

## · 实验研究 ·

# 镍精炼烟尘对 NIH/3T3 细胞 NF- $\kappa$ B 表达及 iNOS、NO 分泌的影响

## Experimental study on effect of nickel-refining fume on expression of NF- $\kappa$ B and secretion of iNOS, NO in NIH/3T3 cells

秦汝男, 王玥, 夏冰, 王声远, 辛芮, 王芮, 吴永会

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

**摘要:** 将镍精炼烟尘配制成终浓度分别为 0.00、12.50、25.00、50.00、75.00、100.00  $\mu\text{g/ml}$  的混悬液, 处理小鼠胚胎成纤维细胞 (NIH/3T3) 24 h。CCK-8 法检测镍精炼烟尘的细胞毒性, 免疫印迹法 (Western blot) 检测核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 的蛋白表达水平, 分光光度法检测细胞上清液中诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 和一氧化氮 (NO) 的含量。NIH/3T3 细胞的生存率随镍精炼烟尘染毒浓度的增加而降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。镍精炼烟尘诱导 NIH/3T3 细胞 NF- $\kappa$ B 蛋白表达高于对照组, 诱导 NIH/3T3 细胞 iNOS 和 NO 分泌量增加, 且随染毒浓度的增加而增加, 差异均有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。提示镍精炼烟尘会致 NIH/3T3 细胞 NF- $\kappa$ B 活性增加, 进而诱导炎症因子 iNOS 和 NO 分泌量增加, 参与炎症的调控过程。

**关键词:** 镍精炼烟尘; 细胞毒性; 核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B); 诱导型一氧化氮合酶 (iNOS); 一氧化氮 (NO)

**中图分类号:** R994.3 **文献标识码:** B

**文章编号:** 1002-221X(2019)06-0468-03

**DOI:** 10.13631/j.cnki.zggyyx.2019.06.015

国际癌症研究机构 (IARC) 已将镍归类为致癌重金属<sup>[1]</sup>。研究显示镍职业性暴露会促进肿瘤发展<sup>[2]</sup>, 其中暴露于镍精炼烟尘的作业工人患肺癌的风险性极高<sup>[3]</sup>。但关于镍尘的具体致癌机制尚不明确。近年来, 炎症致癌的机制引起了学者们的关注, 并且有大量研究证实了炎症与癌症之间的关联<sup>[4]</sup>。其中, 核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 信号通路的作用机制是研究炎症致癌的重点。在真核细胞中普遍存在的 NF- $\kappa$ B 通过调控多种因子的表达参与炎症反应、肿瘤发生发展等过程<sup>[5]</sup>。长时间存在的活性氧 (ROS) 和 DNA 损伤是激活 NF- $\kappa$ B 的重要因素, 之前我们研究发现镍精炼烟尘会诱导氧化应激和 DNA 损伤, 但镍精炼烟尘能否激活 NF- $\kappa$ B 诱导炎症反应尚不清楚。诱导型一氧化氮合酶 (iNOS) 是炎症过程中 NF- $\kappa$ B 重要的靶基因。当免疫细胞受到炎症因子刺激时会通过 NF- $\kappa$ B 诱导 iNOS 转录表达增加, 经炎症循环持续产生大量 NO<sup>[6]</sup>, 诱导呼吸系统炎症和癌症等病理损伤。由 iNOS 调控合成的 NO 是

炎症反应中的一个关键信号<sup>[7]</sup>, 高浓度的 NO 可以通过激活 NF- $\kappa$ B 诱导炎症因子 (如 TNF- $\alpha$  和 IL-1 $\beta$ ) 的进一步表达, 形成正反馈, 进而加重炎症反应和癌症进展<sup>[8]</sup>。本研究将观察不同染毒浓度下镍精炼烟尘诱导小鼠胚胎成纤维细胞 (NIH/3T3) NF- $\kappa$ B 的蛋白表达水平, 检测炎症效应指标 iNOS 和 NO, 从炎症的角度探讨镍精炼烟尘的毒性作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 主要试剂及仪器

