

· 实验研究 ·

二甲基砷暴露对大鼠膀胱上皮细胞增殖因子表达的影响

Effect of dimethyl arsenic exposure on cell proliferative factor expression in bladder epithelium of rats

张琳¹, 张瑛凯², 孙清山¹, 刘盛男¹, 宋英利¹, 席淑华¹, 孙贵范³

(1. 中国医科大学公共卫生学院地球化学性疾病研究室; 2. 中国医科大学 98 期七年制; 3. 中国医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 为观察二甲基砷 (DMA^V) 染毒后的大鼠膀胱上皮细胞增殖相关因子表达情况, 将 48 只初断乳健康 Wistar 大鼠随机分成对照组和低 (100 ppm)、高 (200 ppm) 剂量 DMA^V 染毒组, 雌雄各半。染毒组饮用含 DMA^V 的水, 对照组饮用蒸馏水, 染毒 10 周后, 通过免疫组化法观察大鼠膀胱上皮细胞 PCNA、cyclinD1、COX-2 表达情况。结果显示各染毒组 PCNA、cyclinD1 蛋白表达均显著升高 ($P < 0.01$), 200 ppm DMA^V 染毒组 COX-2 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。提示 DMA^V 对大鼠膀胱上皮细胞具有促增殖作用。

关键词: 二甲基砷; 大鼠; 膀胱癌; 增殖

中图分类号: R994.6 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2014)05-0360-03

DOI:10.13631/j.cnki.zgggxyx.2014.05.016

砷已被国际癌症组织确定为人类致癌物。有研究报道, 职业和环境砷暴露可引起人体皮肤、肺、膀胱、肝、肾等多器官肿瘤^[1-3]。目前认为膀胱上皮细胞增殖是 DMA^V 致膀胱癌发生的机制之一。增殖细胞核抗原 (PCNA) 是一种核内蛋白质, 与细胞增殖和 DNA 合成有关。细胞周期素 D1 (cyclinD1) 是 G1 期细胞增殖信号的关键蛋白, 两者都是从增殖角度研究肿瘤发生机制的重要指标。环氧化酶-2 (COX-2) 是人体利用花生四烯酸合成前列腺素的限速酶, 在细胞受到炎症因子、细胞因子、内毒素、白介素、肿瘤诱导剂及癌基因等的各种刺激下迅速合成, 高表达于各种组织中, 参与炎症过程和肿瘤的生长^[4]。研究发现染毒 10 周可使大鼠膀胱发生可逆的轻微损伤^[5]。因此本研究拟通过亚慢性毒性实验, 观察 DMA^V 染毒 10 周能否引起大鼠膀胱上皮细胞增殖相关因子 PCNA、cyclinD1、COX-2 的改变, 了解 DMA^V 对大鼠膀胱上皮的促增殖作用, 为砷致膀胱癌的研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

五价二甲基砷 (上海生工生物工程股份有限公司, 纯度 99%), cyclinD1 蛋白抗体 (cell signaling technology)、PCNA 蛋白抗体、COX-2 蛋白抗体、即用型免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司), 光学显微镜 (OLYMPUS)。

收稿日期: 2013-10-15; 修回日期: 2013-12-31

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81072244, 81373024)

作者简介: 张琳 (1987—), 女, 硕士研究生, 从事地方性砷中毒研究。

通讯作者: 席淑华, E-mail: shxi@mail.cmu.edu.cn。

1.2 实验动物分组及染毒

选用中国医科大学实验动物中心提供初断乳健康 Wistar 大鼠 (合格证号: SCXK <辽>2008-0005), 48 只, 雌雄各半, 雌鼠体重 (60 ± 5) g, 雄鼠体重 (50 ± 5) g, 实验前适应性喂养 1 周。随机分成对照组和低 (100 ppm)、高 (200 ppm) 浓度 DMA^V 染毒组, 每组 16 只, 雌雄各半, 分笼喂养。用蒸馏水分别配制含 DMA^V 100 ppm 和 200 ppm 的水溶液, 各实验组大鼠自由饮用。对照组大鼠饮蒸馏水。DMA^V 水溶液每 24 h 新鲜配制。染毒 10 周。

