

三氯乙烯对小鼠肝脏 PPAR α 和 PPAR γ 表达的影响

侯菲菲¹ 沈 彤¹ 王 进¹ 房 魏¹ 张 澄² 朱启星²

摘要 目的 探讨饮水摄入三氯乙烯(TCE)对小鼠肝脏过氧化物酶体增殖物活化受体(PPAR) α 和PPAR γ 的影响。方法 雌性BALB/c小鼠随机分为空白对照组、溶剂对照组、2.5 g/L TCE组和5.0 g/L TCE组,TCE经饮水暴露。分别在第2、4、8、12周时,取外周血检测肝功能;处死小鼠取肝脏组织,HE染色进行病理观察;分别采用实时荧光定量RT-PCR法和免疫组化法检测PPAR α 和PPAR γ 的mRNA水平和蛋白表达。结果 与空白对照组及溶剂对照组比较,2.5、5.0 g/L TCE组小鼠谷丙转氨酶(ALT)水平在第2、4周明显升高($P < 0.05$);HE染色显示2.5、5.0 g/L TCE组小鼠肝脏组织有明显炎细胞浸润及肝细胞变性,肝损伤在4周时最明显;与空白对照组及溶剂对照组比较,2.5、5.0 g/L TCE组小鼠肝脏中PPAR α 和PPAR γ mRNA表达量在4、8、12周时明显上升($P < 0.05$, $P < 0.01$);2.5、5.0 g/L TCE组小鼠肝脏组织细胞核中均见PPAR α 和PPAR γ 的阳性表达,与空白对

照组及溶剂对照组比较,各时期肝脏细胞核PPAR α 和PPAR γ 的阳性表达率显著上升($P < 0.05$)。结论 饮水摄入TCE能上调小鼠肝脏PPAR α 和PPAR γ 表达。

关键词 三氯乙烯; PPAR α ; PPAR γ ; 肝毒性

中图分类号 R 114

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2014)04-0467-05

三氯乙烯(trichloroethylene, TCE)是工业上广泛应用的氯代类有机溶剂,除职业暴露外,由于大量应用加之处置不当,其已大量进入大气、土壤和地下水系统,成为一种重要的环境污染物^[1]。职业环境中TCE暴露主要通过呼吸道和皮肤,而普通人群中TCE暴露主要是通过饮水摄入。TCE可引起机体多脏器损害,在TCE职业暴露人群中发生的TCE药疹样皮炎,患者在出现严重皮肤损害的同时还表现出明显的肝脏损害^[2]。研究^[3]显示长期TCE摄入主要引起肝脏毒性,目前TCE长期暴露引起肝脏毒性的具体机制还不清楚。研究^[4]表明许多环境毒物所致肝脏毒性与其诱导核受体超家族转录因子过氧化物酶体增殖物活化受体(peroxisome proliferator activated receptors, PPARs)表达相关。该研究通过检测经饮水摄入TCE小鼠肝脏损伤和肝脏中PPAR α

2013-11-25 接收

基金项目:安徽省自然科学基金项目(编号:11040606M213);教育部科学技术研究重点项目(编号:210100)

作者单位:安徽医科大学公共卫生学院¹ 卫生毒理学系、² 劳动卫生与环境卫生系,合肥 230032

作者简介:侯菲菲,女,硕士研究生;

沈 彤,男,博士,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: ahmusht@163.com

Effects of pubertal fenvalerate exposure on androgen receptor and estrogen receptors in hippocampus of mice

Zhao Yingying¹, Dai Bo¹, Wang Hua², et al

(¹ Dept of Maternal, Child & Adolescent Health, ² Dept of Toxicology, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effects of pubertal fenvalerate exposure on the expression of androgen receptor (AR) and estrogen receptors (ERs) in hippocampus. **Methods** 60 male and female mice in postnatal day (PND) 28 were randomly divided into five groups: the blank group, the control group and fenvalerate (0.02, 0.2, 2 mg/kg) group. Pubertal male and female mice in treatment groups were treated with fenvalerate (0.02, 0.2, 2 mg/kg) by gavage daily from PND28 to PND56, while the blank gave nothing and controls received corn oil. After four weeks, the mice were sacrificed, then hippocampus was excised. Protein expression of AR, two estrogen receptors (ER α and ER β) in hippocampus were analyzed by Western blot. **Results** In males, the protein expression of AR in hippocampus was markedly upregulated in pubertal fenvalerate exposure. In females, the protein expression of AR in hippocampus was of no statistically significant differences between groups. There was no statistically significant difference of the ER α and ER β protein expression among all the sexual groups. **Conclusion** Pubertal fenvalerate exposure disrupts AR expression in hippocampus of mice.

