变, 按照皮肤刺激反应评价标准对阴性对照组、阳性对照组和 TCE 实验组动物皮肤改变进行记录。结果显示: 阳性对照组 6 只动物均出现皮肤红斑及水肿反应, 致敏率为 100%; 阴性对照组动物皮肤未出现红斑和水肿, 致敏率为 0; TCE 实验组 5 只出现明显皮肤改变, 致敏率为 83.3%, TCE 实验组和阴性对照组比较差异有统计学意义。

2.2 凋亡基因 mRNA 表达水平的改变

用 β -actin 作为内参, 将豚鼠脾和外周血淋巴细胞的阴性对照组 Bcl-2、Bax 和 Bad 的 mRNA 表达分别设为 1, 阳性对照组和 TCE 实验组 Bcl-2、Bax 和 Bad 的 mRNA 表达量以相应的对照组比较进行计算。结果显示, 阳性对照组和 TCE 实验组豚鼠脾淋巴细胞 Bcl-2、Bax 和 Bad 的 mRNA 表达水平比阴性对照组显著升高 ($P < 0.01$); 但外周血淋巴细胞 Bcl-2、Bax 和 Bad 的 mRNA 表达水平和阴性对照组比较差异无统计学意义。

3 讨论

三氯乙烯是目前常用的有机溶剂之一, 在工业上应用非常广泛。最近十多年来我国广东等沿海地区常发生接触三氯乙烯引起严重皮肤和肝脏损害的病例, 对职业接触者健康造

成严重危害。早期阶段该疾病有多个名称, 上世纪八九十年代通常称之为“三氯乙烯中毒”, 后来因为该疾病出现皮肤损害非常明显, 而且与药疹样皮炎相似, 故称为“三氯乙烯药疹样皮炎”。皮肤损害是三氯乙烯药疹样皮炎病人的特征性改变, 一般在接触 TCE 2~5 周后发病, 脸部和四肢躯干等处皮肤出现红斑、皮疹、水疱, 根据病情分为大疱性皮炎、剥脱性皮炎和大疱性表皮坏死性松懈症^[1-4]。该病的另一个特点是初次接触 TCE 时并不引起皮肤反应, 经过一定潜伏期后再接触 TCE 时则很快在接触部位发生改变^[2,3]。

基于鼠类具有与人类 98% 以上相同的基因, 豚鼠是最佳的实验对象。故本实验以豚鼠为受试对象, 采用豚鼠最大值试验。GPMT 是国内外评价化学品皮肤致敏作用的常用方法, 国外学者使用 GPMT 研究彩色显影剂的接触变态反应和 β -内酰胺抗生素是否具有潜在抗原性^[7,8]。我国也将 GPMT 方法用于工业化学物质和化妆品的皮肤致敏试验, 卫生部颁布的《化妆品卫生规范》2007 年版就采用 GPMT 试验^[6]。本研究通过背部皮内注射 TCE 染毒使豚鼠致敏, 观察到 TCE 实验组豚鼠背部出现皮肤红斑和水肿的皮肤损害, 说明本实验获得的 TCE 致豚鼠皮肤发生迟发型超敏反应动物模型是成功的。

