

◇ 预防医学研究 ◇

三氯乙烯致敏小鼠 Tc1/Tc2 细胞失衡研究

张澄¹, 王峰¹, 冷静², 查晚生¹, 张家祥¹, 李树龙¹, 王慧¹, 沈彤³, 朱启星^{1,3}

摘要 目的 检测小鼠经三氯乙烯(TCE)致敏后 Tc1、Tc2 细胞的变化,探讨 Tc1/Tc2 细胞失衡在三氯乙烯药疹样皮炎(DMLT)中的可能作用。方法 BALB/c 雌性小鼠随机分为空白对照、溶剂对照和 TCE 处理组,在末次激发后 24、48、72 h 和 7 d 根据皮肤肿胀程度和病理表现分为致敏组和未致敏组。无菌取出脾脏,用流式细胞术检测 Tc1、Tc2 细胞数量,实时荧光定量 PCR 检测 T-bet、GATA-3 mRNA 转录水平。结果 与未致敏组相比,致敏组 Tc1 细胞数量在 24、48、72 h 和 7 d 显著上升($P < 0.01$),72 h 水平最高;致敏组 Tc2 细胞数量在 24、48、72 h 显著上升($P < 0.01$),72 h 水平达到峰值,7 d 较未致敏组差异无统计学意义($P > 0.05$);致敏组

Tc1/Tc2 比例于 48、72 h 和 7 d 较未致敏组显著上升($P < 0.01$)。致敏组 T-bet、GATA-3 mRNA 转录水平在 48、72 h 和 7 d 较相应时点未致敏组显著上升($P < 0.05$, $P < 0.01$),72 h 达到峰值。结论 Tc1/Tc2 细胞失衡可能参与了 TCE 致敏小鼠的免疫损伤过程并发挥重要的作用。

关键词 三氯乙烯;细胞毒性 T 细胞;BALB/c 小鼠

中图分类号 R 114

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)09-1253-05

三氯乙烯(trichloroethylene, TCE)是重要的工业和环境毒物,职业暴露 TCE 可诱发工人罹患职业性三氯乙烯药疹样皮炎(occupational medicamentosa-like dermatitis induced by trichloroethylene, DMLT),该病病情凶险,病死率高,已列入职业病范畴^[1]。DMLT 的临床表现符合 IV 型变态反应特征^[1],其详细发病机制尚未阐明,T 细胞介导的免疫调节失衡可能参与发病^[2]。CD8⁺ T 细胞又称细胞毒性 T 细胞(cytotoxic T cell, Tc),可在一定条件下极化为 Tc1 或 Tc2 细胞,通过生成 I 类或 II 类细胞因子参与调节免疫细胞分化和炎症反应,Tc1/Tc2 极化失衡与多种免疫性疾病的发病与进展相关^[3-4]。该研

2014-05-19 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81371730);高等学校博士学科点专项科研基金(编号:20133420110001)

作者单位:¹安徽医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学,合肥 230032

²安徽省医学科学研究所,合肥 230061

³安徽医科大学第一附属医院皮肤病研究所,合肥 230022

作者简介:张澄,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

Localization and expression of human FKBP25 deletion mutants in mammalian cell lines

Zhang Shanjin¹, Wang Beihua², Gong Rui², et al

(¹Dept of Pathophysiology, ²Dept of Biology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the expression and localization of the product of FKBP25 deleted mutants in cells. **Methods** The full length cDNA fragment of FKBP25 was used for PCR amplification, to construct FKBP25 deletion mutant gene sequence respectively, and inserted them into pcDNA3.1 vector. All expressions were detected by Western blot and immunofluorescence. **Results** The expression of FKBP25 deletion mutants was constructed successfully. Western blot assay showed that FKBP25 deletion mutants could express efficiently in HEK293T cell line, and the results of immunofluorescence microscopy showed that the FKBP25 deletion mutants protein was found to be localized in the nucleus and cytoplasm in COS7 cells lines. **Conclusion** The FKBP25 deletion mutants can express in HEK 293T and COS7 cell lines. The results provide the basis for further understanding of the function of FKBP25 deletion mutants.

