实验研究
Experiment

亚砷酸钠致人胚肺成纤维细胞损伤中自噬和凋亡的关系

王馨悦，王素华，王丽，赵宇航，高艳荣

包头医学院公共卫生学院，内蒙古 包头 014040

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.19239

基金项目
国家自然科学基金（81660532）；内蒙古科技计划项目（201502080）

作者简介
王馨悦（1991—），女，硕士生；
E-mail：1351537685@qq.com

通信作者
王素华，E-mail：bt_wangsuhua@163.com

利益冲突 无申报
收稿日期 2019-04-12
录用日期 2019-05-23

文章编号 2095-9982(2019)09-0853-06
中图分类号 R114
文献标志码 A

▸引用
王馨悦，王素华，王丽，等. 亚砷酸钠致人胚肺成纤维细胞损伤中自噬和凋亡的关系［J］. 环境与职业医学，2019，36（9）：853-857，863.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19239

Funding
This study was funded.

Correspondence to
WANG Su-hua, E-mail: bt_wangsuhua@163.com

Competing interests None declared
Received 2019-04-12
Accepted 2019-05-23

▸To cite
WANG Xin-yue, WANG Su-hua, WANG Li, et al. Relationship between autophagy and apoptosis of human embryonic lung fibroblasts induced by sodium arsenite[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(9): 853-857, 863.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19239

摘要：

[背景] 砷可导致细胞损伤，引起细胞自噬和凋亡，而细胞自噬与凋亡之间目前没有明确界限，二者关系目前尚不明确。

[目的] 探讨亚砷酸钠致人胚肺成纤维细胞（HELF）损伤中细胞自噬与凋亡的关系。

[方法] HELF 细胞株培养 3 d 后传代，随机分为对照组、亚砷酸钠处理组（亚砷酸钠浓度分别为 5、10、20 μmol/L）、自噬抑制组（20 μmol/L $NaAsO_2$+5 mmol/L 3- 甲基腺嘌呤）、凋亡抑制组（20 μmol/L $NaAsO_2$+20 μmol/L Caspase 抑制剂 z-VAD-FMK），染毒 48 h 后，MTT 实验检测细胞存活率，倒置显微镜观察细胞形态学改变。提取细胞上清液、蛋白，ELISA 法测定上清液中白介素（IL）-1β、IL-6、干扰素受体（IFN）-α 含量。Western blot 检测自噬相关蛋白 p62 和 LC3 的表达水平。Caspase 试剂盒检测凋亡相关蛋白 caspase3/7。

[结果] 各组细胞存活率在染毒 12、24、48 h 后均低于对照组（$P<0.05$）。随着染毒浓度增加细胞形态学改变，由紧密的梭形逐渐变为松散的圆形。10、20 μmol/L 砷染毒组 HELF 细胞上清液中 IL-1β 表达量升高（$P<0.05$）；各砷染毒组细胞培养上清液中促炎因子 IL-6、IFN-α 表达量高于对照组（$P<0.05$）；与 20 μmol/L 亚砷酸钠染毒组相比，自噬抑制组呈现促炎因子表达量升高的趋势，凋亡抑制组呈现降低的趋势。与对照组相比，砷染毒组细胞中 LC3-I、LC3-II 蛋白表达量呈升高的趋势，p62 蛋白的表达量呈降低的趋势；与 20 μmol/L 亚砷酸钠染毒组相比，自噬抑制组细胞中 LC3-I、LC3-II 蛋白表达量降低（$P<0.05$），p62 蛋白表达量呈升高的趋势；凋亡抑制组细胞中 LC3-I、LC3-II 蛋白表达水平呈升高趋势，p62 蛋白的表达水平呈降低趋势。随着染毒浓度增加，与对照组相比，10、20 μmol/L 砷暴露组凋亡相关蛋白 caspase3/7 表达量增多（$P<0.05$）；与 20 μmol/L 亚砷酸钠染毒组相比，自噬抑制组 caspase3/7 表达量升高（$P<0.05$），凋亡抑制组表达量降低（$P<0.05$）。

[结论] 亚砷酸钠染毒后可引起 HELF 发生炎症反应、细胞自噬和凋亡，且细胞自噬与凋亡之间可能存在一定的拮抗关系。

关键词：砷；人胚肺成纤维细胞；炎性因子；细胞自噬；细胞凋亡

Relationship between autophagy and apoptosis of human embryonic lung fibroblasts induced by sodium arsenite

WANG Xin-yue, WANG Su-hua, WANG Li, ZHAO Yu-hang, GAO Yan-rong (*School of Public Health, Baotou Medical College, Baotou, Inner Mongolia* 014040*, China*)

Abstract:

[Background] Arsenic can cause cell damage, autophagy, and apoptosis, but there is no clear boundary between autophagy and apoptosis, and their relationship is unclear.

