

## S-生物丙烯菊酯对人淋巴细胞的影响

刘 玥<sup>1</sup>, 梁丽燕<sup>2</sup>, 马文丽<sup>1</sup>, 郑文岭<sup>1</sup> (<sup>1</sup>南方医科大学基因工程研究所, 广东 广州 510515; <sup>2</sup>广东省职业病防治院, 广东 广州 510300)

**摘要:**目的 运用基因芯片技术研究 S-生物丙烯菊酯对正常人淋巴细胞的作用。方法 取正常人外周血淋巴细胞, 加入 S-生物丙烯菊酯刺激, 分别进行光镜、流式细胞仪、电镜、DNA 梯度和基因芯片检测, 研究正常淋巴细胞在 S-生物丙烯菊酯刺激后的变化。结果 正常淋巴细胞在 S-生物丙烯菊酯刺激后发生凋亡, 并有 346 个基因表达发生改变。结论 S-生物丙烯菊酯可导致正常淋巴细胞凋亡和基因表达谱改变。

**关键词:** S-生物丙烯菊酯; 淋巴细胞; 凋亡; 基因表达谱

中图分类号: R392.1 文献标识码: A 文章编号: 1673-4254(2006)03-0321-04

### Effect of S-bioallethrin on human lymphocyte

LIU Yue<sup>1</sup>, LIANG Li-Yan<sup>2</sup>, MA Wen-Li<sup>1</sup>, ZHENG Wen-Ling<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Genetic Engineering, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; <sup>2</sup>Hospital for Occupational Diseases Control of Guangdong Province, Guangzhou 510300, China

**Abstract: Objective** To study the effect of the S-bioallethrin on human lymphocytes by microarray technique. **Methods** The changes of normal human lymphocytes treated with S-bioallethrin were examined with light microscope, flow cytometry, electron microscope, DNA ladder and microarray techniques. **Results** Morphological study showed that the lymphocytes underwent apoptosis after S-bioallethrin exposure, which as further confirmed by the expression changes of 346 genes. **Conclusion** S-bioallethrin can induce apoptosis of normal human lymphocytes and changes in their gene expression profiles.

**Key words:** S-bioallethrin; lymphocyte; apoptosis; gene expression profiling

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<sup>[1-3]</sup>。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<sup>[4]</sup>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  $\mu$ l 浓度为  $2 \times 10^6$  细胞/ml 的正常淋巴细胞, 加入不同浓度 PHA 100  $\mu$ l, 使其终浓度分别为 5、10、15 和 20  $\mu$ g/ml, 每个浓度设 3 个复孔。对照组加 100  $\mu$ l 培养基, 设 3 个复孔。72 h 后, 每孔加 2 mg/ml MTT 20  $\mu$ l。4 h 后离心 96 孔板, 800 g 离心 6 min, 去上清。每孔加 100  $\mu$ l DMSO, 振荡混匀, 酶标仪 570 nm 处测 D( $\lambda$ ) 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  $\mu$ l 浓度为  $2 \times 10^6$  细胞/ml 的正常淋巴细胞, 加入 100  $\mu$ l PHA, 终浓度为 20  $\mu$ g/ml。4 h 后加入 0.5  $\mu$ l 不同浓度的 S-生物丙烯菊酯, 使其终浓度分别为 5、 $5 \times 10^{-1}$ 、 $5 \times 10^{-2}$ 、 $5 \times 10^{-3}$ 、 $5 \times 10^{-4}$ 、 $5 \times 10^{-5}$ 、 $5 \times 10^{-6}$ 、 $5 \times 10^{-7}$  和  $5 \times 10^{-8}$  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  $\mu$ l。4 h 后离心 96 孔板, 800 g 离心 6 min, 去上清。每孔加 100  $\mu$ l DMSO, 振荡混匀, 酶标仪 570 nm 处测 D( $\lambda$ ) 值, 对得到的数据进行 t 检验并

收稿日期: 2005-10-22

基金项目: 广州市重大科技攻关项目(01-Z-005-1)

Supported by the Key Science and Technology Research Development Programs of Guangzhou City(01-Z-005-1)

