

温石棉通过活性氧激活线粒体通路诱导 A549 细胞凋亡的机制研究

王玉琳¹, 霍婷婷^{2,3}, 董发勤^{2,3}, 刘琬薰¹, 杨洁¹, 曾娅莉⁴, 邓建军^{1,4}

(1. 西南医科大学 临床医学院, 四川 泸州 646000; 2. 西南科技大学固体废物处理与资源化教育部重点实验室, 四川 绵阳 621010; 3. 西南科技大学 环境与资源学院, 四川 绵阳 621010; 4. 四川绵阳四〇四医院, 四川 绵阳 621000)

摘要: 探讨活性氧(reactive oxygen species, ROS)在温石棉激活线粒体通路诱导 A549 凋亡中的作用。采用不同浓度温石棉粉尘染毒人肺上皮细胞(A549)后, MTT 法检测细胞存活率, 流式细胞术检测 ROS 抑制剂 N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)预处理前后的细胞凋亡率、胞内 ROS 水平及线粒体膜电位, Western Blot 法检测各组细胞半胱天冬氨酸蛋白酶 3(caspase-3)、p53 蛋白表达水平。实验结果显示, 温石棉可降低 A549 细胞存活率, 呈现时间-剂量效应关系; NAC 可显著减少胞内 ROS 水平、阻止线粒体膜电位下降, 并下调 caspase-3、p53 蛋白的表达水平, 抑制部分细胞凋亡的发生。表明 ROS 可通过诱导 p53 蛋白过表达, 激活线粒体凋亡通路, 诱导 A549 细胞发生凋亡。

关键词: 温石棉; 活性氧; 凋亡; p53; caspase-3

中图分类号: P579

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2018)01-0318-07

The activation of mitochondrial pathway induced by chrysotile asbestos to induce apoptosis of A549 cells by activated reactive oxygen species

WANG Yu-lin¹, HUO Ting-ting^{2,3}, DONG Fa-qin^{2,3}, LIU Wan-xun¹, YANG Jie¹, ZENG Ya-li⁴
and DENG Jian-jun^{1,4}

(1. Clinical Medical College, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. School of Environment and Resource, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China; 3. Key Laboratory of Solid Waste Treatment and Resource Recycle, Ministry of Education, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China; 4. Sichuan Mianyang 404 Hospital, Mianyang 621000, China)

Abstract: In this study, the authors investigated the role of reactive oxygen species (ROS) in inducing A549 apoptosis by activated mitochondria apoptosis pathway in chrysotile asbestos. Human lung epithelial cell (A549) cells were exposed to different concentrations of chrysotile asbestos dust and, on such a basis, the authors conducted detection of cell viability by MTT assay and detection of cell apoptosis rate, intracellular ROS level and mitochondrial membrane potential by flow cytometry before and after pretreatment of N-acetyl-L-cysteine (NAC) of ROS inhibitor, and then performed determination of caspase-3 and p53 protein expression level by Western blot. The experimental results show that chrysotile asbestos dust can reduce the survival rate of A549 cells and present the effectiveness relationship between the time and the dose. NAC could significantly reduce intracellular ROS level, prevent mitochondrial membrane potential declining, lower the expression level of caspase-3, p53 protein, and inhibit the occurrence

收稿日期: 2017-08-31; 接受日期: 2017-12-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(41472046, 41602033); 四川省科技计划资助项目(2016JY0045)

作者简介: 王玉琳(1992-), 女, 硕士研究生; 研究方向: 环境污染物对呼吸系统的影响, E-mail: 13597864747@163.com; 通讯作者: 邓建军(1972-), E-mail: jianjundeng0801@163.com.

of some cell apoptosis. The results indicate that ROS could activate mitochondrial apoptotic pathway by raising p53 protein expression and thus induce apoptosis of A549 cells.

