

Dicer1、miR-155 表达在亚砷酸钠致大鼠肝损伤中的作用

时明阳^{a, b}, 胡倩^{a, b}, 毕顶念^{a, b}, 汪红玲^{a, b}, 张爱华^{a, b}, 胡勇^{a, b}

贵州医科大学 a. 公共卫生学院 b. 环境污染与疾病监控重点实验室, 贵州 贵阳 550025

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.20569

摘要:

[背景] Dicer1 参与微小核糖核酸 (miRNA) 的剪切, miR-155 是一种常见的 miRNA, 能与靶 mRNA 3' 非翻译区结合, 导致 mRNA 降解或翻译抑制。

[目的] 探讨 Dicer1、miR-155 表达在不同浓度亚砷酸钠致大鼠肝损伤中的作用及机制。

[方法] 24 只 Wistar 大鼠适应性喂养 1 周后, 随机分为对照、低/中/高浓度染毒组 4 组, 每组 6 只, 雌雄各半, 分别自由饮用 0、25、50、100 mg·L⁻¹ 亚砷酸钠水溶液, 正常饮食, 持续 24 周。观察各组大鼠毛发光泽度、活动度, 每周同一时间称量动物体重。染毒结束后麻醉解剖大鼠, 大体观察肝组织情况。采用 HE 染色检测肝组织病理, 按照试剂盒步骤检测肝匀浆超氧化物歧化酶 1 (SOD1)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性、丙二醛 (MDA) 含量, 实时荧光定量 PCR 法检测各组大鼠肝组织 Dicer1、miR-155 和 SOD1 转录水平, 免疫组化分析各组大鼠肝组织 Dicer1 和 SOD1 蛋白表达水平, 并采用 Pearson 相关分析探究各指标间的相关性。

[结果] 随着染毒浓度增加, 染毒组大鼠毛发光泽度、活动度降低。与对照组相比, 中、高浓度染毒组大鼠体重下降 (均 $P < 0.05$); 各染毒组大鼠肝脾含量逐渐上升 (均 $P < 0.05$); 肝组织炎性浸润、空泡变、细胞坏死愈加严重; 肝匀浆 SOD1、GSH-Px 酶活性均逐渐下降, MDA 含量上升 (均 $P < 0.05$); 肝组织 Dicer1、miR-155、SOD1 mRNA 转录水平均上升 (均 $P < 0.05$); 肝组织 Dicer1 蛋白表达上升, SOD1 蛋白表达下降 (均 $P < 0.05$)。肝组织 miR-155 表达水平与 Dicer1 蛋白表达水平呈正相关 ($r = 0.670$, $P < 0.05$), 与 SOD1 蛋白表达水平呈负相关 ($r = -0.634$, $P < 0.05$)。

[结论] 砷诱导 Dicer1 基因及蛋白表达增加, 可能促进 miR-155 高表达后与 SOD1 3' 非翻译区结合, 抑制 SOD1 翻译, 导致 SOD1 蛋白表达和酶活性下降, 进而造成肝脏损伤。

关键词: 亚砷酸钠; 肝损伤; 氧化应激; miR-155; 超氧化物歧化酶 1

Roles of Dicer1 and miR-155 expression in sodium arsenite-induced liver damage in rats SHI Mingyang^{a, b}, HU Qian^{a, b}, BI Dingnian^{a, b}, WANG Hongling^{a, b}, ZHANG Aihua^{a, b}, HU Yong^{a, b} (a. School of Public Health b. Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract:

[Background] Dicer1 is involved in the cleavage of microribonucleic acid (miRNA). miR-155 is a common miRNA that can bind to the 3'untranslated region of target mRNA, leading to mRNA degradation or translation inhibition.

[Objective] This experiment explores the roles and mechanisms of Dicer1 and miR-155 expressions in liver injury induced by different concentrations of sodium arsenite in rats.

