

氯乙酸致人支气管上皮细胞16HBE的凋亡机制研究

孟涛¹, 苗盼盼¹, 杨墨^{1,2}, 贾强³, 戴宇飞¹

摘要: [目的] 探讨氯乙酸对人支气管上皮细胞16HBE氧化应激以及线粒体凋亡通路的影响。[方法] 以16HBE细胞为研究对象, 将实验分为对照组和0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L的氯乙酸染毒组, 染毒24 h后检测细胞存活率、凋亡率及超氧化物歧化酶(SOD)活力; 染毒0.25、0.5、1、8、24 h后检测细胞内活性氧(ROS)水平; 染毒8、24 h后检测线粒体膜电位以及*Bcl-2*和*Bax* mRNA表达水平。用1.5、2.5 mmol/L氯乙酸染毒24 h后, 检测*Bcl-2*、*Bax*、细胞色素C、Caspase-9、Caspase-3、PARP-1凋亡相关蛋白的表达水平。[结果] 随氯乙酸染毒浓度升高, 染毒24 h后细胞存活率、SOD活力和线粒体膜电位呈剂量依赖性下降($r=-0.902$ 、 -0.732 和 -0.863 , $P<0.05$), 而细胞凋亡率呈剂量依赖性上升($r=0.914$, $P<0.05$)。与对照组相比, 1.5、2.0、2.5 mmol/L剂量组细胞存活率分别降低了12%、20%和30%, SOD活力分别降低了9%、21%和30%, 线粒体膜电位分别降低了11%、18%和24%, 而细胞凋亡率分别是对照组的3、4和7倍。各剂量组细胞内ROS水平呈先升高后降低的趋势, 在染毒0.5 h达到峰值, 与对照组相比分别增加了15%、35%、48%和55% ($P<0.05$), 染毒1 h后反而降低。染毒各时间点染毒浓度与ROS水平均存在剂量-效应关系($r=0.756$ 、 0.893 、 0.735 、 0.667 和 0.653 , 均 $P<0.05$); 相关性分析表明染毒24 h后ROS水平与细胞凋亡率呈明显正相关($r=0.826$, $P<0.05$)。染毒8、24 h两个时间点, 染毒浓度与*Bcl-2*、*Bax* mRNA表达量存在剂量效应关系(8 h: $r=-0.634$ 和 0.754 , 24 h: $r=-0.773$ 和 0.823 , $P<0.05$); 与对照组相比, 染毒24 h后染毒浓度 ≥ 1.5 mmol/L时*Bcl-2* mRNA和蛋白表达明显下调, 而*Bax* mRNA和蛋白表达明显上调($P<0.05$); 相关性分析表明*Bax* mRNA表达与ROS水平具有正相关($r=0.886$ 和 0.824 , $P<0.05$), 而*Bcl-2* mRNA表达与ROS水平具有负相关($r=-0.862$ 和 -0.815 , $P<0.05$)。与对照组相比, 染毒24 h后染毒浓度2.5 mmol/L时细胞色素C、活化的Caspase-3和Caspase-9蛋白表达量显著增加, 而PARP-1蛋白表达量明显下降($P<0.05$)。[结论] 氯乙酸可致16HBE细胞发生氧化应激, 在其通过氧化应激诱导细胞凋亡过程中可上调促凋亡蛋白*Bax*而下调抗凋亡蛋白*Bcl-2*表达, 进一步激活线粒体依赖的凋亡通路, 最终诱导细胞凋亡的发生。

关键词: 氯乙酸; 氧化应激; 活性氧; 凋亡; 线粒体通路

Apoptosis Mechanism of Human Bronchial Epithelial 16HBE Cells Induced by Chloroacetic Acid
MENG Tao¹, MIAO Pan-pan¹, YANG Mo^{1,2}, JIA Qiang³, DAI Yu-fei¹ (1.Key Laboratory of Chemical Safety and Health/National Institute of Occupational Health and Poison Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China; 2.School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China; 3.Shandong Academy of Occupational Health and Occupational Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan, Shandong 250062, China). Address correspondence to DAI Yu-fei, E-mail: yf_dai@sina.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To examine the chloroacetic acid induced oxidative stress and the related effect on mitochondrial pathway related apoptosis in human normal bronchial epithelial 16HBE cells. [Methods] Cell viability, apoptosis, and superoxide dismutase (SOD) activity were determined in 16HBE cells exposed to 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, and 2.5 mmol/L chloroacetic acid for 24 h *in vitro*. Reactive oxygen species (ROS) were assayed after 16HBE cells were treated with the above-mentioned concentrations for 0.25, 0.5, 1, 8, 24 h, respectively. Mitochondrial membrane potential and expression levels of *Bcl-2* and *Bax* mRNA were measured after 8 and 24 h of treatment. Expression levels of apoptosis-related proteins including *Bcl-2*, *Bax*, cytochrome C, Caspase-9, Caspase-3, and PARP-1 were measured after 16HBE cells treated with 1.5 and 2.5 mmol/L chloroacetic acid for 24 h. [Results] The cell viability rate, SOD activity, and mitochondrial membrane potential decreased in a dose-dependent manner

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2016.16346

[基金项目] 公益性行业科研专项(编号: 201402021); 十二五国家科技支撑计划资助项目(编号: 2014BAI12B02)

