·实验研究·

三氯乙烯致敏小鼠体内补体 C3、C4b 表达水平研究

Changes of complements C3 and C4b expression in trichloroethylene-sensitized BALB/c mice

张家祥[1]，查晚生[1]，王峰[1]，江涛[1]，许述海[1]，沈彤[2]，朱启星[1,2]

ZHANG Jia-xiang[1]，ZHA Wan-sheng[1]，WANG Feng[1]，JIANG Tao[1]，XV Shu-hai[1]，SHEN Tong[2]，ZHU Qi-xing[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. 安徽医科大学第一附属医院皮肤研究所，安徽 合肥 230032）

摘要： 选取 75 只雌性健康 BALB/c 小鼠，随机分成空白对照组、溶剂对照组、TCE 处理组。TCE 处理组小鼠致敏率达 36.5%。24 h、48 h、72 h、7 d 致敏组血清 C3a-desArg、C4b 浓度与空白对照组、溶剂对照组及相对应的未致敏组相比有明显升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）。通过 RT-PCR 检测，灰度值分析显示 24 h、48 h 致敏组与空白对照组、溶剂对照组、相应未致敏组相比 C3、C4b mRNA 表达明显增强（$P<0.05$），但 72 h 致敏组 C3、C4b mRNA 有明显的降低（$P<0.05$）。提示 TCE 对于 BALB/c 小鼠皮肤有致敏作用，TCE 致敏组小鼠可能存在一定程度的补体活化。

关键词： 三氯乙烯；BALB/c 小鼠；补体；C3；C4

中图分类号： R992；O623.221 **文献标识码：** B

文章编号： 1002－221X(2013)01－0035－03

三氯乙烯（trichloroethylene，TCE）是工业上广泛使用的一种有机溶剂，并且短期内未找到替代品[1]。在我国职业性三氯乙烯药疹样皮炎（DMLT）已成为 TCE 接触工人健康危害的突出问题。DMLT 的发病机制目前不是很清楚，有研究发现 TCE 可以引起急性中毒性肝损伤和免疫介导的肝损伤，皮炎的发生和肝损伤有一定的相关性[2,3]。肝脏是补体产生的重要器官，补体是机体天然免疫系统的重要分子物质，补体被激活产生活化物质形成级联反应引起补体成分的相互作用，补体系统活化途径目前已知的有 3 条[4]。C3 和 C4 在补体系统激活过程中起着关键的作用。本研究通过整体动物实验的方法，检测 TCE 处理小鼠血清中 C3a-desArg、C4b 数量的变化，以及采用 RT-PCR 检测肝脏组织中 C3、C4b 的基因表达情况，为进一步阐明三氯乙烯致药疹样皮炎的机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

