

维生素 E 对氯化镍染毒大鼠肺组织 *p15* 基因甲基化过程的影响

杨瑾, 王志武, 刘承芸, 郭庆峰, 张玲

摘要: [目的] 探讨维生素 E(VE)对氯化镍染毒大鼠肺组织 *p15* 基因甲基化过程的影响。[方法] 以 0.1、0.2、0.4 和 0.8 mg/mL 氯化镍灌胃染毒大鼠, 并设立对照组(生理盐水)和拮抗组(0.8 mg/mL 氯化镍 + 5 mg/mL VE), 持续 6 周。染毒结束后处死大鼠, 制备肺组织匀浆, 采用分光光度法, 测定谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)水平的变化; 以荧光定量 PCR 法检测肺组织中抑癌基因 *p15* 的表达水平; 以甲基化 PCR 法检测 *p15* 启动子甲基化状态; 以 Western-blot 检测 DNA 甲基转移酶 1(DNMT1)和蛋氨酸腺苷转移酶 2A(MAT2A)的表达水平。[结果] 随着氯化镍染毒剂量的增加, MDA 含量显著升高, GSH 含量显著下降($P < 0.01$); 与相同剂量染毒组相比, 拮抗组大鼠肺组织中 MDA 含量降低, GSH 含量升高($P < 0.05$); 对照组大鼠肺组织 *p15* 启动子为非甲基化状态, 染毒组大鼠肺组织 *p15* 启动子甲基化和非甲基化条带均有表达; 各染毒组 *p15* mRNA 表达量与对照组相比均显著性降低($P < 0.01$), 使用抗氧化剂 VE 后 *p15* mRNA 表达量与相同剂量染毒组相比显著性增高($P < 0.05$); 随着染毒剂量的增高, DNMT1 和 MAT2A 表达量显著性升高, 与对照组相比, 最高剂量染毒组 DNMT1 和 MAT2A 的表达量分别增高了 1.52 倍和 1.49 倍。使用拮抗剂 VE 后, 与相同剂量染毒组相比 DNMT1 和 MAT2A 的表达量分别降低了 10% 和 29%; 双变量相关分析显示大鼠肺组织中 GSH 含量与 DNMT1 和 MAT2A 蛋白表达水平呈负相关关系, 相关系数分别为 $r = -0.889$ ($P = 0.018$) 和 $r = -0.821$ ($P = 0.044$)。[结论] 维生素 E 可能通过影响 GSH 在氯化镍染毒大鼠肺组织中的含量而影响 *p15* 基因的甲基化过程。

关键词: 氯化镍; 维生素 E; 甲基化

Effects of Vitamin E on the Methylation of *p15* in Lung of Rats Exposed to Nickel Chloride YANG Jin, WANG Zhi-wu, LIU Cheng-yun, GUO Qing-feng, ZHANG Ling (Department of Occupational Health, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effects of vitamin E on the methylation of *p15* in lung of rats exposed to nickel chloride. [Methods] The rats were fed by gavage with the designed concentrations of $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.1, 0.2, 0.4 and 0.8 mg/mL) for four different exposed groups and 0.9% NaCl solution for the solvent control group. The antagonism group was supplied with vitamin E (5 mg/mL) along with 0.8 mg/mL NiCl_2 . After treating the rats for six weeks, we detected the levels of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) to assess oxidative stress in the lung tissues. In addition, we also evaluated the methylation status and expressions of tumor suppressor gene *p15* using methylation specific PCR and quantitative real time PCR. DNA methyltransferase (DNMT1) and methionine adenosyltransferase 2A (MAT2A) that play key role in methylation process were detected by western blot. [Results] Compared with the control group, the levels of MDA in lung of the rats exposed to nickel chloride increased significantly, while the levels of GSH decreased significantly ($P < 0.01$). As compared with the high-dose group (0.8 mg/mL NiCl_2), a significant increase in GSH contents was observed in the antagonism group ($\text{NiCl}_2 + \text{VE}$), while the levels of MDA decreased significantly ($P < 0.05$). The tumor suppressor gene of *p15* was found to be non-methylated in the control group. The methylation and non-methylation of *p15* were both observed in NiCl_2 exposure groups and VE antagonism group. Compared with the control group, the levels of *p15* were down-regulated significantly in the NiCl_2 exposure groups ($P < 0.01$). As compared with the high-dose group (0.8 mg/mL NiCl_2), a significant increase in *p15* levels was observed in the antagonism group ($\text{NiCl}_2 + \text{VE}$) ($P < 0.05$). The levels of DNMT1 and MAT2A significantly increased as the concentrations of NiCl_2 increased, and the ratios increased 1.52- and 1.49- folds in the high-dose group respectively compared with the control group. Compared with the high-dose group, the relative ratios of DNMT1 and MAT2A in the antagonism ($\text{NiCl}_2 + \text{VE}$) group decreased 18% and 29% respectively. We found that the levels of GSH were correlated negatively with the relative expressions of DNMT1 ($r = -0.889$, $P = 0.018$) and MAT2A ($r = -0.821$, $P = 0.044$). [Conclusion] Our findings suggest that glutathione influenced by vitamin E may play important role in DNA methylation.

