

· 实验研究 ·

亚砷酸钠及其代谢产物对 A549 细胞中环状基因表达的影响

Effects of sodium arsenite and its metabolites on expression of circular gene in A549 cells

赵瑞欢, 周倩, 尹锦瑶, 谭婧文, 李舒婷, 蒋成兰, 何越峰

(昆明医科大学公共卫生学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 分别用浓度为 20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 的亚砷酸钠 (NaAsO_2) 溶液和无机砷的代谢产物一甲基胂酸 (MMA)、二甲基胂酸 (DMA) 对处于对数生长期的人肺腺癌 A549 细胞处理 48 h, 提取 RNA 并逆转录为 cDNA, 用聚合酶实时荧光定量反应 (qRT-PCR) 检测 hsa_circ_0004448、hsa_circ_0027493、hsa_circ_0000416、circRELB、circFOXN2、circATXN2 6 个环状基因 (circRNAs) 的相对表达量。结果表明, 与对照组比较, 不同浓度的 NaAsO_2 溶液均可引起 A549 细胞中上述 circRNAs 表达量升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与对照组比较, DMA 仅使 hsa_circ_0004448 和 circATXN2 表达量升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。经 MMA 染毒后, 上述 6 个 circRNAs 的相对表达量均无变化, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 NaAsO_2 组比较, MMA 组和 DMA 组中 6 个 circRNAs 表达量均降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

关键词: 亚砷酸钠 (NaAsO_2); 一甲基胂酸 (MMA); 二甲基胂酸 (DMA); 环状基因 (circRNAs)

中图分类号: R994.3 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2022)04-0346-03

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2022.04.020

砷作为一种广泛存在的工业毒性金属元素, 多以无机砷形态分布于各种矿物中, 应用于化工、冶金等行业。职业性砷暴露主要经呼吸道或消化道摄入^[1], 其中无机砷通常以三氧化二砷、亚砷酸盐和砷酸盐的形式存在, 在体内通过还原/氧化反应代谢产生一甲基胂酸 (MMA)、二甲基胂酸 (DMA)^[2], 导致急性慢性砷中毒^[3]。

环状基因 (circRNAs) 是一类由 pre-mRNA (mRNA 前体) 反向剪接产生的非编码 RNA^[4], circRNAs 可通过参与细胞周期、细胞增殖和细胞死亡调控多种疾病的发生和发展, 部分 circRNAs 可充当致

癌基因^[5]。其中 hsa_circ_0004448、hsa_circ_0027493 和 hsa_circ_0000416 以癌基因 *MDM2* 为母基因。有报道称, 与上述同源的 hsa_circ_0027491 过高表达会导致口腔鳞状细胞癌, 预后不佳^[6]。同时, RELB 调控细胞周期相关基因的表达, FOXN2 表达上调可抑制细胞迁移, 但是 circRELB、circFOXN2 的功能还有待深入探究。circATXN2 过高表达可以抑制脂肪基质细胞增殖^[7]。因此, 上述 6 个 circRNAs 的异常表达具有一定的指示性, 其在砷致癌机制中发挥作用的可能性不容忽视。本研究以 A549 为实验细胞, 探讨亚砷酸钠 (NaAsO_2) 及其代谢产物对 hsa_circ_0004448、hsa_circ_0027493、hsa_circ_0000416、circRELB、circFOXN2、circATXN2 6 个 circRNAs 表达的影响, 为阐明砷致癌机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器和试剂 人肺腺癌细胞系 (A549 细胞), 中国科学院动物研究中心; RNA Isolate 提取试剂盒, 北京诺禾致源生物信息科技有限公司; 逆转录试剂盒, 上海罗氏制药有限公司; Lightcycler 实时荧光定量聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 仪, 美国 ABI 公司; FastStart Universal SYBR Green Master 荧光定量试剂盒, 上海罗氏诊断产品有限公司; NaAsO_2 (纯度 $\geq 95.0\%$), 成都西亚试剂有限公司; MMA、DMA (纯度均 $\geq 99.0\%$), 美国 Accu Standard 公司。

1.2 细胞培养和传代 取 A549 细胞于 T25 细胞培养瓶中, 加入 7~8 ml 1640 完全培养液 (含 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素混合液), 置于 37℃、5% CO_2 恒温培养箱中, 隔日观察细胞生长速度并根据细胞生长状况进行处理, 待细胞增殖到对数生长期时, 用 0.25% 胰蛋白酶消化细胞。