Key words puberty; hippocampus; androgen receptor; estrogen receptors

和 PPAR γ 的表达情况,探讨 TCE 暴露对小鼠肝脏 PPARs 表达的影响及其与肝脏毒性的关系,为防治 TCE 危害提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 TCE 和二甲基亚砜(DMSO)为分析纯(美国 Sigma 公司);RNA 抽提试剂盒(美国 QIAGEN 公司);反转录试剂盒和 RT-PCR 试剂盒[宝生物工程(大连)有限公司];兔抗小鼠 PPAR α 单克隆抗体和兔抗小鼠 PPAR γ 单克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司);正常山羊血清封闭液(武汉博士德生物工程有限公司);快捷性酶标羊抗兔 IgG(福州迈新生物技术开发有限公司);DAB 显色剂(北京中杉金桥生物技术有限公司);Applied Biosystems 7500 实时 PCR 仪(美国 AB 公司);Universal 320/320R 型台式低温高速离心机(德国 Hettich 公司);罗氏 P800 全自动生化仪(美国 Bio-Tek 公司)。

1.2 实验动物及处理 80 只 6 周龄雌性 BALB/c 小鼠,SPF 级,体重 16~18 g,购自北京维通利华实验动物中心,饲养于清洁动物房,维持 12 h 光照/黑暗昼夜节律,自由进食;适应性饲养 1 周后随机分为空白对照组、溶剂对照组、2.5 g/L TCE 组和 5.0 g/L TCE 组。TCE 用 DMSO 溶解(终浓度不超过 1%)后经饮水摄入,每天记录动物饮水量,为保持饮水中 TCE 浓度,每 2 d 换水 1 次;小鼠每周称重 1 次;分别在第 2、4、8、12 周时摘眼球取血,处死小鼠无菌取肝脏,称重,计算肝脏系数(肝脏重量/体重)。

1.3 肝功能检测 外周血 4℃ 静置 1 h 后 3 000 r/min 离心 10 min,取血清,全自动生化仪检测肝功能指标谷丙转氨酶(ALT)。

1.4 肝脏组织病理学检查 取新鲜肝脏组织固定于 4% 多聚甲醛,石蜡包埋制备组织蜡块,连续切片,常规 HE 染色,显微镜观察组织病理学改变。

1.5 实时荧光定量 RT-PCR 法检测肝脏 PPAR α 和 PPAR γ mRNA 水平 取新鲜肝脏制备匀浆,用 RNA 抽提试剂盒提取总 RNA,用逆转录试剂盒逆转录成 cDNA,按如下程序进行 RT-PCR 反应:94℃ 预变性 5 min,35 个循环,循环参数为 94℃ 20 s,60℃ 20 s,72℃ 20 s,87℃ 10 s。以 GAPDH 为内参,用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析基因的相对表达量。引物序列为:PPAR α : 5'-GGGTACCACTACGGAGTTCACG-3' (上游),5'-CAGACAGGCACTTGTGAAAACG-3' (下游);PPAR γ : 5'-TGACCACTCCCATTCCTTT-3' (上游),5'-

GCTCTACTTTGATCGCACTTT-3' (下游);GAPDH: 5'-AGCAATGCCTCCTGCACCACCAAC-3' (上游),5'-CCGGAGGGGCCATCCACAGTCT-3' (下游)。

1.6 免疫组化法检测肝脏 PPAR α 和 PPAR γ 蛋白表达 取新鲜肝脏组织固定于 4% 多聚甲醛,石蜡包埋制备组织蜡块。切片后常规脱蜡水化,Triton X-100 细胞通透,双氧水消除内源性过氧化物酶,枸橼酸钠抗原修复,正常山羊血清封闭,滴加一抗(1:500)4℃ 过夜,第 2 天取出洗净后滴加二抗,PBS 充分冲洗后 DAB 显色,苏木精复染,干燥,封片。阴性对照以等量 PBS 代替一抗,其他步骤同上。PPAR α 和 PPAR γ 细胞核阳性表达率计算:400 倍镜下选取 5 个具有代表性的视野,计算阳性细胞所占百分比,并求其平均数。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,符合正态分布的资料用单因素方差分析(ANOVA)进行多组间的比较,用 t 检验进行两组间的比较,非正态分布资料采用非参数检验。

