

三氯乙醇和三氯乙酸在诱发三氯乙烯药疹样皮炎中的作用

伊梦楠¹, 臧丹^{1,2}, 易娟³, 刘帅¹, 周伟³, 王俊程¹, 沈美丽¹, 王婷¹, 段化伟¹, 黄先青³, 戴宇飞¹

1. 中国疾病预防控制中心, 职业卫生与中毒控制所/化学污染物与健康重点实验室, 北京 100050
2. 北京市丰台区市场监督管理局, 北京 100050
3. 深圳市职业病防治院, 广东 深圳 510000

摘要:

[背景] 三氯乙烯职业暴露是导致药疹样皮炎发病的主要原因, 然而其代谢产物是否参与疾病的发生尚不明确。

[目的] 检测三氯乙烯的代谢产物三氯乙酸和三氯乙醇的致敏性, 进一步探讨二者在诱发三氯乙烯药疹样皮炎 (TIHD) 中的作用。

[方法] 体外细胞研究通过培养人髓系白血病单核细胞株 (THP-1), 设置三氯乙酸和三氯乙醇染毒浓度为 0、0.5、1.0、2.0、4.0 mmol·L⁻¹, 采用 ELISA 法检测上清中白细胞介素-8 (IL-8) 的表达水平; 采用 Western blotting 法检测诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 的表达水平。人群研究分别设置三氯乙烯非接触对照组 (20 人)、三氯乙烯接触对照组 (20 人)、TIHD 入院病例组 (10 人) 和 TIHD 出院病例组 (7 人), 共 57 人, 利用淋巴细胞分离液分离其外周血单个核细胞后, 加入 0.5、2.0 mmol·L⁻¹ 的三氯乙酸和三氯乙醇进行染毒处理, 利用 CCK-8 法检测外周血单个核细胞存活率。

[结果] 体外细胞研究结果: 随着染毒剂量增高, 三氯乙酸和三氯乙醇对 THP-1 细胞毒性逐渐增加, 并且 THP-1 细胞 IL-8 表达水平逐渐增高, 表现出剂量依赖性 (相关分析, 均 $P < 0.05$); 与未染毒组相比, 在 1.0、2.0、4.0 mmol·L⁻¹ 染毒剂量下, 三氯乙酸染毒组 IL-8 水平分别增加了 116.30%、176.08%、541.18%, 三氯乙醇染毒组 IL-8 水平分别增加了 176.08%、366.70%、670.48% ($P < 0.05$); Western blotting 检测结果显示, 与空白对照组相比, 1.0、2.0、4.0 mmol·L⁻¹ 三氯乙酸组 iNOS 的表达水平分别增加了 93.73%、87.08%、238.06% ($P < 0.05$), 1.0、2.0、4.0 mmol·L⁻¹ 三氯乙醇组 iNOS 的表达水平分别增加了 95.99%、486.29%、735.72% ($P < 0.05$)。人群研究结果显示: 与非接触对照组相比, 出院病例组外周血单个核细胞经 0.5、2.0 mmol·L⁻¹ 三氯乙酸处理后细胞存活率分别增加了 5.81%、5.64% ($P < 0.05$); 而在该组人群三氯乙醇处理后的细胞存活率变化未见统计学意义 ($P > 0.05$); 同样, 三氯乙烯接触对照组、入院病例组的外周血单个核细胞经三氯乙酸和三氯乙醇处理后, 其细胞存活率差异也均无统计学意义 ($P > 0.05$); 结果提示出院病例组人群外周血中存在三氯乙酸抗原特异性淋巴细胞。

[结论] 三氯乙酸和三氯乙醇均具有体外细胞致敏性, 三氯乙酸可能作为致敏原参与了 TIHD 的发生过程。

关键词: 三氯乙烯; 三氯乙酸; 三氯乙醇; 致敏性; 药疹样皮炎

Roles of trichloroethanol and trichloroacetic acid in trichloroethylene-induced hypersensitive dermatitis YI Mengnan¹, ZANG Dan^{1,2}, YI Juan³, LIU Shuai¹, ZHOU Wei³, WANG Juncheng¹, SHEN Meili¹, WANG Ting¹, DUAN Huawei¹, HUANG Xianqing³, DAI Yufei¹ (1. Key Laboratory of Chemical Contaminants and Health/Institute of Occupational Health and Poison Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China; 2. Beijing Fengtai District Market Supervision Administration, Beijing 100050, China; 3. Shenzhen Preventive and Treatment Center for Occupational Diseases, Shenzhen, Guangdong 510000, China)

Abstract:

[Background] Occupational exposure to trichloroethylene (TCE) is a major cause of dermatitis; however, whether its metabolites are involved in the development of the disease is unclear.