[Methods] After adaptive feeding for one week, 24 Wistar rats were randomly divided into 4 groups: control, low-, medium-, and high-dose groups, each group consisting of 6 rats, half male and half female. The rats were freely given drinking water containing 0, 25, 50, and 100 mg·L⁻¹ sodium arsenite and had a normal diet for 24 weeks. The changes of hair gloss and mobility were observed, and all of them were weighed at the same time every week. After arsenic exposure, the rats were anesthetized and dissected, and the pathological changes of liver tissues were observed. The activities of superoxide dismutase 1 (SOD1) and glutathione peroxidase (GSH-Px), and the content of malondialdehyde (MDA) in liver homogenate were detected according to the instructions of the kit. Moreover, the transcriptional expression levels of miR-155, Dicer1, and SOD1 in liver

基金项目

国家自然科学基金项目 (81860561); 贵州省区域内一流学科建设项目 - 公共卫生与预防医学 (黔教科研发 2017 [85] 号)

作者简介

时明阳 (1995—), 女, 硕士生;
E-mail: 853596136@qq.com

通信作者

胡勇, E-mail: brucehu1979@163.com

伦理审批

已获取
利益冲突 无申报
收稿日期 2020-12-03
录用日期 2021-03-21

文章编号 2095-9982(2021)06-0643-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

时明阳, 胡倩, 毕顶念, 等. Dicer1、miR-155 表达在亚砷酸钠致大鼠肝损伤中的作用 [J]. 环境与职业医学, 2021, 38 (6): 643-648.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20569

Funding

This study was funded.

Correspondence to

HU Yong, E-mail: brucehu1979@163.com

Ethics approval

Obtained

Competing interests

None declared

Received

2020-12-03

Accepted

2021-03-21

►To cite

SHI Mingyang, HU Qian, BI Dingnian, et al. Roles

of Dicer1 and miR-155 expression in sodium

arsenite-induced liver damage in rats[J]. Journal

of Environmental and Occupational Medicine,

2021, 38(6): 643-648.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20569

tissues were detected by quantitative real-time PCR (qRT-PCR), and the levels of protein expression of Dicer1 and SOD1 were analyzed by immunohistochemistry. The correlation between above indicators was evaluated by Pearson correlation analysis.

[Results] With the increase of arsenic exposure dose, the hair gloss and mobility of rats were decreased. Compared with the control group, the weight of the 50 and 100 mg·L⁻¹ arsenic groups were decreased ($P < 0.05$); the liver arsenic levels were increased in all arsenic groups ($P < 0.05$); inflammatory infiltration, vacuolation, and cell necrosis of liver tissues were more serious; the activities of SOD1 and GSH-Px in liver homogenate were decreased, while MDA content were increased (all $P < 0.05$); the transcriptional expression levels of *Dicer1*, *miR-155*, and *SOD1* in liver tissues were increased gradually (all $P < 0.05$); the *Dicer1* protein expression levels in liver tissues were increased, while the *SOD1* protein expression levels were decreased (all $P < 0.05$). The levels of *miR-155* in liver tissues were positively correlated with the protein expression levels of *Dicer1* ($r = 0.670$, $P < 0.05$), but negatively correlated with the protein expression levels of *SOD1* ($r = -0.634$, $P < 0.05$).

[Conclusion] Arsenic induces increases of *Dicer1* gene and protein expression, which may promote the overexpression of *miR-155* to bind to the *SOD1* 3'UTR region, inhibit *SOD1* translation, lead to the decrease of *SOD1* protein expression and enzyme activity, and in turn cause liver damage.

Keywords: sodium arsenite; liver damage; oxidative stress; *miR-155*; superoxide dismutase 1

地方性砷中毒, 简称地砷病, 是一种以多系统、多脏器损伤为主要特点的慢性砷中毒; 除典型的皮肤损害以外, 突出特点是肝损害严重。该病发病机制不清, 已成为制约其有效防控的难点^[1-2]。目前, 砷诱导氧化应激学说得到广泛认可, 但机制尚未明确。深入研究其机制可以更好地了解砷引起多系统、多脏器损害的原因, 为地砷病的针对性防治提供科学依据^[3]。

超氧化物歧化酶1 (superoxide dismutase 1, SOD1) 是人体内的一种重要抗氧化酶。本课题组前期发现, 砷可致人和大鼠 *SOD1* mRNA 转录水平增高, 但其蛋白表达水平却下降, 这提示可能存在某种转录后调节机制抑制 SOD1 的翻译^[4-5]。

微小核糖核酸 (miRNA) 是一类内源性非蛋白质编码的 RNA 分子, 一般含有 22 个核苷酸, 能够参与细胞的基因表达调控。*Dicer1* 能够对 miRNA 前体进行剪切, 形成成熟的 miRNA^[6]。成熟的 miRNA 是 RNA 沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) 的重要组成部分, RISC 能通过碱基互补配对的方式与靶 mRNA 3' 非翻译区 (untranslated region, UTR) 结合, 引起 mRNA 降解或翻译抑制, 导致蛋白表达水平下降。*miR-155* 是一种常见的 miRNA, 由 B 细胞淋巴瘤的逆转录病毒被启动子插入在整合位点后, 激活其转录过程形成, 又称 B 细胞融合群集。

