

二巯基丙磺酸钠对氯化汞中毒大鼠肾脏基因表达的影响

路文芳, 王秀琴, 姜霞, 武晓燕, 林海鹏, 田宇, 刘占旗

摘要: [目的] 运用基因芯片技术分析二巯基丙磺酸钠(DMPS)驱汞治疗对肾脏基因表达的影响, 为进一步研究无机汞肾损伤及治疗的分子机制提供理论依据。[方法] 健康雄性SD大鼠30只, 随机分成3组, 每组10只, 阳性对照组和治疗组大鼠皮下注射氯化汞溶液建立亚慢性汞中毒肾脏损伤大鼠模型, 阴性对照组大鼠皮下注射0.9% NaCl注射液, 模型建好后治疗组大鼠肌肉注射DMPS驱汞治疗, 阴性对照组和阳性对照组大鼠肌肉注射0.9% NaCl注射液, 治疗结束后用基因芯片方法筛选大鼠肾脏差异表达基因, 并用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法验证部分差异表达基因。[结果] 阳性对照组与阴性对照组比较筛选出差异基因385个; 治疗组与阴性对照组比较筛选出差异基因183个; 治疗组与阳性对照组比较筛选出差异基因223个。DMPS治疗有效基因中明显差异表达基因23个, 其功能涉及毒物、异物代谢, 氧化应激应答, 炎症应答, 转录调节, 离子转运和信号转导, 细胞增殖与凋亡, 胶原纤维、软骨的形成, 神经递质代谢, 糖类、脂类、氨基酸代谢等方面, 并得到RT-PCR方法的验证。[结论] DMPS驱汞治疗可使汞中毒肾脏损伤差异基因得到明显恢复, 这些明显恢复的基因可能在汞中毒肾脏损伤的发生和DMPS治疗中发挥重要作用。

关键词: 二巯基丙磺酸钠; 氯化汞; 肾脏损伤; 基因芯片

Effect of Sodium Dimercaptopropanesulfonate on Gene Expression of Kidney in Mercuric Chloride Treated Rats LU Wen-fang, WANG Xiu-qin, JIANG Xia, WU Xiao-yan, LIN Hai-peng, TIAN Yu, LIU Zhan-qi (Department of Radiological and Environmental Medicine, China Institute for Radiation Protection, State Environmental Protection—Key Laboratory of Environment and Health(Taiyuan), Taiyuan, Shanxi 030006, China) • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To explore the effect of sodium dimercaptopropanesulfonate (DMPS) on gene expression of kidney in HgCl_2 treated rats by gene chips technology, and to provide theoretical basis for the molecular machinery of inorganic mercury-induced kidney injury and treatment. [Methods] Thirty SD male rats were randomly divided into 3 groups (10 each group). An animal model of kidney injury was established by subcutaneous HgCl_2 injection into the positive control group and the treatment group, and the negative control group was given 0.9% NaCl. Then the treatment group were intramuscularly injected with DMPS, the negative and the positive control groups were injected with 0.9% NaCl. After treatment, differentially expressed genes were identified by gene chips and validated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). [Results] A total of 385 genes were identified differentially expressed between the negative and the positive control groups; 183 between the negative control group and the treatment group; and 223 between the positive control group and the treatment group. Among the 23 genes expressed differentially involved in DMPS treatment, the functions included xenobiotic metabolism, oxidative stress response, inflammatory response, ion transport, signal transduction, transcription regulation, cell proliferation and apoptosis, collagen fibril organization and cartilage development, neurotransmitter metabolism, and lipid, glucose and amino acid metabolism, etc. Selected results were confirmed by RT-PCR. [Conclusion] DMPS can recover the differentially expressed genes of kidney induced by HgCl_2 , and these genes may possibly play an important role in kidney injury by mercury exposure and in subsequent DMPS treatment.

