

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^[1-4]。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^[5]。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 μ 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 μ 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 CO₂ 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 CO₂ 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 μ 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 $P = A1/A2 \times 100\%$ ^[6](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- α (TNF- α)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)及内参 β -actin 的 mRNA 表达水平。目的基因的相对表达量用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 方法计算^[7]。

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- α	F:TCAGTTCATGGCCAGAC
	R:GTTGTCTTTGAGATCCATGCCATT
ICAM-1	F:GCTTCTGCCACCATCACTGTGTA
	R:ATGAGGTTCTTGCCACCTG
β -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

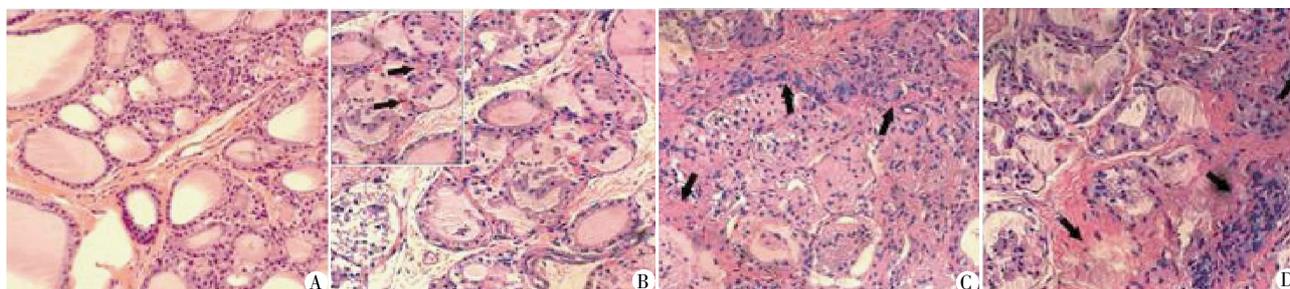
随着造模时间的延长,各组大鼠的体重逐渐增加,与对照组比较,实验组大鼠行为无明显异常改变,正常摄食、饮水,无明显腹泻,未见由 PCB118 引起的大鼠死亡。各组间大鼠的体重未见明显差异($P > 0.05$)。

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)。



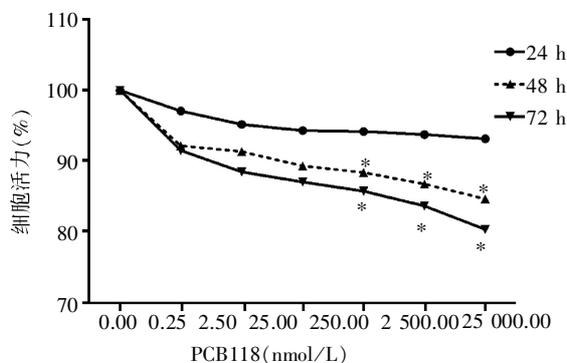
A: 对照组; B: 10 µg/(kg·d) PCB118 处理组; C: 100 µg/(kg·d) PCB118 处理组; D: 1 000 µg/(kg·d) PCB118 处理组。

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, * $P < 0.05$, $n = 3$ 。

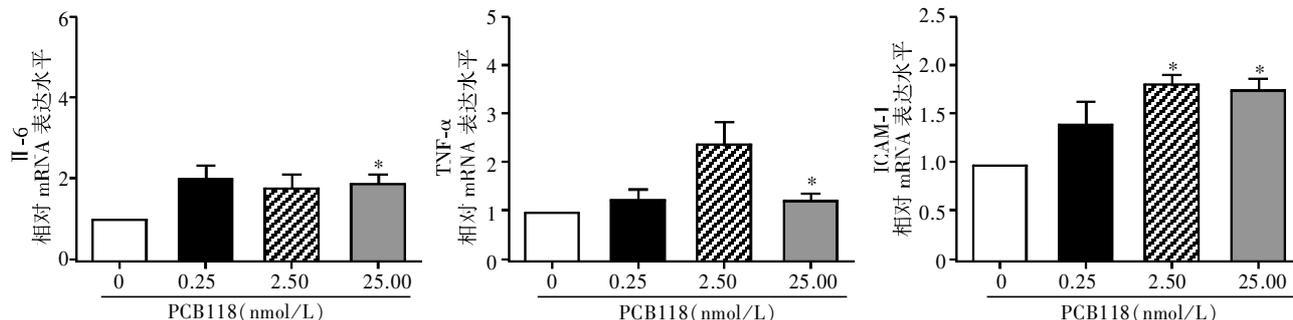
图 2 PCB118 对大鼠甲状腺 FRTL-5 细胞活力的影响

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^[8]。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^[9-11], 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^[12], 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^[13],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- α 等^[14]。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^[15]。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- α 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- κ B 通路^[16]及 P38 或 JNK MAPK 通路^[17]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⁻(-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、 γ -干扰素和肿瘤坏死因子- α 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- κ 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