Key words FKBP25; gene expression; immunofluorescence; cellular localization

究通过建立 TCE 致敏动物模型,检测脾脏细胞中 Tc1、Tc2 细胞数量以及特征性转录因子 T-bet 和 GATA-3 mRNA 的转录水平,观察 Tc1、Tc2 细胞的变化,为 Tc1/Tc2 细胞失衡在 DMLT 中的致病机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 TCE (99.5% 分析纯级) 购于美国 Acros Organic 公司;橄榄油、丙酮购于中国医药上海化学试剂公司;弗氏完全佐剂 (FCA)、佛波酯 (PMA)、离子霉素 (ionomycin)、莫能菌素 (monensin) 购于美国 Sigma 公司;抗小鼠 CD3-FITC 抗体、抗小鼠 CD8-PE-Cy5 抗体、抗小鼠 IFN- γ -PE 抗体、抗小鼠 IL-4-PE 抗体购于美国 eBioscience 公司;固定液、破膜液购于美国贝克曼库尔特公司;胎牛血清、RPMI 1640 培养液购于美国 Hyclone 公司;T-bet 引物、GATA-3 引物、GAPDH 引物、UNIQ-10 柱式 TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒购于上海生工生物工程股份有限公司。流式细胞仪为 Beckman Coulter Epics XL-4C、离心机为 Hettich Universal 320/320R 台式低温高速离心机。

1.2 实验动物处理 6~8 周龄健康 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠共 75 只, (19.21 $\pm$ 1.20) g, 购于安徽省实验动物中心, 人工维持 12 h 昼夜环境, 控制环境温度 20~25 $^{\circ}\text{C}$, 湿度 (50 $\pm$ 5) %。小鼠经适应性喂养 1 周后, 随机分成空白对照 ($n=5$)、溶剂对照 ($n=5$) 和 TCE 处理组 ($n=65$), 根据本课题组成熟的实验方法建立小鼠致敏模型^[5]。简单步骤如下: 实验前 24 h 剔除小鼠背部毛发大小约为 1.5 $\times$ 2 (cm^2) 并保证 TCE 处理时该处皮肤裸露; TCE 处理组小鼠于第 1 天腹部注射 100 μl 50% TCE (TCE: 橄榄油: 丙酮 = 5: 2: 3) 与等量 FCA 的混合液, 第 4、7、10 天于背部裸露处涂抹 100 μl 50% TCE, 第 17、19 天于背部裸露处涂抹 100 μl 30% TCE (TCE: 橄榄油: 丙酮 = 3: 2: 5)。溶剂对照组仅使用与 TCE 处理组相同比例的橄榄油与丙酮混合物, 空白对照组不做任何处理。末次激发后 24 h ($n=16$)、48 h ($n=16$)、72 h ($n=16$) 和 7 d ($n=17$) 4 个时点处死动物, 根据皮肤的肿胀程度和病理表现判断是否致敏。无菌取出脾脏, 一半立即研磨用于流式细胞术, 另一半液氮速冻后于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冻存以备提取 RNA。

1.3 流式细胞仪检测脾脏 Tc1 和 Tc2 比例 取 25 mg 小鼠新鲜脾脏组织研磨制备脾脏单细胞悬液,

RPMI 1640 (含胎牛血清) 调节细胞浓度至 $2 \times 10^6 / \text{ml}$ 。取 300 μl 脾脏单细胞悬液并加入 PMA 工作液、离子霉素工作液和莫能菌素工作液于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 培养箱培养 6 h。加入 1 μl CD3-FITC 和 1 μl CD8-PE-Cy5 抗体, 室温避光 15 min, 分成两管并分别加入 50 μl 固定液, 室温避光 15 min。离心 (2 500 r/min, 10 min) 弃上清液后加入 50 μl 破膜剂避光 5 min, 在两管中加入相应抗体 (Tc1 管加入 1 μl IFN- γ -PE 抗体, Tc2 管加入 1 μl IL-4-PE 抗体), 室温避光 15 min 后离心 (2 500 r/min, 10 min) 弃上清液, PBS 重悬细胞后流式细胞仪分别检测 Tc1 和 Tc2 细胞比例。数据采取 FCS Express V3 软件分析, CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ IFN γ^{+} 为 Tc1 细胞, CD3 $^{+}$ CD8 $^{+}$ IL4 $^{+}$ 为 Tc2 细胞, 结果表示为 Tc1、Tc2 细胞占 CD8 $^{+}$ T 细胞的比例。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测脾脏 T-bet 和 GATA-3 mRNA 转录水平 小鼠冻存脾脏室温解冻后取 25 mg, 制成匀浆后用 UNIQ-10 柱式 TRIzol 总 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA。引物序列见表 1, 按如下程序扩增 T-bet、GATA-3 和 GAPDH: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min 后进行 35 个循环, 循环条件依次为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 87 $^{\circ}\text{C}$ 10 s。以 GAPDH 为内参基因, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析基因的相对表达量。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

