

尤其是在地下工事、装甲车等封闭环境中,温压爆炸气体的缺氧、毒性效应会更加严重<sup>[8]</sup>,值得深入探究。

本研究通过探讨温压弹爆炸气体对生物体的毒性作用,分析生物毁伤的具体机制,对防护装备的研发及作业人员的伤害救治等具有重要意义。

## 参考文献

- [1] 仲倩,王伯良,刘大斌,等.温压弹药综合毁伤效果评估模型研究[J].爆破器材,2018,47(5):21-26,34.
- [2] 贾炎坤,李超,刘毅.温压弹药及其医学效应[J].西北国防医学杂志,2019,40(12):764-768.
- [3] 胡岚,刘红妮,任春燕,等.某温压弹爆轰气体靶场测试技术[J].含能材料,2010,18(2):196-199.

- [4] 陈丽倩,黄明伟.急性一氧化碳中毒后迟发性脑病的危险因素分析[J].中国基层医药,2017,24(6):879-882.
- [5] Rose JJ, Wang L, Xu Q, et al. Carbon monoxide poisoning: Pathogenesis, management and future directions of therapy [J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2016, 195(5): 596.
- [6] 李英,刘佳宁.急性一氧化碳中毒后发生急性肺损伤的相关危险因素分析[J].安徽医药,2018,22(8):1472-1474.
- [7] 王鸿,高俊宏,刘志永,等.温压装药爆炸模拟气体对大鼠呼吸及神经系统的影响[J].中华劳动卫生职业病杂志,2019,37(11):815-819.
- [8] 雍顺宁,徐利娜,王凤丹,等.坑道环境爆轰气体产物的试验方法初探[J].测试技术学报,2013,27(6):93-97.

(收稿日期:2020-05-21;修回日期:2020-09-30)

# 高尔基体磷蛋白 3 在镍精炼烟尘致 Beas-2B 细胞损伤中的作用

## Role of GOLPH3 played in Beas-2B cell damage induced by nickel refining fume

辛野,王声远,王玥,王芮,辛芮,张童,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:**为探讨镍精炼烟尘致人支气管上皮细胞(Beas-2B)损伤过程中高尔基体磷蛋白3(golgiosomal phosphoprotein III, GOLPH3)表达的变化,采用0、6.25、12.50、25.00 μg/ml的镍精炼烟尘混悬液处理Beas-2B细胞24 h,以免疫印迹法检测GOLPH3、缺氧诱导因子(HIF-1α)、磷脂酰肌醇激酶(PI3K)、磷酸化蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶(p-AKT)的蛋白表达水平。结果表明,随着染毒浓度的增大,GOLPH3、HIF-1α、PI3K、p-AKT表达量随之增加,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。提示GOLPH3表达增加可能在镍精炼烟尘致Beas-2B细胞损伤中具有一定的作用。

**关键词:**镍精炼烟尘;高尔基体磷蛋白3(GOLPH3);细胞毒性

中图分类号:R994.3 文献标识码:B

文章编号:1002-221X(2021)02-0132-03

DOI:10.13631/j.cnki.zggyyx.2021.02.012

镍作为工业上应用最广泛的金属,职业镍接触人群数量庞大。研究表明<sup>[1]</sup>,肺癌、鼻咽癌与职业性接触镍化合物密切相关。镍化合物可以导致细胞凋亡及

肿瘤发生<sup>[2]</sup>,但其致病机制目前尚未明确。缺氧诱导因子(hypoxia inducible factor-1, HIF-1α)是一种关键的致癌转录因子,它能靶向调控Warburg效应。镍暴露能够在常氧条件下引起细胞内HIF-1α蓄积<sup>[3]</sup>。高尔基体磷蛋白3(golgiosomal phosphoprotein III, GOLPH3)是高尔基体上第一个固有癌基因蛋白<sup>[4]</sup>,主要定位于反式高尔基体网络(TGN)。GOLPH3在人类肿瘤中的过量表达可增强细胞迁移<sup>[5,6]</sup>。PI3K/AKT通路是细胞生物学过程中重要的信号通路,包括参与调控细胞的增殖、凋亡、细胞周期及血管的形成等过程<sup>[7]</sup>。PI3K/AKT通路通过逐级磷酸化下游蛋白来控制肿瘤的发生与发展。

