

TCE致皮肤角质形成细胞凋亡机制 及银杏叶提取物的保护作用

戴丹, 沈彤, 于均峰, 俞韵, 朱启星*

(安徽医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系, 安徽 合肥 230032)

摘要: 目的 研究有机溶剂三氯乙烯 (TCE) 致角质形成细胞凋亡作用及其与凋亡诱导因子 (AIF) 的关系。方法 将 45只 BALB/c 裸鼠随机分为空白对照组、溶剂对照组 (橄榄油)、20% TCE、40% TCE、80% TCE、100% TCE 组、0.1% 银杏叶提取物 (GbE) 保护组、1% GbE 保护组和 10% GbE 保护组; 皮肤染毒, 保护组为先用 GbE 涂皮后 1 再涂抹 TCE。小鼠均于涂抹 TCE 24 h 后处死, 无菌条件下取皮, 制成蜡块后切片, 应用原位末端标记免疫化学法 (TUNEL) 检测细胞凋亡, 应用免疫组化法检测皮肤组织 AIF 的表达。结果 40% TCE、80% TCE 和 100% TCE 组凋亡指数和 AIF 活性与空白组和溶剂对照组差异有统计学意义 ($P < 0.01$), TCE 浓度越高, 凋亡指数越高, AIF 的表达水平也越高; 1% GbE 和 10% GbE 保护组凋亡指数和 AIF 活性与 100% TCE 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 AIF 可能参与了 TCE 诱导的裸鼠皮肤角质形成细胞凋亡, 而 GbE 则对此显示出一定的保护作用。

关键词: 三氯乙烯; 银杏叶提取物; 凋亡诱导因子

中图分类号: R135.7 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2008)06-0354-04

Apoptotic mechanism of keratinocyte by trichloroethylene and protective effect of ginkgo biloba leaf extract on it

DAIDan, SHEN Tong, YU Jun feng, YU Yun, ZHU Qi xing

(Department of Occupational and Environmental Health School of Public Health Anhui Medical University Hefei 230032 China)

Abstract: Objective To explore the apoptotic effect of trichloroethylene (TCE) on keratinocytes and the relationship with apoptosis inducing factor (AIF). Methods Forty-five BALB/c nude mice were randomly divided into nine groups, which are blank control, solvent control (olive oil), 20% TCE group, 40% TCE group, 80% TCE group, 100% TCE group, 0.1% ginkgo biloba leaf extract (GbE) group, 1% GbE group and 10% GbE group. Mice of the protective groups was pre-treated by skin smearing with GbE at 1 h before TCE-smearing. All the mice were killed 24 h later after TCE-smearing, the skin was taken under sterile conditions. Apoptotic cells were detected by TUNEL method, and the expression of AIF was detected by immunohistochemical method. Results The AIF activity and the apoptotic indices in 40% TCE group, 80% TCE group and 100% TCE group were significantly differed from blank control group and solvent control group ($P < 0.01$). The higher the concentration of TCE treated, the higher the apoptosis index and the AIF activity. The AIF activities and the apoptosis indices of 1% GbE group and 10% GbE group were significantly differed from 100% TCE group ($P < 0.05$). Conclusions It was suggested that AIF may be involved in the apoptosis of keratinocytes induced by TCE, and GbE has the protective effect on it.

Key words: Trichloroethylene (TCE); Apoptosis; Apoptosis inducing factor (AIF); Ginkgo biloba leaf extract

三氯乙烯 (TCE) 可引起机体的神经系统, 肝脏、肾脏和肺脏等器官损害以及具有致癌作用^[1,2]。此外, 还可引起皮肤损害, 急性损害主要表现为严重的药疹样皮炎, 存在个体特异性; 慢性损害则是对直接接触部位产生去脂化改变, 皮肤出现烘焦状干燥、角化不全、皲裂、剥脱、脱发等原发性损害, 一般不存在个体差异。我们前期研究表明三氯乙烯可以引起

明显的刺激性皮炎^[3~5]、皮肤角质形成细胞凋亡^[6~8]。凋亡诱导因子 (apoptosis inducing factor, AIF) 是一种主要的凋亡效应蛋白, 在体外可以诱导染色质凝聚以及 DNA 大规模片段化的形成^[9], 其前体分子质量为 67 kDa, 由胞浆进入线粒体后被截短为 57 kDa 的成熟分子, 锚定于线粒体内膜^[10], 在正常生理状态下作为 NADH 氧化酶发挥作用。在某些凋亡诱导因素刺激下, 可以作为 DNA 内切酶与核酸外切酶 G 协同诱发染色质凝集和 DNA 断裂, 产生长度约 50 kb 的片段, 引起不依赖 caspase 的细胞凋亡, 在促进凋亡的过程中起着重要作用^[11,12]。本次研究应用 TUNEL 法和免疫组织化学法观察三氯乙烯染毒

