

砷染毒对家兔皮肤雌激素受体 α 、 β 和PI3K mRNA表达的影响及性别差异

古丽达娜·塔布斯别克, 马瑶, 白雪, 涂开荣, 吴军

新疆医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学教研室, 新疆 乌鲁木齐 830011

摘要:

[背景] 砷作为一种环境内分泌干扰物, 能够发挥雌激素样效应, 其对皮肤雌激素效应靶基因的毒作用机制尚未完全阐明。

[目的] 观察砷暴露以及DNA甲基化抑制剂5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-dc)干预砷暴露对不同性别家兔皮肤组织中雌激素受体 α ($ER\alpha$)、雌激素受体 β ($ER\beta$)和磷脂酰肌醇-3激酶(PI3K) mRNA表达的影响, 并探讨其在砷的皮肤毒作用性别差异中的作用。

[方法] 将家兔分为: 空白对照组、低剂量砷组 ($0.075\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{周}^{-1}$)、中剂量砷组 ($0.15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{周}^{-1}$)、高剂量砷组 ($0.75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{周}^{-1}$)、5-Aza-dc干预低剂量砷组、5-Aza-dc干预中剂量砷组、5-Aza-dc干预高剂量砷组7组, 每组8只, 雌雄各半。家兔自由饮水, 持续染毒14周, 自第9周开始, 5-Aza-dc干预组家兔经耳缘静脉注射 $0.125\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 5-Aza-dc, 每周2次, 连续注射6周。第14周末对每组家兔背部同一部位采用皮肤活检术剖取全部皮肤。通过实时荧光定量PCR (RT-PCR) 法检测不同性别家兔皮肤组织中 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 和 PI3K mRNA 表达水平。

[结果] 家兔皮肤组织中, 雌性低、高剂量砷组 $ER\alpha$ mRNA (分别为 1.67 ± 0.10 和 2.95 ± 0.38) 较对照组表达升高 ($P<0.05$), 雄性高剂量砷组 $ER\alpha$ mRNA (2.88 ± 0.43) 较对照组表达升高 ($P<0.05$)。雌性低、高剂量砷组 $ER\beta$ mRNA (分别为 0.75 ± 0.02 和 0.59 ± 0.29) 较对照组降低 ($P<0.05$); 低、高剂量砷组 $ER\beta$ mRNA 表达量雄性低于雌性 (雌性分别为 0.90 ± 0.08 和 1.48 ± 0.58) ($P<0.05$)。雄性低剂量砷组 PI3K mRNA 表达量低于雌性 (分别为 0.70 ± 0.22 和 1.40 ± 0.10) ($P<0.05$); 雄性 5-Aza-dc 干预各剂量砷组 $ER\beta$ 和 PI3K mRNA 与对照组相比, 均明显降低 (均 $P<0.05$)。

[结论] 砷暴露可诱导雌雄家兔皮肤组织中 $ER\alpha$ mRNA 表达升高, 雄性家兔皮肤组织 $ER\beta$ mRNA 和 PI3K mRNA 表达降低, 且均为雌性高于雄性。砷诱导的 $ER\alpha$ 、 $ER\beta$ 和 PI3K mRNA 表达的性别差异可能在砷毒作用差异中发挥作用; 5-Aza-dc 可能会加剧雌雄间差异。

关键词: 砷; 5-氮杂-2'-脱氧胞苷; 雌激素受体; PI3K; 皮肤; 家兔

Effects of arsenic exposure on expressions of $ER\alpha$, $ER\beta$, and PI3K mRNA in rabbit skin and sex difference Gulidana TABUSIBIEKE, MA Yao, BAI Xue, TU Kai-rong, WU Jun (Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830011, China)

Abstract:

[Background] Arsenic (As) acts as an environmental endocrine disruptor to exert estrogen-like effects, and its toxic mechanism on target genes of estrogen effect in skin has not been fully elucidated.

[Objective] This experiment is designed to observe the effects of arsenic exposure and the intervention of 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-dc, an DNA methylation inhibitor) on the expressions of estrogen receptor α ($ER\alpha$), estrogen receptor β ($ER\beta$) and phosphoinositide 3-kinase (PI3K) mRNA in the skin tissues of rabbits of different sexes, and to explore the roles of estrogen effect target gene mRNA expressions in the sex difference of arsenic skin toxicity.

