

S-生物丙烯菊酯对人淋巴细胞的影响

S-生物丙烯菊酯(S-bioallethrin)属于拟除虫菊酯类,因对人类低毒性而广泛用于蚊香、蚊片、杀虫剂等,是WHO推荐的可用于防治卫生害虫及其媒介的农药之一,人们逐渐发现其具有神经和免疫毒性[1][2][3]。为此我们研究了正常人淋巴细胞在S-生物丙烯菊酯刺激后的变化,并且运用基因芯片技术[4]研究了其基因表达谱的变化,旨在阐明S-生物丙烯菊酯对淋巴细胞的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

1例正常人外周血淋巴细胞样品来自南方医院;S-生物丙烯菊酯来自广东省职业病防治院,CAS登记号为28434-00-6,含90%的标准浓缩液;Agilent Human 1B寡核苷酸基因芯片购自美国Agilent公司。

1.2 实验方法

1.2.1 淋巴细胞分离 取正常人抗凝血10 ml,与10 ml PBS混匀,小心加于10 ml淋巴细胞分离液上,2000 g离心20 min;收集第2层(浅黄色层)细胞,放入含PBS 5 ml的试管中,充分混匀,1500 g离心10 min;最后用PBS洗2次,每次1000 g离心5 min,所得沉淀即为淋巴细胞。

1.2.2 植物血球凝集素(PHA)终浓度的确定 在96孔板中,每孔加100 μl 浓度为 2×10^6 细胞/ml的正常淋巴细胞,加入不同浓度PHA 100 μl ,使其终浓度分别为5、10、15和20 $\mu\text{g/ml}$,每个浓度设3个复孔。对照组加100 μl 培养基,设3个复孔。72 h后,每孔加2 mg/ml MTT 20 μl 。4 h后离心96孔板,800 g离心6 min,去上清。每孔加100 μl DMSO,振荡混匀,酶标仪570 nm处测D(λ)值,对得到的数据进行t检验分析。

1.2.3 S-生物丙烯菊酯终浓度的确定 在96孔板中每孔加100 μl 浓度为 2×10^6 细胞/ml的正常淋巴细胞,加入100 μl PHA,终浓度为20 $\mu\text{g/ml}$ 。4 h后加入0.5 μl 不同浓度的S-生物丙烯菊酯,使其终浓度分别为5、 5×10^{-1} 、 5×10^{-2} 、 5×10^{-3} 、 5×10^{-4} 、 5×10^{-5} 、 5×10^{-6} 、 5×10^{-7} 和 5×10^{-8} mol/L,每个浓度设3个复孔。对照组加相应量的DMSO,设3个复孔。72 h后,每孔加2 mg/ml MTT 20 μl 。4 h后离心96孔板,800 g离心6 min,去上清。每孔加100 μl DMSO,振荡混匀,酶标仪570 nm处测D(λ)值,对得到的数据进行t检验并作图分析。

1.2.4 淋巴细胞培养

1.2.4.1 正常组 用10%小牛血清1640培养基调整正常淋巴细胞浓度为 2×10^6 细胞/ml,培养72 h后,1000 g离心10 min,收集细胞。

1.2.4.2 PHA处理组 用10%小牛血清1640培养基调整正常淋巴细胞浓度为 2×10^6 细胞/ml,加入PHA,终浓度为20 $\mu\text{g/ml}$,培养72 h后,1000 g离心10 min,收集细胞。

1.2.4.3 S-生物丙烯菊酯处理组 用10%小牛血清1640培养基调整正常淋巴细胞浓度为 2×10^6 细胞/ml,加入PHA,终浓度为20 $\mu\text{g/ml}$;4 h后加入S-生物丙烯菊酯,终浓度为 1.5×10^{-5} mol/L;培养72 h后,1000 g离心10 min,收集细胞。

1.2.5 流式细胞仪检测 收集正常组、PHA处理组和S-生物丙烯菊酯处理组的淋巴细胞各 $10^5 \sim 10^6$ ，PBS洗2次，加入1 ml 70%冻乙醇，4 °C过夜，避光固定。加入10 $\mu\text{g/ml}$ RNaseA 10 μl ，4 °C、30 min。1500 g离心10 min。小心倒出上清，PBS重悬，静置5 min。1500 g离心10 min。加入50 $\mu\text{g/ml}$ PI 1 ml，4 °C避光染色30 min，立刻检测。