本课题组前期研究发现, *miR-155* 在燃煤型砷中毒人群血浆中高表达^[7]。应用生物信息学工具 Tarbase 及网站 microRNA.org 分析均发现, *miR-155* 可与人 *SOD1*-3'UTR 序列结合。为了解 *miR-155*、*Dicer1*、*SOD1* 在砷致肝损伤中的作用, 本研究建立不同浓度亚砷酸钠致大鼠肝损伤模型; 通过检测肝砷含量、肝组织病理、氧化应激相关指标及 *Dicer1*、*miR-155* 和 *SOD1* 的

基因及蛋白表达情况, 为进一步揭示砷致肝氧化应激损伤的机制提供科学依据。

1 对象与方法

1.1 主要仪器试剂

电感耦合等离子体质谱仪 (inductively coupled plasma mass spectrometry, ICP-MS) NexION 2000 (美国 Thermo), AU400 全自动生化分析仪、光学显微镜 (日本 Olympus), MQX200 酶标仪 (美国 Bio-Tek), 亚砷酸钠 (美国 Sigma), TB Green® Premix Ex Taq II (日本 Takara), 兔抗 *Dicer1*、*SOD1* (英国 Abcam), 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记山羊抗小鼠、山羊抗兔二抗、二氨基联苯胺 (3, 3'-diaminobenzidine, DAB) 显色剂 (中国 Servicebio), 谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、*SOD1*、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (中国南京建成生物研究所)。

1.2 实验动物分组及处理

购买 SPF 级 80~100 g Wistar 大鼠 24 只 [辽宁长生生物技术股份有限公司, 合格证号为 SCXK (辽) 2015-0001], 雌雄各半, 饲养于贵州医科大学实验动物中心清洁级动物房, 光照与黑暗各 12 h 交替, 控制室温为 (25±3) °C, 湿度为 45%~65%。本实验经贵州医科大学实验动物中心伦理委员会批准, 审批编号为 1900250。经预实验测定大鼠经口亚砷酸钠半数致死量为 45 mg·kg⁻¹, 根据亚砷酸钠半数致死量的 1/4、1/8、1/16 确定大鼠染毒质量浓度 (后称浓度) 依次为 100、50、25 mg·L⁻¹。大鼠适应性喂养 1 周后, 按体重 Z 字形随机分为对照、低/中/高浓度组 4 组, 每组 6 只, 雌雄各半, 分别自由饮用浓度为 0、25、50、

100 mg·L⁻¹亚砷酸钠水溶液。24周后,大鼠禁食24 h,采用0.9%戊巴比妥钠麻醉,心尖取乙二胺四乙酸(ethylenediamine tetraacetic acid, EDTA)抗凝血2 mL后处死,用于转录表达检测;取肝最大叶中间部分置于4%多聚甲醛中固定,用于病理HE染色与免疫组化,其余肝脏-80℃保存,用于酶活性检测。

1.3 一般情况

大鼠饲喂期间记录毛发光泽度、活动度,每周同一时间称量各组动物体重并记录。

1.4 肝砷含量检测

取0.3 g大鼠肝脏加入5 mL硝酸与2 mL过氧化氢,浸泡2 h后进行微波消解。第一步:1 200 W, 120℃, 6 min;第二步:1 200 W, 180℃, 10 min;第三步:1 200 W, 190℃, 15 min。赶酸至0.5 mL,定容至10 mL后稀释待测。采用ICP-MS检测肝砷含量,该方法的精密密度为1.3%,回收率为95.3%~107.1%。

