

## 低剂量长期砷暴露对 HaCat 细胞周期及周期蛋白影响\*

刘世宜, 李昕

**摘要:**目的 探讨低剂量长期砷暴露对人皮肤角质形成细胞系 HaCat 细胞周期及周期蛋白 D1 (cyclin D1) 和 p21 影响。方法 HaCat 细胞暴露于浓度为 0、0.05、0.1  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{NaAsO}_2$  15 周后,用流式细胞仪测定 10 000 个细胞的细胞周期分布;用 western blot 法检测细胞 cyclin D1 和 p21 的蛋白表达水平。结果 与对照组比较,  $\text{NaAsO}_2$  染毒组细胞的  $G_0/G_1$  期细胞数明显增高, S 期细胞数明显降低, 而  $G_2/M$  期无明显变化; 0.05、0.1  $\mu\text{mol/L}$  砷染毒组细胞内 cyclin D1 表达水平分别为  $(152.40 \pm 8.17)\%$ 、 $(145.59 \pm 2.89)\%$ , 与对照组  $[(99.99 \pm 1.13)\%]$  比较, 均明显增高; 0.05、0.1  $\mu\text{mol/L}$  砷染毒组细胞内 p21 表达水平分别为  $(64.06 \pm 1.62)\%$ 、 $(39.57 \pm 1.82)\%$ , 均明显低于对照组的  $(99.9 \pm 2.83)\%$ , 呈剂量效应关系 ( $P < 0.05$ )。结论 长期低剂量砷暴露可诱导 HaCat 细胞周期异常, cyclin D1 表达上升, p21 表达下降。

**关键词:** 亚砷酸钠 ( $\text{NaAsO}_2$ ); HaCat 细胞株; 细胞周期; 周期蛋白 D1 (cyclin D1); p21

中图分类号: R 599.9 文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2013)08-1190-03 DOI: 10.11847/zgggws2013-29-08-30

### Influence of low level, long-term arsenite exposure on cell cycle, cyclin D1 and p21 of HaCat cells

LIU Shi-yi, LI Xin (Department of Occupational Health, School of Public Health, China Medical University, Shenyang, Liaoning Province 110001, China)

**Abstract: Objective** To examine the influence of low level, long-term arsenite exposure on cell cycle, cyclin D1 and p21 of human keratinocyte (HaCat) cells. **Methods** HaCat cells were exposed to arsenic (0, 0.05, 0.1  $\mu\text{mol/L}$ ) for 15 weeks; then 10 000 cells were measured to detect cell cycle and protein expression levels of cyclin D1 and p21 were detected by western blot assay. **Results** Compared with those of the control, the number of cells in  $G_0/G_1$  phase increased significantly, while the number of cells in S phase decreased markedly. The protein expression levels of cyclin D1 of 0.05 and 0.1  $\mu\text{mol/L}$  group were  $152.40 \pm 8.17\%$  and  $145.59 \pm 2.89\%$ , respectively, which were significantly higher than that of the control ( $99.99 \pm 1.13\%$ ); the protein expression levels of p21 of 0.05 and 0.1  $\mu\text{mol/L}$  groups were  $64.06 \pm 1.62\%$  and  $39.57 \pm 1.82\%$ , respectively, which were markedly lower than that of the control with dose-effect relationship ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Low level, long-term arsenite exposure could induce aberrant cell cycle and increased expression of cyclin D1 protein but decreased expression of p21 protein in HaCat cells.

**Key words:** sodium arsenite ( $\text{NaAsO}_2$ ); HaCat cell; cell cycle; cyclin D1; p21

砷是一种被确证的人类致癌物<sup>[1]</sup>。目前研究认为, 砷致肿瘤是通过影响细胞内的某些信号转导通路等途径来发挥效应而其本身并不具有致突变作用<sup>[2-3]</sup>。细胞周期的调控异常是细胞发生癌变的重要原因之一, 而周期蛋白 D1 (cyclin D1) 和 p21 在细胞周期的调控中起关键作用<sup>[4]</sup>。目前, 砷致癌性研究多是关于短期砷暴露对皮肤等多种细胞的影响, 而长期低剂量砷暴露对于正常人皮肤细胞周期调控因子的报道相对较少。因此, 本研究采用永生化的正常人皮肤角质形成细胞株 HaCat 进行研究, 探讨低剂量长期砷暴露对 HaCat 细胞周期及 cyclin D1 和 p21 的影响, 初步揭示砷致皮肤癌的发生机制。

