

· 实验研究 ·

活化 T 细胞核因子在双酚 A 调控巨噬细胞分泌 IL-10 中的作用

Role of nuclear factor of activated T cells in IL-10 secretion of macrophages regulated by BPA

何秀¹, 段志文¹, 王晓红¹, 喻道军¹, 郭丽², 马明月¹, 张玉敏¹, 裴秀丛¹

(1. 沈阳医学院公共卫生学院; 2. 沈阳医学院科学实验中心, 辽宁 沈阳 110034)

摘要: 研究活化 T 细胞核因子 (NFAT) 在环境内分泌干扰物双酚 A (BPA) 调控小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 (RAW264.7) 分泌白细胞介素-10 (IL-10) 蛋白中的作用, 为进一步研究 BPA 的免疫毒作用机制提供理论依据。将不同剂量的 BPA (0.1、1、10、100 及 1000 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 RAW264.7 细胞 24 h、48 h, 用 CCK8 试剂盒检测细胞活性。以 1 $\mu\text{g/ml}$ 脂多糖 (LPS) 为激活剂, 以 1、10、50、100 $\mu\text{mol/L}$ BPA 作用细胞 24 h, ELISA 试剂盒检测细胞上清液中 IL-10 蛋白含量。10、100 $\mu\text{mol/L}$ BPA 作用细胞 4 h、12 h, 用实时定量 PCR 方法测定 IL-10、NFATc、NFATp 基因表达。与对照组比较, 1000 $\mu\text{mol/L}$ BPA 无论作用 24 h 还是 48 h 均能明显抑制细胞活性 ($P < 0.01$); LPS 显著促进巨噬细胞分泌 IL-10 蛋白, 50 和 100 $\mu\text{mol/L}$ BPA 作用细胞 24 h, 与 LPS 组比较, 显著抑制 IL-10 蛋白的分泌 ($P < 0.01$); 10 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$ BPA 染毒 4 h 能明显促进 NFATp mRNA 表达 ($P < 0.01$); 染毒 12 h 时, IL-10 mRNA 水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示本实验条件下, NFATp 在 BPA 调控巨噬细胞分泌 IL-10 蛋白中具有一定的作用。

关键词: 双酚 A; 活化 T 细胞核因子; 巨噬细胞; 白细胞介素-10 (IL-10)

中图分类号: R114 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2016)02-0124-03

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyx.2016.02.015

双酚 A (bisphenol A, BPA) 属于芳香族化合物, 广泛应用于婴儿瓶、食品包装材料、牙科填充剂等塑料行业^[1]。已有研究表明, BPA 除具有生殖内分泌毒性、神经发育及行为等毒性外, 还具有免疫毒性。活化 T 细胞核因子 (nuclear factor of activated T cells, NFAT) 是具有广泛生理功能的转录因子, 在免疫反应中对诱导基因转录起重要作用^[2]。白细胞介素-10 (IL-10) 是一种多功能负性调节因子, 在巨噬细胞免疫防御中起到抗炎作用。IL-10 在具有临床症状的炎症免疫反应中起关键性作用, 检查 IL-10 水平可以间接反映组织局部的炎症反应程度^[3]。本研究旨在探讨 NFAT 在环境内分泌干扰

物双酚 A 调控小鼠单核巨噬细胞白血病细胞 (RAW264.7) 分泌 IL-10 蛋白中的作用, 为 BPA 的免疫毒性机制研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

Series II 3110 CO₂ 培养箱 (美国 Thermo 公司), 3K-30 高速低温离心机 (德国 Sigma 公司), 酶标仪 (美国 Molecular Device 公司), NANODROP 2000C 微升核算分析仪 (Thermo Scientific), Mastercycler pro 梯度 PCR 仪 (Eppendorf 公司), 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems 公司)。

BPA (纯度>99%, 日本东京仁成工业株式会社), 脂多糖 (LPS, Sigma 公司), DMEM 高糖培养液 (赛默飞世尔生物化学制品北京有限公司), 胎牛血清 (FBS, BI 科技有限公司), 二甲基亚砜 (DMSO, Sigma 公司), CCK8 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所), ELISA (IL-10) 检测试剂盒 (武汉优尔生科技股份有限公司), RNA 提取试剂盒 (TaKaRa 公司), PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa 公司), SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 试剂盒 (TaKaRa 公司)。

1.2 细胞复苏及培养

RAW 264.7 细胞来自 ATCC 细胞库, 于液氮罐中冻存, 临用前取出装有 RAW 264.7 的冻存管, 迅速投入到已经预热为 37 °C 的水浴锅中使其快速融化并不断摇动, 全部吸收到装有培养液的离心管中, 800 r/min 离心 5 min, 用含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养液 (青霉素、链霉素浓度均为 100 U/ml) 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.3 细胞染毒及测定方法

