· 实验研究 ·

白藜芦醇对镍染毒 NIH/3T3 细胞 COX-2 mRNA 表达影响的实验研究

Experiment research on the effect of resveratrol on the expression of COX-2 mRNA in nickel infected NIH/3T3 cell

辛芮，王玥，李昶，周艾佳，杨越，付瑶，吴永会

（哈尔滨医科大学公共卫生学院劳动卫生与职业病学教研室，黑龙江 哈尔滨　150081）

摘要：研究白藜芦醇对镍染毒小鼠胚胎成纤维细胞（NIH/3T3）损伤的保护作用。将 NIH/3T3 细胞分为镍染毒组和白藜芦醇干预组，染毒组给予终浓度分别为 0.00、100.00、200.00、400.00 μg/ml 的三氧化二镍（Ni_2O_3）混悬液。干预组在染毒前加入白藜芦醇溶液（终浓度为 20 μmol/L）预处理 2 h，其他处理与染毒组一致。采用 MTT 法检测细胞生长抑制率；实时定量 PCR（real time PCR，RT-PCR）法检测细胞中环氧合酶-2（COX-2）mRNA 的表达水平。结果显示，随着染毒浓度的升高，染毒组和干预组细胞生长抑制率均明显增加。在 Ni_2O_3 染毒浓度 100.00、200.00、400.00 μg/ml 时，干预组抑制率均低于染毒组，差异有统计学意义（$P<0.05$）；干预组 COX-2 mRNA 相对表达量分别为 4.18±0.18、5.25±1.10、7.34±0.96。干预组 COX-2 基因相对表达量均低于染毒组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。提示，随着镍染毒浓度的增加，NIH/3T3 细胞损伤程度增加，COX-2 mRNA 表达水平增高，白藜芦醇对镍所致的细胞损伤具有一定的保护作用。

关键词：镍；COX-2；白藜芦醇

中图分类号：R995　　**文献标识码**：B

文章编号：1002-221X(2017)01-0036-03

DOI：10.13631/j.cnki.zggyyx.2017.01.011

镍（nickel，Ni）是机体必需的微量元素，具有许多生物学作用，但过多的镍进入机体则会引发相应的功能性、器质性损伤。工业上常见的镍化合物有三氧化二镍（Ni_2O_3）、氢氧化镍[$Ni(OH)_2$]、硫酸镍（Ni_2SO_4）等。研究发现肺癌、鼻咽癌发病率的增加与职业性接触镍化合物密切相关[1]。已有研究证实镍化合物可以导致细胞凋亡及肿瘤发生[2]，但是目前镍化合物的毒作用机制尚不完全明确[3]。白藜芦醇（resveratrol，3,4',5-trihydroxystilbene，Rsv）是一种天然非黄酮多酚类化合物，是被广泛研究的不对称且具有特定构型的二苯乙烯衍生物。有文献报道[4]，白藜芦醇可以起到抗炎、抗氧化、预防癌症等作用。环氧化酶（cyclooxygenase，COX）是前列腺素合成途径中主要的限速酶之一，参与炎症、发热、出凝血等病理生理过程。COX-2 是其同工酶之一，在肿瘤发生、发展、转移、凋亡抑制及促进肿瘤血管生成等方面发挥重要作用，已成为肿瘤防治的一个新靶点[5]。近年来，有研究表明 COX-2 的高表达与非小细胞肺癌的发生、发展密切相关[6]。本研究采用白藜芦醇进行干预，通过观察三氧化二镍（Ni_2O_3）在体外诱导小鼠成纤维细胞（NIH/3T3）发生损伤后细胞中 COX-2 mRNA 表达水平的变化，探讨白藜芦醇对镍染毒细胞是否具有保护作用，为镍暴露职业人群健康的保护提供依据。