收稿日期: 2008-07-16 修回日期: 2008-09-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30671787); 安徽省人才开发资金资助项目 (2004Z032)

作者简介: 戴丹 (1984-) 男, 硕士生, 研究方向: 皮肤毒理学。

*: 通讯作者, 男, 教授, 博士生导师。

的裸鼠皮肤组织中细胞凋亡和 AIF 的表达情况, 并研究 GbE 的保护作用, 探讨 AIF 在 TCE 诱导的角质形成细胞凋亡中的作用。

1 材料与方法

1.1 试剂

三氯乙烯 (Sigma 公司产品), 银杏叶提取物 (江苏扬子江药业生产), 橄榄油 (中国医药上海化学试剂公司生产), TUNEL 试剂盒 (Roche 公司产品), AIF 抗体 (工作液) 由 Lab-Vision 公司生产, 链霉素抗生素 过氧化酶 (S-P) 法试剂盒由福州迈新生物有限公司生产。

1.2 实验动物 成年 BALB/c 裸鼠 [上海市斯莱克动物实验有限责任公司, 实验动物质量许可证: 3CXK (沪) 2003-0003], 选用健康状况良好、体重范围为 20~30 g 雌性成年 BALB/c 裸鼠, 实验环境为 SPF 清洁级动物房, 实验室认可编号: 安徽医动字第 010 号。

1.3 方法

1.3.1 剂量与分组 将 45 只雌性 BALB/c 裸鼠, 随机分成空白对照组、溶剂对照组 (橄榄油)、20% TCE、40% TCE、80% TCE、100% TCE、0.1% GbE 保护组、1% GbE 保护组和 10% GbE 保护组 (5 只/组)。

1.3.2 动物处理和皮肤标本采集 将受试物涂到裸鼠 2.5 cm×2.5 cm 大小的背部皮肤上, 用无刺激性的塑料膜和胶布固定, 24 h 后用生理盐水清洗裸鼠背部皮肤除去受试物。保护作用研究是先将 100 μl 不同浓度的 GbE 涂至裸鼠背部皮肤, 1 h 后再将 100 μl 100% TCE 涂到同样的皮肤位置, 敷用时间为每次 4 h 之后用生理盐水除去残留受试物, 染毒 24 h 实验结束后将裸鼠迅速处死, 无菌条件下取染毒的皮肤。

1.3.3 细胞凋亡检测 采用原位末端标记 (TUNEL) 组织化学检测法。石蜡切片常规脱蜡、水化、蛋白酶 K 抗原修复, 0.1% TritonX-100 作用 5 min, 滴加 50 TUNEL 反应混合物 37 °C 孵育 1 h 以 PBS 代替反应混合物作为阴性对照, 以 DNase I 处理的切片作为阳性对照, PBS 洗涤后加入转化剂 POD 孵育冲洗后 DAB 显色, 苏木素复染, 常规脱水、透明、封片。

1.3.4 AIF 检测 将组织进行常规石蜡包埋, 然后连续切片, 经过梯度乙醇脱蜡、水化, 按照试剂说明书结合免疫组化 S-P 法进行实验, 以 PBS 代替一抗作为阴性对照, 操作过程中均用 PBS 冲洗。

1.4 结果判定

1.4.1 细胞凋亡检测结果判定 由病理医师根据染色和细胞核形态鉴定凋亡细胞。显微镜下 (400 倍) 随机选取 5 个视野, 分别计数 100 个细胞, 以凋亡细胞的平均值作为凋亡指数。

1.4.2 AIF 检测结果判定 本实验采用 DAB 显色, 苏木素复染, AIF 表达在细胞浆, 部分可在细胞核。根据阳性细胞浆所占的面积及染色强度比较不同剂量组所测抗原的表达情况, 计算阳性部位在整个视野下的百分比, 求出平均值。阳性细胞数 < 5% 为阴性, 5%~25% 为 1 分, 26%~50% 为 2 分, 51%~75% 为 3 分, > 75% 为 4 分。阳性强度以淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分, 两者相加为最后评分结果。