[作者简介] 孟涛(1983—), 女, 博士生, 助理研究员; 研究方向: 化学物致病生物标志物及其机制研究; E-mail: taotao198307@163.com

[通信作者] 戴宇飞, E-mail: yf_dai@sina.com

[作者单位] 1. 中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 化学污染与健康安全重点实验室, 北京 100050; 2. 山西医科大学公共卫生学院, 山西 太原 030001; 3. 山东省医学科学院, 山东省职业卫生与职业病防治研究院, 山东 济南 250062

with increasing concentrations of chloroacetic acid ($r=-0.902$, -0.732 , and -0.863 , respectively, $P<0.05$); but the cell apoptosis rate increased in a dose-dependent manner ($r=0.914$, $P<0.05$). In comparison with the control group, remarkable reductions of 12%, 20%, and 30% for cell viability, 9%, 21%, and 30% for SOD activity, and 11%, 18%, and 24% for mitochondrial membrane potential were found in the 1.5, 2.0, and 2.5 mmol/L chloroacetic acid treated groups ($P<0.05$) respectively; moreover, the cell apoptosis rates were 3, 4, and 7 times of the control group respectively. The intracellular ROS levels increased first and then decreased; peak values shown after 0.5 h of exposure in the 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mmol/L treatment groups, and significantly increased by 15%, 35%, 48%, and 55% respectively in comparison with the controls ($P<0.05$); the ROS levels in various concentration groups gradually dropped after 1 h. There were significant dose-response relationships between ROS levels and concentrations of chloroacetic acid at each designed time point of exposure ($r=0.756$, 0.893 , 0.735 , 0.667 , and 0.653 , $P<0.05$). There was a distinct positive correlation between cell apoptosis rate and ROS level ($r=0.826$, $P<0.05$). After 8 and 24 h of exposure, the *Bcl-2* and *Bax* mRNA expression levels both showed dose-response relationships with exposure concentrations ($r=-0.634$ and 0.754 at 8 h, $r=-0.773$ and 0.823 at 24 h, $P<0.05$). After 24 h of exposure, there was a significant decrease of the *Bcl-2* mRNA and protein expression levels but a remarkable increase of the *Bax* mRNA and protein expression levels in 1.5 and 2.5 mmol/L treatment groups in contrast to the controls ($P<0.05$). There were significant positive correlations between the ROS level and the mRNA expression level of *Bax* ($r=0.886$ and 0.824 , $P<0.05$), and negative correlations between the ROS level and the mRNA expression level of *Bcl-2* ($r=-0.862$ and -0.815 , $P<0.05$). After 24 h of exposure, compared with the control group, the protein expression levels of cytochrome C, activated Caspase-3, and activated Caspase-9 were distinctly increased and the PARP-1 protein level was significantly decreased in the 2.5 mmol/L chloroacetic acid treated group ($P<0.05$). [Conclusion] Chloroacetic acid could trigger oxidative stress in 16HBE cells and result in cell apoptosis via activating mitochondrial pathway with elevated expression level of *Bax* and decreased expression level of *Bcl-2*.

Key Words: chloroacetic acid; oxidative stress; reactive oxygen species; apoptosis; mitochondrial pathway

氯乙酸为中等毒性,是职业接触中危害最大的酸类物质,毒性强于乙酸、二氯乙酸和三氯乙酸。由于其化学性质活泼,已广泛应用于医药、染料、农药、香料、树脂、食品添加剂、表面活性剂等生产领域,也是饮用水氯化消毒的主要副产物。除经皮肤黏膜吸收外,氯乙酸也可经呼吸道侵入机体,引起肺组织不同程度的炎性反应与组织损伤。人群流行病学研究表明,吸入低浓度的酸雾或粉尘可引起上呼吸道的刺激症状,而吸入高浓度的酸雾则迅速发生严重急性中毒^[1]。动物研究发现,氯乙酸短时间暴露即可引起肺组织炎性损伤^[2]。进一步研究证实,氧化应激和细胞凋亡在肺炎性损伤的发展过程中具有重要的生物学意义^[3]。然而,氯乙酸诱导氧化应激和细胞凋亡的分子机制尚未明确,从而限制了其中毒机制及防治策略的研究。活性氧(ROS)作为氧化应激的主要根源之一,正常情况下其产生和清除处于动态平衡,当机体的氧化程度超过了氧化物清除能力,就可导致ROS体内蓄积,引发细胞毒性,甚至细胞死亡。此外,细胞内过量的ROS也可作为第二信使激活凋亡通路,通过调节凋亡相关基因的表达而引发细胞凋亡。目前,凋亡主要有三条信号通路,内源性线粒体通路在细胞凋亡发生中扮演着重要角色,而*Bcl-2*家族基因是线粒体凋亡通路中起重要调控作用的基因,主要位于凋亡通路上游,其中*Bcl-2*和*Bax*作为家族两类代表性基

因通过调节线粒体膜电位,以及膜通透性进而调控线粒体内细胞色素C的释放,当其释放进入胞质后与凋亡因子结合形成多聚体,进一步激活胱天蛋白酶的级联反应^[4]。胱天蛋白酶是细胞凋亡的中心分子,其中Caspase-9和Caspase-3的活化与线粒体凋亡通路密切相关^[5],而Caspase-3一旦激活细胞凋亡不可避免,其作为凋亡效应的执行者切割下游底物,最终触发细胞凋亡。

