· 实验研究 ·

亚砷酸钠对 SV-HUC-1 细胞 NRF2 通路影响*

王惠惠[1], 陈锋[1], 朱佳玉[1], 席淑华[2], 孙贵范[3]

摘　要: 目的　探讨亚砷酸钠($NaAsO_2$)对人膀胱上皮细胞系 SV-HUC-1 细胞内核因子相关因子 2(NRF2)活性的影响。**方法**　时间效应实验以 4 μmol/L $NaAsO_2$ 分别处理 SV-HUC-1 细胞 0(对照)、4、8、16、24 h; 剂量效应实验设对照组和 $NaAsO_2$ 处理组(1、2、4、8、10 μmol/L); Western blot 免疫印迹试验检测 NRF2 通路相关蛋白(NRF2、NQO1 和 HO1)表达水平。**结果**　4 μmol/L $NaAsO_2$ 处理 SV-HUC-1 细胞 4、8、16、24 h 后, 与对照组(0.68 ± 0.03)比较, 细胞内 NRF2 蛋白表达水平明显升高, 16 h 处理组 NRF2 蛋白表达最高(1.17 ± 0.10), 差异有统计学意义($P < 0.05$); 随着染砷剂量增加, NRF2、NQO1 和 HO1 蛋白表达水平增强, 与对照组 NRF2(0.86 ± 0.05)、NQO1(0.68 ± 0.02)、HO1(0.09 ± 0.01)比较, 4 和 8 μmol/L $NaAsO_2$ 处理组细胞内 NRF2、NQO1、HO1 蛋白表达水平分别为(1.12 ± 0.01)和(1.16 ± 0.11)、(0.93 ± 0.01)和(1.15 ± 0.19)、(1.28 ± 0.01)和(1.30 ± 0.02), 均明显升高, 差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论**　$NaAsO_2$ 急性暴露能够活化 NRF2 通路, 引起膀胱上皮细胞适应性抗氧化反应增强。

关键词: 亚砷酸钠; SV-HUC-1 细胞; 核因子相关因子 2(NRF2); 适应性抗氧化反应
中图分类号: R 114　**文献标志码**: A　**文章编号**: 1001-0580(2017)01-0095-03　DOI: 10.11847/zgggws2017-33-01-24

Effect of sodium arsenite on NRF2 pathway in SV-HUC-1 cells

WANG Hui-hui*, CHEN Feng, ZHU Jia-yu, et al (*Department of Environmental Toxicology, School of Public Health, China Medical University, Shenyang, Liaoning Province* 110122, China)

Abstract: Objective　To investigate the effect of sodium arsenite on nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (NRF2) activity in human uroepithelial cells (SV-HUC-1). **Methods**　The SV-HUV-1 cells were treated with 4 μmol/L sodium arsenite ($NaAsO_2$) for 0 (control group), 4, 8, 16, and 24 hours for time-effect evaluation and the treatments of 16 hours with $NaAsO_2$ of 1, 2, 4, 8 and 10 μmol/L were adopted for dose-response assessment. NRF2 pathway related proteins (NRF2, NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1[NQO1] and heme oxygenase-1[HO1]) were detected with Western blot. **Results**　The NRF2 protein levels were significantly increased in the SV-HUC-1 cells after exposed to 4 μmol/L $NaAsO_2$ for 4, 8, 16, and 24 hours compared to that in the control cells (0.68 ± 0.03) and the maximum NRF2 protein level (1.17 ± 0.10) was observed in the cells treated for 16 hours ($P < 0.05$). The protein levels of NRF2, NQO1 and HO1 increased in dose-response manner when treated with various dosages of $NaAsO_2$ for 16 hours. Compared to the protein levels of NRF2 (0.86 ± 0.05), NQO1 (0.68 ± 0.02), and HO1 (0.09 ± 0.01) in the control group, the levels of NRF2, NQO1, and HO1 increased to 1.12 ± 0.01, 1.16 ± 0.11 and 0.93 ± 0.01 and 1.15 ± 0.19, 1.28 ± 0.01 and 1.30 ± 0.02 in the cells treated with 4 and 8 μmol/L $NaAsO_2$, respectively (all $P < 0.05$). **Conclusion**　Acute $NaAsO_2$ exposure can activate NRF2 pathway and induce adaptive antioxidant response in SV-HUC-1 cells.