1　材料与方法

1.1　主要试剂及仪器

三氧化二镍（Ni_2O_3，分析纯）、白藜芦醇药品（纯度 99%）、噻唑蓝（MTT），美国 Sigma 公司；胎牛血清，杭州四季青公司；胰蛋白酶，碧云天生物技术研究所；琼脂糖，西班牙 Biowest 公司；RT-PCR 试剂盒，北京康为世纪有限公司。

二氧化碳培养箱、低温高速离心机，美国 Thermo 公司；酶标仪，美国 Bio-Tech 公司；电泳仪，北京凯元信瑞仪器有限公司；实时荧光 PCR 仪，上海宏石医疗科技有限公司。

1.2　细胞培养

小鼠胚胎成纤维细胞（NIH/3T3）由北京市肿瘤研究所提供，细胞接种于 DMEM 培养液中（含 10%胎牛血清，1%双抗），培养于 37℃、5% CO_2 培养箱中，胰蛋白酶消化液消化，传代备用。

1.3　实验分组

将 NIH/3T3 细胞分为染毒组和白藜芦醇干预组。染毒组给予终浓度分别为 0.00、100.00、200.00、400.00 μg/ml 的 Ni_2O_3 混悬液，染毒时间为 24 h。干预组在染毒前加入白藜芦醇溶液［二甲基亚砜（DMSO）配制，终浓度为 20 μmol/L］预处理 2 h，其他处理与染毒组一致。

1.4　细胞生长抑制率的 MTT 法检测

将 NIH/3T3 细胞接种于 96 孔板中，每个浓度组设 6 个复孔，处理 20 h 后，每孔加入 MTT 液（5 mg/ml）20 μl，在 37℃、5% CO_2 条件下继续培养 4 h，弃去每孔内液体，加入 DMSO 150 μl，37℃避光振荡孵育 15 min，在酶标仪 490 nm 波长下测定各孔吸光度（A）值，计算细胞相对生长抑制率。

$$细胞相对生长抑制率=\frac{1-染毒组\ A\ 值}{空白对照组\ A\ 值}\times 100\%$$

1.5　总 RNA 提取和 RT-PCR 检测

应用 Trizol 法提取细胞总 RNA，并通过 260/280 nm 对

收稿日期：2016-06-21；**修回日期**：2016-10-08

基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：81372965）

作者简介：辛芮（1991—），女，硕士研究生。

通信作者：吴永会，教授，研究方向：工业致癌物致癌机制的研究，E-mail：wuyonghui777@163.com。

RNA 质量进行评价。将总 RNA 反转录合成 cDNA 并进行扩增，以 β-actin 为内参，对 COX-2 mRNA 水平进行分析。25 μl PCR 反应体系：RNase-Free Water 10.5 μl，引物 F 和 R 1 μl，cDNA 模板 1 μl，SYBR Mix 12.5 μl。PCR 反应条件：95℃ 预变性 5 min，35 次循环（95℃ 15 s，60℃ 1 min）。溶解曲线分析条件：95℃ 15 s，60℃ 1 min，95℃ 15 s，60℃ 15 s。COX-2 引物序列：上游 5'-TGGAGGCGAAGTGGGTTTTA-3'，下游 5'-GAGTGGGAGGCACTTGCATT-3'；β-actin 引物序列：上游 5'-ACTGCCGCATCCTCTTCCT-3'，下游 5'-TCAACGTCACACTTCATGATGGA-3'。所有样本均重复检测 3 次，计算扩增循环数（*Ct*）值，各基因 mRNA 相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算分析。

1.6　统计分析

所有数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计分析，染毒组及干预组组内不同染毒浓度采用单因素方差分析及相关分析；相同染毒浓度下染毒组与干预组之间比较采用 *t* 检验，以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　各组 NIH/3T3 细胞生长抑制率的比较

由表 1 可见，在 Ni_2O_3 浓度为 100.00、200.00、400.00 μg/ml 时，染毒组和干预组的细胞相对抑制率均高于空白组（0.00 μg/ml），差异有统计学意义（$P<0.05$）。相关分析显示，染毒组和干预组内不同 Ni_2O_3 浓度与细胞生长抑制率呈正相关，且差异具有统计学意义（$r_{染毒组}=0.999\ 0$，$r_{干预组}=0.996\ 0$，$P<0.05$）。在相同 Ni_2O_3 浓度时，干预组细胞相对抑制率均低于染毒组，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。