胎牛血清 (杭州四季青公司); 胰蛋白酶、CCK-8 试剂盒、BCA 试剂盒 (碧云天公司); NF- $\kappa$ Bp65 鼠源一抗和  $\beta$ -actin 兔源一抗 (美国 CST 公司); 山羊抗鼠二抗 (ZB-2305)、山羊抗兔二抗 (ZB-2301) (北京中杉金桥公司); NOS 试剂盒、NO 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 酶标仪 (美国 SpectraMax Plus384)。

#### 1.2 受试物

镍精炼烟尘取自某精炼炉的炉前沉降尘, 采用 ICP-MS 法进行成分分析, 镍精炼烟尘包括镍、钙、铝、锰、铬等多种金属成分, 其中金属镍含量高达 92.68%, 明显高于其他金属<sup>[6]</sup>。经玛瑙研钵研磨致 99% 的颗粒直径  $< 5 \mu\text{m}$ , 紫外灯照射灭菌后, 溶于磷酸盐缓冲液 (PBS) 中制备成混悬液母液, 依据预实验, 依次稀释成终浓度为 0.00、12.50、25.00、50.00、75.00、100.00  $\mu\text{g/ml}$  的粉尘混悬液。

#### 1.3 细胞培养

NIH/3T3 细胞购自北京市肿瘤研究所。接种于含有 10% 胎牛血清、1% 双抗的 DMEM 培养液中, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  条件下的细胞培养箱中培养。胰蛋白酶消化贴壁细胞, 经传代后备用。

#### 1.4 CCK-8 法检测细胞存活率

NIH/3T3 细胞接种于 96 孔板, 待细胞完全贴壁后按实验设计进行不同浓度染毒处理, 每组分别设 6 个复孔。染毒 24 h 后弃掉孔内液体, 每孔加入 10  $\mu\text{l}$  CCK-8 溶液。继续在培养箱中培养 2 h 后, 酶标仪 450 nm 波长处测定吸光度值, 计算细胞相对存活率。

#### 1.5 Western blot 检测 NF- $\kappa$ B 蛋白表达

收集经不同浓度镍精炼烟尘混悬液染毒 24 h 后的细胞, 用含有蛋白酶抑制剂的裂解液在低温环境下裂解 40 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  下 12 000 r/min 离心 10 min。BCA 法检测蛋白浓度。上样经凝胶电泳分离蛋白后转膜 60 min, 室温下 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,

收稿日期: 2019-01-04; 修回日期: 2019-03-14

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 81673138)

作者简介: 秦汝男 (1993—), 女, 硕士研究生。

通信作者: 吴永会, 教授, E-mail: wuyonghui777@163.com。

4℃一抗(NF-κB 1:1 000; β-actin 1:2 000)孵育过夜。洗膜后,37℃二抗孵育1 h。洗膜后,ECL底物化学发光显色液进行显色,曝光显影。利用Image J软件对条带进行灰度值分析,计算蛋白相对表达量。

### 1.6 炎症因子iNOS、NO分泌量测定

收集经不同浓度镍精炼烟尘混悬液染毒24 h后的细胞上清液,采用试剂盒测定细胞上清液中iNOS和NO的含量,分析镍精炼烟尘对NIH/3T3细胞iNOS和NO分泌量变化的影响。

### 1.7 统计分析

实验数据用均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用SPSS 17.0统计软件进行统计学分析,不同染毒浓度组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 镍精炼烟尘对NIH/3T3细胞存活率的影响

按实验设计不同浓度镍精炼烟尘混悬液处理NIH/3T3细胞24 h后,CCK-8法检测结果显示,染毒组的细胞存活率均低于对照组,且随染毒剂量的增加,细胞存活率以剂量依赖的方式下降,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表1。

### 2.2 镍精炼烟尘诱导NIH/3T3细胞NF-κB蛋白表达

与对照组相比,镍精炼烟尘染毒NIH/3T3细胞诱导NF-κB蛋白表达明显增加,见图1、2。且随染毒剂量的增加,细胞表达NF-κB蛋白水平也呈剂量依赖方式增加,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。

