

两种砷化物诱导胰岛细胞的凋亡

姚晓峰, 王方芳, 姜丽平, 耿成燕, 仲来福, 郑白璐, 杨光, 孙鲜策(大连医科大学劳动卫生与环境卫生教研室, 辽宁省防治老年退行性疾病天然产物工程实验室, 辽宁省大连市 116044)

文章亮点:

- 1 砷作为一种常见的环境化学毒物, 虽然有流行病学研究提示其与糖尿病发生可能具有剂量-反应关系, 但人们对于无机砷在细胞分子水平对糖尿病影响机制的深入研究却很少。
- 2 无机砷和有机砷均可引起胰岛 β 细胞凋亡, 可能与砷所致活性氧水平增高有关。
- 3 无机砷可诱导细胞核内 P53 表达上调, 而有机砷对细胞核内 P53 未见显著影响。

关键词:

组织构建; 组织工程; 砷化物; 大鼠胰岛 β 细胞; 细胞凋亡; 活性氧; P53; 国家自然科学基金

主题词:

组织工程; 砷; 细胞凋亡; 流式细胞术

基金资助:

国家自然科学基金(30972562); 辽宁省自然科学基金(2014023050)

摘要

背景: 近年有流行病学调查显示砷暴露与糖尿病发病相关。

目的: 实验从砷导致胰岛 β 细胞凋亡的机制入手, 阐明砷化物相关糖尿病的致病机制。

方法: 将砷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, iAs^{5+} , 50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$)和二甲基砷酸钠($\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, DMA^{5+} , 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$)分别作用于大鼠胰岛细胞株(INS-1 细胞)24 h 或 48 h。通过 MTT 法检测砷化物对胰岛细胞的毒性作用。用 Annexin V-FITC/PI 和 Hoechst 33258 染色法检测两种砷化物致细胞凋亡情况。用 2', 7'-二氢二氯荧光素染色检测细胞内活性氧的含量, 用 Western blot 检测细胞内 P53 的蛋白含量变化。

结果与结论: 砷酸氢二钠($> 50 \mu\text{mol/L}$)、二甲基砷酸钠($> 100 \mu\text{mol/L}$)均降低大鼠胰岛 β 细胞的细胞存活率($P < 0.05$, $P < 0.01$); 砷酸氢二钠(50-200 $\mu\text{mol/L}$)和二甲基砷酸钠(100-400 $\mu\text{mol/L}$)作用于大鼠胰岛 β 细胞 48 h 后, 细胞发生凋亡。砷酸氢二钠、二甲基砷酸钠暴露 24 h 引起大鼠胰岛 β 细胞内活性氧水平呈剂量依赖性升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。经砷酸氢二钠染毒的胰岛 β 细胞的细胞核内 P53 蛋白表达增多($P < 0.05$, $P < 0.01$), 而经二甲基砷酸钠染毒的大鼠胰岛 β 细胞的细胞核内 P53 蛋白表达差异无显著性意义。结果说明, 两种砷化物砷酸氢二钠、二甲基砷酸钠均可引起胰岛 β 细胞凋亡, 可能与砷所致活性氧水平增高有关。

姚晓峰, 王方芳, 姜丽平, 耿成燕, 仲来福, 郑白璐, 杨光, 孙鲜策. 两种砷化物诱导胰岛细胞的凋亡[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(51):8286-8291.

Two arsenicals induce apoptosis of islet cells

Yao Xiao-feng, Wang Fang-fang, Jiang Li-ping, Geng Cheng-yan, Zhong Lai-fu, Zheng Bai-lu, Yang Guang, Sun Xian-ce (Liaoning Natural Products Engineering Research Center for Anti-Degenerative Diseases, Department of Occupational and Environmental Health, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China)

Abstract

BACKGROUND: In recent years, epidemiological data show an association between arsenic exposure and diabetes mellitus.

OBJECTIVE: To investigate the underlying mechanism of arsenic-induced apoptosis in pancreatic β cells to elucidate the pathogenesis of arsenic-related diabetes.