1.2.6 电镜检测 收集正常和S-生物丙烯菊酯处理组的淋巴细胞各107，加入400 μl 戊二醛固定，梯度酒精脱水、渗透、包埋、聚合、超薄切片，染色，观察。

1.2.7 DNA梯度实验 收集正常和S-生物丙烯菊酯处理组的淋巴细胞，用Qiagen DNeasy Tissue System提取基因组DNA，具体步骤严格按照试剂盒说明进行。1.2%琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.8 芯片检测 采用Agilent Human 1B寡核苷酸基因芯片研究S-生物丙烯菊酯处理后的淋巴细胞的基因表达谱变化。

1.2.8.1 RNA提取及质检 收集正常和S-生物丙烯菊酯处理组淋巴细胞，加Trizol(1×10^7 细胞/ml)提取总RNA。采用Agilent BioAnalyzer 2100进行RNA样品的质量鉴定。

1.2.8.2 样品的标记 2个样品各取总RNA 2 μg 。采用Agilent低RNA荧光线性扩增试剂盒对样品进行双色荧光标记，实验步骤按说明书进行。

1.2.8.2.1 逆转录合成cDNA 每个标本取总RNA 2 μg ，加入5 L T7启动子引物，加无核酸酶水至总反应体积为11.5 L。65 °C水浴10 min，冰上放置5 min，然后加8.5L cDNA Master Mix(含5 \times 第一链缓冲液4 L，0.1 mol/L DTT 2 L，10 mmol/L dNTP 混合物1 L，逆转录酶MMLV 1 L，RNA酶抑制剂0.5 L)，40 °C水浴2 h后，65 °C、15 min灭活MMLV-RT，冰上孵育5 min。

1.2.8.2.2 荧光标记cRNA的合成 以Cy3标记A组标本，Cy5标记B组标本。在每对合成好的cDNA标本中分别加入2.4 L Cy3-CTP(10 mmol/L)和2.4 L Cy5-CTP(10 mmol/L)，然后各加入57.6 L的转录Master Mix(含无核酸酶水15.3 L，4 \times 转录缓冲液20 L，0.1 mol/L DTT 6.0 L，NTP混合物8.0L，50%PEG 6.4 L，RNA酶抑制剂0.5 L，无机焦磷酸酶0.6 L，T7 RNA聚合酶 0.8 L)，40 °C避光水浴2 h。

1.2.8.2.3 荧光标记cRNA的纯化 采用Qiagen RNeasy迷你旋转柱子对标记的cRNA进行纯化，具体步骤严格按照试剂盒说明进行。

1.2.8.3 芯片杂交和洗片 采用Agilent原位杂交试剂盒进行杂交，60 °C、4 g/min杂交17 h，具体步骤按照试剂盒要求进行。杂交完毕后将芯片盒从杂交炉中取出，依次用配制好的漂洗缓冲液进行芯片的漂洗，具体参数参照试剂盒说明书进行配制。

1.2.8.4 扫描与分析 将芯片置于Agilent 2565BA基因芯片扫描仪中扫描，参数设置采用扫描仪的默认参数，扫描后的数据用Feature extraction软件进行数据分析及标准化处理。

1.2.9 RT-PCR验证 采用Primer5.0软件对有进一步研究价值且表达改变显著的差异基因FXR2和TNFRSF 10A以及看家基因GAPDH设计特异性引物，进行半定量RT-PCR验证，反应参数为：95 °C、5 min；94 °C、30 s，55 °C、30 s，72 °C、1 min，循环28次；72 °C、7 min。

2 结果

2.1 PHA终浓度

72 h后在96孔板底肉眼可见蓝紫色甲贍颗粒，PHA刺激前后每个孔的D(λ)值有显著差异($P < 0.01$)，说明PHA刺激前后细胞增殖有统计学意义。选取PHA用量相对较少，细胞增殖相对较多的终浓度为20 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.2 S-生物丙烯菊酯终浓度