1.3 实验方法

1.3.1 取材 染毒完成后水合氯醛麻醉取大鼠膀胱, 纵切成两半经 4% 多聚甲醛固定, 用于免疫组化。

1.3.2 免疫组化法观察大鼠膀胱上皮细胞 PCNA、cyclinD1、COX-2 表达情况 常规方法制石蜡切片, 按免疫组化试剂盒说明书进行表达水平检测。具体方法: 常规脱蜡至水化; 体积分数为 3% 的 H₂O₂ 室温孵育 10 min 以清除内源性过氧化物酶, 蒸馏水漂洗 5 min, 3 次; 微波法作抗原修复; 5% BSA 封闭, 室温 20 min; 甩去多余液体; 滴加 100 μl 的 1:100 稀释的一抗, 37℃, 30 min; PBS 漂洗 5 min, 3 次; 滴加生物素化的二抗, 37℃, 30 min; PBS 漂洗 5 min, 3 次; 滴加 SABC, 37℃, 30 min; PBS 漂洗 5 min, 3 次; DAB 显色, 棕黄色为阳性表达; 充分水洗; 苏木素轻度复染, 盐酸乙醇分化数秒后脱水; 透明中性树胶封片。用自动曝光显微照相系统照相, 每张切片随机取 10 个视野, 用 Metamorph PDP10PBX51 彩色病理图文分析系统对免疫组化的切片进行图像分析。PCNA、cyclinD1 在细胞核内表达, 通过计数细胞计算阳性表达率比较。COX-2 在胞质内表达通过测定平均吸光度 OD 比较。

1.4 数据处理

采用 SPSS13.0 统计软件进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同 DMA^V 染毒组大鼠一般状况

刚断乳大鼠染毒的 10 周内, 正处于生长发育阶段, 3 组大鼠的体重和饮水量均随时间而呈上升趋势, 但各组之间比较差异均无统计学意义, 活动及一般状况均正常。

2.2 DMA^V 对大鼠膀胱上皮细胞 PCNA、cyclinD1、COX-2 表达的影响

由图 1~3 可见, 对照组膀胱上皮细胞不表达 PCNA 和 cy-

clinD1, 染毒组细胞核可见明显的阳性表达。对照组膀胱上皮细胞不表达 COX-2, 200 ppm 染毒组中可见细胞质中表达明显增强。由表 1 可见, 染毒后 PCNA 的表达显著高于对照组 ($P < 0.01$), 100 ppm 染毒组达到最高。cyclinD1 的表达呈上升

趋势, 各染毒组 cyclinD1 的表达显著高于对照组 ($P < 0.01$), 200 ppm 染毒组达到最高。COX-2 在 200 ppm 组显著升高, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

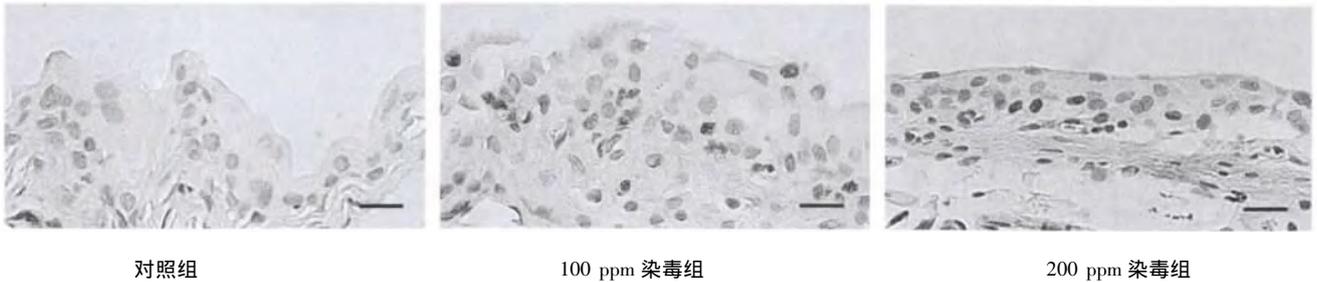


图 1 各组大鼠膀胱上皮细胞 PCNA 表达结果 (免疫组化法, 标尺 = 20 μm)