1.3.1 CCK-8 活性检测 RAW 264.7 细胞接种于 96 孔板中, 调整各孔细胞浓度约为 5×10^3 个/孔和 2.5×10^3 个/孔, 以 DMEM 高糖培养液为对照组, 取 0.1、1、10、100、1000 $\mu\text{mol/L}$ 的 BPA 染毒后, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中分别培养 24 h 和 48 h, 每孔加 CCK-8 10 μl 继续培养 3 h, 用酶标仪测定 450 nm 处的光密度 (OD) 值。计算细胞存活率 (%) = (加药细胞 OD/对照细胞 OD) $\times 100\%$ 。

1.3.2 IL-10 蛋白含量测定 细胞接种于 6 孔板中, 调整细胞密度为 5×10^5 个/ml。以 1 $\mu\text{g/ml}$ LPS 为激活剂, 1、10、50、100 $\mu\text{mol/L}$ BPA 作用细胞, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后收集细胞培养液, 用 ELISA 试剂盒检测 IL-10 蛋白含量, 于 450 nm 波长处测定光密度值 (OD), 操作及分析步骤严格按照试剂盒说明书进行。

收稿日期: 2015-10-21; 修回日期: 2015-11-30

基金项目: 国家自然科学基金 (81373029); 辽宁省高等学校杰出青年学者成长计划 (LJQ2014114); 辽宁省教育厅科学技术研究项目 (L2012377); 沈阳市科技计划项目 (F13-302-1-00)

作者简介: 何秀 (1990—), 女, 硕士在读, 研究方向: 环境污染物的免疫生殖毒性研究。

通讯作者: 裴秀丛, E-mail: xiaopei2399@163.com

1.3.3 IL-10、NFATp、NFATc mRNA 表达 细胞接种于 6 孔板中,以 10、100 $\mu\text{mol/L}$ BPA 作用细胞 4 h、12 h,采用 TaKaRa RNA 提取试剂盒提取 RNA,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行,再测定 RNA 含量,所得 RNA A260 nm/A280 nm 介于 1.8~2.2 之间,符合纯度要求,采用 TaKaRa 试剂盒

PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 进行逆转录,合成 cDNA, TaKaRa 试剂盒 SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus) 测定 IL-10、NFATc、NFATp 基因表达。依据公式 $ct_{\text{靶 RNA}}/ct_{\text{内参}}$,计算相对定量测定结果。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物	正义链	反义链
IL-10	5'-CGGTTCTGGACAACATACTGCTAA-3'	5'-GGATCATTTCCGATAAGGCTTG-3'
NFATp	5'-ACCTGTCGGGAAGGCAAAT-3'	5'-TGGAACCTGGGAATAATAAAG-3'
NFATc	5'-GACTTCGATTCTCTCTCGAGT-3'	5'-AAGGCAGAGAGTGTGCTGTGG-3'
内参 GAPDH	5'-TGATGACATCAAGAAGGTGCTGAAG-3'	5'-TCCTTGAGGCCATGTAGGCCAT-3'

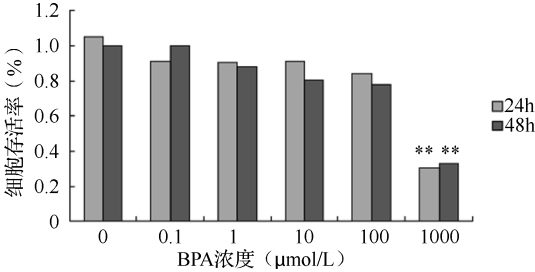
1.4 统计学分析

应用 Excel 软件建立数据库,用 SPSS16.0 软件进行单因素方差分析,组间比较采用 LSD 及 Dunnett T3 法, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BPA 对 RAW264.7 细胞活性的影响

以浓度为 0.1、1、10、100 及 1000 $\mu\text{mol/L}$ BPA 对 RAW264.7 细胞进行染毒,与对照组比较,作用 24 h、48 h,0.1~100 $\mu\text{mol/L}$ BPA 对 RAW264.7 细胞活性抑制作用均不明显,而 1000 $\mu\text{mol/L}$ BPA 对 RAW264.7 细胞活性存在明显抑制作用 ($P<0.01$),见图 1。



注:与对照组比较, * $P<0.01$ 。

图 1 不同浓度 BPA 对 RAW264.7 细胞活性的影响

2.2 BPA 对 RAW264.7 细胞分泌 IL-10 的影响

表 2 BPA 染毒不同时间对 IL-10、NFATp、NFATc 基因表达的影响 ($\bar{x}\pm s, n=3$)