1.5 肝组织病理改变检测

解剖过程中肉眼观察大鼠肝脏表面质地变化,取肝脏最大叶中间部分置于4%多聚甲醛固定,依次进行脱水、石蜡包埋、HE染色及镜检。

1.6 肝组织氧化损伤指标检测

取肝组织,用冰预冷生理盐水1:9稀释匀浆后,采用黄嘌呤氧化酶法检测SOD1活力,二巯双硝基苯甲酸还原法检测GSH-Px活性,硫代巴比妥酸比色法检测MDA含量。

1.7 大鼠肝组织 *miR-155*、*Dicer1* 及 *SOD1* 转录水平检测

采用实时荧光定量PCR检测3项指标的转录情况,Trizol法提取肝组织总RNA,逆转录为cDNA后,-20℃保存。*miR-155*引物:正向5'-CGGCGGTTTAA TGCTAATCGTGAT-3',反向5'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGTAT-3';内参*U6*引物:正向5'-CGGCGGTCGTGAAGCGTTCCAT-3',反向3'-CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA T-5';*Dicer1*引物:正向5'-TCTTCTTTCTCCTCATCCTCC-3',反向5'-TCCCCATA TTGATGGACATGGAAC-3';*SOD1*引物:正向5'-AGCA GAAGGCAAGCGGTGAAC-3',反向5'-TCCCCATATTGATG GACATGGAAC-3';内参甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *GAPDH*)引物:正向5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGA ATG -3',反向5'-ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA-3'。反应条件:95℃预变性30s,95℃变性15s,60℃退火1min,72℃延伸15s,共40个循环。结果以Ct值为统计参数,计算2^{-ΔΔCt}后

进行统计分析。

1.8 肝组织免疫组化

肝组织置于常规4%多聚甲醛固定后脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡、抗原修复和阻断内源性过氧化物酶后分别加一抗,体积比分别为1:200(*Dicer1*)、1:100(*SOD1*),4℃孵育过夜,磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline, PBS)冲洗3次,每次5 min;分别加山羊抗小鼠、山羊抗兔二抗,体积比为1:200,室温孵育30 min后,PBS冲洗3次,每次5 min;DAB显色,自来水冲洗终止染色;苏木素复染细胞核,脱水封片,二甲苯透明,中性树胶封片。采用Image Pro Plus图像处理系统观察*Dicer1*、*SOD1*表达情况。阳性表达呈棕黄色,200倍光镜下采集免疫组化图像,每张切片随机采3个不重叠视野,计算平均光密度值。

1.9 统计学分析

数据以均数±标准差表示,使用SPSS 23.0软件进行统计分析。数据首先进行正态性检验,符合正态分布时多组间比较使用单因素方差分析,进一步两两比较采用LSD-t检验,指标间相关性分析采用Pearson相关分析。检验水准α=0.05。

2 结果

2.1 一般情况

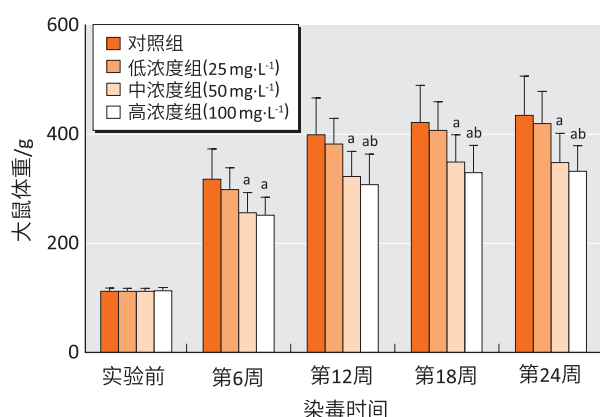
实验期间,对照组大鼠毛发光泽,活动正常,生长发育良好,能够正常饮水和进食;各染砷组大鼠活动度下降,毛色暗淡,毛发质地粗糙,尤以高浓度组明显,甚至出现个别大鼠躁狂异常。

2.2 体重

染毒6、12、18、24周后,各组间大鼠体重差异均存在统计学意义($F=3.59$ 、 4.04 、 3.89 、 4.63 ,均 $P<0.05$)。与对照组比较,染毒6、12、18、24周后,中、高浓度组大鼠体重均下降($P<0.05$);与低浓度组比较,染毒12、18、24周后,高浓度组大鼠体重均下降($P<0.05$)。结果见图1。

2.3 肝砷含量

对照及低、中、高浓度染毒组大鼠肝砷含量分别为(0.10 ± 0.02)、(1.35 ± 0.08)、(1.91 ± 0.20)、(2.28 ± 0.09) μg·g⁻¹。各组间大鼠肝砷含量差异具有统计学意义($F=333.38$, $P<0.05$)。与对照组相比,各染砷组肝砷含量均升高($P<0.05$);与低浓度组相比,中、高浓度组肝砷含量均升高($P<0.05$);与中浓度组相比,高浓度组肝砷含量也升高($P<0.05$)。



