

长时间低浓度暴露亚砷酸钠促进人正常膀胱上皮细胞增殖

Long time and low concentration exposure of sodium arsenite promotes human bladder epithelial porliferation

王晨, 王菲, 刘盛男, 曹思奇, 席淑华

(中国医科大学公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 以不同浓度亚砷酸钠 (NaAsO₂) (0、0.1、0.5、1.0 μmol/L) 对人正常膀胱上皮细胞 (SV-HUC-1) 进行长期染毒, 采用四甲基偶氮唑 (MTT) 比色法检测细胞活力。未经砷染毒的 SV-HUC-1 进行长期传代培养, 细胞增殖活力没有发生任何改变; 0.1、0.5 μmol/L NaAsO₂ 处理 20 代后, 细胞增殖活性显著增高, 并呈剂量-反应增高趋势 ($r=0.632$ 、 $P<0.01$, $r=0.939$ 、 $P<0.01$), 而 1.0 μmol/L NaAsO₂ 处理的细胞其增殖活力未随染毒时间而发生变化 ($P>0.05$)。提示长时间低浓度暴露 NaAsO₂ 可以促进 SV-HUC-1 增殖。

关键词: NaAsO₂; SV-HUC-1 细胞; 增殖

中图分类号: R-332 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2015)03-0195-02

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2015.03.012

砷是环境致癌物质, 可通过消化道、呼吸道和皮肤等途径接触到砷化合物。本研究采用慢性砷暴露的体外细胞模型, 对人正常膀胱上皮细胞 (SV-HUC-1) 做长期砷染毒处理, 探究慢性砷暴露能否导致细胞增殖, 为进一步了解低浓度长期砷暴露所致人膀胱上皮细胞恶性转化的分子机制提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

超净工作台, 江苏苏净集团公司; 150 型二氧化碳恒温培养箱, 荷兰 Heraeus 公司; TS 100 型倒置荧光显微镜, 日本 Nikon 公司; Multiskan Ascent 354 型酶标仪, 芬兰 Labsystems 公司。NaAsO₂ (分析纯), 美国 Fluka 公司; F12K 培养基, 美国 Sigma 公司; 胎牛血清 (FBS), 德国 Biochrom 公司; 磷酸盐缓冲液 (PBS), 美国 Sigma 公司; 青霉素、链霉素, 美国 Invitrogen 公司; 胰蛋白酶, 美国 Hyclone 公司; 四甲基偶氮唑 (MTT)、二甲基亚砜 (DMSO), 美国 Sigma 公司。

1.2 细胞培养与染毒

SV-HUC-1 系人正常尿路上皮细胞株 (购自美国典型菌种

保藏中心 ATCC, 编号: CRL-9520), 于 95% 空气、5% CO₂、37℃ 条件下常规培养于 F12K 完全培养基 (10% 胎牛血清, 1×10⁵ U/L 青霉素, 100 mg/L 链霉素)。隔天换液, 待细胞生长至 85%~90% 融合后, 以 0.25% 胰蛋白酶消化传代, 一般以 1:3 传代培养。细胞以 1×10⁵ 个/ml 的密度在 25 cm² 细胞培养瓶中培养, 待细胞生长铺满培养瓶底面 80% 后, 换液, 以 F12K 完全培养基配制不同浓度的 NaAsO₂ 溶液, 进行细胞慢性染毒。

1.3 细胞活力 MTT 法检测

将不同染砷浓度、不同代数细胞接种于 96 孔培养板, 并设空白对照组 (不含细胞的培养液), 于 5% CO₂、37℃ 培养箱中常规培养, 待细胞贴壁正常生长, 每孔加入 MTT 溶液, 孵育 4 h, 弃去含 MTT 的液体, 加入 DMSO 显色, 震荡 10 min, 立即用酶标仪在 490 nm 处测定各孔的光密度 (OD) 值。细胞活力用 MTT 还原率表示, 活力越强, MTT 的还原率越高。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 13.0 for Windows 软件进行数据的统计分析。采用单因素方差分析 (ANOVA) 比较各实验组与对照组间的统计学差异, 组间两两比较采用 LSD 检验, 以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

