

三氯乙烯对肝细胞凋亡基因和肝代谢酶基因表达水平的影响

廖日炎¹, 徐新云²

1.广东省深圳市光明新区疾病预防控制中心, 深圳 518106; 2. 广东省深圳市疾病预防控制中心, 深圳 518055

摘要:目的: 研究三氯乙烯 (TCE) 对人肝细胞凋亡基因 (*Caspase-3*、*Caspase-8*、*BAX*、*Bcl-2*) 和肝代谢酶基因(*CYP1A2*、*CYP2E1*、*CYP3A4*) mRNA 表达水平的影响。 **方法:** 用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养肝细胞, DMSO 作为溶剂对照, 采用不同浓度 TCE (0.2、0.4、0.8、1.6、3.2 mmol/L) 染毒 L02 肝细胞 24 h, 另外用 TCE 1.0 mmol/L 染毒细胞不同时间 (2 h, 4h, 8h, 16h, 32h), 采用 Real-time 荧光定量 PCR 技术检测肝细胞中凋亡基因和 CYP 基因 mRNA 表达水平。 **结果:** 不同剂量 TCE 染毒后, 凋亡基因 *Caspase-3*、*Caspase-8*、*BAX* 表达水平比对照组升高 21%~145%, 差异有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), *Bcl-2* 表达水平下降 20%~35%。TCE 染毒引起 *CYP1A2*、*CYP3A4*、*CYP2E1* 的 mRNA 表达明显上升, 比对照组升高 30%~550%, 差异有统计学意义 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。用 TCE 1.0 mmol/L 染毒 2 h~32 h, 同样发现凋亡基因和肝代谢酶基因表达增加, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P<0.05$, 或 $P<0.01$)。 **结论:** TCE 可引起肝细胞凋亡基因和肝代谢酶基因表达变化, 凋亡基因和肝代谢酶基因可能在 TCE 对肝细胞毒性效应中发挥重要作用。

关键词:三氯乙烯; L02 肝细胞; 凋亡基因; 肝代谢酶基因; 细胞色素 P450

Study on mRNA expression of apoptosis genes and metabolism genes in hepatocytes after trichloroethylene treatment

LIAO Riyan, XU Xinyun

1. Guangmin New District Center and Prevention, Shenzhen 518106, China; 2. Shenzhen center for disease control and prevention, Shenzhen 518055, China

Abstract:Objective: To study mRNA expression of apoptosis genes and hepatic metabolic enzyme genes in hepatocytes after treatment with trichloroethylene (TCE). **Methods:** L02 hepatocytes (L02 cells) were cultured with various doses of TCE (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, and 3.2 mmol/L) for 24h, or the cells were cultured with a single dose of TCE (1.0 mmol/L) for different periods of time (2h, 4h, 8h, 16h, 32h), the control was treated with DMSO, real-time fluorescent PCR assay was applied for detection of mRNA expression of apoptosis genes (*Caspase-3*, *Caspase-8*, *BAX*, *Bcl-2*) and hepatic metabolic enzyme genes (*CYP1A2*, *CYP2E1*, *CYP3A*). **Results:** The relative levels of mRNA expression of apoptosis genes and hepatic metabolic enzyme genes remarkably increased after TCE treatment at various doses (0.2, 0.4, 0.8, 1.6, and 3.2 mmol/L) for 24h, the elevation of mRNA expression in TCE treatment groups was significant in comparison with control ($P<0.05$, or $P<0.01$). Additionally, when the cells were treated with a single dose of TCE (1.0 mmol/L) for different periods of time (2h, 4h, 8h, 16h, 32h), the mRNA expression also increased significantly compared with control ($P<0.05$, or $P<0.01$). **Conclusions:** Trichloroethylene could induce alternation of mRNA expression of apoptosis genes and hepatic metabolic enzyme genes, these genes might play an important role in cytotoxicity of trichloroethylene.