[Objective] This study aims to evaluate the sensitization of trichloroacetic acid and trichloroethanol,

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.21210

组稿专家

施小明 (中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所), E-mail: shixm@chinacdc.cn

基金项目

国家自然科学基金项目 (81773477); 国家科技支撑计划 (2014BAI12B02)

作者简介

伊梦楠 (1995—), 男, 博士生; E-mail: yimn1995@163.com

通信作者

戴宇飞, Email: daiyf@niohp.chinacdc.cn

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-05-14

录用日期 2021-08-10

文章编号 2095-9982(2021)10-1113-06

中图分类号 R135

文献标志码 A

引用

伊梦楠, 臧丹, 易娟, 等. 三氯乙醇和三氯乙酸在诱发三氯乙烯药疹样皮炎中的作用 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38 (10): 1113-1118.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21210

Funding

This study was funded.

Correspondence to

DAI Yufei, Email: daiyf@niohp.chinacdc.cn

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2021-05-14

Accepted 2021-08-10

To cite

YI Mengnan, ZANG Dan, YI Juan, et al. Roles of trichloroethanol and trichloroacetic acid in trichloroethylene-induced hypersensitive dermatitis [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(10): 1113-1118.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.21210

and to investigate their roles in the TCE-induced hypersensitive dermatitis (TIHD).

[Methods] Human myeloid leukemia mononuclear cells (THP-1) were cultured *in vitro* and exposed to trichloroacetic acid or trichloroethanol at 0, 0.5, 1.0, 2.0, and 4.0 mmol·L⁻¹, respectively. Interleukin-8 (IL-8) was detected by ELISA; inducible nitric oxide synthase (iNOS) was detected by Western blotting. A total of 57 individuals participated in a population-based study, including a TCE non-exposure control group, a TCE exposure group, a TIHD admitted group, and a TIHD discharged group. Peripheral blood mononuclear cells were separated by lymphocyte isolation solution and exposed to 0.5 and 2.0 mmol·L⁻¹ trichloroacetic acid or trichloroethanol. Their survival rates were estimated by CCK-8.

[Results] The toxicity of trichloroacetic acid or trichloroethanol on THP-1 cells increased in a dose-dependent manner, and the IL-8 levels in THP-1 cells also increased gradually with the increase of exposure dose in a dose-dependent manner ($P < 0.05$). Compared with the control group, the IL-8 levels increased by 116.30%, 176.08%, and 541.18% in the 1.0, 2.0, and 4.0 mmol·L⁻¹ trichloroacetic acid groups and by 176.08%, 366.70%, and 670.48% in the 1.0, 2.0, and 4.0 mmol·L⁻¹ trichloroethanol groups, respectively ($P < 0.05$). The results of Western blotting indicated that compared with the control group, the iNOS levels in the 1.0, 2.0, and 4.0 mmol·L⁻¹ trichloroacetic acid groups increased by 93.73%, 87.08%, and 238.06% ($P < 0.05$), and the levels in the 1.0, 2.0, and 4.0 mmol·L⁻¹ trichloroethanol groups increased by 95.99%, 486.29%, and 735.72% ($P < 0.05$), respectively. In the population-based study, compared with the non-exposure control group, the survival rates of peripheral blood mononuclear cells exposed to 0.5 and 2 mmol·L⁻¹ trichloroacetic acid increased by 5.81% and 5.64% in the discharged group ($P < 0.05$), while no cell proliferation was found after trichloroethanol treatment in the discharged group ($P < 0.05$); the survival rates of peripheral blood mononuclear cells after trichloroacetic acid or trichloroethanol treatment in the TCE exposure group and the TIHD admitted group showed no significant differences with the non-exposure control group ($P < 0.05$). These results illustrated the presence of trichloroacetic acid antigen-specific mononuclear cells in peripheral blood in the discharged patients.

