

TNFR2 与三氯乙烯致敏小鼠免疫性肝损伤的关系研究

杨 屹¹, 徐琼影¹, 黄 猛¹, 姜 伟¹, 丁百旺¹, 张家祥¹, 朱启星^{1,2}

摘要 目的 观察三氯乙烯(TCE)致敏小鼠肝脏内 TNFR2 表达情况,探讨 TNFR2 与免疫性肝损伤之间的关系。方法 选取 21 只 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠,6~8 周龄,随机将其分为空白对照组(5 只),溶剂对照组(5 只),TCE 处理组(11 只),建立 TCE 致敏小鼠模型,进行小鼠背部皮肤致敏反应评分,评分大于 1 分为 TCE 致敏组,反之为未致敏组。模型完成后处死小鼠,摘取眼球取血,测定血清肝功能活性指标 ALT 和 AST;取出小鼠肝脏制成石蜡切片,HE 染色观察小鼠肝脏病理表现,免疫组织化学(IHC)法和 Western blot 法观察小鼠肝脏肿瘤坏死因子(TNF)- α 与 TNFR2 的表达情况。实时荧光定量 PCR 法检测 TNFR2 的 mRNA 水平。结果 TCE 组致敏率为 45.45%(5/11);致敏组小鼠的肝功能指标较高,与其他组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。HE 染色结果显示 TCE 致敏组可见细胞发生空泡样变性,细胞呈蜂窝状且胞质疏松,其余组小鼠的肝细胞形态正常,染色均匀。免疫组化实验显示,TCE 致敏组 TNF- α 表达较高,且与其他组相比 TCE 致敏组可以观察到大量 TNFR2 阳性表达,评分结果差异有统计学意义($P < 0.05$)。实时荧光 PCR

结果显示 TCE 致敏组 TNFR2 的 mRNA 表达也比其他组表达升高($P < 0.05$)。Western blot 实验表明 TCE 致敏组比其他组 TNFR2 蛋白表达水平增高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 TNFR2 在 TCE 致敏组小鼠肝脏中表达升高,其表达的改变可能参与了 TCE 致敏小鼠免疫性肝损伤过程。

关键词 三氯乙烯; 肝脏; TNFR2; 职业性三氯乙烯药疹样皮炎

中图分类号 R 135.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2021)04-0602-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.04.019

三氯乙烯(TCE)是一种无色且容易挥发的有机溶剂,工业上被广泛用作去污剂和萃取剂等^[1]。TCE 可通过呼吸道、皮肤以及消化系统进入人体,造成与药物过敏反应相似的皮肤损伤,中国将其定义为“职业性三氯乙烯药疹样皮炎”(occupational medicamentosalike dermatitis due to TCE, OMLDT)^[2]。OMLDT 患者出现皮疹的同时常伴不同程度的肝脏损害,严重者可很快发展为急性肝衰竭,目前普遍认为 IV 型变态反应并不能完全解释 TCE 所致的多重脏器损伤,人群研究^[3]表明 OMLDT 患者血清细胞因子肿瘤坏死因子(TNF)- α 水平显著高于正常人群组。TNF- α 是一种多向性细胞因子,主要通过结合 TNFR1 和 TNFR2 两种受体发挥重要的免疫调节作用^[4]。前期研究^[5-6]表明,在 TCE 致敏小鼠中,肝脏 TNF- α 表达水平有升高现象。TNFR1 几乎在

2020-09-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81874259、81673141);安徽省自然科学基金(编号:2008085QH385)

作者单位:¹安徽医科大学公共卫生学院职业卫生与环境卫生学系,合肥 230032

²安徽医科大学第一附属医院皮肤病研究所,合肥 230032

作者简介:杨 屹,女,硕士研究生;