表 1　各组 NIH/3T3 细胞生长的相对抑制率

组别	Ni_2O_3 浓度（μg/ml）	相对抑制率(%)
染毒组	0.00	0.00
	100.00	13.91[a]
	200.00	31.74[a]
	400.00	65.22[a]
干预组	0.00	1.02
	100.00	12.11[bc]
	200.00	31.05[bc]
	400.00	54.74[bc]

注：a，与 0.00 μg/ml 染毒组比较，$P<0.05$；b，与 0.00 μg/ml 干预组比较，$P<0.05$；c，与同剂量染毒组比较，$P<0.05$。

2.2　白藜芦醇对镍染毒 NIH/3T3 细胞中 COX-2 mRNA 表达水平的影响

由表 2 可见，染毒组与干预组 NIH/3T3 细胞中 COX-2 mRNA 的表达量均随着镍染毒浓度的增加而增加，与空白组（0.00 μg/ml）比较，差异具有统计学意义（$F_{染毒组}=44.23$，$F_{干预组}=78.24$，$P<0.05$）。相关分析显示，染毒组和干预组内不同 Ni_2O_3 浓度与 COX-2 mRNA 相对表达量呈正相关，且差异有统计学意义（$r_{染毒组}=0.968\ 0$，$r_{干预组}=0.978\ 0$，$P<0.05$）。

对相同浓度不同组别进行比较，镍染毒浓度为 0.00 μg/ml 时，干预组 COX-2 mRNA 相对表达量高于染毒组，在 Ni_2O_3 浓度为 100.00、200.00、400.00 μg/ml 时，干预组 COX-2 mRNA 相对表达量均低于染毒组，差异有统计学意义（$P<0.05$）。

表 2　各组 NIH/3T3 细胞中 COX-2 mRNA 表达水平（$n=3$，$\bar{x}\pm s$）

组别	Ni_2O_3 浓度（μg/ml）	相对表达量
染毒组	0.00	1.00±0.00
	100.00	7.92±0.80[a]
	200.00	9.95±1.78[a]
	400.00	15.63±2.47[a]
干预组	0.00	1.45±0.44
	100.00	4.18±0.20[bc]
	200.00	4.92±0.80[bc]
	400.00	7.67±0.40[bc]

注：a，与 0.00 μg/ml 染毒组比较，$P<0.05$；b，与 0.00 μg/ml 干预组比较，$P<0.05$；c，与同剂量染毒组比较，$P<0.05$。

3　讨论

镍广泛应用于电镀、电铸、电焊等工业过程中。目前认为，肺部和皮肤是镍暴露的主要靶器官[7]。国际癌症研究中心（IARC）于 1990 年正式确定镍化合物中的硫化镍（Ni_3S_2）和三氧化二镍（Ni_2O_3）为第 1 类致癌物[8]。白藜芦醇作为一种天然多酚类化合物，已被证实存在多种有益作用[4]。在本次实验中，经镍染毒后的 NIH/3T3 细胞，生长抑制率随着染毒浓度升高呈剂量依赖性增加。经白藜芦醇预处理的 NIH/3T3 细胞，生长抑制率有一定程度的降低，提示白藜芦醇对镍导致的细胞损伤有一定的保护作用。