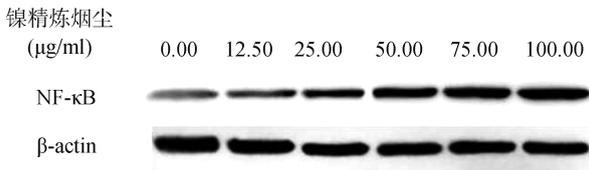
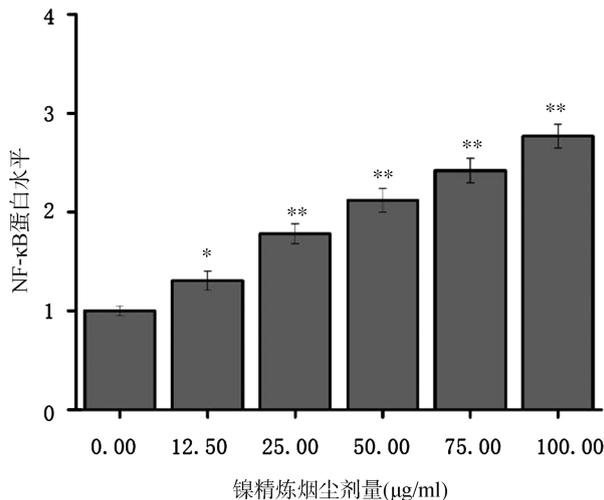


图1 各染毒剂量组NIH/3T3细胞中NF-κB蛋白表达水平



注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$

图2 各染毒剂量组NIH/3T3细胞中NF-κB蛋白灰度值

### 2.3 镍精炼烟尘对NIH/3T3细胞iNOS和NO分泌量的影响

镍精炼烟尘染毒NIH/3T3细胞后培养液中iNOS和NO的

水平显著提高,且以剂量依赖的方式随染毒剂量增加而增加,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),iNOS和NO的含量变化趋势一致。见表1。

表1 各染毒剂量组NIH/3T3细胞相对存活率及iNOS、NO分泌量的变化( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	浓度(μg/ml)	相对成活率(%)	iNOS(U/ml)	NO(μmol/L)
对照组	0.00	100.00	0.95±0.09	89.77±1.71
染毒组	12.50	72.63*	1.72±0.12*	133.26±2.25*
	25.00	64.18*	2.59±0.18*	189.69±2.15*
	50.00	57.29*	4.77±0.22*	243.08±5.23*
	75.00	48.11*	5.89±0.27*	276.47±6.12*
	100.00	35.27*	6.56±0.24*	298.64±6.38*

注:\*,与对照组比较, $P < 0.05$

## 3 讨论

本次研究即通过体外实验从炎症的角度对镍精炼烟尘毒性作用的分子机制进行探讨。通过CCK-8实验发现镍精炼烟尘对NIH/3T3细胞具有明显的毒性作用,细胞生存率随着染毒浓度的增加呈现下降的趋势。

NF-κB是一个关键的转录调节因子,NF-κB信号通路除了参与细胞周期调控、细胞凋亡外,还参与炎症和肿瘤的发生发展过程。本研究结果显示,镍精炼烟尘诱导NIH/3T3细胞NF-κB蛋白表达,且表达水平随镍精炼烟尘浓度增加而增加。作为炎症反应的关键调控因子,有研究表明NF-κB通过高效调节下游多种白细胞介素、炎症酶和趋化因子等靶基因的表达,进一步加重炎症反应<sup>[9]</sup>。TNF-α和IL-1等炎症因子又会反过来激活NF-κB,延长和扩大炎症反应。本实验中,镍精炼烟尘以剂量依赖的方式促进炎症效应指标iNOS和NO的表达增加,与NF-κB蛋白表达增加的趋势一致。有研究证实<sup>[10]</sup>,炎症细胞因子iNOS在炎症和肿瘤实验模型中表达均有所增加,促进炎症和癌症发生发展。由iNOS激活表达的NO作为活性氧的一种形式,也是炎症反应和癌症进展的重要调节因素<sup>[6]</sup>。