由于只有少数三氯乙烯接触者发生严重的皮肤变态反应损害, 我们推测该疾病属于迟发型超敏反应, 可能与淋巴细胞的基因表达和调控有关。本文主要探讨三氯乙烯染毒后豚鼠脾和外周血淋巴细胞凋亡基因 Bcl-2、Bax 和 Bad 的表达水平是否发生改变。细胞凋亡是指为维持内环境稳定, 由基因控制的细胞自主的程序性死亡, 与机体发育、组织自稳定、自身免疫疾病和神经退行性疾病的发生密切相关。根据 Bcl-2 家族成员结构和功能的不同, 可将 Bcl-2 分为抑制凋亡的家族成员 (Bcl-2, Bcl-x1 等) 和促进凋亡的家族成员 (Bax, Bad 等), 这两类物质相互结合彼此抑制, 往往由其数量的相对多少决定凋亡发生与否。Bax 与 Bcl-2 可形成异源二聚体, Bax 被称为死亡激动剂, 当 Bax 超表达时, 细胞凋亡增多, 而当 Bcl-2 超表达时, 它与 Bax 形成异源二聚体, 细胞凋亡被抑制^[9-11]。本实验结果表明, TCE 染毒后豚鼠脾淋巴细胞凋亡基因 Bcl-2、Bax、Bad 的 mRNA 表达明显升高, 与阴性对照组比较差异有统计学意义; 但 TCE 染毒对外周血淋巴细胞凋亡基因表达水平无明显改变。

根据越飞等对 TCE 的研究发现^[12], TCE 对未致敏小鼠脾细胞是抑制的, 且随 TCE 浓度的升高抑制作用增强。而在致敏小鼠 TCE 可以促进脾细胞增殖, 呈现剂量-效应趋势。这提示 TCE 可能诱导小鼠的迟发性变态反应, 再次接触 TCE 时刺激致敏淋巴细胞增殖。研究还发现, TCE 可以引起 NIH 小鼠足趾肿胀以及脾细胞增殖, 提示 TCE 可能是一种引起迟发性变态反应的抗原。该研究对本实验提供了一个有益的佐证。TCE 引起豚鼠皮肤出现迟发型皮肤超敏反应, 是否与某些淋巴细胞凋亡基因表达水平发生变化有关, 值得进一步探讨。

参考文献:

- [1] XU Xinyun, YANG Rongxing, WU Nan, *et al.* Severe hypersensitivity dermatitis and liver dysfunction induced by occupational exposure to

- trichloroethylene [J]. *Ind Health*, 2009, 47 (2): 107-112.
- [2] XU Xinyun, WU Peiqiao, KE Yuebin, *et al.* Oxidative stress and inducible nitric oxide synthase expression in human hepatocytes treated with trichloroethylene [J]. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 2010, 92 (4): 801-811.
- [3] 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.
- [4] Goon A T, Lee L T, Tay Y K, *et al.* A case of trichloroethylene hypersensitivity syndrome [J]. *Arch Dermatol*, 2001, 137 (3): 274-276.
- [5] Nakajima T, Yamanoshita O, Kamijima M, *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.
- [6] 赵同刚. 化妆品卫生规范 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2007: 116-120.
- [7] Liden C, Boman A. Contact allergy to color developing agents in the guinea pig [J]. *Contact Dermatitis*, 1988, 19 (4): 290-295.
- [8] Hattori H, Yamaguchi F, Wagai Ni, *et al.* An assessment of antigenic potential of β -lactam antibodies, low molecular weight drugs using guinea pig models [J]. *Toxicology*, 1997, 123 (1-2): 149-160.
- [9] Yokoyama T, Tanahashi M, Kobayashi Y, *et al.* The expression of Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak and Bim) in human lymphocytes [J]. *Immunol Lett*, 2002, 81 (2): 107-113.
- [10] Kaufmann T, Schlipf S, Sanz J, *et al.* Characterization of the signal that directs Bcl-xL, but not Bcl-2, to the outer mitochondrial membrane [J]. *J Cell Biol*, 2003, 160 (1): 53-64.
- [11] Cory S, Adams J M. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2 (9): 647-656.
- [12] 越飞, 李来玉, 梁丽燕, 等. 三氯乙烯染毒小鼠免疫功能变化研究 [J]. *中国职业医学*, 2004, 31 (3): 24-25.

