

银杏叶提取物对三氯乙烯所致的角质形成细胞线粒体膜电位变化的影响

朱启星, 马泰, 沈彤, 俞韵, 叶良平

(安徽医科大学公共卫生学院毒理中心, 安徽 合肥 230032)

摘要: 目的 研究三氯乙烯(TCE)对角质形成细胞(KC)线粒体膜电位的影响以及银杏叶提取物(GBE)的保护作用,为预防三氯乙烯皮肤损害提供理论依据。方法 体外培养的人角质形成细胞以不同浓度TCE处理8h,GBE保护实验则以不同浓度GBE预处理2h后再进行TCE染毒,采用罗丹明123(Rh123)和碘化丙啶(PD)双染色方法,通过流式细胞仪检测线粒体膜电位的变化情况。结果 空白对照组Rh123荧光强度为 18.73 ± 0.45 ,正常和早期凋亡细胞分别占 $(77.10 \pm 2.08)\%$ 和 $(12.33 \pm 1.39)\%$;2.0 mmol/L TCE染毒组Rh123荧光强度下降到 8.20 ± 0.66 (与空白对照相比, $P < 0.01$),正常和早期凋亡细胞比例分别为 $(11.90 \pm 0.56)\%$ 和 $(65.33 \pm 1.45)\%$ (与空白对照相比,均 $P < 0.01$)。10 mg/L的GBE预处理对2.0 mmol/L TCE所致的线粒体膜电位下降即显示有保护作用,Rh123荧光强度为 13.80 ± 0.92 ,正常细胞占 $(40.90 \pm 2.10)\%$,早期凋亡细胞占 $(32.10 \pm 1.25)\%$ (与2.0 mmol/L TCE染毒组相比差异有统计学意义, $P < 0.01$)。随着GBE浓度的增大,保护作用渐强,100 mg/L的GBE达到完全的保护作用,上述3项指标分别为 18.57 ± 0.57 , $(76.57 \pm 2.67)\%$ 和 $(11.63 \pm 1.07)\%$ (与2.0 mmol/L TCE染毒组相比, $P < 0.01$,而与空白对照组相比差异均无统计学意义)。结论 TCE可以剂量依赖性地诱导KC线粒体膜电位的下降,使细胞进入凋亡状态;GBE预处理能有效预防TCE所致的线粒体膜电位的下降,并可降低KC凋亡。研究结果提示GBE可能用作预防三氯乙烯皮肤损伤的有效保护剂。

关键词: 银杏叶提取物; 三氯乙烯; 角质形成细胞; 线粒体膜电位

中图分类号: R751; O623.221 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2007)02-0072-04

Effect of pretreatment with ginkgo biloba extract on declined mitochondrial membrane potential caused by TCE in human keratinocyte

ZHU Qi-xing, MA Tai, SHEN Tong, YU Yun, YE Liang-ping

(Toxicology Center, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032, China)

Abstract: **Objective** To observe the change of mitochondrial membrane potential (MMP) in human keratinocytes after exposing to trichloroethylene (TCE) and the effect of ginkgo biloba extract (GBE) pretreatment on it, thereby obtaining some basic data for prevention of skin damage caused by trichloroethylene. **Method** Different groups of cultured human primary keratinocytes were treated with different concentrations of TCE respectively for 8 hours as exposed groups some other groups of cultured human primary keratinocytes were given different concentrations of ginkgo biloba extract pre-incubation for 2 hours before exposure to TCE as the pretreatment groups. Double-staining with Rhodamine 123 (Rh123) and propidium iodide (PI) was used for cell stain, and MMP was detected by flow cytometry. **Result** The results showed that the fluorescence intensity of Rh123 in control group was 18.73 ± 0.45 , while in 2.0 mmol/L TCE exposed group was 8.20 ± 0.66 ($P < 0.01$), the proportion of living cell (cluster A) and early apoptotic cell (cluster B) were $(77.10 \pm 2.08)\%$ and $(12.33 \pm 1.39)\%$ in control group, but they were $(11.90 \pm 0.56)\%$ and $(65.33 \pm 1.45)\%$ respectively in 2.0 mmol/L TCE exposed group ($P < 0.01$), while 10 mg/L GBE pretreatment might maintain the fluorescence intensity of Rh123 at 13.80 ± 0.92 (significantly differed from that of 2.0 mmol/L TCE exposed group, $P < 0.01$), the proportions of cluster A and cluster B were $(40.90 \pm 2.10)\%$ and $(32.10 \pm 1.25)\%$ respectively (also significantly differed from that of 2.0 mmol/L TCE group, $P < 0.01$), 100 mg/L of GBE showed a fully protect effect on the decline of MMP caused by TCE, the three indices mentioned above were 18.57 ± 0.57 , $(76.57 \pm 2.67)\%$ and $(11.63 \pm 1.07)\%$, respectively (nearly equal to control group). **Conclusion** Trichloroethylene can dose dependently induce the decline of MMP in human keratinocytes, make keratinocytes enter apoptosis and this change can be well prevented by pre-treating with GBE, suggesting that GBE may be used as an effective protective agent for the skin damage caused by trichloroethylene.