体重（28.80±2.57）g 清洁级雌性白色健康 BALB/c 小鼠 75 只（湖南长沙斯莱克动物养殖有限公司），三氯乙烯（TCE，美国 Acros Organic 公司）、弗氏完全佐剂（FCA，美国 Sigma 公司），橄榄油（中国医药上海化学试剂公司），酶联免疫吸附法（ELISA）试剂盒（美国 Rapidbio 公司），RT-PCR 反转录试剂盒（欧盟 Fermentas 公司），TRIzol（美国 Invitrogen 公司），PCR 扩增试剂盒（北京 Tiangen 公司）；引物（上海生工生物有限公司），PCR 仪（德国 Biometra 公司），电泳、电转移系统、Tanon 凝胶成像系统（美国 Bio-RAD 公司），Universal 320/320R 型低温高速离心机（德国 Hettich 公司），μQuant 酶标仪（美国 Bio-Tek 公司），Tanon 凝胶图像分析系统（安徽医科大学第一附属医院中心实验室提供）。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及致敏模型的建立 6～8 周清洁级雌性健康 BALB/c 小鼠，经适应性饲养一星期后，随机分为空白对照组、溶剂对照组、TCE 处理组。参考豚鼠最大值试验（guinea pig maximization test，GPMT），结合国外小鼠致敏模型[5]，建立 TCE 诱导的 BALB/c 小鼠致敏模型。TCE 处理组动物，实验前 24 h 去除动物腹部毛发，第 1 天腹部皮内注射 50% TCE 与等量 FCA 的混合液 100 μl，进行初次致敏；于第 4、7、10 天进行 3 次腹部皮肤涂抹 100 μl 的 50% TCE（TCE∶橄榄油∶丙酮＝5∶2∶3）致敏；第 17、19 天于背部皮肤涂抹 100 μl 的 30% TCE（TCE∶橄榄油∶丙酮＝3∶2∶5），进行初次激发和末次激发。溶剂对照组用不含 TCE 的与致敏和激发试剂相同比例的橄榄油和丙酮混合物，空白对照组不做任何处理。24 h 后观察记录动物皮肤反应情况，将 TCE 处理组小鼠分为致敏组和未致敏组。并于末次激发后的相应时点进行眼静脉丛取血，无菌取皮肤和肝脏组织。结合皮肤致敏情况和取材时点的不同，将小鼠分为致敏 24 h、48 h、72 h、7 d 组和未致敏 24 h、48 h、72 h、7 d 组。按红斑大小记 0～4 分、水肿严重程度记 0～3 分的标准对皮肤反应进行评分，当小鼠皮肤反应积分≥1 时即判为皮肤致敏反应阳性。

1.2.2 血清中 C3a-desArg、C4b 浓度检测 眼静脉丛取血后，3 000 r/min 离心 15 min（离心半径 87 mm），取血清，采用酶联免疫吸附法（ELISA），操作按试剂盒（购自美国 Rapidbio 公司）说明书进行。

1.2.3 肝脏组织 C3、C4b 基因 mRNA 表达 采用 TRIzol 法按说明书操作步骤提取各组 BALB/c 小鼠肝脏细胞的总 RNA。以 RNA 为模板，按照反转录试剂盒说明书进行反转录合成 cDNA，然后对新合成的 cDNA 进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 产物，使用凝胶图像分析系统分析结果，各组动物 C3/GAPDH、C4b/GAPDH 的条带灰度比值作为统计数据分

收稿日期：2012－07－25；修回日期：2012－09－28

基金项目：国家自然科学基金资助项目（38072147）

作者简介：张家祥（1985—），男，硕士研究生，研究方向：职业毒理学。

通讯作者：朱启星，教授，博士生导师，E-mail：zqxing@yeah.net。

析 mRNA 表达情况。见表 1。

1.2.4 统计学处理 数据应用 SPSS 11.0 软件分析，所有计量资料均以（$\bar{x} \pm s$）表示，组间差异采用单因素方差分析，组间比较采用最小显著差数法（LSD 法），$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 基因 RT-PCR 引物序列及 PCR 反应条件

基因	正向引物（5′-3′）	反向引物（5′-3′）	产物	退火温度（℃）	循环数
C3	tacaacgtagaggccacatcc	gcaggtgactttgcttttgag	393	60.0	35
C4b	ggcttcctgattctatgaccac	actcacagccacatcatcattc	206	60.0	35
GAPDH	aggccggtgctgagtatgtc	tgcctgcttcaccaccttct	460	58.7	35

2 结果

2.1 小鼠致敏情况

激发后空白对照组及溶剂对照组背部皮肤均未发现红斑和水肿，TCE 处理组 63 只小鼠中有 23 只背部皮肤出现不同程度的红斑和水肿，小鼠致敏率达 36.5%，致敏强度为中度。