对 SV-HUC-1 进行长期传代培养, 细胞经 10、20、30 和 40 代培养后, 细胞增殖活力没有发生任何改变。选用 0.1、0.5、1.0 μmol/L NaAsO₂ 对 SV-HUC-1 进行长期染毒, 结果显示 0.1、0.5 μmol/L NaAsO₂ 处理细胞 20 代后, 细胞增殖活性显著升高, 并随代数的增加活性呈现增高趋势 ($r=0.632$, $P<0.01$; $r=0.939$, $P<0.01$), 染毒 40 代的细胞增殖活性最高, 特别是 0.5 μmol/L NaAsO₂ 处理的细胞在培养 40 代后其活力是对照组的 2.74 倍。1.0 μmol/L NaAsO₂ 处理的细胞其增殖活力并未随染毒时间而增高, 不同代数之间未见统计学差异 ($P>0.05$)。见表 1。

表 1 NaAsO₂ 长期染毒不同时间对 SV-HUC-1 细胞增殖能力的影响

组别	染毒前	第 10 代	第 20 代	第 30 代	第 40 代
对照组		1.00±0.03	1.03±0.08	1.07±0.10	1.05±0.07
0.1 μmol/L 染毒组	1.00±0.22	1.04±0.14	1.27±0.28*	1.27±0.18*	1.47±0.21**
0.5 μmol/L 染毒组	1.00±0.15	1.19±0.17	1.72±0.19**	2.48±0.26**	2.75±0.33**
1.0 μmol/L 染毒组	1.00±0.15	1.00±0.15	0.81±0.08	1.10±0.25	1.16±0.10

注: 与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

3 讨论

砷是国际癌症研究署 (IARC) 确认的人类致癌物, 可以引起皮肤癌、肺癌、肝癌、膀胱癌等, 其致病机制目前仍不

清楚。大量研究表明砷及其甲基代谢产物作为助癌剂一定程度上参与了信号转导通路的启动,促进细胞增殖、减少抗增殖信号及对细胞分裂检查位点的控制^[1]。本研究发现未经处理的 SV-HUC-1 增殖能力不随生长代数增长,即排除了细胞代数增长对细胞增殖活力的影响。染毒 0.1、0.5 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 处理细胞 20 代后,细胞增殖活性显著升高;染毒 40 代的细胞增殖活性最高,说明长时间低浓度暴露亚砷酸钠可以促进 SV-HUC-1 增殖。1.0 $\mu\text{mol/L}$ NaAsO_2 处理的细胞其增殖活力并未随染毒时间而增高,说明长时间较高浓度暴露 NaAsO_2 对 SV-HUC-1 无促进增殖作用。近年来,低水平砷的生物作用效应机制研究备受关注。长期低剂量砷暴露促进人和啮齿类动物细胞增殖^[2],而国内外已有研究报道 NaAsO_2 对细胞增殖具有双向效应。研究表明,低浓度(0.1、0.5 $\mu\text{mol/L}$)的亚砷酸盐暴露可以促进细胞增殖,但高浓度(5.0、10.0 $\mu\text{mol/L}$)暴露则会抑制细胞增殖^[3]。Lee 等^[4]报道亚砷酸盐和砷酸盐能增加细胞克隆形成数,呈倒 U 形生长曲线,且畸变率比对照低;孙鲜策等^[5]报道 NaAsO_2 在小于 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时引起人皮肤永生生化角质细胞增殖,当大于 10.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时引起该细胞增殖力降低。本实验观察引起 SV-HUC-1 细胞明显增殖的 NaAsO_2 浓度曲线趋势与其他实验和流行病学研

究报道的曲线形态相近,说明低剂量 NaAsO_2 在一定条件下利于细胞生长,而达到较高浓度时,细胞增殖现象不明显。

参考文献:

- [1] Nagy J A, Vasile E, Feng D, *et al.* Vascular permeability factor vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis [J]. *Exp Med*, 2002, 196 (11): 1497-1506.
- [2] Yu Hsin-Su, Liao Wei-Ting, Chai Chee-Yin. Arsenic carcinogenesis in the skin [J]. *Journal of Biomedical Science*, 2006, 13 (5): 657-666.
- [3] He Xiao-Qing, Chen Rui, Yang Ping, *et al.* Biphasic effect of arsenite on cell proliferation and apoptosis is associated with the activation of JNK and ERK1/2 in human embryo lung fibroblast cells [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2007, 220 (1): 18-24.
- [4] Lee T C, Oshimura M, Barrett J C. Comparison of arsenic-induced cell transformation, cytotoxicity, mutation and cytogenetic effects in Syrian hamster embryo cells in culture [J]. *Carcinogenesis*, 1985, 6 (10): 1421-1426.
- [5] 孙鲜策,孙贵范,王璐,等.亚砷酸钠对角质形成细胞增殖力和细胞周期的影响[J].*中华劳动卫生职业病杂志*, 2004, 22 (3): 219-220.

亚砷酸钠对小胶质细胞增殖活力和 NO 分泌的影响

Effect of sodium arsenite on proliferative activity and NO secretion in BV-2 microglia cells

郭丽¹, 颜凌², 王菲², 刘盛男², 席淑华², 周璐³

(1. 沈阳医学院基础医学院, 辽宁 沈阳 110034; 2. 中国医科大学公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110001; 3. 沈阳医学院基础医学院 2013 级医学检验, 辽宁 沈阳 110034)

摘要: 分别用浓度 0、1、2、4、8、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 的亚砷酸钠(NaAsO_2)处理小鼠小胶质细胞(BV-2), 24 h 后四甲基偶氮唑(MTT)法检测细胞增殖活力, 硝酸还原酶法检测培养液中 NO 含量。结果显示, BV-2 细胞染毒 24 h 后, 所有砷处理组的细胞增殖活力均显著降低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。各砷处理组的细胞培养液中 NO 含量均显著低于对照组, $P < 0.01$ 。提示砷可对小胶质细胞产生毒性作用。

关键词: 亚砷酸钠(NaAsO_2); 小胶质细胞; 增殖活力; 一氧化氮(NO)

中图分类号: R-332 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2015)03-0196-02

DOI: 10.13631/j.cnki.zgggyx.2015.03.013

砷是国际癌症研究署(IARC)确认的人类致癌物。砷中毒可累及多器官系统,如呼吸系统、消化系统、循环系统、外周血管病变以及外周及中枢神经系统。砷对中枢神经系统的损害作用已受到众多学者的高度重视。目前的研究主要集中在砷对中枢神经递质的影响,对脑组织的氧化性损伤,以

及诱导细胞凋亡等。

小胶质细胞(microglia, MG)属于单核吞噬细胞系统^[1],广泛分布在中枢神经系统,被称为神经系统的免疫细胞,约占胶质细胞数目的 10%~20%,在神经元的生理活动中起着支持、营养、保护及修护等重要功能,具有提呈抗原、分泌细胞因子、吞噬病原体 and 坏死组织的作用,是神经系统不可缺少的成分^[2]。砷可通过血脑屏障进入中枢神经系统,是否对小胶质细胞及其功能产生影响尚不清楚。因此,本研究对 NaAsO_2 对小胶质细胞的增殖活力和 NO 分泌情况进行了检测。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

CO_2 恒温培养箱(荷兰 Heraeus 公司),倒置显微镜(Nikon 公司),Multiskan Ascent 354 型酶标仪(芬兰 Labsystems 公司), NaAsO_2 (美国 Fluka 公司),胎牛血清(FBS,德国 Biochrom 公司),青霉素、链霉素(美国 Invitrogen 公司),胰蛋白酶、MTT(美国 Hyclone 公司),一氧化氮(NO)测试盒(南京建成生物公司)。

1.2 细胞培养与分组

小鼠小胶质细胞(BV-2)由中国协和医科大学基础医学

收稿日期: 2014-12-24; 修回日期: 2015-04-27

作者简介: 郭丽(1962—),女,高级实验师,从事环境污染物质毒性作用研究。