[Conclusion] Both trichloroacetic acid and trichloroethanol could induce cellular sensitization, and trichloroacetic acid may be involved in the development of TIHD as an allergen.

Keywords: trichloroethylene; trichloroacetic acid; trichloroethanol; sensitization; dermatitis

三氯乙烯是一种无色易挥发的有机溶剂，具有良好的去污、脱脂能力，主要用于去除金属部件的杂质以及织物清洁和染色等各种工艺中。鉴于其溶剂特性，三氯乙烯可以通过吸入和皮肤接触进入人体^[1]。流行病学调查显示职业暴露于三氯乙烯是导致职业性三氯乙烯药疹样皮炎 (trichloroethylene-induced hypersensitive dermatitis, TIHD) 发生的直接原因^[2]，职业性三氯乙烯暴露后2周至2个月出现四肢、面部、颈部或躯干皮疹，伴有不同程度的发烧、淋巴结肿大等^[3]。机体暴露于三氯乙烯后，三氯乙烯经由肝脏细胞色素P450氧化代谢等通路生成的代谢产物为三氯乙醛和水合氯醛，后经由醇脱氢酶和醛脱氢酶催化生成三氯乙醇和三氯乙酸^[4]；而水合氯醛在机体内能够被乙醇脱氢酶迅速代谢为三氯乙酸和三氯乙醇，导致水合氯醛在血液和尿液中含量均较低。研究证实三氯乙醇是机体内三氯乙烯和水合氯醛的主要代谢产物^[5]；三氯乙酸也被认为是引起肝损伤的三氯乙烯主要代谢产物^[4]。目前国内外针对三氯乙烯代谢产物三氯乙酸和三氯乙醇是否参与TIHD的发病过程存在争议^[5]，因此本研究拟分为两部分，第一部分为体外细胞实验：受试物为三氯乙酸和三氯乙醇，体外实验选取人髓系白血病单核细胞株 (THP-1)，检测三氯乙烯代谢产物对炎症因子白细胞介素-8 (interleukin-8, IL-8) 和一氧化氮 (nitric oxide, NO) 合成过程中重要的限速酶诱导型一氧化氮合酶 (inducible nitric oxide synthase, iNOS) 的影响。第

二部分为人群研究：检测三氯乙酸和三氯乙醇对TIHD患者外周血单个核细胞增殖能力的影响，从代谢角度解析三氯乙烯诱发致敏反应起始阶段的关键分子。

1 对象与方法

1.1 主要试剂及仪器

三氯乙酸、三氯乙醇、DMSO (Sigma, 美国)；RPMI 1640培养基、胎牛血清、青霉素-链霉素 (Gibco, 美国)；兔抗人 iNOS 多克隆抗体 (Abcam, 英国)；山羊抗兔抗体 (北京中杉金桥试剂, 中国)；高效化学发光试剂盒 (Santa Cruz, 美国)；DC蛋白测定试剂盒、酶标仪 (Bio-Rad, 美国)；异丙醇、甲醇、电泳液、电转液等试剂均为国产试剂。

1.2 体外细胞实验

1.2.1 细胞培养 THP-1细胞株购买于中国医学科学院基础医学院细胞中心。配制含有10%~15% (体积分数, 后均相同) 胎牛血清和1%青霉素-链霉素的完全培养基, 于37°C、5% CO₂培养箱中培养THP-1细胞, 每隔24 h观察细胞形态。待细胞数量达到显微镜视野下80%左右时, 进行细胞传代。

1.2.2 THP-1细胞存活率的检测 用CCK-8法检测各处理组中细胞相对存活率。调整THP-1细胞密度为 2×10^5 个·mL⁻¹, 将 2×10^4 个THP-1细胞接种于96孔板内, 并设置至少3个平行孔, 设置空白组、对照组及染毒组, 于37°C、5% CO₂培养箱中培养44 h。每孔加入

10 μL CCK-8, 继续培养 4 h。设置酶标仪波长为 450 nm 检测每孔光密度 (D) 值, 按照公式: 细胞相对存活率 = $(D_{\text{染毒组}} - D_{\text{空白组}}) / (D_{\text{对照组}} - D_{\text{空白组}}) \times 100\%$, 计算不同浓度三氯乙酸和三氯乙醇对细胞存活率的影响。