COX-2 是炎症反应中的诱导型关键酶，一旦被诱导，可以导致大量的 PGE2 生成，引起炎症反应；COX-2 与癌症的发生发展密切相关，在正常组织中无表达，当细胞受到各种刺激因素（包括生长因子、细胞因子、炎性介质、促癌剂等）作用时，表达迅速上调；COX-2 在肺癌发生、发展、转移过程中的重要作用也被实验证实[9]。在本实验中，随着染毒剂量的升高，NIH/3T3 细胞中 COX-2 mRNA 表达量呈剂量依赖性增加，加入白藜芦醇干预后，干预组 COX-2 mRNA 的表达量均低于染毒组，且存在一定的剂量-反应关系，表明白藜芦醇可以对镍染毒 NIH/3T3 细胞中 COX-2 的产生起到抑制作用，为白藜芦醇保护机制的研究奠定了基础。有研究证实，白藜芦醇能通过抑制环氧合酶 COX 的活性而在肿瘤早期阶段起抑制作用[10]，这与本研究的结果一致。我们认为白藜芦醇可能通过下调 COX-2 mRNA 在 NIH/3T3 细胞中的表达来达到抗炎、延缓癌症进程的作用，而白藜芦醇发挥其保护作用的具体机制有待进一步研究。

本研究表明，镍染毒可增加 NIH/3T3 细胞的生长抑制率，同时细胞中 COX-2 mRNA 表达量也随之增加，而白藜芦醇的干预可以改善这种损伤情况，说明白藜芦醇对镍染毒引起的 NIH/3T3 细胞损伤具有一定的保护作用，并且其保护机制之一可能是通过下调 COX-2 mRNA 的表达来实现。本实验结果为白藜芦醇对抗镍的毒性作用的研究及镍暴露职业工人呼吸系统炎症与肿瘤的预防提供了新的思路。

参考文献：

[1] Castorina A，Giunta S. Mucin 1（MUC1）signalling contributes to increase the resistance to cell death in human bronchial epithelial cellsexposed to nickel acetate [J]. Biometals，2014，27（6）：1149-1158.

[2] Freitas M，Gomes A，Porto G，*et al*. Nickel induces oxidative burst，NF-kB activation and interleukin-8 production in human neutrophils [J]. J Biol Inorg Chem，2010，15（8）：1275-1283.

[3] 刘静，程宁. 镍化合物细胞毒理学研究的某些进展 [J]. 工业卫生与职业病，2010，36（5）：306-309.

[4] Szaefer H，Cichocki M，Krajka-Kuźniak V，*et al*. The effect of resveratrol and its methylthio-derivatives on NF-κB and AP-1 signaling pathways in HaCaT keratinocytes [J]. Pharmacological Reports，2014，66（5）：732-740.

[5] 向阳，孙敏，王和勇. COX-2 及其抑制剂在肿瘤防治中的作用 [J]. 生命科学，2008，20（1）：81-85.

[6] Chi F，Wu R，Jin X，*et al*. HER2 induces cell proliferation and invasion of non-small-cell lung cancer by upregulating COX-2 expression via MEK/ERK signaling pathway [J]. Oncotargets & Therapy，2016，9：2709-2716.

[7] Uppala R，McKinney R W，Brant K A，*et al*. Nickel inhibits mitochondrial fatty acid oxidation [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications，2015，463（4）：806-810.

[8] International Agency for Research on Cancer（IARC），Nickel and nickel compounds，Summaries & Evaluations [R]. 1990，49：257.

[9] 宋文静，王新允，郑宏伟. 人类肺癌组织中 COX-2 的表达及其与 K-ras 和 Mcl-1 表达的关系 [J]. 中国肺癌杂志，2009，12（3）：216-221.

[10] Banerjee S，Buesoramos C，Aggarwal B B. Suppression of 7，12-Dimethylbenz（*a*）anthracene-induced mammary carcinogenesis in rats by resveratrol：role of nuclear factor-kappaB，cyclooxygenase 2，and Matrix Metalloprotease 9 [J]. Cancer Research，2002，62（17）：4945-4954.