[Methods] Rabbits were randomly divided into seven groups: blank control group, low-dose arsenic group ($0.075\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{week}^{-1}$), medium-dose arsenic group ($0.15\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{week}^{-1}$), high-dose arsenic group ($0.75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{week}^{-1}$), 5-Aza-dc intervention against low-dose arsenic group, 5-Aza-dc intervention against medium-dose arsenic group, and 5-Aza-dc intervention against high-dose

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19608

基金项目

新疆维吾尔自治区自然科学基金项目 (2018D01C147)

作者简介

古丽达娜·塔布斯别克 (1994—), 女, 硕士生; E-mail: 254019132@qq.com

通信作者

吴军, Email: wuj1997@sohu.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-09-04

录用日期 2019-11-27

文章编号 2095-9982(2020)03-0254-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

古丽达娜·塔布斯别克, 马瑶, 白雪, 等. 砷染毒对家兔皮肤雌激素受体 α 、 β 和PI3K mRNA表达的影响及性别差异[J]. 环境与职业医学, 2020, 37(3): 254-259.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19608

Funding

This study was funded.

Correspondence to

WU Jun, E-mail: wuj1997@sohu.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2019-09-04

Accepted 2019-11-27

►To cite

Gulidana TABUSIBIEKE, MA Yao, BAI Xue, et al. Effects of arsenic exposure on expressions of $ER\alpha$, $ER\beta$, and PI3K mRNA in rabbit skin and sex difference[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(3): 254-259.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19608

arsenic group, with eight animals in each group, half male and half female. The rabbits were given free drinking water and continuously administered the corresponding arsenic dosages for 14 weeks. From the 9th week, the 5-Aza-dc intervention groups received intravenous injection of $0.125 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 5-Aza-dc through ear vein twice a week for six weeks. At the end of the 14th week, biopsy of full-thickness skin was performed on the same region on the back of each rabbit. The expression levels of *ER α* , *ER β* and *PI3K* mRNA in skin tissues of rabbits of different sexes were detected by real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR).

[Results] In the rabbit skin tissues, the expression levels of *ER α* mRNA in the female low- and high-dose arsenic groups (1.67 ± 0.10 and 2.95 ± 0.38 , respectively) and in the male high-dose arsenic group (2.88 ± 0.43) were higher than that in the control group ($P < 0.05$). The expression levels of *ER β* mRNA in the male low- and high-dose arsenic groups (0.75 ± 0.02 and 0.59 ± 0.29 , respectively) were lower than those in the control group and in the females with corresponding treatments (0.90 ± 0.08 and 1.48 ± 0.58 , respectively) ($P < 0.05$). The expression level of *PI3K* mRNA in the male low-dose arsenic group (0.70 ± 0.22) was lower than that in the corresponding female group (1.40 ± 0.10) ($P < 0.05$). The expression levels of *ER β* and *PI3K* mRNA in the male 5-Aza-dc intervention groups were lower than that in the control group ($P < 0.05$).

[Conclusion] Arsenic exposure can induce increased expression of *ER α* mRNA in the skin tissues of male and female rabbits, and decreased expressions of *ER β* and *PI3K* mRNA in the skin tissues of male rabbits, and both were higher in females than in males. The sex difference of arsenic-induced *ER α* , *ER β* , and *PI3K* mRNA expressions may play a role in the sex difference of arsenism. Moreover, 5-Aza-dc can further increase the differences between males and females.

Keywords: arsenic; 5-Aza-2'-deoxycytidine; estrogen receptor; *PI3K*; skin; rabbit

砷(As)暴露是一个全球性的健康问题,多年来人们对砷的致病机制做了广泛研究,细胞实验和动物实验初步证实砷作为一种环境内分泌干扰物(environmental endocrine disrupting chemicals, EDCs)发挥雌激素样效应^[1-2]。皮肤是砷中毒的靶器官之一,也是雌激素在非生殖器官中最大的靶器官^[3]。正常状态下,雌激素能够改善皮肤胶原含量和质量,增加皮肤厚度,促进血管形成,在皮肤的屏障功能及伤口愈合等功能中发挥重要作用^[4]。而砷的雌激素样效应能够影响雌激素及其受体表达,干扰正常激素依赖型细胞信号转导途径,导致多种疾病以及癌症^[5-6]。目前,砷对皮肤的雌激素效应靶基因的毒作用机制尚未完全阐明。流行病学研究显示,砷所致皮肤癌的发病率有明显性别差异,男性患病率高于女性^[7-8],从内分泌角度来看,有研究认为雌激素受体 α (estrogen receptor α , *ER α*)表达与砷致肺癌的性别差异有一定关联^[9],雌激素受体与砷皮肤毒作用性别差异的联系值得探究。

磷脂酰肌醇-3激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, *PI3K*)通路是机体重要的抗氧化信号通路,对细胞的生长、增殖、存活发挥重要作用^[10],砷能够通过发挥类雌激素作用诱导活性氧的产生^[11-12],引起氧化应激,因此 $PI3K$ 通路与砷的雌激素效应具有密切联系。此外,一些研究发现砷暴露可能会影响DNA甲基化模式从而影响基因表达^[13],DNA甲基化对砷的雌激素效应靶基因与皮肤毒作用之间关系的影响也值得探究。生活中大部分砷暴露主要通过饮水途径接触,通常饮用水中砷的主要是三价砷(As^{3+})和五价砷(As^{5+})