Key Words: sodium dimercaptopropanesulfonate; mercuric chloride; kidney injury; gene chips

汞(mercury, Hg), 俗称水银, 常温下银白色液态金属, 有毒, 是一种常见的重金属环境污染物。自然分布的汞不足以对人类造成危害, 但随着工业化社会的进程, 汞被广泛应用于多种行业, 对环境和人体健康造成许多不良影响。实验和临床经

验表明: 汞中毒病人的治疗主要选择二巯基类驱汞药物, 并将二巯基丙磺酸钠(DMPS)作为首选。迄今, 未见用基因芯片的方法研究驱汞药物对汞中毒基因表达的影响。本研究拟应用基因芯片方法研究传统药物DMPS驱汞治疗对氯化汞(HgCl_2)中毒肾脏基因表达的影响, 为进一步研究无机汞肾脏损伤及治疗的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康雄性SD大鼠30只, 体重(100 ± 20)g, 中国军事科学

[基金项目] 环保公益性行业科研项目(编号: 200909101, 201009044)

[作者简介] 路文芳(1976—), 女, 硕士, 助理研究员; 研究方向: 环境卫生与职业卫生; E-mail: luwenfang1226@126.com

[作者单位] 中国辐射防护研究院放射医学与环境医学研究所, 国家环境保护环境与健康重点实验室(太原), 山西 太原 030006

研究院实验动物中心提供,无特定病原体(SPF)级,动物合格证号:SCXK-(军)2007-004;HgCl₂,分析纯,由泰兴市化学试剂厂提供;0.9%NaCl注射液,由山东华鲁制药有限公司提供;DMPS,由上海禾丰制药有限公司提供;大鼠全基因组表达谱芯片RatRef-12(含22000个基因,每个基因约30个重复位点),由美国Illumina公司生产,上海博星基因芯片公司提供;Unizol RNA提取试剂,由上海博星公司提供;引物由上海英骏生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 建立汞中毒肾脏损伤动物模型 将大鼠按体重随机分成阴性对照组、阳性对照组、治疗组共3组,每组10只。阳性对照组、治疗组大鼠背部皮下注射HgCl₂溶液0.2mg/kg(染毒剂量根据前期急性试验LD₅₀确定),阴性对照组背部皮下注射0.9%NaCl注射液1mL/kg,均每天1次,染毒2个月后将大鼠放入代谢笼留取12h夜尿,检查尿N-乙酰-β-D氨基葡萄糖苷酶、微量白蛋白、总蛋白、肌酐含量。若以上检测指标异常则提示出现肾脏早期损伤并停止染毒,否则继续染毒直到建立汞中毒肾脏损伤模型。

1.2.2 驱汞治疗及取材 判定造模成功后,治疗组大鼠后腿肌肉注射DMPS 2mg/kg,每天1次,连续治疗3d后间歇4d为一个疗程^[1-2],共3个疗程。阴性对照组、阳性对照组大鼠后腿肌肉注射0.9%NaCl注射液1mL/kg,疗程同治疗组。治疗结束后,将大鼠用40mg/kg戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,固定于解剖台上,开腹切取同侧肾脏在0.9%NaCl溶液中漂洗,去除血渍和污物,装入标记好的冷冻保存管中,迅速液氮保存备用。

1.2.3 肾脏总RNA提取 从阴性对照组、阳性对照组和治疗组中,各随机选取3个肾脏组织样本,用Unizol试剂按照说明书分别提取总RNA,并进行RNA质量检测。

1.2.4 RNA的扩增、纯化 将各组内3个RNA样本等质量混合作为一个芯片实验样本。经反转录、扩增、生物素-神经丝蛋白(Biotin-NTP)标记并纯化得到cRNA,其步骤参照Illumina Total Prep RNA扩增试剂盒说明操作。

1.2.5 杂交、洗涤、干燥 每组各取0.75μg cRNA样本,按照Hybridize 12-Sample BeadChip with IntelliHyb Seal说明书操作,将加好待检样本的大鼠全基因组RatRef-12芯片放入58℃杂交炉中保温16~20h进行杂交,经多次洗涤、Cy3荧光显色后自然干燥。

1.2.6 扫描、分析 用Illumina公司提供的BeadStation 500 System扫描仪扫描芯片,用BeadStudio Gene Expression Module分析软件将芯片灰度扫描信号转换成数字信号,用Cubic Spline归一化方法对原始数值进行处理,得到芯片上每个基因点的数字信号值。将阳性对照组、治疗组、阴性对照组的数字信号值进行两两比较,得到差异分值,以差异分值>20为表达上调基因,<-20为表达下调基因。