### 1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂 Labsystems Multiskan Ascent 354 型全自动酶标仪 (芬兰 Labsystems 公司), BD FACS Calibur 流式细胞仪 (美国 BD 公司), 微型 western bolt 装置 (美国 Bio-Rad 公司), IMAGER 5500 电泳凝胶成像分析仪 (美国 Alpha 公司)。亚砷酸钠 (纯度  $\geq 99.0\%$ , 美国 Fluka 公司), 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS), 胰蛋白酶、达尔伯克改良伊格 (Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM) 培养基 (美国 Hyclone 公司), Bio-Rad 蛋白测定试剂盒 (美国 Bio-Rad 公司), 二氟化树脂 (PVDF) 膜 (美国 Millipore 公司), 细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒 (海门碧云天生物技术研究所),  $\beta$ -actin、cyclin D1、p21 抗体 (美国 Santa 公司), 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (北京中衫金桥生物技术有限公司), 增强化学发光法显色剂 (北京全式金生物技术有限公司), 预染蛋白 marker (美国 Fer-

\* 基金项目: 辽宁省教育厅课题 (L2010705)

作者单位: 中国医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 辽宁 沈阳 110001

作者简介: 刘世宜 (1987 -), 男, 内蒙古赤峰人, 硕士在读, 研究方向: 砷毒性及其防治研究。

通讯作者: 李昕, E-mail: lixin@mail.cmu.edu.cn

mentas 公司)。

1.2 细胞培养及染毒 HaCat 细胞株(中科院上海细胞库),以 DMEM 培养基(10% FBS, 100 U/mL 青、链霉素)常规培养于 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 条件下。以 DMEM 配制 NaAsO<sub>2</sub> 染毒液,终浓度分别为 0(对照)、0.05、0.1 μmol/L,对照组为磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)。每个浓度设 3 个平行样,培养时间为 15 周,隔日换液,每 7 d 传代 1 次,每次均采用新鲜配制的染毒液进行染毒。

1.3 细胞周期测定 染毒 15 周后,待 HaCat 细胞进入对数生长期时,以 0.25% 胰蛋白酶消化,以 5 × 10<sup>4</sup> 个/mL 密度接种于 6 孔板,每孔 2 mL 且每个浓度设 3 个复孔,置于 CO<sub>2</sub> 恒温培养箱 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养,待细胞融合率 > 80% 时,以 0.25% 胰蛋白酶消化,收集细胞至离心管中,按细胞周期检测试剂盒说明书进行操作。采用流式细胞仪测定 10 000 个细胞,用 Cell Quest 软件分析细胞 DNA 分布图,计算 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期、S 期和 G<sub>2</sub>/M 期细胞数。

1.4 蛋白表达水平的 western blot 检测

1.4.1 细胞总蛋白提取 分别将 HaCat 细胞株以 1 × 10<sup>5</sup> 个/mL 密度接种于 10 cm 培养皿,待细胞进入对数生长期后,弃去含砷培养液,用 PBS 清洗 3 次,吸净 PBS,加入细胞裂解液(100 μL/皿),冰上裂解 30 min 后,收集细胞,于 4 °C、以 12 000 × g 离心 5 min 后,提取全蛋白,采用 Bio-Rad 试剂盒测定蛋白浓度,具体操作方法按照试剂盒说明书进行。

1.4.2 Western blot 检测 蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行蛋白表达水平检测。细胞蛋白内参为 β-actin,蛋白上样量为 30 μg/孔道。特异性一抗 cyclin D1(1:1 000)、p21(1:1 000)、β-actin(1:4 000),特异性二抗为辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:5 000)。以增强化学发光法显色剂显色后,立即进行曝光显像,并用凝胶成像分析系统进行蛋白灰度值分析,重复试验 3 次。

1.5 统计分析 用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,组间差异比较采用单因素方差分析,并以 SNK(Student Neuman Keuls)法进行两两比较,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 NaAsO<sub>2</sub> 对 HaCat 细胞周期影响(表 1)

0.05、0.1 μmol/L NaAsO<sub>2</sub> 作用于 HaCat 细胞 15 周后,细胞的 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞数均明显高于对照组,S 期细胞数均明显低于对照组(P < 0.05),而 G<sub>2</sub>/M 期无明显变化。

2.2 NaAsO<sub>2</sub> 对 cyclin D1 蛋白表达影响(表 2、图 1) NaAsO<sub>2</sub> 作用于 HaCat 细胞 15 周后,各染砷组细胞的 cyclin D1 表达均明显高于对照组(P < 0.05)。

表 1 NaAsO<sub>2</sub> 对 HaCat 细胞周期影响(% ,  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