朱启星,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: zqxing@yeah.net

TCE + Tempol group were 0.40 and 0.33, respectively. Pathological examination found that the liver cells of the blank group, solvent group and non-sensitized group had no obvious pathological changes. There was a large number of vacuolar degeneration in the liver cells of the TCE sensitization positive group, with cell edema and cytoplasm in a loose state, while the TCE + Tempol sensitization positive group showed hepatocyte edema in some areas; Compared with the blank group, the MDA activity, IL-22 and IL-2 content in the liver tissue of mice in solvent group and sensitization negative group were not statistically significant. The relative expression levels of MDA, IL-22 and IL-2 in the liver tissue of mice in the sensitization positive group were higher than those in the solvent group and the sensitization negative group ($P < 0.05$), and the TCE sensitization positive group was higher than the TCE at the same point TCE + Tempol sensitization positive group ($P < 0.05$). **Conclusion** Tempol may reduce the levels of IL-22 and IL-2 to protect the immune liver injury caused by TCE.

Key words trichloroethylene; oxidative stress; interleukin; liver injury

所有类型的细胞上都可以表达,主要介导细胞毒性作用;而 TNFR2 则特异性地表达于免疫和内皮细胞上,主要发挥介导 T 细胞增殖和调控细胞信号传递的作用^[7]。近年来有实验^[8-9]表明,在胆道闭锁小鼠肝脏中 TNFR2 在多个时段表达升高,而阻断 TNFR2 后肝脏损伤减轻。TNFR2 在 OMLDT 患者肝脏损伤中的表达与作用尚不明确,因此,该研究建立了 TCE 致敏小鼠模型,通过验证小鼠肝脏内 TNF- α 表达情况以及全方面检测 TNFR2 表达水平,对 TNFR2 与 OMLDT 引发的肝脏损伤的关系做了探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 购入 21 只 6~8 周龄 SPF 级小鼠,雌性,品系为 BALB/c,选自安徽医科大学实验动物中心,体质量(21.36 ± 1.28) g。将小鼠饲养在干净清洁的隔离笼中,保持适宜的温度($20 \sim 25$ °C)和湿度($50\% \pm 5\%$),并使用 12 h 光照和 12 h 黑暗交替饲养,提供标准的饲料和洁净饮水。实验方案和动物使用规章经安徽医科大学生物医学伦理委员会批准。该研究中使用随机化原则将小鼠分为 3 组:空白对照组 5 只,溶剂对照组(橄榄油加丙酮) 5 只和 TCE 处理组 11 只。

1.2 试剂与仪器 TCE、橄榄油、丙酮(上海化学试剂公司);弗氏完全佐剂(FCA)(美国 Sigma 公司);免疫组化检测试剂盒、DAB 显色液(北京中杉金桥生物技术有限公司);肝功能 ALT、AST 检测试剂盒、RIPA 裂解液、PMSF 蛋白酶抑制剂、BCA 蛋白定量试剂盒(上海碧云天生物技术公司);山羊抗小鼠 IgG、山羊抗兔 IgG、TNFR2 抗体(ab109322)、TNF- α 抗体(ab1793)(英国 Abcam 公司);PVDF 膜、ECL 发光液(美国 Advanta 公司);苏木精与伊红染色液(南京建成科技公司);全自动生化分析仪(美国 Bio-Tek 公司);光学显微镜(日本 Olympus 公司);LightCycler96 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司)。

1.3 动物模型与实验分组设计 参照课题组前期的实验,建立 TCE 经皮致敏小鼠模型。第 1 天,对 TCE 处理组小鼠的背部皮下注射 50 μ l、50% TCE (TCE:橄榄油:丙酮=5:2:3,50 μ l)和 50 μ l、FCA 混合物进行首次刺激。第 4、7、10 天,对小鼠背部剃毛预处理并均匀涂抹 100 μ l、50% TCE 进行致敏。在第 17 天和第 19 天,使用 100 μ l、30% TCE (TCE:橄榄油:丙酮=3:2:5,100 μ l)涂抹,对小鼠背部皮肤进行激发。空白对照组不接受任何处