引物名称	引物序列 (5'-3')
T-bet	Forward: GGACCCAACTGCTCAACTGCT
	Reverse: ATAAGTGTGTTCCCGAGGTGTC
GATA-3	Forward: CCAGGCAAGATGAGAAAGAGTG
	Reverse: CATAGGGCGGATAGGTGGTAAT
GAPDH	Forward: AGCAATGCCTCCTGCACCACCAAC
	Reverse: CCGGAGGGGCCATCCACAGTCT

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组均数比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用最小显著差异法 (LSD 法), 两组独立样本均数比较采用 t 检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 TCE 致敏小鼠 Tc1、Tc2 数量的变化 溶剂对照 Tc1 细胞数量与空白对照组细胞数量差异无统计学意义 ($t=0.000$, $P>0.05$), TCE 未致敏小鼠 Tc1 细胞数量与溶剂对照细胞数量差异无统计学意义 ($F=1.557$, $P>0.05$)。致敏小鼠 Tc1 细胞数量在 24 h ($n=6$)、48 h ($n=6$)、72 h ($n=6$) 和 7 d ($n=6$)

均显著高于相应未致敏组水平 ($t = 44.308, P < 0.01$; $t = 98.718, P < 0.01$; $t = 92.597, P < 0.01$; $t = 84.266, P < 0.001$) ,趋势表现为 24 h 开始逐渐上升并在 72 h 达到最高峰 ,此后在 7 d 出现下降但仍显著高于未致敏水平 ,见图 1、2。溶剂对照 Tc2 细胞数量与空白对照差异无统计学意义 ($t = 0.196, P > 0.05$) ,未致敏小鼠 Tc2 细胞数量与溶剂对照差异无统计学意义 ($F = 0.323, P > 0.05$) 。致敏组 Tc2 细胞数量于 24、48、72 h 显著高于相应未致敏组 ($t = 4.427, P < 0.01$; $t = 9.689, P < 0.01$; $t = 26.841, P < 0.01$) ,动态同样表现为 24 h 开始上升 ,72 h 达到最高并于 7 d 下降 ,Tc2 细胞水平在 7 d 时与相应未致敏组比较差异无统计学意义 ($t = 1.890, P > 0.05$) ,见图 3、4。