1.5 统计分析

用 SPSS 11.0 软件进行分析, 各组间的差异用单因素方差分析, 采用 LSD 法, P 值取 0.05。

2 结果

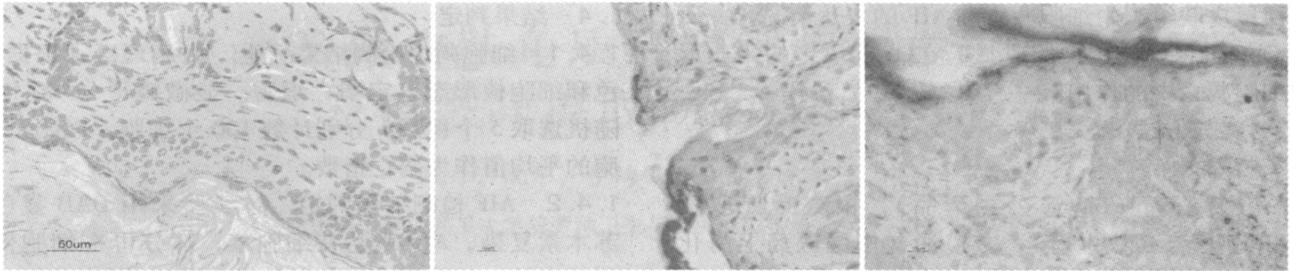
2.1 各组的凋亡指数

TUNEL 法检测细胞凋亡结果见表 1 和图 1。正常皮肤组织仅可见少量凋亡细胞, 低剂量组凋亡指数较低, 高剂量组凋亡指数较高。20% TCE 剂量组与溶剂对照组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 细胞凋亡指数较低; 40% TCE、80% TCE 和 100% TCE 剂量组与溶剂对照组的差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 细胞凋亡指数比溶剂对照和空白对照组高, 细胞凋亡率高。0.1% GbE 保护组与 100% TCE 组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 1% GbE 保护组和 10% GbE 保护组与 100% TCE 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明银杏叶提取物在低剂量不具有保护作用, 1% 和 10% 浓度的 GbE 有保护作用。

表 1 各实验组凋亡指数和 AIF 评分值 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	凋亡指数	AIF 评分
空白对照	5	1.12 ± 0.32	0.60 ± 0.38
溶剂对照	5	1.24 ± 0.59	0.90 ± 0.34
20% TCE	5	2.16 ± 0.95	1.70 ± 0.67
40% TCE	5	6.36 ± 0.95*	6.00 ± 0.70*
80% TCE	5	8.70 ± 0.67*	5.60 ± 1.06*
100% TCE	5	9.00 ± 1.37*	4.60 ± 0.76*
0.1% GbE+100% TCE	5	6.20 ± 0.83	5.80 ± 0.84
1% GbE+100% TCE	5	5.40 ± 0.54#	3.00 ± 0.70#
10% GbE+100% TCE	5	2.80 ± 0.44#	1.80 ± 0.44#

与空白对照组和溶剂对照组比较, * $P < 0.01$; 与 100% TCE 组比较, # $P < 0.05$



空白对照组

40% TCE组

1% GbE+ 100% TCE组

图 1 不同剂量 TCE和保护组 TUNEL法检测结果

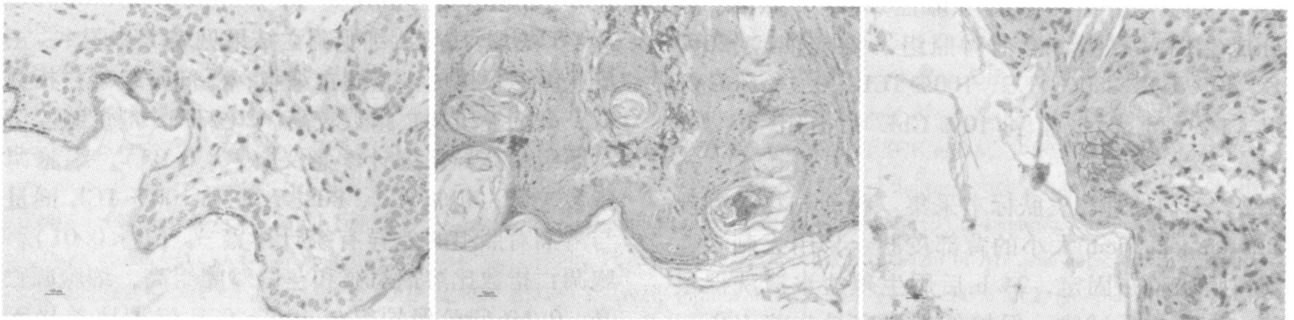
2.2 各组的 AIF表达情况

从图 2可见,在高浓度 TCE刺激下,有大量的 AIF释放到细胞质溶质中去,在 20% TCE组, AIF阳性反应物颜色比较淡,同对照组相似。各组表皮 AIF的表达根据阳性细胞染色强度和阳性面积的百分比进行评分,结果见表 1。溶剂对照组与空白对照组、20% TCE剂量组与空白对照组和溶剂对照组的差异无统计学意义 ($P = 0.16$); 40% TCE、80% TCE、100% TCE组与空白对照组和溶剂对照组相比较差异