本课题组前期的研究发现,镍精炼烟尘可以使人支气管上皮细胞(Beas-2B)中的HIF-1α蛋白表达增高,并启动Warburg效应<sup>[8]</sup>。但GOLPH3在镍精炼烟尘致Beas-2B细胞损伤中的作用目前尚不清楚。因此,本研究通过Western blot检测不同染毒浓度下Beas-2B细胞中GOLPH3、HIF-1α、磷脂酰肌醇激酶(PI3 kinase, PI3K)和磷酸化蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶(phosphorylated protein serine/threonine kinase, p-AKT)蛋白表达水平的变化,分析GOLPH3在镍精炼烟尘致Beas-2B细胞损伤中的作用。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(编号:81673138, 81973010)

**作者简介:**辛野(1994—),女,硕士研究生,研究方向:工业毒物致肿瘤机制。

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

## 1 材料与方法

**1.1 主要试剂及仪器** 胰蛋白酶、CCK-8 试剂盒、BCA 试剂盒 (碧云天公司); HIF-1 $\alpha$ 、PI3K、p-AKT 兔源一抗、GOLPH3、 $\beta$ -actin 鼠源一抗 (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); 胎牛血清 (美国 HyClone 公司)。高速冷冻离心机 (美国 Thermo Fisher); 酶标仪 (美国 SpectraMax Plus384)。

**1.2 细胞培养** Beas-2B 细胞来自首都医科大学劳动卫生学教研室, 常规培养于含 1% 双抗、10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中贴壁生长。定期更换培养基, 细胞生长至 100% 后用胰蛋白酶收集细胞, 传代于新培养基中备用。

**1.3 受试物制备** 镍精炼烟尘取自某镍矿的精炼厂车间, 用玛瑙研钵磨细。分散度测定 < 5  $\mu$ m 的粉尘颗粒达到 99%, 经紫外线 (UV) 灭菌 1 h 后, 与无菌磷酸盐缓冲液 (PBS) 混合制备成混悬液母液, 根据预实验结果将母液配制成终浓度为 0、6.25、12.50、25.00  $\mu$ g/ml 的粉尘混悬液。

**1.4 CCK-8 法检测细胞存活率** 96 孔板中接种 Beas-2B 细胞, 置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养 24 h, 显微镜下观察, 细胞完全贴壁, 状态良好。按照实验设计的染毒浓度对细胞染毒 24 h, 每个染毒组设置 6 个复孔, 在每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 溶液, 继续在细胞培养箱内孵育 2 h, 检测时用酶标仪读取 450 nm 波长处各孔的吸光度值。计算细胞相对生长存活率。

$$\text{存活率} (\%) = \frac{A (\text{实验组})}{A (\text{NC 组})} \times 100\%$$

**1.5 细胞内 GOLPH3、HIF-1 $\alpha$ 、PI3K 和 p-AKT 蛋白水平表达的 Western Blot 检测** 染毒 24 h 后的细胞用 PBS 清洗后收集备用。加入含有蛋白酶抑制剂的细胞裂解液后在冰上裂解 30 min。4 $^{\circ}$ C、12000 r/min 高速冷冻离心机离心 10 min, 取上清, 采用 BCA 试剂盒检测各组蛋白浓度。10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白样品, 然后转移到 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉作为封闭液封闭 2 h; 4 $^{\circ}$ C 孵育一抗 (GOLPH3 1 : 500; PI3K 1 : 1 000; p-AKT 1 : 1 000; HIF-1 $\alpha$  1 : 1 000;  $\beta$ -actin 1 : 2 000), 过夜。洗膜后再 37 $^{\circ}$ C 恒温孵育二抗 1.5 h。洗膜, 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 统计分析** 采用 SPSS 18.0 统计软件进行分析。

经方差齐性检验后, 不同染毒组间指标的比较采用方差分析,  $P < 0.05$  差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 Beas-2B 细胞存活率** 用不同浓度镍精炼烟尘混悬液处理 Beas-2B 细胞 24 h 后, 使用 CCK-8 法测定细胞存活率。如表 1 所示, 与对照组 (0  $\mu$ g/ml) 相比, 各染毒组的细胞存活率明显降低, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