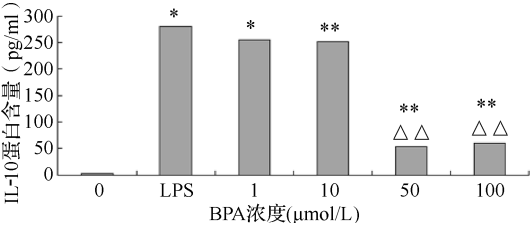
组别	4 h			12 h		
	IL-10	NFATp	NFATc	IL-10	NFATp	NFATc
对照组	1.83±0.02	1.76±0.02	1.37±0.01	1.64±0.02	1.70±0.02	1.36±0.01
LPS 组	1.80±0.01	1.86±0.01**	1.45±0.02**	1.73±0.003**	1.82±0.03*	1.44±0.05*
10 $\mu\text{mol/L}$ BPA	1.82±0.01	1.90±0.02**△△	1.46±0.02**	1.69±0.01**△△	1.84±0.08*	1.42±0.02*
100 $\mu\text{mol/L}$ BPA	1.81±0.02	1.91±0.02**△△	1.44±0.01*	1.69±0.02**△	1.88±0.07**	1.46±0.01**

注:与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 LPS 组比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

3 讨论

体外实验中,经典的巨噬细胞可通过 LPS 刺激活化,明显促进细胞因子分泌。本实验条件下 BPA 可抑制 LPS 对 RAW264.7 的激活作用。本研究中与对照组相比, BPA 促进 IL-10 分泌,表明 BPA 对 RAW264.7 的抑制作用弱于 LPS 的激活作用,但仍说明 BPA 可抑制巨噬细胞分泌 IL-10^[4]。体内试

验发现, BPA 可明显降低 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞及巨噬细胞数量,抑制 T 淋巴细胞分化、B 淋巴细胞激活,阻抑炎症反应过程中巨噬细胞向感染部位的迁移,减弱巨噬细胞吞噬功能并影响各种细胞炎症因子的释放,从而导致机体非特异性免疫防御机能下降,引发炎症反应。巨噬细胞是炎症反应中主要的调节细胞,通过分泌各种细胞因子等参与炎症反应。



注:与对照组 (0 $\mu\text{mol/L}$) 比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 LPS 组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

图 2 BPA 对 RAW264.7 细胞分泌 IL-10 蛋白的影响

2.3 BPA 对 IL-10、NFATp、NFATc 基因表达的影响

1 $\mu\text{g/ml}$ LPS 使 IL-10、NFATp、NFATc mRNA 水平增高 (除 4 h、IL-10mRNA 水平外),与对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。与 LPS 组相比, 10、100 $\mu\text{mol/L}$ BPA 染毒 4 h 时, NFATp 基因表达水平明显增高;染毒 12 h 时, IL-10 表达水平明显降低,仍显著高于对照组 ($P<0.05$)。见表 2。

细胞因子 IL-10 能抑制炎症因子的合成与释放,降低细胞表面主要组织相容性抗原 II (class II major histocompatibility complex, MHC II) 的抗原呈递,下调 T 淋巴细胞活性,抑制炎症性细胞的激活,从而起到抗炎的作用^[5]。本实验结果提示 BPA 不仅能影响巨噬细胞的增殖,也能显著抑制巨噬细胞分泌 IL-10 蛋白,进而影响 T 淋巴细胞及促炎因子的合成,产生免疫毒作用。

NFAT 家族是一种活化 T 细胞的特征因子,虽然其家族中的各个成员在结构和功能上有相似性,但也具有各自的分布特征和功能。NFATp、NFATc 是 NFAT 基因家族的重要成员,二者之间基因编码蛋白的 C 端具有高度一致性,其结构是与 Rel 家族相类似的 DNA 结合结构域,而 N 端仅有有限的同源性。NFAT 在许多免疫细胞中均有表达,其在 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞中的作用已得到广泛认可,但有关 NFAT 在巨噬细胞中的作用研究较少^[6]。许多炎症细胞因子的启动子或增强子上都发现有 NFATp、NFATc 的结合位点,因此作为转录因子能选择性诱导 IL-2、IL-4、IL-10 等细胞因子,并对细胞因子的表达起下调和上调的相反作用^[7,8]。以往实验结果显示,环境内分泌干扰物邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯(DEHP)能通过上调 NFATc 及下调 NFATp 表达而促进脾淋巴细胞分泌 IL-4 蛋白^[9]。毒理基因组学研究表明 DEHP 和 BPA 具有相似的毒作用^[10],因此本研究进一步探讨了 NFAT 在 BPA 调节巨噬细胞分泌 IL-10 蛋白中的作用。本实验条件下,BPA 能促进 NFATp mRNA 表达而对 NFATc 无明显作用,抑制 IL-10 基因表达。提示可能由于 NFATp 和 NFATc 结构不同,导致 BPA 对其影响不同。被激活的 NFATp 进入细胞核后与 IL-10 基因上的特定位点结合,或与细胞核内蛋白及其他转录因子相互作用,激活特定基因的表达,降低 IL-10 mRNA 表达,从而显著降低巨噬细胞分泌 IL-10 蛋白。总之,BPA 可能通过上调