理,溶剂组涂抹 100 μ l 丙酮与橄榄油混合溶液(橄榄油:丙酮=2:3,100 μ l)作为对照,两组实验流程安排与 TCE 处理组相同。在末次激发 24 h 后,对小鼠背部的皮肤反应评分:0 分无反应;1 分皮肤散在轻度变红;2 分中度和弥漫性变红;3 分皮肤高度的红斑和肿胀。小鼠评分 ≥ 1 分,则判断为 TCE 致敏并归类为致敏组(阳性组),否则为未致敏组(阴性组)。在末次激发 72 h 使用颈椎脱臼法处死小鼠,无菌操作取小鼠血液、肝脏和其他组织样品备用。

1.4 肝功能测定 眼静脉丛收集小鼠血液,4 °C 离心机以 3 000 r/min 离心 15 min 吸取上清液血清。按照肝功能试剂盒说明书在 96 孔板进行血清 ALT 和 AST 检测,调整酶标仪至 510 nm 波长,测定每孔 OD 值,代入标准方程计算血清中 ALT 和 AST 的活性。

1.5 肝脏病理学染色 将新鲜小鼠肝脏浸泡于多聚甲醛中,在摇床上放置 48 h 后石蜡包埋,制作石蜡切片,用二甲苯脱蜡、乙醇梯度脱水、用 PBS 洗涤切片 3 次,先用苏木精染色 3 min,流动纯水冲洗 3 min,再用伊红染色 15~20 s,清洗 3 min 后用 60 °C 烤箱烘片 4 h,用中性树脂封片,显微镜下观察组织的病理损伤情况。

1.6 免疫组织化学(IHC)检测 将肝脏切片用二甲苯脱蜡、乙醇梯度脱水,接着用 PBS 清洗 3 次,用内源性过氧化物酶封闭,放入柠檬酸钠缓冲液用微波进行抗原修复,自然冷却至室温后滴加山羊血清封闭,37 °C 室温封闭 20 min,分别滴加 TNFR2 和 TNF- α 抗体放入 4 °C 冰箱孵育过夜。第 2 天提前拿出玻片在室内复温,再依次滴加生物素标记的二抗和辣根酶,用 DAB 显色后冲洗玻片,苏木精复染细胞核,烤箱烘干后在显微镜下拍摄,图片使用 Image pro plus 软件进行免疫组化评分。

1.7 实时荧光定量 PCR 检测小鼠 TNFR2 的 mRNA 取大约 50~100 mg 肝脏进行组织抽提,在匀浆器中加入 1 ml、TRIzol 低温抽打匀浆,室温裂解 10 min,加入氯仿后振荡 30 s,离心后加入异丙醇,提取肝脏组织总 RNA,利用逆转录酶合成 cDNA 后,在每孔加入 MIX 10 μ l,上游引物 1 μ l,下游引物 1 μ l,DEPC 水 7 μ l,cDNA 1 μ l,进行 PCR 程序扩增,检测目的基因表达。扩增程序为 90 °C、10 s,60 °C、15 s,72 °C、20 s,共循环 45 次。用 GAPDH 作为内参基因,2^{- $\Delta\Delta C_t$} (Livak)法计算 TNFR2 的 mRNA 的相对表达量。GAPDH 上游引物序列为 5'-ACCCCAGCAAGGACACTGAGCAAG-3',下游引物序列为 5'-GGC-

CCCTCCTGTTATTATGGGGGT-3'; TNFR2 上游引物序列为 5'-TGGGTCTGCTGATGTTAGG-3', 下游引物序列为 5'-GACCTGCTCATCCTTTGG-3'。

1.8 Western blot 检测 TNFR2 蛋白表达水平 用 RIPA 组织裂解液与 PMSF 蛋白酶抑制剂处理肝脏组织, 提出蛋白后用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 每孔上样 5 μ l, 用 SDS-PAGE 进行电泳分离, 200 mA 转膜 3 h, 用脱脂牛奶室温封闭 2 h, 用 TNFR2 一抗封闭过夜 (1:10 000), 第 2 天用 PBST 和 PBS 清洗条带 4 次后, 室温孵育山羊抗兔 IgG (1:2 500) 二抗 2 h, 再次用 PBST 和 PBS 洗涤条带后, 使用 ECL 检测试剂盒中按照 1:1 配置的 ECL 发光液进行显影, 得到图片经灰度值处理分析后, 将 TNFR2 条带与内参蛋白 GAPDH 比较, 判断各组蛋白表达水平。