Key Words: nickel chloride; Vitamin E; methylation

[基金项目] 山西省青年科技研究基金资助项目(编号: 2009021044-1); 山西省高等学校优秀青年学术带头人支持计划资助(编号: 晋教科[2010]4号)

[作者简介] 杨瑾(1975—), 女, 博士, 副教授; 研究方向: 分子毒理学; E-mail: yj750410@163.com

[作者单位] 山西医科大学公共卫生学院劳动卫生学教研室, 山西 太原 030001

由于镍具有耐高温和抗腐蚀的性能,因此被广泛应用于现代工业。在镍冶炼、合金制造、机械制造、原子能工业和蓄电池生产等多种领域都可接触到镍及其化合物。此外含镍不锈钢制品的广泛使用,矫形外科使用含镍的义齿及义肢等使得镍的过量接触成为重要的公共卫生学课题。流行病学研究证实长期暴露于镍化合物的职业工人肺癌和鼻腔癌的发病率显著升高^[1],体内、外实验研究均证实了镍化合物的致癌性^[2,3]。国际癌症研究中心(IARC)于1990年将镍及其化合物列为第一类致癌物^[4]。虽然镍化合物致癌的机制目前尚不清楚,但目前的研究认为氧化应激和表观遗传在其中发挥重要的作用^[5]。CREPPY等发现活性氧可以通过表观修饰而影响基因的表达^[6-8]。本研究拟观察抗氧化剂维生素E(VE)对氯化镍染毒大鼠肺组织中抑癌基因*p15*甲基化状态和表达水平的影响,以阐述DNA甲基化和脂质过氧化(lipid peroxidation, LPO)在镍染毒大鼠中的关联性,为探索镍致癌机制提供实验室依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与主要试剂

氯化镍(NiCl₂·6H₂O),分析纯(北京北化精细化学品有限责任公司);VE,分析纯(Sigma公司);谷胱甘肽(glutathione, GSH)和丙二醛(maleic dialdehyde, MDA)试剂盒(南京建成生物工程研究院);DNA提取试剂DNAiso(TaKaRa, Code: D305A, 大连);RNA提取试剂RNAiso(TaKaRa, Code: D312, 大连);逆转录试剂盒(TaKaRa, Code: DRR037S, 大连);荧光定量PCR试剂盒(TaKaRa, Code: DRR081A, 大连);DNA甲基化检测试剂盒(Zymo Research Corporation, Code: D5001, 美

国);DNA甲基转移酶1(DNA methyltransferase 1, DNMT1)抗体(Santa Cruz, Code: sc-20701, 美国);蛋氨酸腺苷转移酶2A(methionine adenosyltransferase 2A, MAT2A)抗体(Santa Cruz, Code: sc-28031, 美国);荧光定量PCR仪(STRATA GENE公司, 美国)高速冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂);JY92-II超声波细胞粉碎机(上海新芝生物技术研究所)。