这两种无机形式^[14-15]混合存在,且 As^{3+} 的毒性远大于 As^{5+} 。在中国饮水型砷中毒主要分布在台湾、新疆、内蒙古、山西和吉林等地,其中台湾、山西和内蒙古病区高砷水区多为还原环境,地下水中 As^{3+} 含量往往高于 As^{5+} ,相对而言,吉林和新疆高砷水区为氧化环境, As^{5+} 含量高于 As^{3+} ^[16],砷中毒患者病情明显轻于台湾、山西和内蒙古病区,因此 As^{5+} 含量与 As^{3+} 含量比值很可能与病区患者病情程度有关。本研究初步模拟人群自然状态下砷暴露形式,将饮水中 As^{5+} 含量与 As^{3+} 含量以1:1混合,对家兔进行砷染毒,研究不同浓度混合砷暴露下以及DNA甲基化抑制剂5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-2'-deoxycytidine, 5-Aza-dc)干预后雌雄个体皮肤中*ER α* 、雌激素受体 β (estrogen receptor β , *ER β*)和*PI3K*基因mRNA的表达差异,探讨它们在砷的皮肤毒作用与性别差异中的作用及可能机制,为今后阐明砷对皮肤毒作用机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-Aza-dc, 北京华迈科), Trizol总RNA提取试剂(美国Invitrogen), PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser逆转录试剂盒(日本TaKaRa, 货号RR047A), TB Green™ Premix Ex Taq II 荧光定量试剂盒(日本TaKaRa, 货号RR820A), 荧光定量PCR仪(美国Applied Biosystems, 型号ABI7500)。

1.2 实验动物的分组与染毒

本实验采用由新疆医科大学实验动物中心提供的成年健康普通级新西兰大耳兔(本文中统称家兔)

56只,雌雄各半,体重在1800~2200g之间,自由饮用由亚砷酸钠(NaAsO_2)和砷酸钠(Na_2HAsO_4)配制的混合水溶液进行染毒14周。以 NaAsO_2 的半数致死量(median lethal dose, LD_{50})为参考,计算饮水中砷含量。根据相关文献^[17]确定 NaAsO_2 的经口染毒 LD_{50} 为 $13.0\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{周}^{-1}$,即对应 As^{3+} 含量为 $7.5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{周}^{-1}$, Na_2HAsO_4 按照 NaAsO_2 中砷元素含量进行1:1匹配,保证饮水中 As^{3+} 和 As^{5+} 含量比例为1:1。空白对照组给予去离子水,实验组混合砷溶液共低、中、高三个浓度梯度,分别为 0.075 、 0.15 、 $0.75\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{周}^{-1}$ 。第9周起,对5-Aza-dc干预组家兔按照预实验确定的有效剂量静脉注射 $0.125\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的5-Aza-dc(溶解于 $100\mu\text{L}$ PBS),每周2次,连续注射6周。具体染毒分组名称如下:①空白对照组;②低剂量砷组;③中剂量砷组;④高剂量砷组;⑤5-Aza-dc干预低剂量砷组;⑥5-Aza-dc干预中剂量砷组;⑦5-Aza-dc干预高剂量砷组。

正式实验期间,对家兔进行编号后按照随机数字表法随机分为7组,每组8只,每组雌雄各半。保持室温 $18\sim 22^\circ\text{C}$,湿度 $40\%\sim 60\%$,昼夜交替12/12h,每12h通风一次。家兔初始平均体重 2.02 kg ,每日平均饮水量 200 mL ,用去离子水按 As^{3+} 和 As^{5+} 含量比例为1:1设计原则准确配制适量浓度为 $0.328\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 NaAsO_2 和 $1.018\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 Na_2HAsO_4 混合砷储备液,分装成小份,于 -20°C 保存;使用时,低、中、高剂量组分别将储备液稀释500、250、50倍。为保证家兔染毒剂量的准确性,每日在动物饮水中添加配制好的溶液,采用饮水量差值测定法获得每只家兔每日饮水量。后续每周给动物称量一次体重,染毒组按每组动物平均体重和每日平均饮水量调整混合砷水溶液浓度,以此保证砷染毒剂量的一致性。

第14周末对每组家兔麻醉后在背部同一部位脱毛,采用皮肤活检术立即剖取全部皮肤,尽量去除皮下组织,于 -80°C 冻存备用。本研究经新疆医科大学第一附属医院伦理委员会批准(编号:20170221-01),符合动物伦理学要求。