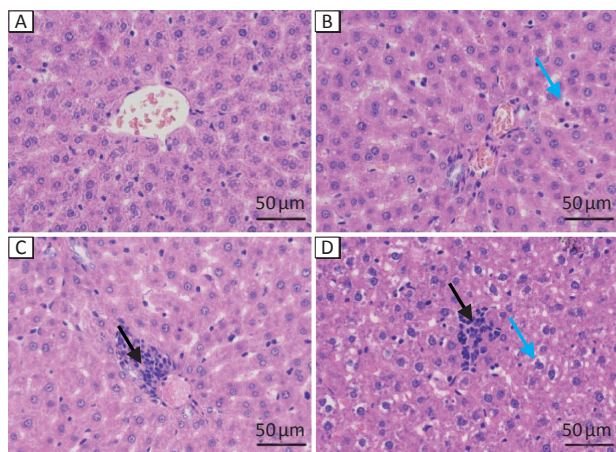
[注] a : 与对照组比较, $P < 0.05$; b : 与低浓度组比较, $P < 0.05$ 。

图1 亚砷酸钠染毒后大鼠体重变化 ($n=6$)

Figure 1 The changes in body weight of rats following sodium arsenite treatment ($n=6$)

2.4 HE 染色结果

HE 染色结果可见: 对照组肝组织小叶结构完整, 肝索结构清晰, 肝细胞排列规则, 胞质丰富, 形态正常, 未见明显异常; 随着染砷浓度增加, 肝细胞变性、坏死增多, 细胞空泡明显, 汇管区淋巴细胞浸润加重, 中、高浓度组肝组织可见明显的炎症坏死小灶。结果见图2。



[注] A : 对照组; B : 低浓度组 ($25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); C : 中浓度组 ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); D : 高浓度组 ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。黑色箭头表示为细胞质疏松淡染和炎症细胞浸润; 蓝色箭头表示为肝细胞空泡变及颗粒变性。

图2 亚砷酸钠染毒24周后大鼠肝组织病理改变 (HE 染色)

Figure 2 The pathology changes in liver tissues of rats following sodium arsenite treatment (HE staining)

2.5 肝匀浆氧化应激指标

各组间 SOD1、GSH-Px 酶活性, MDA 含量差异均具有统计学意义 ($F=21.43$ 、 5.17 、 8.54 , 均 $P < 0.05$)。与对照组比较, 各染砷组 SOD1 酶活性均下降, 高浓度组 GSH-Px 酶活性下降, 中、高浓度组 MDA 含量均升高 (均 $P < 0.05$)。与低浓度组比较, 高浓度组 SOD1、

GSH-Px 酶活性均下降, MDA 含量升高 (均 $P < 0.05$); 与中浓度组比较, 高浓度组 SOD1 酶活性下降, MDA 含量升高 (均 $P < 0.05$)。结果见表1。

表1 亚砷酸钠染毒24周后大鼠肝匀浆 SOD、GSH-Px 酶活性及 MDA 含量变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

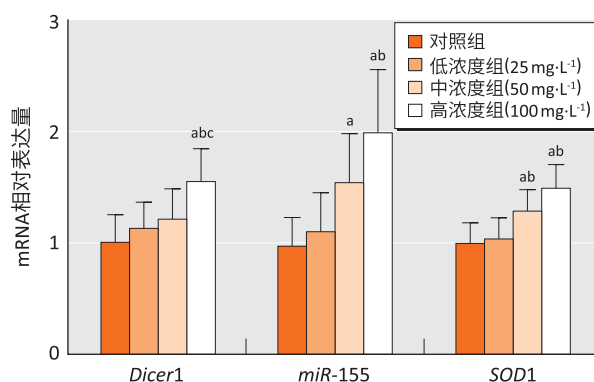
Table 1 The changes in SOD and GSH-Px enzyme activities and MDA contents in liver homogenate of rats following sodium arsenite treatment ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	SOD1/ ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	GSH-Px/ ($\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$)	MDA/ ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)
对照组	296.53 ± 11.42	357.49 ± 28.92	0.48 ± 0.05
低浓度组 ($25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	277.51 ± 9.64^a	326.85 ± 41.67	0.51 ± 0.05
中浓度组 ($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	266.53 ± 15.39^a	304.69 ± 44.70	0.56 ± 0.05^a
高浓度组 ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	238.40 ± 9.52^{abc}	250.32 ± 57.70^{ab}	0.64 ± 0.06^{abc}
F	21.43	5.17	8.54
P	<0.05	<0.05	<0.05