S-生物丙烯菊酯刺激导致细胞增殖被抑制具有统计学意义($P < 0.01$)。以S-生物丙烯菊酯终浓度为横坐标、D(λ)值为纵坐标作曲线，D(λ)值为最大值一半时对应的浓度为半数抑制浓度，即终浓度为 1.5×10^{-5} mol/L。

2.3 细胞培养

PHA处理组淋巴细胞出现增殖，表现为具有集群生长的能力，形成肉眼可见的由几十到几百细胞组成、直

径可达30~100 μm甚至更大的细胞团；细胞在形态上表现为体积增大，胞质增多。S-生物丙烯菊酯处理组淋巴细胞增殖不明显，有的细胞体积变小、变形，细胞膜完整但出现发泡现象。

2.4 流式细胞仪检测结果

PHA处理组淋巴细胞和正常淋巴细胞相比，S期和G2期均抬高，表明细胞出现增殖。S-生物丙烯菊酯处理组淋巴细胞和PHA处理组淋巴细胞相比，S期和G2期均下降，但仍高于正常淋巴细胞，表明增殖部分被抑制；G1期峰前出现亚二倍体峰，表明有凋亡细胞群体，百分率为32%。

2.5 电镜检测结果

由图1可见，正常淋巴细胞核染色质丰富，分布较均匀；S-生物丙烯菊酯处理组淋巴细胞细胞核染色质高度凝聚、边缘化，表明细胞出现凋亡。

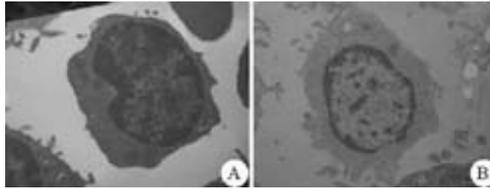


图1 电镜检测结果

Fig.1 Results of electron microscope (×25 000)
A: Control group; B: S-bioallethrin group

2.6 DNA梯度实验

正常淋巴细胞基因组DNA位于点样孔附近，前方无DNA片段化降解条带。S-生物丙烯菊酯处理组细胞DNA电泳条带呈典型的梯状条带，可见每隔200 bp位置出现DNA降解条带(图2)。

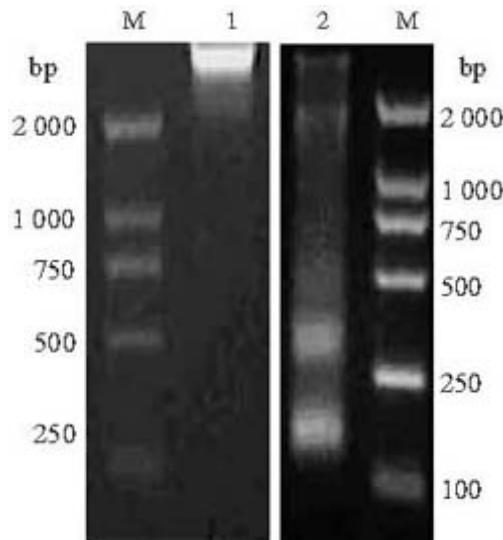


图2 S-生物丙烯菊酯处理前后淋巴细胞基因组DNA电泳图

Fig.2 Electrophoresis of human normal lymphocyte genomic DNA before and after S-bioallethrin treatment
M: Marker; Lane 1: Control group; Lane 2:S-bioallethrin group

2.7 RNA质量分析

正常组和S-生物丙烯菊酯处理组淋巴细胞总RNA的28s/18s峰值面积比值分别为1.856和1.818，说明RNA均无明显降解，基本符合基因芯片测定的要求(图3)。

2.8 芯片杂交结果

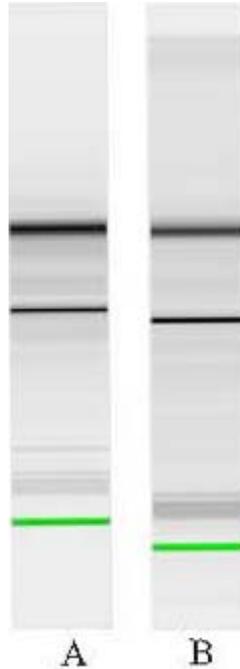


图3 Agilent 2100 Bioanalyzer检测正常和S-生物丙烯菊酯处理淋巴细胞总RNA电泳图
 Fig.3 Electrophoresis of untreated and S-bioallethrin-treated normal lymphocyte total RNA detected by Agilent 2100 Bioanalyzer
 A: Control group; B: S-bioallethrin group