Key words: trichloroethylene; L02 cells; apoptosis genes; hepatic metabolic enzyme genes
作者简介:廖日炎 (1974~) 男, 大学本科, 副主任医师, 主要研究方向是职业卫生与疾病控制。E-mail: 2587289286@qq.com

enzyme genes; cytochrome P450.

三氯乙烯(Trichloroethylene, TCE)是工业上常用的清洗剂之一, 是一种易挥发的不饱和和脂肪族卤代烃类有机溶剂, 气味似氯仿, 无色液体, 有较强的脂溶性, 主要用于电路板、机械产品、五金制品的清洁去油污和干洗衣物等。2000年以来, 广东珠三角其它地区使用TCE的企业经常发生TCE职业病的报道, 深圳发生几百例TCE职业病病例, 该疾病发病迅猛, 病情严重, 病死率高, 没有特效治疗药物, 严重危害广大工人的健康和生命, 引起政府和广大企业的高度重视。TCE中毒病人在临床上主要表现为严重的皮肤和肝功能损害^[1-5]。虽然国内对TCE毒性作用进行了大量研究, 但目前三氯乙烯引起职业病的发病机制仍不清楚。大量现场调查发现只有极少数TCE接触者发病, 因此作者推测该疾病可能与不同个体肝代谢酶活性存在一定关系^[6-8], 而肝代谢酶主要成分是细胞色素P450 (cytochrome P450, 简称CYP)。本文应用TCE染毒L02肝细胞观察凋亡基因和CYP基因的表达水平改变, 为探讨TCE发病机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

三氯乙烯纯度大于99.5% (美国Sigma公司); 二甲亚砜(DMSO) (美国Sigma公司); RPMI-1640细胞培养基、胎牛血清、0.25%胰蛋白酶、0.05%EDTA、100 μg/ml链霉素、100 U/ml青霉素(美国Gibco公司); L02细胞(上海生命科学细胞资源中心); 总RNA提取试剂Trizol (美国Invitrogen公司产品); 反转录及SYBR Green Q-PCR试剂盒DRR063A (大连宝生物工程有限公司)。MX4000型荧光定量PCR仪(美国Stratagene公司); GeneAmp9700型PCR扩增仪(美国Applied Biosystem公司)。

1.2 引物设计与合成

目的基因PCR引物设计与合成委托上海生工生物有限公司完成。引物序列如下。

Caspase-3: F: 5'- GACTCTGGAATATCCCTGGACAACA-3', R: 5'- AGGTTTGCTGCA TCG ACATCTG-3'; *Caspase-8*: F: 5'- CAAATGCAAAGCTGGATGATGAC-3', R: 5'- AGCA GGCT CTTGTTGATTTGG-3'; *BAX*: F: 5'-GCGAGTGTCTCAAGCGCATC -3', R: 5'-CCAGTTGAA GTTG CCGTCAGAA -3'; *Bcl-2*: F: 5'- TGAACCGGCATCTGCACAC-3', R: 5'- CGTCTTC AGAGA CAGCCAGGAG-3'; *CYP1A2*: F: 5'- ATCCTGGAGACCTTCC GACAC-3', R: 5'- TGA CCTGC CACTGGTTTACGA-3'; *CYP3A4*: F: 5'- GCACATAGCCC AGCAAAGAGCA-3', R: 5'- CCAGG AGAAGCCAGGTTTCCAT-3'; *CYP2E1*: F: 5'- CTCTGA GATATGGGCTCCT GATT-3', R: 5'- AATGGTGTCTCGGGTTGCTTC-3'; *β-actin*: F: 5'-TAAAGACC TCTATGCCAACA CAG-3', R: 5'-CACGATGGAGGGGCCGACTCATC-3'。