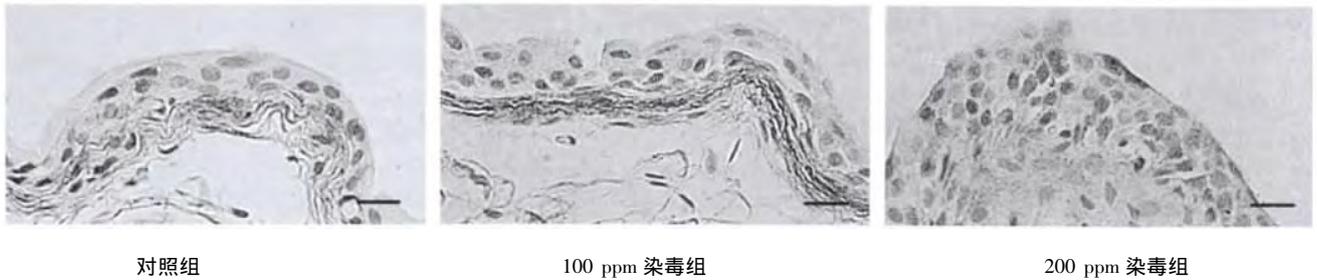


图 2 各组大鼠膀胱上皮细胞 cyclinD1 表达结果 (免疫组化法, 标尺 = 20 μm)

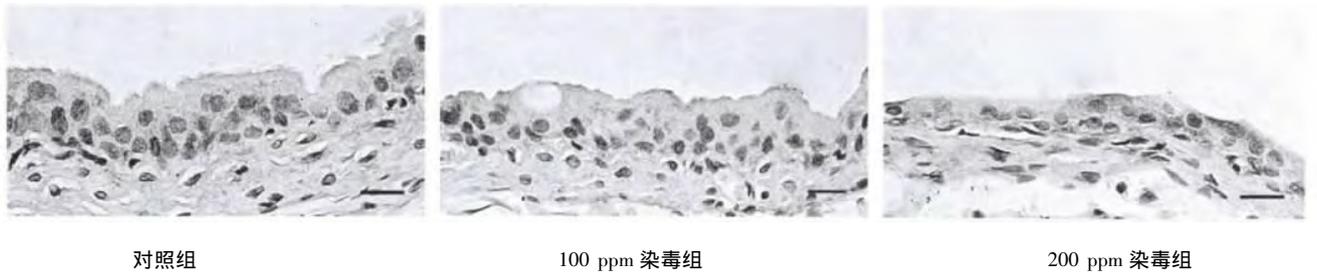


图 3 各组大鼠膀胱上皮细胞 COX-2 表达结果 (免疫组化法, 标尺 = 20 μm)

表 1 DMA^V 对大鼠膀胱上皮细胞 PCNA、cyclinD1、COX-2 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	PCNA (%)	cyclinD1 (%)	COX-2 (OD)
对照组	0	0	0.206 ± 0.009
100 ppm 染毒组	3.901 ± 1.076 **	12.073 ± 6.886 **	0.202 ± 0.008
200 ppm 染毒组	2.271 ± 0.833 **	18.468 ± 6.038 **	0.213 ± 0.009 *

注: %, 视野内阳性表达的膀胱上皮细胞个数占总膀胱上皮细胞个数的百分比。OD, 膀胱上皮细胞阳性反应平均吸光度。与对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

膀胱上皮细胞增殖被认为是 DMA^V 致膀胱癌发生的机制之一。PCNA 是与细胞增殖、DNA 复制密切相关的因子^[6], PCNA 的含量在细胞周期 G1 期开始增加, S 期早期达到高峰, 是评价细胞增殖状态的一个指标^[7]。细胞周期素 D1 (cyclinD1) 是 G1 期细胞增殖信号的关键蛋白, 两者都是从增殖角度研究肿瘤发生机制的重要指标。本实验低、高剂量染毒组大鼠膀胱上皮细胞 PCNA 和 cyclinD1 表达量均升高。这与 Arnold^[5] 等发现的 100 ppm DMA^V 染毒 10 周引起大鼠膀胱上皮细胞 BrdU 指数升高相一致。即 100 ppm 和 200 ppm DMA^V 对