[Objective] This study is designed to investigate the relationship between autophagy and apoptosis in human embryonic lung fibroblasts (HELF) treated with sodium arsenite.

[Methods] HELF cells were cultured for three days and then randomly divided into a control group, three sodium arsenite treatment groups (5, 10, and 20 μmol/L), an autophagy inhibition group (20 μmol/L $NaAsO_2$+5 mmol/L 3-methyladenine), and an apoptosis inhibition group (20 μmol/L $NaAsO_2$+20 μmol/L Caspase inhibitor z-VAD-FMK). After 48 hours of the designed exposure protocol, the cell survival rate was detected by MTT assay, and the morphological changes were observed under inverted microscope. Proteins were extracted from supernatants to determine the contents of interleukin (IL)-1β, IL-6, interferon (IFN)-α in supernatants by ELISA. The expression levels of autophagy related proteins p62 and LC3 were detected by Western blot

and apoptosis related protein caspase3/7 by Caspase kit.

[Results] The cell survival rates of the sodium arsenite treatment groups, the autophagy inhibition group, and the apoptosis inhibition group were significantly lower than that of the control group at 12, 24, and 48 h after treatment ($P<0.05$). With the increase of exposure concentration, the morphology changed from tightly arranged spindle cells to loosely arranged round cells. The expressions levels of IL-1β in the supernatant of HELF cells in the 10 and 20 μmol/L arsenic exposure groups were increased ($P<0.05$). The expression levels of pro-inflammatory cytokins IL-6 and IFN-α in the supernatant of arsenic treated groups were significantly higher than those of the control group ($P<0.05$). Compared with the 20 μmol/L sodium arsenite treatment group, the expression levels of pro-inflammatory cytokines in the autophagy inhibition group were higher, and the expression levels in the apoptosis inhibition group were lower. Compared with the control group, the expression levels of LC3-I and LC3-II proteins showed an upward trend, while the expression levels of p62 protein showed a downward trend in the arsenic exposure groups. Compared with the 20 μmol/L sodium arsenite treatment group, the expression levels of LC3-I and LC3-II proteins were decreased ($P<0.05$), and the expression level of p62 protein showed an increasing trend in the autophagy inhibition group; the expression levels of LC3-I and LC3-II proteins shouled an upward trend, while the expression level of p62 protein showed a downward trend in the apoptosis inhibition group. With the increase of arsenite exposure concentration, compared with the control group, the expression of apoptosis-related protein caspase3/7 in the 10 and 20 μmol/L arsenic exposure groups increased ($P<0.05$). Compared with the 20 μmol/L sodium arsenite treatment group, the expression of caspase3/7 in the autophagy inhibition group was increased ($P<0.05$), and the expression of caspase3/7 in the apoptosis inhibition group was decreased ($P<0.05$).

[Conclusion] Sodium arsenite can induce inflammatory reaction, autophagy, and apoptosis of HELF cells, and there may be an antagonistic relationship between autophagy and apoptosis.

Keywords: arsenic; human embryonic lung fibroblasts; inflammatory cytokine; autophagy; apoptosis

砷是国际癌症机构认定的主要致癌物。在我国内蒙古地区，砷污染区主要分布在呼和浩特、包头等地，受影响人群众多，砷中毒病人逐年增加[1]，是目前国内最严重的地方性砷中毒病区。内蒙古地区砷污染主要为饮水型，饮水中的砷化合物经消化道吸收进入循环系统，流经肺脏，导致呼吸系统损伤，严重者可导致肿瘤的发生[2]，因此，肺脏是砷污染暴露的敏感器官之一。亚砷酸钠染毒可导致细胞存活率下降，形态发生改变。细胞炎性因子变化在参与调控机体炎症反应的过程中起到关键作用。白介素（interleukin，IL）-1β是在炎症反应启动过程中发挥核心作用的促炎细胞因子之一，参与机体各个系统的炎症反应和免疫调节。IL-6亦属于促炎细胞因子，其参与机体炎症、免疫调节和代谢等过程。当发生炎症刺激时，IL-6可被IL-1β和干扰素受体（interferon，IFN）-α诱导，由单核细胞、巨噬细胞和内皮细胞所释放，引起局部炎症反应，导致组织损伤。有研究表明，给予亚砷酸钠染毒后，大鼠肺泡灌洗液中炎性因子表达升高[3]。