以Log Ratio P value <0.01为两者表达差异的判断标准。结果除质量控制点及未能达到分析要求而被排除的基因探针之外，在检测的20 173个基因中共同差异表达基因有346个，其中23个基因表达上调，323个基因表达下调，见图4。对这346个差异表达基因采用ABI公司的在线软件Panther进行生物学分类，其中与凋亡相关的基因共7个，其中CEBPB、TNFRSF 10A、BLK、CARD9、FXR2、DLGAP1表达上调，ATF1表达下调。



图4 芯片杂交结果
 Fig.4 Results of microarray hybridization Red: Up-regulated genes; Green: Down-regulated genes; Yellow: Unchanged genes

2.9 RT-PCR验证

S-生物丙烯菊酯处理后的人淋巴细胞表达改变的基因中，FXR2的Ratio为7.1569，TNFRSF 10A的Ratio为5.9919。应用半定量RT-PCR反应，对这两个差异基因的表达进行确认，琼脂糖电泳检测见图5。S-生物丙烯菊酯处理前后差异基因的表达水平以相对表达量即差异基因/GAPDH的比率来计算，结果表明处理组的FXR2/GAPDH和TNFRSF 10A /GAPDH的比值明显高于正常组，与芯片杂交结果基本一致，说明S-生物丙烯菊酯处理人淋巴细胞后，FXR2和TNFRSF 10A的表达上调，杂交结果可信度较高。

3 讨论

以往的研究表明，S-生物丙烯菊酯可以抑制T淋巴细胞增殖，导致嗜碱粒细胞释放组胺[5]；与胡椒基丁醚混合应用后更加有效地抑制了IL-4和IFN- γ [6]，而IFN- γ 的产生和表达与淋巴细胞增殖有关；Diel等[7]还通过Western-blot发现S-生物丙烯菊酯抑制细胞内Th2特异性的信号转导催化因子6，从而抑制淋巴细胞信号转导，但至今仍未有S-生物丙烯菊酯可以导致淋巴细胞凋亡的报道。细胞凋亡涉及到促凋亡及抗凋亡信号转导途径的启动或抑制，对凋亡刺激的反应性取决于相反力量之间的平衡。此外，细胞凋亡和细胞增殖又是机体维持细胞数量恒定的手段，并借两者之间互为消长来维持自身的平衡。因此，采用药物干预前后的比较，应考虑到凋亡和增殖信号转导途径之间的复杂联系，以了解凋亡与增殖基因动态变化中密切相关的信号分子的调控规律。

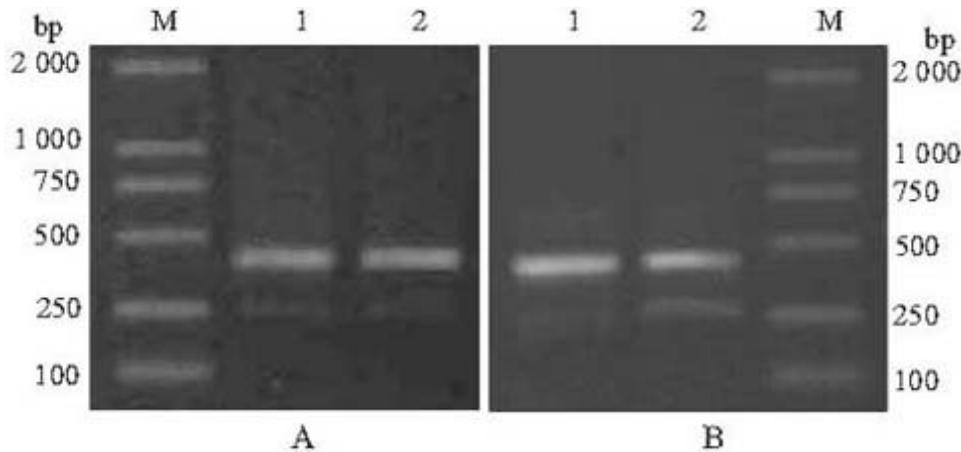


图5 S-生物丙烯菊酯处理前后淋巴细胞差异基因RT-PCR电泳图

Fig.5 Electrophoresis of the RT-PCR product of differentially expressed genes after S-bioallethrin treatment