大鼠染毒 10 周, 大鼠膀胱上皮细胞已有促增殖作用。

COX-2 蛋白表达过多可通过多种作用机制促进肿瘤的形成。COX-2 可能通过促进细胞增殖、抑制细胞凋亡、促进血管形成、增加肿瘤细胞侵袭、转移的潜能、调节免疫功能参与致癌物的代谢等机制, 参与肿瘤的发生和发展。大量证据表明 COX-2 在人膀胱癌组织中高表达^[8], COX-2 的表达程度与肿瘤级别和浸润深度有关^[9]。有文献报道, COX-2 不仅可在人和大鼠膀胱癌中高表达, 在瘤前病变和肿瘤周围形态正常但有轻微增生表现的组织中表达也有所升高。其表达水平的增加可能是肿瘤发生的一个早期事件。本实验中 200 ppm 染毒组大鼠膀胱上皮细胞中 COX-2 与对照组相比有轻微升高, 也进一步说明了 DMA^V 染毒大鼠 10 周已起到了促进大鼠膀胱上皮细胞增殖, 促进膀胱癌发生的作用。本研究提示大鼠亚慢性暴露 DMA^V 能够对膀胱上皮细胞产生促增殖作用。

参考文献:

[1] Hughes M F, Beck B D, Chen Y, et al. Arsenic exposure and toxicology: a historical perspective [J]. Toxicol Sci, 2011, 123 (2): 305-332.
 [2] Jomova K, Jenisova Z, Feszterova M, et al. Arsenic: toxicity, oxi-

- dative stress and human disease [J]. *Appl Toxicol*, 2011, 31 (2): 951-957.
- [3] Najukas M F, Anderson B, Ahsan H, *et al.* The broad scope of health effects from chronic arsenic exposure: update on a worldwide public health problem [J]. *Environ Health Perspect*, 2013, 121 (3): 295-302.
- [4] Seno H, Oshima M, Ishikawa T O, *et al.* Cyclooxygenase 2 and prostaglandin E (2) receptor EP (2)-dependent angiogenesis in APC (Delta716) mouse intestinal polyps [J]. *Cancer Res*, 2002, 62 (2): 506-511.
- [5] Arnold L L, Cano M, St John M, *et al.* Effects of dietary dimethylarsinic acid on the urine and urothelium of rats [J]. *Carcinogenesis*, 1999, 10: 2171-2179.
- [6] Kudo Y, Takata T, Ysui W, *et al.* Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor P27 is an indicator of malignant behavior in oral squamous cell carcinoma [J]. *Cancer*, 1998, 83 (2): 2447-2455.
- [7] Jares P, Fernandez P L, Campo E, *et al.* PRAD-1/cyclinD1 gene amplification correlates with messenger RNA over expression and tumor progression in human laryngeal carcinomas [J]. *Cancer Res*, 1994, 54 (17): 4813-4817.
- [8] Hara S, Kondo Y, Matsuzawa I, *et al.* Expression of cyclooxygenase-2 in human bladder and renal cell carcinoma [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2002, 507: 123-126.
- [9] Gurocak S, Sozen S, Erdem O, *et al.* Relation between cyclooxygenase-2 expression and clinicopathologic parameters with patient prognosis in transitional cell carcinoma of the bladder [J]. *Urol Int*, 2006, 76: 51-56.

