

## 多氯联苯 118 引起大鼠甲状腺炎症反应的研究

杨 慧,许波进,郑旭琴,陈欢欢,崔 岱,段 宇\*

(南京医科大学第一附属医院内分泌科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨持续低浓度多氯联苯 118(polychlorinated biphenyl 118,PCB118)暴露是否会引起大鼠甲状腺炎症反应。方法:①将 40 只清洁级成年雄性 Wistar 大鼠[体重(200±10)g]随机分为 4 组,每组 10 只,分别给予溶剂对照玉米油及低、中、高剂量[10、100、1 000 μg/(kg·d)]的 PCB118,每周腹腔注射 5 d,每周称重,造模 13 周后取甲状腺组织进行 HE 染色,观察炎症细胞浸润情况;②CCK8 实验用于检测 PCB118 对细胞活力的影响;③实时定量 PCR(qRT-PCR)实验检测 PCB118 对炎症因子白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)及细胞间黏附分子-1(ICAM-1)mRNA 表达水平的影响。结果:①大鼠甲状腺组织 HE 染色可见各 PCB118 处理组有大量炎症细胞浸润;②相对低浓度的 PCB118(0~25 nmol/L)对细胞活力无显著影响( $P > 0.05$ );③与对照组比较,不同低浓度的 PCB118 刺激后,IL-6、TNF-α 及 ICAM-1 的 mRNA 表达量显著增加( $P < 0.05$ )。结论:PCB118 可引起大鼠甲状腺组织及甲状腺细胞发生炎症反应。

**[关键词]** 多氯联苯;甲状腺;炎症

**[中图分类号]** R581.4

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)05-622-04

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150505

## A study of polychlorinated biphenyl 118 induced inflammation reaction in rat thyroid

Yang Hui, Xu Bojin, Zheng Xuqin, Chen Huanhuan, Cui Dai, Duan Yu\*

(Department of Endocrinology, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** Objective: To explore whether polychlorinated biphenyl 118(PCB118) could cause inflammation reaction in rat thyroid.

**Methods:** ①Forty male Wistar rats were randomly divided into 4 groups: solvent control group (corn oil), low dose, medium dose and high dose PCB118 groups, intraperitoneal injected with corn oil or different doses of PCB118(10, 100, 1 000 μg/(kg·d), respectively) for 5 d per week, and weekly weighed. Thirteen weeks later, the thyroid tissues were stained using HE method and the infiltration of inflammatory cells were observed. ②The effects of PCB118 on FRTL-5 cells viability was assessed using a Cell Counting Kit-8 assay. ③Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was used to detect the mRNA expression of cytokines interleukin-6(IL-6), tumor necrosis factor-α(TNF-α) and intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1). **Results:** ①In HE staining, there were a large number of inflammatory cells infiltration in PCB118-treated rat thyroid tissue; ②Relatively low concentrations of PCB118 had no significant effects on cells viability ( $P > 0.05$ ); ③Compared to the control group, the mRNA levels of IL-6, TNF-α and ICAM-1 increased significantly ( $P < 0.05$ ) after stimulating with different concentrations of PCB118. **Conclusion:** PCB118 could induce inflammation reaction in rat thyroid tissues.

**[Key words]** polychlorinated biphenyl; thyroid; inflammation

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(05): 622-625]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81170726, 81102032);江苏省医学重点人才资助(20111541);南京医科大学第一附属医院创新团队资助(20113012);江苏高校优势学科建设工程资助(PAPD)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: duanyu@medmail.com.cn

多氯联苯 (polychlorinated biphenyls, PCBs) 是环境内分泌干扰物中具有代表性的典型的持续性有机污染物 (POPs), 共有 209 种同系物。PCBs 的理化特性极为稳定, 且具有耐高温、耐酸碱和耐腐蚀的特性, 禁用前在工业上广泛用作热载体、绝缘油和润滑油等。但是由于其具有难分解、蓄积性强、残留期长及亲脂性等特点, 可在生物体内积聚, 并可

沿着食物链逐渐富集,因此即使环境中存在的浓度很低,也可能蓄积在人体组织中,具有致癌、致畸、致突变作用,对个体内分泌系统、生殖功能、神经系统、循环系统等产生毒性<sup>[1-4]</sup>。此外,有研究表明 PCBs 可引起体外培养的小鼠动脉内皮细胞发生炎症反应<sup>[5]</sup>。但是,目前有关 PCBs 是否可引起甲状腺组织炎症的研究尚缺乏。本研究主要采用体内和体外实验的方法,选用 PCB118 为代表来研究 PCBs 是否可引起大鼠甲状腺组织或细胞发生炎症反应。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