氯乙酸的酸雾或粉尘经呼吸道吸入后,支气管上皮细胞是其主要作用的靶细胞,因此,本研究以人支气管上皮细胞16HBE为对象,进行氯乙酸体外毒性研究,通过检测细胞内ROS水平和超氧化物歧化酶(SOD)活力,探讨氯乙酸诱导的氧化应激损伤,并采用相关分析探讨氧化应激与细胞凋亡的关系;通过检测处理组*Bcl-2*、*Bax*、细胞色素C、Caspase-9、Caspase-3等凋亡相关蛋白表达,探讨线粒体通路在氧化应激诱导细胞凋亡中的作用及关系,为阐明氯乙酸所致健康损害机制提供实验数据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

1.1.1 试剂 MEM培养液、胎牛血清、胰酶、青链霉素混合液(Gibco,美国);氯乙酸、二甲基亚砷(Sigma,美国);Trizol、蛋白标准品(Thermo,美国);PCR引物(上海英俊生物技术公司,中国);兔抗

人 Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9、聚 ADP 核糖聚合酶(PARP-1)、细胞色素 C、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记的山羊抗兔 IgG、聚偏二氟乙烯(PVDF)膜(Millipore, 美国); CCK-8 细胞毒性检测试剂盒、ROS 检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1)、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒、二喹啉甲酸(BCA)蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(中国碧云天生物技术公司, 中国); 逆转录试剂盒、荧光定量 PCR 试剂盒(Promega, 美国); 底物化学发光(ECL)试剂盒(Cell Signaling, 美国), 其余均为国产生化试剂。

1.1.2 仪器 CO₂ 细胞培养箱、紫外分光光度计(Thermo, 美国); 倒置显微镜(Olympus, 日本); 多功能酶标仪(Bio-Tek, 美国); 实时荧光定量 PCR 仪、蛋白电泳和印迹系统(Bio-Rad, 美国); 流式细胞仪(BD, 美国); 低温离心机(Sigma, 美国)。

1.2 细胞培养

将人支气管上皮细胞 16HBE(中山大学公共卫生学院陈雯教授馈赠)复苏后, 用含 10%(体积分数)胎牛血清、1%(体积分数)青链霉素混合液的 MEM 培养基在 37℃、5%CO₂ 培养箱中进行培养, 每隔 3~4 d 传代一次。

1.3 细胞存活率的检测

取对数生长期细胞, 按 5×10^4 个/孔接种于 96 孔培养板中, 于 37℃、5%CO₂ 条件下进行培养。24 h 后弃培养液, PBS 洗 1 次, 加入不同浓度(0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L)的氯乙酸, 培养 24 h 后每孔加入 CCK-8 染液 10 μ L, 37℃培养 1 h 后, 酶标仪上检测 450 nm 处的光密度值(D), 细胞存活率(%) = $(D_{\text{实验}} - D_{\text{空白}}) / (D_{\text{对照}} - D_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

1.4 细胞凋亡率的检测

取对数生长期细胞, 按 1×10^6 个/孔接种于 6 孔培养板, 24 h 后弃培养液, PBS 洗 1 次, 加入不同浓度氯乙酸染毒 24 h 后, 胰酶消化收获细胞, PBS 洗 1 次, 将细胞重悬于 500 μ L 结合缓冲液。加入 10 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L 碘化丙啶(PI), 轻轻混匀, 避光室温反应 15 min, 行流式细胞仪检测荧光强度, 依据 Accuri C6 分析系统直读出细胞凋亡率。

1.5 SOD 活力的检测

取对数生长期细胞, 按 1×10^6 个/孔接种于 6 孔培养板, 24 h 后弃培养液, PBS 洗 1 次, 各浓度氯乙酸染毒 24 h 后, 胰酶消化, PBS 洗 2 次, 超声裂解,

4℃、3 000 $\times g$ 离心 15 min, 按试剂盒说明书用黄嘌呤氧化酶法测定 SOD 活力, 并用 BCA 法测定上清蛋白含量。

1.6 细胞内 ROS 的检测

利用荧光探针二氯荧光二乙酸酯(DCFH-DA)评估细胞内 ROS 的水平。取对数生长期细胞, 按 1×10^6 个/孔接种于 6 孔培养板, 24 h 后弃培养液, PBS 洗 1 次, 各浓度氯乙酸染毒 0.25、0.5、1、8、24 h 后, 弃培养液, 胰酶消化, PBS 洗 2 次, 离心收获细胞, 加入含 10 μ mol/L DCFH-DA 的无血清培养基, 于 37℃和 5%(体积分数)CO₂ 培养箱内孵育 20 min, PBS 洗 2 次, 用 350 μ L PBS 重悬细胞, 行流式细胞仪检测荧光强度。

1.7 线粒体膜电位的检测

采用 JC-1 染料测定线粒体膜电位。取对数生长期细胞, 按 1×10^6 个/孔接种于 6 孔培养板, 24 h 后弃培养液, PBS 洗 1 次, 各浓度氯乙酸处理 8、24 h 后, 胰酶消化, PBS 洗 1 次, 重悬于 1 mL 培养液, 加入 1 mL JC-1 染色工作液, 充分混匀, 于 37℃和 5%CO₂ 培养箱内孵育 20 min, 用 JC-1 染色缓冲液洗 2 次, 用 350 μ L PBS 重悬细胞, 行流式细胞仪检测荧光强度, 依据 Accuri C6 分析系统直出线粒体膜电位。