1.3 细胞处理 取六孔板接种 2.5×10^5 个/孔, 放置 37℃、5% CO_2 恒温培养箱中培养 22 h, 分别用 0、20、40、60 $\mu\text{mol/L}$ 的 NaAsO_2 溶液和 MMA、DMA

基金项目: 国家自然科学基金 (82160607); 昆医联合专项面上项目 (202101AY070001-054)。

作者简介: 赵瑞欢 (1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 劳动卫生与环境卫生学。

通信作者: 何越峰, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail: heyuefeng@kmmu.edu.cn

对其染毒，每组设置3个平行样，相同条件培养48 h后，用RNA Isolate试剂盒提取细胞内的RNA，再将所提取的RNA逆转录得到cDNA作为反应模板。

1.4 circRNAs的相对表达量检测 用qRT-PCR检测circRNAs的相对表达量，反应体系为每孔15 μl，设

置模式为预变性95℃ 520 s，变性95℃ 10 s，退火37℃ 30 s，延伸95℃ 10 s，共反应40个循环。以管家基因β-actin (ACTB)为内参基因，用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法定量分析，每孔设置3个平行。各引物序列见表1。

表1 qRT-PCR引物序列

基因	上游序列	下游序列	长度 (bp)
hsa_circ_0000416	5'-ACGCCATCGAATCCGGAAAAT-3'	5'-GTCCTTTTGATCACTCCCACC-3'	138
hsa_circ_0004448	5'-GCAATTAGTGAGACAGGAAAATATA-3'	5'-GTCCTTTTGATCACTCCCACC-3'	138
hsa_circ_0027493	5'-CCGTCTATGACAAGATTTTAAC-3'	5'-CAGGGACCCAGCGTTGTA-3'	119
circFOXN2	5'-CACCAACAGGCTGGAAGAAT-3'	5'-CCTCTGCATCTGTGGGTTCT-3'	125
circATXN2	5'-GGCCGAAACGTGAAGAAATA-3'	5'-CATTGGAGCCCTCTTTTGTG-3'	223
circRELB	5'-CAATTAGTGAGACAGAATCATCG-3'	5'-GTCCTTTTGATCACTCCCACC-3'	139
β-actin	5'-GCCGAGGACTTTGATGCAC-3'	5'-TGGACTTGGGAGGACTGG-3'	211

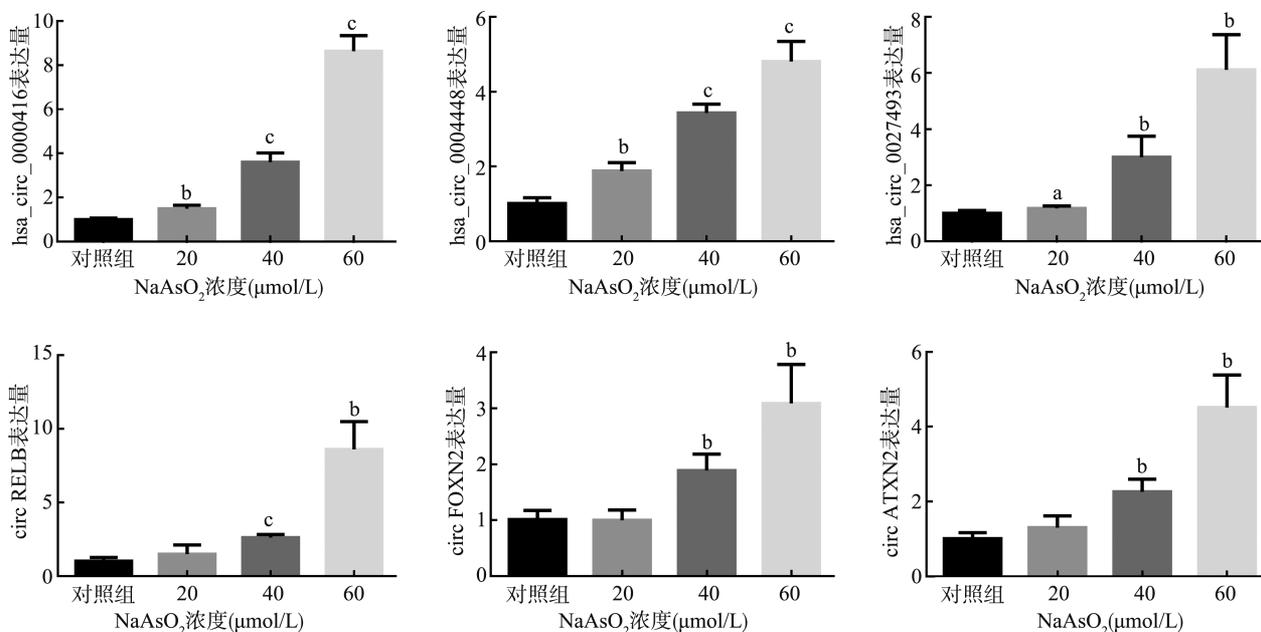
1.5 统计分析 数据采用GraphPad Prism 6.0软件进行处理，以 $\bar{x} \pm s$ 表示，多组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析(One Way ANOVA)。进一步组间相互比较，方差齐采用SNK检验(Student-Newman-Keuls法)；方差不齐时采用Games-Howell检验，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NaAsO₂染毒对A549细胞circRNAs表达的影响 随着NaAsO₂染毒浓度的升高，hsa_circ_0004448、