Prxs 蛋白在矽尘致肺纤维化中的作用

Role of protein Prxs in pulmonary fibrosis caused by silica dust

张志敏, 张艳淑, 关维俊, 孟春燕, 姚林

(河北联合大学公共卫生学院, 河北 唐山 063000)

摘要: 采用 Western blot 方法检测不同剂量矽尘染毒 28 d 大鼠肺组织中 Prxs I 和 Prxs VI 蛋白的表达水平, 同时用试剂盒检测肺组织中抗氧化酶活性并进行肺组织病理观察。结果显示随着矽尘染毒剂量增加, H₂O₂ 及羟脯氨酸 (HYP) 的含量逐渐增加, CAT 及 GSH-Px 的活性逐渐降低。Prxs I 和 Prxs VI 蛋白含量随着染尘剂量的增加有不同程度的降低。结果表明 Prxs 蛋白可能参与矽尘暴露导致的肺纤维化。

关键词: 矽肺; 硫氧还原蛋白过氧化物酶 (Prxs); 肺纤维化; 氧化损伤

中图分类号: R135.2 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2014)05-0362-03

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2014.05.017

氧化抗氧化平衡失调是目前矽尘致肺组织纤维化的机制之一^[1]。游离 SiO₂ 粉尘可损伤肺巨噬细胞, 产生大量的活性氧 (ROS), 主要包括 O₂⁻、H₂O₂、OH⁻; 体内的抗氧化酶主要有过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx)、硫氧还原蛋白过氧化物酶 (peroxiredoxins, Prxs) 等。Prxs 蛋白^[2,3]是新近发现的一类过氧化物酶, 属于抗氧化蛋白超家族, Prxs 蛋白不仅参与自由基的清除, 还参与细胞的增殖分化及细胞信号转导^[4]、保护自由基敏感蛋白、增强 NK 细胞的活性^[5,6]。哺乳动物中 Prxs 家族包括 6 个成员, Prxs I 蛋白在多种组织中表达, 在氧化应激及某些恶性肿瘤细胞中表达显著增高^[7]; Prxs VI 在肺脏中表达最高, 其基因高表达可减

少转基因小鼠腹膜巨噬细胞中的 H₂O₂ 的生成^[8]。本课题拟探讨 Prxs I 和 Prxs VI 在矽肺发病中的作用, 进一步弄清矽尘致肺纤维化的分子机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 32 只, 体重 180~220 g, 北京维通利华实验动物有限公司提供 [合格证号: SCXK (京) 2006-0009], 根据体重随机分成 4 组, 即对照组、染尘组 (12.5 mg/ml 低剂量组、25 mg/ml 中剂量组、50 mg/ml 高剂量组), 每组 8 只。采用非暴露式气管内注入法染尘, 对照组大鼠经气管注入无菌生理盐水 1 ml, 染尘组大鼠分别经气管注入 12.5 mg/ml、25 mg/ml 和 50 mg/ml 二氧化硅混悬液 1 ml, 28 d 后处死大鼠取材。

1.2 主要实验试剂

二氧化硅粉尘购自 Sigma, CAT、H₂O₂、GSH-Px (谷胱甘肽过氧化物酶) 和 HYP (羟脯氨酸) 试剂盒均购自南京建成生物技术有限公司, Prxs I 和 Prxs VI 的一抗购自 Santa cruz Blotechnology, Prxs I 和 Prxs VI 的二抗以及 β-actin 抗体均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 肺组织中 Prxs I 和 Prxs VI 检测

采用质量分数为 12% 的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 进行电泳, Western blot 定量检测 Prxs I 和 Prxs VI 蛋白的表达水平。Prxs I 和 Prxs VI 的一抗稀释浓度均为 1:500, 二抗稀释浓度为 1:1000, 采用 Fluor Chem HD2 凝胶成像系统采集图像并获得各蛋白条带灰度值。以 Prxs I 和 Prxs VI 的灰度值与各自的内参蛋白 (β-actin) 的灰度值之比, 计算其相对表达水平。

1.4 肺组织中抗氧化酶活性和 HYP、H₂O₂ 含量检测

用试剂盒检测肺组织中 CAT、GSH-Px 的活性以及 HYP、

收稿日期: 2013-12-18; 修回日期: 2014-03-10

基金项目: 河北省应用基础研究项目 (编号: 11966120D); 河北省科技支撑项目 (编号: 02976194D)

作者简介: 张志敏 (1987-), 女, 硕士在读, 研究方向: 分子毒理学。

通讯作者: 姚林, E-mail: yaolin766@163.com。