1.2.7 逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)验证 选择部分差异表达基因,用RT-PCR进行验证。以β-actin为管家基因,引物序列见表1。逆转录条件为:65℃ 5min;42℃ 2min;52℃ 2h;70℃ 15min终止反应。PCR条件为:50℃ 2min;95℃ 10min;95℃ 15s,60℃ 1min(40个循环);95℃ 15s;

60℃ 15s;95℃ 15s。

表1 目的基因引物序列

基因名称	方向	引物序列	引物长度(bp)	产物长度(bp)
Gstm1	正向	5'AAGTTGGCCCAATGGAGTAAC 3'	21	130
	反向	5'AGAAGGGAGCAGGAAGGAGA 3'	20	
Comt	正向	5'CGCCTGTCATCCCCAGTATC 3'	20	89
	反向	5'GCCCTGGCTGTCTTGGAACT 3'	20	
Slc22a7	正向	5'TCAGACAGACAGGATTGGGACTTAC 3'	23	97
	反向	5'CAACTTTGGGCAGCAACAGC 3'	20	
β-actin	正向	5'AGATTACTGCCCTGGCTCCTAC 3'	22	144
	反向	5'CATCGTACTCCTGCTGTGAT 3'	22	

1.3 统计分析

本实验所得染毒后大鼠肾脏功能生化指标数据以均数±标准差表示,采用单因素方差分析法(ANOVA)进行组间差异的显著性检验,两处理组分别与阴性对照组比较用dunnett-t检验。检验水准α=0.05。

经软件自动分析,以管家基因β-actin为参比基因,导出相应的循环域值,即Ct值。用2^{-ΔΔCt}方法计算基因相对表达量比值,即Fold值(Fold=2^{-ΔΔCt}),Fold值>1为表达上调基因,<1为表达下调基因,而由于2^{-ΔΔCt}法将PCR的扩增效率设定为1,但实际的扩增效率不可能达到1,因此该法计算的相对定量结果通常比实际结果要高,因此实际工作中常以大于1.5或小于0.5为明显差异基因的判断标准。

2 结果

2.1 染毒后大鼠表现

阴性对照组大鼠体重均一,皮毛光滑亮泽,反应灵敏。在染毒期间,阳性对照组、治疗组大鼠皮毛杂乱、脱落、无光泽、污秽不洁;染毒1个月后,脱毛现象加重,首先为头面部,以后延展至脚趾、背部、腹部,总体摄食量和体重随染毒时间的延长有下降趋势。在治疗期间,治疗组大鼠脱毛现象明显改善,原脱毛部位长出了新的被毛,摄食量、体重下降趋势有所好转,而阳性对照组大鼠无明显改善。

2.2 染毒后尿液肾功能生化指标

以尿肌酐校正尿肾功能的检测指标,阳性对照组、治疗组大鼠尿中N-乙酰-β-D氨基葡萄糖苷酶、微量白蛋白、总蛋白含量均比阴性对照组有不同程度的增加。阳性对照组、治疗组分别与阴性对照组比较,尿N-乙酰-β-D氨基葡萄糖苷酶和微量白蛋白差异均有统计学意义(P<0.05),见表2。

表2 HgCl₂染毒2月后大鼠尿液肾功能生化指标检测结果($\bar{x} \pm s$)

组别	n	N-乙酰-β-D氨基葡萄糖苷酶 (U/g肌酐)	微量白蛋白 (mg/g肌酐)	总蛋白 (mg/g肌酐)
阴性对照组	10	7.46 ± 3.17	3.68 ± 1.71	418.30 ± 221.25
阳性对照组	10	12.10 ± 4.68*	32.06 ± 26.99*	635.75 ± 436.39
治疗组	10	11.98 ± 5.26*	29.58 ± 24.43*	613.17 ± 470.77

