

网络出版时间: 2019-5-9 10:21 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190506.1438.018.html>

◇预防医学研究◇

NLRP3 与三氯乙烯致敏小鼠肝脏损伤关系研究

谢海波¹ 李娜¹ 陈双平¹ 张家祥¹ 王峰² 杨玲³ 朱启星^{1,2}

摘要 目的 检测小鼠肝脏 NLRP3 水平,探讨 NLRP3 与三氯乙烯(TCE)致敏小鼠免疫性肝损伤的关系。方法 选取 22 只无特定病原体雌性 6~8 周 BALB/c 小鼠,随机分为空白对照组 6 只,溶剂对照组 4 只,72 h TCE 组 12 只,建立 TCE 小鼠致敏模型。于末次激发后 24 h 依据小鼠背部皮肤致敏反应评分情况,将 TCE 组小鼠分为 TCE 致敏组与 TCE 未致敏组。所有小鼠于末次激发后 72 h 处死,眼球取血测定小鼠肝功能指标谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST);无菌取小鼠肝脏,石蜡包埋切片后观察小鼠肝脏病理,免疫组织化学(IHC)法及 Western blot 法测定小鼠肝脏 NLRP3 蛋白表达情况。实时荧光定量 PCR 法检测小鼠肝脏 NLRP3 基因水平。结果 TCE 致敏组小鼠血清 ALT、AST 水平较空白对照组、溶剂对照组和 TCE 未致敏组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。空白对照组、溶剂对照组、TCE 未致敏组小鼠肝细胞未见明显病理改变。TCE 致敏组小鼠肝脏可

见大量肝细胞肿胀,细胞核破裂或消失,并有炎细胞聚集。免疫组化法结果显示 TCE 致敏组小鼠肝脏有大量 NLRP3 表达,空白对照组、溶剂对照组、TCE 未致敏组未见明显表达。Western blot 结果显示 TCE 致敏组小鼠肝脏 NLRP3 蛋白表达较空白对照组、溶剂对照组和 TCE 未致敏组明显升高($P < 0.05$)。实时荧光定量 PCR 结果显示 TCE 致敏组小鼠 NLRP3 基因较其他组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 NLRP3 在 TCE 致敏组小鼠肝脏中表达较其他组明显增加,提示 NLRP3 的表达可能与 TCE 致敏小鼠免疫性肝损伤有关。

关键词 三氯乙烯; NLRP3; 肝脏

中图分类号 R 349.31

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)05-0748-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.05.018

2019-01-22 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81874259、81673141、81502791); 安徽高校自然科学基金项目(编号: KJ2017A206)

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 安徽医科大学皮肤病研究所, 合肥 230032

³ 安徽医科大学医院, 合肥 230032

作者简介: 谢海波 男 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

三氯乙烯(trichloroethylene, TCE)作为一种主要的卤代烯烃化合物,常被用作溶剂、萃取剂、干洗剂和金属去污剂等^[1]。职业性接触 TCE 可引起不同程度的皮肤炎症反应,多数患者还伴随有黏膜和内脏的损害,临床表现类似于药疹,称之为“职业性三氯乙烯药疹样皮炎”(occupational dermatitis medicamentosa-like of trichloroethylene, ODMLT)^[2]。研究^[3]发现 TCE 介导皮炎发生的同时也伴随着肝脏的严重损伤,且为 ODMLT 致死的主要原因之一^[4]。因此,三氯乙烯介导的免疫性肝损害的机制研究在

time (1, 3, 6 h), MTT method and LDH activity were used to observe the change of cells growth viability. The concentrations of FITC in samples and TEER of Caco-2 cells were examined to understand the effect of Hcy on Caco-2 cells permeability. The synthetic levels of LTE_4 and PGE_2 were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) in cells supernatant and the activity of NF- κ B was detected by Gel mobility migration (EMSA). **Results** After treatment with Hcy, the viability of Caco-2 cells were significantly inhibited with a time and dose dependent manner. With the increasing of Hcy concentrations, the TEER significantly decreased and the FITC transmembrane transport greatly increased, the levels of LTE_4 and PGE_2 in cells supernatant were markedly augmented ($P < 0.05$); the activity of Caco-2 cells treated with Hcy (50 $\mu\text{mol/L}$) significant augmented with a time dependent (1, 3, 6 h) manner. **Conclusion** Hcy can accelerate the synthesis of LTE_4 and PGE_2 in intestinal mucosa by activating NF- κ B signaling pathway, causing intestinal mucosal inflammation damage in Caco-2 cells.