M: Marker; Lane 1: Control group; Lane 2: S-bioallethrin group
A: FXR2; B: TNFRSF 10A

本研究结合光镜、电镜、流式细胞仪和DNA 梯度实验的分析结果，表明S-生物丙烯菊酯处理正常淋巴细胞可导致淋巴细胞凋亡，并且进一步分析了S-生物丙烯菊酯处理的淋巴细胞基因表达谱，发现：促凋亡基因CEBPB、TNFRSF 10A、BLK、CARD9、FXR2和DLGAP1等表达上调的同时，凋亡抑制基因ATF1表达下调；促增殖基因表达下调的同时，抗增殖基因表达上调；并有多数促进细胞增殖信号传导、促进免疫应答的基因表达显著下调。S-生物丙烯菊酯处理后淋巴细胞基因表达的总体趋势是促进凋亡、抑制增殖。

TNFRSF 10A编码肿瘤坏死因子受体，可诱导半胱天冬酶介导的凋亡，该基因的突变与多种癌症相关。Bieche等[8]研究表明，在炎性乳腺癌中，TNFRSF 10A表达上调，而且该基因还可以作为诊断炎性乳腺癌恶性以及判断预后的标准之一。Sardi等[9]研究表明，TNFRSF 10A在高危成神经细胞瘤中高表达。本研究中该基因表达上调，促进了半胱天冬酶介导的凋亡，从而促进了淋巴细胞的凋亡。

ATF1是诱导NOX1产生的增量调节通路的关键基因，NOX1是NADPH氧化酶的催化亚单位[10]，ATF1表达下调，NOX1产生减少导致NADPH氧化作用减弱，影响了机体的信号转导。

CARD9在淋巴细胞活化中起重要作用。Nakamura等[11]研究发现，CARD9高表达可能与胃B细胞淋巴瘤的发展有关。FXR2属于脆性X综合征基因，参与多核糖体的翻译，与儿童智力迟钝有关[12]。Pickard等[13]研究指出，DLGAP1是精神病遗传基础的代表基因之一。这3个基因的表达上调与淋巴细胞受S-生物丙烯菊酯刺激后出现凋亡有何关系，还需进一步研究。

以往研究较多的基因如促细胞凋亡基因Caspase1、Caspase2、Caspase3、Caspase6、Calpain II、Cathepsin S、Dnase γ 、PKCdelta等均未出现在本研究筛出的差异表达基因中，但S-生物丙烯菊酯刺激后这些基因的平均表达是正常淋巴细胞的4.6倍，而且S-生物丙烯菊酯刺激后表达值最低的基因Caspase6也高于正常淋巴细胞中Caspase6的表达。Cathepsin B、Mtal、NF2kappa B、Notch等研究较多的抗凋亡基因也均未出现在本研究筛出的差异表达基因中，但S-生物丙烯菊酯刺激后这些基因的平均表达约是正常淋巴细胞的

1/3, 而且S-生物丙烯菊酯刺激后表达值最高的基因Notch也低于正常淋巴细胞中Notch的表达。以上基因的表达情况均与以往研究一致。

本研究还发现了促进细胞增殖信号传导、促进免疫应答的基因, 其中两个在细胞凋亡与细胞增殖中起诱导作用的上游因子尤其值得注意。转化生长因子(TGF) β 既可诱导某些细胞的凋亡反应, 又可增强某些细胞的抗细胞凋亡作用[14]。正常淋巴细胞在S-生物丙烯菊酯处理后呈现凋亡的趋势, TGF β 的显著上调作为调节细胞凋亡过程的上游因子, 成为促凋亡、抗增殖的信号转导的重要途径。原癌基因和抑癌基因多数参与一般细胞凋亡的调控。原癌基因既促进细胞增殖又抗细胞凋亡, 抑癌基因的作用正好相反[15]。本研究观察到在S-生物丙烯菊酯刺激过程中, 原癌基因A-Raf、c-Jun等下调, 抑癌基因变化不明显, 因此S-生物丙烯菊酯刺激的淋巴细胞中原癌基因作用被部分抑制, 从而加强了促凋亡、抗增殖的信号传导。