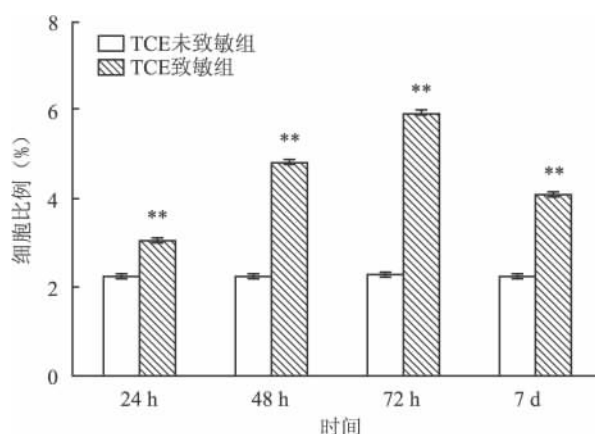


图 1 各时点 Tc1 细胞数量的变化
与 TCE 未致敏组比较: ** $P < 0.01$

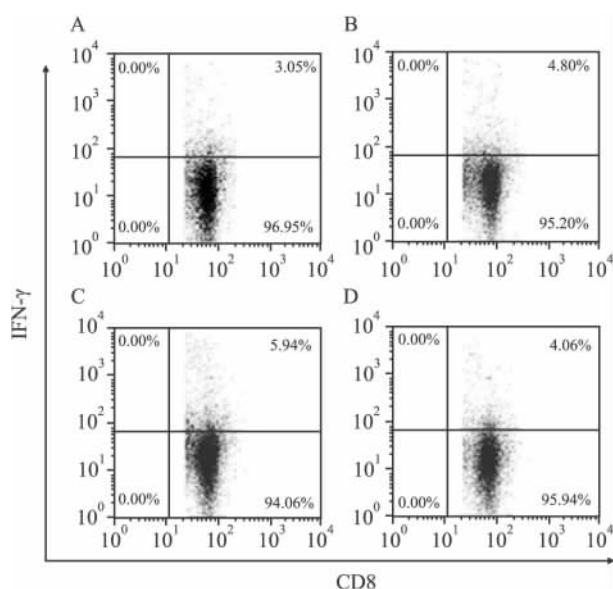


图 2 各时点 TCE 致敏组 Tc1 细胞流式结果
A: 24 h; B: 48 h; C: 72 h; D: 7 d

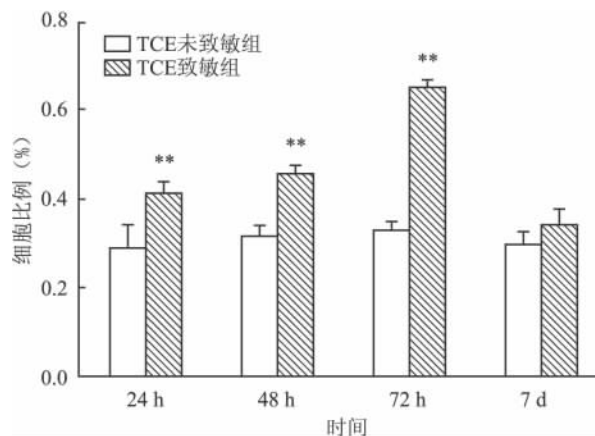


图 3 各时点 Tc2 细胞数量的变化
与 TCE 未致敏组比较: ** $P < 0.01$

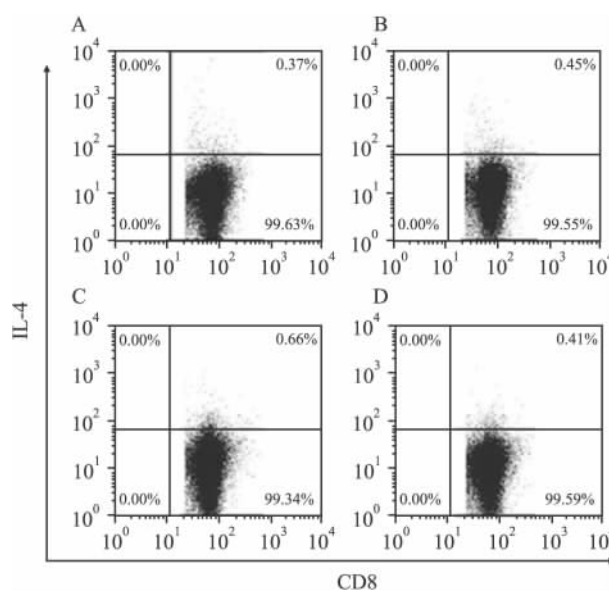


图 4 各时点致敏组 Tc2 细胞流式细胞术结果
A: 24 h; B: 48 h; C: 72 h; D: 7 d

2.2 TCE 致敏小鼠 Tc1/Tc2 比例的变化 溶剂对照组 Tc1/Tc2 比例较空白对照组差异无统计学意义 ($t = 0.117, P > 0.05$) ,未致敏组 Tc1/Tc2 比例较溶剂对照差异无统计学意义 ($F = 0.629, P > 0.05$) 。致敏组 Tc1/Tc2 比例在 24 h 较相应未致敏组差异无统计学意义 ($t = 0.685, P > 0.05$) ,在 48、72 h 和 7 d 时较相应未致敏组水平显著升高 ($t = 11.613, P < 0.01$; $t = 11.094, P < 0.01$; $t = 10.543, P < 0.01$) ,见图 5。