Key words homocysteine; nuclear factor kappa B; 5-lipoxygenase; cyclooxygenase-2; leukotriene E_4 ; prostaglandin E_2

ODMLT 的发病及防治中显得更为重要。炎性小体是大分子量多蛋白复合体,是固有免疫中重要的一部分。NLRP3 炎性小体是炎性小体中研究最充分的一种。现已发现其参与了多种肝脏疾病的发生发展。为此,本实验对 NLRP3 炎性小体是否参与了三氯乙烯药疹样皮炎肝损伤做一探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 22 只 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠,6~8 周龄,[(20.6±1.6)g],安徽医科大学实验动物中心提供[合格证号:34000200000745;许可证号:scxk(皖)2011-002]。小鼠饲养在温度为 20~25℃,湿度为 60% 的室内,人工控制 12 h 昼夜节律。

1.1.2 实验试剂与仪器 TCE、弗氏完全佐剂(FCA)购自美国 Sigma 公司;橄榄油、丙酮购自国药集团化学试剂有限公司;谷丙转氨酶(ALT/GPT)生化测定试剂盒、谷草转氨酶(AST/GOT)生化测定试剂盒购自南京建成生物工程研究所;DAB 染色液购自北京中杉金桥生物技术有限公司;NLRP3 抗体购自英国 Abcam 公司(货号:ab214185);RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司;ECL 化学发光检测试剂盒购自美国 Thermo 公司;TRIzol 总 RNA 提取试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;RNA 逆转录试剂盒购自美国 Thermo 公司;LightCycler 480 SYBR Green I Master 溶液购自瑞士 Roche 公司;酶标仪(uQuant)购自美国 Bio-Tek 公司;生物普通光学显微镜购自日本 OLYMPUS 有限公司;多聚核苷酸链式反应(PCR)仪(LightCycler 480)购自瑞士 Roche 公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物处理 BALB/c 小鼠经适应性培养 1 周后,随机分为空白对照组(6 只)、溶剂对照组(4 只)、TCE 处理组(12 只)。参照 Wang et al^[5] 建立的小鼠 TCE 致敏模型对小鼠进行如下处理:实验前 24 h 将 TCE 处理组小鼠背部剃除约 2 cm×2 cm 面积大小毛发,实验第 1 天腹腔注射 50 μl 体积分数为 50% 的 TCE(TCE:丙酮:橄榄油=5:3:2)与 50 μl FCA 混合液进行初次诱导,实验第 4、7、10 d 背部皮肤涂抹 50% TCE 100 μl,实验第 17、19 天背部皮肤涂抹 30% TCE(TCE:丙酮:橄榄油=3:5:2)100 μl 进行初次和末次激发。溶剂对照组每次的染毒试剂均为体积分数之比为 3:2 的丙酮与橄榄油混合溶液 100 μl,染毒操作与 TCE 处理组

相同;空白对照组不做任何处理。于末次激发后 24 h 即实验第 20 天,根据《化学品毒性鉴定技术规范》中的皮肤致敏反应试验评分标准对本次实验小鼠皮肤反应进行评分,积分≥1 分者为阳性,归为致敏组,否则归为未致敏组。本批小鼠在末次激发后 72 h 宰杀,结合致敏情况,进一步将小鼠分为 TCE 致敏组和 TCE 未致敏组。

1.2.2 小鼠血清及肝脏组织采集 于末次激发后 72 h 眼静脉取小鼠血液于普通 EP 管中,并无菌条件下取小鼠肝脏组织。静脉血于 4℃ 条件下静置 1 h,3 000 r/min 低温离心 15 min,吸取上清液,分装后-80℃ 保存;取出的新鲜肝脏组织取部分于 4% 中性多聚甲醛溶液中固定,其余分装后-80℃ 保存。

1.2.3 小鼠肝功能测定 取出小鼠血清样本缓慢解冻后,按照 ALT、AST 生化测定试剂盒说明书操作,酶标仪 510 nm 波长下测定各孔 OD 值并求得相应 ALT、AST 活力单位。

1.2.4 小鼠肝脏组织病理 48 h 后将固定于 4% 中性多聚甲醛溶液中的肝脏取出,石蜡包埋后制成 5 μm 厚切片,苏木精-伊红染色后观察组织病理学损伤情况。