自噬是形成双层膜的自噬泡包裹胞质内的物质，然后与溶酶体融合消化掉内容物。细胞自噬是细胞程序性死亡形式之一[4]，生理性自噬是细胞的自我保护机制，但自噬过度可导致代谢应激、细胞死亡等。研究发现，砷暴露致大鼠肺损伤的机制可能与细胞自噬功能紊乱有关[5]。砷暴露可使细胞自身自噬保护机制启动，但当细胞损伤达到一定程度时则发生凋亡，因此可以认为自噬是凋亡发生的前一阶段。透射电镜观察“自噬小体”是目前国际上认定自噬发生的金标准，是反映细胞内形态的重要技术手段[6]。当自噬被激活时，p62表达水平降低；当自噬被抑制时，自噬体发生积累，p62表达水平升高，p62蛋白水平增高是自噬损伤的标志之一。LC3分为Ⅰ型和Ⅱ型，细胞内新合成的LC3其C端被Atg4蛋白酶切割，成为可溶形式的LC3-I，分布于胞浆内。LC3-I经过泛素化加工修饰，与自噬膜表面的磷脂酰乙醇胺共轭结合，成为LC3-II，并定位于自噬体内膜和外膜[7]。因此，LC3和p62是细胞自噬水平的标志之一。

细胞凋亡是指由基因控制的细胞有序而独立地死亡，以维持内部环境的稳定[8]。研究发现3价砷可诱导小鼠肺泡巨噬细胞发生凋亡[9]。凋亡是正常的细胞死亡途径，诱导细胞凋亡也是砷产生细胞毒性的可能机制之一。Caspase3/7是细胞凋亡的执行者，在细胞凋亡过程中起重要作用[10]。细胞自噬与凋亡目前没有明确界限，本研究通过亚砷酸钠染毒人胚肺成纤维细胞（human embryonic lung fibroblasts，HELF），观察染毒后细胞形态学、炎性因子、细胞自噬、细胞凋亡的变化，从而讨论在亚砷酸钠染毒后HELF中自噬与凋亡的关系。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

HELF细胞株（人胚肺成纤维细胞，中国武汉普诺赛生命科技有限公司），细胞解冻后复苏，培养于10 cm细胞培养皿，37℃，5%CO_2，每3 d更换一次培

养基。

1.2 主要试剂与仪器

亚砷酸钠（纯度99%，中国成都艾科化学技术有限公司），胎牛血清、杜氏改良Eagle培养基、胰酶（以色列BI），IL-1β、IL-6、IFN-α试剂盒（中国南京建成公司），LC3、p62抗体（美国CST），caspase荧光试剂盒（美国Promega），细胞培养箱（美国Thermo），离心机（中国长沙湘仪仪器有限公司）。

1.3 细胞模型的建立及样品采集

HELF复苏后培养10 cm细胞培养皿中，加入完全培养液（DMEM+FBS），每3 d更换一次培养基，进行细胞传代、冻存。细胞培养后进行MTT实验。将细胞随机分为对照组、亚砷酸钠暴露组、自噬抑制组、凋亡抑制组。对照组常规培养，加入10 mL 完全培养基；亚砷酸钠暴露组分别各加入10 mL浓度为5、10、20 μmol/L的$NaAsO_2$溶液；自噬抑制组加入10 mL浓度为20 μmol/L的$NaAsO_2$溶液及浓度为200 mmol/L的3-甲基腺嘌呤（3-meyhyladenine，3-MA）250 μL；凋亡抑制组加入10 mL浓度为20 μmol/L的$NaAsO_2$溶液及浓度为1 mmol/L的Caspase抑制剂z-VAD-FMK（后简称z-VAD）200 μL。染毒48 h后提取细胞培养液上清液、蛋白进行后续实验。

1.4 细胞形态学观察及MTT实验

采用倒置显微镜观察细胞形态学改变，收集对数期细胞并调整细胞悬液浓度，将细胞单层培养于96孔板中，加入梯度浓度药物，5%CO_2，37℃孵育48 h。每孔加入20 μL MTT溶液，继续培养4 h后，终止培养，小心吸去孔内培养液。每孔加入150 μL二甲基亚砜，低速振荡10 min，溶解晶体。酶标仪预热，490 nm处测量各孔的光密度值（*D*），计算细胞存活率。