METHODS: Rat pancreatic β cells (INS-1) were treated with sodium arsenate (iAs^{5+}) (50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$) and dimethylarsinic acid (DMA^{5+}) (100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$) for 24 or 48 hours. The cytotoxicity of arsenic was detected by MTT assay in INS-1 cells. The arsenic-induced apoptosis was detected by Annexin V-FITC/PI and Hoechst33258 staining. The intracellular reactive oxygen species level was detected by 2',7'-dichlorofluorescein staining. The P53 expression level was detected by western blot.

RESULTS AND CONCLUSION: iAs^{5+} ($> 50 \mu\text{mol/L}$), DMA^{5+} ($> 100 \mu\text{mol/L}$) reduced the INS-1 cell viability ($P < 0.05$, $P < 0.01$); after treating with iAs^{5+} (50-200 $\mu\text{mol/L}$) and DMA^{5+} (100-400 $\mu\text{mol/L}$) for 48 hours, both arsenic compounds induced apoptosis in INS-1 cells. The intracellular reactive oxygen species level increased in a concentration-dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$), after treating with iAs^{5+} and DMA^{5+} for 24 hours respectively; the nuclear expression level of P53 protein in INS-1 increased after treating with iAs^{5+} ($P < 0.05$,

姚晓峰, 女, 1979 年生, 辽宁省大连市人, 汉族, 2006 年大连医科大学毕业, 硕士, 讲师。

姚晓峰和王方芳并列第一作者。

通讯作者: 孙鲜策, 博士, 教授, 大连医科大学劳动卫生与环境卫生教研室, 辽宁省大连市 116044

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.51.016
[http://www.crter.org]

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2014)51-08286-06
稿件接受: 2014-10-17

Yao Xiao-feng, Master, Lecturer, Liaoning Natural Products Engineering Research Center for Anti-Degenerative Diseases, Department of Occupational and Environmental Health, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Wang Fang-fang, Liaoning Natural Products Engineering Research Center for Anti-Degenerative Diseases, Department of Occupational and Environmental Health, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Yao Xiao-feng and Wang Fang-fang contributed equally to this work.

Corresponding author: Sun Xian-ce, M.D., Professor, Liaoning Natural Products Engineering Research Center for Anti-Degenerative Diseases, Department of Occupational and Environmental Health, Dalian Medical University, Dalian 116044, Liaoning Province, China

Accepted: 2014-10-17

$P < 0.01$); however, DMA⁵⁺ did not increase the P53 level significantly. In summary, both iAs⁵⁺ and DMA⁵⁺ can induce apoptosis in INS-1 cells, which may be related with arsenic-induced rise in intracellular reactive oxygen species.

Subject headings: tissue engineering; arsenic; apoptosis; flow cytometry

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. 30972562; the Natural Science Foundation of Liaoning Province, No. 2014023050

Yao XF, Wang FF, Jiang LP, Geng CY, Zhong LF, Zheng BL, Yang G, Sun XC. Two arsenicals induce apoptosis of islet cells. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2014;18(51):8286-8291.

0 引言 Introduction

慢性砷中毒是一个全球性的公共卫生问题^[1-2]。砷除了引起癌症,还可导致皮肤角化、色素沉着、心血管病、神经系统损伤和内分泌紊乱等^[3-5]。全球有上亿人面临高砷污染的威胁,而中国已成为受砷危害最为严重的国家之一。近年来在孟加拉等地进行的流行病学研究表明,慢性砷暴露是2型糖尿病的危险因素之一^[6-8]。中国新疆高砷地区居民血糖水平明显高于低砷地区居民血糖水平^[9]。因此,地方性砷中毒的防治面临巨大挑战,研究砷对糖尿病流行所起的作用将是今后公共卫生研究的一个重点问题。