1.2.5 免疫组化法测定小鼠肝脏 NLRP3 蛋白 将制成的 5 μm 厚石蜡切片放入烤片机中 94℃ 烤片 20 min,依浓度由高到低顺序,依次放入二甲苯溶液、乙醇溶液中脱蜡,流水冲洗 5 min,PBS 冲洗 5 min×3 次,滴加过碘酸 30 s,PBS 冲洗 5 min×3 次,放入柠檬酸钠溶液中微波炉加热修复抗原,修复完毕后取出自然冷却至室温,PBS 冲洗 5 min×3 次,滴加山羊血清 37℃ 封闭 15 min,滴加一抗 4℃ 过夜。第 2 天取出后室温条件下复温 30 min,PBS 冲洗 5 min×3 次,滴加二抗 37℃ 恒温箱中放置 15 min,取出后 PBS 冲洗 5 min×3 次,滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液 37℃ 恒温箱中放置 15 min,取出后 PBS 冲洗 5 min×3 次,滴加二氨基联苯胺(DAB)显色,流水冲洗后苏木精染核,流水冲洗,干燥后中性树胶封片,显微镜下观察并拍片,结果采用 Image pro plus 软件进行处理,测定平均光密度(OD)值。

1.2.6 Western blot 检测肝脏组织 NLRP3 蛋白表达水平 RIPA 裂解液提取肝脏组织总蛋白后,BCA 法测定蛋白浓度,取 20 μg 总蛋白,SDS-PAGE 电泳分离,转膜,牛奶封闭,孵一抗过夜(1:1 000 稀释),洗涤后室温孵育山羊抗兔 IgG(1:100 000 稀释)

表1 小鼠各分组肝功能

组别	动物只数(n)	ALT(μmol/L, $\bar{x} \pm s$)	F 值	P 值	AST(μmol/L, $\bar{x} \pm s$)	F 值	P 值
空白对照	6	14.22 ± 3.42	21.06	<0.001	27.79 ± 7.01	18.43	<0.001
溶剂对照	4	15.87 ± 2.75			25.46 ± 4.57		
TCE 未致敏	7	15.66 ± 1.32			29.46 ± 6.25		
TCE 致敏	5	38.01 ± 11.00* #▽			50.64 ± 5.46* #▽		

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: ▽ $P < 0.05$

2 h 洗涤后经化学发光成像系统成像,将各目的蛋白条带荧光强度与内参蛋白 GAPDH 比较,判断各组 NLRP3 蛋白表达水平。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 检测小鼠肝脏组织 NLRP3 基因 取肝脏组织约 50 mg,放入无菌玻璃匀浆器中匀浆,用 TRIzol 提取肝脏组织总 RNA,逆转录为 cDNA 后,按以下程序扩增: 94 °C 预变性 5 min,再以 94 °C 20 s, 60 °C 20 s, 72 °C 20 s, 87 °C 10 s; 循环 55 次。选择 GAPDH 作为内参基因, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 NLRP3 基因的相对表达量。GAPDH 上游引物序列为: 5'-ACCCAGCAAGGACACTGAGCAAG-3', 下游引物: 5'-GGCCCTCCTGTTATTATGGGGGT-3'; NLRP3 上游引物: 5'-GAGTTCTTCGCTGCTATGT-3', 下游引物: 5'-ACCTTCACGTCTCGGTTTC-3'。

1.3 统计学处理 用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,定量资料结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组数据比较采用单因素方差分析,组间比较采用 LSD- t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠致敏情况 依据小鼠背部皮肤反应情况进行评分时,空白对照组、溶剂对照组均未见红斑水肿, TCE 处理组 12 只小鼠中 5 只背部皮肤有不同程度红斑水肿,致敏率为 41.7%。

2.2 各组小鼠肝功能检测结果 与空白对照组比较,溶剂对照组、TCE 未致敏组小鼠血清 ALT 与 AST 水平均无明显变化,差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 与空白对照组、溶剂对照组和 TCE 未致敏组比较, TCE 致敏组小鼠血清 ALT 与 AST 水平均增高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 小鼠肝脏组织病理学观察结果 空白对照组、溶剂对照组、TCE 未致敏组小鼠肝细胞排列整齐、细胞质均匀、核膜清晰、核仁明显,未见中性粒细胞等炎细胞浸润。TCE 致敏组可见大量肝细胞肿胀,细胞核破裂或消失,并有炎细胞聚集。见图 1。