1.9 统计学处理 应用 SPSS 23.0 统计软件进行分析, 根据实验中收集到的原始数据计算 $\bar{x} \pm s$, 组间差异使用单因素方差分析。实验数据分析前均进行方差齐性检验。两个组之间均值差异采用最小显著差异法 (LSD 法) 检验, $P < 0.05$ 则认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠皮肤致敏情况 根据皮肤反应评分, 第 20 天将小鼠分为致敏组和未致敏组, 空白对照组和溶剂对照组小鼠背部皮肤表现正常、无明显皮损, TCE 处理组小鼠皮肤出现不同程度的红肿, 计算 TCE 组致敏率 (背部皮肤红肿数/各组小鼠总数), 致敏率为 45.45% (5/11)。见表 1。

表 1 小鼠皮肤致敏评分和致敏率

组别	动物数量 (只)	评分结果 (分)				致敏率 (%)
		0	1	2	3	
空白对照	5	5	0	0	0	0.00
溶剂对照	5	5	0	0	0	0.00
TCE 处理	11	6	2	2	1	45.45

2.2 肝功能检测结果 与空白对照组比较, 溶剂对照组小鼠血清中的 ALT 与 AST 测定结果差异较小, 差异无统计学意义。与空白对照组和溶剂对照组比较, TCE 未致敏组测定结果无明显改变, 差异无统计学意义。TCE 致敏组 ALT 与 AST 水平分别为 (144.18 ± 24.28) U/L 和 (71.91 ± 8.29) U/L, 与空白对照组、溶剂对照组和 TCE 未致敏组比较均有增高趋势, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

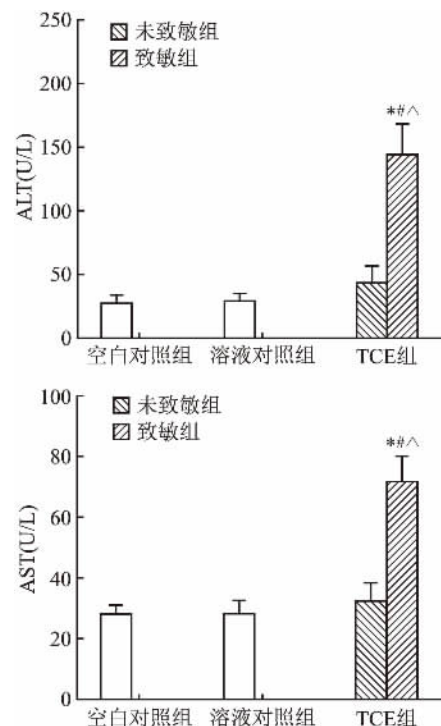


图 1 小鼠血清 ALT 与 AST 水平

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与溶剂对照组比较: # $P < 0.05$; 与 TCE 未致敏组比较: $\Delta P < 0.05$

2.3 肝脏病理学染色结果 观察 HE 染色的肝组织切片。空白对照组和溶剂对照组及 TCE 未致敏组的肝脏组织肝细胞排列整齐, 大小正常, 染色均匀, 形态学无明显改变。TCE 致敏组肝细胞出现大量空泡呈蜂窝状, 部分细胞形态异常, 胞质疏松, 糖原颗粒减少, 如图 2 所示, 黑箭头处显示细胞排列紊乱, 出现空泡样变性, 有炎性细胞浸润。

