

IL-6和 IL-8在三氯乙烯致敏豚鼠血清中的变化

汪亮^{1,2}, 汪立杰¹, 戴丹¹, 沈彤¹, 朱启星^{1*}

(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 昆山市卫生监督所, 江苏 昆山 215300)

摘要: 目的 通过豚鼠致敏最大值试验 (Guinea Pig Maximization Test, GMT) 方法建立豚鼠致敏模型, 检测并比较 TCE致敏豚鼠与未致敏豚鼠血清中 IL-6和 IL-8的水平, 探讨 IL-6和 IL-8在三氯乙烯 (TCE) 过敏性皮炎中的作用。方法 将豚鼠随机分为空白对照组, 溶剂 (橄榄油) 对照组, DNCB阳性对照组和 TCE处理组。采用 GMT法建立豚鼠致敏模型。根据致敏结果及末次激发后采血的不同时点将 TCE处理组分为 TCE未致敏 24 h组, TCE致敏 24 h组, TCE未致敏 72 h组, TCE致敏 72 h组。用 ELISA试剂盒测定血清中 IL-6和 IL-8的含量。结果 DNCB组致敏率为 100%, TCE组致敏率为 62%。溶剂对照组与空白对照组差异均无统计学意义。与溶剂对照组相比, TCE未致敏 24 h组 IL-6水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), TCE未致敏 72 h组与 TCE未致敏 24 h组相比, IL-6水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与溶剂对照组相比, TCE未致敏 72 h组 IL-8水平明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 血清中细胞因子 IL-6和 IL-8水平在 TCE诱导的致敏组和未致敏组豚鼠间, 仅个别时间段的差异有统计学意义, 提示两者可能仅在一定时间段中发挥作用。

关键词: 三氯乙烯; 白细胞介素-6 白细胞介素-8

中图分类号: R758.22 C623.221 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2010)02-0086-03

Variation of IL-6 and IL-8 levels in serum of guinea pigs sensitized by trichloroethylene

WANG Liang^{1,2}; WANG Li-jie¹; DAIDan¹; SHEN Tong¹; ZHU Qi-xing^{1*}

(1 Department of Occupational and Environmental Health, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2 Kunshan Municipal Agency for Public Health Inspection, Kunshan 215300, China)

Abstract: Objectives The animal model was established by Guinea Pig Maximization Test (GMT) methods, then detected and compared the serum levels of IL-6 and IL-8 between trichloroethylene (TCE) sensitized guinea pigs and control guinea pigs for exploring the role of IL-6 and IL-8 in the pathogenesis of TCE dermatitis. Methods Guinea pigs were randomly divided into blank control group, solvent (olive oil) control group, DNCB positive control group and TCE group, and the TCE group was subdivided into TCE sensitized 24h, 72h subgroups and non-sensitized 24h, 72h subgroups by GMT method. The serum levels of IL-6 and IL-8 were measured by ELISA kits. Results The results showed that the sensitized rates were 100% in DNCB positive control group, 62% in TCE group, respectively. The serum levels of IL-6 and IL-8 were no obvious difference between blank control group and solvent control group, while there was a significant decrease between TCE non-sensitized 24h group and solvent control group or TCE non-sensitized 72h group ($P < 0.05$); meanwhile, there was also a significant decrease of IL-8 in TCE non-sensitized 72h group compared with solvent control group ($P < 0.05$). Conclusions The results showed that the significant differences of the serum levels of IL-6 and IL-8 between TCE-induced sensitized guinea pigs and non-sensitized guinea pigs can only be seen in some time during the experimental process, which suggested that IL-6 or IL-8 plays its role in the TCE sensitization only in a certain time.