1.5 透射电镜观察细胞自噬小体

细胞染毒后取出，消化，10 000×*g*离心20 mim，弃去上清液，加入电镜专用戊二醛，4℃固定过夜。吸去固定液，用磷酸缓冲液冲洗样品3次，每次5 min，使用1%的锇酸溶液固定样品2 h，包埋剂：丙酮（体积比1∶1）处理样品1 h，包埋剂：丙酮（体积比3∶1）处理样品3 h，用试剂处理的样品隔夜，将样品掩埋，在70℃加热过夜，切成70 mm的切片，透射电镜观察HELF自噬体。

1.6 ELISA法检测IL-1β、IL-6、IFN-α

96孔板设标准孔、空白孔、样品孔。向标准孔中加入按比例稀释好的标准品，样品孔中加入50 μL样品，每孔加入生物素50 μL，盖上封板膜，轻轻震荡混匀，37℃孵育30 min。弃去孔内液体，每孔加入洗涤液300 μL，轻轻摇晃30 s，在吸水纸上拍干，如此重复5次。每孔加入亲和素50 μL，盖上封板膜，轻轻震荡混匀，37℃孵育30 min。弃去孔内液体，每孔加入洗涤液300 μL，轻轻摇晃30 s，在吸水纸上拍干，如此重复5次。每孔先后加入显色液A、B各50 μL，盖上封板膜，轻轻震荡混匀，室温避光孵育10 min。取出96孔板，加入终止液50 μL终止反应。酶标仪于波长450 nm处检测*D*值，根据*D*值计算出样品浓度。

1.7 Western blot法检测LC3A/B-Ⅰ、LC3A/B-Ⅱ、p62

细胞用缓冲液冲洗后加入裂解液，放入离心机12 000×*g*、4℃、离心20 min，提取细胞总蛋白。在采集的蛋白质样品中加入适量的SDS-PAGE蛋白样品缓冲液，100℃或沸水浴加热5 min以上，以充分变性蛋白，随后将蛋白依次放入SDS-PAGE凝胶样品孔中，浓缩胶电压设置为80~100 V，分离胶电压设置为120 V，转膜。加入Western封闭液，在摇床上轻慢摇动，37℃封闭1 h。按照说明书分别加入一抗二抗，凝胶成像仪拍照。应用Quantity One、Gel pro analyzer、Image J等软件对Western blot条带进行定量分析，计算出相对值。

1.8 caspase3/7荧光检测

将96孔板从培养箱取出，平衡到室温。将100 μL Caspase-Glo试剂加入各组的96孔白色板上。用盖子或封闭膜覆盖板，并在振荡器上轻轻混合约30 s。室温（18~22℃）孵育2 h。在发光检测仪或带发光检测功能的多功能酶标仪上读取每个样品的荧光值。

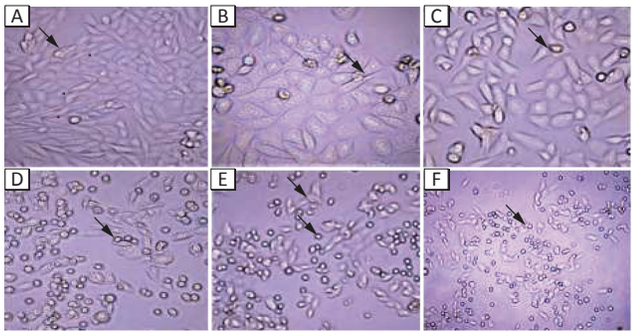
1.9 统计学分析

采用SPSS 17.0软件进行统计分析。不同组间均数比较采用完全随机设计单因素方差分析，均数间两两比较方差齐时采用LSD-*t*检验。检验水准α=0.05。

2 结果

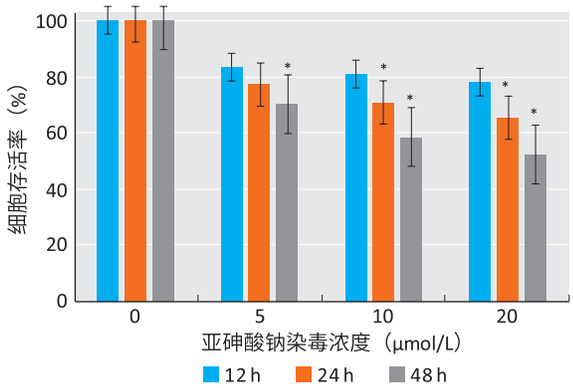
2.1 细胞存活率及形态学变化

染毒后HELF细胞形态学发生改变，由正常的梭形变为圆形，且圆形数量增多（图1）。各染毒组细胞随着染毒浓度和时间的增加，细胞存活率呈现逐渐下降的趋势；染毒48 h后，在20 μmol/L时细胞存活率降至约50%。各组细胞存活率在染毒12、24、48 h后均低于对照组（$P<0.05$）。见图2。