1.2.3 THP-1 细胞 IL-8 表达的检测 用完全培养基调整细胞密度为 5×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$, 取 2 mL 细胞悬液接种于 6 孔板中; 根据文献 [6] 报道和细胞对化学物的敏感性设置三氯乙酸和三氯乙醇的染毒剂量均为: 0、0.5、1.0、2.0、4.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, 各浓度组均设置 3 个平行孔, 培养 48 h 后, 分离细胞上清和细胞。利用细胞上清液检测 IL-8 表达水平, 利用细胞提取全蛋白进行 Western blotting 检测。

1.2.4 THP-1 细胞内 iNOS 表达的检测 每个染毒处理组细胞用 2 mL PBS 清洗 3 遍后, 加入 250 μL 的 RIPA 裂解液, 涡旋混匀, 冰上充分裂解 2 h, $14\ 000 \times g$ 离心 15 min 后取上清为全蛋白。每组蛋白定量吸取 35 μg , 并与 5 \times 上样缓冲液按照 4:1 的比例混匀, 配制上样体系体积为 20 μL , 100°C 水浴加热 10 min。配制 10% 的凝胶, 加入 5 μL 的蛋白 marker 和 10 μL 的各处理组蛋白, 60 V 电泳 1 h 后转为 90~110 V 继续电泳 1~2 h; 250 mA 转膜 2.5 h。转膜完成后, PVDF 膜浸泡于 10~15 mL 1 \times TBST 中摇床漂洗 10 min \times 3 次; 用 5% 脱脂奶粉溶液浸泡 PVDF 膜, 室温封闭 1 h; 稀释比为 1:500 的 iNOS 抗体 4°C 冰箱孵育过夜或超过 12 h。漂洗 PVDF 膜 10 min \times 3 次。以 1:5000 比例稀释二抗, 室温孵育 1 h 后, 水平摇床漂洗 PVDF 膜 10 min \times 3 次。加入化学发光试剂曝光后, 以 β -actin 为内参, 采用 Image pro plus 6.0 软件进行灰度分析。

1.3 TIHD 患者研究

1.3.1 研究对象选择标准 研究对象共 57 人, 分为 4 组。非接触对照组: 20 人, 选择深圳职业病防治院体检科上岗前健康体检结果处于正常范围的职业工人, 均未接触过三氯乙烯, 排除职业性有机溶剂接触史及药物食物过敏史; 接触对照组: 20 人, 选择与病例同车间同工种接触三氯乙烯但未发病的健康工人, 排除药物食物过敏史; 病例组: 共 17 人, 选择 2008—2010 年在深圳市职业病防治院进行治疗的 TIHD 患者, 均为按照 GBZ 185—2006《职业性三氯乙烯药疹样皮炎诊断标准》临床确诊的病例, 有明确三氯乙烯接触史, 接触时间不超过 3 个月, 平均约 30 d, 排除其他药物食物过敏史, 发病前 2 周均无药物服用史; 其中 10 人正在接受治疗, 为入院病例组, 另 7 人激素用量减至每天 2 mg 或停用, 血常规和肝功能检查未发现异常,

身体各项机能均基本恢复, 为出院病例组。所有研究对象经过详细的人口学调查以及职业病接触史、既往疾病史、家族遗传病史等资料收集, 均排除糖尿病、哮喘、过敏性皮炎、系统性红斑狼疮、类风湿关节炎、特应性皮炎、遗传性过敏性疾病等免疫系统相关疾病以及其他类似的职业有害因素接触史和药物食物过敏史。本研究已经中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所医学伦理委员会审查批准 (批准号: 无)。

1.3.2 研究对象外周血单个核细胞存活率的测定 采集所有被纳入人员晨起空腹肘静脉血 5 mL, 1:1 加入淋巴细胞分离液, $800 \times g$ 离心 20 min 后, 小心吸取淋巴细胞层, 加入 2 倍体积的 PBS 混匀, $300 \times g$ 离心 10 min 后, 收集沉淀即为外周血单个核细胞, 用含有 10% 胎牛血清和 1% 双抗的完全培养液稀释细胞, 调节各组细胞浓度为 1×10^6 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 96 孔板, 加入 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的三氯乙酸和三氯乙醇后, 置于 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 44 h, 检测细胞存活率, 方法同“1.2.2”。