1.8 Bcl-2 和 Bax mRNA 表达水平的测定

取对数生长期细胞, 按 1×10^6 个/孔接种于 6 孔培养板, 24 h 后加入不同浓度氯乙酸, 处理 8 h 或 24 h 后, 实验设对照组, Trizol 法提取细胞总 RNA, 紫外分光光度计检测 RNA 浓度及纯度。将提取 RNA 用 Promega 公司的荧光定量 PCR 试剂盒逆转录为 cDNA。Bcl-2 引物序列: (正向) 5'-ATGTGTGTGGAGAGC GTCAA-3'; (反向) 5'-GCCGTACAGTTCCACAAAGG-3'。Bax 引物序列: (正向) 5'-CCAAGAAGCT GAGCG AGTGT-3'; (反向) 5'-CAGCC CATGATGGTT CTGAT-3'。GAPDH 引物序列: (正向) 5'-CTCTCTGCTC CTCCTGTTTCGAC-3'; (反向) 5'-TGACCGATGTGGCTCGGCT-3'。分析 Bcl-2 和 Bax 基因表达, 以 GAPDH 为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 公式, 计算各基因的相对表达量。

1.9 凋亡蛋白表达水平的测定

按 5×10^6 个/皿的密度接种于 10 cm 培养皿, 24 h 后加 1.5、2.5 mmol/L 氯乙酸处理 24 h 后, 实验设对照组, 加入 RIPA 裂解液(含浓度 1 mmol/L 的苯甲基磺酰氟), 冰浴 10 min 收集裂解液, 4℃16 000 $\times g$ 离心 10 min, 二喹啉甲酸二钠盐(BCA)法测定上清蛋白浓度, 样品变性 5 min, -80℃保存。配制分离胶和浓缩胶, 加

样后经110 V电压垂直电泳,再经110 V恒压转膜,用10%(体积分数)脱脂奶粉室温封闭2 h。加入稀释的兔抗人Bcl-2、Bax、Caspase-3、Caspase-9、放射免疫沉淀(PARP)-1、细胞色素C、GAPDH一抗,4℃反应过夜。加入稀释的HRP标记的山羊抗兔IgG,室温反应1 h,显影、定影后用ECL化学发光法检测蛋白条带,并用Phoretix 1D软件分析各蛋白的相对表达量。

1.10 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行数据统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。各组间采用单因素方差分析进行统计学检验,方差齐时用LSD法进行组间的两两比较,方差不齐则用Dunnett-*t*检验;采用Pearson相关分析探讨两个指标之间的相关性。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 氯乙酸对16HBE细胞存活和凋亡的影响

由表1可见,染毒24 h,随着氯乙酸作用浓度的升高,细胞存活率逐渐降低($r=-0.902$, $P<0.05$);与对照组相比,1.5、2.0、2.5 mmol/L剂量组细胞存活率明显降低,分别降低了12%、20%和30%,差异均有统计学意义($P<0.05$)。氯乙酸诱导的细胞凋亡率与染毒浓度呈正相关($r=0.914$, $P<0.05$);染毒24 h时,1.5、2.0、2.5 mmol/L剂量组细胞凋亡率明显高于对照组($P<0.05$),且分别是对照组的3、4和7倍。

表1 氯乙酸染毒24 h对16HBE细胞存活和凋亡的影响
($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

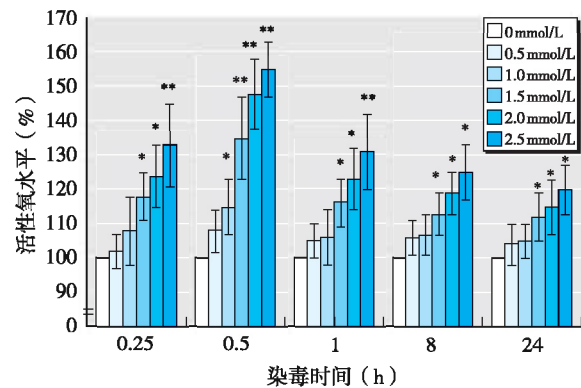
染毒浓度 (mmol/L)	存活率 (%)	凋亡率 (%)
0	100.0 ± 0.0	5.6 ± 3.0
0.5	97.5 ± 3.2	6.2 ± 2.3
1.0	94.4 ± 3.5	8.5 ± 2.6
1.5	87.7 ± 4.4*	17.2 ± 4.0*
2.0	80.2 ± 5.3**	24.6 ± 4.2**
2.5	70.6 ± 5.5**	39.3 ± 5.7**

[注]与对照组(0 mmol/L)比较,*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

2.2 氯乙酸对16HBE细胞氧化应激的影响

由图1可见,从不同染毒时间看,ROS水平呈先升高后降低的趋势,各剂量组在染毒0.5 h达到峰值,染毒1 h反而降低;从不同染毒看,染毒0.5 h时,1.0、1.5、2.0、2.5 mmol/L各剂量组细胞内ROS水平对应的荧光强度值分别为 2452.4 ± 129.3 、 2878.9 ± 163.5 、 3156.1 ± 236.6 、 3305.4 ± 253.3 ,与对照组ROS水平(2132.5 ± 82.4)相比明显升高($P<0.05$),分别增加了15%、35%、48%和55%;染毒各时间点(0.25、0.5、