2 结果

2.1 一般情况 实验期间各组小鼠一般情况良好,未出现个体因 TCE 摄入而死亡,各组小鼠平均饮水量和体重增长差异无统计学意义,各时间点小鼠肝脏系数组间差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 饮水摄入 TCE 对小鼠肝功能的影响 在 2、4、8、12 周,溶剂对照组小鼠肝脏 ALT 水平与空白对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);在 2、4 周,2.5、5.0 g/L TCE 组 ALT 水平较对照组有所升高,并且 5.0 g/L TCE 组的升高趋势比 2.5 g/L TCE 组更加明显($P < 0.05$, $P < 0.01$);在 8、12 周,2.5、5.0 g/L TCE 组 ALT 水平有所下降,但仍高于对照组,只有 5.0 g/L TCE 组 ALT 水平显著高于对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$),其他组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见图 1。

2.3 饮水摄入 TCE 对小鼠肝脏组织病理学影响 组织病理检查显示,空白对照组和溶剂对照组小鼠肝细胞排列整齐,胞核大而圆,核仁明显,胞质均匀,无炎性改变(图 2A、B);TCE 暴露组小鼠肝脏组织汇管周围见明显炎细胞浸润,部分肝细胞轻度水肿,少许细胞变性或坏死,4 周时最明显(图 2F),且 5.0 g/L 组(图 2F)较 2.5 g/L 组(图 2E)显著,在 8 周(图 2G、H)和 12 周时损伤程度有所减轻。

2.4 饮水摄入 TCE 对小鼠肝脏 PPAR α 、PPAR γ

mRNA 水平的影响 在 2、4、8、12 周,溶剂对照组小鼠肝脏 PPAR α 和 PPAR γ mRNA 水平与空白对照组比较差异无统计学意义;在 4、8、12 周,TCE 暴露组 PPAR α mRNA 水平高于空白对照组和溶剂对照组,且 5.0 g/L TCE 组上升趋势高于 2.5 g/L TCE 组($P < 0.05$, $P < 0.01$);在 4 周时,2.5、5.0 g/L TCE 组 PPAR γ mRNA 水平均高于空白对照组和溶剂对照组($P < 0.05$);在 8、12 周,5.0 g/L TCE 组 PPAR γ mRNA 水平高于空白对照组和溶剂对照组($P < 0.05$, $P < 0.01$),2.5 g/L TCE 组 PPAR γ mRNA 水平显著高于空白对照组($P < 0.01$),与溶剂对照组比较差异无统计学意义。在 2 周时,除 5.0 g/L TCE 组 PPAR γ mRNA 水平高于空白对照组外($P < 0.05$),其他组间比较差异均无统计学意义,见图 3。

2.5 饮水摄入 TCE 对小鼠肝脏 PPAR α 、PPAR γ 蛋白表达影响 免疫组化检测显示 PPAR α 和 PPAR γ 阳性表达细胞呈棕褐色,主要位于细胞核内,偶有胞质表达,阴性表达细胞呈淡蓝紫色。空白对照组和溶剂对照组肝组织少见 PPAR α 和 PPAR γ 阳性表达,TCE 暴露组小鼠肝脏组织各时期均显示 PPAR α 和 PPAR γ 阳性表达,见图 4、5。统计显示

TCE 暴露组肝组织细胞核 PPAR α 、PPAR γ 阳性表达率显著高于空白对照组和溶剂对照组($P < 0.05$),见表 1。

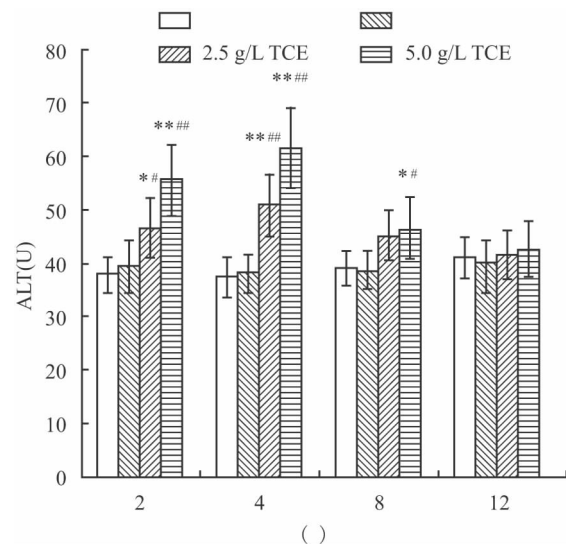


图 1 饮水摄入 TCE 对小鼠 ALT 的影响($n=5$)