1.3 实时荧光定量PCR(RT-PCR)检测

取 -80°C 保存的家兔背部皮肤组织,质量约 50 mg ,液氮处理后研磨成粉末,加入 1 mL 的Trizol试剂,按照说明书提取皮肤组织中总RNA,采用Nano Drop 2000分光光度计(V1.0)检测总RNA浓度和纯度。按照说明使用反转录试剂盒将总RNA通过去除基因组DNA和反转录反应合成cDNA,于 -20°C 保存。配制的

cDNA样品按照荧光定量试剂盒说明书再配制成 $20\mu\text{L}$ 反应体系进行下一步PCR反应,反应条件为: 95°C 预变性 30 s , 95°C 变性 5 s , 60°C 退火延伸 34 s ,40个循环。引物由西安奥科鼎盛生物公司设计并合成,各引物序列见表1。运用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析各基因的mRNA相对表达量,其中 $\Delta\Delta\text{Ct}=(\text{Ct}_{\text{暴露组目的基因}}-\text{Ct}_{\text{暴露组内参基因}})-(\text{Ct}_{\text{对照组目的基因}}-\text{Ct}_{\text{对照组内参基因}})$ 。

表1 实时荧光定量PCR中各引物序列

基因	引物序列	片段长度/bp
β -actin	上游: 5'-GTGCGGGACATCAAGGAGA-3'	176
	下游: 5'-AGGAAGGAGGGCTGGAAGAG-3'	
$\text{ER}\alpha$	上游: 5'-GTTGCTGGCTACATCGTCTCG-3'	191
	下游: 5'-CCATCAGGTGGATCAAGGTGTC-3'	
$\text{ER}\beta$	上游: 5'-CAGACCTCGTCTGGACAGG-3'	154
	下游: 5'-CTGGAGTTGAGCAGGACCATGG-3'	
PI3K	上游: 5'-GCAGCAGCCTTCAACAAAGA-3'	110
	下游: 5'-CAGTAGCCAGCACAGGACAG-3'	

1.4 统计学分析

利用SPSS 21.0软件进行整理。数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间均值比较采用两独立样本 t 检验,多组间均数比较采用正态性检验、方差齐性检验和单因素方差分析(one way ANOVA)。进一步进行组间两两比较时,若方差齐时,采用LSD- t 检验;若方差不齐时,采用Games-Howell检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 一般情况

家兔的一般情况总体良好,各组饮水量、食量均正常;个别中、高剂量砷组家兔有面部、胸前脱毛现象,毛色暗淡无光泽。染毒后期中、高剂量砷组家兔频发易怒、同笼打架现象。如表2所示,家兔初始总体平均体重为 2.02 kg ,14周后家兔总体平均体重为 2.92 kg ,平均增重 0.90 kg 。14周后各处理组家兔体重均值与对照组相比差异均无统计学意义($P>0.05$)。

2.2 $\text{ER}\alpha$ mRNA相对表达水平

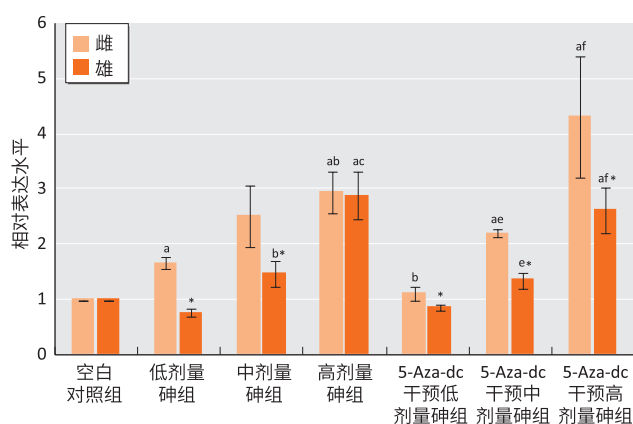
对照组不同性别家兔皮肤 $\text{ER}\alpha$ mRNA的Ct值与各自对照组平均值计算所得相对表达量无明显差异($P>0.05$)。各组家兔皮肤组织中 $\text{ER}\alpha$ mRNA相对表达水平如图1所示。雌性家兔低、高剂量砷组 $\text{ER}\alpha$ mRNA表达(分别为 1.67 ± 0.10 和 2.95 ± 0.38)较对照组升高($P<0.05$),雌性高剂量砷组较低剂量砷组升高($P<0.05$)。雄性中剂量砷组(1.46 ± 0.24)较低剂量砷组(0.76 ± 0.07)表达升高($P<0.05$),高剂量砷组

(2.88 ± 0.43) 较中剂量砷组表达升高 ($P < 0.05$)，即低、中、高剂量砷组表达量随暴露剂量增加逐渐上升，雄性高剂量组较对照组表达升高 ($P < 0.05$)。低、中剂量组雌性与雄性表达水平有显著差异，雌性均高于雄性 ($P < 0.05$)。