1.2 方法

1.2.1 动物染毒与分组 健康雄性SD大鼠36只,体重160~180g,活动能力相近,由山西医科大学实验动物中心提供,称重后按体重编号,将动物随机分为6组:空白对照组,0.1、0.2、0.4、0.8 mg/mL NiCl₂染毒组和拮抗组(0.8 mg/mL NiCl₂ + 5 mg/mL VE)组。各组以每100 g体重1 mL的剂量灌胃染毒。按照灌胃容积将NiCl₂溶于生理盐水中配制成相应浓度的溶液,空白对照组以生理盐水灌胃。各组动物均正常喂饲与饮水,每周染毒5 d,持续6周,每周一称量大鼠的体重,根据体重变化调整灌胃剂量。染毒结束后股动脉放血处死动物,分离肺脏,保存于-80℃冰箱内备用。

1.2.2 MDA和GSH的测定 从冰箱取出冰冻肺组织,切下约0.1 g,按1:10比例加入生理盐水至1 mL。超声波细胞粉碎机粉碎细胞,制成10%组织匀浆,4℃ 12 000 × g离心10 min,取上清,以考马斯亮蓝法测定蛋白含量,然后按照MDA和GSH试剂盒说明测定。

1.2.3 *p15*启动子甲基化状态 用DNAiso提取各组大鼠肺组织DNA, DNA样本使用甲基化检测试剂盒,经亚硫酸氢盐转变后纯化,回收的DNA按表1所列引物和反应条件进行扩增,扩增产物以2%琼脂糖凝胶电泳,紫外照射显带。

表1 甲基化特异性PCR引物和反应条件

Table 1 Primer and PCR condition for methylation specific PCR analysis

基因 Gene	引物类型 Type of primer	上游引物 Forward primer (5' to 3')	下游引物 Reverse primer (5' to 3')	PCR反应条件 PCR condition
<i>p15</i>	甲基化 Methylation	GGAGGATTATTTTTGTTACGGATC	GACGTTAAATCTACGCCGAC	94℃ 5 min 1cycle; 94℃ 30s, 49℃ 30s, 72℃ 30s, 38 cycle; 72℃ 5 min 1cycle
<i>p15</i>	非甲基化 No-methylation	GAGGATTATTTTTGTTATGGATTGG	TAACAACATTAATAATCTACACCAAC	94℃ 5 min 1cycle; 94℃ 30s, 51℃ 30s, 72℃ 30s, 38 cycle; 72℃ 5 min 1cycle

1.2.4 *p15* mRNA表达水平 用RNAiso提取肺组织总RNA,根据TaKaRa real time PCR 逆转录试剂盒说明书进行逆转录。应用美国STRATA GENE公司MX300P实时定量PCR仪,按照

TaKaRa DRR081A试剂盒标准程序进行定量检测,引物和反应条件见表2。每个样品做3个平行样,采用相对定量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行计算。

表2 实时定量PCR引物和反应条件

Table 2 Primer and PCR condition for quantitative real-time PCR analysis

基因(Gene)	上游引物(Forward primer) (5' to 3')	下游引物(Reverse primer) (5' to 3')	PCR反应条件(PCR condition)
<i>p15</i>	TGT GAG GCA CTG AAG TGG GTT TA	GAA CTG GGT CAC CGT TTA GCA GA	95℃ 10s 1cycle; 95℃ 5s, 49℃ 30s, 60℃ 30s, 40 cycle
β -actin	TGA GAC CTT CAA CAC CCC AG	GCC ATC TCT TGC TCG AAG TC	

1.2.5 DNMT1和MAT2A蛋白表达水平 取50 mg肺组织,加500 μ L裂解液[含0.1 mol/L NaCl, 0.01 mol/L Tris HCl(pH7.6), 1 mmol/L EDTA(pH8.0), 100 μ g/mL苯甲基磺酰肼, 2 μ g/mL亮抑酶肽],以超声波细胞粉碎机粉碎,4℃ 12 000 × g离心10 min,取上清,以考马斯亮蓝法测定蛋白含量,调蛋白浓度一致。