PCB118 标准品(AccuStandard 公司,美国),用 612  $\mu$ L DMSO 溶解成 25 mmol/L 的贮存液;玉米油(Sigma 公司,美国);F-12 培养基、促甲状腺激素(TSH)、氢化可的松、生长抑素、胰岛素、转铁蛋白,L-甘氨酸-组氨酸-赖氨酸盐(Sigma 公司,美国);RNA 提取试剂盒(TaKaRa 公司,日本);qRT-PCR 试剂盒(Roche 公司,美国);qRT-PCR 引物由大连宝生物工程有限公司合成,引物序列见表 1。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 动物造模

40 只健康成年雄性清洁级 Wistar 大鼠,体重(200  $\pm$  10)g(上海斯莱克实验动物有限责任公司),于南京医科大学动物实验中心饲养,相对湿度 50%~70%,环境温度 18~22 $^{\circ}$ C,明暗周期 12 h,摄食及饮水均自由。大鼠适应性饲养 1 周后,随机分为溶剂对照组、低剂量、中剂量、高剂量 4 组,每组 10 只,分别给予溶剂对照玉米油及 10、100、1 000  $\mu$ g/(kg·d)不同剂量的 PCB118,每周腹腔注射 5 d,每周称重。

#### 1.2.2 大鼠甲状腺组织 HE 染色

造模 13 周后,取大鼠甲状腺组织用 4%多聚甲醛固定过夜,石蜡包埋组织切片染色后用 HE 染色,通过光镜观察甲状腺组织炎症细胞浸润情况。

#### 1.2.3 细胞实验

##### 1.2.3.1 细胞培养

大鼠甲状腺 FRTL-5 细胞由郑旭琴博士馈赠,培养于含 10 ng/mL 胰岛素,0.36 ng/mL 氢化可的松,5 ng/mL 转铁蛋白,2 ng/mL L-甘氨酸-组氨酸-赖氨酸盐,10 ng/mL 生长抑素,1 U/L TSH 及 5%小牛血清的 F-12 培养基中。置于 37 $^{\circ}$ C,5%的 CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养,每 7~10 d 传代 1 次,待细胞 80%左右融合,开始实验。

##### 1.2.3.2 细胞活力实验

将 FRTL-5 细胞消化、离心、计数后铺 96 孔板,置于 37 $^{\circ}$ C,5%的 CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养过夜后,用溶剂对照 DMSO 及不同浓度(0.25、2.50、25.00、250.00、2 500.00 及 25 000.00 nmol/L)的 PCB118 分别刺激 24、48 及 96 h 后,每孔加入 CCK8 试剂 10  $\mu$ L,培养箱继续孵育 2~3 h 后,用酶标仪在 450 nm 波长处测吸光度,根据下列公式计算细胞活力  $P = A1/A2 \times 100\%$ <sup>[6]</sup>(P:相对细胞活力比值;A1:PCB118 刺激组的吸光度;A2:溶剂对照组的吸光度)。

##### 1.2.3.3 qRT-PCR 实验

取体外培养的约 80%融合的 FRTL-5 细胞消化、离心、计数后铺 6 孔板,置于上述条件的培养箱中培养过夜后,用溶剂对照 DMSO 及不同浓度(0.25、2.50 及 25.00 nmol/L)的 PCB118 刺激 24 h 后,提取细胞 RNA,参照试剂盒说明书进行 qRT-PCR 实验,检测目的基因白介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)及内参  $\beta$ -actin 的 mRNA 表达水平。目的基因的相对表达量用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 方法计算<sup>[7]</sup>。

表 1 实时定量 PCR 引物

Table 1 Primers used for quantitative real-time PCR	
细胞因子	引物序列(5'→3'方向)
IL-6	F:GTCAACTCCATCTGCCCTTC
	R:TGTGGGTGGTATCCTCTGTG
TNF- $\alpha$	F:TCAGTTCATGGCCAGAC
	R:GTTGTCTTTGAGATCCATGCCATT
ICAM-1	F:GCTTCTGCCACCATCACTGTGTA
	R:ATGAGGTTCTTGCCACCTG
$\beta$ -actin	F:GGAGATTACTGCCCTGGCTCCTA
	R:GACTCATCGTACTCTGCTTGCTG