2.3 TCE 致敏小鼠 T-bet、GATA-3 mRNA 水平的变化 溶剂对照较空白对照 T-bet mRNA 转录水平差异无统计学意义 ($t = 1.765, P > 0.05$) ,未致敏组 T-bet 转录水平较溶剂对照组差异无统计学意义 ($F =$

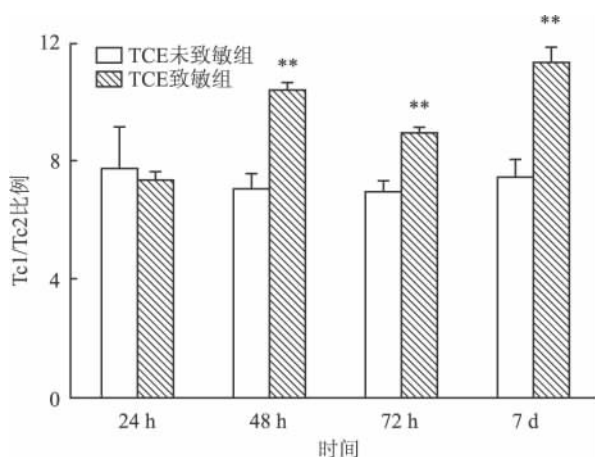


图5 各时点 Tc1/Tc2 比例的变化

与 TCE 未致敏组比较: ** $P < 0.01$

2.659, $P > 0.05$)。24 h 致敏组 T-bet 转录水平较相应未致敏组差异无统计学意义 ($t = 1.801$, $P > 0.05$)。48、72 h 和 7 d 致敏组 T-bet 转录水平较相应未致敏组显著上调 ($t = 7.142$, $P < 0.05$; $t = 8.262$, $P < 0.05$; $t = 8.274$, $P < 0.01$)。于 72 h 达到高峰并于 7 d 下降,见图 6。溶剂对照 GATA-3 转录水平与空白对照组差异无统计学意义 ($t = 0.100$, $P > 0.05$)。与未致敏组比较,差异无统计学意义 ($F = 0.577$, $P > 0.05$)。致敏组 GATA-3 转录水平于 24 h 较相应未致敏组差异无统计学意义 ($t = 1.841$, $P > 0.05$)。于 48、72 h 和 7 d 较相应未致敏组显著上调 ($t = 14.212$, $P < 0.01$; $t = 15.910$, $P < 0.01$; $t = 7.762$, $P < 0.01$)。72 h 达到高峰,见图 7。

3 讨论

在 IV 型变态反应中, Tc1/Tc2 稳态失衡可能通过扰乱免疫细胞的分化和细胞因子的释放,参与多种免疫性疾病的发生发展^[3-4]。本研究中,流式细胞术检测结果显示,致敏小鼠 Tc1、Tc2 细胞数量从 24 h 开始显著上升并于 72 h 达到高峰,提示 TCE 致敏急性期 Tc1、Tc2 细胞分化被促进。随后 Tc1、Tc2 数量于 7 d 下降,提示 Tc 细胞分化随时间逐渐恢复正常,这一趋势与 DMLT 患者 Tc 细胞数量先上升后下降的现象一致^[2]。观察各时点 Tc1/Tc2 比例发现 48、72 h 和 7 d 致敏组比例显著上升,表明平衡向 Tc1 方向偏移。T-bet、GATA-3 的 mRNA 检测结果显示,致敏组两种转录因子 mRNA 水平在 48、72 h 和 7 d 均较相应未致敏组显著上调并于 7 d 达到高峰,与文献^[6-7]报道 TCE 显著上调 L02 细胞 GATA-3 mRNA 水平, DMLT 患者 GATA-3 mRNA 水平较正常者显著上升等结果一致。