与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与溶剂对照组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

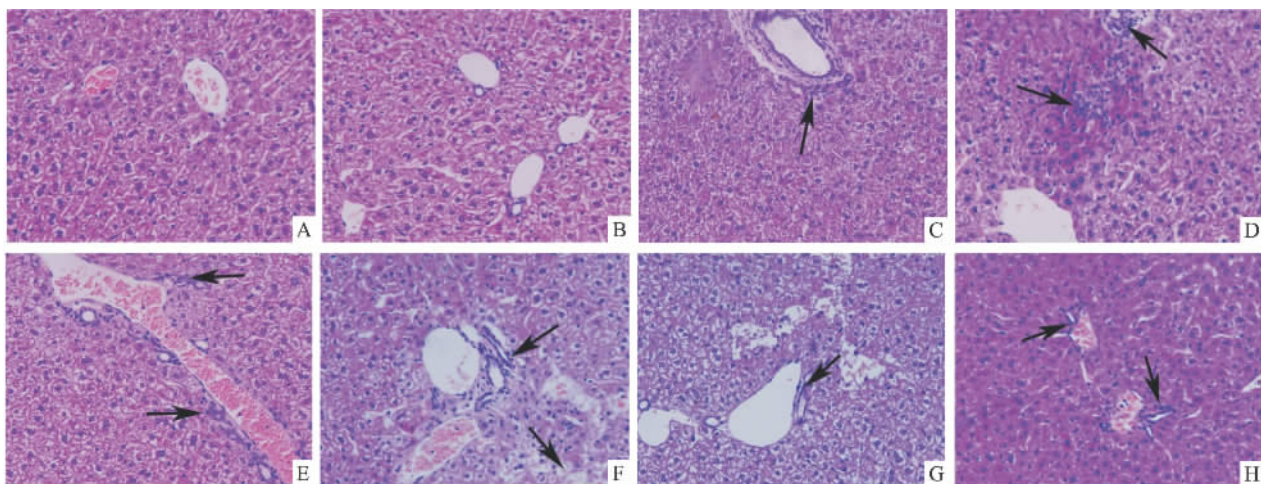


图 2 肝脏组织病理学检查结果 $\times 200$

A: 空白对照组; B: 溶剂对照组; C: 2 周 2.5 g/L TCE 组; D: 2 周 5.0 g/L TCE 组; E: 4 周 2.5 g/L TCE 组; F: 4 周 5.0 g/L TCE 组; G: 8 周 2.5 g/L TCE 组; H: 8 周 5.0 g/L TCE 组

表 1 肝脏 PPAR α 、PPAR γ 细胞核阳性表达率 ($n=3$ $\bar{x} \pm s$)

项目	组别	2 周	4 周	8 周	12 周
PPAR α	空白对照	0.020 0 $\pm$ 0.001 8	0.023 8 $\pm$ 0.003 8	0.019 4 $\pm$ 0.003 5	0.025 0 $\pm$ 0.006 1
	溶剂对照	0.022 5 $\pm$ 0.002 5	0.026 0 $\pm$ 0.005 6	0.023 7 $\pm$ 0.005 0	0.025 3 $\pm$ 0.003 1
	2.5 g/L TCE	0.039 2 $\pm$ 0.005 9* #	0.066 7 $\pm$ 0.013 4* #	0.058 2 $\pm$ 0.003 9* #	0.057 6 $\pm$ 0.003 8* #
	5.0 g/L TCE	0.043 1 $\pm$ 0.003 4* #	0.084 3 $\pm$ 0.008 3* #	0.081 3 $\pm$ 0.008 5* #	0.078 1 $\pm$ 0.004 8* #
PPAR γ	空白对照	0.017 9 $\pm$ 0.001 6	0.017 5 $\pm$ 0.001 8	0.018 6 $\pm$ 0.000 3	0.017 9 $\pm$ 0.001 3
	溶剂对照	0.018 0 $\pm$ 0.000 7	0.017 2 $\pm$ 0.001 5	0.020 7 $\pm$ 0.002 9	0.018 9 $\pm$ 0.001 1
	2.5 g/L TCE	0.047 3 $\pm$ 0.008 6* #	0.065 0 $\pm$ 0.012 7* #	0.062 7 $\pm$ 0.016 5* #	0.056 2 $\pm$ 0.005 4* #
	5.0 g/L TCE	0.061 0 $\pm$ 0.001 7* #	0.103 6 $\pm$ 0.022 9* #	0.086 1 $\pm$ 0.004 3* #	0.079 4 $\pm$ 0.003 0* #