1.4 统计学分析

IL-8 数据不符合正态分布和方差齐性, 采用完全随机化设计的多组独立样本的秩和检验 (Kruskal-Wallis 法) 进行比较, 数据采用 M (Min, Max) 表示。其他符合正态分布和方差齐性的指标, 采用方差分析比较, 组间比较采用 LSD 法, 数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有统计检验均为双侧检验, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 THP-1 细胞实验结果

2.1.1 THP-1 细胞相对存活率和 IL-8 的表达水平 与对照组相比, 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氯乙酸和三氯乙醇组细胞存活率略有增加, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$); 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 及以上剂量组, 随着三氯乙酸和三氯乙醇浓度的增加, 细胞存活率逐渐降低; IL-8 表达水平逐渐增多, 表现为剂量依赖性 (均 $P<0.05$)。见表 1。

2.1.2 THP-1 细胞 iNOS 的表达水平 与对照组相比, 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氯乙酸和三氯乙醇组 iNOS 表达量差异无统计学意义 ($P>0.05$); 随着染毒浓度增高, 1.0、2.0、4.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氯乙酸组 iNOS 的表达水平分别增高 93.73%、87.08%、238.06% ($P<0.05$), 1.0、2.0、4.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氯乙醇组 iNOS 的表达水平分别增高 95.99%、486.29%、735.72% ($P<0.05$); 但 1.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 2.0 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 三氯乙酸两个处理组之间 iNOS 表达水平差异无统计学意义 ($P>0.05$)。见图 1。

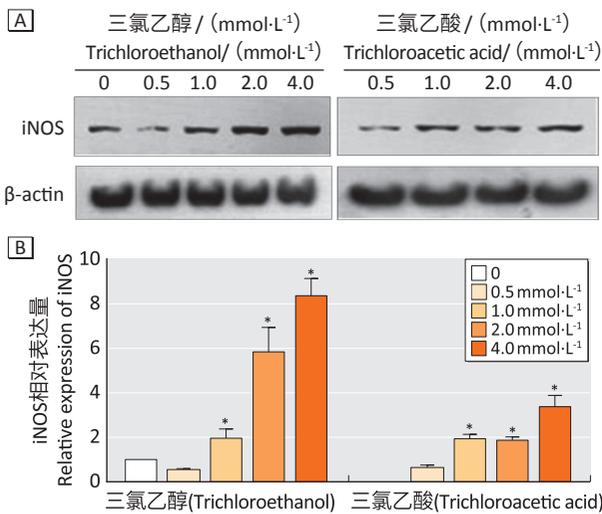
表1 不同浓度三氯乙酸和三氯乙醇对细胞存活率和IL-8的影响 (n=3)

Table 1 Effects of different concentrations of trichloroacetic acid and trichloroethanol on cell survival rates and IL-8 (n=3)

剂量组别/ (mmol·L ⁻¹) Dose group/ (mmol·L ⁻¹)	三氯乙酸 (Trichloroacetic acid)		三氯乙醇 (Trichloroethanol)	
	存活率/% Survival rate/% ($\bar{x}\pm s$)	IL-8/ (mmol·L ⁻¹) M (Min, Max)	存活率/% Survival rate/% ($\bar{x}\pm s$)	IL-8/ (mmol·L ⁻¹) M (Min, Max)
0	100±0.00	18.77 (15.13, 26.65)	100±0.00	18.77 (15.13, 26.65)
0.5	104.48±5.93	24.53 (15.13, 31.50)	102.02±2.41	26.04 (15.13, 60.01)
1.0	92.43±2.87 [*]	40.60 (24.22, 60.01) [*]	92.04±5.85 [*]	51.82 (33.93, 126.72) [*]
2.0	79.46±2.79 [*]	51.82 (23.01, 74.56) [*]	82.04±2.82 [*]	87.60 (48.48, 303.82) [*]
4.0	65.97±5.03 [*]	120.35 (58.19, 340.21) [*]	68.60±4.06 [*]	144.62 (61.83, 340.21) [*]
r	-0.875 [#]	0.596 [#]	-0.921 [#]	0.639 [#]
F (χ^2)	33.720	17.527	12.933	20.025
P	<0.001	0.002	0.011	<0.001

[注] * : 与对照组 (0mmol·L⁻¹) 相比, P<0.05 ; # : P<0.05。

[Note] * : Compared with the control group (0 mmol·L⁻¹), P<0.05; # : P<0.05.