有统计学意义 ($P < 0.01$); 40% TCE的表达高于 100% TCE。0.1% GbE保护组与 100% TCE组相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 1% GbE保护组和 10% GbE保护组与 100% TCE组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$),表明银杏叶提取物在 1%以上剂量有保护作用。

2.3 凋亡指数与 AIF表达之间的相关性

通过相关分析,凋亡指数与 AIF表达的相关系数 $r = 0.46$ $P < 0.05$ 。



空白对照组

40% TCE组

1% GbE+ 100% TCE组

图 2 不同剂量 TCE和保护组免疫组化检测结果

3 讨论

TCE作为一种工业上常用的清洗剂,手工操作时与皮肤直接接触,从而引起的损伤也比较常见。皮肤角质层作为机体接触外源化合物的第一道防线,其凋亡异常往往与皮肤病的发生和发展有密切关系。本次实验发现,凋亡指数随 TCE浓度增加而升高,40% TCE、80% TCE和 100% TCE剂量组与空白对照组和溶剂对照组的差异有统计学意义,表明 TCE引起了角质形成细胞的凋亡。AIF是一种凋亡效应分子,可直接介导独立于 caspase 之外的细胞凋亡途径。在 TCE染毒后, AIF表达升高,其与凋亡指数之间的相关系数为 0.46 说明 AIF在 TCE所致的角质形成细胞凋亡中可能起着重要作用。1% GbE保护组和 10% GbE保护组凋亡指数和 AIF活性与 100% TCE组相比差异有统计学意义,提示 GbE在 1%和 10%浓度时

对 TCE所致的凋亡有保护作用。其保护机制可能是通过抑制 AIF活性,也可能是其抗氧化作用的原因,确切机制还有待进一步研究。

以前的研究发现, TCE引起的早期皮肤损伤与细胞凋亡有较大的关系,其机制是以线粒体介导的内部凋亡途径为主。本次实验发现,在 TCE染毒裸鼠中发生了 AIF诱导的角质形成细胞凋亡。因此我们提出假设,将来通过小的 AIF激活或抑制分子来探索调控 AIF功能,能否对 AIF诱导的凋亡产生抑制作用从而抑制凋亡,本次研究为防治 TCE所致的职业性皮肤病损伤提供了实验依据和新的思路。

参考文献:

[1] Mundt K A, Birk T, Burch M T. Critical review of the epidemiological literature on occupational exposure to perchloroethylene and cancer [J]. Int Arch Occup Environ Health, 2003, 76 (7): 473-491

(下转第 374 页)

2.2 中毒程度对心电图改变的影响

按照国家《职业性急性砷化氢中毒诊断标准》将 33 例患者分成轻、中、重 3 组。轻度中毒者的心电图异常率明显低于中、重度者, 见表 2。

表 2 不同程度中毒者的心电图改变

中毒程度	检查人数	异常人数	异常率 (%)
轻度	11	6	54.55*
中度	5	5	100.00
重度	17	17	100.00
合计	33	28	84.85

与中、重度者比较, * $P < 0.01$

2.3 年龄对心电图改变的影响

将患者分为 ≤ 39 岁组 (21 例) 和 ≥ 40 岁组 (12 例), 结果低年龄组心电图异常 16 例, 占 76.19%, 高年龄组心电图全部出现异常改变, 两组异常率比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.4 出院时的心电图结果

33 例患者经住院治疗, 出院时有 31 例患者表 1 中前 6 项指标恢复正常, 2 例死亡。

3 讨论

砷化氢的毒作用主要为溶血, 直接引起肾脏、肝脏等多脏器损害, 但砷化氢亦可因直接毒作用和缺氧缺血原因导致心肌等脏器损害^[2]。急性砷化氢中毒可引起心脏乳头肌及间质散在出血, 肌纤维断裂, 灶性水肿及炎症等病理变化^[3]。本组有 5 例出现左心室肥大 (高电压), 可能与左心室心肌变性及水肿有关, 经治疗后恢复。严重溶血时可导致机体缺氧, 由于心肌缺氧缺血, 能量供应不足和酸中毒, 使心肌细胞内钠钾泵功能下降, 局部心电生理改变, 心肌电不稳定, 引起心肌损害。另外, 急性砷化氢中毒影响神经体液因素, 使心肌体液调节功能紊乱, 交感神经和儿茶酚胺作用增强, 能量

