

# 三氯乙烯对未成熟人树突状细胞的毒性作用

赵娜, 吴奇峰, 李宏玲, 刘浩中, 王海兰

(广东省职业病防治院, 广东 广州 510300)

**摘要:** 目的 探讨三氯乙烯 (TCE) 对体外诱导人未成熟树突状细胞 (iDC) 的细胞毒性作用。方法 免疫磁珠分离人外周血单核细胞, 应用重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF) 和白细胞介素-4 (rhIL-4) 诱导获得 iDC, 细胞形态学观察和流式细胞仪 (FACS) 检测细胞表面标记鉴定。给予 TCE 处理进行剂量-效应和时间-效应分析, 采用 Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 检测细胞存活率。结果 诱导获得的 iDC 呈悬浮状态, 部分细胞聚集成簇, 大部分细胞呈圆形, 部分细胞的胞浆存在少量不明显的毛刺样树突伸出。细胞表面标志分子表达阳性率 CD14 为 0.35%, CD1a 为 85.82%, HLA-DR 为 50.34%, CD40 为 23.20%, CD80 为 9.65%, CD83 为 25.73%, CD86 为 33.67%, 获得的细胞具有 iDC 的特征性表型。TCE 不同剂量 (0.5、1.0、5.0、10.0 mmol/L) 处理组随作用剂量增加, 细胞数呈不同程度减少, 细胞皱缩现象逐渐增多, 原本成簇的 iDC 随 TCE 作用剂量的增加而逐渐变松散以至散开; TCE 不同剂量 (1.0、5.0、10.0 mmol/L) 处理组作用不同时间 (24、48 h), 细胞存活率随染毒时间的延长而降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论 TCE 具有人未成熟 DC 细胞的毒性效应。

**关键词:** 三氯乙烯; 树突状细胞; 细胞毒性

中图分类号: R996 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2014)01-0006-04 DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2014.01.002

## Cytotoxic effect of trichloroethylene on human immature dendritic cell

ZHAO Na, WU Qi-feng, LI Hong-ling, LIU Hao-zhong, WANG Hai-lan

(Guangdong Provincial Center for Prevention and Treatment of Occupational Diseases, Guangzhou 510300, China)

**Abstract: Objective** To study the cytotoxicity of trichloroethylene (TCE) on dendritic cells (DC). **Methods** Isolated human peripheral blood monocytes (PBMC) from healthy donors using magnetic activated cell sorting (MACS) technique were induced with rhGM-CSF and rhIL-4 to get immature dendritic cell (iDC), which were identified both using by detecting the surface markers with cell morphological observation and flow cytometry instrument (FACS) to detect cell surface marker. After treatment of TCE, the cells, Counting Kit-8 (CCK-8) was used conducted to evaluate the cell viability of iDC treated by TCE and analyze its dose-effect and time-course studies effect relationships. **Results** It was showed that the induced iDC grewed in a suspended status and some of them were clustered aggregated into clumps, majority with typical morphology round shape, the cytoplasm in some cells were found a little bit out of a small inconspicuous burr like dendrites. The cell surface marker expression positive rate were: There was high level expression simultaneously in CD1a (85.82%), HLA-DR (50.34%), and low level in CD14 (0.35%), CD40 (23.20%), CD80 (9.65%), CD83 (25.73%), CD86 (33.67%), respectively. The number of iDCs showed decreasing trend in TCE treated group with TCE dose, the clustering tendency was gradually reduced, and the viability of iDC was significantly decreased too, with dose-and time-depended patterns ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** It was shown that there was some cytotoxic effect of TCE on human immature DC.