1.3 肝细胞培养和TCE染毒处理

L02肝细胞在37℃, 5% CO₂条件下培养, 培养基是含10%胎牛血清、100 U/ml青霉素和100 μg/ml链霉素的RPMI-1640。当细胞融合度达到70%~80%时, 弃去培养基, 用磷酸盐缓冲液(PBS)洗3次, 加入无血清的RPMI-1640培养基2 ml。在各培养瓶中分别加入TCE应用液(DMSO配成0.2 mol/L TCE)并混匀。TCE染毒终浓度分别为0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.2 mmol/L, 以0 mmol/L TCE组为空白对照组, 设DMSO组为溶剂对照组, 共7组, 染毒24 h。另外, 为探讨TCE不同染毒时间的影响, 用同一浓度TCE (1.0 mmol/L) 分别染毒2、4、8、16、32 h, 以0 h组为对照组(无TCE处理)。

1.4 实时荧光定量PCR检测基因表达

用 Trizol 试剂提取各组细胞总 RNA，按照逆转录试剂盒说明书进行 cDNA 合成，冰上配置如下反应液： PrimeScript RT Enzyme Mix 0.5 μ l，5 \times PrimeScript Buffer 2 μ l，Oligo dT Primer (50 μ mol/L) 0.5 μ l，Random 6 mers (100 μ mol/L) 0.5 μ l，Total RNA 500 ng，用 RNase Free ddH₂O 补足至 10 μ l。逆转录反应条件为：37 $^{\circ}$ C 15 min，85 $^{\circ}$ C 5 s，获得的 cDNA 于-20 $^{\circ}$ C 保存。荧光定量 PCR 以 cDNA 为模板， β -actin 作为内参基因。PCR 反应体系为：2 \times SYBR Green Q-PCR master mix 12.5 μ l，Forward primer(10 μ mol/L) 0.5 μ l，Reverse primer(10 μ mol/L) 0.5 μ l，ROX Reference Dye (50 \times) 0.5 μ l，cDNA 2 μ l，ddH₂O 9 μ l。以 ddH₂O 代替模板作为对照 (no-template control, NTC)。PCR 反应条件为：95 $^{\circ}$ C 预变性 10 s，1 个循环；接着 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s，退火延伸 30 s，共 40 个循环。

1.5 统计分析

实验所得数据采用均值 \pm 标准差表示，各组之间的比较采用 SPSS16.0 单因素方差分析 (ANOVA) 进行组间差异的显著性检验， $\alpha=0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 TCE对肝细胞凋亡基因mRNA表达水平的影响

TCE 染毒 L02 肝细胞后，凋亡基因 *Caspase-3*、*Caspase-8*、*BAX* 表达水平随 TCE 染毒剂量增加而升高，TCE 剂量 0.4 mmol/L 时，*Caspase-3*、*Caspase-8*、*BAX* 表达水平升高 20~30% 与对照组比较存在显著差异 ($P < 0.05$)；当 TCE 剂量达到 1.6 或 3.2 mmol/L 时，*Caspase-3*、*Caspase-8*、*BAX* 表达水平比对照组升高 40%~145%，差异非常显著 ($P < 0.01$)。但 *Bcl-2* 属于抑凋亡基因，TCE 染毒后 *Bcl-2* 表达水平下降，TCE 剂量 0.8~3.2 mmol/L 时，*Bcl-2* 表达水平下降 20%~35%，与对照组比较差异有统计学意义，见图 1。此外，TCE 不同染毒时间对凋亡基因表达的影响也非常明显，染毒 8 h 时 *Caspase-3*、*Caspase-8*、*BAX* 表达水平比对照组升高 20%~50%，染毒 32 h 时升高幅度达 70%~130%，与对照组比较差异均具有统计学意义 (P 均 < 0.01)，见图 2。