[注] a : 与对照组比较, $P < 0.05$; b : 与低浓度组比较, $P < 0.05$; c : 与中浓度组比较, $P < 0.05$ 。

2.6 肝组织 Dicer1、miR-155 及 SOD1 mRNA 转录水平

各组间大鼠肝组织 Dicer1、miR-155 及 SOD1 mRNA 转录水平差异均有统计学意义 ($F=5.26$ 、 7.75 、 10.01 , 均 $P < 0.05$)。与对照组相比, 高浓度组肝组织 Dicer1 mRNA 转录水平升高 (均 $P < 0.05$); 中、高浓度组肝组织 miR-155、SOD1 mRNA 转录水平均升高 (均 $P < 0.05$)。与低浓度组相比, 高浓度组肝组织 Dicer1 mRNA 转录水平升高 (均 $P < 0.05$); 高浓度组肝组织 miR-155 转录水平升高 (均 $P < 0.05$); 中、高浓度组肝组织 SOD1 mRNA 转录水平升高 (均 $P < 0.05$)。与中浓度组相比, 高浓度组肝组织 Dicer1 mRNA 转录水平升高 (均 $P < 0.05$)。结果见图3。



[注] a : 与对照组比较, $P < 0.05$; b : 与低浓度组比较, $P < 0.05$; c : 与中浓度组比较, $P < 0.05$ 。

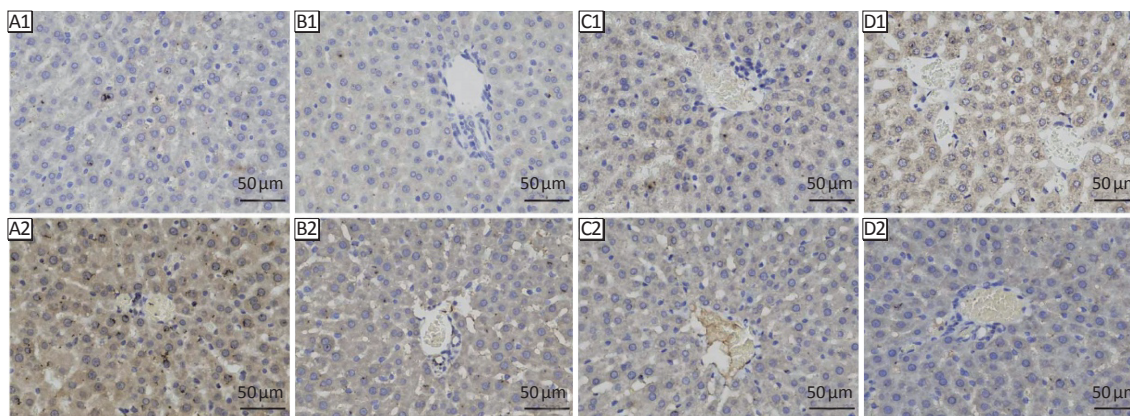
图3 亚砷酸钠染毒24周后大鼠肝组织 miR-155、Dicer1 及 SOD1 转录表达 ($n=6$)

Figure 3 The transcriptional expressions of miR-155, Dicer1, and SOD1 in liver tissues of rats following sodium arsenite treatment ($n=6$)

2.7 肝组织免疫组化结果

亚砷酸钠染毒后, 各组免疫组化结果见图4。各组间大鼠肝组织 Dicer1 及 SOD1 蛋白表达差异均有统计学意义 ($F=17.75$ 、 $F=38.10$, 均 $P<0.05$)。与对照组相比, 各染砷组肝组织 Dicer1 蛋白表达均增高, SOD1

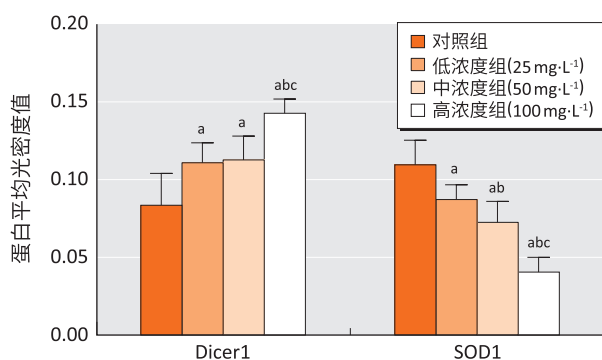
蛋白表达均下降 (均 $P<0.05$) ; 与低浓度组相比, 高浓度组 Dicer1 蛋白表达升高, 中、高浓度组肝组织 SOD1 蛋白表达均下降 (均 $P<0.05$) ; 与中浓度组相比, 高浓度组 Dicer1、SOD1 蛋白表达下降 (均 $P<0.05$)。结果见图5。



[注] A : 对照组 ; B : 低浓度组 ($25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) ; C : 中浓度组 ($50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) ; D : 高浓度组 ($100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。1 : Dicer1 ; 2 : SOD1。