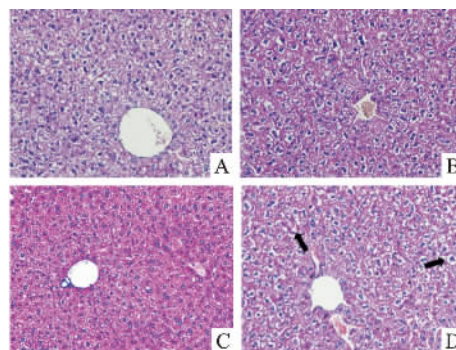


图 2 小鼠肝脏的 HE 病理染色结果 $\times 400$

A: 空白对照组; B: 溶剂对照组; C: TCE 未致敏组; D: TCE 致敏组

2.4 肝脏组织中 TNF- α 表达结果 免疫组化结果显示, TNF- α 在空白对照组和溶剂对照组之间表达水平较低, 在 TCE 未致敏组仅可见少量表达, 而在 TCE 致敏组中阳性染色区域明显, 与其他 3 组比较,

TNF- α 表达量升高,且差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3 和表 2。

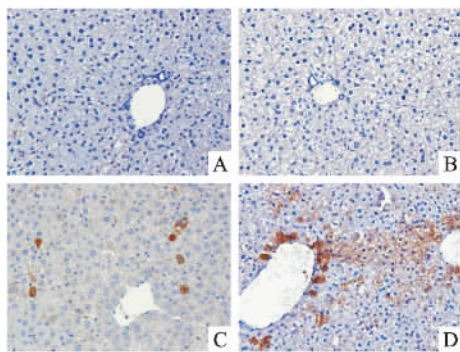


图 3 小鼠肝脏 TNF- α 表达结果 $\times 400$

A: 空白对照组; B: 溶剂对照组; C: TCE 未致敏组; D: TCE 致敏组

2.5 肝脏组织中 TNFR2 表达结果 空白对照组和溶剂对照组背景干净,无显著阳性表达,TNFR2 表达水平较低;TCE 未致敏组仅可见少量散在 TNFR2 蛋白沉积;而 TCE 致敏组 TNFR2 表达较高,与其他组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4 和表 2。

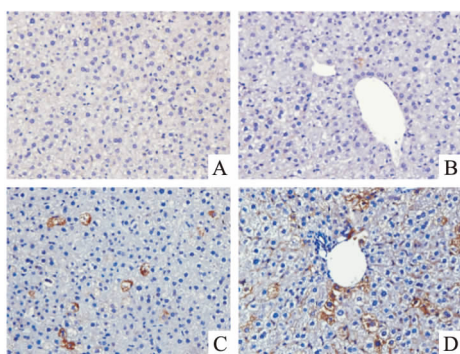


图 4 小鼠肝脏 TNFR2 表达结果 $\times 400$

A: 空白对照组; B: 溶剂对照组; C: TCE 未致敏组; D: TCE 致敏组

表 2 小鼠肝脏 TNF- α 和 TNFR2 免疫组化评分

组别	小鼠数量(只)	TNF- α	TNFR2
空白对照	5	0.18 $\pm$ 0.03	0.11 $\pm$ 0.01
溶剂对照	5	0.19 $\pm$ 0.04	0.10 $\pm$ 0.01
TCE 未致敏	6	0.28 $\pm$ 0.18	0.18 $\pm$ 0.02
TCE 致敏	5	2.15 $\pm$ 0.39* [#] Δ	2.05 $\pm$ 0.13* [#] Δ
F 值		172.81	219.78
P 值		<0.001	<0.001

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与溶剂对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与 TCE 未致敏组比较: Δ $P < 0.05$

2.6 小鼠肝脏 TNFR2 的 mRNA 表达水平 与空白对照组比较,溶剂对照组中的 TCE 未致敏组 TN-

FR2 的 mRNA 表达水平均未见明显升高,差异无统计学意义;而在 TCE 致敏组中,TNFR2 的 mRNA 表达水平较其他 3 组显著升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 5。