表 1 不同浓度染毒处理 24 h Beas-2B 细胞的相对存活率

组别	相对存活率 (%)
对照组	100.00
6.25 $\mu$ g/ml 染毒组	88.03 <sup>a</sup>
12.50 $\mu$ g/ml 染毒组	80.99 <sup>a</sup>
25.00 $\mu$ g/ml 染毒组	70.98 <sup>a</sup>

注: a, 与对照组相比,  $P < 0.05$ 。

**2.2 Beas-2B 细胞中 GOLPH3、PI3K、p-AKT、HIF-1 $\alpha$  蛋白表达** 与对照组相比, 镍精炼烟尘染毒 Beas-2B 细胞诱导 GOLPH3 蛋白表达明显增加。HIF-1 $\alpha$  同 GOLPH3 表达趋势相同 (图 1~3)。随着镍精炼烟尘浓度的增大, PI3K/AKT 通路表达增加 (图 4, 5)。各组 Beas-2B 细胞中 GOLPH3、HIF-1 $\alpha$ 、PI3K、p-AKT 蛋白表达水平均呈剂量-反应关系, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

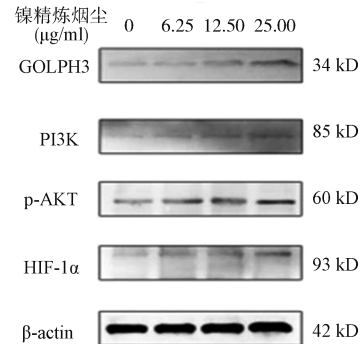
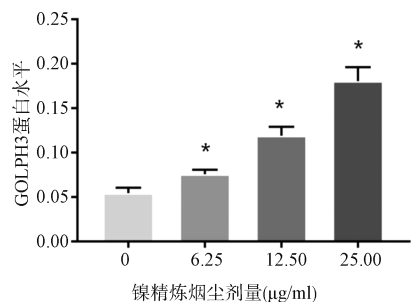


图 1 各组 Beas-2B 细胞中 GOLPH3、PI3K、p-AKT 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白表达水平



注: \*, 与对照组相比,  $P < 0.05$ 。图 3~5 同。

图 2 各组 Beas-2B 细胞中 GOLPH3 蛋白灰度值

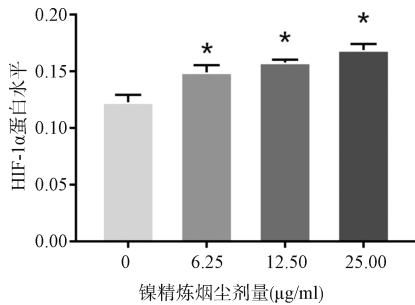


图3 各组 Beas-2B 细胞中 HIF-1 $\alpha$  蛋白灰度值

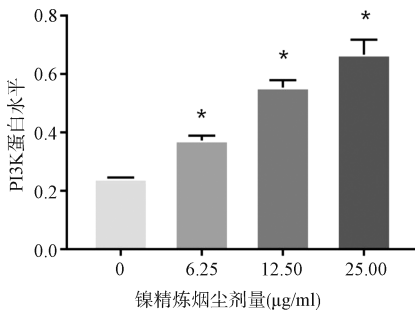


图4 各组 Beas-2B 细胞中 PI3K 蛋白灰度值

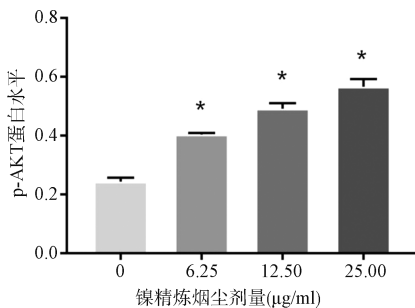


图5 各组 Beas-2B 细胞中 p-AKT 蛋白灰度值

### 3 讨论

镍精炼烟尘对细胞有许多毒性作用,包括抑制细胞生长、诱导氧化应激、造成 DNA 及线粒体损伤、引发炎症反应等<sup>[9,10]</sup>。镍在 NIH/3T3 细胞中激活 HIF-1 $\alpha$  蛋白,且通过 PI3K/AKT 通路调控 HIF-1 $\alpha$  表达<sup>[11]</sup>。有研究表明<sup>[12]</sup>,在结肠癌细胞中,GOLPH3 可调控 PI3K/AKT 通路,增加细胞的增殖能力,促进肿瘤生长。本实验在镍精炼烟尘干预的 Beas-2B 细胞中发现,随着 GOLPH3 蛋白表达增加,HIF-1 $\alpha$  表达也随之增加。随着染毒浓度的增大,PI3K/AKT 通路的 PI3K、p-AKT 蛋白表达升高,表明 PI3K/AKT 通路被激活。因此,推测 GOLPH3 可能通过 PI3K/AKT 通路激活 HIF-1 $\alpha$ ,从而激活下游的 Warburg 效应。