[注]*:与阴性对照组比较,P<0.05。

2.3 差异表达基因筛选结果

将 3 组基因两两比较, 筛选出差异常基因数见表 3。表 4 列出了治疗组与阳性对照组比较所得差异基因中差异分值 <-50 和 >50 的差异表达基因。

表 3 HgCl₂ 染毒 2 月后各组大鼠比较筛选的差异表达基因数

比较组别	差异基因数	上调基因数	下调基因数
阳性对照组/阴性对照组	385	139	246
治疗组/阴性对照组	183	77	106
治疗组/阳性对照组	223	140	83

表 4 治疗组与阳性对照组比较明显差异表达基因

基因名称	基因描述	差异分值	基因功能
<i>Comt</i>	Rattus norvegicus catechol-O-methyltransferase(<i>Comt</i>), mRNA.	-80.59	神经递质代谢
<i>Gstm1</i>	Rattus norvegicus glutathione S-transferase, mu 1(<i>Gstm1</i>), mRNA.	-149.97	感知觉
<i>Nqo1</i>	Rattus norvegicus NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1(<i>Nqo1</i>), mRNA.	-55.59	毒物代谢、神经细胞凋亡、氧化应激应答
<i>Pgam2</i>	Rattus norvegicus phosphoglycerate mutase 2(<i>Pgam2</i>), mRNA.	-52.71	调节横纹肌收缩
<i>Serpina3n</i>	Rattus norvegicus serine(or cysteine)peptidase inhibitor, clade A, member 3N(<i>Serpina3n</i>), mRNA.	-107.20	炎症应答
<i>Ugt2b3</i>	Rattus norvegicus UDP glycosyltransferase 2 family, member 3(<i>Ugt2b3</i>), mRNA.	-66.94	异物代谢、类固醇代谢
<i>Slc22a7</i>	Rattus norvegicus solute carrier family 22(organic anion transporter), member 7(<i>Slc22a7</i>), mRNA.	63.23	离子转运
<i>Tacstd2</i>	Rattus norvegicus tumor-associated calcium signal transducer 2(<i>Tacstd2</i>), mRNA.	66.93	细胞增殖、信号连接细胞表面受体
<i>Matn1</i>	Rattus norvegicus matrilin 1, cartilage matrix protein(<i>Matn1</i>), mRNA.	92.98	胶原纤维及软骨形成
<i>Scd1</i>	Rattus norvegicus stearoyl-Coenzyme A desaturase 1(<i>Scd1</i>), mRNA.	88.55	脂肪酸生物合成
<i>Sds</i>	Rattus norvegicus serine dehydratase(<i>Sds</i>), mRNA.	68.31	糖异生、氨基酸代谢
<i>Serpina10</i>	Rattus norvegicus serine(or cysteine)peptidase inhibitor, clade A(alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 10(<i>Serpina10</i>), mRNA.	50.14	组织再生
<i>Akr1b1</i>	Rattus norvegicus aldo-keto reductase family 1, member B1(aldose reductase)(<i>Akr1b1</i>), mRNA.	60.59	糖代谢
<i>Akr1b7</i>	Rattus norvegicus aldo-keto reductase family 1, member B7(<i>Akr1b7</i>), mRNA.	111.11	脂代谢
<i>Bnip3</i>	Rattus norvegicus BCL2/adenovirus E1B 19 kDa-interacting protein 3(<i>Bnip3</i>), nuclear gene encoding mitochondrial protein, mRNA.	96.18	参与细胞凋亡、调节线粒体膜通透性、活性氧代谢
<i>Clcnka</i>	Rattus norvegicus chloride channel Ka(<i>Clcnka</i>), mRNA.	72.02	离子转移、体液调节
<i>Cmtm2a</i>	Rattus norvegicus CKLF-like MARVEL transmembrane domain containing 2A(<i>Cmtm2a</i>), mRNA.	81.16	负向调节转录
<i>Cyp1a1</i>	Rattus norvegicus cytochrome P450, family 1, subfamily a, polypeptide 1(<i>Cyp1a1</i>), mRNA.	98.65	二恶英代谢
<i>Cyp2c</i>	Rattus norvegicus Cytochrome P450, subfamily IIC(mephenytoin 4-hydroxylase)(<i>Cyp2c</i>), mRNA.	58.05	异物代谢
<i>Egr1</i>	Rattus norvegicus early growth response 1(<i>Egr1</i>), mRNA.	61.31	转录调节
<i>Fos</i>	Rattus norvegicus FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog(<i>Fos</i>), mRNA.	51.41	转录调节、炎症应答
<i>Fst</i>	Rattus norvegicus follistatin(<i>Fst</i>), mRNA.	88.56	调节卵泡刺激素分泌
<i>Gfra4</i>	Rattus norvegicus glial cell line derived neurotrophic factor family receptor alpha 4(<i>Gfra4</i>), mRNA.	55.60	酪氨酸激酶信号通路跨膜受体蛋白