**Key words:** trichloroethylene (TCE); dendritic cell (DC); cytotoxicity

树突状细胞 (dendritic cell, DC) 是最具潜能的专职抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC), 其在体内数量很少, 却是诱导 T 细胞介导的细胞免疫的关键, 其最大特点是能激活初始 T 细胞启动获得性免疫应答, 堪称机体免疫应答的起始器和调节器<sup>[1]</sup>。多种毒物能够改变和破坏 DC 的表型和免疫功

能, 从而直接影响到下游免疫效应细胞的功能, 导致人体免疫失调、免疫亢进、免疫抑制和肿瘤形成<sup>[2]</sup>。三氯乙烯 (trichloroethylene, TCE) 是一种有机溶剂, 目前多作为清洗剂应用于五金、电子行业。近 20 年来, 广东省发生了 400 余例接触 TCE 而引起的以重症皮疹和肝损伤为主要表现的患者, 此病发病急, 如不及时治疗, 可导致死亡, 现已被正式命名为职业性 TCE 药疹样皮炎 (occupational medicamentosa-like dermatitis due to trichloroethylene, OMDT)<sup>[3]</sup>。在以往的研究中依据该病的特征和临床症状一般将 OMDT 看作 IV 型变态反应 (迟发性变态反应)<sup>[4]</sup>。根据免疫学

收稿日期: 2013-11-04

基金项目: 广东省医学科研基金 (A2010057); 广东省科技计划项目 (2010B050700026)

作者简介: 赵娜 (1981—) 女, 在读博士, 主要从事职业病防治技术研究。

通讯作者: 王海兰, 主任技师, 主要从事有机溶剂中毒的研究, E-mail: wanghl@gdoh.org.

原理,迟发型超敏反应的发生离不开抗原提呈细胞 (antigen presenting cell, APC) 和 T 淋巴细胞的参与。现有的研究均指向 TCE 可影响淋巴细胞功能,引起人体免疫功能紊乱<sup>[5]</sup>。然而,国内外还缺少 TCE 对上游免疫起始调控细胞 DC 的免疫毒理学研究,其机制还未明确。因此,本研究初步观察了 TCE 对人未成熟 DC 的细胞毒性,为后期研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

MACS 单核细胞负选试剂盒、磁架、分选器、LS 柱、滤膜均购自德国美天旎生物技术公司。重组人粒-巨噬细胞集落刺激因子 (rhGM-CSF)、重组人白细胞介素-4 (rhIL-4) 购自美国 eBioscience 公司。抗人 PE-CD14、PE-HLA-DR、FITC-CD1a、PE-CD40、FITC-CD80、PE-CD83、FITC-CD86、PE-Isotype control、FITC-Isotype control 均购自美国 BD 公司。RPMI-1640 和胎牛血清 (FBS) 购自美国 Gibco 公司。淋巴细胞分离液 (Ficoll) 购自美国 Sigma 公司。CCK-8 为日本同仁化学研究所产品。青霉素、链霉素双抗购自碧云天公司。

### 1.2 免疫磁珠 (MACS) 负选分离单核细胞

肝素抗凝健康志愿者静脉血为广州军区总医院输血科提供。取人外周抗凝血, Ficoll-Hypaque 密度梯度离心法分离人外周血单核细胞 (PBMC)。细胞加入 10  $\mu$ l T cell biotin-antibody cocktail, 混匀。4 $^{\circ}$ C 反应 10 min, 将分选器置于磁架上, 并将 LS 柱固定于分选器, 滤器放在 LS 柱上端。LS 柱用磁珠分选缓冲液冲洗后, 将细胞悬液加入 LS 柱, 用磁珠分选缓冲液冲洗 LS 柱, 收集流出液, 无菌 PBS 洗 2 次, 即为纯化的单核细胞。细胞用 PE-anti-CD14 抗体标记, 采用流式细胞仪检测该细胞中单核细胞纯度, 调整前向角和侧向角设门, 结果显示 CD14<sup>+</sup> 细胞比例 >95%, 纯度达到后续实验的要求。

### 1.3 DC 的体外诱导

调整细胞浓度为 1  $\times$  10<sup>9</sup> 个/L, 加入 6 孔培养板中, 每孔 3 ml DC 培养液 (含 10% FBS 的 RPMI-1640 培养液, rhIL-4 和 rhGM-CSF 终浓度均为 20  $\mu$ g/L), 每 2 天进行半量换液, 补充相应的细胞因子, 并于倒置显微镜下观察细胞形态。培养 5 d 后, 收获人未成熟 DC。