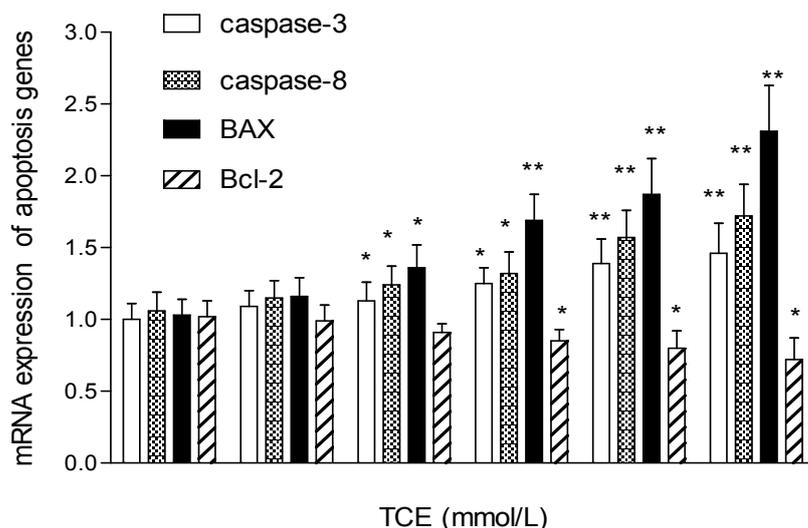


图 1. TCE 不同浓度染毒 L02 细胞 24 h 对凋亡基因表达水平的影响。与对照组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$

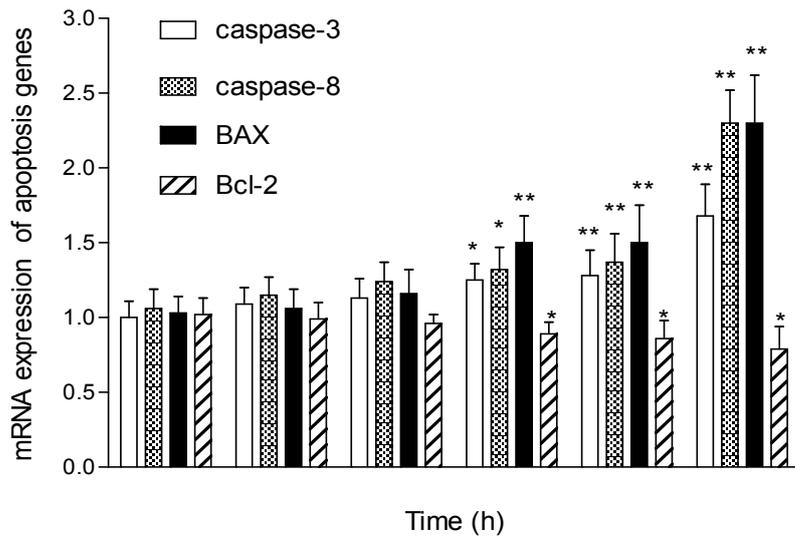


图 2. TCE 染毒 L02 细胞不同时间对凋亡基因表达水平的影响.与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 TCE对肝细胞代谢酶基因mRNA表达水平的影响

TCE 染毒 L02 细胞时, *CYP1A2*、*CYP2E1* 和 *CYP3A4* mRNA 表达水平都明显升高, TCE 剂量在 0.4 mmol/L 时, *CYP1A2*、*CYP2E1* 和 *CYP3A4* mRNA 表达水平明显高于对照组 ($P < 0.05$); TCE 剂量 ≥ 0.8 mmol/L 时, *CYP1A2*、*CYP2E1* 和 *CYP3A4* mRNA 表达水平比对照组升高 150%~550%, 差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 见图 3。TCE 不同染毒时间对肝代谢酶基因表达的影响也非常明显, 染毒 4 h 时 *CYP1A2*、*CYP3A4*、*CYP2E1* 表达水平即升高, 与对照组比较差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 染毒时间 ≥ 8 h, *CYP1A2*、*CYP3A4*、*CYP2E1* 表达水平与对照组升高 110%~500%, 差异非常显著 ($P < 0.01$), 见图 4。