Key words: chrysotile; asbestos; reactive oxygen species; apoptosis; p53; caspase-3

Fund support: Projects of National Natural Science Foundation of China (41472046, 41602033); Project of Science and Technology of Sichuan Province, China(2016JY0045)

温石棉是我国主要石棉矿产资源,占石棉总产量的95%左右。据估算,我国温石棉储量位居世界第3,产量和使用量均居世界前列。温石棉从开采、加工到相关制品的生产,早已形成庞大且成熟的产业体系(宋鹏程等,2013;樊晶光等,2016)。然而,国内外大量流行病学研究显示,长期吸入一定浓度的温石棉纤维粉尘,可导致肺纤维化、肺癌及胸腹膜间皮瘤等疾病的发生发展,致病机制可能与温石棉诱导的细胞凋亡有关(Kamp *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2015)。Pereira 等(2013)研究发现,随呼吸进入肺内的石棉纤维,可刺激靶细胞产生大量的活性氧 ROS(reactive oxygen species),导致机体氧化应激损伤,进而诱导细胞凋亡。线粒体是细胞内产生 ROS 的主要场所,线粒体参与的细胞凋亡是温石棉诱导细胞凋亡机制研究的热点之一(Huang *et al.*, 2012; Cheresch *et al.*, 2015)。细胞凋亡中线粒体作用的不断深入研究发现,ROS 不管在诱导细胞凋亡事件发生起始,还是在线粒体凋亡信号传导通路中,都发挥着不容忽视的作用(Kamp *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2015)。由此,本文选取四川新康温石棉为研究对象,体外染毒 A549 细胞,探讨 ROS 在温石棉诱导的线粒体凋亡通路中的可能作用机制,以期从分子层面阐述温石棉通过线粒体诱导细胞凋亡的信号通路和调控靶点,为进一步明确温石棉对人体的毒性作用机制提供理论基础。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂与仪器

主要试剂:改良型 RPMI-1640 培养基、胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素(美国 Hyclone 公司);胰蛋白酶消化液、噻唑蓝(methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT)、细胞凋亡检测试剂盒(Annexin V-FITC/Propidium Iodide, Annexin V-FITC/PI)、线粒体膜电位检测试剂盒(mitochondrial membrane potential assay kit, JC-1)、2,7-二氯荧光黄双乙酸盐(2,7-dichlorodi-hydrofluorescein diace-

tate, DCFH-DA)、磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)(碧云天生物技术有限公司);N-乙酰半胱氨酸(N-acetyl-L-cysteine, NAC)、兔抗 p53 抗体、兔抗 caspase-3 抗体、兔抗 GAPDH 抗体、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司)。

主要仪器:卧式行星磨(QM-3SP4J, 南京大学仪器厂),倒置相差荧光显微镜(Axio Observer A1, 德国 Zeiss 公司),流式细胞仪(FACS Calibur, 美国 Becton Dickinson 公司),微孔板分光光度计(BioTek Power Wave XS2, 美国 BioTek 公司),Western 电泳仪(164-5051, 美国 BIO-RAD 公司),Trans-Blot Turbo 全能型蛋白转印系统(170-4150, 美国 Bio-rad 公司),多功能酶标仪(M3, 美国 MD Spectramac 公司)。

1.2 细胞培养及温石棉纤维粉尘悬液配置

人肺上皮细胞株(A549)购自中国科学院上海生命科学研究院,采用 10% 胎牛血清的改良型 RPMI-1640 培养基(含 100 U/mL 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素),置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% 的 CO_2 培养箱中培养,每 2~3 d 按 1:3 的比例常规消化、传代。

四川新康温石棉由西南科技大学提供。温石棉原矿经剪短、劈分、碾压后,使用卧式球磨机在酒精中湿磨 10 h,洗出并抽滤烘干后再次研磨过 300 目筛,制成超细粉尘,封装待用。实验前将温石棉粉尘高温高压蒸汽灭菌后,采用无血清改良型 RPMI-1640 培养基配制成 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的母液,使用前需用超声振荡仪振荡 20 min。

1.3 实验方法

1.3.1 MTT 法检测细胞存活率

取对数生长期细胞调整浓度 1×10^5 个/mL 后,接种 200 μL 于 96 孔板中并置于培养箱中培养。次日,弃上清,磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)清洗 3 次后,向孔板中加入 12.5、25、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的温石棉纤维粉尘悬液 200 μL ,培养 12 h、24 h 和 48 h 后分别向每孔加入 10 μL MTT(5 mg/mL),于细胞培养箱中避光孵育 4 h 后弃上清,每孔加入 200 μL 二甲基亚砜,震荡 10 min 后用微孔板分

光光度计于 490 nm 波长处测量吸光度值(A)。每个浓度设 6 个平行孔。同时设置阴性对照组(细胞悬液和培养基)和粉尘对照组(只加温石棉粉尘悬液和培养基)。根据以下公式计算细胞相对存活率:

$$\text{细胞相对存活率}(\%) = \frac{(\text{A 实验组} - \text{A 粉尘对照组}) / \text{A 对照组}}{\text{A 对照组}} \times 100\%$$