[注] A : 电泳图 ; B : iNOS 相对表达量 ; * : 与对照组相比, P<0.05。

[Note] A: Electrophoresis image; B: Relative expression of iNOS; *: Compared with the control group, P<0.05.

图1 不同浓度受试物对 THP-1 细胞 iNOS 表达水平的影响
Figure 1 Effects of different concentrations of trichloroacetic acid and trichloroethanol on iNOS expression in THP-1 cells

表3 不同浓度三氯乙酸和三氯乙醇对外周血单个核细胞存活率的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effects of different concentrations of trichloroacetic acid and trichloroethanol on survival rate of peripheral blood mononuclear cells ($\bar{x}\pm s$)

组别 (Group)	例数 (Number)	未染毒对照 (Control)	单位 (Unit) : %			
			三氯乙酸 (Trichloroacetic acid)		三氯乙醇 (Trichloroethanol)	
			0.5 mmol·L ⁻¹	2.0 mmol·L ⁻¹	0.5 mmol·L ⁻¹	2.0 mmol·L ⁻¹
非接触对照组 (Non-exposure control group)	20	100.00±0.00	83.13±6.19 [*]	71.67±4.97 [*]	85.47±5.32 [*]	73.53±5.94 [*]
接触对照组 (Exposure group)	20	100.00±0.00	83.22±3.74 [*]	73.18±3.61 [*]	85.26±4.43 [*]	75.80±5.94 [*]
入院病例组 (Admitted group)	10	100.00±0.00	82.17±4.60 [*]	69.56±4.42 [*]	84.35±6.23 [*]	74.98±5.81 [*]
出院病例组 (Discharged group)	7	100.00±0.00	88.94±5.50 ^{a*}	77.31±6.05 ^{ab}	86.97±3.03 [*]	77.39±5.86 [*]
F	—	—	2.937	4.315	0.386	0.914
P	—	—	0.042	0.009	0.764	0.440

[注] * : 与未染毒对照相比, P<0.05 ; a : 与非接触对照组相比, P=0.012 ; b : 与非接触对照组相比, P=0.007。

[Note] * : Compared with the control group, P<0.05; a : Compared with the non-exposure control group, P=0.012; b : Compared with the non-exposure control group, P=0.007.

2.2 职业接触人群的研究结果

2.2.1 研究对象一般情况

各组研究对象基本情况见表2。其中,非接触对照组均无三氯乙烯接触史,接触对照组平均接触工龄为(466.09±280.65) d,入院病例组和出院病例组的平均接触工龄分别为(32.00±19.81)、(29.17±10.82) d。

表2 2008—2010年深圳市职业病防治院研究对象基本资料

Table 2 General information of participants from Shenzhen Preventive and Treatment Center for Occupational Diseases in 2008—2010

组别 Group	人数 (Number)			年龄/岁 Age/years ($\bar{x}\pm s$)	接触工龄/d Working years of exposure/d ($\bar{x}\pm s$)
	全部 Total	男 Male	女 Female		
非接触对照组 Non-exposure control group	20	13	7	26.3±4.35	0
接触对照组 Exposure control group	20	14	6	22.95±5.98	466.09±280.65
入院病例组 Admitted group	10	5	5	23.90±7.46	32.00±19.81
出院病例组 Discharged group	7	2	5	26.86±7.07	29.17±10.82

2.2.2 研究对象外周血单个核细胞增殖能力的变化

各组人群外周血单个核细胞在加入不同浓度三氯乙酸和三氯乙醇处理后,与未染毒细胞相比,各组细胞存活率均降低 (P<0.05)。与非接触对照组相比,0.5、2.0 mmol·L⁻¹三氯乙酸处理细胞后,出院病例组细胞存活率分别增加5.81%和5.64% (P<0.05);而接触对照组、入院病例组的细胞存活率差异无统计学意义 (P>0.05)。4组人群外周血单个核细胞经0.5、2.0 mmol·L⁻¹三氯乙醇处理后的细胞存活率差异无统计学意义 (P>0.05)。见表3。