2.4 RT-PCR 验证结果

以管家基因 β -actin 为内参, 对目的基因 *Slc22a7*、*Gstm1*、*Comt* 进行 RT-PCR 验证, 结果见表 5。目的基因的 RT-PCR 基因表达趋势(Fold 值)与芯片基因表达趋势(差异分值)一致, 表明基因芯片实验结果可靠。

表 5 HgCl₂ 染毒 2 月后大鼠部分目的基因 RT-PCR 结果及芯片差异值

基因名称	比较组别	Fold 值	芯片差异分值
<i>Slc22a7</i>	阳性对照组/阴性对照组	0.13	-67.27
	治疗组/阴性对照组	0.60	-6.03
	治疗组/阳性对照组	4.45	63.23
<i>Gstm1</i>	阳性对照组/阴性对照组	5.39	374.34
	治疗组/阴性对照组	0.52	9.90
	治疗组/阳性对照组	0.10	-149.97
<i>Comt</i>	阳性对照组/阴性对照组	1.79	104.63
	治疗组/阴性对照组	0.64	9.76
	治疗组/阳性对照组	0.36	-80.59

3 讨论

汞是一种重要的环境有毒污染物, 摄入不同形态的汞均可造成机体的损害, 其生物学效应表现为以肾脏和神经系统损伤

为主的多器官损伤。尿 N-乙酰- β -D 氨基葡萄糖苷酶和微量白蛋白是反映肾小管上皮细胞和肾小球基底膜早期损伤的重要指标^[3-5], 本实验染毒后阳性对照组、治疗组大鼠尿 N-乙酰- β -D 氨基葡萄糖苷酶、微量白蛋白与阴性对照组比较差异均有统计学意义, 提示阳性对照组和治疗组大鼠均已出现汞中毒肾脏早期损害。

已有研究证实, 汞作为一种基因毒物可明显改变影响细胞生存和凋亡的基因表达, 如金属硫蛋白(*Mt*)、谷胱甘肽 S 转移酶(*GST-pi*, *mGST1*)、溶质转运体(*Slc22a*)、碳酸酐酶(*Ca*)、转录因子 *c-jun/AP-1* 等基因^[6-9]。本实验在阳性对照组中筛查出的差异基因中也包含这些基因。

DMPS 为巯基络合剂, 可与多种金属形成络合物, 以促排汞的效果最好。PINGREE 报道^[10], DMPS 在体内不发生重要的代谢反应, 它与汞亲和力较大, 能夺取已经与酶结合的金属, 而恢复酶的活性。DMPS 分子中的巯基与体内的二价汞离子结合, 形成的络合物可经尿排出体外, 达到驱汞效果。本实验运用基因芯片方法从基因水平分析 DMPS 驱汞治疗对 HgCl₂ 肾脏损伤基因表达的影响, 结果显示, DMPS 驱汞治疗对 HgCl₂ 肾脏损伤的基因表达有明显向正常水平改善趋势, 而且芯片实验结果得到了 RT-PCR 方法的验证。

(下转第 588 页)

防治纳入目前农村“新农合”制度中。在目前综合保险与城镇保险并轨设计过程中,尽快修订属地《工伤保险实施办法》,将农民工的工伤保险赔偿纳入全市职工工伤保障的统一体系中,如果暂无条件,应先将农民工的职业病保障与本市职工接轨,以享受“同城同险”待遇。

•作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1]胡锦涛.高举中国特色社会主义伟大旗帜,为夺取全面建设小康社会新胜利而奋斗[R].北京:人民出版社,2007.
- [2]人民网.对话成思危:7门外语与1部《世界经济发展宣言》

[EB/OL].(2003-10-07).<http://www.people.com.cn/GB/jingji/1037/2121452.html>.