GOLPH3 蛋白在非小细胞肺癌组织中高度表达<sup>[13]</sup>,在肺癌形成过程中可能起到重要作用。GOLPH3 蛋白在镍精炼烟尘染毒后的 Beas-2B 细胞中表达增加,可能是镍导致肺癌发生机制中的关键一

环。GOLPH3 蛋白可能通过 HIF-1 $\alpha$  调控 Warburg 效应,而 Warburg 效应是肿瘤细胞的典型代谢特征,据此可以推测 GOLPH3 可能是镍致癌的关键影响因子。

本研究通过使用镍精炼烟尘处理 Beas-2B 细胞来充分模拟职业工人的暴露环境进行实验,为镍精炼烟尘诱导细胞癌变的可能通路提供新的证据,也为接触镍精炼烟尘工人职业健康研究提供新的思路。

### 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 cells exposed to nickel acetate [J]. *Biomaterials*, 2014, 27 (6): 1149-1158.
- [2] Freitas M, Gomes A, Porto G, et al. Nickel induces oxidative burst, NF- $\kappa$ B activation and interleukin-8 production in human neutrophils [J]. *J Biol Inorg Chem*, 2010, 15 (8): 1275-1283.
- [3] He M, Lu Y, Xu S, et al. MiRNA-210 modulates a nickel-induced cellular energy metabolism shift by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2 in Neuro-2a cells [J]. *Cell Death & Disease*, 2014, 5 (2): e1090.
- [4] Bergeron John JM, Au Catherine E, Thomas David Y, et al. Proteomics identifies golgi phosphoprotein 3 (GOLPH3) with a link between golgi structure, cancer, DNA damage and protection from cell death [J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2017, 16 (12): 2048-2054.
- [5] Buschman MD, Rahajeng J, Field SJ. GOLPH3 links the golgi, DNA damage, and cancer [J]. *Cancer Res*, 2015, 75 (4): 624-627.
- [6] Zhou X, Zhan W, Bian W, et al. GOLPH3 regulates the migration and invasion of glioma cells through RhoA [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013 (433): 338-344.
- [7] 胡志英,朱新江,陈舒晨,等.非小细胞肺癌 PI3K/AKT/MTOR 信号通路的研究现状与进展 [J]. *癌症进展*, 2018, 16 (6): 671-674.
- [8] Wang R, Wang SY, Wang Y, et al. The Warburg effect promoted the activation of the NLRP3 inflammasome induced by Ni-refining fumes in BEAS-2B cells [J]. *Toxicol Ind Health*, 2020, 36 (8): 580-590.
- [9] Wang Y, Wang SY, Jia L, et al. Nickel-refining fumes induced DNA damage and apoptosis of NIH/3T3 cells via oxidative stress [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2016, 13 (7): 629.
- [10] 夏冰,李吉平,秦汝男,等.镍精炼烟尘致 NIH/3T3 细胞 NLRP3 炎性小体的表达 [J]. *中国工业医学杂志*, 2019, 32 (3): 201-203.
- [11] Han D, Yang Y, Zhang L, et al. Nickel-smelting fumes increased the expression of HIF-1 $\alpha$  through PI3K/ERK pathway in NIH/3T3 cells [J]. *J Occup Health*, 2016 (58): 413-424.
- [12] Yu T, An Q, Cao XL, et al. GOLPH3 inhibition reverses oxaliplatin resistance of colon cancer cells via suppression of PI3K/AKT/mTOR pathway [J]. *Life Sci*, 2020 (260): 1-12.
- [13] Tang SC, Yang RR, Zhou X, et al. Expression of GOLPH3 in patients with non-small cell lung cancer and xenografts models [J]. *Oncology Letters*, 2018, 15 (5): 7555-7562.

(收稿日期: 2020-11-13; 修回日期: 2021-01-12)