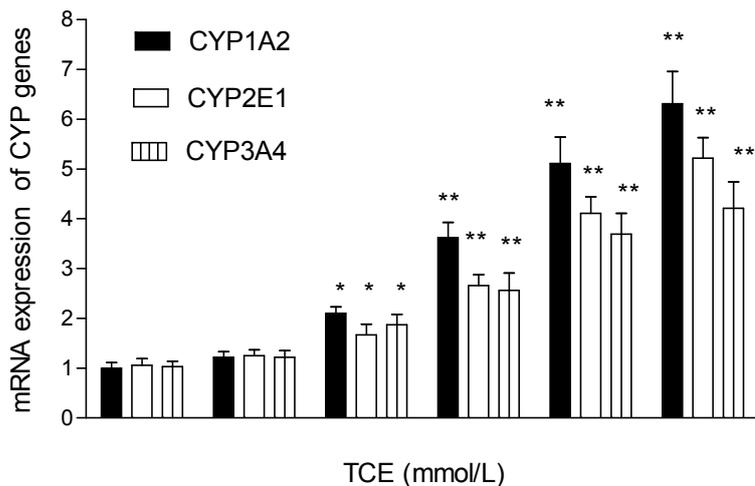


图 3. 不同浓度 TCE 染毒 L02 细胞 24 h 对肝代谢酶基因表达水平的影响. 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

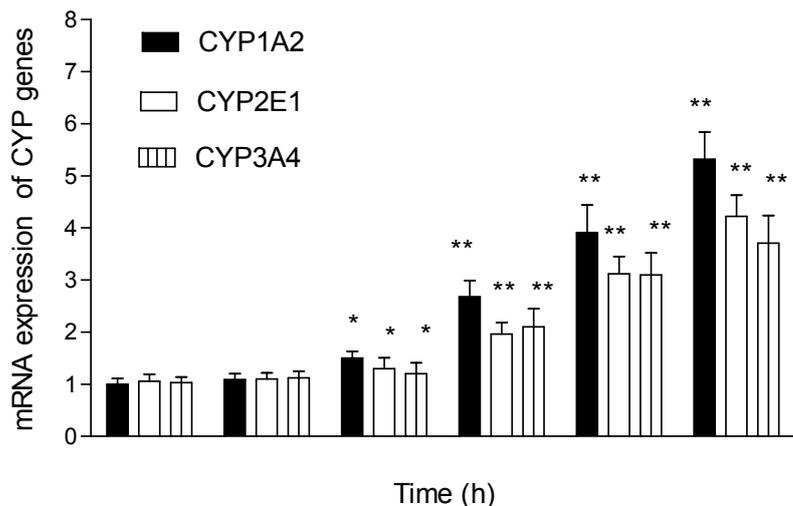


图4. TCE 染毒 L02 细胞不同时间对肝代谢酶基因表达水平的影响. 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 讨论

三氯乙烯的职业危害与致癌作用已引起国内外许多科研人员的高度重视, 近几年许多研究机构对TCE毒性进行了大量研究。据文献报道, 动物实验已证明TCE具有致癌性, 可引起B6C3F1和Swiss小鼠肺癌、小鼠肝癌、大鼠肾细胞癌^[9,10]。在人群流行病学资料方面, Bruning T等学者应用对照研究发现持续性暴露于高剂量TCE可以导致人群肾细胞癌发病率上升^[11,12], Ritz 应用大规模队列研究显示, 从事金属配件清洗作业工人的肝癌死亡率增加^[13]。此外, TCE还具有免疫毒性和致畸、致突变等作用^[14]。

通过对TCE职业病的调查分析, 我们发现TCE接触工人中仅少数人发病, TCE致病一般具有以下特点: 潜伏期从几天到几个月不等, 短者3~5天, 最长一般不超过3个月; TCE发病无明显的剂量-反应关系; 病人皮肤损害明显, 以皮肤红斑丘疹比较常见, 但也有皮肤水疱和表皮坏死脱落; 病人基本上都有发热表现; 病人肝脏损害明显, 常有肝功能异常, ALT等血清转氨酶升高至300~500IU甚至1000~2000IU; 病人发病无明显的性别差异和年龄差异; 用TCE进行皮肤斑贴试验可以获得阳性结果^[1-3]; 病人痊愈后再次接触TCE可以再次发病; 测定TCE病人尿中TCE 代谢产物三氯乙酸可有增高, 但三氯乙酸水平与中毒程度不存在平行关系。由于TCE致病具有这些特点, 我们认为TCE致病可能属于变态反应性疾病, 推测该疾病可能是TCE在不同个体内经过代谢产生某些致敏原, 或与某些肝脏代谢酶的基因表达水平有关。