[注] 染毒组细胞形态变为圆形，且圆形数量增加。A：对照；B：5 μmol/L；C：10 μmol/L；D：20 μmol/L；E：20 μmol/L+3-MA；F：20 μmol/L+z-VAD。

图 1 亚砷酸钠染毒 48 h 后 HELF 细胞形态学改变（x100）



[注] *：与对照组比较，$P<0.05$。

图 2 亚砷酸钠染毒后 HELF 细胞存活率的变化

2.2 炎性因子含量

与对照组相比，10、20 μmol/L 亚砷酸钠染毒组 HELF 细胞上清液中 IL-1β 表达量升高，且在 20 μmol/L 时达到最高；与 20 μmol/L 组相比，自噬抑制组 IL-1β 表达量呈升高，凋亡抑制组呈降低的趋势。与对照组相比，各亚砷酸钠染毒组 HELF 细胞上清液中 IL-6 表达量升高；与 20 μmol/L 组相比，自噬抑制组 IL-6 表达量呈升高的趋势，凋亡抑制组降低（$P<0.05$）。与对照组相比，各亚砷酸钠染毒组 HELF 细胞上清液中 IFN-α 表达量升高，且在 20 μmol/L 时达到最高；与 20 μmol/L 组相比，自噬抑制组 IL-1β 表达量升高（$P<0.05$），凋亡抑制组呈降低的趋势。见表 1。

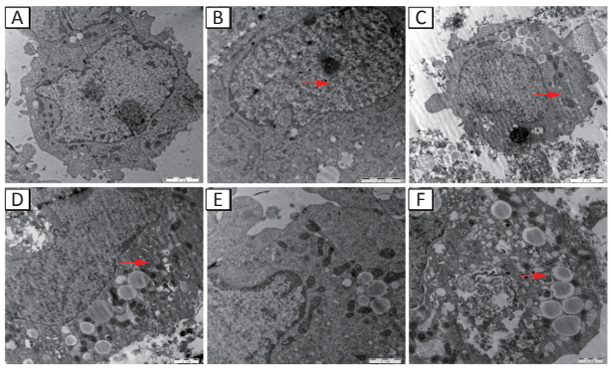
表 1 不同亚砷酸钠染毒后 HELF 细胞中 IL-1β、IL-6、IFN-α 含量（$\bar{x}\pm s$）

组别	IL-1β	IL-6	IFN-α
对照	6.434±1.102[b]	97.778±1.154[b]	9.104±0.259[b]
5 μmol/L	7.432±0.672[b]	124.993±2.919[ab]	12.309±0.755[ab]
10 μmol/L	8.718±0.990[a]	196.331±2.123[ab]	15.545±0.703[ab]
20 μmol/L	9.108±1.167[a]	155.089±3.911[a]	18.502±1.407[a]
20 μmol/L+3-MA	9.343±0.789[a]	176.654±2.756[a]	20.654±0.675[ab]
20 μmol/L+z-VAD	8.932±0.657[a]	150.785±1.896[ab]	16.765±0.658[a]
F	8.094	15.452	12.207
P	<0.05	<0.05	<0.05

[注] a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与 20 μmol/L 组相比，$P<0.05$。

2.3 自噬小体

砷酸钠染毒 48 h 后，5 μmol/L 组出现较少自噬小体；随着染毒浓度增加，10、20 μmol/L 组自噬小体逐渐增加；且抑制细胞凋亡后凋亡抑制组（20 μmol/L $NaAsO_2$+z-VAD）出现自噬小体，加入自噬抑制剂 3-MA 后自噬小体消失（图 3）。