NFATp 表达而负向调控巨噬细胞分泌 IL-10 蛋白,导致机体的免疫系统调节发生改变。其具体机制尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Barrett, J R. BPA and reproductive health reviewing the current state of the science [J]. Environ Health Perspect, 2014, 122: A223.
- [2] 彭鑫,申卫红,邵启祥. 针对 NFAT 信号途径的新型免疫抑制剂 [J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24 (5): 391-397.
- [3] Miller L J, Fischer K A, Goralnick S J, *et al.* Interleukin-10 levels in seminal plasma: implications for chronic prostatitis-chronic pelvic pain syndrome [J]. J Urol, 2002, 167: 753-756.
- [4] 喻道军,郑延芳,宋曼铜,等. 邻苯二甲酸二乙基己酯和镉对大鼠睾丸巨噬细胞分泌 IL-1 β 的影响 [J]. 中国工业医学杂志, 2015, 28 (4): 247-249.
- [5] 赵宁伟,殷志敏. 关于 IL-10 抗炎机制的研究 [J]. 生命科学, 2007, 11 (4): 14-18.
- [6] Urmila M, John S P, Liwu Li. An innate immunity signaling process suppresses macrophage ABCA1 expression through IPAK-1-mediated down regulation of retinoic acid receptor alpha and NFATc2 [J]. Mol Cell Biol, 2009, 29 (22): 5989-5997.
- [7] Diehl S, Krahel T, Rinaldi L, *et al.* Inhibition of NFAT specifically in T cells prevents allergic pulmonary inflammation [J]. J Immunol, 2004, 172 (6): 3597-3603.
- [8] 阎亚涛. 活化 T 细胞核因子的临床研究进展 [J]. 医学研究生学报, 2011, 24 (1): 109-112.
- [9] Pei X, Duan Z, Ma M, *et al.* Role of Ca/Ca N /NFAT signaling in IL-4 expression by splenic lymphocytes exposed to phthalate (2-ethylhexyl) ester in spleen lymphocytes [J]. Mol Biol Rep, 2014, 41: 2129-2142.
- [10] Singh S, Li S S. Bisphenol A and phthalates exhibit similar toxicogenomics and health effects [J]. Gene, 2012, 494: 85-91.

镍冶炼工人肺癌组织中 ΔNp63 蛋白表达的变化

Changes of apoptosis-related protein ΔNp63 expression in lung cancer tissues of nickel smelting workers

陈嘉述, 王玥, 王声远, 谭文乔, 吴永会

(哈尔滨医科大学公共卫生学院劳动卫生与职业病学教研室, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要: 采用蛋白质免疫组织化学 (SP) 法检测镍冶炼工肺癌细胞、非镍工肺癌细胞和正常肺成纤维组织中 ΔNp63 的表达,以探讨镍冶炼厂工人肺癌的发生及相关蛋白 ΔNp63 的变化。镍冶炼工肺癌组织中 ΔNp63 的蛋白表达量,与正常肺间质细胞相比增加 77.29%,与非镍工肺癌细胞中 ΔNp63 的表达量相比增加 26.73%,组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。提示 ΔNp63 的过度表达可能参与了肺癌发生的重要

阶段,在发病机制中起到重要作用。

关键词: 镍冶炼工; 肺癌; ΔNp63 ; 免疫组织化学

中图分类号: R135.2 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2016)02-0126-04

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2016.02.016

在工作和生活环境中,人类广泛接触含镍化合物^[1,2]。国内外研究调查证实,镍化合物的职业接触可以引起镍冶炼工人的肺癌和鼻咽癌,但其致癌作用的确切机制尚不清楚^[3,4]。镍和镍化合物的物理特性能够影响其生物利用度和相关毒性。不溶性或难溶性镍(如金属镍、硫化镍)可以粉尘和烟雾等形式存在于工作场所,吸入暴露是镍冶炼工人在工作场所接触镍及其化合物的主要途径^[5]。 ΔNp63 作为重要的癌基因成

收稿日期: 2015-08-14; **修回日期:** 2015-10-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81372965)

作者简介: 陈嘉述 (1990—),男,硕士研究生。

通讯作者: 吴永会,教授,研究方向:工业致癌物致癌机制的研究。