砷作为一种常见的环境化学毒物,虽然有流行病学研究提示其与糖尿病发生可能具有剂量-反应关系,但人们对于无机砷在细胞分子水平对糖尿病影响机制的深入研究却很少。糖尿病在全球范围内正以较为迅猛的速度发展,已成为继肿瘤、心血管病后又一个严重危害人类健康的慢性疾病^[9]。糖尿病的病因和发病机制比较复杂,至今尚未完全清楚。目前公认已知的危险因素包括特定的遗传多态性、年龄、性别、肥胖、饮食、活动减少和压力^[10-11]。近年来高砷暴露被提出是2型糖尿病的危险因素之一^[12],而胰岛 β 细胞凋亡导致其功能丧失是糖尿病发生的重要机制^[13-14]。实验希望从砷导致胰岛 β 细胞凋亡的机制入手,阐明砷对糖尿病的致病机制。

自然界中砷很少以自由状态出现,而是以无机化合物和有机化合物结合的形式出现在环境中。砷化物的化学形式分为无机砷和有机砷,无机砷化物比有机砷化物的毒性大,而三价砷的毒性比五价砷大^[15]。目前为止研究表明砷的毒性是高度依赖于它的化学形式,不同形态的砷毒理学性质差异巨大^[16]。本课题组在以往的研究中发现亚砷酸钠通过溶酶体-线粒体轴诱导胰岛 β 细胞凋亡^[17]。但关于五价有机砷砷酸氢二钠和有机砷二甲基砷酸钠能否诱导胰岛 β 细胞凋亡及其机制的研究均未见报道。因此,实验分别研究两种砷化合物诱导胰岛 β 细胞凋亡的可能机制。

1 材料和方法 Materials and methods

设计: 细胞学实验。

时间及地点: 于2012年5月至2013年5月在大连医科大学辽宁省防治老年退行性疾病天然产物工程实验室完成。

材料:

细胞株: 大鼠胰岛 β 细胞株(INS-1), 购于中国典型培

养物保藏中心(China Center for Type Culture Collection, CCTCC)。

两种砷化物诱导胰岛细胞的凋亡实验相关试剂及仪器:

试剂及仪器	来源
砷酸氢二钠, 二甲基砷酸钠, 2', 7'-二乙氧二氯荧光素	Sigma公司
核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒	南京凯基生物科技发展有限公司
BCA蛋白含量检测试剂盒, SDS-PAGE凝胶配制试剂盒, Hoechst33258染色液	碧云天生物有限公司
PVDF膜	Millipore公司
兔抗小鼠P53多克隆抗体	武汉三鹰生物技术有限公司
兔抗小鼠 β -actin多克隆抗体	SANTA CRUS公司
辣根过氧化物酶标记山羊抗兔IgG	Thermo公司
Annexin V-FITC/PI双染凋亡检测试剂盒, 流式细胞仪	BD公司
CO ₂ 培养箱	FORMA公司
荧光分光光度计	Hitachi公司
荧光显微镜	OLYMPUS公司
凝胶成像系统	UVP公司

方法:

INS-1细胞培养及处理INS-1细胞: 用含有体积分数10%胎牛血清的MEM培养液, 于37 °C且含有体积分数5%CO₂的细胞培养箱中常规培养。参考以往文献的方法^[18-19], 用50, 100, 200 μ mol/L砷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)或100, 200, 400 μ mol/L二甲基砷酸钠($\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)分别处理各组细胞。对照组为未经砷化物处理组细胞。

MTT实验收集对数生长期的INS-1细胞, 分别加入不同剂量的砷酸氢二钠(50, 100, 200 μ mol/L)和二甲基砷酸钠(100, 200, 400 μ mol/L), 于37 °C作用48 h后, 加入MTT溶液, 37 °C孵育4 h, 加入二甲基亚砷(DMSO), 37 °C孵育1 h, 使结晶物充分溶解。用酶标仪在490 nm波长处测量各孔的吸光度值, 并计算细胞存活率^[20]。