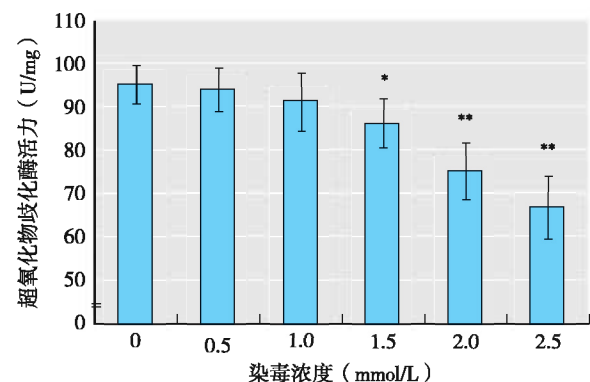
1、8、24 h)染毒浓度与ROS水平均存在较好的剂量-效应关系($r=0.756$ 、 0.893 、 0.735 、 0.667 和 0.653 , $P<0.05$)。另外,本研究进一步分析了细胞内ROS水平与细胞凋亡的关系,结果显示凋亡率与染毒24 h细胞内ROS水平呈明显正相关($r=0.826$, $P<0.05$)。



[注]与对照组(0 mmol/L)比较,*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

图1 氯乙酸对16HBE细胞内ROS水平的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

由图2可见,氯乙酸的染毒浓度与SOD活力呈负相关($r=-0.732$, $P<0.05$);1.5、2.0、2.5 mmol/L剂量组SOD活力分别为(86.3 ± 5.8)、(75.2 ± 6.6)、(66.8 ± 7.2) U/mg(以每mg蛋白计,余同),均明显低于对照组SOD活力[(95.3 ± 5.3) U/mg]($P<0.05$)。



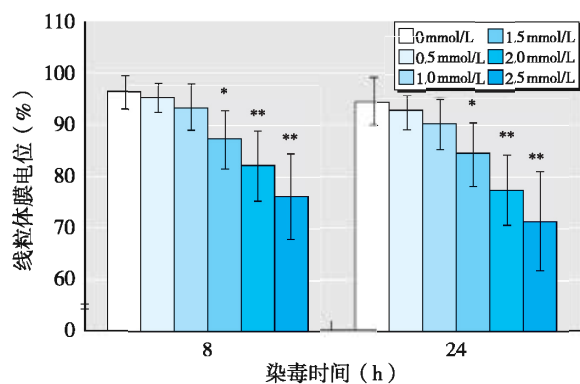
[注]与对照组(0 mmol/L)比较,*: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

图2 氯乙酸染毒24 h对16HBE细胞SOD活力的影响
($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

2.3 氯乙酸对16HBE细胞线粒体膜电位的影响

由图3可见,线粒体膜电位8 h组与24 h组比较差异无统计学意义。从不同染毒浓度看,与对照组相比,1.5、2.0、2.5 mmol/L剂量组线粒体膜电位均明显降低,染毒8 h后各剂量组分别降低了9%、15%和21%,染毒24 h各剂量组分别降低了11%、18%和24%,差异有统计学意义($P<0.05$)。染毒8、24 h两个时间点,染毒浓度与线粒体膜电位存在剂量-效应关

系($r=-0.652$ 和 -0.863 , $P<0.05$)。



[注]与对照组(0mmol/L)比较, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

图3 氯乙酸对16HBE细胞线粒体膜电位的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

2.4 氯乙酸对Bcl-2和Bax表达的影响

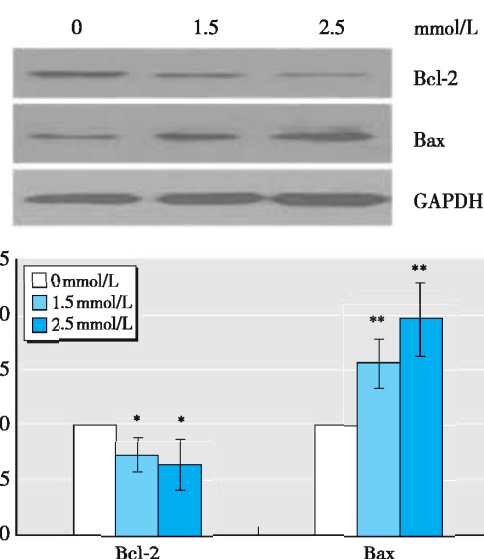
由表2可见, *Bcl-2*和*Bax* mRNA表达8h组与24h组比较差异无统计学意义; 氯乙酸处理8h和24h两个时间点, 染毒浓度与*Bcl-2*、*Bax* mRNA表达水平存在剂量效应关系(8h: $r=-0.634$ 和 0.754 , 24h: $r=-0.773$ 和 0.823 , $P<0.05$); 两个染毒时间点, 2.0、2.5 mmol/L剂量组*Bcl-2* mRNA水平较对照组下调, 而1.5、2.0、2.5 mmol/L剂量组*Bax* mRNA水平较对照组上调($P<0.05$)。此外, 本研究也分析了染毒8、24h后*Bcl-2*和*Bax* mRNA表达与细胞内ROS水平的关系, 结果显示*Bax* mRNA表达与ROS水平呈正相关($r=0.886$ 和 0.824 , $P<0.05$), 而*Bcl-2* mRNA表达与ROS水平呈负相关($r=-0.862$ 和 -0.815 , $P<0.05$)。