### 1.4 DC 表面标志物的检测

用细胞刮刮取培养 5 d 后 iDC, 用 0.01 mol/L 冷磷酸盐缓冲液 (PBS) + 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 溶液洗 2 次后重悬。调整每管细胞数为 5  $\times$  10<sup>5</sup> 个。

采用直接免疫荧光法测定, 4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 min, 洗涤后重悬, 使用流式细胞仪 (FACS Calibur, 美国 BD 公司) 测定, 以 FITC 为第一荧光 (FL1), PE 为第二荧光 (FL2), 用 FCS Express V3.0 软件分析阳性细胞频数和分布直方图; 以鼠抗人同型 IgG 为对照, 得到各种表面标志表达阳性细胞百分数。

### 1.5 细胞分组和处理

收获经诱导未成熟 DC, 调整细胞浓度为 1  $\times$  10<sup>9</sup> 个/L, 每孔 100  $\mu$ l 接种于 96 孔培养板中, 用终浓度分别为 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 mmol/L 的 TCE 进行处理, 以 DMSO 作为空白对照。置 5% CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C 分别培养 24 h、48 h 检测以下指标。

### 1.6 细胞形态学观察

各组细胞处理后, 于倒置相差显微镜 (DP72, OLYMPUS) 下观察细胞的形态学改变, 用 View finder 软件采集细胞图像。

### 1.7 TCE 对 iDC 细胞毒性检测

用 CCK-8 试剂盒测定细胞毒性。TCE 处理后, 在培养结束时, 取出 96 孔板, 每孔加入 20  $\mu$ l 的 CCK-8, 在培养箱中继续培养 4 h 后, 测定 450 nm 吸光度。以含有细胞的培养基、CCK-8、TCE 为实验孔 (As); 含有细胞的培养基、CCK-8、DMSO 为对照孔 (Ac); 含有 CCK-8, 不含细胞和 TCE 的培养基为空白孔 (Ab)。按如下公式计算细胞存活率 (%) 以评价细胞毒性。细胞存活率 (%) = [(As-Ab) / (Ac-Ab)]  $\times$  100%。

### 1.8 统计学分析

采用 SPSS13.0 软件进行统计学分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较分析采用方差分析, 两两比较采用 S-N-K 法, 以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 纯化单核细胞的纯度

细胞经磁珠分选后用 PE-anti-CD14 抗体标记, 采用流式细胞仪检测该细胞中单核细胞 (Mo) 纯度, 调整前向角和侧向角设门。结果显示 CD14<sup>+</sup> 细胞比例 >95%, 纯度达到后续实验的要求。见图 1。

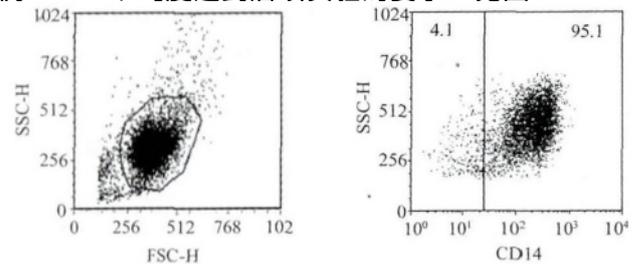


图1 流式细胞仪检测 CD14<sup>+</sup> 单核细胞纯度

## 2.2 FCM 鉴定 iDC 表面分子

Mo 细胞在 GM-CSF 和 IL-4 培养基中培养 5 d 后, FCM 检测结果表明, CD14 为 0.35%, CD1a 为 85.82%, CD40 为 23.20%, HLA-DR 为 50.34%, CD80 为 9.65%, CD83 为 25.73%, CD86 为 33.67%, 见图 2。符合 imDC 表型特征。