2.4 免疫组化法检测小鼠肝脏 NLRP3 蛋白表达水平的结果 空白对照组、溶剂对照组及 TCE 未致

敏组均未见明显 NLRP3 蛋白沉积。TCE 致敏组小鼠肝脏可见除散在表达的 NLRP3 外,还有部分表达已连接成片,表达量较其他组明显升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2、图 2。

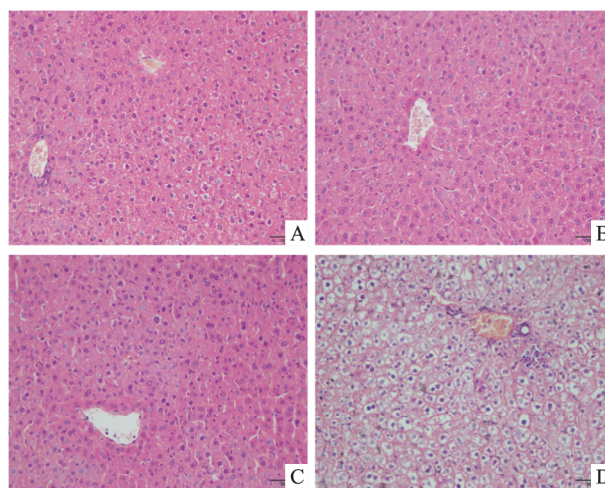


图1 小鼠肝脏病理学观察结果 HE × 400

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

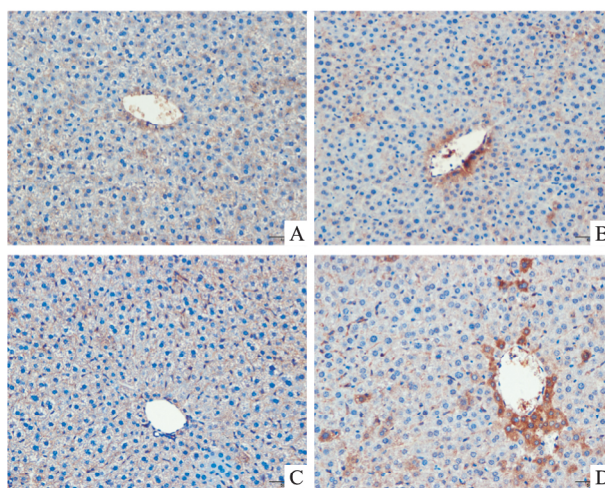


图2 免疫组化法检测各组小鼠肝脏 NLRP3 结果 IHC × 400

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 Western blot 法检测小鼠肝脏 NLRP3 蛋白含量的结果 与空白对照组比较,溶剂对照组小鼠肝脏 NLRP3 含量均未见明显变化,差异无统计学意义

($P > 0.05$)。TCE 致敏组小鼠 NLRP3 蛋白含量表达明显高于空白对照组、溶剂对照组、TCE 未致敏组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。

表 2 小鼠肝脏 NLRP3 蛋白表达水平的免疫组化评分

组别	动物只数	NLRP3
空白对照	6	0.20 ± 0.04
溶剂对照	4	0.22 ± 0.01
TCE 未致敏	7	0.29 ± 0.15
TCE 致敏	5	3.19 ± 0.74* #▽

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: ▽ $P < 0.05$

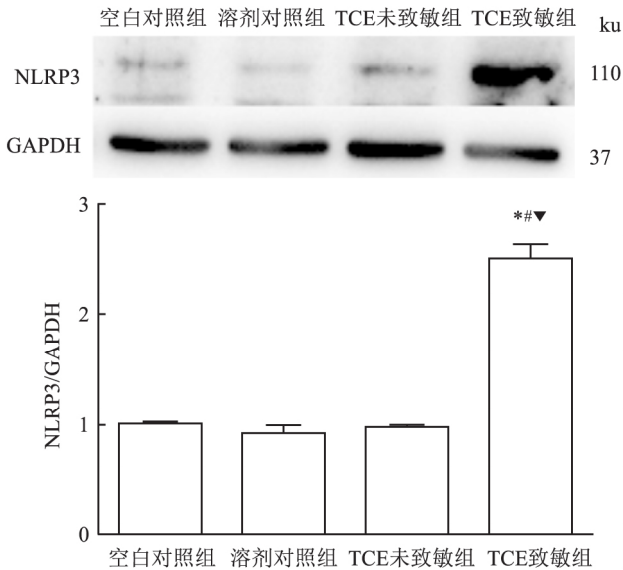


图 3 Western blot 检测小鼠肝脏 NLRP3 蛋白含量的结果

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: ▽ $P < 0.05$

2.6 小鼠肝脏 NLRP3 基因表达水平 与空白对照组比较,溶剂对照组、TCE 未致敏组 NLRP3 基因水平均未见明显升高,差异无统计学意义($P > 0.05$)。与空白对照组、溶剂对照组、TCE 未致敏组比较,TCE 致敏组小鼠肝脏 NLRP3 基因表达水平明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。