图4 亚砷酸钠染毒24周后大鼠肝组织免疫组化结果

Figure 4 The immunohistochemical results of rat liver tissues following sodium arsenite treatment



[注] a : 与对照组比较, $P<0.05$; b : 与低浓度组比较, $P<0.05$; c : 与中浓度组比较, $P<0.05$ 。

图5 亚砷酸钠染毒24周后各组大鼠肝组织 Dicer1、SOD1 平均光密度值 ($n=6$)

Figure 5 The average optical density of Dicer1 and SOD1 in liver tissues of rats following sodium arsenite treatment for 24 weeks ($n=6$)

2.8 Pearson 相关性分析

亚砷酸钠染毒24周后, 大鼠肝组织 miR-155 与 Dicer1 蛋白表达水平呈正相关 ($r=0.670$, $P<0.05$) , 与 SOD1 蛋白表达水平呈负相关 ($r=-0.604$, $P<0.05$)。

3 讨论

肝脏是砷损害的主要靶器官, 砷中毒肝损伤发病率和死亡率较高, 病情较严重^[8]。砷毒作用复杂, 致病机制不清, 已成为地砷病防控工作的瓶颈和亟待解决的关键问题^[9-10]。本研究发现, 亚砷酸钠染毒大鼠, 肝组织 miR-155、Dicer1、SOD1 的基因表达均升高, 肝

组织 Dicer1 蛋白表达升高, SOD1 蛋白表达下降。

本研究利用亚砷酸钠建立饮水型砷中毒大鼠肝损伤模型。结果显示, 各染砷组大鼠出现活动度下降、毛发暗淡、饮水和摄食量明显减少等中毒症状; 随染毒浓度增加, 大鼠体重增长缓慢, 肝砷含量增加, 且存在明显的剂量-效应关系。该结果提示, 砷已对大鼠产生毒性作用和肝脏蓄积效应。进一步病理学检查发现, 各染砷组大鼠出现不同程度的病理学改变。上述结果表明, 饮水型砷中毒大鼠肝损伤模型构建成功。

SOD1、GSH-Px 是两种重要的超氧自由基清除剂, MDA 是脂质过氧化终产物, 它们的水平可反映机体氧化应激水平^[11]。结果发现, 随着染砷浓度增加, 大鼠肝匀浆 SOD1、GSH-Px 活性均下降, 而 MDA 含量均上升。该结果提示, 砷诱导了氧化应激, 机体内产生的过氧化产物不能被及时清除而大量堆积, 可能造成肝脏损伤。为进一步探讨砷诱导氧化应激与肝损伤的机制, 本研究检测了 SOD1 基因表达。结果发现, 随着染砷浓度增加, SOD1 mRNA 表达逐渐增加而其蛋白表达逐渐下降; 与课题组前期研究结果一致^[4-5]。这提示, 可能存在某种转录后调控机制, 抑制了 SOD1 蛋白表达。

mRNA 3'UTR 在基因表达调控上起重要作用^[12]。成熟的 miRNA 是形成 RISC 的最重要的组成成分, 该 RISC 复合体通过碱基互补配对的方式与靶 mRNA

3'UTR 结合^[13]。当两者互补配对程度高时, RISC 会发挥作用导致靶 mRNA 降解或翻译抑制^[14]。在本研究中, 随着亚砷酸钠染毒浓度增加, 大鼠肝组织 miR-155 表达量均逐渐上升; 提示亚砷酸钠能够促进 miR-155 表达。相关性分析显示, 大鼠肝组织 miR-155 水平与 SOD1 蛋白表达水平呈负相关, 结合生物信息学工具的发现, 推测 miR-155 可与人 SOD1-3'UTR 序列结合。高表达的 miR-155 可能通过与 SOD1 3'UTR 结合, 抑制 SOD1 翻译, 导致 SOD1 蛋白表达减少。

Dicer1 能够剪切 miRNA 前体, 形成成熟的 miRNA^[15]。miR-155 是一种常见的 miRNA, 提示 Dicer1 可能通过剪切 miR-155 前体, 生成成熟的 miR-155。本研究发现, Dicer1 的转录和蛋白表达均随亚砷酸钠染毒浓度的增加而增加; 相关性分析也发现, 大鼠肝组织 miR-155 水平与 Dicer1 蛋白表达水平存在明显的正相关关系。该结果提示, 砷引起 Dicer1 表达增加, 高表达的 Dicer1 可能增加对 miR-155 前体的剪切, 导致成熟 miR-155 增多而调控下游靶基因的表达。