1.3.2 流式细胞术检测细胞凋亡

将对数生长期的 A549 细胞,调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL 后接种 2 mL 到 6 孔板中,置于培养箱中培养。实验分为温石棉组, NAC + 温石棉组[2 mL NAC(10 mmol/L)预处理 1 h]。待细胞贴壁长至 70% 时,弃上清, PBS 洗涤 3 次,分别向温石棉组、NAC + 温石棉组的孔板中加入 2 mL 浓度为 0、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的温石棉纤维粉尘悬液。孵育 24 h 后,消化、离心收集细胞。根据细胞凋亡检测试剂盒的操作说明,加入 5 μL Annexin V-FITC 后,再加入 5 μL PI 混匀,室温、避光反应 15 min,流式细胞仪检测细胞凋亡情况。每个实验组中的每个浓度均设 3 个平行孔。

1.3.3 流式细胞术检测胞内 ROS 水平

细胞接种、实验分组、温石棉的浓度设置及细胞染毒方式同实验 1.3.2。各浓度组细胞经 PBS 缓冲液洗涤后离心、收集细胞,吹散悬浮于终浓度为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 2,7-二氯荧光黄双乙酸盐(2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)中,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL,置于细胞培养箱中避光孵育 20 min。用无血清的培养液洗 3 次,流式细胞仪检测。每个实验组中的每个浓度均设 3 个平行孔。

1.3.4 流式细胞术检测线粒体膜电位

细胞接种、实验分组、温石棉的浓度设置及细胞染毒方式同实验 1.3.2。PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次后,室温离心 5 min(2 000 r/min),收集各试验组细胞,并调整细胞数为 1×10^6 个/mL。根据线粒体膜电位检测试剂盒操作说明配置 JC-1 工作液。取 500 μL JC-1 工作液(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)将细胞均匀悬浮成单细胞悬液,在细胞培养箱中孵育 20 min 后,用流式细胞仪检测。每个实验组中的每个浓度均设 3 个平行孔。

1.3.5 Western Blot 检测 caspase-3 和 p53 蛋白水平

将对数生长期的细胞调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL 后,每孔 2 mL 接种到 6 孔板中,置于培养箱中培养。实验分组同实验 1.3.2。贴壁长至 70% 时,弃上清后 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次,分别向温石棉组、NAC + 温石棉组加入 2 mL 浓度为 0、50、

100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的温石棉纤维粉尘悬液。孵育 24 h 后胰酶常规消化,用预冷 PBS 漂洗、离心后收集细胞;裂解、提取蛋白进行蛋白定量检测。SDS-PAGE 电泳后转膜、封闭,再分别孵育兔抗 p53 抗体(1:1 000)、兔抗 caspase-3 抗体(1:500)、兔抗 GAPDH 抗体(1:1 000),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜;TBST 洗膜 3 次,加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG(1:5 000),37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 1.5 h;TBST 洗膜 3 次,封闭二抗后 ECL 化学发光法显色,使用 Trans-Blot Turbo 全能型蛋白转印系统成像,Gel-Pro32 软件对结果进行灰度分析。每个实验组中的每个浓度均设 3 个平行孔。

1.4 统计学分析

采用 Excel、SPSS 24.0 进行数据整理和分析,实验数据以($\bar{x} \pm s$)表示。均值比较采用单因素 ANOVA 分析进行显著性检验,多组间的两两比较使用 LSD 检验,通过绘图软件 Graph Pad Prism 5.0 及 Origin 8.0 进行图形绘制。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异有显著统计学意义。

2 实验结果与数据分析

2.1 温石棉对细胞存活率的影响

如图 1 所示,不同浓度温石棉染毒 A549 细胞 12 h、24 h 和 48 h 后,与对照组(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)相比,细胞存活率随着温石棉染毒浓度增加和染毒时间延长均呈递减趋势,且存在时间-剂量依赖效应,差异具