表2 氯乙酸对*Bcl-2*和*Bax* mRNA相对表达水平的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

染毒浓度 (mmol/L)	<i>Bcl-2</i>		<i>Bax</i>	
	8 h	24 h	8 h	24 h
0	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
0.5	0.97 ± 0.13	0.95 ± 0.11	1.14 ± 0.18	1.17 ± 0.18
1.0	0.95 ± 0.15	0.91 ± 0.14	1.24 ± 0.21	1.36 ± 0.14**
1.5	0.85 ± 0.13	0.82 ± 0.10*	1.43 ± 0.18*	1.68 ± 0.18**
2.0	0.81 ± 0.10*	0.73 ± 0.11**	1.65 ± 0.21**	1.84 ± 0.22**
2.5	0.75 ± 0.13**	0.65 ± 0.16**	1.73 ± 0.25**	1.95 ± 0.18**

[注]与对照组(0mmol/L)比较, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

由图4可见, *Bcl-2*和*Bax*蛋白表达和其mRNA表达基本一致, 与对照组相比, 染毒24h时, 1.5、2.5 mmol/L氯乙酸剂量组可明显改变*Bcl-2*和*Bax*蛋白水平, 差异有统计学意义($P<0.05$), *Bcl-2*蛋白表达分别下调了27%和36%, 而*Bax*蛋白表达分别上调了56%和96%。

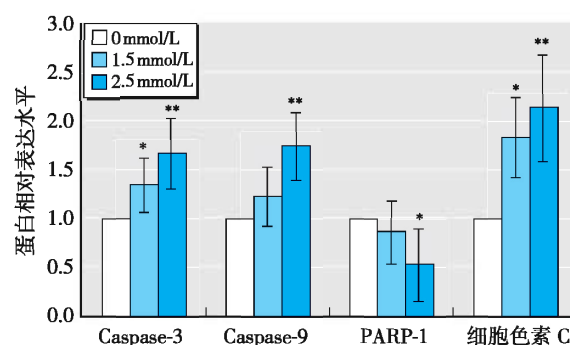
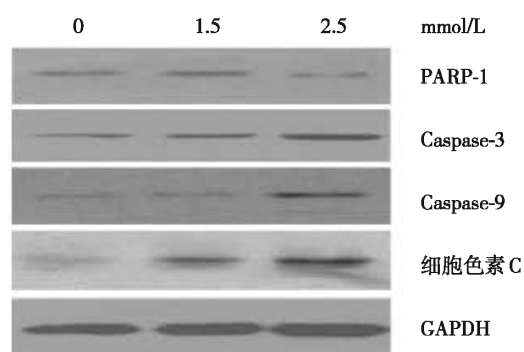


[注]与对照组(0mmol/L)比较, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

图4 氯乙酸染毒24h对*Bcl-2*和*Bax*蛋白表达的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

2.5 氯乙酸对胱天蛋白酶、PARP-1、细胞色素C表达的影响

由图5可见, 氯乙酸染毒24h后, 1.5、2.5 mmol/L剂量组细胞色素C表达较对照组分别增加了83%和114%; Caspase-3表达分别增加了35%和67%, 差异均有统计学意义($P<0.05$); 而Caspase-9和PARP-1表达仅2.5 mmol/L剂量组与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$), 分别增加了75%和降低了47%。



[注]与对照组(0mmol/L)比较, *: $P<0.05$; **: $P<0.01$ 。

图5 氯乙酸染毒24h对Caspase-9、Caspase-3、PARP-1、细胞色素C表达的影响($n=3$, $\bar{x} \pm s$)

3 讨论

目前,氯乙酸急性毒性的相关毒理学研究多集中在神经系统、心血管系统、泌尿系统的影响等,而对呼吸系统的急性、慢性毒性研究鲜见。为了较好地反映氯乙酸对呼吸系统造成的损伤,本研究选取的靶细胞是人支气管上皮细胞 16HBE,其增殖能力较强,是一种广泛用于研究可吸入物质的靶细胞模型。当浓度在 0.3~5.0 mmol/L 时,氯乙酸对多种细胞引发程度不同的细胞毒性,本课题组根据细胞毒性结果,计算出染毒 24 h 氯乙酸对 16HBE 半数致死浓度(LC₅₀)为 2.9 mmol/L。2006 年美国环保局规定氯乙酸最高容许浓度为 0.006 mmol/L,但在饮用水和泳池用水的生物监测中却检测到更高浓度(0.001~0.030 mmol/L)。可见一般人群,尤其是职业人群对氯乙酸有较高的暴露风险,暴露特征以长期低浓度为主,且暴露浓度远低于体外试验的染毒浓度,可见体外研究低浓度氯乙酸的毒效应及作用机制更有意义,为此本研究选择稍低于 LC₅₀ 的浓度 2.5 mmol/L 作为最高染毒剂量。由于本身酸度的原因,其剂量间距设置较小(0.5 mmol/L)。CCK-8 毒性结果也显示,当氯乙酸作用浓度 ≥ 1.5 mmol/L 时,随染毒浓度升高细胞存活率明显下降,提示 1.5 mmol/L 及以上浓度的氯乙酸对 16HBE 细胞生长具有明显的抑制作用,其毒作用机制可能与抑制线粒体细胞器的功能有关。