5-Aza-dc 干预中剂量砷组雌性 *ERα* mRNA 表达量 (2.20 ± 0.07) 较 5-Aza-dc 干预低剂量砷组 (1.12 ± 0.12) 表达升高 ($P < 0.05$)，5-Aza-dc 干预高剂量砷组 (4.31 ± 1.09) 较 5-Aza-dc 干预中剂量砷组表达升高 ($P < 0.05$)，即随混合砷暴露剂量增加逐渐上升；雄性 5-Aza-dc 干预低、中、高剂量砷组 (分别为 0.86 ± 0.04 、 1.35 ± 0.15 和 2.63 ± 0.42) 表达量也随混合砷暴露剂量增加逐渐上升 ($P < 0.05$)；5-Aza-dc 干预低、中、高剂量砷组雌性表达量均高于雄性 ($P < 0.05$)。

表2 各组家兔体重变化情况 ($n=8$, $\bar{x} \pm s$)

组别	染毒前体重/kg	第14周体重/kg	染毒前后差值/kg
空白对照组	2.02 ± 0.09	3.30 ± 0.28	1.28 ± 0.36
低剂量砷组	1.98 ± 0.13	2.72 ± 0.86	0.75 ± 0.74
中剂量砷组	2.06 ± 0.06	2.84 ± 0.29	0.78 ± 0.28
高剂量砷组	2.01 ± 0.08	2.92 ± 0.37	0.92 ± 0.37
5-Aza-dc 干预低剂量砷组	2.01 ± 0.10	3.02 ± 0.40	1.01 ± 0.46
5-Aza-dc 干预中剂量砷组	2.08 ± 0.07	2.94 ± 0.34	0.87 ± 0.37
5-Aza-dc 干预高剂量砷组	1.97 ± 0.12	2.73 ± 0.33	0.76 ± 0.37
<i>F</i>	1.420	1.659	1.496
<i>P</i>	0.227	0.152	0.200



[注] *：与同组雌性比较， $P < 0.05$ ；a：与对照组比较， $P < 0.05$ ；b、c 分别表示与低、中剂量砷组比较， $P < 0.05$ ；e、f 分别表示与 5-Aza-dc 干预低、中剂量砷组比较， $P < 0.05$ 。

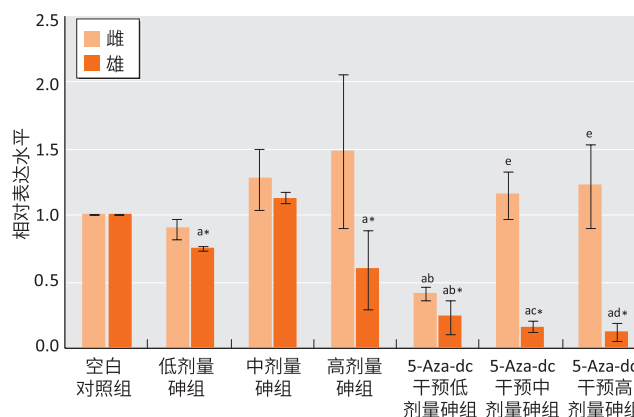
图1 各组家兔皮肤中 *ERα* mRNA 表达情况 ($n=4$, $\bar{x} \pm s$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$)

2.3 *ERβ* mRNA 相对表达水平

对照组不同性别家兔皮肤 *ERβ* mRNA 的 *Ct* 值与各自对照组平均值计算所得相对表达量无差异 ($P > 0.05$)。各组家兔皮肤组织中 *ERβ* mRNA 相对表达水平如图2所示。雄性低、高剂量砷组 (分别为 0.75 ± 0.02

和 0.59 ± 0.29) 较对照组表达降低 ($P < 0.05$)；雌性低、高剂量砷组相对表达量分别为 0.90 ± 0.08 和 1.48 ± 0.58 ，高于雄性 ($P < 0.05$)。

雄性 5-Aza-dc 干预低、中、高剂量砷组 *ERβ* mRNA 表达量 (分别为 0.23 ± 0.13 、 0.16 ± 0.04 和 0.12 ± 0.07) 均较对照组降低 ($P < 0.05$)，与同剂量砷组相比也降低 ($P < 0.05$)。

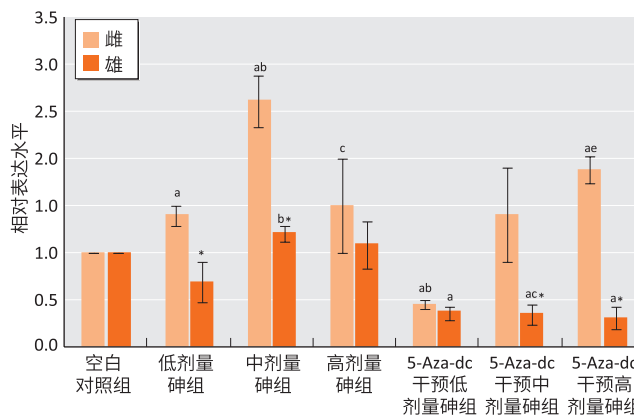


[注] *：与同组雌性比较， $P < 0.05$ ；a：与对照组比较， $P < 0.05$ ；b、c、d 分别表示与低、中、高剂量砷组比较， $P < 0.05$ ；e 表示与 5-Aza-dc 干预低剂量砷组比较， $P < 0.05$ 。