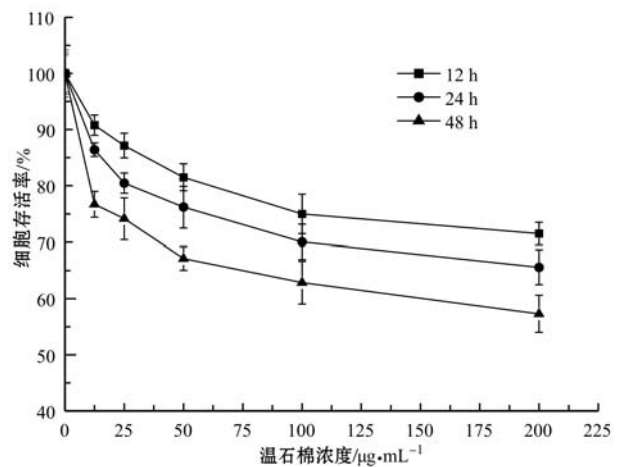


图 1 温石棉粉尘对 A549 细胞存活率的影响
Fig. 1 Effect of chrysotile asbestos dusts on the survival rate of A549 cells

有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。当温石棉的浓度为 $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ 时,染毒 12 h、24 h 和 48 h 后存活率分别为 71.51%、65.57%、57.29%。染毒 24 h 时,温石棉粉尘对 A549 细胞的半数抑制浓度为 $217.51 \mu\text{g}/\text{mL}$,为后续实验的浓度设置提供参考。

2.2 温石棉诱导细胞凋亡

通过流式细胞仪检测细胞凋亡,结果如图 2 所示:温石棉粉尘分别以 50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度作用 A549 细胞 24 h 后,细胞凋亡率分别为 20.5%、29.89%、60.94%。随着温石棉纤维粉尘浓度的增大,细胞凋亡率呈上升趋势,与对照组相比,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。在相同浓度温石棉纤维粉尘条件下,加入 ROS 抑制剂 NAC 后,NAC 组的细胞凋亡率分别为 12.29%、20.35%、50.78%,较温石棉组明显降低,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

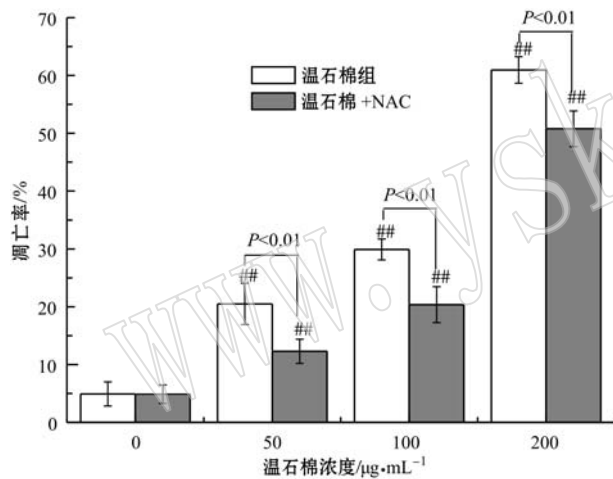


图 2 不同浓度温石棉粉尘染毒 A549 细胞 24 h 后的细胞凋亡率

Fig. 2 Apoptosis rate of A549 cells exposed to different concentrations of chrysotile asbestos dusts after 24 hours

##——温石棉处理组细胞凋亡率与对照组相比较 $P < 0.01$

##——the cell apoptosis rate in chrysotile asbestos group compared with control group, $P < 0.01$

2.3 细胞内 ROS 水平

DCFH-DA 自身无荧光,可自由穿过细胞膜。进入细胞的 DCFH-DA 被胞内的酯酶水解、ROS 氧化生成有荧光的 DCF。检测 DCF 的荧光密度可反应胞内 ROS 水平。温石棉粉尘分别以 0、50、100、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度染毒 A549 细胞 24 h 后,流式细胞术检测结果如图 3 所示:与对照组相比,胞内 ROS 水平随着温石棉纤维粉尘染毒浓度的增加和时间的延长

呈上升趋势,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。当加入活性氧抑制剂 NAC 后,与同一浓度温石棉组相比,NAC 可显著抑制 ROS 的生成,胞内 ROS 水平分别降低 10.63%、7.43%、17.74%。

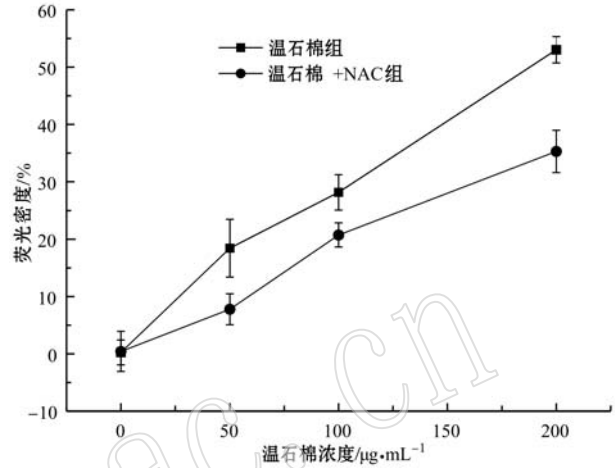


图 3 不同浓度温石棉粉尘染毒 A549 细胞 24 h 后的胞内 ROS 水平

Fig. 3 Intracellular ROS levels in A549 cells exposed to different concentrations of chrysotile asbestos dusts after 24 hours