正常生理情况下,机体的氧化和抗氧化体系处于平衡状态,而氧化应激是由于体内氧化与抗氧化体系平衡被破坏,使 ROS 在体内过量蓄积,从而导致氧化反应占主导作用。本研究发现,氯乙酸可以引起 16HBE 细胞内 ROS 水平升高,且 ROS 产生时间比较早,呈先升后降的趋势,即染毒 0.25 h 开始增加,0.5 h 达到峰值,1 h 后 ROS 水平逐渐下降(≤ 1.0 mmol/L 剂量组 ROS 恢复到对照组水平,≥ 1.5 mmol/L 剂量组 ROS 仍高于对照组)。另外,本研究发现,染毒 24 h 后 16HBE 细胞 SOD 活力随染毒浓度的升高而降低,提示氯乙酸处理后 16HBE 抗氧化能力也减弱。可见,SOD 活力降低和 ROS 水平升高提示氯乙酸可以较早诱发 16HBE 发生氧化应激。Lu 等^[6]研究也证实,氯乙酸毒性效应与氧化应激密切相关,推测氧化应激可能是氯乙酸致肺损伤的重要机制之一。

细胞凋亡是细胞对生理性或病理性刺激信号产生的一种自发的、程序化的死亡过程^[7],其受到非常复杂的调控,而凋亡的异常又与多种疾病的发生、发展有着密切关系,其在呼吸系统的炎性损伤中也起着

重要作用^[8]。本研究结果显示,当氯乙酸作用浓度大于 1.5 mmol/L 时,可以引发 16HBE 细胞凋亡率呈剂量依赖性升高。体外研究^[6,9]也证实,氯乙酸处理后细胞凋亡率明显升高,这与我们的研究结果相一致。本研究又通过相关分析进一步发现,细胞内 ROS 水平与凋亡率呈明显正相关,提示 16HBE 细胞内 ROS 过量聚集,造成氧化应激,并最终引起细胞凋亡。线粒体是 ROS 产生的重要场所,也是凋亡的调控中心,其在凋亡发生中的表现包括两方面:①线粒体膜发生去极化,膜电位下降或丢失,氧化磷酸化功能障碍。线粒体膜电位是评价线粒体功能的敏感性指标,其中膜电位下降公认为凋亡发生的最早检测指标^[10-11]。本研究使用 JC-1 染色法检测线粒体膜电位,结果显示处理组线粒体膜电位明显低于对照组,且在处理 8 h 后膜电位发生了显著降低,且膜电位呈浓度和时间依赖性下降,并发现膜电位与细胞凋亡呈负相关,提示氯乙酸所致膜电位的降低可以作为反映凋亡的早期检测指标。②细胞内过量的 ROS 使线粒体膜发生脂质过氧化,膜通透性增加,使线粒体内的凋亡相关蛋白如细胞色素 C 扩散到胞浆中,同时有研究证实细胞色素 C 又正反馈调节线粒体产生 ROS^[12]。本研究发现,经氯乙酸处理后 16HBE 细胞在线粒体膜电位降低的同时伴随着胞质细胞色素 C 表达呈剂量依赖性增加,提示氯乙酸可引起线粒体膜通透性增加,使细胞色素 C 从膜间隙释放进入胞质。

Bcl-2 家族是调控线粒体内细胞色素 C 释放的关键调控蛋白,主要分为抗凋亡和促凋亡两类,它们的表达、调控以及相互作用是影响线粒体通路相关凋亡的重要因素^[5]。Bax 是家族中重要的促凋亡蛋白,其通过形成多聚体而易位到线粒体,与线粒体通透性转换孔发生作用,并在外膜上形成通道,促使细胞色素 C 的释放,从而触发细胞凋亡^[4-5]。Bcl-2 作为家族中最重要的抗凋亡蛋白,位于凋亡通路的上游,可以与 Bcl-2 家族中的促凋亡蛋白形成二聚体对抗其促凋亡效应,进而调节细胞色素 C 从膜间隙释放入胞质的早期级联反应。本研究发现,随着氯乙酸染毒浓度升高,染毒 8 h 后 Bax mRNA 表达上调而 Bcl-2 mRNA 表达下调,染毒 24 h 后 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达和 mRNA 表达相一致,从 mRNA 和蛋白表达结果说明 16HBE 经氯乙酸作用后,其促凋亡能力增加而抗凋亡能力下降,进一步激活线粒体相关的细胞凋亡。相关分析结果提示,Bax mRNA 表达与细胞内 ROS 水平呈正相关,而 Bcl-2