用Western-blot方法检测蛋白表达水平。用增强化学发光法(enhanced chemiluminescence, ECL)检测蛋白质表达,胶片扫描保存。实验重复进行3次,用Gel-Pro Analyzer(Ver 3.0)软件对胶片上蛋白质条带进行灰度值测定。用目的蛋白与 β -Actin的灰度值比作为蛋白表达的相对含量。以对照组蛋白表达相对

量为基准 1, 计算其它各组蛋白表达相对量与对照组蛋白表达相对量的比值。

1.2.6 统计学分析 用 SPSS 12.0 软件进行最小显著差法的单因素方差分析, 两组间的比较采用最小显著差法。两组变量相关性分析采用双变量相关分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠肺组织 MDA 和 GSH 测定结果

由表 3 可知, 随着氯化镍染毒剂量的增加, MDA 含量显著增多 ($r=0.795, P<0.01$), GSH 含量显著减少 ($r=0.770, P<0.01$), 且各染毒组与对照组相比差异有统计学意义 ($P<0.01$); 抗氧化剂 VE 拮抗组大鼠肺组织中 MDA 含量降低, GSH 含量增高, 与最高剂量染毒组相比差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 3 各组大鼠肺组织 MDA 和 GSH 测定结果 ($\bar{x} \pm s$)

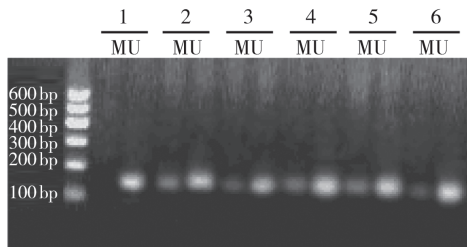
Table 3 Levels of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) in lung tissue of rats

组别 Groups	丙二醛 MDA ($\mu\text{mol/g prot}$)	谷胱甘肽 GSH (mg/g prot)
对照组 (Control)	10.15 \pm 1.17	0.28 \pm 0.03
0.1 mg/mL NiCl ₂	36.60 \pm 8.09 ^{**▲}	0.18 \pm 0.02 ^{**▲}
0.2 mg/mL NiCl ₂	55.04 \pm 4.11 ^{**}	0.15 \pm 0.01 ^{**▲}
0.4 mg/mL NiCl ₂	64.20 \pm 2.52 ^{**}	0.12 \pm 0.01 ^{**}
0.8 mg/mL NiCl ₂	67.95 \pm 7.49 ^{**}	0.11 \pm 0.01 ^{**}
0.8 mg/mL NiCl ₂ +5 mg/mL VE	58.54 \pm 6.72 ^{**▲}	0.14 \pm 0.01 ^{**▲}

[注]**: 与对照组比较 (Compared with the control group), $P<0.01$; ▲: 与 0.8 mg/mL NiCl₂ 组比较 (Compared with the high-dose NiCl₂ group 0.8 mg/mL), $P<0.05$ 。

2.2 大鼠肺组织 p15 甲基化状态

由图 1 可见, 对照组大鼠肺组织 p15 启动子为非甲基化状态, 染毒组大鼠肺组织 p15 启动子甲基化和非甲基化条带均有表达, VE 拮抗组未能改变染镍大鼠肺组织 p15 启动子不完全甲基化状态。



1: 对照组 (Control group); 2: 0.1 mg/mL NiCl₂; 3: 0.2 mg/mL NiCl₂; 4: 0.4 mg/mL NiCl₂; 5: 0.8 mg/mL NiCl₂; 6: 拮抗组 (The antagonism group); M: 甲基化产物 (Methylated DNA); U: 非甲基化产物 (Non-methylated DNA)。

