

维生素 E 对三氯乙烯诱导人皮肤角质形成细胞凋亡的保护作用

丁锐, 沈彤, 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 探讨工业有机溶剂三氯乙烯 (trichloroethylene, TCE) 对体外培养人皮肤角质形成细胞 (keratinocyte, KC) 的凋亡诱导作用及抗氧化物质维生素 E (vitamine E, Vit E) 对其保护作用。方法 TCE 组以不同浓度 TCE (0.125、0.50、2.0 mmol/L) 作用于体外培养的人 KC; Vit E 保护组分别采用不同浓度 TCE 和 150 μmol/L Vit E 共同作用于 KC。利用透射电子显微镜和流式细胞仪检测细胞凋亡水平, 并测定细胞 DNA 含量, 计算凋亡发生率及增殖指数 (PI)。结果透射电子显微镜观察可见 TCE 组 KC 出现凋亡改变, 而 Vit E 保护组细胞凋亡改变不明显; 流式细胞仪定量检测可见 TCE 组细胞凋亡率较对照组高, 而增殖指数降低; Vit E 保护组细胞凋亡率比 TCE 作用组低, 而增殖指数升高, 且有统计学意义。结论 TCE 对体外培养人 KC 具有凋亡诱导作用, Vit E 对其具有保护作用。

关键词: 三氯乙烯; 细胞凋亡; 透射电子显微镜; 流式细胞仪; 角质形成细胞

中图分类号: O623.221; R751 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2007)02-0076-03

Protective effect of vitamin E on the apoptosis of human keratinocyte caused by trichloroethylene

DING Rui, SHEN Tong, ZHU Qi-xing*

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

Abstract Objective To explore the apoptosis-inducing effect of trichloroethylene (TCE) on cultured human keratinocyte (KC) and the protective effect of vitamine E (Vit E) on it. **Method** Different concentrations of TCE (0.125 mmol/L, 0.50 mmol/L, 2.0 mmol/L) and mixtures of 150 μmol/L Vit E with different concentrations of TCE mentioned above were added into the cultural media of KC. Transmission electron microscope and flow cytometer were used to observe cell morphologic changes and apoptosis level of KC, meanwhile, DNA contents were also determined for calculating apoptosis rate (AR) and proliferation index (PI). **Result** The results showed that the cells treated with different concentrations of TCE displayed clear morphologic change, while the cells administrated with the Vit E had no certain morphologic change. The flow cytometer study showed that the apoptosis rates of KC were increased and the proliferation indices were decreased in all the TCE treated groups, while the apoptosis rates and proliferation indices in Vit E treated groups were significantly lower and higher compared with the TCE treated groups, respectively. **Conclusion** TCE could induce apoptosis in cultured human KC, while Vit E has definite protective effect on it.

Key words: Trichloroethylene; Apoptosis; Transmission electron microscope; Flow cytometer; Keratinocyte (KC)

三氯乙烯 (trichloroethylene, TCE) 作为工业有机溶剂已得到广泛应用, 其长期暴露可引起严重的皮肤损害^[1,2], 但 TCE 皮肤毒性作用机制目前尚不清楚。文献报道 TCE 对体外培养人皮肤角质形成细胞 (keratinocyte, KC) 具有明显的氧化损伤作用, 而 150 μmol/L 维生素 E (vitamine E, Vit E) 对其损伤可起到有效的保护作用^[3]。本次研究采用不同浓度 TCE 作用于体外培养人 KC, 并利用抗氧化物质 Vit E 作为保护剂, 研究不同浓度 TCE 对体外培养人 KC 的凋亡诱

导作用及 Vit E 的保护作用。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

DMEM 和角质形成细胞无血清培养基 (Keratinocyte-SFM, Cat. No. 17005) 为美国 Gibco 公司产品; 24 孔培养板和 96 孔培养板为美国 Corning 公司产品; TCE、Vit E 为美国 Sigma 公司产品, 其中 TCE 和 Vit E 用丙酮作为助溶剂, 丙酮在培养液中终浓度为 0.1%。鼠尾胶原根据文献 [4] 的方法制备。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 取人体皮肤标本用 0.25% 的胰蛋白酶经低温两步消化分离后进行细胞培养, 待细胞 80% 融合时用于以下实验。具体参见文献 [5]。