hsa_circ_0027493、hsa_circ_0000416、circRELB、circFOXN2和circATXN2表达量均较对照组显著升高，差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图1。

2.2 MMA、DMA染毒对A549细胞circRNAs表达的影响 与对照组比较，DMA染毒组hsa_circ_0004448和circATXN2表达量升高，差异有统计学意义($P < 0.05$)；MMA染毒组6个circRNAs表达量差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与NaAsO₂组比较，MMA染毒组和DMA染毒组6个circRNAs表达量均降低，差异有统计学意义($P < 0.01$)。见表2。



注：与对照组比较，a $P < 0.05$ ；b $P < 0.01$ ；c $P < 0.001$ 。

图1 不同浓度NaAsO₂对A549细胞circRNAs表达水平的影响

表2 MMA、DMA、NaAsO₂对 A549 细胞 circRNAs 表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	hsa_circ_0000416	hsa_circ_0004448	circRELB	circFOXN2	circATXN2	hsa_circ_0027493
对照组	4	1.181±0.818	1.212±0.736	1.277±0.526	1.402±0.789	1.133±0.859	1.756±0.501
MMA 组	4	1.087±0.796 ^b	1.238±0.741 ^b	1.151±0.884 ^b	1.063±0.805 ^b	0.993±0.865 ^b	1.949±1.059 ^b
DMA 组	4	1.021±0.818 ^b	1.726±1.317 ^{ab}	2.103±1.436 ^b	1.264±1.055 ^b	1.753±1.292 ^{ab}	3.687±1.340 ^b
NaAsO ₂ 组	4	9.318±5.657 ^a	9.174±5.766 ^a	28.300±20.430 ^a	3.649±2.985 ^a	8.694±5.278 ^a	15.060±11.980 ^a

注: a, 与对照组比较 $P < 0.05$; b, 与 NaAsO₂组比较 $P < 0.01$ 。

3 讨论

无机砷已被国际癌症研究机构 (IARC) 认定为 I 类致癌物, 肺为其主要靶器官之一, 砷及其化合物所致肺癌已被列入我国《职业病分类和目录》。A549 细胞作为人肺腺癌细胞系, 其细胞内 circRNAs 的表达对砷暴露具有一定的参考价值。有研究表明, NaAsO₂ 诱导细胞周期加速的致癌过程中 circRNA_100284 表达上调^[8], NaAsO₂ 介导的 circDHX34 上调促进了激素非依赖性乳腺癌细胞的凋亡^[9], 每个 circRNAs 的功能不可一概而论。

本研究采用 A549 细胞, 探讨 NaAsO₂ 及其代谢产物 MMA 和 DMA 对 6 个 circRNAs 表达的影响。结果显示, NaAsO₂ 染毒后 6 个 circRNAs 在 A549 细胞中的相对表达量升高, 且与 NaAsO₂ 染毒浓度存在剂量-反应关系; MMA 染毒后上述 6 个 circRNAs 相对表达量均无变化, DMA 染毒后仅有 hsa_circ_0004448、circATXN2 相对表达量升高。NaAsO₂ 对细胞中 circRNAs 的作用较 MMA、DMA 明显, 推测原因可能是 MMA、DMA 的毒性低于 NaAsO₂^[10]。Zheng 等^[6] 研究发现 hsa_circ_0027491 上调促进了口腔鳞状癌细胞的增殖, 且敲低抑制了体内肿瘤的生长。