2.2 血清 C3a-desArg、C4b 浓度检测

激发后 TCE 处理组中，24 h、48 h、72 h、7 d 致敏组血清 C3a-desArg 浓度明显高于空白对照组及溶剂对照组，差异有统计学意义（$P < 0.05$）；各组别中致敏组浓度明显高于未致敏组，差异有统计学意义（$P < 0.05$）；且 48 h、72 h 致敏组与 7 d 致敏组相比也有明显差异（$P < 0.05$）。24 h、48 h、72 h 致敏组血清 C4b 浓度与空白对照组、溶剂对照组比较有明显升高，差异有统计学意义（$P < 0.05$），7 d 致敏组与空白对照组、溶剂对照组相比差异无统计学意义（$P > 0.05$）；同时，24 h、48 h、72 h 致敏组与其相对应的未致敏组相比，血清 C4 浓度明显升高（$P < 0.05$）。详见表 2。

2.3 肝脏组织中 C3、C4b mRNA 表达

应用 RT-PCR 技术检测各组小鼠肝脏组织中 C3、C4b mRNA 表达情况，灰度值分析显示 24 h、48 h 致敏组与空白对照组、溶剂对照组、各自未致敏组相比 C3 mRNA 表达明显增强（$P < 0.05$），但是 72 h 致敏组 C3 mRNA 有明显的降低，差异有统计学意义（$P < 0.05$），7 d 致敏组表达无统计学意义（$P > 0.05$）。同时，24 h、48 h 致敏组肝脏组织 C4b mRNA 表达与空白对照组、溶剂对照组、各自未致敏组相比明显升高，差异有统计学意义（$P < 0.05$），72 h 致敏组 C4b mRNA 表达与空白对照组及溶剂对照组相比明显降低（$P < 0.05$），7 d 致敏组表达无统计学意义（$P > 0.05$）。详见表 2、图 1。

表 2 不同组别 TCE 致敏小鼠血清 C3a-desArg、C4b 浓度及灰度值 C3/GAPDH、C4b/GAPDH 的变化（$\bar{x} \pm s$）

组别	动物数	血清（ng/L）		灰度值	
		C3a-desArg	C4b	C3/GAPDH	C4b/GAPDH
空白对照组	6	62.47 ± 6.04	181.05 ± 51.64	0.81 ± 0.07	0.66 ± 0.08
溶剂对照组	6	66.10 ± 9.28	182.64 ± 36.88	0.78 ± 0.03	0.73 ± 0.13
24 h 致敏组	6	83.24 ± 3.18^{abc}	311.05 ± 19.58^{abcd}	1.15 ± 0.09^{abc}	0.85 ± 0.12^{abc}
24 h 未致敏组	9	60.35 ± 6.50	176.84 ± 35.16	0.75 ± 0.10	0.74 ± 0.13
48 h 致敏组	6	86.47 ± 5.66^{abcd}	360.80 ± 24.26^{abcd}	1.20 ± 0.13^{abc}	0.89 ± 0.09^{abc}
48 h 未致敏组	10	60.98 ± 6.64	135.24 ± 40.70	0.93 ± 0.17	0.70 ± 0.05
72 h 致敏组	6	87.35 ± 9.81^{abcd}	375.36 ± 30.83^{abcd}	0.47 ± 0.07^{abc}	0.42 ± 0.06^{abcd}
72 h 未致敏组	10	69.46 ± 5.68	172.53 ± 43.59	1.08 ± 0.14	0.62 ± 0.03
7 d 致敏组	5	75.95 ± 5.38^{ab}	227.59 ± 21.48	1.09 ± 0.09	0.55 ± 0.10
7 d 未致敏组	11	69.61 ± 6.27	238.96 ± 26.21	0.66 ± 0.16	0.73 ± 0.15

注：a，与空白对照组相比，$P < 0.05$；b，与溶剂对照组相比，$P < 0.05$；c，与相应未致敏组相比，$P < 0.05$；d，与 7 d 致敏组相比，$P < 0.05$。