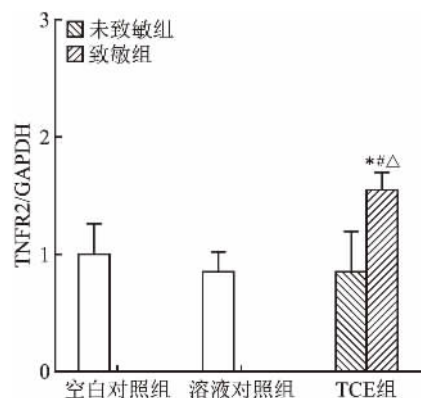


图 5 小鼠肝脏 TNFR2 mRNA 表达水平

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与溶剂对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与 TCE 未致敏组比较: Δ $P < 0.05$

2.7 Western blot 法检测小鼠肝脏 TNFR2 蛋白表达水平 与空白对照组比较,溶剂对照组和 TCE 未致敏组的 TNFR2 蛋白表达量均无明显改变,差异无统计学意义;在 TCE 致敏组中,TNFR2 的蛋白表达含量较其他 3 组升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 6。

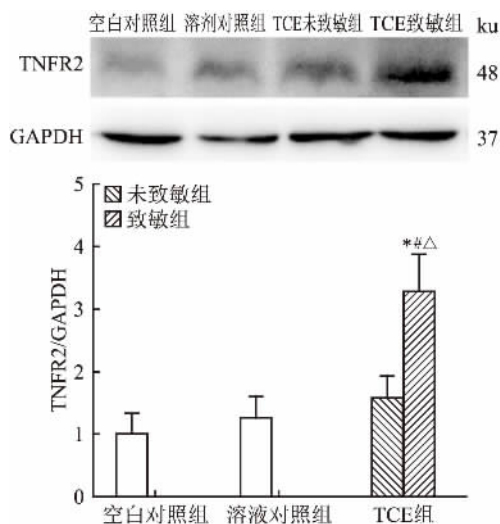


图 6 Western blot 法测定小鼠肝脏 TNFR2 蛋白表达结果

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与溶剂对照组比较: [#] $P < 0.05$; 与 TCE 未致敏组比较: Δ $P < 0.05$

3 讨论

TCE 是一种用途广泛的有机溶剂,在工业使用

过程中可通过呼吸道吸入和皮肤接触进入人体。目前由 TCE 接触导致的 OMLDT 已成为全国严重职业危害之一,且其发病有由沿海向内陆逐渐扩展的态势。由于该病缺乏早期诊断指标,发病后尚未发现特效治疗药物和方法,因此病程较长^[10],TCE 可造成多重脏器损伤,而肝功能衰竭是其致死的主要原因之一。目前学者普遍认为的 IV 型变态反应并不能完全解释 TCE 所致的多重脏器损伤,人群研究表明 OMLDT 患者血清细胞因子 TNF- α 水平高于正常人群组,而课题组近几年研究^[5-6]也表明,TCE 致敏小鼠肝脏内 TNF- α 表达水平升高。TNF- α 是一个多功能的细胞因子,参与多种细胞活动,包括诱导炎症因子产生,细胞增殖、分化和凋亡。该实验建立了 TCE 经皮致敏小鼠模型,在 TCE 致敏阳性组中,小鼠出现了不同程度的肝损伤,相比空白对照组、溶剂对照组及 TCE 未致敏组小鼠,TCE 致敏组小鼠血清 ALT、AST 活力升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。肝脏病理结果显示 TCE 致敏组肝细胞发生空泡样变性,细胞核破裂,胞质流失并有部分炎性细胞聚集。此外,免疫组化实验表明 TCE 致敏小鼠肝脏中 TNF- α 表达含量较其他组确有上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