Key words: sodium arsenite; SV-HUV-1 cell; nuclear factor-erythroid 2-related factor 2; adaptive antioxidant response

饮水砷污染是地方性饮水型砷中毒的主要原因, 目前是世界范围内严重的公共卫生问题。砷是国际肿瘤研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)确定的人类致癌物, 流行病调查研究表明慢性砷暴露可引起膀胱、皮肤和肺等多器官肿瘤[1]。研究表明氧化应激是砷的致癌机制之一, 砷及其甲基化产物可诱导细胞内活性氧自由基(reactive oxygen species, ROS)生成增多, ROS 攻击生物大分子, 导致 DNA 损伤、miRNA 修饰改变、蛋白分子结构改变以及脂质过氧化等与癌症发生密切相关的损伤机制[2]。砷可以通过诱导 SV-HUC-1 细胞内 ROS 产生, 造成人膀胱细胞的损伤[3]。核因子相关因子 2(nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, NRF2)是一种核转录因子, 其调控的下游基因主要包括抗氧化酶类和 II 相解毒酶, NRF2 介导的抗氧化反应是正常细胞抵御外源性和内源性氧化应激的重要系统, 在维持细胞氧化还原稳态、抑制氧化损伤、调节细胞增殖和分化等方面起关键作用[4]。NRF2 正常状态下与伴侣蛋白(Kelch-like epichlorohydrin-associated protein 1, KEAP1)偶联被锚定在胞

* **基金项目**: 国家自然科学基金青年项目(81502841); 国家自然科学基金(81373023)
作者单位: 1. 中国医科大学公共卫生学院环境毒理学研究室, 辽宁 沈阳 110122; 2. 中国医科大学公共卫生学院地球化学性疾病研究室; 3. 中国医科大学公共卫生学院环境与慢性病研究中心
作者简介: 王惠惠(1982 -), 女, 辽宁朝阳人, 讲师, 博士, 研究方向: 环境毒理学。
通讯作者: 孙贵范, E-mail: sungf@mail.cmu.edu.cn
数字出版日期: 2016 - 4 - 5 9:14
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160405.0914.016.html

浆内,导致其泛素化进而被蛋白酶降解。当细胞受到氧化物或亲电子物质刺激后,NRF2 与 KEAP1 解离而被活化,继而入核识别并结合于下游靶基因启动区的抗氧化反应元件(antioxidant response element, ARE),启动其表达。大量抗氧化酶,如血红素加氧酶(heme oxygenase-1, HO1)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)及 II 相解毒酶,如醌氧化还原酶[NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1, NQO1]、谷胱甘肽硫转移酶(glutathione S-transferase, GSTs)均受 NRF2 调控[5]。因此,NRF2-ARE 信号传导通路是细胞对抗氧化损伤和药物毒性的重要防御机制。本研究以亚砷酸钠(sodium arsenite, $NaAsO_2$)处理人膀胱上皮永生化细胞系 SV-HUC-1 细胞,通过观察细胞内 NRF2 通路相关蛋白表达水平变化,探讨 SV-HUC-1 细胞对抗氧化损伤作用机制。结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　*主要仪器与试剂*　超净工作台(江苏苏净集团公司);二氧化碳细胞培养箱(荷兰 Heraeus 公司);酶标仪(芬兰 Labsystems 公司);超速低温离心机(美国 Sigma 公司)。$NaAsO_2$(分析纯)、F12K 培养基、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂(美国 Sigma 公司);胎牛血清(德国 Biochrom 公司);胰蛋白酶(美国 Hyclone 公司);NRF2、NQO1、HO1、GAPDH 和 actin 抗体(美国 Santa Cruz 公司)。