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS18.0 统计软件进行统计学分析,计量数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用最小显著差法(LSD 法), $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 不同剂量的 PCB118 对大鼠体重的影响

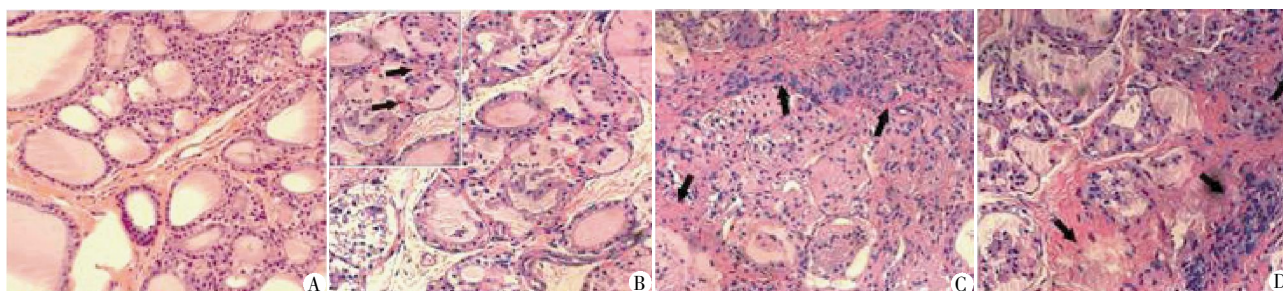
随着造模时间的延长,各组大鼠的体重逐渐增加,与对照组比较,实验组大鼠行为无明显异常改变,正常摄食、饮水,无明显腹泻,未见由 PCB118 引起的大鼠死亡。各组间大鼠的体重未见明显差异( $P > 0.05$ )。

### 2.2 PCB118 对大鼠甲状腺组织炎症浸润的影响

光镜下观察大鼠甲状腺组织 HE 染色切片,甲

状腺组织增生肥大, 对照组未见明显炎症细胞浸润, 各 PCB118 处理组可见明显炎症细胞浸润, 且

随着 PCB118 剂量的增加, 浸润的炎症细胞增多, 呈一定的剂量依赖趋势(图 1)。



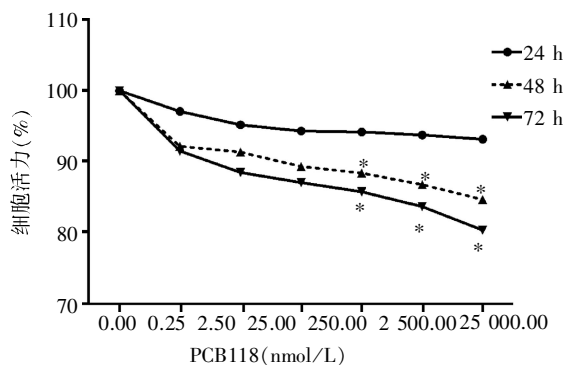
A: 对照组; B: 10 µg/(kg·d) PCB118 处理组; C: 100 µg/(kg·d) PCB118 处理组; D: 1 000 µg/(kg·d) PCB118 处理组。

图 1 PCB118 对大鼠甲状腺组织炎症浸润的影响(HE, ×200)

Figure 1 Effects of PCB118 on the inflammatory infiltration of rat thyroid (HE-stained, ×200)

### 2.3 PCB118 对大鼠甲状腺 FRTL-5 细胞活力的影响

分别用 DMSO 及不同浓度的 PCB118 (0.25~25 000.00 nmol/L) 刺激 FRTL-5 细胞 24, 48 及 72 h 后, 从 24 到 72 h, 与对照组比较, 相对低浓度的 PCB118(0.25~25.00 nmol/L) 刺激后, 细胞活力未见明显降低 ( $P > 0.05$ )。在 24 h, 相对高浓度的 PCB118(250~2 5000 nmol/L) 的刺激亦未见细胞活力明显降低( $P > 0.05$ ), 但当延长刺激时间至 48 及 72 h 后, 高浓度组细胞活力显著降低( $P < 0.05$ )。因此选用 0.25~25.00 nmol/L 的相对低浓度进行后续实验(图 2)。