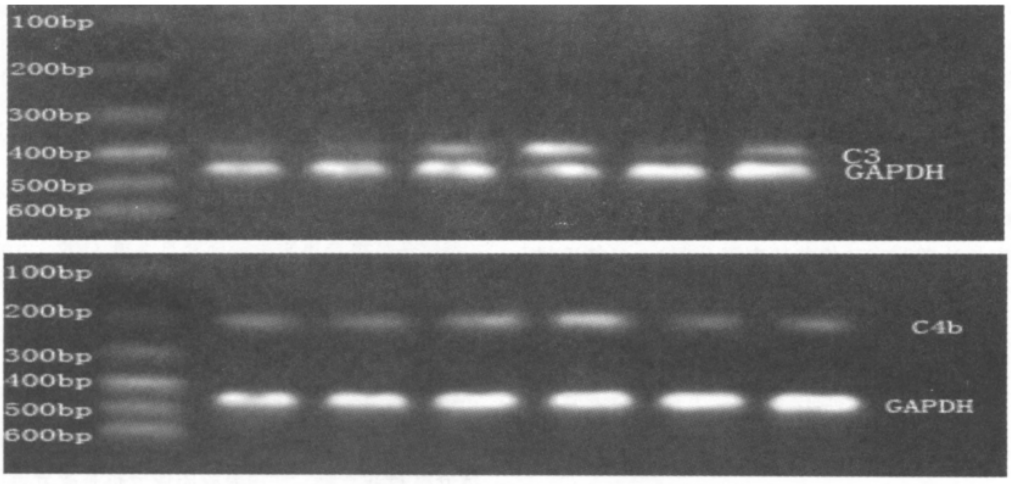

图 1 TCE 致敏小鼠各组肝脏细胞 C3、C4b mRNA 表达

3 讨论

近年来职业性 DMLT 是严重危害作业工人的职业病，一些研究发现患者出现的肝脏损伤会有补体在内的免疫性指标异常，提示 DMLT 的发病过程中补体激活可能起着重要的作用。肝脏是补体产生的重要器官，约 90% 的 C3 是由肝脏产生。C3 经 3 个途径均活化为 C3a 及 C3b，C3a 在体内迅速转换为 C3a-desArg，C3b 与其他补体成分一起经一系列步骤形成攻膜复合物 C5b-9[6]。C4 经活化途径活化后转化为 C4a 及 C4b，本研究以 C4b 的基因表达反应 C4 的基因表达情况。

越飞[7]等发现 DMLT 患者治疗前体内补体含量明显低于治疗后，认为 DMLT 患者病程中可能存在补体活化，从而导致肝脏损伤。本课题组的前期研究发现 TCE 致敏豚鼠肝脏有一定的损伤，且血清中补体 C3、C4 含量降低，补体系统可能被激活。本研究发现 TCE 致敏组小鼠血清 C3a-desArg、C4b 浓度在 24 h 开始升高，与空白对照组、溶剂对照组及相应未致敏组相比差异有明显统计学意义。提示此阶段 C3、C4 可能处于活化状态，7 d 致敏组小鼠血清 C3a-desArg、C4b 开始降低，其中 C4b 已降低到正常水平，这与本实验室前期的肝脏损伤研究一致[8]。

RT-PCR 研究发现 TCE 处理组小鼠中，24 h、48 h 致敏组 C3、C4b mRNA 表达升高，灰度值统计分析差异有统计学意义（$P<0.05$），提示此时肝脏中补体产生量应该增加；但在前期的各项研究中血清补体浓度都明显降低，提示在此阶段可能存在一定程度的补体活化。本研究发现在 TCE 致敏72 h 组 C3、C4b mRNA 表达明显降低。本课题组前期研究发现 72 h致敏组肝脏损伤最严重，提示 C3、C4b mRNA 表达的降低可能与肝脏的损伤程度有关。7 d 致敏组 C3、C4b mRNA 表达恢复至正常水平，这与 ELISA 检验结果相一致。

综上所述，本研究通过整体动物实验方法，检测血清中 C3a-desArg 及 C4b 的浓度及肝脏组织中 C3 及 C4b mRNA 表达，进一步为 TCE 致敏小鼠体内补体激活提供证据。但补体活化在三氯乙烯药疹样皮炎的病程中起什么样的作用，其具体的作用机制是什么，如激活的补体最后形成膜攻击复合物 C5b-9（MAC）[9]，MAC 是否在肝脏损伤中起到一定的作用，还需要做进一步的研究。

参考文献:

[1] 刘移民，艾宝民，王致. 我国三氯乙烯职业危害研究十年回顾[J]. 中国工业医学杂志，2007，20（2）：120-121.