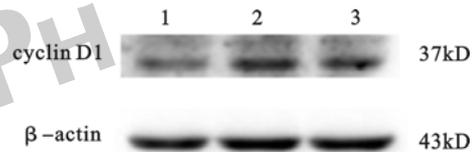
组别(μmol/L)	细胞周期		
	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
对照组	45.97 ± 1.51	44.74 ± 1.62	9.30 ± 0.99
NaAsO <sub>2</sub> 0.05	54.49 ± 1.67 <sup>a</sup>	35.71 ± 0.59 <sup>a</sup>	9.80 ± 1.21
NaAsO <sub>2</sub> 0.1	53.07 ± 1.51 <sup>a</sup>	36.87 ± 0.94 <sup>a</sup>	10.05 ± 0.58

注:与对照组比较,a P < 0.05。

表 2 NaAsO<sub>2</sub> 对 HaCat 细胞 cyclin D1、p21 蛋白表达影响(% ,  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别(μmol/L)	CyclinD1 (%)	p21 (%)
对照组	99.99 ± 1.13	99.99 ± 2.83
NaAsO <sub>2</sub> 0.05	152.40 ± 8.17 <sup>a</sup>	64.06 ± 1.62 <sup>a</sup>
NaAsO <sub>2</sub> 0.1	145.59 ± 2.89 <sup>a</sup>	39.57 ± 1.82 <sup>ab</sup>

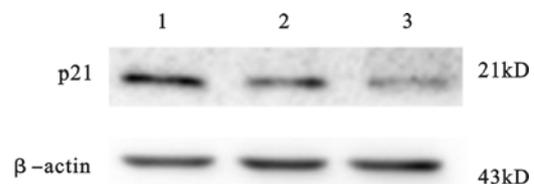
注:与对照组比较,a P < 0.05;与 NaAsO<sub>2</sub> 0.05 μmol/L 组比较,b P < 0.05。



注:1:对照组;2,3:0.05、0.1 μmol/L NaAsO<sub>2</sub> 染毒组。

图 1 NaAsO<sub>2</sub> 对 HaCat 细胞 cyclin D1 蛋白表达水平影响

2.3 NaAsO<sub>2</sub> 对 p21 蛋白表达水平影响(表 2、图 2) NaAsO<sub>2</sub> 作用于 HaCat 细胞 15 周后,各染砷组细胞的 p21 表达均明显低于对照组(P < 0.05),且 0.1 μmol/L 砷染毒组细胞内 p21 蛋白表达水平明显低于 0.05 μmol/L 砷染毒组(P < 0.05)。



注:1:对照组;2,3:0.05、0.1 μmol/L NaAsO<sub>2</sub> 染毒组。

图 2 NaAsO<sub>2</sub> 对 HaCat 细胞 p21 蛋白表达水平影响

## 3 讨论

砷致肿瘤是一个长期缓慢的过程<sup>[5]</sup>,因此,模拟长期砷暴露对于砷致肿瘤的研究具有重要意义。细胞周期正负调节因子 cyclin D1 及 p21 的异常表达是肿瘤发生的原因之一,砷致肿瘤的发生可能与这些因子的异常表达有关。cyclin D1 是细胞增殖

调控的关键蛋白之一,能够结合并激活细胞周期依赖激酶(cyclin-dependent kinase, CDK),促进多种基因转录及 DNA 合成,从而促使细胞由 G<sub>1</sub> 期进入 S/G<sub>2</sub> 期,实现细胞增殖<sup>[6-7]</sup>。p21 是一种 CDK 抑制剂,在正常细胞中与 cyclin-CDK 复合物结合,作用于 G<sub>1</sub>/S 期的转换,抑制细胞周期,表现为负调控细胞生长<sup>[8]</sup>。Liu 等<sup>[9]</sup>发现低剂量砷可导致细胞周期蛋白 cyclin D1 的高表达并促进细胞增殖,并具有明显剂量-效应关系。Taylor 等<sup>[10]</sup>发现低剂量砷可诱导细胞有丝分裂异常及 p21 低表达,并具有明显剂量-效应关系。本研究结果表明,长期低剂量砷暴露能够诱导 HaCat 细胞中 cyclin D1 蛋白表达增高,而 p21 蛋白表达降低,同时,细胞周期中 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例明显增高,而 S 期细胞比例却明显降低。这种现象产生的原因可能与砷诱导细胞周期异常,抑制细胞进行独立分化有关。有研究指出,低剂量的砷在促进细胞增殖的同时,也可抑制细胞进行独立分化<sup>[11]</sup>。细胞为避免分化,不得不先停止在 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期来抑制细胞的分化,然后再进入周期循环,从而表现为增值水平增高的同时 G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期细胞比例增高而 S 期细胞比例有所降低。

#### 参考文献

[1] Valenzuela OL, Borja-Aburto VH, Garcia-Vargas GG, et al. Urinary trivalent methylated arsenic species in a population chronically exposed to inorganic arsenic[J]. Environ Health Perspect,

2005,113(3):250-254.