与溶剂对照组比较, \* $P < 0.05, n = 3$ 。

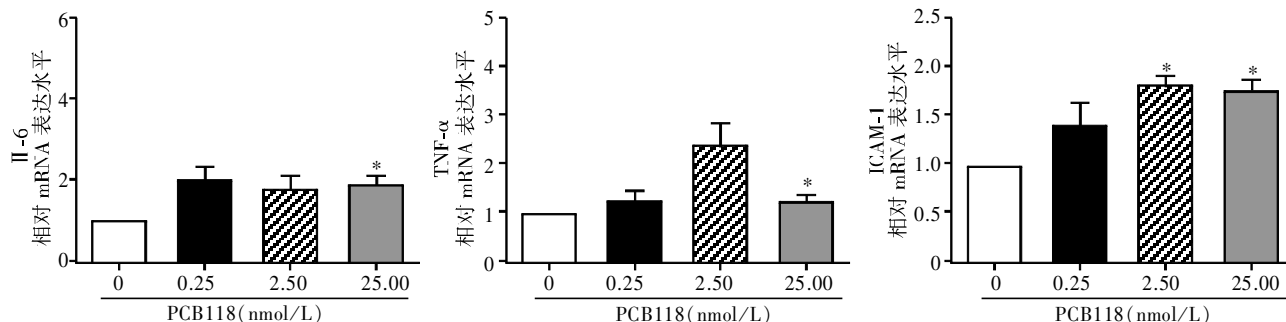
图 2 PCB118 对大鼠甲状腺 FRTL-5 细胞活力的影响

Figure 2 Effect of PCB118 on rat FRTL-5 cells viability

### 2.4 PCB118 对大鼠甲状腺 FRTL-5 细胞炎症因子 IL-6、TNF-α 及 ICAM-1 的 mRNA 表达水平的影响

与对照组比较, 25.00 nmol/L PCB118 刺激组 IL-6 及 TNF-α 的 mRNA 表达水平显著升高 ( $P <$

0.05), 2.50 及 25.00 nmol/L PCB118 刺激组 ICAM-1 的 mRNA 表达水平显著升高( $P < 0.05$ ), 各处理组间比较未见明显差异( $P > 0.05$ , 图 3)。



与对照组比较, \* $P < 0.05, n = 3$ 。溶剂对照组的基因 mRNA/β-actin 的相对比值为 1。

图 3 PCB118 对大鼠 FRTL-5 细胞炎症因子 IL-6、TNF-α 及 ICAM-1 的 mRNA 表达水平的影响

Figure 3 Effects of PCB118 on the mRNA expression levels of IL-6, TNF-α and ICAM-1 in rat FRTL-5 cells

## 3 讨论

PCBs 可引起多组织、多系统、多器官损害, 其中甲状腺是 PCBs 对内分泌系统产生毒性效应的主要靶器官。已知 PCBs 的暴露可引起甲状腺功能的损害, 目前普遍接受的观点是多氯联苯可降低循

环甲状腺激素, 尤其是甲状腺素的水平<sup>[8]</sup>。此外, 许多研究亦已揭示 PCBs 可引起多组织或细胞发生炎症反应<sup>[9-11]</sup>, 但是目前有关 PCBs 引起甲状腺组织或细胞炎症反应的研究尚缺乏。PCB118 是最持久的 PCBs 同系物之一, 其已被发现存在于人体组织及乳汁<sup>[12]</sup>, 同时 PCB118 也是 9 种与甲状腺功能

障碍密切相关的 PCBs 同系物之一<sup>[13]</sup>,其污染广泛存在于我国长三角地区的水和土壤以及水生生物中。因此本研究选择 PCB118 作为 PCBs 的代表性污染物,研究持续低浓度 PCB118 暴露是否会引起大鼠甲状腺组织或细胞炎症反应。

本研究发现,持续、低剂量暴露于 PCB118 后,大鼠甲状腺组织增生肥大,可见明显炎症浸润及间质纤维化,且随着暴露剂量的增加,炎症细胞浸润的程度加重,呈一定的剂量依赖趋势。

甲状腺疾病的发生发展与许多细胞因子有着密切的关系,其中炎症性因子主要有 IL-6、TNF- $\alpha$  等<sup>[14]</sup>。正常的细胞或组织未经刺激时,上述因子 mRNA 的表达量一般检测不到,但当发生炎症反应或其他病理过程时,其表达量可增加<sup>[15]</sup>。本研究根据 CCK8 实验的结果,选择不影响大鼠甲状腺 FRTL-5 细胞活力的 PCB118 浓度进行后续实验。结果显示 PCB118 可引起大鼠甲状腺 FRTL-5 细胞炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$  及 ICAM-1 的 mRNA 表达量显著增加,表明 PCB118 可能在甲状腺炎症反应的发生发展过程中起重要作用。