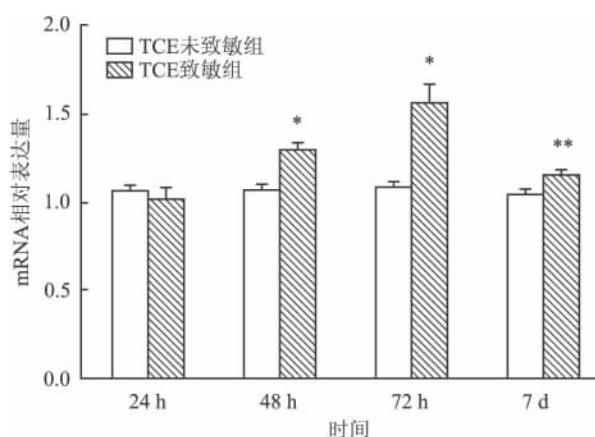


图6 各时点 T-bet 转录水平的变化

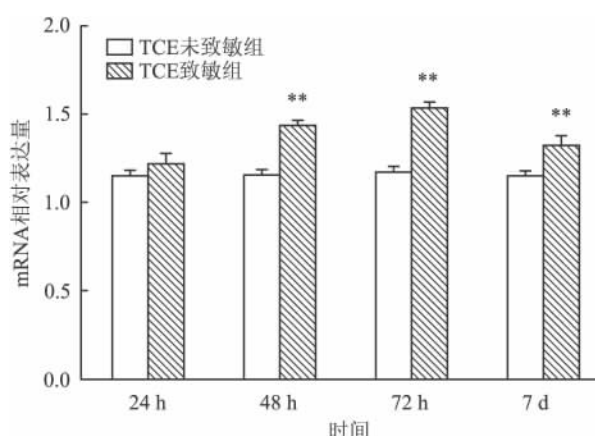
与 TCE 未致敏组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 

图7 各时点 GATA-3 转录水平的变化

与 TCE 未致敏组比较: ** $P < 0.01$

Tc 细胞接受抗原刺激后发生增殖并分化为效应细胞,引起细胞数量激增,成熟的效应细胞发挥作用后大部分自发凋亡,只保留小部分成熟为记忆细胞并长期存活^[8],该过程可能导致 Tc1、Tc2 数量先上升后下降。极化的 Tc1 细胞分泌 IFN- γ 等 I 型细胞因子,拮抗 Tc2 分化以及 IL-4 等 II 型细胞因子的合成,增强 Tc 细胞 CD8 分子的表达和裂解细胞的能力^[9],提示 Tc1 主导的平衡偏移可能通过该生物学效应介导 TCE 致敏急性期的病理改变。参与调控 Tc 细胞极化的因素较多,相关文献^[10]报道 TCE 通过增强 Lck 磷酸化水平显著提高 T 细胞受体通路介导的 Tc 细胞增殖,提示 TCE 可能具有调控 Tc 细胞的能力。此外 T-bet 和 GATA-3 也可能参与 Tc1、Tc2 细胞极化的调控^[11-12]。研究^[13]显示 T-bet 通过募集染色质重塑复合物至 *Ifng* 基因以改变染色质状态,便于转录和翻译 IFN- γ 以维持 Tc1 细胞极化;GATA-3 也具有染色质重塑能力,能够引起 IL-4