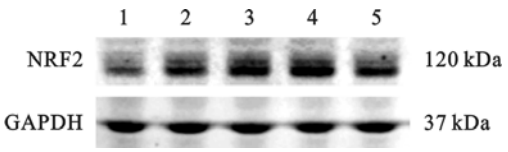
1.2　*细胞培养与处理*　SV-HUC-1 细胞[美国典型菌种保藏中心(American Type Culture Center, ATCC)],常规培养于 F12K 完全培养基(10% 胎牛血清,100 U/mL 青霉素,100 μg/mL 链霉素)。细胞以 5×10^5 个/mL 密度接种至培养板或培养皿,16 h 后待细胞贴壁并生长至 80% 融合后,进行细胞染毒和相关实验。(1)时间效应实验:以 4 μmol/L $NaAsO_2$ 分别处理 SV-HUC-1 细胞 0(对照组)、4、8、16、24 h 后,收集细胞进行实验;(2)剂量效应实验:分别设对照组和 $NaAsO_2$ 处理组(1、2、4、8、10 μmol/L),染毒处理 16 h 后,收集细胞进行各项指标检测,实验重复 3 次。

1.3　*NRF2 通路蛋白表达检测*　采用 Western blot 免疫印迹法,砷染毒结束后,弃培养液,预冷的磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗 2 次,加入细胞裂解液,用细胞刮刮取细胞,4 ℃超声裂解细胞,4 ℃、12 000 g 离心 5 min,收集上清液用于细胞蛋白检测。所有蛋白样品储存在 −80 ℃直至使用。蛋白浓度测定应用 Bradford 法;蛋白质样品通过聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl-polyacryl gradient gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离(100 V) 1.5 h,从正极到负极按照海绵 – 厚滤纸 – 硝酸纤维素膜 – 凝胶 – 厚滤纸 – 海绵的顺序制备三明治,在转移电泳槽中将分离胶中的蛋白湿转印至硝酸纤维素膜上(100 V,1 h);将转印后的硝酸纤维素膜封闭 1 h 后,加入相应一抗 NRF2、NQO1、HO1、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)和 actin(1∶1 000)4 ℃孵育过夜;第 2 d,用辣根过氧化物酶偶联抗鼠、抗兔或抗羊的二抗室温孵育 1 h 后,用 PBST 洗 3 次;加入底物,应用成像系统扫描发光条带,并应用 Image J 软件分析条带灰度值,以内参(GAPDH 或 actin)为参比蛋白,测定目的蛋白相对表达量。

1.4　*统计分析*　采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,实验数据以均数 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用最小显著性差异法 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

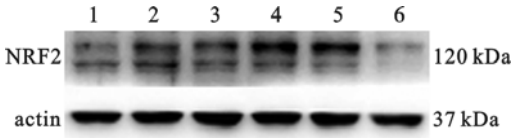
2　结　果

2.1　*亚砷酸钠对 SV-HUC-1 细胞转录因子 NRF2 影响*(图 1、2)　4 μmol/L $NaAsO_2$ 处理 0(对照组)、4、8、16、24 h 时,SV-HUC-1 细胞内 NRF2 蛋白表达分别为(0.68 ± 0.03)、(0.93 ± 0.01)、(1.06 ± 0.08)、(1.17 ± 0.10)、(0.95 ± 0.06);与对照组比较,处理 4 h 时,染砷组 SV-HUC-1 细胞内 NRF2 蛋白表达已呈升高趋势;在处理 16 h 时,SV-HUC-1 细胞内 NRF2 蛋白表达水平最高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。对照组、1、2、4、8、10 μmol/L $NaAsO_2$ 处理组 SV-HUC-1 细胞内 NRF2 蛋白表达分别为(0.86 ± 0.05)(1.03 ± 0.05)、(0.95 ± 0.06)、(1.12 ± 0.01)、(1.16 ± 0.11)、(0.61 ± 0.06);与对照组比较,4、8 μmol/L $NaAsO_2$ 处理组 SV-HUC-1细胞内 NRF2 蛋白表达升高,10 μmol/L $NaAsO_2$ 处理组 SV-HUC-1 细胞内 NRF2 蛋白表达降低,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。