目前,关于 PCBs 引起甲状腺炎症反应的机制目前尚不清楚,许多研究已经表明 NF- $\kappa$ B 通路<sup>[16]</sup>及 P38 或 JNK MAPK 通路<sup>[17]</sup>在 PCBs 引起的炎症反应中起重要作用,上述通路是否在 PCBs 引起的甲状腺炎症反应中起作用尚不明确,具体机制尚需进一步探讨。

#### [参考文献]

- [1] Golden R, Kimbrough R. Weight of evidence evaluation of potential human cancer risks from exposure to polychlorinated biphenyls;an update based on studies published since 2003[J]. *Crit Rev Toxicol*,2009,39(4): 299-331
- [2] Portigal CL,Cowell SP, Fedoruk MN,et al. Polychlorinated biphenyls interfere with androgen-induced transcriptional activation and hormone binding[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2002,179(3):185-194
- [3] Zhao G,Wang Z,Zhou H,et al. Burdens of PBBs,PBDEs,and PCBs in tissues of the cancer patients in the e-waste disassembly sites in Zhejiang,China[J]. *Sci Total Environ*,2009,407(17):4831-4837
- [4] 钱春花,唐伟,刘超,等.多氯联苯对甲状腺功能影响的研究[J].*南京医科大学学报:自然科学版*,2006,26(6):396-399
- [5] Han SG,Eum SY,Toborek M,et al. Polychlorinated biphenyl-induced VCAM-1 expression is attenuated in

- aortic endothelial cells isolated from caveolin-1 deficient mice [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2010,246(1-2):74-82
- [6] Liu X,Zhang B,Guo Y,et al. Down-regulation of AP-4 inhibits proliferation,induces cell cycle arrest and promotes apoptosis in human gastric cancer cells[J]. *PLoS One*,2012,7(5):e37096
- [7] Livak KJ,Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(-Delta Delta C(T))method[J]. *Methods*,2001,25(4): 402-408
- [8] Kato Y,Haraguchi K,Kubota M,et al. A possible mechanism for the decrease in serum thyroxine level by a 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-like polychlorinated biphenyl congener,3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl in mice[J]. *Drug Metab Dispos*,2010,38(1):150-156
- [9] Lin M,Wu T,Sun L,et al. Aroclor 1254 causes atrophy of exocrine pancreas in mice and the mechanism involved [J]. *Environ Toxicol*,2014,doi:10.1002/tox.22079
- [10] Hennig B,Oesterling E, Toborek M. Environmental toxicity,nutrition,and gene interactions in the development of atherosclerosis[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*,2007,17(2):162-169
- [11] Wang J,Lv X, Du Y. Inflammatory response and insulin signaling alteration induced by PCB77[J]. *J Environ Sci (China)*,2010,22(7):1086-1090
- [12] Tarkowski S. Environmental health in Europe. A WHO perspective[J]. *Int J Occup Med Environ Health*,1996,9(1):1-6
- [13] Bloom MS,Weiner JM,Vena JE,et al. Exploring associations between serum levels of select organochlorines and thyroxine in a sample of New York state sportsmen;the New York State Angler Cohort Study[J]. *Environ Res*,2003,93(1):52-66
- [14] Durães C,Alvelos I,Mendes A,et al. Polymorphisms in the TNFA and IL6 genes represent risk factors for autoimmune thyroid disease [J]. *PLoS One*,2014,9(8):e105492
- [15] 段宇,刘超,蒋须琴,等.甲状腺细胞中白介素-6、 $\gamma$ -干扰素和肿瘤坏死因子- $\alpha$  基因的表达[J].*中华内分泌代谢杂志*,2000,16(4):228-230
- [16] Kwon O,Lee E,Moon TC,et al. Expression of cyclooxygenase-2 and pro-inflammatory cytokines induced by 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl(PCB 153)in human mast cells requires NF- $\kappa$ B activation [J]. *Biol Pharm Bull*,2002,25(9):1165-1168
- [17] Majkova Z,Smart E,Toborek M,et al. Up-regulation of endothelial monocyte chemoattractant protein-1 by coplanar PCB77 is caveolin-1-dependent [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,2009,237(1):1-7