等 II 型细胞因子基因位点对 DNA 酶敏感 加速该类细胞因子的表达,维持 Tc2 分化并抑制 Tc1 分化^[14]。

本研究结果提示 TCE 致敏小鼠体内 Tc1、Tc2 细胞均显著上调,Tc1/Tc2 平衡被扰乱,T-bet 和 GATA-3 可能参与该过程的调控。

参考文献

- [1] 徐 辉,冷 静,沈 彤,等. 我国职业性三氯乙烯药疹样皮炎研究进展[J]. 中国工业医学杂志,2011,24(3): 196-9.
- [2] 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): 1017-21.
- [3] Betts R J, Kemeny D M. CD8 + T cells in asthma: friend or foe? [J]. *Pharmacol Ther*, 2009, 121(2): 123-31.
- [4] 张慧华. 强直性脊柱炎患者 T 细胞极化状态分析[J]. 中国农村卫生事业管理,2011,31(10): 1081-2.
- [5] 张家祥,查晚生,王 峰,等. 三氯乙烯致敏小鼠体内补体 C3、C4b 表达水平研究[J]. 中国工业医学杂志,2013,26(1): 35-7.
- [6] 周 丽,徐新云,丁利平,等. 三氯乙烯染毒 L02 细胞后 Foxp3 和 GATA3 基因 mRNA 表达水平改变[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(12): 2773-5.
- [7] 徐新云,刘月峰,易 娟,等. 三氯乙烯药疹样皮炎患者免疫相关基因的表达水平[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2011,29(11): 816-9.
- [8] Kaech S M, Cui W. Transcriptional control of effector and memory CD8 + T cell differentiation [J]. *Nat Rev Immunol*, 2012, 12(11): 749-61.
- [9] Apte S H, Groves P, Olver S, et al. IFN-gamma inhibits IL-4-induced type 2 cytokine expression by CD8 T cells *in vivo* and modulates the anti-tumor response [J]. *J Immunol*, 2010, 185(2): 998-1004.
- [10] Kobayashi R, Nakanishi T, Nagase H. Trichloroethylene enhances TCR-CD3-induced proliferation of CD8(+) rather than CD4(+) T cells[J]. *J Toxicol Sci*, 2012, 37(2): 381-7.
- [11] Jia Y, Domenico J, Takeda K, et al. Steroidogenic enzyme Cyp11a1 regulates Type 2 CD8 + T cell skewing in allergic lung disease[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(20): 8152-7.
- [12] Amsen D, Spilianakis C G, Flavell R A. How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made? [J]. *Curr Opin Immunol*, 2009, 21(2): 153-60.
- [13] Oestreich K J, Weinmann A S. Transcriptional mechanisms that regulate T helper 1 cell differentiation. [J]. *Curr Opin Immunol*, 2012, 24(2): 191-5.
- [14] Zeng W P. 'All things considered': transcriptional regulation of T helper type 2 cell differentiation from precursor to effector activation[J]. *Immunology*, 2013, 140(1): 31-8.

The study on imbalance of Tc1/Tc2 cells in trichloroethylene sensitized mice

Zhang Cheng¹, Wang Feng¹, Leng Jing², et al

(¹Dept of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032; ²Anhui Academy of Medical Science, Hefei 230061)

Abstract Objective To detect the alterations of Tc1 and Tc2 cells in trichloroethylene (TCE) sensitized mice and to shed light on the possible role of Tc1/Tc2 imbalance on occupational medicamentosa-like dermatitis induced by trichloroethylene (DMLT). **Methods** Female BALB/c mice, randomly separated into blank control, solvent control and TCE group, were sacrificed on 24, 48, 72 h and 7 d after last challenge. Sensitized or non-sensitized mice were identified by cutaneous swelling and histological appearance before sacrifice. Spleens were taken to prepare splenocyte suspensions quantifying Tc1 and Tc2 by flow cytometry. Tc lineage-specific transcription factors, T-bet and GATA-3, were evaluated by real-time fluorescence quantitative PCR. **Results** Compared with non-sensitized group, the percentages of Tc1 cells in sensitized mice were significantly higher at four consecutive timepoints ($P < 0.01$), which peaked at 72 h. Tc2 cell levels in sensitized mice were markedly elevated at 24 and 48 h with reaching the summit at 72 h ($P < 0.01$), whereas the level at 7 d showed no significant difference with non-sensitized mice ($P > 0.05$). Tc1/Tc2 ratios in sensitized group were significantly higher at 48, 72 h and 7 d compared with non-sensitized group. The levels of T-bet and GATA-3 mRNA in sensitized mice were remarkably increased than corresponding non-sensitized mice at 48, 72 h and 7 d ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** The imbalance of Tc1/Tc2 cells may play a key role in the immunological damage in TCE sensitized mice.

Key words trichloroethylene; cytotoxic T cell; BALB/c mice