与空白对照组比较: * $P < 0.05$; 与溶剂对照组比较: # $P < 0.05$

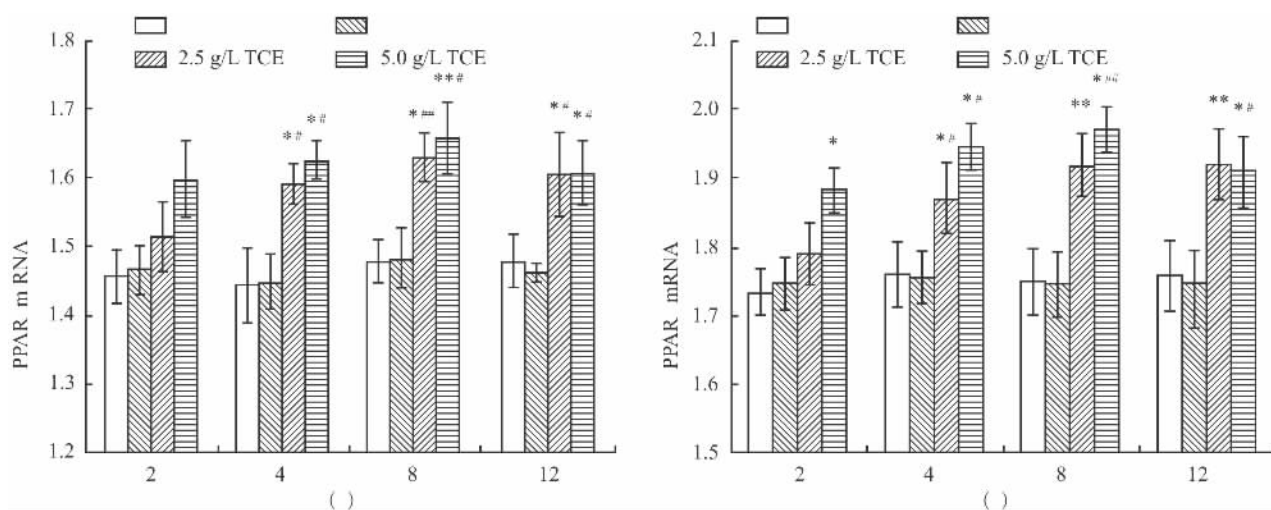


图3 TCE 饮水暴露小鼠肝脏 PPAR α 、PPAR γ mRNA 表达情况 ($n=5$)

与空白对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与溶剂对照组比较: # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

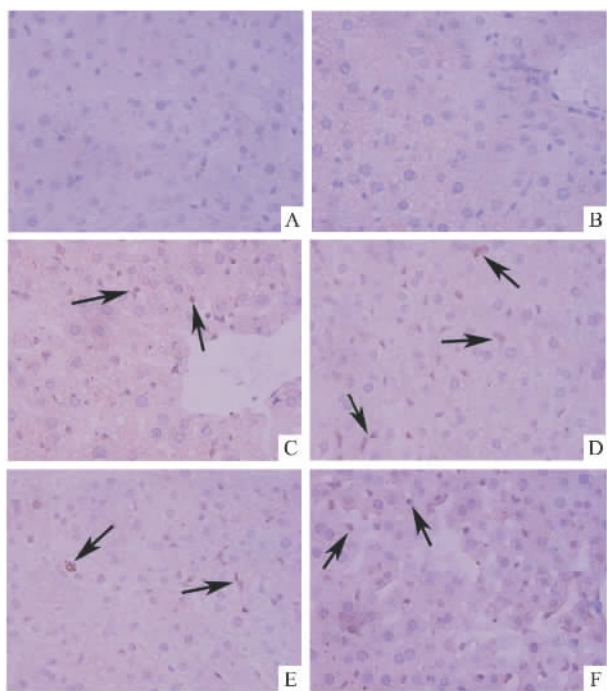


图4 小鼠肝脏组织 PPAR α 表达 PV $\times 400$

A: 空白对照组; B: 溶剂对照组; C: 4 周 2.5 g/L TCE 组; D: 4 周 5.0 g/L TCE 组; E: 8 周 2.5 g/L TCE 组; F: 8 周 5.0 g/L TCE 组