· 短篇报道 ·

工业性角膜异物剔除术后重组人表皮生长因子滴眼液的临床疗效观察

任洪芹

[北京市延庆区医院（北京大学第三医院延庆医院），北京 延庆　102100]

关键词：角膜异物；重组人表皮生长因子

中图分类号：R135.92　　**文献标识码**：C

文章编号：1002-221X(2017)01-0038-01

DOI：10.13631/j.cnki.zggyyx.2017.01.012

工业性角膜异物是我院眼科门急诊常见的眼外伤，以金属性异物——铁屑最为常见。我院于角膜异物剔除术后联合应用重组人表皮生长因子和盐酸左氧氟沙星滴眼液，取得满意疗效，现报告如下。

1　资料与方法

1.1　临床资料

2015 年 1—12 月于我院门急诊就诊的工业性角膜异物患者 98 例 98 只眼，均为单眼异物。其中男性 95 例、女性 3 例，年龄 21~62（平均 35±2）岁。患眼异物均未超出角膜基质层的前 1/2。根据随机数字表法将患者分为治疗组（49 例）和对照组（49 例），两组患者在年龄、性别等一般资料差异无统计学意义，具有可比性。

1.2　治疗方法

所有患者均使用盐酸奥布卡因滴眼液进行表面麻醉，于裂隙灯显微镜下使用 1 ml 一次性注射器针头剔除角膜异物。剔除术后，治疗组患者应用重组人表皮生长因子和盐酸左氧氟沙星滴眼液滴眼 4 次/d，对照组患者仅用盐酸左氧氟沙星滴眼液滴眼 4 次/d。告知患者 3 d 后眼科门诊复查。

1.3　疗效标准

根据患者临床表现及角膜荧光素染色情况判定疗效。治愈：患眼疼痛、异物感、羞明流泪等症状消失，角膜创面基本愈合，荧光素染色阴性；显效：患眼临床症状显著减轻，角膜创面修复>50%，荧光素染色阴性或“+”；好转：患眼临床症状减轻，角膜创面修复 25%~50%，荧光素染色“+”或“++”；无效：患眼临床症状无好转或加重，角膜荧光素染色与治疗前无明显变化。

1.4　统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析，应用 χ^2 检验比较两组间的疗效差异，以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2　结果

治疗后 3 d 门诊复查，治疗组 49 例，治愈 41 例、显效 5 例、好转 3 例，治愈率为 83.7%；对照组 49 例，治愈 30 例、显效 7 例、好转 12 例，治愈率为 61.2%。两组治愈率比较，差异有统计学意义（$P<0.01$）。

3　讨论

当角膜受到损伤时，其周围组织细胞就会释放出内源性细胞生长因子（epidermal growth factor，EGF）用于促进和调节角膜上皮细胞、基质成纤维细胞和内皮细胞的增生、分化及移行，促进角膜损伤的愈合。并且重组人表皮生长因子（recombinant human epidermal growth factor，rhEGF）在修复过程中可促使角膜胶原纤维板层的排列更加接近正常人的合理排列趋势。但人体组织中的 EGF 含量普遍较低，因此应用外源性 rhEGF 以补充内源性 EGF 的不足，对于启动细胞增殖、加速创面修复有非常重要的临床意义[1]。

本次观察的治疗组患者角膜异物剔除术后，在使用盐酸左氧氟沙星滴眼液抗感染的基础上，应用重组人表皮生长因子滴眼液促进角膜上皮和基质的愈合，经药物治疗 3 d 后临床症状均有明显改善，且治愈率高于仅使用盐酸左氧氟沙星滴眼液的对照组，差异具有统计学意义（$P<0.01$）。重组人表皮生长因子滴眼液对眼表上皮细胞有促分裂再生的作用，可加速受损角膜上皮的愈合，其联合盐酸左氧氟沙星滴眼液可显著提高工业性角膜异物剔除术后的临床疗效。

参考文献：

[1] Stojanovic A，Chen X，Jin N，*et al*. Safety and efficacy of epithelium-on corneal collagen cross-linking using a multifactorial approach to achieve proper stromal riboflavin saturation [J]. J Ophthalmol，2012，2012：498435.

收稿日期：2016-06-19；**修回日期**：2016-07-14

作者简介：任洪芹（1986—），女，主治医师，从事眼科门急诊常见病的临床工作。