- [2] Schuhmacher-Wolz U, Dieter HH, Klein D, et al. Oral exposure to inorganic arsenic: evaluation of its carcinogenic and non-carcinogenic effects[J]. Crit Rev Toxicol, 2009, 39(4): 271-298.
- [3] Druwe IL, Vaillancourt RR. Influence of arsenate and arsenite on signal transduction pathways: an update [J]. Arch Toxicol, 2010, 84(8): 585-596.
- [4] Kandel R, Li SQ, Bell R, et al. Cyclin D1 and p21 is elevated in the giant cells of giant cell tumors [J]. Orthop Res, 2006, 24(3): 428-437.
- [5] 杨磊, 顾永清, 潘泽民, 等. 慢性砷染毒的肝细胞 L-02 的基因芯片分析[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(1): 33-34.
- [6] Li YJ, Wei ZM, Meng YX, et al.  $\beta$ -catenin up-regulates the expression of cyclin D1, c-myc and MMP-7 in human pancreatic cancer; Relationships with carcinogenesis and metastasis [J]. World Gastroenterol, 2005, 11: 2117-2123.
- [7] 刘洁, 崔泽实, 周宝森, 等. 女性非小细胞肺癌中细胞周期素 D1 和 E 的表达[J]. 中国公共卫生, 2006, 22(3): 308-310.
- [8] Yao D, Alexander CL, Quinn JA, et al. Fos cooperation with PTEN loss elicits keratoacanthoma not catcinoma, owing to p53/p21/WAF-induced differentiation triggered by GSK3 beta inactivation and reduced AKT activity[J]. Cell Sci, 2008, 121(Pt 10): 1758-1769.
- [9] Liu Y, Hock JM, Sullivan C, et al. Activation of the p38 MAPK/Akt/ERK1/2 signal pathways is required for the protein stabilization of CDC6 and cyclin D1 in low-dose arsenite-induced cell proliferation [J]. Cell Biochem, 2010, 111(6): 1546-1555.
- [10] Taylor BF, McNeely SC, Miller HL, et al. P53 suppression of arsenite-induced mitotic catastrophe is mediated by p21 [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2006, 318(1): 142-151.
- [11] Hwang BJ, Utti C, Steinberg M. Induction of cyclin D1 by submicromolar concentrations of arsenite in human epidermal keratinocytes [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2006, 217(2): 161-167.

收稿日期: 2012-08-30

(解学魁编辑 郑新校对)

#### · 实验研究 ·

## 红三叶草异黄酮对大鼠肝功能及炎症反应影响

侯宁<sup>1</sup>, 宁鸿珍<sup>1</sup>, 高尚<sup>2</sup>, 李清钊<sup>1</sup>, 唐咏梅<sup>1</sup>, 孙彤<sup>1</sup>, 张宇<sup>1</sup>, 郭向娇<sup>1</sup>

**摘要:**目的 观察红三叶草异黄酮对非酒精性脂肪肝大鼠肝功能及炎症反应影响。方法 雄性 SD 大鼠随机分为对照组(喂普通饲料)、造模组(脂肪乳灌胃),同时给予 18% 蔗糖溶液,连续 4 周,将造模成功大鼠按体重随机分为模型组、红三叶草低、中、高剂量组(75、150、300 mg/kg 红三叶草异黄酮灌胃),连续 12 周,检测血清及肝组织中谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、C 反应蛋白(CRP)的活性或含量。结果 与模型组比较,红三叶草组肝细胞损伤减轻,肝功能改善,中剂量红三叶草组大鼠血清 ALT [(65.63 ± 13.00) U/L]、AST [(145.88 ± 34.28) U/L] 含量明显降低 ( $P < 0.05$ );中剂量红三叶草组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、CRP 分别为 (43.24 ± 4.14) ng/mL、(69.94 ± 6.98) pg/mL、(3.06 ± 0.36) mg/L,均明显低于模型组 ( $P < 0.05$ )。结论 红三叶草异黄酮对非酒精性脂肪肝大鼠的肝功能具有保护作用,可降低炎症反应。

**关键词:**红三叶草异黄酮;非酒精性脂肪肝;肝功能;炎症反应

中图分类号: R 151.3 文献标志码: A 文章编号: 1001-0580(2013)08-1192-04 DOI: 10.11847/zgggws2013-29-08-31

## Effect of red clover isoflavones on liver function and inflammatory response of nonalcoholic fatty liver disease in rats

作者单位: 1. 河北联合大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室 河北省煤矿卫生与安全实验室, 河北 唐山 063000; 2. 四川大学轻纺与食品学院食品科学与工程系

作者简介: 侯宁(1985-), 男, 山西人, 硕士在读, 研究方向: 食品安全及营养保健品研发。

通讯作者: 宁鸿珍, E-mail: ningzhz@163.com