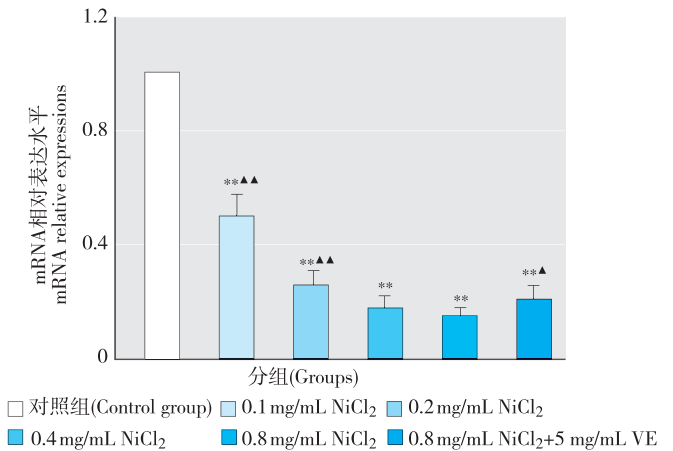
图 1 各组大鼠肺组织 p15 甲基化状态

Figure 1 Methylation status of p15 in lung tissue of rats

2.3 大鼠肺组织 p15 mRNA 的表达水平

由图 2 可见, 随着染毒剂量增加, 各染毒组 p15 mRNA 表

达量与对照组相比均显著性降低 ($r=-0.745, P<0.01$)。使用抗氧化剂 VE 后 p15 mRNA 表达量与最高剂量染毒组相比显著性增高 ($P<0.05$)。



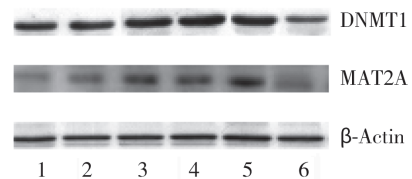
[注]**: 与对照组相比 (Compared with the control group), $P<0.01$; ▲: 与 0.8 mg/mL NiCl₂ 组相比 [Compared with the high-dose NiCl₂ group (0.8 mg/mL)], $P<0.05$; ▲▲: 与 0.8 mg/mL NiCl₂ 组相比 [Compared with the high-dose NiCl₂ group (0.8 mg/mL)], $P<0.01$ 。

图 2 各组大鼠肺组织 p15 mRNA 相对水平

Figure 2 Relative expressions of p15 mRNA in lung tissue of rats

2.4 大鼠肺组织 DNMT1 和 MAT2A 蛋白表达水平

图 3 显示各实验组大鼠肺组织中 DNMT1、MAT2A 和 β -Actin 的表达水平。图 4 显示的是与对照组相比, 各组大鼠肺组织 DNMT1 和 MAT2A 蛋白表达的变化率。由图 3、4 可见, 随着染镍浓度的增高, DNMT1 和 MAT2A 表达量随之显著性升高 ($r=0.900, P<0.05$; $r=0.910, P<0.05$), 与对照组相比, 最高剂量染镍组 DNMT1 和 MAT2A 的表达量分别增高了 1.52 倍和 1.49 倍。使用拮抗剂 VE 后, 与最高剂量染镍组相比 DNMT1 和 MAT2A 的表达量分别降低了 10% 和 29%。



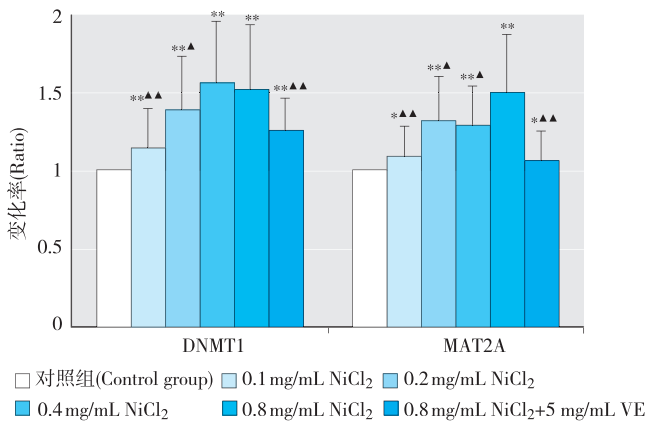
1: 对照组 (Control group); 2: 0.1 mg/mL NiCl₂; 3: 0.1 mg/mL NiCl₂; 4: 0.4 mg/mL NiCl₂; 5: 0.8 mg/mL NiCl₂; 6: 拮抗组 (The antagonism group)。