本研究发现镍精炼烟尘诱导NIH/3T3细胞NF-κB表达增加,进而调控炎症指标iNOS和NO的分泌量增加,促进炎症反应发生。但是炎症的发生发展机制非常复杂,需多条信号通路相互作用调节,因此关于镍精炼烟尘具体致炎分子机制还需要更加深入的研究。本次实验为进一步从炎症角度解释镍精炼烟尘毒性分子机制提供了理论基础和新思路,且为暴露于镍精炼烟尘的职业人群肺部炎症和癌症的治疗和预防提供了重要靶点和新的研究方向。

### 参考文献:

[1] World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. Chromium, nickel and welding [Z]. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 1990 (49): 648.

[2] Pavela M, Uitti J, Pukkala E. Cancer incidence among copper smelting and nickel refining workers in Finland [J]. American Journal of Industrial Medicine, 2017, 60 (1): 87-95.

- [3] Zhao J, Shi X, Castranova V, *et al.* Occupational toxicology of nickel and nickel compounds [J]. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology*, 2009, 28 (3): 177-208.
- [4] Shrihari TG. Dual role of inflammatory mediators in cancer [J]. *E-cancer Medical Science*, 2017 (11): 721.
- [5] Zaynagetdinov R, Sherrill TP, Gleaves LA, *et al.* Chronic NF- $\kappa$ B activation links COPD and lung cancer through generation of an immunosuppressive microenvironment in the lungs [J]. *Oncotarget*, 2016, 7 (5): 5470-5482.
- [6] Lind M, Hayes A, Caprnda M, *et al.* Inducible nitric oxide synthase: Good or bad? [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 93: 370-375.
- [7] Hussain SP, He P, Subleski J, *et al.* Nitric oxide is a key component in inflammation-accelerated tumorigenesis [J]. *Cancer Research*, 2008, 68 (17): 7130-7136.
- [8] Ridnour LA, Cheng RY, Switzer CH, *et al.* Molecular pathways: Toll-like receptors in the tumor microenvironment—poor prognosis or new therapeutic opportunity [J]. *Clinical Cancer Research*, 2013, 19 (6): 1340-1346.
- [9] Lawrence T. The nuclear factor NF- $\kappa$ B pathway in inflammation [J]. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2009, 1 (6): a001651.
- [10] Kim SF, Huri DA, Snyder SH. Inducible nitric oxide synthase binds, S-nitrosylates, and activates cyclooxygenase-2 [J]. *Science*, 2005, 310 (5756): 1966-1970.

## 鸦胆子苦醇对苯致白血病小鼠的治疗作用及其机制

### Therapeutic effect and underlying mechanisms of brusatol on benzene-induced leukemia in mice

贺今<sup>1</sup>, 贾强<sup>1</sup>, 刘光峰<sup>1</sup>, 于功昌<sup>1</sup>, 韩冰<sup>2</sup>, 崔萍<sup>1</sup>

(1. 山东省职业卫生与职业病防治研究院, 山东第一医科大学/山东省医学科学院, 山东 济南 250062; 2. 山东省医学科学院附属医院, 山东 济南 250031)

**摘要:** 将30只无特定病原体级雄性CBA/CA小鼠, 随机分为对照组、苯诱导急性髓系白血病(BZ-AML)模型组、鸦胆子苦醇(Brusatol)治疗组, 每组各10只小鼠。BZ-AML、Brusatol组小鼠利用静式染毒柜吸入染毒, 每天苯吸入浓度300 ppm, 6 h/d, 5 d/周, 连续8周; 对照组小鼠吸入空气。观察各组小鼠外周血常规、骨髓细胞学涂片, 确认BZ-AML建模成功后给药。Brusatol治疗组腹腔注射给药4 mg/(kg·d), 连续5 d。流式细胞术测定外周血中CD<sub>3</sub><sup>+</sup>、CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>8</sub><sup>+</sup>T细胞的数量以及骨髓单个核细胞ROS、细胞凋亡率的改变。与BZ-AML组小鼠比较, Brusatol组小鼠外周血CD<sub>4</sub><sup>+</sup>、CD<sub>3</sub><sup>+</sup>T淋巴细胞数量及CD<sub>4</sub><sup>+</sup>/CD<sub>8</sub><sup>+</sup>比值增加, 骨髓单个核细胞ROS水平降低及细胞凋亡率增高。提示Brusatol通过改善T淋巴细胞免疫功能, 降低骨髓细胞ROS生成及诱导凋亡发挥抗白血病的作用。