Key words: trichloroethylene; interleukin-6 (IL-6); interleukin-8 (IL-8)

三氯乙烯 (trichloroethylene, TCE) 是一种工业上常见的有机溶剂。上世纪 90年代至今, TCE接触工人出现“三氯乙烯药疹样皮炎” (dermatitis medicamentosa like of trichloroethylene, DMLT) 的病例时

有报道^[1]。DMLT的发病机制尚不明确, 目前多认为是 T淋巴细胞介导的迟发型 IV型变态反应^[2]。但也有研究表明^[3], TCE可作为变应原启动机体的免疫反应, 诱导免疫细胞和炎性细胞产生大量细胞因子, 从而调节免疫应答, 介导炎症反应的发生和发展。本研究通过检测 TCE致敏豚鼠血清中 IL-6和 IL-8的水平, 分析 IL-6和 IL-8在三氯乙烯引起的免疫损伤中的作用, 探索 DMLT的发病机制。

1 材料与方法

收稿日期: 2009-09-28 修回日期: 2009-12-15

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30671787, 30872147); 安徽省教育厅自然科学基金重点项目 (2009KJ0362D)

作者简介: 汪亮 (1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 皮肤毒理学。

*. 通讯作者, 男, 教授, 博士生导师

1.1 试剂

三氯乙烯、FCA为Sigma公司产品, 橄榄油为中国医药上海化学试剂公司产品, 豚鼠 IL-6 和 IL-8 ELISA试剂盒为美国 RB公司产品 (北京尚博生物有限公司进口分装)。

1.2 动物饲养及分组

将体重为 250~300 g 的白色雌性豚鼠饲养于安徽医科大学动物中心, 采用豚鼠专用饲料喂养, 适应性饲养 5~7 d 后, 每 3 d 称量一次体重。将豚鼠随机分成空白对照组 (5 只)、溶剂对照组 (5 只)、TCE 试验组 (29 只) 和 DNCB 阳性对照组 [15 只, 其中末次激发后 24 h 试验组 (DNCB 24 h 组) 7 只, 72 h 试验组 (DNCB 72 h 组) 8 只]。根据致敏结果 (表 1), TCE 试验组有 18 只动物致敏, 将致敏动物随机分为两组: TCE 致敏 24 h 组 (9 只) 和 TCE 致敏 72 h 组 (9 只), 分别在末次激发后 24 h、72 h 采血检测。同样, 将未致敏组也分为 TCE 未致敏 24 h 组 (5 只) 和 TCE 未致敏 72 h 组 (6 只)。

1.3 豚鼠致敏模型的建立

用松下 ER333R 型儿童专用电动剃刀, 试验前 24 h 剃除动物背部大小约 4 cm×6 cm 的毛发。采用豚鼠最大反应试验 (GMT) 方法建立致敏模型: 第 1 天 TCE 实验组和 DNCB 阳性对照组分别注射 5% TCE (TCE 橄榄油 = 5:95) 和 0.25% DNCB (DNCB 丙酮 橄榄油 = 1:3:397) 进行初次致敏, 空白对照组和溶剂对照组分别注射赋形剂和橄榄油; 第 8 天, TCE 组用 40% TCE 阳性对照组用 0.5% DNCB 涂皮, 然后用两层纱布, 一层玻璃纸覆盖, 无刺激胶布封固 48 h 进行第二次诱导致敏。空白对照组仅用赋形剂作诱导处理, 溶剂对照组涂橄榄油, 48 h 后用生理盐水清洗; 第 15 天, TCE 组用 20% TCE 阳性对照组用 0.25% DNCB 涂抹进行激发, 方法同上, 24 h 后用生理盐水清洗, 观察皮肤反应。

1.4 视觉评分

在豚鼠致敏模型末次激发后 24 h 依据《化学品毒性鉴定技术规范》(卫监督发【2005】272 号) 观察和记录豚鼠背部受试区的皮肤反应情况, 进行评分。当试验组动物皮肤反应积分 ≥ 1 时, 判断为皮肤致敏反应阳性。

1.5 血液采集与细胞因子的测定

采用心脏采血的方法, 用真空管采集血液, 制备血清。用豚鼠双抗夹心 ELISA 试剂盒测定血清中 IL-6 和 IL-8 的含量。

1.6 统计分析

所得数据采用 SPSS12.0 软件处理, 用 χ^2 检验进行显著性检验, 方差分析进行组间比较, 检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 豚鼠体重变化

在整个试验过程中豚鼠的健康状态良好, 每隔 3 d 对体重检测的结果显示, 各组豚鼠的体重均在 250~310 g 之间, 随着饲养时间的延长豚鼠的体重稍有增加, 但变化不明显。