作者简介: 刘 玥(1980-), 女, 在读硕士研究生, 电话: 020-62789097, E-mail: sunshine@fimmu.com

通讯作者: 马文丽, 电话: 020-61648209, E-mail: wenli@fimmu.com

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  $2 \times 10^6$  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  $2 \times 10^6$  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  $2 \times 10^6$  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  $1.5 \times 10^{-5}$  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,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  过夜, 避光固定。加入  $10 \mu\text{g/ml}$  RNaseA  $10 \mu\text{l}$ ,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、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,  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  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  $10^7$ , 加入  $400 \mu\text{l}$  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 ( $1 \times 10^7$  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  $2 \mu\text{g}$ 。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 g, 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  $^\circ\text{C}$  水浴 10 min, 冰上放置 5 min, 然后加 8.5 L 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),  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴 2 h 后,  $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 、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 mol/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 8.0 L, 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),  $40 \text{ }^\circ\text{C}$  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,  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 、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:  $95 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5 min;  $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 、30 s,  $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 、30 s,  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 、1 min, 循环 28 次;  $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 、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臞颗粒, PHA 刺激前后每个孔的  $D(\lambda)$  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,  $D(\lambda)$  值为纵坐标作曲线,  $D(\lambda)$  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  $1.5 \times 10^{-5}$  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  $30 \sim 100 \mu\text{m}$  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。

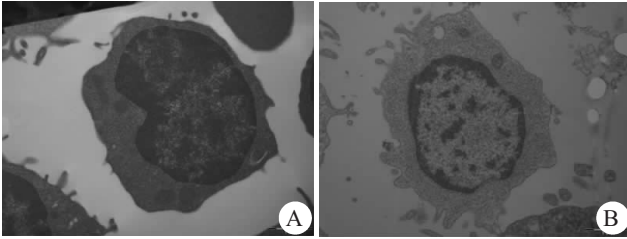


图 1 电镜检测结果

Fig.1 Results of electron microscope ( $\times 25\ 000$ )

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)。

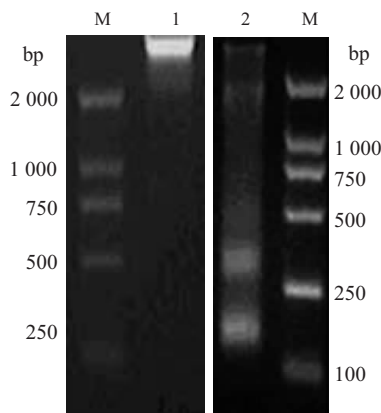


图 2 S-生物丙烯菊酯处理前后淋巴细胞基因组 DNA 电泳图

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

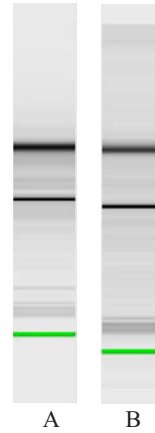


图 3 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测正常和 S-生物丙烯菊酯处理淋巴细胞总 RNA 电泳图

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。

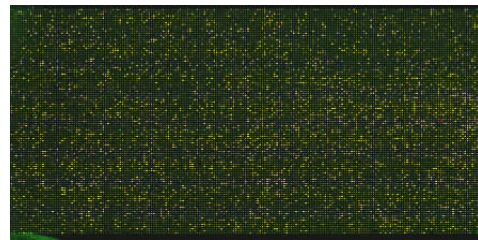


图 4 芯片杂交结果

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

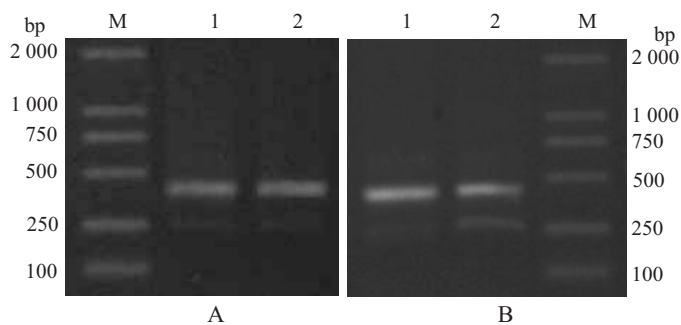


图 5 S-生物丙烯菊酯处理前后淋巴细胞差异基因 RT-PCR 电泳图

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

淋巴细胞增殖,导致嗜碱粒细胞释放组胺<sup>[5]</sup>;与胡椒基丁醚混合应用后更加有效地抑制了 IL-4 和 IFN- $\gamma$ <sup>[6]</sup>,而 IFN- $\gamma$  的产生和表达与淋巴细胞增殖有关;Diel 等<sup>[7]</sup>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。

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;并有多个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<sup>[8]</sup>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良恶性以及判断预后的标准之一。Sardi 等<sup>[9]</sup>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<sup>[10]</sup>,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<sup>[11]</sup>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<sup>[12]</sup>。Pickard 等<sup>[13]</sup>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 $\gamma$ 、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) $\beta$  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<sup>[14]</sup>。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 $\beta$  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<sup>[15]</sup>。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。

(下转 327 页)