综上, 本研究发现: 砷诱导 Dicer1 基因及蛋白表达增加, 可能促进 miR-155 高表达后与 SOD1 3'UTR 区结合, 抑制 SOD1 翻译, 导致 SOD1 蛋白表达和酶活性下降, 进而造成肝脏损伤。本研究为进一步揭示砷致肝损伤的机制及寻找新的药物靶点提供了科学依据, 但本实验不能确切说明 miR-155 对 SOD1 的靶向作用, 还需进一步通过 miR-155 的高低表达实验验证 miR-155 和 SOD1 3'UTR 指标间的相互关系。

参考文献

- [1] LV Y, HU Q, SHI M, et al. The role of PSMB5 in sodium arsenite-induced oxidative stress in L-02 cells [J]. Cell Stress Chaperones, 2020, 25 (3): 533-540.
- [2] XIA Y, LIU J. An overview on chronic arsenism via drinking water in PR China [J]. Toxicology, 2004, 198 (1/2/3): 25-29.
- [3] 袁娟, 赖燕, 黄春桃, 等. 亚急性砷中毒 11 例临床分析 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2020, 38 (12): 921-924.
YUAN J, LAI Y, HUANG CT, et al. Clinical analysis of 11 cases of sub-acute arsenic poisoning [J]. Chin J Ind Hyg Occup Dis, 2020, 38 (12): 921-924.
- [4] 胡勇, 张爱华, 黄晓欣. 铜锌超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶 1 mRNA 表达及其酶活力与砷中毒肝损伤关系 [J]. 环境与职业医学, 2012, 29 (5): 277-279, 289.
HU Y, ZHANG AH, HUANG XX. Relationship between arsenic liver injury and transcriptional expressions and activities of Cu/Zn superoxide dismutase and glutathione peroxidase 1 enzymes [J]. J Environ Occup Med, 2012, 29 (5): 277-279, 289.
- [5] HU Y, YU C, YAO M, et al. The PKC δ -Nrf2-ARE signalling pathway may be involved in oxidative stress in arsenic-induced liver damage in rats [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2018, 62: 79-87.
- [6] WANG P, XU LJ, QIN JJ, et al. MicroRNA-155 inversely correlates with esophageal cancer progression through regulating tumor-associated macrophage FGF2 expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2018, 503 (2): 452-458.
- [7] BUTOVSKY O, JEDRYCHOWSKI MP, CIALIC R, et al. Targeting miR-155 restores abnormal microglia and attenuates disease in SOD1 mice [J]. Ann Neurol, 2015, 77 (1): 75-99.
- [8] THANGAPANDIYAN S, RAMESH M, HEMA T, et al. Sulforaphane potentially ameliorates arsenic induced hepatotoxicity in albino wistar rats: implication of PI3K/Akt/Nrf2 signaling pathway [J]. Cell Physiol Biochem, 2019, 52 (5): 1203-1222.
- [9] TRYNDYAK VP, BOROWA-MAZGAJ B, STEWARD CR, et al. Epigenetic effects of low-level sodium arsenite exposure on human liver HepaRG cells [J]. Arch Toxicol, 2020, 94 (12): 3993-4005.
- [10] ZHANG AL, TANG SF, YANG Y, et al. Histone demethylase JHDM2A regulates H3K9 dimethylation in response to arsenic-induced DNA damage and repair in normal human liver cells [J]. J Appl Toxicol, 2020, 40 (12): 1661-1672.
- [11] HU Y, XIAO T, WANG Q, et al. Effects of essential trace elements and oxidative stress on endemic arsenism caused by coal burning in PR China [J]. Biol Trace Elem Res, 2020, 198 (1): 25-36.
- [12] LI H, LAI P, JIA J, et al. RNA helicase DDX5 inhibits reprogramming to pluripotency by miRNA-based repression of RYBP and its PRC1-dependent and-independent functions [J]. Cell Stem Cell, 2017, 20 (4): 462-477.
- [13] CUI D, WANG K, LIU Y, et al. MicroRNA-623 inhibits epithelial-mesenchymal transition to attenuate glioma proliferation by targeting TRIM44 [J]. Onco Targets Ther, 2020, 13: 9291-9303.
- [14] LIU X, TAN C, CHENG X, et al. miR168 targets Argonaute1A mediated miRNAs regulation pathways in response to potassium deficiency stress in tomato [J]. BMC Plant Biol, 2020, 20 (1): 477.
- [15] CHENDRIMADA TP, GREGORY RI, KUMARASWAMY E, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing [J]. Nature, 2005, 436 (7051): 740-744.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 王晓宇)