Key words: Ginkgo biloba extract (GBE); Trichloroethylene (TCE); Keratinocyte; Mitochondrial membrane potential (MMP)

收稿日期: 2006-09-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30471469 No. 30671787)

作者简介: 朱启星 (1958-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事皮肤毒理学研究。

线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 是线粒体功能得以发挥的基础, 膜电位的下降可以引起线粒体能量产生障碍、活性氧生成增多、细胞钙稳态失调以及诱导细胞发生凋亡, 这些变化均和

组织细胞的损伤密切相关^[1]。三氯乙烯(trichloroethylene, TCE)是常见的引起皮肤严重损害的有机溶剂,研究表明,角质形成细胞(keratinocyte, KC)的损伤和凋亡在其皮肤毒性机制中发挥重要的作用^[2]。银杏叶提取物(ginkgo biloba extract, GBE)具有公认的抗氧化作用,还能够保护线粒体功能形态、抗衰老和细胞凋亡^[3~5]。本研究通过观察TCE作用下,皮肤角质形成细胞线粒体膜电位的改变以及GBE预处理对其的影响,以深入揭示TCE的皮肤毒性机制并为开发研制皮肤防护用品提供理论资料。

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

三氯乙烯(99.5% AR, 美国Alfa Aesar公司),银杏叶提取物(含24%的银杏黄酮类和6%的萜烯内酯类)由江苏扬子江药业提供,胰蛋白酶、DMEM、Defined Keratinocyte-SFM培养基(KC专用无血清培养基)均购自Invitrogen公司,胎牛血清(FBS)为杭州四季青生物工程材料有限公司产品。24孔细胞培养板(Corning公司),罗丹明123(Rh123)染料(Sigma公司),DNA-PrepTM Stain(含碘化丙啶,美国Beckman Coulter公司),低速台式离心机(北京雷勃尔公司),EPICS流式细胞仪(美国Beckman Coulter公司)。

1.2 角质形成细胞的分离和培养

临床泌尿外科包皮环切术后的正常皮肤用D-Hanks液漂洗3次并去除皮下组织,剪成1 cm×0.5 cm大小的皮片,经0.25%胰蛋白酶在4℃消化10 h分离出表皮,再以0.25%胰蛋白酶37℃消化10 min,吹打、过滤、离心后分离得到KC,用DMEM培养基(含10%FBS)于37℃、5%CO₂条件下进行培养,贴壁后换成KC专用无血清培养基继续培养用于实验研究。

1.3 细胞处理

根据苔盼蓝染色细胞活力在90%以上的细胞用于实验,将细胞以5×10⁵/ml的密度接种至6孔培养板中。待细胞贴壁后,以不同浓度TCE(0、0.125、0.5和2.0 mmol/L)染毒8 h;银杏叶提取物预处理组首先加入不同浓度的银杏叶提取物(0、10、50、100、150 mg/L)置培养箱内预适应2 h,再以2.0 mmol/L的TCE染毒8 h,每个处理组设3个重复孔。

1.4 膜电位变化检测

染毒后8 h终止培养,收集细胞,PBS轻轻洗涤一遍。细胞沉淀加入1 ml 2μg/ml的Rh123溶液重悬后于37℃孵育30 min。800 r/min离心5 min弃上清,PBS洗涤细胞2遍,加入500 μl碘化丙啶(PI)染料(DNA-PrepTM Stain),室温避光染色30 min后进行流式