3 讨论

TCE 的职业暴露途径主要为经呼吸道和皮肤直接接触。ODMLT 为职业性接触 TCE 引起的一种类似于药疹的皮肤炎症反应,多数患者伴有内脏和黏膜的损伤 86% ~ 100% 的 ODMLT 患者会出现肝脏损害。此外,部分患者还可出现肾脏、心脏损害,严重威胁职业性接触 TCE 工人的健康^[2]。目前,大多认为其属于迟发型 IV 型变态反应,但 ODMLT 引起

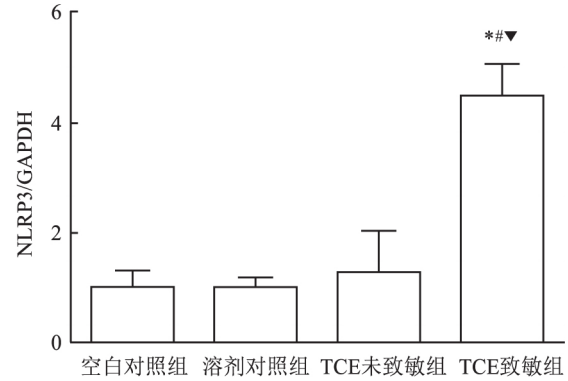


图 4 小鼠肝脏 NLRP3 基因表达水平

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: ▽ $P < 0.05$

的内脏损伤并不能完全由 IV 型变态反应来解释,其还可能与 II、III 型变态反应有关。ODMLT 的致死率约为 10% 死因主要为急性肝衰竭和严重感染。本课题组前期建立 TCE 致敏小鼠模型,研究发现 TCE 致敏小鼠出现了不同程度的肝损伤,血清 ALT、AST 水平上升,部分肝细胞水肿、空泡样变性^[6],有较严重的炎症反应。本研究表明,相比于空白对照组小鼠,TCE 未致敏组小鼠肝脏未见明显损伤,TCE 致敏组小鼠血清 ALT、AST 水平明显升高,肝脏病理结果显示 TCE 致敏组可见大量肝细胞肿胀,细胞核破裂或消失,并有炎细胞聚集。此结果与课题组前期研究^[6]结果一致。此外,相比于空白对照组,TCE 未致敏组小鼠 NLRP3 表达水平未见升高,而 TCE 致敏组小鼠肝脏可见大量 NLRP3 蛋白沉积,蛋白含量较空白对照组、溶剂对照组和 TCE 未致敏组明显升高;RT-PCR 结果也显示 TCE 致敏组小鼠 NLRP3 基因水平明显升高。NLRP3 炎性小体蛋白表达及基因转录水平与小鼠肝脏损伤结果一致。

NLRP3 炎性小体作为固有免疫中重要的一部分,在肝脏,其可存在于各种免疫细胞(如肝巨噬细胞、中性粒细胞和树突状细胞)以及非免疫细胞(如肝细胞、内皮细胞、肝星状细胞和肌成纤维细胞),原代培养的肝细胞中 NLRP3 几乎不表达^[7]。大量研究发现其参与多种肝脏疾病的发生发展,在免疫调节和炎症反应中发挥着非常重要的作用。潮蓉等^[8]发现应用 P2X7 受体特异性抑制剂能够下调 NLRP3 炎性小体水平,进而减轻小鼠的酒精性肝损伤。李凡等^[9]总结前人研究,发现 NLRP3 炎性小体的激活是肝纤维化形成的关键分子机制。刘钱等^[10]还发现慢性乙型肝炎肝细胞中 NLRP3 炎性小体表达量较正常细胞显著升高,提示 NLRP3 炎性小

体在慢性乙型肝炎的发生发展中可能发挥着重要作用。结合前人研究结果,推测 NLRP3 炎性小体在 TCE 致敏组小鼠肝细胞中的表达,可能与其炎症反应有关,NLRP3 炎性小体可能在 TCE 致敏小鼠肝脏损伤中发挥了作用。