mRNA表达与ROS水平呈负相关,推测氧化应激可能在氯乙酸激活线粒体通路相关细胞凋亡中发挥着重要作用,这与Wang等^[13]的研究结果相一致。此外,Fu等^[14]研究也证实,细胞内过量的ROS可作为第二信使触发凋亡信号,通过调控*Bcl-2*家族基因,进而调控细胞色素C的释放,最终促使细胞发生凋亡。细胞色素C的释放是线粒体凋亡通路发生的重要环节,当其释放到胞质后与凋亡因子结合形成多聚体,触发胱天蛋白酶的级联反应,最终导致凋亡的发生^[15]。胱天蛋白酶是细胞凋亡的中心分子,主要分为两类,即起始胱天蛋白酶(*Caspase-8, 9, 10*)和效应胱天蛋白酶(*Caspase-3, 6, 7*)。在内源性线粒体凋亡途径中,主要是通过活化*Caspase-9*前体,活化的*Caspase-9*进而激活效应*Caspase-3*,而活化的*Caspase-3*可作为终末剪切酶切割下游底物如PARP-1,引发细胞凋亡。PARP-1是一种重要的DNA修复蛋白,在DNA损伤修复和细胞死亡中起着重要作用^[16]。本研究结果显示,与对照组相比,染毒24h后最高染毒浓度组16HBE细胞内细胞色素C、活化的*Caspase-9*和*Caspase-3*表达显著增加,而PARP-1表达显著降低,提示氯乙酸处理16HBE后可以激活线粒体相关的凋亡途径。Chen等^[9]研究证实,氯乙酸可以通过线粒体通路诱导神经母细胞瘤neuro-2a细胞发生凋亡。为进一步确认以上结果,本课题组后续添加*Caspase-3*和*Caspase-9*抑制剂,观察抑制剂对氯乙酸诱导细胞存活和凋亡的影响,进一步揭示不同浓度氯乙酸是否完全通过线粒体通路造成细胞凋亡。

综上,氯乙酸可诱导人正常支气管上皮细胞16HBE发生氧化应激,氧化应激可能是诱导细胞凋亡的重要环节之一,在其诱导细胞凋亡过程中通过氧化应激上调促凋亡蛋白Bax和下调抗凋亡蛋白Bcl-2,使线粒体膜电位降低、膜通透性增加,促使细胞色素C进入胞质,激活下游*Caspase-9*前体,进一步活化*Caspase-3*,切割底物PARP-1,最终导致细胞凋亡。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献

- [1]王彤,杨丽莉,李雅婷.氯乙酸对作业工人的健康影响[J].职业与健康,2009,25(1):20-21.
- [2]Kato J, Dote T, Shimizu H, et al. Lethal acute lung injury and hypoglycemia after subcutaneous administration of monochloroacetic acid[J]. Toxicol Ind Health, 2006, 22(5): 203-209.
- [3]Wang LY, Antoninin JM, Rojanasakul Y, et al. Potential role of apoptotic macrophages in pulmonary inflammation and fibrosis[J]. J Cell Physiol, 2003, 194(2): 215-224.
- [4]Harris MH, Thompson CB. The role of the Bcl-2 family in the regulation of outer mitochondrial membrane permeability[J]. Cell Death Differ, 2000, 7(12): 1182-1191.
- [5]Breckenridge DG, Xue D. Regulation of mitochondrial membrane permeabilization by Bcl-2 family proteins and caspases[J]. Curr Opin Cell Biol, 2004, 16(6): 647-652.
- [6]Lu TH, Su CC, Tang FC, et al. Chloroacetic acid triggers apoptosis in neuronal cells via a reactive oxygen species-induced endoplasmic reticulum stress signaling pathway[J]. Chem Biol Interact, 2015, 225: 1-12.
- [7]Hotchkiss RS, Strasser A, McDunn JE, et al. Cell death[J]. N Engl J Med, 2009, 361(16): 1570-1583.
- [8]宋小莲,白冲,傅佩芳,等.急性肺损伤大鼠肺部细胞因子水平变化及肺泡上皮细胞的凋亡情况[J].上海医学,2010,33(11): 1027-1030.
- [9]Chen CH, Chen SJ, Su CC, et al. Chloroacetic acid induced neuronal cells death through oxidative stress-mediated p38-MAPK activation pathway regulated mitochondria-dependent apoptotic signals[J]. Toxicology, 2013, 303: 72-82.
- [10]Gottlieb E, Armour SM, Harris MH, et al. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis[J]. Cell Death Differ, 2003, 10(6): 709-717.
- [11]Lee MS. Role of mitochondrial function in cell death and body metabolism[J]. Front Biosci, 2016, 21: 1233-1244.
- [12]Valero T. Mitochondrial biogenesis: pharmacological approaches[J]. Curr Pharm Des, 2014, 20(35): 5507-5509.
- [13]Wang CC, Liu TY, Cheng CH, et al. Involvement of the mitochondrion-dependent pathway and oxidative stress in the apoptosis of murine splenocytes induced by areca nut extract[J]. Toxicol in Vitro, 2009, 23(5): 840-847.
- [14]Fu J, Dang Z, Deng Y, et al. Regulation of c-Myc and Bcl-2 induced apoptosis of human bronchial epithelial cells by zinc oxide nanoparticles[J]. J Biomed Nanotechnol, 2012, 8(4): 669-675.
- [15]Babbitt SE, Sutherland MC, San Francisco B, et al. Mitochondrial cytochrome c biogenesis: no longer an enigma[J]. Trends Biochem Sci, 2015, 40(8): 446-455.
- [16]Sosna J, Voigt S, Mathieu S, et al. TNF-induced necroptosis and PARP-1 mediated necrosis represent distinct routes to programmed necrotic cell death[J]. Cell Mol Life Sci, 2014, 71(2): 331-348.

(收稿日期:2016-04-07)

(英文编辑:汪源;编辑:汪源;校对:洪琪)