**关键词:** 鸦胆子苦醇(Brusatol); 苯; 白血病; 活性氧

**中图分类号:** R135.12 **文献标识码:** B

**文章编号:** 1002-221X(2019)06-0470-05

**DOI:** 10.13631/j.cnki.zggyyx.2019.06.016

苯是引起白血病的明确致癌毒物, 是油漆、喷漆、粘胶等行业中广泛使用的芳香烃类有机溶剂。苯在常温下能自然挥发, 通过呼吸道吸入是苯引起血液系统毒性的主要接触途径<sup>[1]</sup>。流行病学研究表明, 苯诱导的急性髓系白血病(benzene-induced acute myeloid leukemia, BZ-AML)是最常见的白血病类型<sup>[1]</sup>, 在我国已被确认为职业性肿瘤。目前关于BZ-AML发病机制的研究主要涉及骨髓细胞增殖异常、氧化应

激损伤、免疫功能抑制等方面。Hirabayashi等<sup>[2]</sup>体内实验研究表明, 苯及其代谢物如苯酚、氢醌可引起骨髓造血祖细胞产生过多氧自由基(reactive oxygen species, ROS)。ROS增高可引起DNA损伤, 诱导细胞内癌基因的激活<sup>[3-5]</sup>。CD<sub>4</sub><sup>+</sup>T淋巴细胞数量的减少可引起白血病干细胞逃避免疫监视, 也是BZ-AML发生发展的重要机制<sup>[6]</sup>。尽管目前作业场所的苯暴露浓度已经明显降低, 但BZ-AML的发病率和死亡率在过去的20年仍在较高水平<sup>[7]</sup>, 对BZ-AML治疗新药研究仍然非常重要。鸦胆子苦醇(Brusatol)是核因子红系2相关因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)特异性抑制剂<sup>[8]</sup>。体外研究证明鸦胆子苦醇对AML细胞株具有增强化疗药物敏感性及减少白血病干细胞恶性克隆作用<sup>[9]</sup>。对鸦胆子苦醇分子靶向治疗的I期临床研究, 将为BZ-AML化疗提供更多新的治疗策略和选择方案。本研究拟通过建立BZ-AML小鼠模型, 观察鸦胆子苦醇对BZ-AML小鼠外周血T淋巴细胞免疫功能、骨髓细胞ROS生成及细胞凋亡率的影响, 为鸦胆子苦醇治疗BZ-AML的临床研究提供实验室参考数据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 动物

无特定病原体(SPF)级的健康雄性CBA/CA小鼠30只, 6~8周龄, 体重22~24 g, 购自上海西普乐-必凯实验动物有限公司, 动物生产许可证号: SCXK2013-0016。每笼5只, 饮用水及饲料均经高压灭菌, 动物自由进食、饮水。小鼠饲养于符合《实验动物环境及设施》(GB14925—2010)相关要求的屏障动物房, 动物使用许可证号: SYXK(鲁)-20140012, 屏障动物房监测合格证号: H20170069。实验前小鼠经检疫程序在饲养环境中适应1周。本研究符合《动物实验指南》(GB 14924.2—2001)的要求。

#### 1.2 主要试剂和仪器

收稿日期: 2019-06-18; 修回日期: 2019-08-01

基金项目: 山东省重点研发计划(编号: GG201709220077)

作者简介: 贺今(1975—), 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事职业病临床治疗工作。

通信作者: 崔萍, 主任医师, E-mail: 13105410654@163.com; 韩冰, 主治医师, E-mail: hepatobiliary@sina.com。