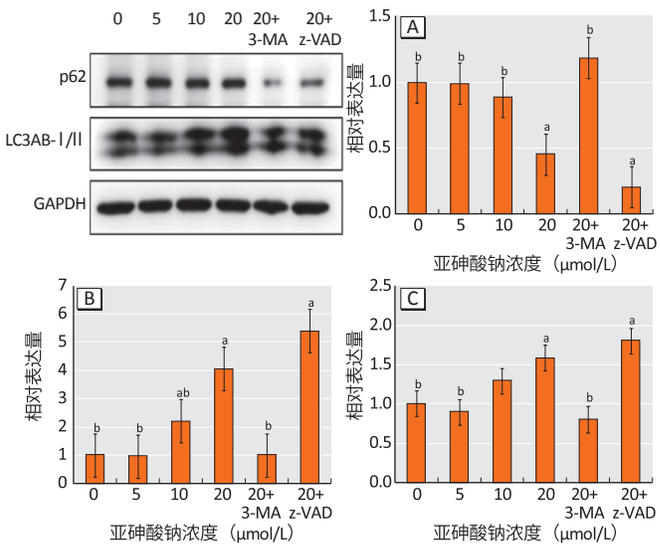


[注] 红色箭头示自噬小体。A: 对照；B：5 μmol/L；C：10 μmol/L；D：20 μmol/L；E：20 μmol/L+3-MA；F：20 μmol/L+z-VAD。

图 3 亚砷酸钠染毒 HELF 细胞 48 h 后细胞中自噬小体（x100）

2.4 LC3A/B-Ⅰ、LC3A/B-Ⅱ、p62 含量

亚砷酸钠染毒后，与对照组相比，各染毒组自噬相关蛋白 LC3-I、LC3-II 表达量呈逐渐升高的趋势，p62 表达量呈逐渐降低的趋势。与 20 μmol/L $NaAsO_2$ 组相比，自噬抑制组 LC3A/B-I、LC3A/B-II 表达量降低（$P<0.05$），凋亡抑制组表达量呈现升高的趋势。与 20 μmol/L $NaAsO_2$ 组相比，自噬抑制组 p62 表达量升高（$P<0.05$），凋亡抑制组 p62 表达量呈降低的趋势。见图 4。

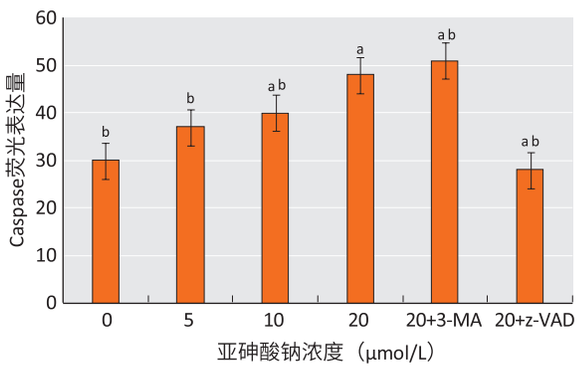


[注] a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与 20 μmol/L 组相比，$P<0.05$。

图 4 亚砷酸钠染毒后 HELF 细胞 p62（A）、LC3A/B-Ⅰ（B）、LC3A/B-Ⅱ（C）蛋白表达水平

2.5 caspase3/7 含量

结果显示，不同染毒组 HELF 中 caspase3/7 含量与对照组（32.8±1.9）相比，随着亚砷酸钠染毒浓度增加，caspase3/7 含量呈现增高趋势（37.2±1.7、40.6±2.3、48.0±2.9），10、20 μmol/L 组差异有统计学意义（$P<0.05$）。与 20 μmol/L $NaAsO_2$ 组相比，自噬抑制组（20 μmol/L $NaAsO_2$+3-MA）中凋亡相关蛋白 caspase3/7 表达量增加（51.6±2.2），凋亡抑制组 caspase3/7 表达量减少（27.0±1.4）（$P<0.05$）。见图 5。



［注］a：与对照组相比，$P<0.05$；b：与 20 μmol/L 组相比，$P<0.05$。

图 5 亚砷酸钠染毒后 HELF 细胞中 caspase3/7 表达水平

3 讨论

细胞形态及存活率是反映细胞是否发育良好的指标之一，有研究显示，低浓度砷可引起细胞增殖[11]，高浓度可引起细胞凋亡，本实验选取亚砷酸钠浓度为抑制增殖浓度，随着染毒浓度增高，细胞存活率开始下降，并且随着染毒时间延长和染毒剂量增加，细胞形态学逐渐发生变化，由饱满的梭形变为圆形。培养细胞上清液中炎性因子的表达量可反映亚砷酸钠染毒后损伤程度，本实验显示，在染毒 48 h 后细胞促炎因子 IL-1β、IL-6、IFN-α 明显升高，并在 20 μmol/L 时细胞炎性反应达到最大，说明该浓度砷暴露可导致 HELF 细胞发生损伤，炎症的发生可能是引起细胞自噬或凋亡的机制之一。