细胞仪检测,激发光波长为488 nm。根据Rh123和PI的荧光强度高将细胞分为4群:A:Rh123高/PI低的细胞代表正常活细胞;B:Rh123低/PI低的细胞代表膜电位减小而胞膜完整的细胞,即将进入凋亡;C:Rh123低/PI高为死亡细胞;D:Rh123高/PI高为机械损伤的细胞。分别检测各群细胞所占的百分比以及Rh123的荧光强度,A群细胞的增加和B群细胞的减少意味着线粒体膜电位降低,细胞进入凋亡阶段。

1.5 统计学处理

所有数据采用SPSS11.5统计软件包进行处理。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间各指标差异比较采用单因素方差分析(最小有意义差异 t 检验, LSD- t 检验)。

2 结果

2.1 不同浓度TCE对KC线粒体膜电位的影响

由表1可见,0.125、0.5和2.0 mmol/L的TCE均能显著降低KC线粒体膜电位水平(Rh123荧光强度低于对照组, $P < 0.01$),且随着染毒剂量的增加,Rh123荧光强度逐渐减弱,呈明显的剂量-效应关系。从细胞比例的变化来看,各染毒组A群细胞比例较空白对照组下降($P < 0.01$),B和C群细胞比例则有所上升($P < 0.01$)。A群细胞的减少和B群细胞的增加呈剂量依赖性变化,提示TCE诱导细胞由正常(A群)进入凋亡状态(B群)(图1a~e)。

2.2 不同浓度银杏叶提取物预处理对KC线粒体膜电位的影响

如表1所示,KC经不同浓度的GBE预处理2 h后再以2.0 mmol/L TCE染毒8 h后进行检测,10 mg/L GBE预处理的细胞Rh123荧光强度较单纯2.0 mmol/L TCE染毒有所增加($P < 0.01$),图1f~g示A群细胞比例减少($P < 0.01$),B群和C群细胞比例增加($P < 0.01$);随着银杏叶提取物的增加,这种作用更为明显,A群(正常)细胞向B群(凋亡)细胞转化逐渐得到抑制(图1f~i),100和150 mg/L的GBE预处理组Rh123荧光强度、A和B群细胞比例分别与2.0 mmol/L TCE相比差异有统计学意义($P < 0.01$),但与空白对照组相比则未见差异($P > 0.05$),即TCE所致的线粒体膜电位下降得到完全的保护。

3 讨论

细胞在能量代谢的过程中,线粒体内膜呼吸链酶复合体在传递电子的同时将H⁺泵出至膜间隙内,形成的内膜内电位低于内膜外的电位即线粒体的膜电位,用 $\Delta\Psi_m$ 来表示。 $\Delta\Psi_m$ 不仅是推动ATP合成的动力,而且影响着细胞内钙稳态的调节并对细胞的存活和功能至关重要。因此 $\Delta\Psi_m$ 是反映线粒体和细胞