图2 各组家兔皮肤中 *ERβ* mRNA 表达情况 ($n=4$, $\bar{x} \pm s$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$)

2.4 *PI3K* mRNA 相对表达水平

对照组不同性别家兔皮肤 *PI3K* mRNA 的 *Ct* 值与各自对照组平均值计算所得相对表达量无差异 ($P > 0.05$)。各组家兔皮肤组织中 *PI3K* mRNA 相对表达水平如图3所示。雌性低、中剂量砷组 (分别为 1.40 ± 0.10 和 2.61 ± 0.27) 较对照组及雄性同剂量砷组 (分别为 0.70 ± 0.22 和 1.21 ± 0.08) 表达升高 ($P < 0.05$)。



[注] *：与同组雌性比较， $P < 0.05$ ；a：与对照组比较， $P < 0.05$ ；b、c 分别表示与低、中剂量砷组比较， $P < 0.05$ ；e 表示与 5-Aza-dc 干预低剂量砷组比较， $P < 0.05$ 。

图3 各组家兔皮肤中 *PI3K* mRNA 表达情况 ($n=4$, $\bar{x} \pm s$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$)

雌性 5-Aza-dc 干预低剂量砷组较对照组表达降低 ($P < 0.05$)，5-Aza-dc 干预高剂量砷组较对照组表达升

高 ($P < 0.05$)。雄性 5-Aza-dc 干预低、中、高剂量砷组 (分别为 0.37 ± 0.22 、 0.35 ± 0.10 和 0.32 ± 0.12) 与对照组相比, 表达均下降 ($P < 0.05$)。

3 讨论

一些研究表明, *ERα* 和 *ERβ* 在肿瘤的发生进展中分别扮演着肿瘤启动因子和肿瘤抑制因子的角色^[18]。Chen 等^[19] 提出的 *ERα* 会促进雌激素依赖细胞增殖和生长, 而 *ERβ* 促进细胞凋亡及其他抑制功能。对甲状腺癌的研究发现 *ERα* 表达增高能够促进肿瘤细胞的增生^[20], 在对乳腺癌的研究中发现敲除 *ERβ* 基因能够导致癌细胞增殖能力增强, 对砷皮肤毒性的研究发现雌激素诱导的 *ERα* 表达升高能够促进角质形成细胞的增殖^[4]。此外, *ERβ* 还能通过与表皮生长因子受体上的雌激素反应元件结合, 抑制恶性肿瘤相关基因 (*IMP3*) 的表达, 从而发挥抑制转移的作用^[21]。Mancuso 等^[22] 也提出不平衡的 *ERα/ERβ* 表达比例即 *ERα* 过表达和 *ERβ* 表达下调可能与雌激素介导的非黑色素瘤皮肤癌变调控有关。砷对皮肤的慢性毒性最初表现为非恶性角化过度, 随后发展为恶性病变^[23], 本次研究发现, 通过饮水砷染毒, 雌雄家兔皮肤组织中 *ERα* mRNA 表达量一定程度上升, 雄性 *ERβ* mRNA 在低剂量和高剂量砷组中表达量降低, 表明砷对皮肤组织的损伤可能与 *ERα* mRNA 表达升高和 *ERβ* mRNA 表达降低存在一定联系。

研究表明砷暴露人群中男性皮肤癌发病率高于女性^[7-8], 具体机制不清。课题组前期对家兔的皮肤进行电镜检测, 发现砷可促进角化基因表达 (*K1*、*K10*、*INV*、*Lor*), 在皮肤角化紊乱中发挥作用^[24]。本次家兔皮肤实验观察到雌性 *ERα* mRNA 表达量高于雄性, 雄性 *ERβ* mRNA 表达下降, 而雌性 *ERβ* mRNA 没有变化; 在低剂量砷暴露时, 雄性 *ERα* mRNA 不变, *ERβ* mRNA 降低更为明显, 表明雄性对砷毒作用的敏感可能是通过影响 *ERβ* 途径发挥作用。已有研究报道人群慢性低剂量砷暴露与皮肤癌密切相关^[25]。砷对皮肤 *ERα* mRNA 和 *ERβ* mRNA 的双向作用可能与皮肤损伤的性别差异有关。*ERα* 和 *ERβ* mRNA 表达紊乱和比例失调可以部分解释人群流行病学研究中砷导致的男性皮肤癌患病率高于女性的现象, 但还有其他致病危险因素需要今后深入探究。