3 讨论

大量研究表明,职业接触三氯乙烯是引起TIHD发生的直接原因^[3]。根据三氯乙烯引起的超敏反应的特征及发病机制,将其划分为IV型超敏反应即迟发型超敏反应,该反应是由效应T淋巴细胞与抗原作用后引起单个核细胞浸润和组织损伤,并且伴有严重的炎症反应^[6]。由于三氯乙烯进入机体后产生多种代谢产物例如水合氯醛、三氯乙酸、三氯乙醇等,因此三氯乙烯是否需经过代谢以后才具体致敏作用一直存在争议,有研究指出三氯乙烯及其代谢产物三氯乙酸和三氯乙醇可能均是引起TIHD的致敏原^[7-8]。本次研究结果表明:三氯乙酸在TIHD发病过程中,发挥其致敏能力;但三氯乙醇是否在TIHD发病过程中发挥其致敏能力尚无证据。

多数具有致敏性的化学物能够促进THP-1细胞分泌细胞因子,例如IL-8、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α 等,因而THP-1细胞株被广泛应用于验证、检测小分子化学物的致敏性^[9],并且在致敏性化学物的作用下THP-1细胞IL-8的表达水平增加,因此IL-8被认为是THP-1细胞体外验证化学物致敏能力的重要筛查指标^[9-10]。此外,机体在致敏原的诱导下可以促进iNOS的表达,在iNOS的催化作用下促进机体内释放大量的NO,参与炎症过程,对机体造成损伤^[10-11]。iNOS作为NO合成过程中重要的限速酶,影响NO的产生,在一定程度上同样可以作为化学物致敏能力的筛查指标。本研究结果表明:随着三氯乙酸、三氯乙醇浓度增加,IL-8表达水平增加,并且THP-1细胞iNOS表达水平增加,该趋势与IL-8变化趋势一致($P < 0.05$)。上述体外实验结果初步证明了三氯乙酸和三氯乙醇均具有致敏能力。

三氯乙烯致敏主要包括两个过程:诱导过程和激发过程^[12]。诱导过程中,化学物或其活性代谢物与内源性肽相互作用形成复合物,即形成具有免疫原性的完全抗原。完全抗原在机体内能够被抗原呈递细胞识别加工,进而促进T淋巴细胞的增殖分化,使得机体内记忆T淋巴细胞大量增加;激发过程中,当机体再次接触相同的抗原时,记忆T淋巴细胞活化为效应T淋巴细胞,引起机体免疫应答^[13-14]。目前,利用抗原特异性T淋巴细胞特点检测外源性化学物具有免疫原性的方法包括淋巴细胞转化实验和皮肤斑贴实验^[15]。为验证三氯乙酸和三氯乙醇是否在TIHD过程中发挥其致敏作用,本研究采取淋巴细胞转化实验检测三氯乙酸和三氯乙醇对三氯乙烯职业暴露人群和

非暴露人群外周血T淋巴细胞的增殖能力的影响。结果发现:相对于非接触对照组,出院病例组,分离其外周血单个核细胞与三氯乙酸共培养,细胞存活率上升,提示患者体内可能存在三氯乙酸抗原特异性的T淋巴细胞,当这类细胞再次接触特异性半抗原三氯乙酸时,T细胞发生增殖;而入院治疗组细胞存活率无明显变化,可能是因为患者入院后,治疗TIHD的药物(如糖皮质激素)对机体的免疫应答具有一定的抑制作用;当患者出院后激素停用,药物对机体的免疫抑制作用减弱,因此特异性抗原的促增殖效应能够被检测出来。

此外,Huang等^[16]采用皮肤斑贴试验对致敏原进行了检测,发现19例TIHD康复病例中,对0.05%、0.5%和5.0%三氯乙醇斑贴呈阳性的比率分别为52.6%、73.7%、89.5%;5.0%三氯乙酸阳性率为47.4%,0.5%三氯乙酸斑贴试验均为阴性;Watanabe等^[5]发现三氯乙醇、三氯乙酸均能引起TIHD患者皮肤斑贴试验阳性。结合本研究的淋巴细胞转化实验和文献报道的斑贴试验结果,可以认为三氯乙酸是参与TIHD的发病过程的致敏原之一;而本研究结果尚无法确定三氯乙醇是否参与TIHD的发病。导致研究结果差异性的原因可能是由于淋巴细胞转化实验所使用的淋巴细胞与斑贴试验中皮肤角质细胞的敏感性差异、受试物浓度差异等多种因素引起。为进一步验证试验结果的准确性,后续需扩大样本量,增设化学物的干预剂量和干预时间,进一步验证三氯乙醇、三氯乙酸以及其他代谢产物在TIHD发病过程中的作用。