TNF- α 主要通过两种类型的跨膜受体的结合而实现其功能,它们就是 TNFR1 和 TNFR2。TNFR1 的胞内段有特征性的死亡结构域,主要介导经典的促炎、细胞毒性和细胞凋亡等功能。相比之下,TNFR2 则缺乏该类死亡结构域,并且表达更加局限,主要表达于免疫细胞、内皮细胞和某些神经元细胞上,主要功能是介导与细胞活化和增殖相关的信号通路,在调节性 T 细胞(Tregs)和髓源性抑制细胞(MDSCs)的增殖和功能中起着重要作用^[11]。Tregs 是一群典型的免疫抑制性 T 细胞,能终止过度的自身免疫反应,维持免疫稳态,而其数量和功能的失衡可能导致多种免疫性疾病。课题组近年的研究^[12]表明:TCE 的免疫毒性能够改变小鼠免疫脏器中 Tregs 细胞的数量比例,引起小鼠体内 Tregs 细胞失衡。而有研究^[13]表明,TNF- α 对 Tregs 数量及功能的影响是通过 TNFR2 实现的,阻断 TNF- α /TNFR2 信号轴后会导致肿瘤微环境中 Tregs 减少。此外,TNFR2 参与了多种肝脏疾病的发生发展,在胆道闭锁小鼠模型中,TNFR2 表达显著升高,肝脏组织汇管区出现炎性细胞浸润,而阻断 TNFR2 信号后,下游 NF- κ B 和 MAPK-STAT3 表达显著减少,小鼠表型减轻,生存率提高^[8]。Siegmund et al^[14]研究表明

TNFR2 打开了一种依赖于 RIPK1 激酶活性的促炎信号传导模式,随后可上调 Traf1、IL-6 和 IL-1 β 等细胞因子。在一些肿瘤与免疫性疾病中,使用 TNFR2 拮抗剂或激动剂可提高治疗效果,TNFR2 是扩展功能性 Tregs 来治疗自身免疫性疾病的新兴靶标^[15]。该实验检测了 TNFR2 在肝脏中的表达,免疫组化结果表明在 TCE 致敏组中 TNFR2 大量沉积,且空白对照组、溶剂对照组中的 TCE 未致敏组未见明显表达。同时 Western blot 与 QRT-PCR 实验结果也表明 TCE 致敏组小鼠 TNFR2 的蛋白水平和 mRNA 水平较空白对照组、溶剂对照组和 TCE 未致敏组有升高现象,差异有统计学意义($P < 0.05$)。实验结果表明在 TCE 诱导的肝脏损伤过程中 TNFR2 表达增加,而针对这一现象,使用拮抗剂或激动剂靶向作用于 TNFR2 可能作为一种治疗免疫相关疾病和癌症的新策略。

参考文献

- [1] 李云霞,戴宇飞.三氯乙烯的免疫毒性[J].环境与职业医学,2018,35(1):8-13.
- [2] 石家琦,鲁严.职业性三氯乙烯药疹样皮炎[J].临床皮肤科杂志,2019,48(5):311-3.
- [3] 易娟,刘征宇,李添娣.三氯乙烯药疹样皮炎患者细胞因子水平分析[J].职业卫生与应急救援,2015,33(2):89-91.
- [4] Liu Y, Tian F, Shan J, et al. Kupffer cells: important participant of hepatic alveolar echinococcosis[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020,10:8.
- [5] 徐琼影,张家祥,杨屹,等.M1型库普弗细胞极化在三氯乙烯致敏小鼠肝脏损伤中的作用[J].环境与职业医学,2019,36(10):927-33.
- [6] Banerjee N, Wang H, Wang G, et al. Enhancing the nrf2 antioxidant signaling provides protection against trichloroethene-mediated inflammation and autoimmune response[J]. Toxicol Sci,2020,175(1):64-74.
- [7] Senkerikova R, de Mare-Bredemeijer E, Frankova S, et al. Genetic variation in TNFA predicts protection from severe bacterial infections in patients with end-stage liver disease awaiting liver transplantation[J]. J Hepatol,2014,60(4):773-81.
- [8] Shivakumar P, Mizuochi T, Mourya R, et al. Preferential TNF α signaling via TNFR2 regulates epithelial injury and duct obstruction in experimental biliary atresia[J]. JCI Insight, 2017, 2(5): e88747.
- [9] Ham B, Wang N, D'Costa Z, et al. TNF receptor-2 facilitates an immunosuppressive microenvironment in the liver to promote the colonization and growth of hepatic metastases[J]. Cancer Res, 2015, 75(24): 5235-47.
- [10] 金佳纯,黄健,柳柳,等.广东省职业性三氯乙烯药疹样皮炎病例分布特征分析[J].中国职业医学,2019,46(3):302-6.