图 3 各组大鼠肺组织 DNMT1 和 MAT2A 蛋白表达水平

Figure 3 Levels of DNMT1 and MAT2A in lung tissue of rats

2.5 大鼠肺组织 DNMT1 和 MAT2A 蛋白表达水平与 GSH 含量的相关性

双变量相关分析显示大鼠肺组织中 GSH 含量与 DNMT1 和 MAT2A 蛋白表达水平呈负相关关系, 相关系数分别为 $r=-0.889 (P=0.018)$ 和 $r=-0.821 (P=0.044)$ 。



[注]*: 与对照组相比 (Compared with the control group), $P < 0.05$; **: 与对照组相比 (Compared with the control group), $P < 0.01$; ▲: 与 0.8 mg/mL NiCl₂ 相比 [Compared with the high-dose NiCl₂ group (8 mg/mL)], $P < 0.05$; ▲▲: 与 0.8 mg/mL NiCl₂ 相比 [Compared with the high-dose NiCl₂ group (8 mg/mL)], $P < 0.01$ 。

图 4 各组大鼠肺组织 DNMT1 和 MAT2A 蛋白表达变化率

Figure 4 Ratios of DNMT1 and MAT2A in lung tissue of rats

3 讨论

镍作为一种过渡金属, 以往的体内外研究表明镍化合物可诱导机体产生活性氧^[9]。活性氧对机体的最直接的影响就是打破体内的氧化还原平衡。维生素 E 是细胞膜上存在的主要脂溶性抗氧化剂, 能保护细胞膜防止脂质过氧化。它能与氧自由基反应供给一个氢离子并转变为反应性较低的形式, 这种自由基然后再由抗坏血酶-GSH 氧化还原偶联反应而还原。有研究证明, 维生素 E 可以通过增加 GSH 含量而拮抗金属诱导的毒性^[10-11]。GSH 在人体抗氧化系统中起着非常重要的作用, 同时对维持细胞内氧化还原状态也发挥关键作用。以往的研究发现镍染毒后可导致 GSH 含量下降^[12]。本次实验得出相同结果, 随着氯化镍染毒剂量的增加, 大鼠肺组织中 MDA 含量显著增多, GSH 含量显著减少。使用 VE 后 MDA 含量降低, GSH 含量增高, 与最高剂量染毒组相比差异有统计学意义, 提示 VE 可以拮抗由氯化镍诱导的过氧化作用。

p15 是细胞周期的重要调节因子—细胞周期蛋白-激酶抑制因子 (cyclin-kinase inhibitor, CKI) 家族中的重要成员。*p15* 的表达产物 *p15* INK 4B 可与细胞周期依赖激酶 CDK6 和 CDK4 结合, 阻碍其与细胞周期蛋白 D (cyclin D) 形成复合物, 使 cyclin D/CDK6、cyclin D/CDK4 激酶失活, 导致细胞周期停滞在 G1/S 期, 细胞增殖受到抑制, 呈现抑癌基因的作用。许多研究已证实 *p15* 启动子区的异常甲基化是其表达量降低和功能丧失的原因^[13-14]。本研究显示正常大鼠肺组织中 *p15* 基因启动子区域并未发生甲基化, 但是氯化镍染毒后可以同时检测到甲基化和非甲基化产物。DNA 甲基化是由 DNA 甲基转移酶 (DNA methyltransferase, DNMT) 调控的, 众多促甲基化因子和促去甲基化因子共同参与的动态的信号机制。DNMT 的作用是将甲基供体 S-腺苷蛋氨酸 (S-adenosylmethionine, SAM) 上的甲基基团转移到胞嘧啶 5 位碳原子上, 从而催化 DNA 甲基