2.2 皮肤致敏反应视觉评分

皮肤反应评分结果如表 1 所示。在本次致敏试验中, 空白对照组和橄榄油组均未见红斑或水肿, 而 TCE 试验组的部分豚鼠皮肤出现红斑和水肿, DNCB 阳性对照组则出现明显红斑或水肿。结果显示 TCE 组 29 只动物共有 18 只豚鼠皮肤反应积分 ≥ 1, 判为皮肤致敏反应阳性, 致敏率为 62.1%。

表 1 各组动物皮肤反应视觉评分

组别	总动物数	各积分动物数				致敏率 (%)
		积分 0	积分 1	积分 2	积分 3	
空白对照组	5	5	0	0	0	0
溶剂对照组	5	5	0	0	0	0
TCE 处理组	29	11	7	7	4	62.1
DNCB 组	15	0	2	7	6	100.0

2.3 TCE 致敏豚鼠血清中 IL-6、IL-8 水平检测结果

与溶剂对照组相比较, TCE 未致敏 24 h 组 IL-6 水平明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 TCE 未致敏 24 h 组比较, TCE 未致敏 72 h 组血清 IL-6 水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与溶剂对照组相比, TCE 72 h 未致敏组 IL-8 水平明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

表 2 不同组别豚鼠血清中 IL-6 和 IL-8 水平 ($\bar{x} \pm s$) pg/ml

组别	动物数	IL-6	IL-8
空白对照组	5	77.772 ± 39.367	40.405 ± 18.169
溶剂对照组	5	84.426 ± 43.287	35.244 ± 11.931
TCE 24 h 致敏组	9	73.914 ± 30.954	27.252 ± 19.079
TCE 24 h 未致敏组	5	38.462 ± 12.564*#	23.895 ± 10.617
TCE 72 h 致敏组	9	113.393 ± 58.363	39.494 ± 19.858
TCE 72 h 未致敏组	6	67.090 ± 17.527 Δ	19.981 ± 0.904*
DNCB 24 h 组	7	60.547 ± 13.139	26.698 ± 10.859
DNCB 72 h 组	8	67.362 ± 18.133	36.194 ± 17.564

注: 与溶剂对照组相比, * $P < 0.05$ 与 TCE 24 h 致敏组相比, # $P < 0.05$ 与 TCE 24 h 未致敏组相比 $\Delta P < 0.05$ 。

3 讨论

细胞因子是具有高度生物学效应的物质, 它们互相诱导受体表达, 互相调节影响彼此的生物学活性,

组成了一个功能复杂的细胞因子网络。正常情况下它们在机体内保持一种相对平衡,一旦外来异物(如病毒感染)打破这种平衡时,就会诱导免疫应答和炎症反应的发生,影响疾病的发生发展。

IL-6是一种多功能细胞因子,可刺激细胞生长,促进细胞分化和增殖,并能加速肝细胞急性期蛋白的合成^[4],在变态反应性接触性皮炎(ACD)中应低表达。IL-6可以诱导 IL-10的产生,IL-10则可以抑制 ACD反应^[5]。但是有报道表明,IL-6是 ACD早期阶段的炎症前介质,对 ACD的发病起重要作用,IL-6基因缺乏(IL-6^{-/-})的小鼠在强化化学接触性致敏原的作用下不能产生 ACD,但是将这样的小鼠注射小鼠重组 IL-6以后则可以产生显著的 ACD反应^[6,7]。

IL-8是一个多种细胞来源的趋化性细胞因子,IL-8能趋化和激活中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和 T淋巴细胞,动物腹腔或静脉注射 IL-8可引起外周血中性粒细胞数量的增加。IL-8可使中性粒细胞外形改变,促进其脱颗粒,激活中性粒细胞并使其产生呼吸爆发(respiratory burst)、释放超氧化物(O₂⁻、H₂O₂)和溶酶体酶;局部注射 IL-8可趋化中性粒细胞,并刺激中性粒细胞产生白三烯 B₄(LTB₄)而使皮下血浆渗出;IL-8还可刺激释放组织胺,可能与速发型超敏反应的发生有关。