1.2.2 染毒及细胞凋亡检测 将 80% 融合的原代 KC 转入铺有鼠尾胶原的 24 孔培养板, 培养 24 h 后换

收稿日期: 2006-10-13; 修回日期: 2006-12-01

基金项目: 国家自然科学基金 (30471469); 安徽医科大学校科研基金 (2005KJ12)

作者简介: 丁锐 (1979-), 男, 讲师, 硕士, 主要从事皮肤毒理学研究。

* 通讯作者。

液。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。TCE组于48 h后加入含0.125、0.50、2.0 mmol/L TCE的培养液^[3]，作用4 h后换为不含TCE的培养液培养至24 h，收集细胞。Vit E保护组使用150 μmol/L Vit E预作用2 h后，换入含不同浓度TCE和150 μmol/L Vit E的混合培养基，作用4 h后换为不含TCE的培养基培养至24 h，收集细胞。然后采用2种方法测定。流式细胞仪测定DNA含量时用YDN9-U9W紫外灯对同一条件培养的KC照射700 s，合计功率15 mW作为阳性对照^[6]。

1.2.2.1 透射电子显微镜检测 通过离心收集细胞，用无菌磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗涤后，用体积分数为2.5%的戊二醛在4℃下固定4~6 h，再用体积分数为1%的锇酸固定1 h，乙醇脱水后用环氧树脂(EPON812)包埋，制成超薄切片，于JEM-1230透射电子显微镜下观察摄片。

1.2.2.2 流式细胞仪检测 收集细胞悬液，PBS洗2次后尼龙网过滤，1000 r/min离心，加入50 μl DNA-Prep LPR混匀，20 s后加入500 μl DNA-Prep Stain混匀，室温下避光染色，30 min后在EPICS XL-MCL

型流式细胞仪(FCM)上测定细胞DNA含量。按下列公式计算细胞凋亡率和增殖指数(proliferation index, PI), $PI = (S + G_2 + M) / (G_1 + S + G_2 + M) \times 100\%$

式中，S：DNA合成期，G₁：分裂前增长期，G₂：分裂后增长期，M：有丝分裂期。

1.2.3 统计方法 实验均进行3次。数据用Excel软件录入，绘图，用SAS6.12软件包进行统计分析。使用的统计方法主要为回归分析和方差分析，显著性水平取P=0.05。

2 结果

2.1 细胞凋亡检测

2.1.1 透射电子显微镜观测 透射电子显微镜观测可见细胞发生形态学改变。正常的细胞核呈卵圆形，核膜完整，可见核仁，胞浆内可见较多透明角质颗粒，扩张的粗面内质网、线粒体等(图1)。而TCE作用的细胞胞浆水肿，细胞器大部分破坏及消失，细胞核染色质靠边聚集呈现凋亡改变，可见凋亡小体形成(图2)。Vit E保护组显示150 μmol/L Vit E与2.0 mmol/L TCE共同作用组细胞核膜模糊，胞浆内可见透明角质颗粒和张力细丝(图3)。

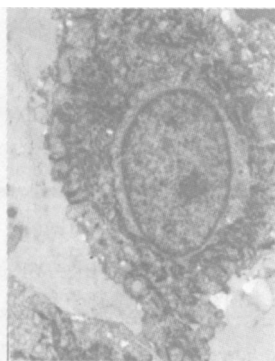


图1 溶剂对照组 ×5000



图2 2.0 mmol/L TCE处理组 ×5000



图3 150 μmol/L Vit E + 2.0 mmol/L TCE组 ×5000

2.1.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率 用流式细胞仪检测经不同浓度TCE染毒4 h的KC的DNA含量，在DNA含量图中可见到G₁期前存在亚二倍体峰，即凋亡峰；溶剂对照组细胞显示较小的凋亡峰，而阳性对照组显示较高的凋亡峰。对细胞凋亡率统计分析显示，各TCE组细胞凋亡率均比溶剂对照组高，经方差分析，差异有统计学意义(P<0.01)，阳性对照组的细胞凋亡率超过72%，且KC凋亡率与TCE染毒浓度呈剂量-反应关系；与TCE组相比，Vit E保护组细胞凋亡水平较低，且差异有统计学意义(P<0.05)，见表1。