[2] 夏丽华，丘创逸，张莹，等. 三氯乙烯药疹样皮炎的研究概况[J]. 中华劳动卫生职业病杂志，2006，24（12）：764-766.

[3] Tang Xiaojiang，Que Bingling，Song Xiangrong，*et al*. Characterization of liver injury associated with hypersensitive skin reactions induced by trichloroethylene in the guinea pig maximization test[J]. J Occup Health，2008，50：114-121.

[4] Singhal R，Ganey P E，Roth R A. Complement activation in cetaminophen-induced liver injury in mice[J]. J Pharmacol Exp Ther，2012，341（2）：377-385.

[5] Naoki Inagaki，Hiroichi Nagai. Analysis of the mechanism for the development of allergic skin inflammation and the application for its treatment：mouse models for the development of remedies for human allergic dermatitis[J]. J Pharmacol Sci，2009，110：251-259.

[6] Hertle E，van Greevenbroek M M，Stehouwer C D. Complement C3：an emerging risk factor in cardiometabolic disease[J]. Diabetologia，2012，55（4）：881-884.

[7] 越飞，曾泽明，李森华，等. 三氯乙烯药疹样皮炎患者体内补体等变化情况观察[J]. 中国职业医学，2007，34（6）：448-449.

[8] 朱启星，徐辉，冷静，等. 三氯乙烯致敏豚鼠肝脏损害研究[J]. 癌变·畸变·突变，2011，23（5）：344-348.

[9] 赵志伶，曹书华，王勇强. 膜攻击复合物 C5b-9 对创伤失血性休克大鼠肝损害的影响研究[J]. 中国危重病急救医学，2011，23（3）：158-161.

3-硝基-1,2,4-三唑-5-酮染毒大鼠病理学观察

Pathological observation on 3-nitro-1,2,4-triazol-5-one(NTO) exposed rat

孙苑菡，杜文霞，王玉玲，张延巍，邢亚飞，许俊卿

SUN Yuan-han，DU Wen-xia，WANG Yu-ling，ZHANG Yan-wei，XING Ya-fei，XV Jun-qing

（中国兵器工业集团第五二一研究所，陕西 西安 710065）

摘要: 探讨新型含能材料 3-硝基-1,2,4-三唑-5-酮（NTO）对大鼠主要脏器的亚慢性毒作用。将 NTO 以食用植物油为溶剂分为 0、250、500、1000 mg/kg 剂量组给大鼠经口灌胃。染毒 90 d，每周 5 d，每天 1 次。染毒结束处死大鼠，取心、肝、脾、肺、肾、脑、睾丸、子宫观察其病理改变。结果显示，NTO 染毒大鼠病理改变为肝细胞水肿、肝窦充血、炎细胞浸润、中央静脉扩张、点状坏死；肾脏病变表现为小球系膜细胞增生、近端小管水肿、炎细胞浸润、细部小管细胞增生纤维化；睾丸曲细精管变细，间隙较大，仅可见基底膜单层细胞，未见向管腔内分化的初级精母细胞、次级精母细胞、精子细胞及精子，间质水肿。250、500、1000 mg/kg 剂量组睾丸系数低于对照组。提示 NTO 对大鼠的肝脏、肾脏、睾丸有一定的毒作用。

关键词: 新型含能材料；3-硝基-1,2,4-三唑-5-酮（NTO）；病理改变

中图分类号: R99；TQ086.5 **文献标识码:** B

收稿日期: 2012-01-16；**修回日期:** 2012-05-31

基金项目: 兵器“十一五”预研支撑项目（62301100401）

作者简介: 孙苑菡（1981—），男，工程师，主要从事卫生毒理研究和职业卫生评价。