有研究认为砷和 5-Aza-dc 可用于治疗白血病^[26], 砷和 5-Aza-dc 可能存在联合作用。研究认为长期砷暴露可以引起 *ERα* 基因 CpG 岛甲基化水平降低, 从而使

其表达增强^[27], 砷也可能通过发挥雌激素效应竞争性结合 *ERα*, 从而刺激 *ERα* mRNA 表达增强。目前砷使 *ERβ* mRNA 表达降低的确切机制仍不清楚, 可能与砷导致的代谢缺陷^[6] 或砷的去甲基化作用^[25] 有关。使用 5-Aza-dc 干预砷暴露的目的主要是为了观察两者间有无联合作用, 并确认砷对皮肤的毒作用途径。在本研究中, 未明显观察到 5-Aza-dc 诱导的 DNA 低甲基化对家兔皮肤组织中 *ERα* mRNA 表达的影响, 雄性 5-Aza-dc 干预各剂量砷组与对照组和同剂量砷暴露组比较表达均明显降低, 性别差异更加明显, 表明砷与 5-Aza-dc 发挥协同作用导致的雄性皮肤组织中 *ERβ* mRNA 表达减少, 进一步证明砷对 *ERβ* mRNA 的影响可能与 DNA 甲基化能力降低有关。

砷暴露的家兔皮肤组织 *PI3K* mRNA 表达中, 低、中剂量砷导致雌性 *PI3K* mRNA 表达升高, 提高了皮肤组织抗氧化作用, 而雄性与对照组之间无明显变化。5-Aza-dc 干预后, 雄性各剂量砷组 *PI3K* mRNA 表达与对照组相比均降低; 5-Aza-dc 干预导致的低甲基化可能通过多种方式影响雄性 *PI3K* mRNA 的表达。由于雌雄个体 *PI3K* mRNA 表达变化与各自的 *ERβ* mRNA 表达变化基本相似, 低剂量砷发挥作用可能是通过非基因组途径影响 *ERβ/PI3K*/蛋白激酶 B 通路^[28], 从而导致 *PI3K* 表达减少, 也可能与第 10 号染色体缺失的碱性磷酸和张力蛋白同源物 (phosphatase and tensin homolog deleted in chromosome 10, PTEN) 有关, 因为低甲基化水平能使 PTEN 重新活化, 从而负调控下游 *PI3K* 通路^[29]。

综上, 砷暴露能够使雌雄家兔皮肤组织中 *ERα* mRNA 表达升高, 雄性家兔皮肤组织 *ERβ* mRNA 表达降低; 低剂量砷暴露后导致的 *ERα* 与 *ERβ* 比例失衡, 以及雄性 *PI3K* mRNA 表达降低可能会使砷的毒作用表现出性别差异, 使雄性皮肤损伤风险增强; 同时, 5-Aza-dc 可能会加剧 *ERα* 与 *ERβ* 及 *PI3K* mRNA 表达的雌雄间差异。本研究初步探讨了砷对雌激素效应靶基因 mRNA 的影响, 5-Aza-dc 干预组未考虑静脉注射对皮肤的影响, 实验设计还存在不足。今后还需完善研究设计并观察雌激素受体和雌激素水平, 深入研究砷的雌激素效应及其毒作用和性别差异。

参考文献

- [1] 夏雅娟, 孟萌, 张峰, 等. 砷雌激素样效应及对 HeLa 细胞生长的影响 [J]. 中国地方病学杂志, 2009, 28 (1): 24-27.