自噬是一种分解代谢的过程，通过溶酶体机制降解细胞内的成分[5, 12]，是一个动态过程。根据自噬发生的分子机制、功能的不同可以将自噬分为微自噬（microautophagy）、分子伴侣介导的自噬（chaperone-mediated autophagy）、选择性自噬（selective autophagy）和巨自噬（macroautophagy）。在许多死亡细胞中观察到的自噬活性增加，可能不是细胞死亡的原因，而是作为一种细胞自卫机制，旨在拯救细胞免于死亡。因此，自噬可能实际上是代表细胞的生存机制。透射电镜显示，在亚砷酸钠染毒 HELF 细胞 48 h 后，5、10、20 μmol/L 染毒组均出现自噬小体，随着染毒剂量的增加，自噬小体逐渐增多。Western blot 实验结果显示：$NaAsO_2$ 染毒后随着染毒剂量的增加，细胞中自噬相关蛋白 LC3-Ⅰ、LC3-Ⅱ 表达水平逐渐上升，p62 表达水平下降，在给予凋亡抑制剂 z-VAD 后，与 20 μmol/L 染毒组相比，凋亡抑制组（20 μmol/L $NaAsO_2$+z-VAD）LC3-Ⅰ、LC3-Ⅱ 表达水平升高，p62 表达降低，提示细胞凋亡被抑制后细胞自噬水平反而升高。在亚砷酸钠染毒 48 h 后，caspase3/7 表达量随着染毒剂量的增加而增加，自噬抑制组（20 μmol/L $NaAsO_2$+3-MA）caspase3/7 表达量明显增高，在自噬抑制后细胞凋亡水平反而升高。细胞自噬和细胞凋亡是细胞的两种程序性细胞死亡方式[13-14]，两者可能相互拮抗或相互促进，并且可能同时发生或相继发生[15]。在同一细胞中，相同的诱导因子可诱导不同细胞中的自噬或凋亡，或诱导自噬导致凋亡细胞死亡。具体分为：合作关系、对抗关系、推动关系[14, 16]。本次实验中在亚砷酸钠暴露 HELF 细胞 48 h 后，亚砷酸钠染毒可以导致 HELF 细胞损伤，引起细胞死亡率增高，细胞炎性反应增强，并随着时间与剂量的增加而损伤加重。在亚砷酸钠染毒导致 HELF 细胞损伤过程中，发生了细胞自噬与细胞凋亡，二者可能存在拮抗关系。今后需进一步从基因、信号通路方面深入研究，进一步阐明二者关系。

参考文献

［1］戴红彦. 砷对机体损害及氧化损伤的研究进展［J］. 中国地方病防治杂志，2018，33（5）：516.

［2］杨涛，费振海，钟兴明. Caspase 家族与细胞凋亡的研究进展［J］. 浙江医学，2018，40（18）：2083-2087，2091.

［3］苏鑫，王素华，刘建国，等. 亚砷酸钠致雄性大鼠肺损伤机制探讨［J］. 中国职业医学，2016，43（02）：143-147.

［4］DA SILVA SIQUEIRA M，DE MORAES RIBEIRO R，TRAVASSOS LH. Autophagy and its interaction with intracellular bacterial pathogens［J］. Front Immunol，2018，9：935.

［5］苏鑫，王春虾，王素华，等. 细胞自噬在砷暴露所致肺损伤中的作用［J］. 环境卫生学杂志，2015，5（4）：336-340.

［6］MIZUSHIMA N. Methods for monitoring autophagy［J］. Int J Biochem Cell Biol，2004，36（12）：2491-2502.

［7］MIZUSHIMA N，YOSHIMORI T. How to interpret LC3 immunoblotting［J］. Autophagy，2007，3（6）：542-545.

（下转第 863 页）

参考。

参考文献

[1] 成会荣，秦明芳，陈杨，等. 砷冶炼厂工人砷甲基化代谢与肝和皮肤损伤及LncRNAs表达的关系 [J]. 环境与职业医学，2017，34 (11)：983-987.

[2] SAKURAI T，QU W，SAKURAI M H，et al. A major human arsenic metabolite，dimethylarsinic acid，requires reduced glutathione to induce apoptosis [J]. Chem Res Toxicol，2002，15 (11)：629-637.