2.4 线粒体膜电位变化

本实验利用荧光探针 JC-1 标记 A549 细胞,JC-1 在线粒体膜电位极性的作用下迅速进入线粒体,线粒体内高浓度的 JC-1 形成多聚体发出红色荧光;细胞凋亡时,线粒体膜电位降低,极性减弱,JC-1 从线粒体内释放入胞质,胞质内低浓度的 JC-1 以单体的形式存在并发绿色荧光。不同浓度温石棉粉尘染毒 A549 细胞 24 h 后,流式细胞仪检测 JC-1 绿/红荧光强度比值,结果如图 4 所示。与对照组相比,线粒体膜电位下降幅度随着温石棉染毒浓度的增加而升高 ($P < 0.01$);在同一温石棉浓度条件下,加入 ROS 抑制剂 NAC 后,NAC 组线粒体膜电位下降幅度较温石棉组分别降低 11.87%、12.21% 和 9.5%,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

2.5 caspase-3、p53 蛋白的表达水平

如图 5 所示,温石棉粉尘分别以 50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的浓度染毒 A549 细胞 24 h 后,通过蛋白质电泳、荧光成像系统分析实验结果如图 5 所示。与对照组相比,caspase-3、p53 蛋白表达水平均升高。在相同浓度温石棉条件下,加入 ROS 抑制剂 NAC 后,NAC 组 caspase-3 蛋白表达较温石棉组分别降低 64.5% 和

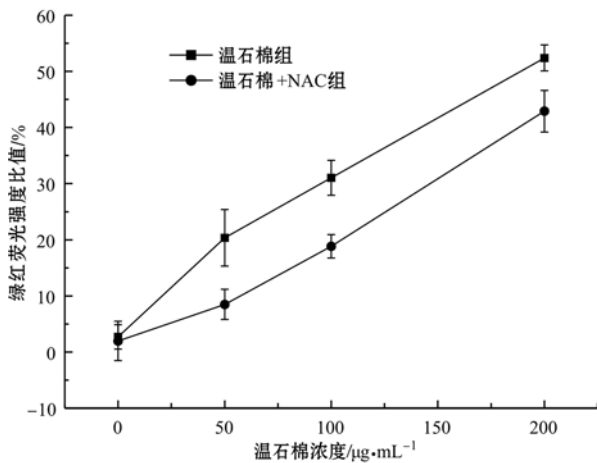


图4 不同浓度温石棉粉尘染毒 A549 细胞 24 h 后的细胞线粒体膜电位下降水平

Fig. 4 Mitochondrial membrane potential of A549 cells exposed to different concentrations of chrysotile asbestos dusts after 24 hours

37%, 差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); NAC 组 p53 蛋白表达水平和温石棉组相比, 在 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时下降 12%, 在 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度时下降 18.5%, 下降水平仅在温石棉剂量为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

温石棉因具有保温、隔热、绝缘等优良性能, 在我国已有数千年的使用历史。目前石棉相关制品有 3 000 多种, 遍布于建筑、化工设备、汽车等行业(樊晶光等, 2016)。然而, 石棉肺、肺癌及胸腹膜间皮瘤等温石棉相关疾病, 潜伏期可达 20 ~ 40 年, 对人体健康造成巨大威胁, 其毒性机制一直是研究的重点和热点。温石棉纤维不仅可直接导致靶细胞机械损伤, 还可诱导靶细胞产生 ROS, 过量的 ROS 使体内氧化-抗氧化系统失衡, 引起机体一系列氧化应激损伤, 最终诱导细胞凋亡(Pietrofesa *et al.*, 2016; 霍婷婷等, 2016)。线粒体是胞内重要的能量生成、转化场所, 也是 ROS 的主要产生地以及参与细胞凋亡的重要细胞器(Afaghi *et al.*, 2015)。越来越多的证据表明, 温石棉粉尘刺激机体产生的 ROS 在线粒体凋亡通路中占据重要地位, 但其具体作用机制仍未阐明。