代谢障碍, 影响窦房结和心肌细胞的膜电位, 干扰了心脏的起搏点及传导系统和心肌的自律性, 致使心电图出现房性和室性期前收缩、束支传导阻滞、窦性心动过速、窦性心动过缓、ST-T 改变等心电图异常表现^[4-6]。本组有 2 例重度以上中毒者心电图表现为完全性左束支传导阻滞, 异常 Q 波, Pt Fv1 阳性, 室性心动过速, 最后出现室颤而死亡。其原因是急性肾功能衰竭和急性溶血性贫血, 导致高钾 (血钾 7.8 mmol/L), 出现了致命性心律失常。

综上所述, 急性砷化氢中毒能引起心脏损害。所以, 在抢救急性砷化氢中毒时, 在有效控制溶血和防治肾功能衰竭的同时, 要特别注意保护心肌, 注意监测心肌酶及心电图变化, 进行心电监护, 及时发现心肌损害及严重心律失常, 了解患者心脏损害的情况, 适时使用营养心肌和抗心律失常的药物, 预防心室颤动, 对临床救治具有积极意义。本组病例的心电图改变, 与患者中毒程度、年龄有一定关系。但由于病例数有限, 未能进一步分析各年龄组不同中毒程度者的心电图特点, 尚需不断积累病例资料。

参考文献:

- [1] 王佩丽. 实用急性中毒全书 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 104.
- [2] 王炳森, 冯怡. 砷化氢中毒性心肌病变 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2000, 18 (5): 303.
- [3] 林洁明. 急性重度砷化氢中毒心、肝、肾超声显像 11 例报告 [J]. 中国工业医学杂志, 1997, 10 (3): 191.
- [4] 向红菊, 王福军. 急性砷化氢中毒的心脏损害 [J]. 心血管康复医学杂志, 2003, 12 (5): 452.
- [5] 冯三畏, 周群, 李海玲, 等. 急性一氧化碳中毒心肌损害 78 例 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2006, 24 (5): 306.
- [6] 向芝青, 赵菊霞, 蒋勇. 急性氯气中毒心电图 334 例分析 [J]. 心电学杂志, 2002, 21 (1): 29.

(上接第 356 页)

- [2] Forkert P G. Mechanisms of 1,1-dichloroethylene induced cytotoxicity in lung and liver [J]. Drug Metab Rev 2001, 33 (1): 49-80.
- [3] Zhu Q X, Shen T, Zhang X J et al. Cytotoxicity of trichloroethylene and perchloroethylene on normal human epidermal keratinocytes and protective role of vitamin E [J]. Toxicology 2005, 209 (1): 55-67.
- [4] Zhu Q X, Shen T, Zhang X J et al. Protective effects of ginkgo biloba leaf extracts on trichloroethylene induced human keratinocyte cytotoxicity [J]. Skin Pharmacology and Physiology 2005, 18: 160-169.
- [5] 于均峰, 俞韵, 张军, 等. 三氯乙烯对裸鼠皮肤的刺激性损伤及维生素 E 的保护作用 [J]. 中国工业医学杂志, 2006, 19 (2): 78-80.
- [6] 丁锐, 沈彤, 朱启星. 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 [J]. 中国工业医学杂志, 2007, 20 (2): 76-78.
- [7] 沈彤, 丁锐, 涂登云, 等. 银杏叶提取物对三氯乙烯诱导的人角

- 质形成细胞凋亡的影响 [J]. 毒理学杂志, 2006, 20 (4): 212-215.
- [8] 沈彤, 马泰, 丁锐, 等. 三氯乙烯诱导皮肤角质形成细胞凋亡的体外研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2005, 23 (5): 347-350.
- [9] Daugas E, Susin S A, Zanzani N et al. Mitochondrion nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis [J]. The FASEB Journal 2000, 14: 729-739.
- [10] Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z et al. Export of mitochondria AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the inner membrane space [J]. EMBO J 2005, 24 (7): 1375-1386.
- [11] Ishitsuka K, Hideshima T, Hamasaki M. Novel inosine monophosphate dehydrogenase inhibitor VX-94 induces apoptosis in multiple myeloma cells primarily via caspase-independent AIF/Endo G pathway [J]. Oncogene 2005, 24 (38): 5888-5896.
- [12] Pankaj J, Wang W, Akins M B et al. The Raf inhibitor BAY 43-9006 (Sorafenib) induces caspase independent apoptosis in melanoma cells [J]. Cancer Res 2006, 66 (3): 1611-1619.