[3] KLIGERMAN A D，DOERR C L，TENNANT A H，et al. Cytogenetic studies of three triazine herbicides：II. In vivo micronucleus studies in mouse bone marrow [J]. Mutaion Rsearch Genetic Toxicol Environ Mutagen，2000，471 (1/2)：107-112.

[4] 潘巧裕，黄汉林，梁旭霞，等. 高效液相色谱-氢化物发生－原子荧光光谱法测定尿中4种形态砷 [J]. 中国职业医学，2014，41 (1)：102-106.

[5] 宋冠仪，梅勇，商律，等. 高效液相色谱-氢化物发生-原子荧光联用技术测定饮用水中四种形态砷 [J]. 环境与职业医学，2017，34 (4)：350-353.

[6] 罗亚翠，张海君，郝伟，等. 慢性砷中毒标志物及其形态分析 [J]. 职业与健康，2019，35 (8)：1051-1054，1058.

[7] 李燕，肖梅，陈福明. 氢化物发生原子荧光检测人发中的砷 [J]. 广东微量元素科学，2016，23 (1)：34-37.

[8] 曹丽军. 微波消解石墨炉原子吸收测铁皮石斛中砷 [J]. 中国卫生检验杂志，2006，16 (7)：805-806.

[9] 王英锋，李中锋，热增才旦，等. 藏药仁青常觉中砷在大鼠尿液中的HPLC-ICP-MS研究 [J]. 药物分析杂志，2019，39 (2)：263-271.

[10] 杜航，龚进，代华，等. 慢性砷中毒患者头发代谢物特征的代谢组学研究 [J]. 环境与职业医学，2018，35 (2)：163-167.

[11] 殷学锋，徐光明，谷雪，等. 因子分析-氢化物发生原子吸收法分析砷的形态 [J]. 分析化学，1999，27 (7)：798-801.

[12] 杨慧，王富华，王旭，等. 蔬菜中砷的形态分析研究及其应用 [J]. 湖北农业科学，2010，49 (9)：2230-2233.

[13] 职业卫生标准制定指南 第5部分：生物材料中化学物质的测定法：GBZ/T 210.5—2008 [S]. 北京：中国标准出版社，2008.

[14] 李拥军，苏福荣，魏静，等. 尿中4种形态砷化物的离子色谱-氢化物发生-原子荧光光谱测定法 [J]. 环境与健康杂志，2011，28 (9)：809-811.

（英文编辑：汪源；编辑：丁瑾瑜；校对：韩凤婵）

（上接第857页）

[8] CLARKE P G. Developmental cell death：morphological diversity and multiple mechanisms [J]. Anat Embryol，1990，181 (3)：195-213.

[9] 韩冰，王君丽，李树钧. 亚砷酸对肺癌A549细胞凋亡及C-myc基因表达影响的研究 [J]. 哈尔滨医科大学学报，2017，51 (1)：25-27.

[10] KATAYAMA S，SHIMODA K，TAKENAGA Y. Loss of ADAR1 in human iPS cells promotes caspase3-mediated apoptotic cell death [J]. Genes Cells，2015，20 (8)：675-680.

[11] 徐辉. JNK/c-Jun信号通路在低浓度亚砷酸钠所致HELF细胞增殖异常和细胞周期紊乱中的作用 [D]. 南京：南京医科大学，2009.

[12] FREJO M T，DEL PINO J，LOBO M，et al. Liver and kidney damage induced by 4-aminopyridine in a repeated dose (28 days) oral toxicity study in rats：gene expression profile of hybrid cell death [J]. Toxicol Lett，2014，225 (2)：252-263.

[13] CHIU H W，LIN W，HO S Y，et al. Synergistic effects of arsenic trioxide and radiation in osteosarcoma cells through the induction of both autophagy and apoptosis [J]. Radiat Res，2011，175 (5)：547-560.

[14] MATTIOLO P，YUSTE V J，BOIX J，et al. Autophagy exacerbates caspase-dependent apoptotic cell death after short times of starvation [J]. Biochem Pharmacol，2015，98 (4)：573-586.

[15] YANG B，XUE Q，QI X，et al. Autophagy enhances the replication of Peste des petits ruminants virus and inhibits caspase-dependent apoptosis *in vitro* [J]. Virulence，2018，9 (1)：1176-1194.

[16] BONAKDARYAZDI B，KHODAGHOLI F，SHAERZADEH F，et al. The effect of arsenite on spatial learning：involvement of autophagy and apoptosis [J]. Eur J Pharmacol，2017，796：54-61.

（英文编辑：汪源；编辑：王晓宇；校对：韩凤婵）