线粒体膜电位降低是细胞发生早期凋亡的标志。研究表明, 温石棉纤维粉尘可直接或间接的使细胞线粒体通透性转换孔开放, 导致线粒体膜通透

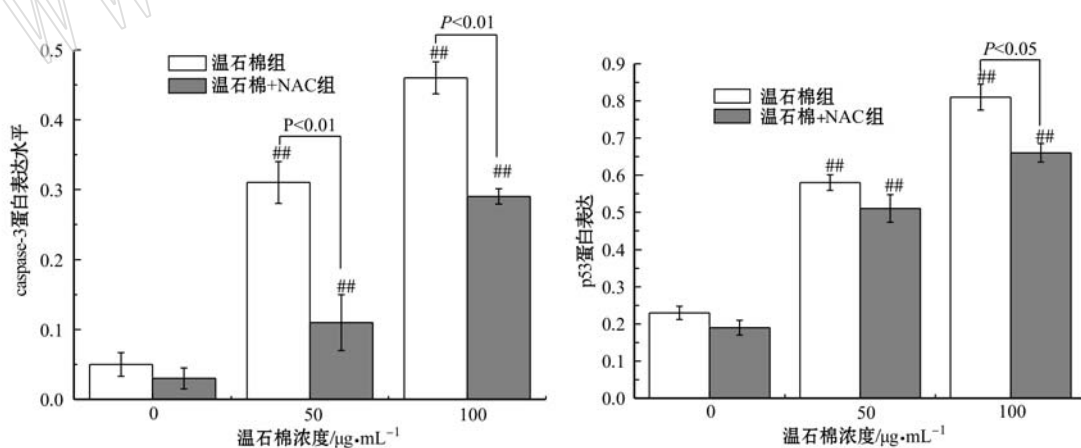


图5 不同浓度温石棉粉尘染毒 A549 细胞 24 h 后的 caspase-3 和 p53 蛋白表达

Fig. 5 Expression of caspase-3 and p53 protein of A549 cells exposed to different concentrations of chrysotile asbestos dust after 24 hours

##——温石棉处理组 caspase-3、p53 蛋白表达水平与对照组相比 $P < 0.01$

##——the expression level of caspase-3 and p53 protein in chrysotile asbestos group compared with control group, $P < 0.01$

性增高或线粒体膜损伤破裂,造成线粒体内外质子浓度梯度和膜两侧电位差失衡,使细胞进入不可逆的凋亡过程(Kamp *et al.*, 2012)。本实验中,随着温石棉染毒剂量的增加,线粒体膜电位的减少值增大,线粒体膜电位逐渐降低。在加入 ROS 抑制剂 NAC 后,与同等浓度的温石棉组相比,线粒体膜电位下降程度明显减少。以上结果表明温石棉纤维粉尘可诱导细胞进入早期凋亡过程,ROS 可促进温石棉纤维诱导细胞凋亡。这一结果与本实验中通过流式细胞仪检测细胞凋亡的结果相一致,更加充分的说明了 ROS 在细胞凋亡中扮演重要角色。

在本实验中,随着温石棉纤维粉尘浓度的增加和作用时间的延长,ROS 的产生量逐步上升,具有明显的时间和剂量效应。方帆等(2015)研究发现温石棉粉尘表面的 Si—O 键在机械破碎后断裂,形成的 Si·基和 Si—O·基在体内肺泡液等酸性环境作用下,可产生大量的 ROS。温石棉纤维表面的金属离子,可促使体内大分子物质以及化学吸附的氧发生生物过氧化,促使炎性细胞的聚集和活化,局部形成慢性炎症缓慢释放出 ROS(Toyokuni, 2014; 王玉琳等,2017)。Schulz 等(2014)发现石棉可通过使线粒体 DNA 缺失导致电子传递链异常,从而诱导 ROS 的产生,是体内 ROS 产生的主要方式。本实验通过 MTT 法检测细胞活力发现,不同浓度的温石棉染毒 A549 细胞不同时间后,对细胞的活力均有抑制作用。在加入 ROS 抑制剂 NAC 后,与同等浓度的温石棉组相比较,胞内 ROS 的含量显著减少。细胞存活率随胞内 ROS 的含量的增加而呈递减趋势,提示温石棉对 A549 细胞体外增殖的抑制作用与胞内 ROS 的产生及含量有关。