参考文献

- [1] KANG YJ, LEE J, AHN J, et al. Trichloroethylene hypersensitivity syndrome: should be considered when diagnosing DRESS syndrome [J]. J Korean Med Sci, 2018, 33 (14): e106.
- [2] DAI Y, ZHOU W, JIA Q, et al. Utility evaluation of HLA-B*13:01 screening in preventing trichloroethylene-induced hypersensitivity syndrome in a prospective cohort study [J]. Occup Environ Med, 2020, 77 (3): 201-206.
- [3] KAMIJIMA M, HISANAGA N, WANG H, et al. Occupational trichloroethylene exposure as a cause of idiosyncratic generalized skin disorders and accompanying hepatitis similar to drug hypersensitivities [J]. Int Arch Occup Environ Health, 2007, 80 (5): 357-370.
- [4] LASH LH, FISHER JW, LIPSCOMB JC, et al. Metabolism of

- trichloroethylene [J]. *Environ Health Perspect*, 2000, 108 (Suppl 2) : 177-200.
- [5] WATANABE H. Hypersensitivity syndrome due to trichloroethylene exposure : a severe generalized skin reaction resembling drug-induced hypersensitivity syndrome [J]. *J Dermatol*, 2011, 38 (3) : 229-235.
- [6] 夏丽华, 黄汉林, 邝守仁, 等. 三氯乙烯所致药疹样皮炎 50 例临床分析 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2004, 22 (3) : 207-210.
- XIA LH, HUANG HL, KUANG SR, et al. A clinical analysis of 50 cases of medicament-like dermatitis due to trichloroethylene [J]. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi*, 2004, 22 (3) : 207-210.
- [7] NAKAYAMA H, KOBAYASHI M, TAKAHASHI M, et al. Generalized eruption with severe liver dysfunction associated with occupational exposure to trichloroethylene [J]. *Contact Dermatitis*, 1988, 19 (1) : 48-51.
- [8] WATANABE H, TOHYAMA M, KAMIJIMA M, et al. Occupational trichloroethylene hypersensitivity syndrome with human herpesvirus-6 and cytomegalovirus reactivation [J]. *Dermatology*, 2010, 221 : 17-22.
- [9] NUKADA Y, MIYAZAWA M, KOSAKA N, et al. Production of IL-8 in THP-1 cells following contact allergen stimulation via mitogen-activated protein kinase activation or tumor necrosis factor- α production [J]. *J Toxicol Sci*, 2008, 33 (2) : 175-185.
- [10] 臧丹. 三氯乙烯药疹样皮炎免疫学效应标志物及致敏原研究 [D]. 北京 : 中国疾病预防控制中心, 2011.
- ZANG D. Study on immunological effect biomarkers and allergen of dermatitis medicamentosa-like of trichloroethylene [D]. Beijing : Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2011.
- [11] ANAVI S, TIROSH O. iNOS as a metabolic enzyme under stress conditions [J]. *Free Radic Biol Med*, 2020, 146 : 16-35.
- [12] ZHANG C, YU Y, YU JF, et al. Viral mimic polyinosine-polycytidylic acid potentiates liver injury in trichloroethylene-sensitized mice—Viral-chemical interaction as a novel mechanism [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 155 : 101-108.
- [13] ILLING PT, MIFSUD NA, PURCELL AW. Allotype specific interactions of drugs and HLA molecules in hypersensitivity reactions [J]. *Curr Opin Immunol*, 2016, 42 : 31-40.
- [14] MARTIN SF. T lymphocyte-mediated immune responses to chemical haptens and metal ions : implications for allergic and autoimmune disease [J]. *Int Arch Allergy Immunol*, 2004, 134 (3) : 186-198.
- [15] MARQUES-MEJÍAS MA, CABAÑAS R, RAMÍREZ E, et al. Lymphocyte Transformation Test (LTT) in allergy to Benznidazole : a promising approach [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10 : 469.
- [16] HUANG Y, XIA L, WU Q, et al. Trichloroethylene hypersensitivity syndrome is potentially mediated through its metabolite chloral hydrate [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (5) : e0127101.

(英文编辑 : 汪源 ; 责任编辑 : 丁瑾瑜)