- [3]熊敏如.21世纪我国职业卫生展望[J].中国职业医学,2000,27(4):40-42.
- [4]叶方立.职业卫生与全球化[J].科技进步与对策,2001(2):159-160.
- [5]吴立冬.国外和港台地区安全生产法规选编[M].北京:中国公安人民大学,2005.

(收稿日期:2011-07-12)

(英文编审:金克峙;编辑:徐新春;校对:王晓宇)

(上接第585页)

芯片信号差异分值显示,阳性对照组与阴性对照组比较筛查出差异基因数为385个,治疗组与阴性对照组比较筛查出差异基因数为183个,治疗后差异基因数比治疗前减少了202个,上下调基因数分别相应减少。结果提示,经DMPS治疗可使汞中毒肾脏损伤差异基因得到一定程度的恢复。

治疗组与阳性对照组比较所得的差异基因,即DMPS治疗得到恢复的有效基因。从差异分值上可见,DMPS有效基因数为223个,其中上调基因数140个,下调基因数83个。从这些差异基因中筛选出的差异分值<-50和>50的明显差异表达基因,其功能涉及毒物/异物代谢、氧化应激应答、炎症应答、转录调节、离子转运和信号转导、细胞增殖与凋亡、胶原纤维及软骨的形成、神经递质代谢、糖类、脂类和氨基酸代谢等方面。与汞中毒阳性对照组中筛查出的差异基因功能一致,表明汞中毒肾脏损伤差异基因经DMPS治疗得到了明显恢复,这些基因可能在汞中毒肾脏损伤的发生和DMPS治疗中发挥了重要作用,为研究无机汞肾损伤及治疗的分子机制提供方法和理论依据。但由于本次实验样本量仍较少,对DMPS肾脏基因表达的影响仅是初步探索,还有待于进一步加大样本量并深入研究。

•作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1]中华人民共和国卫生部.GBZ 89—2002 职业性汞中毒诊断标准[S].北京:人民卫生出版社,2002.
- [2]刘占旗,王秀琴,罗福堂.职业性汞中毒的诊疗措施[J].辐射防护通讯,2003,23(4):39-41.

- [3]杨丽华.尿NAG、微量白蛋白、 α_1 -微球蛋白检测在早期诊断肾脏损伤中的作用[J].中华医学杂志,2004,28(4):271-272.
- [4]D'AMICO G, BAZZI C. Urinary protein and enzyme excretion as markers of tubular damage[J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2003, 12(6):639-643.
- [5]赵立强,沈江,游全程,等.汞中毒肾脏损害的早期监测指标筛选[J].四川大学学报:医学版,2008,39(3):461-463.
- [6]DI GIUSTO G, ANZAI N, RUIZ ML, et al. Expression and function of Oat1 and Oat3 in rat kidney exposed to mercuric chloride[J]. Arch Toxicol, 2009, 83(10):887-897.
- [7]SHENKER BJ, PANKOSKI L, ZEKAVAT A, et al. Mercury-induced apoptosis in human lymphocytes: caspase activation is linked to redox status[J]. Antioxid Redox Signal, 2002, 4(3):379-389.
- [8]LIU J, LEI D, WAALKES MP, et al. Genomic analysis of the rat lung following elemental mercury vapor exposure[J]. Toxicol Sci, 2003, 74(1):174-181.
- [9]BRAMBILA E, LIU J, MORGAN DL, et al. Effect of mercury vapor exposure on metallothionein and glutathione s-transferase gene expression in the kidney of nonpregnant, pregnant, and neonatal rats[J]. J Toxicol Environ Health A, 2002, 65(17):1273-1288.
- [10]PINGREE SD, SIMMONDS PL, WOODS JS. Effects of 2, 3-dimercapto-1-propanesulfonic acid(DMPS) on tissue and urine mercury levels following prolonged methylmercury exposure in rats[J]. Toxicol Sci, 2001, 61(2):224-233.

(收稿日期:2011-09-02)

(英文编审:金克峙;编辑:王晓宇;校对:郭薇薇)