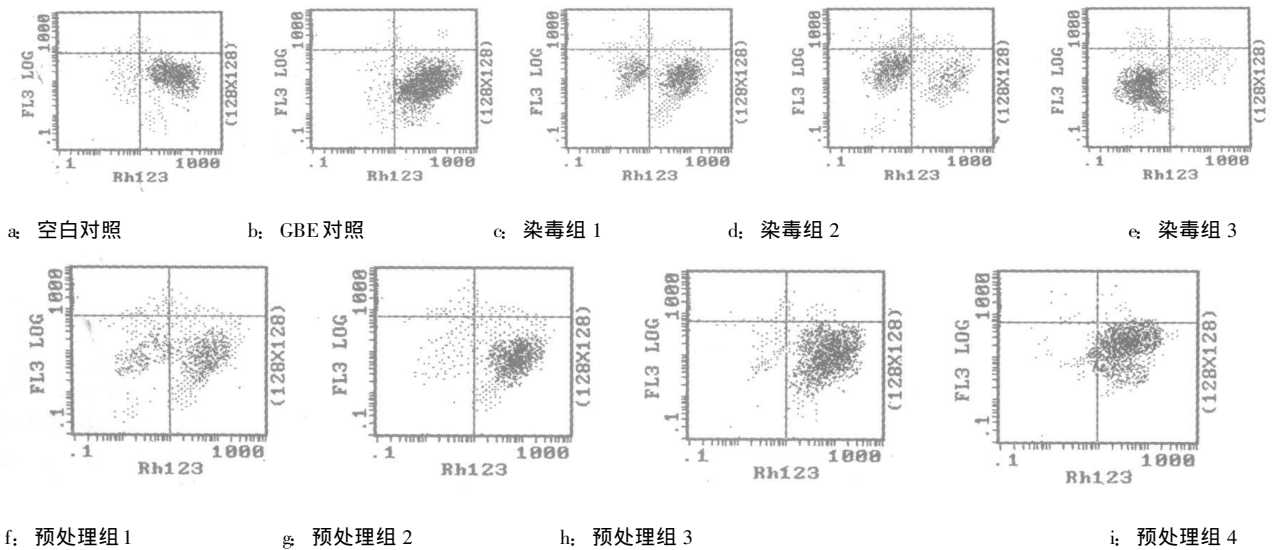


图 1 不同浓度 TCE 和 GBE 对 KC 线粒体膜电位和细胞各群分布的影响 (Rh123 和 PI 双染法)

表 1 不同浓度 TCE 和 GBE 对 KC 线粒体膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	GBE (mg/L)	TCE (mmol/L)	Rh123 荧光强度	细胞分布比例 (%)			
				A	B	C	D
空白对照	0	0	18.73±0.45	77.10±2.08	12.33±1.39	6.10±2.03	4.47±2.12
GBE 对照	150	0	18.67±0.71	77.53±1.88	12.40±0.80	6.27±0.80	3.80±0.36
染毒组 1	0	0.125	16.23±0.45**	57.57±0.65**	25.63±1.20**	9.33±0.78**	7.47±1.17
染毒组 2	0	0.5	12.10±0.46**	30.10±1.54**	42.47±1.14**	16.17±1.11**	11.27±1.33
染毒组 3	0	2.0	8.20±0.66**	11.90±0.56**	65.33±1.45**	12.70±1.87**	10.07±1.47
预处理组 1	10	2.0	13.80±0.92**##	40.90±2.10**##	32.10±1.25**##	15.83±1.50**##	11.17±1.07
预处理组 2	50	2.0	16.73±0.55**##	65.00±1.68**##	17.83±2.11**##	9.60±0.56**##	7.57±1.01
预处理组 3	100	2.0	18.57±0.57**	76.57±2.67**	11.63±1.07**	5.43±0.42**	6.37±2.15
预处理组 4	150	2.0	18.57±1.03**	78.43±2.29**	12.30±1.25**	5.23±1.11**	4.03±1.17

与空白对照组相比, ** $P < 0.01$; 与染毒组 3 相比, ## $P < 0.01$

功能变化的敏感指标。罗丹明 123 是一种亲脂性阳离子染料, 能够穿透胞膜并依赖线粒体膜电位进入线粒体基质, Rh123 进入线粒体的量与线粒体膜电位成正比, 因而用 Rh123 的荧光强度可以反映出线粒体膜电位水平^[6]。碘化丙啶则是一种亲核染料, 但不能穿透细胞膜, 因此 PI 可以反映出细胞的损伤情况。本研究采用 Rh123 和 PI 双染色的方法来同时反映线粒体膜电位变化情况和细胞的存活状态。

研究表明, TCE 可以使 KC 线粒体膜电位下降, 并呈剂量依赖关系。而且从细胞各群分布来看, 随着 TCE 染毒剂量的增大, 正常细胞比例减少, 进入早期凋亡的细胞增多。前期研究结果已经证实 TCE 可以诱导体外培养的 KC 损伤并发生凋亡^[2]。结合本研究结果, 推测线粒体膜电位的下降可能参与了这一细胞毒性作用。因为 $\Delta\Psi_m$ 的下降可以直接影响细胞 ATP 产生, Ca^{2+} 稳态并使活性氧产生增多^[7]。除此之外, $\Delta\Psi_m$ 下降后线粒体细胞色素 C 等蛋白释放入胞浆, 激活胞浆内的 caspase, 引起凋亡的发生, 而且 $\Delta\Psi_m$