- [2] 郭志伟, 杨卫红, 韩晓红, 等. 慢性砷暴露对雌性大鼠心肌雌激素受体结合位点相关抗原9和雌激素反应蛋白mRNA表达的影响[J]. 中国地方病学杂志, 2013, 32 (1): 24-26.
- [3] 孟飞, 郝林鹤, 张洁, 等. 雌激素对皮肤老化的影响及其机制的研究进展[J]. 组织工程与重建外科杂志, 2015, 11 (6): 404-408.
- [4] VERDIER-SEVRAIN S, YAAR M, CANTATORE J, et al. Estradiol induces proliferation of keratinocytes via a receptor mediated mechanism [J]. FASEB J, 2004, 18 (11): 1252-1254.
- [5] 韩晓红, 夏雅娟. 砷的内分泌干扰效应的研究进展[J]. 中国地方病学杂志, 2013, 32 (1): 115-118.
- [6] JOCSAK G, KISS DS, TOTH I, et al. Comparison of individual and combined effects of four endocrine disruptors on estrogen receptor beta transcription in cerebellar cell culture: the modulatory role of estradiol and Triiodo-Thyronine [J]. Int J Environ Res Public Health, 2016, 13 (6): 619.
- [7] VAHTER M, ÅKESSON A, LIDÉN C, et al. Gender differences in the disposition and toxicity of metals [J]. Environ Res, 2007, 104 (1): 85-95.
- [8] RAHMAN M, VAHTER M, SOHEL N, et al. Arsenic exposure and age-and sex-specific risk for skin lesions: a population-based case-referent study in Bangladesh [J]. Environ Health Perspect, 2006, 114 (12): 1847-1852.
- [9] 石萌萌, 陈国建, 张洋, 等. 砷暴露对子代小鼠肺组织ER α 表达性别差异的初步研究[J]. 四川大学学报(医学版), 2015, 46 (2): 197-200.
- [10] CANTLEY L C. The phosphoinositide 3-kinase pathway [J]. Science, 2002, 296 (5573): 1655-1657.
- [11] HUANG M C, DOUILLET C, SU M, et al. Metabolomic profiles of arsenic (+3 oxidation state) methyltransferase knockout mice: effect of sex and arsenic exposure [J]. Arch Toxicol, 2017, 91 (1): 189-202.
- [12] 李远, 刘起展. 砷化物所致细胞恶性转化的信号通路研究进展[J]. 中华预防医学杂志, 2011, 45 (7): 657-660.
- [13] 张正, 王学梅, 郭秀琴, 等. 砷暴露所致DNA甲基化改变的研究进展[J]. 实用预防医学, 2015, 22 (12): 1531-1535.
- [14] 罗婷, 景传勇. 地下水砷污染形成机制研究进展[J]. 环境化学, 2011, 30 (1): 77-83.
- [15] 曹文庚, 陈南祥, 张翼龙, 等. 杭锦后旗浅层地下水砷赋存形态研究[J]. 南水北调与水利科技, 2010, 8 (6): 98-101.
- [16] 汤洁, 卞建民, 李昭阳, 等. 中国饮水型砷中毒区的水化环境与砷中毒关系[J]. 生态毒理学报, 2013, 8 (2): 222-229.
- [17] 刘媛, 吴军, 葛龙, 等. 染砷家兔皮肤抗氧化水平与砷代谢关联研究[J]. 新疆医科大学学报, 2015, 38 (2): 170-173.
- [18] 赵谊宁, 陶陶, 张力杰, 等. 雌激素受体ER α 及ER β 与肿瘤关系的研究进展[J]. 东南大学学报(医学版), 2016, 35 (3): 418-422.
- [19] CHEN G G, VLANTIS A C, ZENG Q, et al. Regulation of cell growth by estrogen signaling and potential targets in thyroid cancer [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2008, 8 (5): 367-377.
- [20] ZENG Q, CHEN G G, VLANTIS A C, et al. Oestrogen mediates the growth of human thyroid carcinoma cells via an oestrogen receptor-ERK pathway [J]. Cell Prolif, 2007, 40 (6): 921-935.
- [21] SAMANTA S, SHARMA V M, KHAN A, et al. Regulation of IMP3 by EGFR signaling and repression by ER β : implications for triple-negative breast cancer [J]. Oncogene, 2012, 31 (44): 4689-4697.
- [22] MANCUSO M, GALLO D, LEONARDI S, et al. Modulation of basal and squamous cell carcinoma by endogenous estrogen in mouse models of skin cancer [J]. Carcinogenesis, 2009, 30 (2): 340-347.
- [23] AI-ERYANI L, JENKINS S F, STATES V A, et al. miRNA expression profiles of premalignant and malignant arsenic-induced skin lesions [J]. PLoS One, 2018, 13 (8): e0202579.
- [24] 马瑶. Nrf2通路在砷致家兔皮肤角质化异常中的作用[D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2018.
- [25] GANAPATHY S, LI P, FAGMAN J, et al. Low doses of arsenic, via perturbing p53, promotes tumorigenesis [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2016, 306: 98-104.
- [26] 张小坤, 罗建民, 孙杰. 三氧化二砷联合5-杂氮-2'-脱氧胞苷对U937细胞SHP-1、JAK3、TYK2基因表达的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2014, 41 (7): 728-733.
- [27] 李艳红. 砷中毒对ER α 基因表达的影响及其致癌机制研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2006.
- [28] 陈凤飞, 高颖生, 孙立, 等. 雌激素受体 β 在乳腺癌生长中的作用研究进展[J]. 药理学进展, 2017, 41 (1): 65-70.
- [29] 罗一. PTEN甲基化在骨肉瘤发生中的作用及5-Aza-CdR去甲基化对其MG-63细胞生物学行为的影响[D]. 长沙: 中南大学, 2013.

(英文编辑: 汪源; 编辑: 王晓宇; 校对: 陈姣)