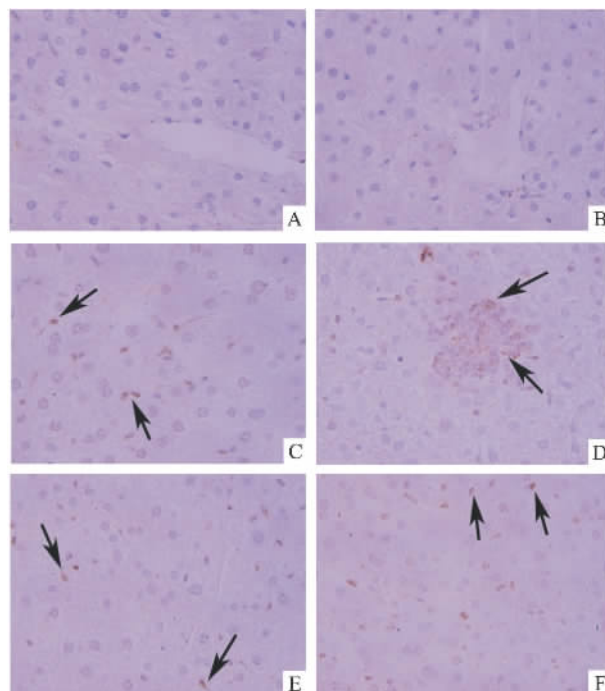


图5 小鼠肝脏组织 PPAR γ 表达 PV $\times 400$

A: 空白对照组; B: 溶剂对照组; C: 4 周 2.5 g/L TCE 组; D: 4 周 5.0 g/L TCE 组; E: 8 周 2.5 g/L TCE 组; F: 8 周 5.0 g/L TCE 组

3 讨论

研究^[5]显示长期暴露于 TCE 可致肝毒性,诱发肝脏炎症、肝脏肿瘤等肝脏损伤,但具体机制目前仍不清楚。本研究在经饮水给予小鼠不同剂量^[3]TCE 后于不同时段进行肝功能检测显示,长期饮水摄入 TCE 可引起小鼠肝功能 ALT 上升,并在 4 周时达到最高,表明长期暴露于 TCE 可引起肝功能的损害;组织病理学检查进一步显示 TCE 染毒小鼠肝脏胞水肿变性、炎细胞浸润等不同程度的肝损伤改变,而且也是 4 周时最为明显。

研究^[6-7]显示 TCE 在肝脏细胞色素 P450 酶作用下生成的三氯乙酸 (TCA)、二氯乙酸 (DCA) 具有过氧化物酶体增殖物 (PP) 的特性,从而激活 PP 的受体 PPARs。激活的 PPARs 主要与靶基因启动子区的 PPAR 反应元件 (PPRE) 的特定核苷酸序列结合,调节靶基因的转录;PPARs 还可通过配体依赖的转录调控抑制核因子- κ B (NF- κ B) 等表达调节炎症细胞因子的表达^[8]。PPARs 有 PPAR α 、PPAR β/δ 和 PPAR γ 3 种亚型,Corton^[9]认为 PPAR α 在 TCE

诱发肝脏肿瘤中扮演着重要角色。本研究显示,饮水给予 TCE 引起小鼠肝脏 PPAR α 和 PPAR γ mRNA 水平上调,与文献^[10]报道的 TCE 暴露引起 PPAR α mRNA 表达量出现显著增加一致;免疫组化检测显示 TCE 染毒动物肝脏细胞核 PPAR α 和 PPAR γ 的阳性表达较对照高,表明饮水摄入 TCE 后 PPAR α 和 PPAR γ 可能被激活;PPAR α 和 PPAR γ 的表达在摄入 TCE 高剂量时较低剂量时明显,且在 TCE 暴露 4 周时达最高与肝脏毒性的剂量和时间效应表现一致,由此推测,饮水摄入 TCE 导致的肝脏毒性可能与 PPAR α 和 PPAR γ 的激活有关。但本研究中并未观察到染毒小鼠肝脏出现增殖肿大现象,肝脏系数变化也没有明显差异,这可能与样本数量和小鼠的种属与品系有关。本研究未对 PPAR α 和 PPAR γ 蛋白表达进行定量分析,因此不能对 PPAR α 和 PPAR γ 表达与 TCE 暴露所致肝损害进行相关性分析。