亚砷酸钠对 HaCat 细胞活力及磷酸化蛋白激酶 B 表达的影响

Effect of sodium arsenite on cell viability and phosphorylated protein kinase B expression in HaCat cells

李昕, 刘世宜, 崔琰, 李冰, 孙贵范

LI Xin, LIU Shi-yi, CUI Yan, LI Bing, SUN Gui-fan

(中国医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 辽宁省砷生物学作用评价及砷中毒防治重点实验室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 为探讨亚砷酸钠 (NaAsO_2) 对人角质形成细胞 (HaCat) 活力及蛋白激酶 B (PKB/Akt) 磷酸化活化的影响, 本研究以 Alamar Blue 还原法检测 NaAsO_2 (0, 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 HaCat 细胞 6 h 后细胞的活力水平; 并以 Western blot 法检测 NaAsO_2 (0, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 HaCat 细胞 6 h 后细胞中磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt) 的蛋白表达情况。结果表明, NaAsO_2 作用 6 h, Alamar Blue 还原率随 NaAsO_2 染毒剂量的升高而显著下降, 具有显著的剂量-效应关系; NaAsO_2 染毒组细胞内 p-Akt 表达水平与对照组相比均显著提高, 提示砷性肿瘤的发生可能与 p-Akt 蛋白表达水平增高有关。

关键词: 亚砷酸钠 (NaAsO_2); HaCat 细胞株; 蛋白激酶 B (PKB/Akt)

中图分类号: R994.6 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2011)06-0449-03

砷是经国际癌症研究总署 (IARC) 研究确定的人类致癌物, 长期接触可引起肺癌和皮肤癌。砷作为一种致癌物具有其特殊性, 它是 IARC 确认致癌物中仅有的 2 种未能在动物中复制出致癌模型物质。因此, 大多数探讨砷致肿瘤发生机

制的实验研究主要是从砷对培养细胞的影响入手。目前研究认为, 砷本身不具有致突变作用, 而是通过影响细胞内某些信号转导通路、诱导癌基因表达等途径发挥致癌效应^[1,2]。

蛋白激酶 B (PKB/Akt) 是一个参与细胞生长及代谢的重要激酶, 其磷酸化活化与多种肿瘤的发生关系密切。目前, 关于 PKB/Akt 对于砷致皮肤癌发生过程中的作用方面尚缺乏详细报道。因此, 本研究利用正常人皮肤角质形成细胞 HaCat 细胞株进行研究, 探讨 NaAsO_2 对 HaCat 细胞 PKB/Akt 磷酸化活化的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

NaAsO_2 (纯度 $\geq 99.0\%$, 美国 Fluka 公司); DEME 培养基 (美国 Hyclone 公司); 胰蛋白酶 (美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (FBS, 美国 Hyclone 公司); Alamar Blue (美国 Sigma 公司); Bio-Rad 蛋白测定试剂盒 (美国 Bio-Rad 公司); PVDF 膜 (美国 Millipore 公司); Akt [(C-20): sc-1618], p-Akt [(ser473-R): sc-7985-R] 及 β -actin (I-19: sc-1616) 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (ZB-2301, 中杉金桥公司); ECL 显色剂 (美国 Pierce 生物技术公司); 预染蛋白 marker (美国 Fermentas 公司)。

超净工作台 (SW-CJ-1FD, 中国苏净集团安泰公司); CO_2 恒温培养箱 (Hera cell 150, 荷兰 Heraeus 公司); 全自动酶标仪 (Labsystems Multiskan Ascent 354, 芬兰 Labsystems 公司); Western bolt 装置 (Mini, 美国 Bio-Rad 公司); 电泳凝胶成像分析仪 (IMAGER 5500, 美国 ALPHA 公司)。

收稿日期: 2011-06-22; 修回日期: 2011-07-13

基金项目: 辽宁省教育厅课题 (L2010705): PI3K-PKB/AKT 信号通路在砷致肿瘤发生中的机制研究

作者简介: 李昕 (1975—), 女, 博士, 副教授, 从事砷的生物学作用及砷中毒防治的研究, E-mail: lixin@mail.cmu.edu.cn.