我们通过形态学观察, 结合Agilent Human 1B寡核苷酸基因芯片分析系统, 研究发现了正常淋巴细胞在受S-生物丙烯菊酯刺激后发生凋亡, 并且基因表达谱也发生了改变, 为S-生物丙烯菊酯的毒理学研究提供了新的思路和理论基础。

参考文献:

- [1] Talts U, Fredriksson A, Eriksson P. Changes in behavior and muscarinic receptor density after neonatal and adult exposure to bioallethrin[J]. *Neurobiol Aging*, 1998, 19(6): 545-52.
- [2] Fakata KL, Swanson SA, Vorce RL, et al. Pyrethroid insecticides as phosphatase inhibitors[J]. *Biochem Pharmacol*, 1998, 55(12): 2017-22.
- [3] Lees G. Effects of pyrethroid molecules on rat nerves in vitro: potential to reverse temperature-sensitive conduction block of demyelinated peripheral axons[J]. *Br J Pharmacol*, 1998, 123(3): 487-96.
- [4] Stoughton RB. Applications of DNA microarrays in biology[J]. *Annu Rev Biochem*, 2005, 74(1): 53-82.
- [5] Diel F, Detscher M, Schock B, et al. In vitro effects of the pyrethroid S-bioallethrin on lymphocytes and basophils from atopic and nonatopic subjects[J]. *Allergy*, 1998, 53(11): 1052-9.
- [6] Diel F, Horr B, Borck H, et al. Pyrethroids and piperonyl-butoxide affect human T-lymphocytes in vitro[J]. *Toxicol Lett*, 1999, 107(1-3): 65-74.
- [7] Diel F, Horr B, Borck H, et al. Pyrethroid insecticides influence the signal transduction in T helper lymphocytes from atopic and nonatopic subjects[J]. *Inflamm Res*, 2003, 52(4): 154-63.
- [8] Bieche I, Lerebours F, Tozlu S, et al. Molecular profiling of inflammatory breast cancer: identification of a poor-prognosis gene expression signature[J]. *Clin Cancer Res*, 2004, 10(20): 6789-95.
- [9] Sardi I, Tintori V, Marchi C, et al. Molecular profiling of high-risk neuroblastoma by cDNA array[J]. *Int J Mol Med*, 2002, 9(5): 541-5.
- [10] Fan C, Katsuyama M, Nishinaka T, et al. Transactivation of the EGF receptor and a PI3 kinase-ATF-1 pathway is involved in the upregulation of NOX1, a catalytic subunit of NADPH oxidase[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(5): 1301-5.
- [11] Nakamura S, Nakamura S, Matsumoto T, et al. Overexpression of caspase recruitment domain (CARD) membrane-associated guanylate kinase 1 (CARMA1) and CARD9 in primary gastric B-cell lymphoma[J]. *Cancer*, 2005, 104(9): 1885-93.
- [12] Hecimovic S, Tarnik IP, Baric I, et al. Screening for fragile X syndrome:

results from a school for mentally retarded children[J]. Acta Paediatr, 2002, 91(5): 535-9.

[13] Pickard BS, Malloy MP, Clark L, et al. Candidate psychiatric illness genes identified in patients with pericentric inversions of chromosome 18[J]. Psychiatr Genet, 2005, 15(1): 37-44.

[14] 陈和华, 宋建国. 转化生长因子 β 在细胞凋亡及抗凋亡中的作用机制[J]. 生命科学, 2002, 15(1): 12-4.

Chen HH, Song JG. Mechanism of transforming growth factor β in apoptosis and anti-apoptosis[J]. Chin Bull Life Sci, 2002, 15(1): 12-4.

[15] 韩晓琳, 张宗玉, 童坦君. 衰老过程中原癌基因及抑癌基因的表达谱[J]. 生理科学进展, 2002, 33(2): 126.

Han XL, Zhang ZY, Tong TJ. Expression profiling of proto-oncogene and anti-oncogene in aging process[J]. Adv Physiol Sci, 2002, 33(2): 126.

[回结果列表](#)