参考文献

- [1] Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). ToxFAQsTM for Trichloroethylene (TCE) [DB/OL]. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxfaqs/tf.asp?id=172&tid=30>. 2003
- [2] Jollow D J, Bruckner J V, McMillan D C, et al. Trichloroethylene risk assessment: A review and commentary [J]. Crit Rev Toxicol, 2009, 39(9): 782-97.
- [3] Griffin J M, Gilbert K M, Lamps L W, et al. CD4(+) T-cell activation and induction of autoimmune hepatitis following trichloroethylene treatment in MRL +/+ mice [J]. Toxicol Sci, 2000, 57(2): 345-52.
- [4] Maloney E K, Waxman D J. Trans-activation of PPAR α and PPAR γ by structurally diverse environmental chemicals [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1999, 161(2): 209-18.
- [5] Chiu W A. Trichloroacetic acid: Updated estimates of its bioavailability and its contribution to trichloroethylene-induced mouse hepatomegaly [J]. Toxicology, 2011, 285(3): 114-25.
- [6] Ramdhan D H, Kamijima M, Yamada N, et al. Molecular mechanism of trichloroethylene-induced hepatotoxicity mediated by CYP2E1 [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2008, 231(3): 300-7.
- [7] Laughter A R, Dunn C S, Swanson C L, et al. Role of the peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in responses to trichloroethylene and metabolites, trichloroacetate and dichloroacetate in mouse liver [J]. Toxicology, 2004, 203(1-3): 83-98.
- [8] Straus D S, Glass C K. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms [J]. Trends Immunol, 2007, 28(12): 551-8.
- [9] Corton J C. Evaluation of the role of peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) in mouse liver tumor induction by trichloroethylene and metabolites [J]. Toxicology, 2008, 253(1-2): 857-75.
- [10] Ramdhan D H, Kamijima M, Wang D, et al. Differential response to trichloroethylene-induced hepatosteatosis in wild-type and PPAR α -humanized mice [J]. Environ Health Perspect, 2010, 118(11): 1557-63.

Effects of trichloroethylene on the expression of liver PPAR α and PPAR γ in mice

Hou Feifei, Shen Tong, Wang Jin, et al

(Dept of Toxicology, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To investigate the effects of trichloroethylene (TCE) intake *via* drinking water on liver peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) α and PPAR γ in mice. **Methods** The female BALB/c mice were randomly divided into blank control group, vehicle control group, 2.5 g/L TCE group and 5.0 g/L TCE group, and were exposed to TCE *via* drinking water. On the 2nd, 4th, 8th, 12th week, blood was collected for liver function examination, liver tissues were taken for HE staining. The PPAR α and PPAR γ expression in liver were measured by RT-PCR and immunohistochemical staining. **Results** The levels of ALT in 2.5, 5.0 g/L TCE treated groups increased significantly compared with control groups on the 2nd, 4th week ($P < 0.05$); HE staining showed inflammatory cell infiltration and liver cell degeneration in 2.5, 5.0 g/L TCE treated groups, the damage was most obvious on the 4th week; compared with control groups, PPAR α and PPAR γ mRNA expression in liver of TCE treated groups increased significantly on the 4th, 8th, 12th week ($P < 0.05$, $P < 0.01$); in the nuclei of liver cells, the expression of PPAR α and PPAR γ was positive in 2.5, 5.0 g/L TCE treated groups, and the levels of PPAR α and PPAR γ expression in nuclei increased significantly compared with control groups on the 2nd, 4th, 8th, 12th week ($P < 0.05$). **Conclusion** The results suggest that TCE intake *via* drinking water can upregulate the expression of liver PPAR α and PPAR γ in mice.

Key words trichloroethylene; PPAR α ; PPAR γ ; hepatotoxicity