注:1:对照组;2 ~ 5:$NaAsO_2$ 处理 4、8、16、24 h 组。

图 1　亚砷酸钠对 SV-HUC-1 细胞内 NRF2 蛋白表达影响(时间效应)

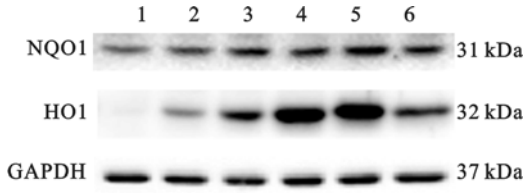


注:1:对照组;2 ~ 6:1、2、4、8、10 μmol/L $NaAsO_2$ 处理组。

图 2　亚砷酸钠对 SV-HUC-1 细胞内 NRF2 蛋白表达影响(剂量效应)

中国公共卫生 CPH

2.2　亚砷酸钠对 SV-HUC-1 细胞内 NQO1 和 HO1 蛋白表达影响(图 3,表 1)　与对照组比较,随着染砷剂量增加,SV-HUC-1 细胞内 NQO1 和 HO1 蛋白表达水平升高,差异均有统计学意义(均 $P<0.05$)。



注:1:对照组;2~6:1、2、4、8、10 μmol/L $NaAsO_2$ 处理组。

图 3　亚砷酸钠对 SV-HUC-1 细胞内 NQO1 和 HO1 蛋白表达影响

表 1　亚砷酸钠对 SV-HUC-1 细胞内 NQO1 和 HO1 蛋白表达影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别(μmol/L)	NQO1	HO1
对照组	0.68 ± 0.02	0.09 ± 0.01
$NaAsO_2$ 处理组 1	0.79 ± 0.01[a]	0.36 ± 0.01[a]
2	1.00 ± 0.05[a]	0.76 ± 0.04[a]
4	0.93 ± 0.01[a]	1.28 ± 0.01[a]
8	1.15 ± 0.19[a]	1.30 ± 0.02[a]
10	0.90 ± 0.04[a]	0.75 ± 0.03[a]

注:与对照组比较,a $P<0.05$。

3　讨　论

研究表明,摄入高砷水导致膀胱癌危险性明显升高[6-9]。SV-HUC-1 细胞是由猿猴空泡病毒 40 转染至 1 名 11 岁男孩的泌尿道上皮细胞而建立起来的永生化细胞系,其分化特性与正常细胞相似,培养简单,可无限传代,却不属于肿瘤细胞。该细胞是研究砷致膀胱损伤或肿瘤机制的理想模型[10]。

活性氧可直接或间接地改变生物大分子(DNA、蛋白质和脂质等)生理功能,导致细胞发生氧化损伤,同时激活细胞氧化应激敏感的信号途径。前期研究结果显示,$NaAsO_2$ 染毒能够诱导 SV-HUC-1 细胞内 ROS 产生,提示砷可引起细胞氧化应激[3,11]。砷可引起细胞氧化应激,同时氧化应激能够诱导细胞内抗氧化系统表达增强,而核转录因子 NRF2 对结构型和诱导型抗氧化反应相关基因的表达起到中枢调控作用。砷暴露直接导致 KEAP1 的空间构象改变,进而 NRF2 和 KEAP1 分离,NRF2 转移入核,启动下游靶基因,如:NQO1、HO1[12-13]。研究表明,砷暴露能够诱导机体和细胞处于氧化应激状态,同时活化 NRF2 及诱导其下游抗氧化酶和 II 相解毒酶的表达,维持细胞内氧化还原状态,保护细胞免受氧化损伤[14]。NQO1 是体内一种重要的II相解毒酶,NQO1 以 NAD(P)H 为受体,可将 NADH 或 NADPH 的电子传递给醌类及其衍生物,发生电子还原反应,生成低毒的氢醌类化合物,此反应无半醌及自由基等氧化产物形成,避免了对细胞的氧化损伤。HO1 蛋白是热休克蛋白中的一种,在正常组织中表达甚微,只有在氧化应激刺激情况下大量产生,增加机体抗氧化能力,维持机体生存;HO1 可以降低组织对氧化应激的敏感性,减少细胞损伤和凋亡,同时还可以增强机体的免疫能力。本研究结果也显示,砷暴露可诱导 SV-HUC-1 细胞蛋白中 NRF2 含量升高,同时也发现 NRF2 下游靶蛋白 NQO1 和 HO1 表达升高,与已有研究结果一致[15]。提示砷染毒可致SV-HUC-1 细胞氧化应激损伤,同时诱导细胞中 NRF2 通路活化。