- [11] Mancusi A, Alvarez M, Piccinelli S, et al. TNFR2 signaling modulates immunity after allogeneic hematopoietic cell transplantation [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2019, 47 : 54 – 61.
- [12] Li S L, Yu Y, Yang P, et al. Trichloroethylene alters Th1/Th2/Th17/Treg paradigm in mice: a novel mechanism for chemically induced autoimmunity [J]. *Int J Toxicol*, 2018, 37 (2) : 155 – 63.
- [13] 姜 锐, 杨 鹏, 江亚萍. TNFR2 基因敲除小鼠 H22 移植瘤生长特点和 Treg 数量与功能检测 [J]. *第三军医大学学报*, 2016, 38(1) : 50 – 4.
- [14] Siegmund D, Ehrenschrwender M, Wajant H. TNFR2 unlocks a RIPK1 kinase activity-dependent mode of proinflammatory TNFR1 signaling [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(9) : 921.
- [15] Shaikh F, He J, Bhadra P, et al. TNF receptor type II as an emerging drug target for the treatment of cancer, autoimmune diseases, and graft-versus-host disease: current perspectives and in silico search for small molecule binders [J]. *Front Immunol*, 2018, 9 : 1382.

The relationship between TNFR2 and immune liver injury induced by trichloroethylene in mice

Yang Yi, Xu Qiongying, Huang Meng, et al

(Dept of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To observe the expression of TNFR2 in the liver of mice and to explore the relationship between TNFR2 and the immune liver injury induced by trichloroethylene in mice. **Methods** Twenty-one BALB/c mice from 6 to 8 weeks of age were randomly divided into blank control group ($n = 5$), solvent control group ($n = 5$) and TCE treatment group ($n = 11$). A TCE-sensitized mouse model was established according to the pre-sensitization method of the research group. Twenty-four hours after the last challenge, the skin sensitization response of the mice was scored, and the mice in the TCE group were divided into the TCE-sensitized group and the TCE non-sensitized group. The mice were sacrificed 72 hours after the last challenge, and the blood was collected from the venous plexus of the eye to measure liver function indexes such as alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST). The liver of the mice was taken out and made into paraffin sections. HE staining was used to observe the pathological features of the liver. Immunohistochemistry method and Western blot method were used to determine the expression of TNF- α and TNFR2 in mouse liver. Real-time fluorescence quantitative PCR method was used to detect the level of TNFR2 gene in mouse liver. **Results** The sensitization rate of the TCE group was 45.45% (5/11); the serum ALT and AST levels of the TCE-sensitized group were significantly higher than those of the blank control group, solvent control group and TCE unsensitized group, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). HE staining results showed that the blank control group, the solvent control group and the TCE unsensitized group had normal liver cell morphology and even staining. The TCE-sensitized group showed cell swelling and vacuolar degeneration. Immunohistochemical experiments showed that the TCE-sensitized group had a higher expression of TNF- α , a large number of TNFR2 positive expressions could be observed in the TCE-sensitized group compared with other groups, and the difference in scores was statistically significant ($P < 0.05$). Real-time fluorescence PCR results showed that the expression of TNFR2 gene in the TCE-sensitized group was also significantly higher than that in the other groups ($P < 0.05$). Western blot method was used to determine the expression level of TNFR2 protein in the liver of mice, and it was found that the protein expression level of TCE-sensitized group was higher than that of the other three groups ($P < 0.05$). **Conclusion** The expression of TNFR2 in the liver of TCE-sensitized mice is significantly higher than that of other groups, suggesting that the expression of TNFR2 may be related to the immune liver injury in TCE-sensitized mice.

Key words trichloroethylene; liver; TNFR2; occupational medicamentosalike dermatitis due to TCE