细胞凋亡的信号转导通路主要包括外源性的死亡受体通路和内源性的线粒体通路、内质网通路。caspase-3 是线粒体凋亡通路中的关键蛋白,多种凋亡途径最终汇聚并通过 caspase-3 来触发凋亡(Maricica *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2015)。有研究表明,体外 A549 细胞和体内小鼠肺组织中发生凋亡的细胞随暴露剂量的增加而增多,同时伴有 caspase-3 和 caspase-9 的过表达(Kido *et al.*, 2008)。本实验中温石棉粉尘分别以 50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量染毒 A549 细胞 24 h 后, caspase-3 蛋白表达量均比对照组明显升高,随着染毒剂量的增加蛋白表达也逐渐增强;加入 NAC 后,和同一剂量温石棉组相比, caspase-3 蛋白表达水平明显下降。表明 ROS 可促进 caspase-3

蛋白过表达,诱导细胞凋亡的发生,与流式细胞术检测的细胞凋亡结果相符合。

p53 是一个经典的肿瘤抑制基因,也可参与线粒体凋亡通路的调控,与凋亡的发生密切相关(Lee *et al.*, 2015)。在凋亡发生的早期,很多细胞中普遍存在着 p53 线粒体转位,线粒体转位后的 p53 主要通过和 Bcl-2 家族蛋白相互作用发挥促凋亡的功能(Belade *et al.*, 2014)。本实验中,温石棉纤维粉尘与 A549 细胞作用 24 h 后,细胞凋亡率升高, p53 蛋白表达水平增加,说明温石棉有助于 p53 转位到线粒体,引起细胞凋亡。Kido 等(2008)研究发现,ROS 的形成是 p53 诱导细胞凋亡的关键步骤。加入 NAC 后,中高浓度(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)温石棉可使 p53 表达水平明显降低,而低浓度(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)温石棉组降低不明显。低浓度组中 ROS 抑制剂对 p53 蛋白表达无明显影响,可能是由于低浓度的温石棉诱导机体产生的 ROS 不足以使 p53 蛋白过表达, p53 蛋白在低浓度下的过表达可能还有其他激活途径,有待进一步研究。

4 结论

(1) 温石棉可诱导胞内 ROS 水平显著上升,并上调线粒体凋亡通路相关蛋白 caspase-3 和 p53 表达,诱导细胞发生凋亡;ROS 抑制剂 NAC 能显著降低胞内 ROS 水平,下调 caspase-3 和 p53 表达,减少细胞凋亡率;

(2) ROS 在温石棉诱导细胞凋亡中通过使 caspase-3、p53 过表达,正向调控线粒体凋亡通路,从而诱导细胞凋亡的发生。

References

- Afaghi A, Oryan S, Rahzani K, *et al.* 2015. Study on genotoxicity, oxidative stress biomarkers and clinical symptoms in workers of an asbestos-cement factory[J]. *Excli Journal*, 14: 1 067 ~ 1 077.
- Belade E, Chrusciel S, Armand L, *et al.* 2014. The role of p53 in lung macrophages following exposure to a panel of manufactured nanomaterials[J]. *Archives of Toxicology*, 9(9): 1 543 ~ 1 556.
- Cheresh P, Moralesnebrede L, Kim S J, *et al.* 2015. Asbestos-induced pulmonary fibrosis is augmented in 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) knockout mice[J]. *American Journal of Respiratory Cell & Molecular Biology*, 52(1): 25 ~ 36.