一旦丧失, 细胞凋亡不可避免^[8]。

GBE 是天然的抗氧化物质, 其有效成分主要包括银杏黄酮和萜烯内酯两大类物质。大量研究证明 GBE 对线粒体具有全面的保护作用。GBE 保护线粒体呼吸功能, 提高呼吸控制比^[9], 改善线粒体呼吸链酶复合体的功能^[10] 并上调其基因表达^[11]。Sastre 等^[4] 还发现其可以阻止衰老导致的线粒体形态学改变、线粒体内过氧化物的形成和线粒体 DNA 的氧化性损伤。除此之外, GBE 可以保护细胞线粒体膜电位的下降^[3, 12] 和膜的完整性, 抑制线粒体细胞色素 C 的释放和细胞凋亡的发生^[5]。因此 GBE 被认为是线粒体有效的保护剂。本研究利用不同浓度 GBE 预处理 KC 后再进行 TCE 染毒, 发现 GBE 对 KC 线粒体膜电位具有保护作用, 10 mg/L GBE 就可以明显保护 TCE 所致的线粒体膜电位的下降和正常细胞进入早期凋亡状态。100 mg/L 的 GBE 则对线粒体膜电位和细胞凋亡转变起到完全的保护作用。GBE 可能是 TCE 皮肤细胞毒性有效的保护剂, 但还需进一步的资料加以证实。本研究

为研制和开发皮肤防护用品提供了理论依据。

参考文献:

- [1] Pedersen P L. Mitochondrial events in the life and death of animal cells: a brief overview [J]. *J Bioenerg Biomembr* 1999, 31 (4): 291-304.
- [2] Zhu Q X, Shen T, Tu D Y, et al. Protective effects of ginkgo biloba leaf extracts on trichloroethylene-induced human keratinocyte cytotoxicity and apoptosis [J]. *Skin Pharmacol Physiol* 2005, 18 (4): 160-169.
- [3] Eckert A, Keil U, Kressmann S, et al. Effects of Egb 761 ginkgo biloba extract on mitochondrial function and oxidative stress [J]. *Pharmacopsychiatry*, 2003, 36 (Suppl 1): S15-S23.
- [4] Sastre J, Millan A, Garcia de la Asuncion J, et al. A ginkgo biloba extract (Egb 761) prevents mitochondrial aging by protecting against oxidative stress [J]. *Free Radic Biol Med* 1998, 24 (2): 298-304.
- [5] Smith J V, Burdick A J, Golik P, et al. Anti-apoptotic properties of ginkgo biloba extract Egb 761 in differentiated PC12 cells [J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2002, 48 (6): 699-707.
- [6] John L V, Walsh M L, Chen L B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine [J]. *Proc Natl Acad Sci* 1980, 77 (2): 990-994.
- [7] Brookes P S, Yoon Y, Robotham J L, et al. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287 (4): C817-833.
- [8] Desagher S, Martinou J. Mitochondria as the central control point of apoptosis [J]. *Trends Cell Bio* 2000, 10 (9): 369-377.
- [9] Janssens D, Michiels C, Delaive E, et al. Protection of hypoxia-induced ATP decrease in endothelial cells by ginkgo biloba extract and bilbalide [J]. *Biochem Pharmacol* 1995, 50 (7): 991-999.
- [10] Janssens D, Delaive E, Remacle J, et al. Protection by bilbalide of the ischaemia-induced alterations of the mitochondrial respiratory activity [J]. *Fundam Clin Pharmacol* 2000, 14 (3): 193-201.
- [11] Tendi E A, Bosetti F, Dasgupta S F, et al. Ginkgo biloba extracts Egb 761 and bilbalide increase NADH dehydrogenase mRNA level and mitochondrial respiratory control ratio in PC12 cells [J]. *Neurochem Res* 2002, 27 (4): 319-323.
- [12] Eckert A, Keil U, Scherping I. Stabilization of mitochondrial membrane potential by ginkgo biloba extract Egb 761 [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2005, 1056: 474-485.