参考文献

[1] International Agency for Research on Cancer. Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans[R]. Geneva: International Agency for Research on Cancer, 2004, 84: 1-477.
[2] Shi H, Shi X, Liu KJ. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis[J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2004, 255: 67-78.
[3] Wang H, Xi S, Xu Y, et al. Sodium arsenite induces cyclooxygenase-2 expression in human uroepithelial cells through MAPK pathway activation and reactive oxygen species induction[J]. Toxicology in vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA, 2013, 27: 1043-1048.
[4] Pi J, Zhang Q, Fu J, et al. ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 244: 77-83.
[5] 朱佳玉,邓宇,徐斌,等. 锰对小鼠黑质内活性氧及 Nrf2 信号通路影响[J]. 中国公共卫生, 2014, 30(4): 460-462.
[6] Steinmaus C, Bates MN, Yuan Y, et al. Arsenic methylation and bladder cancer risk in case-control studies in Argentina and the United States[J]. J Occup Environ Med, 2006, 48: 478-488.
[7] Smith AH, Goycolea M, Haque R, et al. Marked increase in bladder and lung cancer mortality in a region of Northern Chile due to arsenic in drinking water[J]. Am J Epidemiol, 1998, 147: 660-669.
[8] Hopenhayn-Rich C, Biggs ML, Fuchs A, et al. Bladder cancer mortality associated with arsenic in drinking water in Argentina[J]. Epidemiology, 1996, 7: 117-124.
[9] Chiou HY, Hsueh YM, Liaw KF, et al. Incidence of internal cancers and ingested inorganic arsenic: a seven-year follow-up study in Taiwan[J]. Cancer Res, 1995, 55: 1296-1300.
[10] Chai CY, Huang YC, Hung WC, et al. Arsenic salt-induced DNA damage and expression of mutant p53 and COX-2 proteins in SV-40 immortalized human uroepithelial cells[J]. Mutagenesis, 2007, 22: 403-408.
[11] 薛鹏,席淑华,张新玉,等. 亚砷酸钠致 SV-HUC-1 细胞氧化应激作用的研究[J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(12): 1053-1055.
[12] Fu J, Woods CG, Yehuda-Shnaidman E, et al. Low-level arsenic impairs glucose-stimulated insulin secretion in pancreatic Beta cells: involvement of cellular adaptive response to oxidative stress[J]. Environ Health Perspect, 118: 864-870.
[13] Zhang DD, Lo SC, Cross JV, et al. Keap1 is a redox-regulated substrate adaptor protein for a Cul3-dependent ubiquitin ligase complex[J]. Molecular and Cellular Biology, 2004, 24: 10941-10953.
[14] 刘丹,李冰,董丹丹,等. 无机砷对肝细胞转录因子 Nrf2 及其调控蛋白表达影响[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(9): 1188-1190.
[15] Li B, Li X, Zhu B, et al. Sodium arsenite induced reactive oxygen species generation, nuclear factor (erythroid-2 related) factor 2 activation, heme oxygenase-1 expression, and glutathione elevation in Chang human hepatocytes[J]. Environmental Toxicology, 2013, 28: 401-410.

收稿日期: 2015-12-08　　(解学魁编辑　郭薇校对)