化过程。目前认为在哺乳动物中, DNMT 分为从头甲基化转移酶 (DNMT3A 和 DNMT3B) 和维持甲基化转移酶 (DNMT1), 前者在胚胎发育过程中发挥作用, 而后者则在出生后的机体以半保留复制的方式将体细胞的甲基化模式延续下去。SAM 做为 DNA 和组蛋白甲基化过程中所必须的甲基提供者, 是由蛋氨酸经 SAM 合成酶 [也被称为蛋氨酸腺苷转移酶 (methionine adenosyltransferase, MAT)] 催化而来。哺乳动物体内 MAT 主要由 *mat1a* 和 *mat2a* 两种基因编码。其中 *mat1a* 主要在肝脏表达, 而 *mat2a* 在全身其他组织中表达。

近年来很多研究表明代谢过程与表观遗传效应有关, 高半胱氨酸 (homocysteine) 处于蛋氨酸循环 (methionine cycle) 和转硫途径 (transsulfuration pathway) 的交叉口。一方面高半胱氨酸、蛋氨酸、SAM 和 S-腺苷高半胱氨酸 (S-adenosylhomocysteine, SAH) 在酶的催化下完成蛋氨酸循环; 另一方面高半胱氨酸在酶的催化下通过转硫途径生成谷胱甘肽。在正常生理条件下, 蛋氨酸循环和转硫途径处于一种动态平衡, 如果机体处于氧化应激或配子发育阶段, 那么谷胱甘肽水平的波动将会影响表观遗传进程^[15]。

本研究发现染镍大鼠 MAT2A 蛋白表达量随染毒剂量的增加逐渐增高, 可能与染镍大鼠发生氧化损伤, GSH 水平降低, 机体负反馈调节使高半胱氨酸更多地通过转硫途径循环, 而蛋氨酸循环相对受到抑制相关; 在使用抗氧化剂后, GSH 含量明显增高, 部分解除了蛋氨酸循环所受抑制, 因此 MAT2A 表达量随之下降。其具体机制有待进一步研究。基因的甲基化状态是通过 DNMTs 来维持的, 启动子区的 CpG 甲基化可直接导致相关基因的表观遗传学基因沉默, 因此 DNA 甲基化一般与基因沉默相关联。本研究发现染镍大鼠肺组织中抑癌基因 *p15* 表达量降低, 可能与 DNMT1 表达增高使得 *p15* 启动子甲基化有关; 使用抗氧化剂后 DNMT1 表达量降低, *p15* 表达量显著上升, 这点说明了 *p15* 的表达受到了表观遗传的调节, 甲基化 PCR 也验证了此推测, 但本次试验未发现使用抗氧化剂 VE 后改变最高浓度染镍组大鼠肺组织 *p15* 启动子的不完全甲基化状态, 可能与选择的拮抗剂浓度有一定关系, 其机制有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] GRIMSRUD TK, BERGE SR, MARTINSEN JI, et al. Lung cancer incidence among Norwegian nickel-refinery workers 1953—2000 [J]. J Environ Monit, 2003, 5 (2): 190-197.
- [2] LEE SH, SHIAO YH, PLISOV SY, et al. Nickel (II) acetate-treated Chinese hamster ovary cells differentially express Vimentin, hSNF2H homologue, and H ferritin [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1999, 258 (3): 592-595.
- [3] SALNIKOW K, AN WG, MELILLO G, et al. Nickel-induced transformation shifts the balance between HIF-1 and p53 transcription factors [J]. Carcinogenesis, 1999, 20 (9): 1819-1823.
- [4] KASPRZAK KS, SUNDERMAN FW Jr, SALNIKOW K. Nickel carcinogenesis [J]. Mutat Res, 2003, 533 (1-2): 67-97.
- [5] LU H, SHI X, COSTA M, et al. Carcinogenic effect of nickel