文献报道, TCE 吸收进入体内后主要经过两条途径进行代谢, 一条途径是细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 氧化途径, 另外一条是谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 结合途径。经谷胱甘肽结合途径生成的 TCE 反应产物, 其毒性主要作用于肾脏, 经 CYP450 途径氧化代谢生成的产物其作用的靶器官主要是肝脏和肺脏^[15-17]。因此本实验以 L02 肝细胞染毒处理 TCE, 研究 TCE 对细胞色素 P450 (CYP) 基因表达的影响。

CYP1A2 是 CYP 家族中的主要成员之一, 约占肝脏总 P450 氧化酶含量的 13%。本文结果显示, TCE 染毒剂量 0.4~3.2 mmol/L 染毒 24h 时, *CYP1A2* 基因表达水平分别比对照组升高 120%~550%; TCE 剂量 1.0 mmol/L 染毒 4h~32 h 时, *CYP1A2* 表达水平比对照组升高 30%~450%。这些结果说明 *CYP1A2* 基因在 TCE 作用下表达水平显著升高, 参与 TCE 的代谢作用十分明显, 是 TCE 在体内的重要代谢酶之一。CYP1A2 在人体内参与许多

药物和外源性化学物质代谢, CYP1A2 一方面参与外源性物质的解毒代谢, 另一方面 CYP1A2 在代谢外源性物质的过程中产生新的毒物。CYP3A4 是 CYP 超家族占主导地位的氧化酶之一, 占肝脏 CYP 酶总量的 30%左右, 是重要的药物代谢酶, 参与许多药物的生物转化。本文用 TCE 0.4~3.2 mmol/L 剂量染毒 L02 细胞 24h, 发现 *CYP3A4* 基因表达水平比对照组升高 70%~320%, 提示 CYP3A4 参与 TCE 的代谢, 或者说明 TCE 对 *CYP3A4* 基因有明显诱导作用。除 *CYP1A2* 和 *CYP3A4* 基因外, TCE 染毒对 *CYP2E1* 基因表达也产生影响, 本文结果显示 TCE 染毒 24h 后 *CYP2E1* 基因表达显著高于对照组, 提示 TCE 对 *CYP2E1* 具有明显诱导作用。

职业毒物在一定剂量和作用时间等条件下可以引起细胞损伤, 包括形态学和生化指标方面的损伤, 细胞凋亡是细胞受损的一种表现形式, 与许多疾病的发生密切相关。*Bcl-2* 是一种抑凋亡基因, *Bcl-2* 通过与 *Bax* 形成 *Bcl-2-Bax* 异源二聚体抑制细胞凋亡, *Bcl-2* 与 *Bax* 的比例决定细胞凋亡是否发生 [18,19]。Caspase 是一组在活化后使细胞凋亡的蛋白酶, 其中 Caspase-3 是最重要的凋亡执行者之一, 是凋亡的主要效应因子, 其活化意味着凋亡进入不可逆阶段[20]; Caspase-8 是凋亡的启动因子, 在自我活化后能激活凋亡执行。本文观察到 TCE 在 0.4~3.2 mmol/L 染毒时, 凋亡基因 *Caspase-3*、*Caspase-8*、*BAX* 表达水平比对照组升高 21%~145%, 而抑凋亡基因 *Bcl-2* 表达水平下降 20%~35%。这些结果说明, TCE 染毒引起 L02 肝细胞凋亡基因表达水平明显改变, 我们推测这几种凋亡基因表达升高可能是 TCE 引起肝细胞毒性的重要原因之一, 对于深入研究三氯乙烯的肝毒性具有重要意义, 值得今后进一步探讨。

参考文献:

- [1] Xinyun XU, Rongxing YANG, Nan WU, et al. Severe hypersensitivity dermatitis and liver dysfunction induced by occupational exposure to trichloroethylene[J]. *Ind Health*, 2009, 47(2): 107-112.
- [2] Xinyun XU, Peiqiao WU, Yuebin KE, et al. Oxidative stress and inducible nitric oxide synthase expression in human hepatocytes treated with trichloroethylene[J]. *Toxicol & Environ Chem*, 2010, 92(4):801-811.
- [3] 徐新云,毛侃琅, 袁建辉, 等.三氯乙烯对 CYP2E1 基因高表达细胞和正常肝细胞毒性作用. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2014,32(10)723-727.
- [4] 徐新云, 李学余, 刘月峰.三氯乙烯致细胞免疫和体液免疫参与的混合型变态反应研究. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2014,32(12).881-886.
- [5] 徐新云.职业接触三氯乙烯的皮肤损害特点及诊断探讨[J].*中国公共卫生*, 2004,20(2): 251-252.
- [6] 廖日炎, 徐双喜, 朱志良.深圳公明街道有机溶剂职业卫生调查分析. *实用预防医学* 2007, 14(3):783-784.
- [7] 黄微微, 江志荣, 陈小波, 等. 2004 -2013 年深圳中小企业工作场所三氯乙烯动态监测分析. *实用预防医学* 2014, 21(6):658-661.
- [8] 张诗军.深圳龙岗区 2001 -2010 年急性职业有机溶剂中毒情况分析. *实用预防医学* 2012, 19(6):874-875.
- [9] Maltoni C, Lefemine G, Cotti G, et al. Long-term carcinogenicity bioassays on trichloroethylene administered by inhalation to Sprague-Dawley rats and Swiss and B6C3F1 mice[R]. *Ann N Y Acad Sci*, 1988, 534:316-342.
- [10] Bull RJ. Mode of action of liver tumor induction by trichloroethylene and its metabolites,

- trichloroacetate and dichloroacetate [J]. *Environ Health Perspect*, 2000, 108(Suppl 2): 241-259.
- [11] Bruning T, Pesch B, Wiesenhutter B. Renal cell cancer risk and occupational exposure to trichloroethylene: results of a consecutive case-control study in Arnsherg, Germany[J]. *Am J Ind Med*, 2003, 43(3):274-285.
- [12] Bruning T, Bolt HM. Renal toxicity and carcinogenicity of trichloroethylene: key results, mechanisms, and controversies[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2000, 30(3):253-285.
- [13] Ritz B, Zhao Y, Krishnadasan A. Estimated effects of hydrazine exposure on cancer incidence and mortality in aerospace workers[J]. *Epidemiology*, 2006, 17(2): 154-161.
- [14] Motohashi N, Nagashima H, Molnár J. Trichloroethylene I. carcinogenicity of trichloroethylene [J]. *In Vivo*, 1999, 13(3):211-214.
- [15] Levin CY, Maibach HI. Irritant contact dermatitis: is there an immunologic component? [J]. *Int Immunopharmacol*, 2002, 2(2/3):183-189.
- [16] Shvedova A, Kisin E, Murray A, et al. Metal working fluids: sub-chronic effects on pulmonary functions in B6C3F1 mice given vitamin E deficient and sufficient diets[J]. *Toxicology*, 2002, 177(2/3):285-297.
- [17] Lash LH, Fisher JW, Lipscomb JC, Parker JC. Metabolism of trichloroethylene. *Environ. Health Perspec* 2000, 108(Suppl 2):177–200.
- [18] Yokoyama T, Tanahashi M, Kobayashi Y, et al. The expression of Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak and Bim) in human lymphocytes [J]. *Immunol Lett*, 2002, 81(2): 107–113.
- [19] Cory S, Adams JM. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2 (9): 647–656.
- [20] Sharifia AM, Eslamia H, Larijani B, et al. Involvement of caspase-8, -9, and -3 in high glucose-induced apoptosis in PC12 cells [J]. *Neuroscience Letters* 2009, 459(1) 47–51.