2.2 对细胞周期动力学的影响

根据流式细胞仪检测的DNA含量进行细胞周期

表1 TCE染毒及Vit E保护组KC细胞凋亡率(n=4, $\bar{x} \pm s$) %

组别	TCE作用组	150 μmol/L VitE 保护组
空白对照组	18.42 ± 1.33	
溶剂对照组	19.01 ± 1.30	20.08 ± 2.04
TCE 0.125 mmol/L组	31.83 ± 3.08 *	29.98 ± 1.05
TCE 0.50 mmol/L组	38.63 ± 2.84 *	30.65 ± 1.63 △
TCE 2.0 mmol/L组	44.35 ± 2.28 *	33.13 ± 1.86 △
阳性对照组	72.48 ± 4.63 *	

与溶剂对照组比较 *P<0.01; 与TCE作用组比较, △P<0.05
动力学分析, 结果显示, 所有组别的细胞周期各时相分布情况大致相同, 大部分处于G₀/G₁期, 其次为G₂/M期, S期则较少, 表明细胞多数处于静息状态, 增殖状态细胞较少; 但TCE处理组和阳性对照组的

PI 均比溶剂对照组低, 当 TCE 浓度大于 0.50 mmol/L 时, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Vit E 保护组可

见细胞 PI 指数较 TCE 处理组高, 且差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

表 2 TCE 染毒组及 Vit E 保护组体外培养人 KC 周期动力学检测结果 ($n = 4 \bar{x} \pm s$)

组别	TCE 作用组				150 μ mol/L Vit E 保护组				%
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	PI	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	PI	
空白对照组	95.07±1.15	0.97±0.26	3.96±1.51	4.93±0.89	95.07±1.15	0.97±0.26	3.96±1.51	4.93±0.89	
溶剂对照组	95.26±1.94	0.93±0.66	3.81±0.73	4.74±0.63	95.26±1.94	0.93±0.66	3.81±0.73	4.74±0.63	
TCE 0.125 mmol/L 组	97.60±0.75	0.58±0.31	2.71±0.77	3.26±0.81	95.32±1.53	0.92±0.57	3.76±0.86	4.68±0.60 Δ	
TCE 0.50 mmol/L 组	97.45±0.54	0.53±0.30	1.95±0.46	2.48±0.78*	95.51±1.95	0.87±0.31	3.62±0.67	4.49±0.72 Δ	
TCE 2.0 mmol/L 组	97.93±0.85	0.22±0.17	1.85±0.76	2.07±0.88*	95.48±1.64	0.91±0.49	3.61±0.62	4.52±0.58 Δ	
阳性对照组	98.32±1.20	0.32±0.28	1.36±1.01	1.68±0.85*	98.32±1.20	0.32±0.28	1.36±1.01	1.68±0.85 Δ	

与溶剂对照组比较 * $P < 0.05$ 与 TCE 作用组比较, $\Delta P < 0.05$

3 讨论

KC 是机体防护外源性化学物质损伤的第一道防线, 正常情况下 KC 处于增殖与凋亡的平衡状态。当外源化学物引起 KC 氧化应激并超出其承受能力时, 可引起细胞多种成分不可逆的氧化损伤, 导致细胞死亡或细胞凋亡^[7], 增殖与凋亡平衡被打破, 出现多种皮肤损伤。

TCE 作为常用的工业有机溶剂对人体具有毒性作用, 国内外研究表明其对肝、肾、皮肤等组织均具有氧化损伤作用^[8,9]。本课题组在前期实验中已经发现 TCE 对体外培养人 KC 具有氧化损伤作用^[3]。本次研究进一步利用 TCE 对体外培养人皮肤 KC 作用, 通过透射电子显微镜形态学观察和流式细胞仪定量检测, 发现 TCE 对 KC 具有凋亡诱导作用, 细胞周期动力学分析显示 TCE 可以抑制 KC 增殖; 而抗氧化物质 Vit E 的使用可对 TCE 诱导的细胞凋亡起到有效的保护作用, 也反证了 TCE 诱导的 KC 凋亡水平上升可能与其导致细胞氧化应激负荷升高、损伤线粒体、启动线粒体介导的凋亡途径有关。

参考文献:

[1] Nakajima T, Yamanoishi O, Kamijima M, et al. Generalized skin reac-

tions in relation to trichloroethylene exposure; a review from the viewpoint of drug-metabolizing enzymes [J]. J Occup Health, 2003, 45: 8-14.