- Fan Jingguang, Wang Haijiao and Feng Lingyun. 2016. Deadly asbestos fiber[J]. *Labour Protection*, 2(2): 12 ~ 14(in Chinese).
- Fang Zhi, Xue Bo, Liu Longzhou, *et al.* 2015. Free radical types in cells and generation mechanism[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 43(15): 20 ~ 22(in Chinese with English abstract).
- Huang S X L, Partridge M A, Ghandhi S A, *et al.* 2012. Mitochondria-derived reactive intermediate species mediate asbestos-induced genotoxicity and oxidative stress-responsive signaling pathways[J]. *Environmental Health Perspectives*, 120(6): 840 ~ 847.
- Huo Tingting, Dong Faqin, Deng Jianjun, *et al.* 2016. Research development on surface activity and bio-persistence of chrysotile asbestos [J]. *Journal of the Chinese Ceramic Society*, 44(5): 763 ~ 768(in Chinese with English abstract).
- Kamp D, Cheres P, Trejo H, *et al.* 2012. Asbestos-Induced Alveolar Epithelial Cell Apoptosis: Mitochondria-ER Crosstalk[C]. *American Thoracic Society 2012 International Conference*, May, 18 ~ 23, San Francisco, California, A4277.
- Kamp D W, Liu G, Cheres P, *et al.* 2013. Asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis. The role of endoplasmic reticulum stress response[J]. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 49(6): 892 ~ 901.
- Kido T, Morimoto Y, Asonuma E, *et al.* 2008. Chrysotile asbestos causes AEC apoptosis via the caspase activation in vitro and in vivo[J]. *Inhalation Toxicology R.*, 20(3): 339 ~ 347.
- Lee Y J, Lee Y J, Park I S, *et al.* 2015. Quercetin exerts preferential cytotoxic effects on malignant mesothelioma cells by inducing p53 expression, caspase-3 activation, and apoptosis[J]. *Molecular & Cellular Toxicology*, 11(3): 295 ~ 305.
- Lim C B, Prêle C M, Baltic S, *et al.* 2015. Mitochondria-derived reactive oxygen species drive GANT61-induced mesothelioma cell apoptosis[J]. *Oncotarget*, 6(3): 1 519 ~ 1 530.
- Maricica P, Diane S B, Sherri F, *et al.* 2011. Raw single-walled carbon nanotube-induced cytotoxic effects in human bronchial epithelial cells: comparison to asbestos [J]. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 93(5): 1 045 ~ 1 072.
- Peng L I, Liu T, Kamp D W, *et al.* 2015. The c-Jun N-terminal kinase signaling pathway mediates chrysotile asbestos-induced alveolar epithelial cell apoptosis [J]. *Molecular Medicine Reports*, 11(5): 3 626 ~ 3 634.
- Pereira M M, Raposo N R, Brayner R, *et al.* 2013. Cytotoxicity and expression of genes involved in the cellular stress response and apoptosis in mammalian fibroblast exposed to cotton cellulose nanofibers[J]. *Nanotechnology*, 24(7): 75 ~ 103.
- Pietrofesa R A, Velalopoulou A, Albelda S M, *et al.* 2016. Asbestos induces oxidative stress and activation of Nrf2 signaling in murine macrophages: chemopreventive role of the synthetic lignan secoisolaricresinol diglucoside (LGM2605)[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3): 322 ~ 339.
- Schulz E, Wenzel P, Münzel T, *et al.* 2014. Mitochondrial redox signaling: Interaction of mitochondrial reactive oxygen species with other sources of oxidative stress[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 20(2): 308 ~ 324.
- Song Pengcheng, Peng Tongjiang, Xian Haiyang, *et al.* 2013. Mineralogical characteristics, development and utilization of chrysotile asbestos tailing from the Aksay ore district[J]. *Acta Petrologica et Mineralogica*, 32(6): 905 ~ 910(in Chinese with English abstract).
- Toyokuni S. 2014. Iron overload as a major targetable pathogenesis of asbestos-induced mesothelial carcinogenesis[J]. *Redox Rep.*, 19(1): 1 ~ 7.
- Wang Yulin, Deng Jianjun, Yang Jie, *et al.* 2017. Research progress on oxidative stress related mechanism of asbestos cytotoxicity[J]. *Journal of Environmental & Occupational Medicine*, 34(8): 734 ~ 739(in Chinese with English abstract).

附中文参考文献

- 樊晶光, 王海椒, 冯灵云. 2016. 致命的石棉纤维[J]. *劳动保护*, 2(2): 12 ~ 14.
- 方 帆, 薛 波, 刘龙洲, 等. 2015. 细胞内自由基的类型及产生机制[J]. *安徽农业科学*, 43(15): 20 ~ 22.
- 霍婷婷, 董发勤, 邓建军, 等. 2016. 蛇纹石石棉纤维表面活性及生物持久性研究进展[J]. *硅酸盐学报*, 44(5): 763 ~ 768.
- 宋鹏程, 彭同江, 鲜海洋, 等. 2013. 阿克塞石棉尾矿矿物学特征及开发利用研究[J]. *岩石矿物学杂志*, 32(6): 905 ~ 910.
- 王玉琳, 邓建军, 杨 洁, 等. 2017. 石棉致细胞毒性的氧化应激机制的研究进展[J]. *环境与职业医学*, 34(8): 734 ~ 739.