·病例报道·

急性三氯异氰尿酸中毒 1 例报告

A case of acute trichloroisocyanuric acid poisoning

刘瑞莹¹, 胡丹丹², 王涤新³

- (1. 鞍山市职业病防治院, 辽宁 鞍山 114014;
2. 北京航天总医院, 北京 100076; 3. 首都医科大学
附属朝阳医院, 北京 100020)

三氯异氰尿酸是新型的含氯消毒剂, 具有分解彻底、低残留、易清洗等优点, 近年来被广泛应用于医院、游泳池、餐馆等食品卫生器皿消毒。本品为低毒类物质, 有轻度刺激性, 大鼠经口 LD₅₀ 为 700~800 mg/kg, 尚未见其中毒的报告。现将使用三氯异氰尿酸消毒引发急性中毒 1 例报告如下。

1 临床资料

患者, 男, 55 岁, 京郊某个体养鱼池工人, 既往体健, 于 2006 年 3 月 23 日上午消毒鱼池时, 将约 2 kg 三氯异氰尿酸粉末溶于 50 L 清水中, 并乘船将其洒入鱼池。工作中无任何防护措施, 约 30 min 后出现流泪、流涕、咳嗽、咳痰, 继而出现胸闷、气短、大汗、胸痛, 送往当地医院急救。经吸氧、静脉滴注维生素 C、氟美松等对症治疗, 病情仍无好转, 7 h 后转北京朝阳医院急诊收住院。入院查体: R 32 次/min, BP 128/83 mm Hg, 意识清, 精神萎靡, 急性病容, 呼吸急促, 不能平卧。双肺可闻及大量湿啰音, P 86 次/min, 律齐, 心脏听诊各瓣区未闻及病理性杂音, 腹软, 肝脾未及, 双下肢无水肿。急查血常规 WBC 14.3×10⁹/L; 血气分析 pH 7.33, PCO₂ 42 mm Hg, PO₂ 55 mm Hg, SO₂ 0.82; 胸片示右肺上下野及左肺中野可见大小不等的淡薄斑片影, 边缘较模糊, 考虑

为肺水肿。肝功能、肾功能、离子、血糖、血脂、尿常规检查均正常。给予地塞米松 20 mg 静脉滴注 q d, 控制肺水肿; 间断无创呼吸机辅助通气 (IPAP 12 cm H₂O, EPAP 4 cm H₂O) 纠正低氧血症; 左氧氟沙星 0.5g 静脉滴注抗感染治疗。3 d 后症状明显好转, 患者仍咳嗽、咳痰, 无胸闷, 双肺湿啰音明显减少, 血气分析示 PCO₂ 41 mm Hg, PO₂ 87 mm Hg, SO₂ 0.96, 停用无创呼吸机通气, 改用低流量持续吸氧; 停地塞米松静脉滴注。入院 15 d 后咳嗽、咳痰、胸闷、气短、胸痛等症状消失, 查体双肺呼吸音清, 未闻及干湿啰音, 复查血常规、血气分析、胸片结果均正常, 临床治愈出院。

2 讨论

三氯异氰尿酸有粉剂及片剂, 目前常用的健之素片含 3%~6% 三氯异氰尿酸, 消毒时配制成水溶液, 其水溶液含游离 Cl⁻, 而粉剂易潮解生成 HCl, 二者对皮肤、黏膜均有较强刺激性。原液使用不当或误服可引起中毒, 皮肤接触可引起红肿、瘙痒; 吸入后表现为咳嗽和气短, 严重时发生肺水肿; 食入后造成黏膜腐蚀, 剧烈灼痛、呕吐、声音嘶哑, 咽喉部水肿, 严重者 2~3 d 后引起消化道穿孔、昏迷和休克。该患者用三氯异氰尿酸粉剂直接倾倒入 50 L 水中, 配制时有白色刺激性药雾吸入, 其浓度为 4%, 远高于普通消毒液要求的浓度 (0.065%~0.26%), 并且患者在配制消毒液及施药过程中无任何个人防护, 致其吸入大量三氯异氰尿酸粉末及原液挥发出的含氯化合物, 直接刺激呼吸道黏膜导致中毒。

本病例在治疗上及时、短程应用了肾上腺糖皮质激素, 减轻了机体对外源刺激物的反应性, 同时给予无创呼吸机辅助通气、雾化吸入、抗感染等综合对症治疗, 急性肺水肿被迅速控制, 患者住院 15 d 后痊愈。

该例再次提示, 使用三氯异氰尿酸时使用者应严格按照说明配制溶液, 同时做好个人防护, 避免此类中毒的发生。