综上所述,NLRP3 炎性小体在 TCE 致敏组小鼠肝脏中表达明显增加,提示 NLRP3 炎性小体的表达可能与 TCE 致敏小鼠免疫性肝脏损伤有关。

参考文献

- [1] 杨 鹏,藏丹丹,杨小东,等.补体 C3a 受体拮抗剂对三氯乙烯致敏小鼠肾脏免疫性损伤的影响[J].中华劳动卫生职业病杂志,2017,35(3):161-5.
- [2] 施 辛,丁 兰,陈玲玲,等.职业性三氯乙烯药疹样皮炎[J].中华皮肤科杂志,2014,47(4):302-4.
- [3] Tang X J, Que B L, Song X R, et al. Characterization of liver injury associated with hypersensitive skin reactions induced by trichloroethylene in the guinea pig maximization test [J]. *J Occup Health* 2008, 50(2): 114-21.
- [4] 张雅洁,张桂梅,季 卉,等.三氯乙烯致重症药疹样皮炎伴多系统损害 20 例[J].中华皮肤科杂志,2001,34(5):393.
- [5] Wang H, Zhang J X, Li S L, et al. An Animal Model of Trichloroethylene-Induced Skin Sensitization in BALB/c Mice [J]. *Int J Toxicol* 2015, 34(5):442-53.
- [6] 李博栋,王 贤,杨小东,等.补体调节蛋白 CD46 在聚肌胞苷酸加重三氯乙烯致敏小鼠肝损伤中的表达规律[J].环境与职业医学,2017,34(12):1060-6.
- [7] Lech M, Avila-Ferrufino A, Skuginna V, et al. Quantitative expression of RIG-like helicase, NOD-like receptor and inflammation-related mRNAs in humans and mice [J]. *Int Immunol*, 2010, 22(9):717-28.
- [8] 潮 蓉,武小娟,王羽辉,等.P2X7R/NLRP3 信号通路在酒精性肝损伤中的作用[J].中国药理学通报,2018,34(4):491-5.
- [9] 李 凡,白纪红,梁志清. NLRP3 炎症小体在肝纤维化形成中作用的研究进展 [J]. 山东医药,2018,58(8):98-100.
- [10] 刘 钱,王靖雪,府伟灵.肝细胞内 NLRP3 炎症体的表达与炎症应答初步研究[J].免疫学杂志,2014,30(2):129-32.

The relationship between NLRP3 inflammasome and liver immune injury in trichloroethylene-sensitized mice

Xie Haibo, Li Na, Chen Shuangping, et al

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

Abstract Objective To explore the the relationship between NLRP3 inflammasome and liver immune injury in trichloroethylene-sensitized mice by detect the expression of NLRP3 inflammasome. **Methods** Totally 22 female 6 ~ 8 weeks SPF BALB/c mice were randomly divided into blank control group ($n=6$), solvent control group ($n=4$) and TCE treatment group ($n=12$) to build the TCE-sensitized mice module. 24 hours after the last challenge, all 12 TCE treated mice were divided into TCE sensitized group and TCE non-sensitized group according to the skin sensitization reaction score. All mice were sacrificed at 72 h after the last challenge. The blood were collected, and then used for detecting the serum ALT and AST levels to present for liver function. Mouse liver pathology was observed after mouse liver took out at aseptic conditions. The level of NLRP3 protein was observed by immunohistochemical and Western blot. The liver NLRP3 mRNA level was tested by real-time PCR. **Results** Compared with blank control group, solvent control group and TCE non-sensitized group, ALT and AST levels of TCE-sensitized group were significantly increased ($P<0.05$). There were no obvious pathological changes in blank control group, solvent control group and TCE non-sensitized group. In TCE-sensitized group, a large number of hepatocytes were swollen, the nucleus was ruptured or disappeared, and inflammatory cells were gathered. The results of immunohistochemical showed a large number of NLRP3 expressed in TCE-sensitized mice liver. The results from Western blot showed that the liver NLRP3 protein was significantly higher than blank control group, solvent control group and TCE non-sensitized group. The gene level of NLRP3 was also significantly increased by real-time PCR. **Conclusion**

The NLRP3 inflammasome is significantly increased in TCE-sensitized group mouse, indicate that NLRP3 inflammasome may associated with the liver immune injury in trichloroethylene-sensitized mice.

Key words trichloroethy; NLRP3; liver