本研究结果显示,溶剂对照组 IL-6和 IL-8水平与空白对照组相比差异无统计学意义,且 TCE 24 h致敏组、TCE 72 h致敏组、DNCB 24 h组及 DNCB 72 h组血清 IL-6和 IL-8水平与溶剂对照组相比,差异均无统计学意义(P>0.05),提示豚鼠血液中细胞因子 IL-6和 IL-8在皮肤致敏反应前后变化并不明显。然而,TCE 24 h未致敏组 IL-6水平较 TCE 24 h致敏组低,TCE 72 h未致敏组 IL-8水平较 TCE 72 h致敏组

低,且差异有统计学意义(P<0.05),提示细胞因子 IL-6和 IL-8在豚鼠致敏反应的不同阶段虽发挥一定作用,但意义不大。

综上所述,通过对 TCE致敏的豚鼠血清中 IL-6、IL-8水平的检测,发现在 TCE皮肤致敏过程中,细胞因子 IL-6和 IL-8在 TCE诱导的致敏组豚鼠和未致敏组豚鼠血清中,其水平仅在个别时间段差异有统计学意义。另外,TCE除了作为抗原具有致敏作用外,还具有刺激作用,可对角质形成细胞产生明显的细胞毒性作用和凋亡诱导作用^[8]。

参考文献:

- [1] 夏丽华, 黄汉林, 邱守仁, 等. 三氯乙烯药疹样皮炎 50例临床分析 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2004, 22 (3): 207-210
- [2] Field A C, Bloch M F, Bellon B. Neonatal tolerance to a Th2-mediated autoimmune disease generates CD8+ Tq regulatory cells [J]. J Autoimmun 2003, 21 (3): 201-212
- [3] 越飞, 李来玉, 梁丽燕, 等. 三氯乙烯染毒小鼠免疫功能变化研究 [J]. 中国职业医学, 2004, 31 (3): 72-73
- [4] Francesco A, Emanuela L, Cristina P, et al. Interleukin-6 impairs the insulin signaling pathway promoting production of nitric oxide in human umbilical vein endothelial cells [J]. Mol Cell Biol 2007, 27: 2372-2383
- [5] Gräbe S, Schwarz T. Immunoregulatory mechanisms involved in elicitation of allergic contact hypersensitivity [J]. Immunol Today 1998, 19: 37-44
- [6] Westphal G A, Schnuch A, Moessner R, et al. Cytokine gene polymorphisms in allergic contact dermatitis [J]. Contact Dermatitis 2003, 48: 93-98
- [7] Nishimura N, Tohyama C, Sato M, et al. Defective immune response and severe skin damage following UVB irradiation in interleukin-6-deficient mice [J]. Immunology 1999, 97: 77-83
- [8] Zhu D 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.

卫生部批准发布 10项国家职业卫生标准

2010年 3月 11日, 卫生部发布通告(卫通[2010] 6号), 批准发布了 9项强制性国家职业卫生标准, 1项推荐性国家职业卫生标准, 这些标准将于 2010年 10月 1日起实施。自实施之日起, GBZ8-2002, GBZ35-2002, GBZ45-2002, GBZ9-2002, GBZ75-2002, GBZ78-2002, GBZ93-2002, GBZ64-2002和 GBZ87-2002将废止。这些标准的编号及名称见下表。

强制性国家职业卫生标准

标准号	标准名称	标准号	标准名称
GBZ8-2010	职业性急性氨基镍中毒诊断标准	GBZ78-2010	职业性急性化学源性猝死诊断标准
GBZ35-2010	职业性白内障诊断标准	GBZ93-2010	职业性航空病诊断标准
GBZ45-2010	职业性三硝基甲苯白内障诊断标准	GBZ226-2010	职业性铊中毒诊断标准
GBZ59-2010	职业性中毒性肝病诊断标准	GBZ227-2010	职业性传染病诊断标准
GBZ75-2010	职业性急性化学物中毒性血液系统疾病诊断标准		

推荐性国家职业卫生标准

标准号	标准名称
GBZ/T228-2010	职业性急性化学物中毒后遗症诊断标准