[2] 夏丽华, 黄汉林, 邱守仁, 等. 三氯乙烯所致药疹性皮炎 50 例临床分析 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2004, 22: 207-209.

[3] 丁锐, 沈彤, 朱启星. 三氯乙烯和四氯乙烯对体外培养人皮肤角质形成细胞脂质过氧化物的影响 [J]. 中国工业医学杂志, 2006, 19 (3): 129-131.

[4] 鄂征. 组织培养和分子细胞技术 [M]. 北京: 北京出版社, 1995: 56.

[5] 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.

[6] Yokoyama S, Nakano H, Yamazaki T, et al. Enhancement of ultraviolet-induced apoptosis by NF- κ B decoy oligonucleotides [J]. British Journal of dermatology, 2005, 153 (Suppl 2): 47-51.

[7] Sandeep R, Brian H R. Mitochondria, Oxygen free radicals, and apoptosis [J]. American Journal of Medical Genetics, 2001, 106: 62-70.

[8] Tomason M, Clark J, Dankovic D, et al. Oxidative Vit E stress and DNA damage in Fisher rats following acute exposure to trichloroethylene or perchloroethylene [J]. Toxicology, 1999, 138: 43-53.

[9] 戴宇飞, 李海山, 孙耀峰, 等. 代谢活化在三氯乙烯对小鼠致敏及肝毒性中的作用 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2005, 19 (5): 378-382.

(上接 71 页)

[8] Quinlan G J, Lamb N J, Tilley R, et al. Plasma hypoxanthine levels in ARDS: implications for oxidative stress, morbidity, and mortality [J]. Am J Respir Crit Care Med, 1997, 155: 479-484.

[9] Segal A W, Abo A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes [J]. Trends Biochem Sci, 1993, 18: 43-47.

[10] Babior B M, Lambeth J D, Nauseef W. The neutrophil NADPH oxidase [J]. Arch Biochem Biophys, 2002, 379: 342-344.

[11] Fan jie, Frey Randalls, Malik Asrar B. TLR4 signaling induced TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase [J]. Clin Invest, 2003, 112 (8): 1234-1243.

[12] Tampo Y, Tsukamoto M, Yonaha M. Superoxide production from paraquat evoked by exogenous NADPH in pulmonary endothelial cells [J]. Free Radic Biol Med, 1999, 27 (5-6): 588-595.

[13] Zalba G, Jose G S, Moren M U, et al. Oxidative stress in arterial hypertension. Role of NADPH oxidase [J]. Hypertension, 2001, 38:

1395-1399.

[14] Sanders K A, Huecksteadt T, Xu P, et al. Regulation of oxidant production in acute lung injury [J]. Chest, 1999, 116: 56-61S.

[15] Jemigan T W, Croce M A, Fabian T C. Apoptosis and necrosis in the development of acute lung injury after hemorrhagic shock [J]. Am Surg, 2004, 70 (12): 1094-1098.

[16] Mei S, Yao Y, Zhu Y J, et al. Protection of Pifenidone against an early phase of oleic acid induced acute lung injury in rats [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 313 (1): 379-388.

[17] 陈莉, 赵金垣. 油酸型急性呼吸窘迫综合征肺血液流变学变化及其意义探讨 [J]. 中国工业医学杂志, 2000, 13 (3): 129-131.

[18] 陈莉, 赵金垣. 急性呼吸窘迫综合征纤维蛋白原水平的变化及其意义初探 [J]. 中华内科杂志, 2000, 39 (6): 474-475.

[19] 刘和亮, 赵金垣. 化学性急性肺损伤时肺内皮细胞及血液流变学的实验研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2003, 21 (1): 37-40.