RELB 通过结合 p65 抑制炎症细胞的增殖, RELB 表达上调会抑制 HER2 阳性乳腺癌细胞增殖^[11]; FOXN2 表达上调可抑制肝癌细胞的增殖和侵袭^[12], circFOXN2 表达下调也可作为预测早期肝功能损伤的标志物^[13]; ATXN2 可以调节细胞中 mRNA 翻译和营养代谢^[14], 而 circATXN2 也被证明会抑制脂肪基质细胞增殖, 6 个 circRNAs 表达均与疾病发生过程中生物调控机制相关。本研究将 6 个 circRNAs 在不同剂量的砷暴露组中的差异性表达与其在癌组织中的差异性表达协同考虑, 揭示了 6 个 circRNAs 在砷致癌中发挥功能的潜在可能性, 也为解决砷暴露职业人群健康防治的相关问题提供了数据支持。

参考文献

[1] Vergara-Gerónimo CA, León Del Río A, Rodríguez-Dorantes M, *et al.* Arsenic-protein interactions as a mechanism of arsenic toxicity

- [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2021 (431): 115738.
- [2] Bae S, Kamynina E, Guetterman HM, *et al.* Provision of folic acid for reducing arsenic toxicity in arsenic-exposed children and adults [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2021, 10 (10): CD012649.
- [3] Mawia AM, Hui SZ, Zhou L, *et al.* Inorganic arsenic toxicity and alleviation strategies in rice [J]. *J Hazard Mater*, 2021 (408): 124751.
- [4] Wang S, Wang ZM, Su HJ, *et al.* Effects of long-term culture on the biological characteristics and RNA profiles of human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2021 (26): 557-574.
- [5] Zhou LY, Zhai M, Huang Y, *et al.* The circular RNA ACR attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing autophagy via modulation of the Pink1/FAM65B pathway [J]. *Cell Death Differ*, 2019, 26 (7): 1299-1315.
- [6] Zheng Z, Ma XZ, Li HF. Circular RNA circMDM2 accelerates the glycolysis of oral squamous cell carcinoma by targeting miR-532-3p/HK2 [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24 (13): 7531-7537.
- [7] Song XH, He N, Xing YT, *et al.* A novel age-related circular RNA circ-ATXN2 inhibits proliferation, promotes cell death and adipogenesis in rat adipose tissue-derived stromal cells [J]. *Front Genet*, 2021 (12): 761926.
- [8] Dai XY, Chen C, Yang QL, *et al.* Exosomal circRNA_100284 from arsenite-transformed cells, via microRNA-217 regulation of EZH2, is involved in the malignant transformation of human hepatic cells by accelerating the cell cycle and promoting cell proliferation [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9 (5): 454.
- [9] Li ST, Jiang CL, Tan JW, *et al.* Sodium arsenite-mediated upregulation of circDHX34 promotes apoptosis in hormone-independent breast cancer cells by regulating apoptotic genes [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2022, 29 (2): 2728-2736.
- [10] 陈江容, 张若冰, 张媛, 等. 砷及其代谢产物对 p21 基因表达的影响 [J]. *职业与健康*, 2018, 34 (23): 3213-3216.
- [11] Cost TDF, Zhuang T, Lorent J, *et al.* PAK4 suppresses RELB to prevent senescence-like growth arrest in breast cancer [J]. *Nat Commun*, 2019, 10 (1): 3589.
- [12] Liu XH, Liu LP, Xu XM, *et al.* FOXN2 suppresses the proliferation and invasion of human hepatocellular carcinoma cells [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2021, 25 (2): 731-737.
- [13] Wang K, Wei XY, Wei Q, *et al.* A two-circular RNA signature of donor circFOXN2 and circNECTIN3 predicts early allograft dysfunction after liver transplantation [J]. *Ann Transl Med*, 2020, 8 (4): 94.
- [14] Sen NE, Arsovic A, Meierhofer D, *et al.* In human and mouse spinocerebellar tissue, ataxin-2 expansion affects ceramide-sphingomyelin metabolism [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20 (23): 5854.

(收稿日期: 2021-11-19; 修回日期: 2022-05-16)