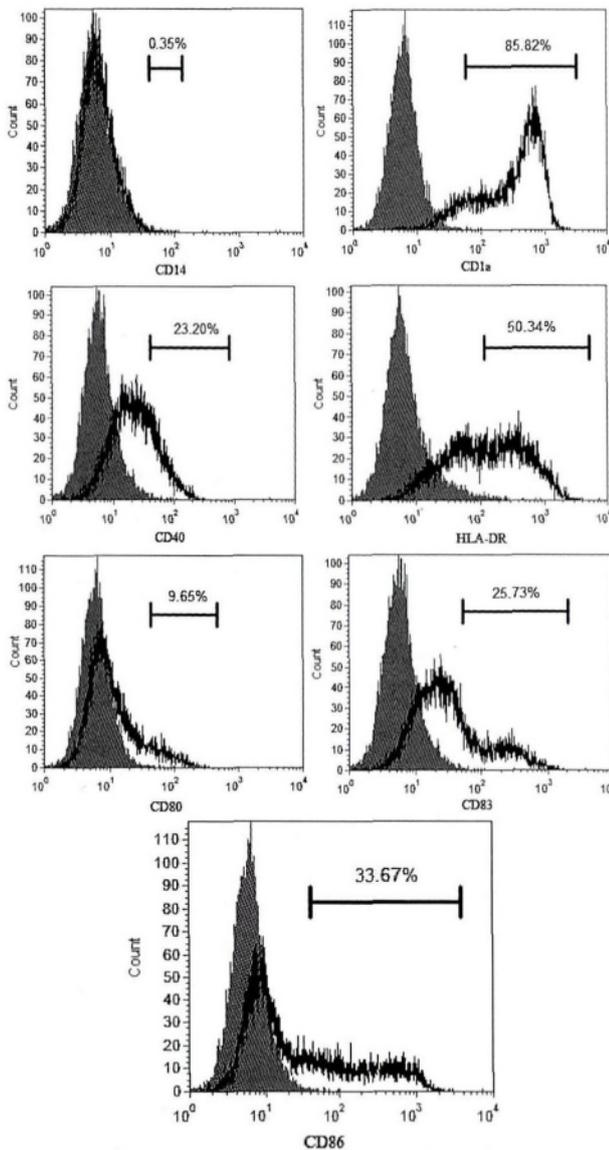


图 2 流式细胞仪鉴定 iDC 表面标志

## 2.3 TCE 对 iDC 形态学特征的影响

在倒置显微镜下观察各染毒组 iDC 的形态变化, 对照组 iDC 呈悬浮状态, 部分细胞聚集成簇, 胞浆存在少量不明显的毛刺状树突样伪足; TCE 处理组随作用剂量增加, 细胞数呈不同程度减少, 原本成簇的 iDC 随 TCE 作用剂量的增加而逐渐变松散以至散开, 而且细胞皱缩现象逐渐增多, 在 10 mmol/L TCE 染毒 48 h 时细胞稀疏, 大部分细胞皱缩体积缩小。

## 2.4 TCE 对 iDC 的毒性作用

表 1 可见, TCE 为 0.1 mmol/L 时, TCE 处理 24 h、48 h 组 iDC 存活率均接近 100%, 与 DMSO 对照组相比, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 其余各剂量组细胞存活率与之比较, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。细胞存活率 (%) 在 24 h 和 48 h 时间点均随作用剂量 (0.5 ~ 10.0 mmol/L) 升高而降低, 呈明显剂量-依赖性关系 (Pearson's  $r$ ,  $P < 0.05$ ); 当 TCE 浓度  $> 1$  mmol/L 时, 在同一剂量组的不同时间点 (24 h 和 48 h), 细胞存活率随时间的延长而降低, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 1 TCE 对 iDC 的毒性作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

实验分组	检测次数	TCE 剂量 (mmol/L)	iDC 存活率 (%)	
			24 h	48 h
对照组	3	0	100.00 ± 2.30	100.00 ± 1.43
TCE 处理组	3	0.1	103.71 ± 3.35	105.62 ± 3.19
	3	0.5	91.23 ± 4.87*	89.96 ± 4.43*
	3	1.0	82.34 ± 5.23*	77.51 ± 5.50* $\Delta$
	3	5.0	74.87 ± 2.76*	61.25 ± 3.92* $\Delta$
	3	10.0	57.80 ± 3.70*	40.53 ± 3.26* $\Delta$
Pearson's $r$ 值			0.947 $\#$	0.921 $\#$