- compounds[J]. Mol Cell Biochem, 2005, 279(1-2): 45-67.
- [6] CREPPY EE, TRAORÉ A, BAUDRIMONT I, et al. Recent advances in the study of epigenetic effects induced by the phycotoxin okadaic acid[J]. Toxicology, 2002, 181-182: 433-439.
- [7] MARNETT LJ, RIGGINS J N, WEST J D. Endogenous generation of reactive oxidants and electrophiles and their reactions with DNA and protein[J]. J Clin Invest, 2003, 111(5): 583-593.
- [8] VALINLUCK V, TSAI H H, ROGSTAD D K, et al. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2) [J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32(14): 4100-4108.
- [9] DAS K K, DAS S N, DHUNDASI S A. Nickel, its adverse health effects & oxidative stress[J]. Indian J Med Res, 2008, 128(4): 412-425.
- [10] KUMAR M R, REDDY A G, ANJANEYULU Y, et al. Oxidative stress induced by lead and antioxidant potential of certain adaptogens in poultry[J]. Toxicol Int, 2010, 17(2): 45-48.
- [11] SWAPNA G, REDDY A G, REDDY A R. Cadmium-induced Oxidative Stress and Evaluation of Embilica Officinalis and Stressroak in Broilers [J]. Toxicol Int, 2010, 17(2): 49-51.
- [12] DAS K K, DAS S N, DASGUPTA S. The influence of ascorbic acid on nickel-induced hepatic lipid peroxidation in rats[J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2001, 12(3): 187-195.
- [13] CLAUS R, PLASS C, ARMSTRONG S A, et al. DNA methylation profiling in acute myeloid leukemia: from recent technological advances to biological and clinical insights[J]. Future Oncol, 2010, 6(9): 1415-1431.
- [14] XING C, WANG Q F, LI B, et al. Methylation and expression analysis of tumor suppressor genes *p15* and *p16* in benzene poisoning[J]. Chem Biol Interact, 2010, 184(1-2): 306-309.
- [15] LERTRATANANGKOON K, WU C J, SAVARAJ N, et al. Alterations of DNA methylation by glutathione depletion[J]. Cancer Lett, 1997, 120(2): 149-156.

(收稿日期: 2011-03-25)

(英文编审: 黄建权; 编辑: 洪琪; 校对: 徐新春)

【精彩预告】

无机砷对 Chang 肝细胞株血红素单加氧酶-1 mRNA 和蛋白表达的诱导作用

李冰, 李昕, 朱博, 等

为了观察亚砷酸钠(sodium arsenite, NaAsO₂)对 Chang 肝细胞株血红素单加氧酶-1(heme oxygenase-1, HO-1) mRNA 和蛋白表达的诱导作用。中国医科大学的研究人员以 5 和 10 μmol/L 的 NaAsO₂ 作用 Chang 肝细胞株 2h、6h、12h 和 24h, 分别用 RT-PCR 和 Western Blot 法检测细胞内 HO-1 的 mRNA 和蛋白表达情况。结果显示: 5 和 10 μmol/L NaAsO₂ 暴露 2h 开始出现 HO-1 mRNA 的诱导表达、6h 的表达水平显著高于对照组和 2h 暴露组 ($P < 0.01$)。其中, 10 μmol/L NaAsO₂ 暴露 12h 和 24h 的 mRNA 表达均明显高于该浓度的 6h 暴露组 ($P < 0.01$), 但 24h 的 HO-1 mRNA 表达水平与 12h 组相比没有明显升高。NaAsO₂ 暴露诱导的 HO-1 蛋白表达则从 6h 开始明显出现, 且 12h 组明显高于 6h 组, 24h 组明显高于 12h 组 (均 $P < 0.01$); 5 和 10 μmol/L NaAsO₂ 分别暴露 6h、12h 和 24h 的 HO-1 蛋白表达量分别是对照组的 2.80、9.34、18.15 和 3.97、12.92、23.29 倍; 此外, 10 μmol/L NaAsO₂ 暴露 12h 和 24h 的 HO-1 mRNA 和蛋白表达均显著高于对应时间的 5 μmol/L 组 ($P < 0.01$)。因此认为 NaAsO₂ 暴露能够有效和持续性诱导 Chang 肝细胞株 HO-1 的 mRNA 和蛋白表达, 是无机砷暴露的一种细胞保护性适应性反应。

此文将于近期刊出, 敬请关注!