注: 各时间点 ANOVA 与对照组比较的 S-N-K 检验, \*  $P < 0.05$ ; 与同剂量组 24 h 配对  $t$  检验,  $\Delta P < 0.05$ ; Pearson's 相关分析,  $\#P < 0.05$ 。

## 3 讨论

本研究通过免疫磁珠技术分离人外周血中单核细胞, 纯度达到 95% 以上, 相比传统的贴壁法, 能更好地在后续试验中避免淋巴细胞对试验结果的干扰。运用 rhGM-CSF 和 rhIL-4 诱导形成未成熟 iDC, 表现为单核细胞表面标志 CD14 消失, DC 表面标志 CD1a、HLA-DR 高表达, 反映 DC 成熟的共刺激分子 CD80、CD83、CD86 低表达。细胞形态呈悬浮生长, 部分细胞聚集成簇, 胞浆存在少量不明显的毛刺状树突样伪足, 从表面标记及形态学两方面均提示成功诱导和获得人 iDC, 为 TCE 免疫毒性作用及机制研究提供了模型和基础。

近年来, TCE 作为制冷剂氟利昂替代品之一使用量急剧增加, 导致 TCE 对普通人群造成潜在危害, 研究 TCE 中毒发病机制及筛选易感人群早期生物标志物对保护普通人群同样具有重要意义。目前国内外大量研究关注于寻找 TCE 毒性作用的早期靶作用细胞及敏感的生物标志物<sup>[6]</sup>。现有的大量研究聚集在 TCE 对效应性 T、B 淋巴细胞的免疫毒性及其机制<sup>[7]</sup>。

本研究采用溶于 DMSO 中的 TCE 作用于 iDC, 发现不同剂量和作用时间对 iDC 细胞活性呈不同程度的毒性。在低剂量处理组 (0.1 mmol/L) 对 DC 的毒性作用并不明显, 甚至出现低剂量兴奋效应, 其表现为

低剂量 TCE 处理组细胞存活率略高于对照组。中 (0.5、1.0 mmol/L)、高 (5.0、10.0 mmol/L) 剂量组 TCE 对 iDC 抑制作用呈剂量依赖性增高, 且高剂量组 TCE 对细胞的抑制作用随染毒时间的延长而增高。

DC 能摄取、加工和提呈抗原, 通过与原始 T 细胞相互作用, 参与淋巴细胞的生长分化, 具有强大的激活 T 淋巴细胞的能力, 控制着体内免疫反应和应答的过程, 在激活 T 细胞介导的细胞免疫反应以及 B 细胞介导的体液免疫反应中起着枢纽作用<sup>[8]</sup>。近年来我国 TCE 接触工人中主要以 OMDT 为主, 暴露工人长期低剂量接触 TCE, 而本实验中低剂量的 TCE 对 DC 有比较明显的刺激作用, 因此, TCE 对 DC 的刺激作用可能是 TCE 引发超敏反应的潜在机制之一。1995 年国际癌症研究中心 (IARC) 根据人群流行病学资料发现 TCE 可能导致人类的肾脏、肝脏和淋巴造血系统肿瘤, 结合动物致癌试验和体外细胞遗传学试验, 将 TCE 定为“人类可能致癌物”<sup>[9]</sup>。中、高剂量的 TCE 降低 DC 的活性, 这可能是高剂量 TCE 导致机体免疫抑制, 从而引发肿瘤的机制之一。

下一步我们将深入探索低剂量 TCE 对 iDC 分化成熟、细胞因子分泌、表型、凋亡及激活 T 细胞功能的影响, 研究低剂量 TCE 是否可促进 iDC 向成熟 DC 分化 (mDC), 阐明 TCE 引发机体超敏反应的免

疫毒作用机制。

参考文献:

- [1] Reid S D, Penna G, Adorini L. The control of T cell responses by dendritic cell subsets [J]. *Curr Opin Immunol*, 2000, 12 (1): 114-121.
- [2] Guha N, Loomis D, Grosse Y, *et al*. Carcinogenicity of trichloroethylene, tetrachloroethylene, some other chlorinated solvents, and their metabolites [J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13 (12): 1192-1193.
- [3] GBZ185—2006, 职业性三氯乙烯药疹样皮炎诊断标准 [S].
- [4] 李来玉, 黄汉林, 何家禧, 等. 广东 150 例职业性三氯乙烯药疹样皮炎病例的职业流行病学调查 [J]. *中国职业医学*, 2006, 33 (5): 333-336.
- [5] 易娟, 滕艳霞, 臧丹, 等. 三氯乙烯药疹样皮炎患者及健康接触工人外周血淋巴细胞亚群分析 [J]. *中华预防医学杂志*, 2011, 45 (11): 1017-1021.
- [6] 黄振烈, 越飞, 黄汉林, 等. 职业性三氯乙烯药疹样皮炎患者血清蛋白质差异表达分析 [J]. *中国职业医学*, 2011, 38 (4): 271-275.
- [7] 越飞, 李来玉, 梁丽燕, 等. 三氯乙烯致药疹样皮炎患者免疫功能的变化 [J]. *中国公共卫生*, 2004, 20 (6): 708-709.
- [8] Flores Romo L. In vivo maturation and migration of dendritic cells [J]. *Immunology*, 2001, 102 (3): 255-262.
- [9] International Agency for Research on Cancer (IARC). (1995) Dry cleaning, some chlorinated solvents and other industrial chemicals. Lyon: International Agency for Research on Cancer, World Health Organization [A].

(上接第 5 页)

润<sup>[5]</sup>。(5) LEI\_MYB\_TARGETS 基因组中 Myb 调节基因过度表达 MYB, MYB 基因是细胞内一种原癌基因, 它表达 MYB 转录因子, 作用于相应靶基因, 调节细胞的增殖、分化, 在多种恶性肿瘤细胞中过度表达, 而其下调又是某些癌细胞分化所必需的。Long<sup>[6]</sup>和 Ilan<sup>[7]</sup>等均证实了 MYB 基因在人类肺癌中的过度表达, 印证了本实验的发现, 更是支持其为砷致癌的可能机制之一。

而参与激活凋亡的 BCL2L11 和参与代谢的 COX5A 表现为明显的下调, 这与 Lau<sup>[8]</sup>的结果一致, 即低剂量砷可引起细胞凋亡异常从而参与肿瘤发生。另外两个明显下调的基因组与肺癌的预后相关, 尤其涉及到肺癌耐药将在以后做更为深入的研究。

参考文献:

- [1] Shi H, Hudson L G, Ding W, *et al*. Arsenic causes DNA damage in keratinocytes via generation of hydroxyl radicals [J]. *Chem Res Toxicol*, 2004, 17: 871-878.
- [2] Meng D, Wang X, Chang Q, *et al*. Arsenic promotes angiogenesis

in vitro via a heme oxygenase-1-dependent mechanism [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 244: 291-299.

- [3] Liu L Z, Jiang Y, Carpenter R L, *et al*. Role and mechanism of arsenic in regulating angiogenesis [J]. *PLoS One*, 2011, 6 (6): e20858.
- [4] Chung L Y, Tang S J, Sun G H, *et al*. Galectin-1 promotes lung cancer progression and chemoresistance by up regulating p38 MAPK, ERK, and cyclooxygenase-2 [J]. *Clin Cancer Res*, 2012, 18 (15): 4037-4047.
- [5] Jian M, Nan L, Guo C J, *et al*. Down regulating PRL-3 inhibit migration and invasion of lung cancer cell via RhoA and mDial [J]. *Tumori*, 2012, 98 (3): 370-376.
- [6] Long E M, Long M A, Tsigotis M, *et al*. Stimulation of the murine Uchl 1 gene promoter by the B-Myb transcription factor [J]. *Lung Cancer*, 2003, 42 (1): 9-21.
- [7] Ilan L, Katzav S. Human Vav1 expression in hematopoietic and cancer cell lines is regulated by c-Myb and by CpG methylation [J]. *PLoS One*, 2012, 7 (1): e29939.
- [8] Lau A T, Li M, Xie R, *et al*. Opposed arsenite-induced signaling pathways promote cell proliferation or apoptosis in cultured lung cells [J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25 (1): 21-28.