细胞存活率 = 染毒组吸光度值 / 对照组吸光度值 \times 100%。

Hoechst 33258染色检测INS-1细胞凋亡: 砷酸氢二钠(50, 100, 200 μ mol/L)、二甲基砷酸钠(100, 200, 400 μ mol/L)分别作用于INS-1细胞48 h。弃去培养液, 向培养板中加入体积分数10%缓冲甲醛固定液, 4 °C固定细胞10 min。PBS

冲洗3次, 加入Hoechst 33258(碧云天生物有限公司)荧光染料, 室温下避光染色10 min。PBS冲洗3次, 在荧光显微镜下观察INS-1细胞核形态变化^[21-22]。

Annexin V-FITC/PI双染流式细胞仪检测INS-1细胞的凋亡: 磷酸氢二钠(50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$)和二甲胍酸钠(100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$)分别作用于INS-1细胞48 h, 收集细胞后, 加入Annexin V-FITC(BD公司)室温下避光孵育15 min, 上机前加入PI溶液室温下避光孵育5 min, 后立即用流式细胞仪分析^[23-24]。

细胞内活性氧的测定: 选用荧光探针DCFH-DA测定INS-1细胞中活性氧水平^[25]。磷酸氢二钠(50, 100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$)和二甲胍酸钠(100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$)分别处理INS-1细胞24 h。收集细胞后, 调节细胞浓度为 $4 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 离心收集细胞, 然后加入终浓度为5 $\mu\text{mol/L}$ 的 DCFH-DA, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 40 min后, 将细胞和上清液一起用荧光分光光度计测定荧光强度, 激发波长485 nm, 发射波长550 nm, 狭缝4 nm^[26]。

Western blot收集处理后的细胞: 磷酸氢二钠(50, 100, 200 $\mu\text{mol/L}$)和二甲胍酸钠(100, 200, 400 $\mu\text{mol/L}$)处理INS-1细胞48 h后, 利用核蛋白和胞浆蛋白提取试剂盒提取胞浆蛋白, 利用BCA蛋白含量检测试剂盒检测胞浆蛋白浓度。胞浆蛋白提取物进行SDS-PAGE凝胶电泳, 转膜后将PVDF膜放入封闭液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭1 h。1:1 000稀释兔抗小鼠P53, β -actin多克隆抗体, 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG二抗37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。ECL发光液避光反应5 min, 在凝胶成像系统中拍照, 用凝胶图像处理系统分析目标条带的灰度值。

主要观察指标: MTT实验观察各组细胞存活率; Hoechst 33258及AV/PI染色观察各组细胞凋亡情况; DCFH染色观察各组细胞内活性氧水平; Western blot观察各组细胞内P53蛋白表达情况。

统计学分析: 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用SPSS 17.0软件进行数据分析, 各组间均数比较采用单因素方差分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果 Results

2.1 两种砷化物对INS-1细胞生存率的影响 两种砷化物处理INS-1细胞48 h后, 与对照组比较, $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (iAs^{5+})和 $\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (DMA^{5+})引起INS-1细胞的存活率降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 且呈剂量依赖性下降(表1)。

2.2 两种砷化物对INS-1细胞凋亡的影响 两种砷化物处理INS-1细胞48 h后, Hoechst 33258染色结果表明对照组INS-1细胞核形态均一无边聚, 胞内染色均匀一致, 形状规则。而随着毒物剂量的增加, iAs^{5+} 和 DMA^{5+} 各处理组细胞边缘渐不平整, 染色变深, 染色质浓集, 荧光增强, 部分染色质出现浓缩状态, 高度凝聚、边缘化, 出现凋亡小体(图1)。

表1 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对INS-1细胞存活率的影响

Table 1 The cell viability of INS-1 cells after the treatment with $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

砷化物	iAs^{5+} ($\mu\text{mol/L}$)	吸光度值	细胞生存率
$\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0	0.20 \pm 0.02	1.00 \pm 0.04
	50	0.17 \pm 0.01	0.82 \pm 0.30 ^a
	100	0.13 \pm 0.02	0.62 \pm 0.50 ^b
	200	0.10 \pm 0.01	0.48 \pm 0.10 ^b
$\text{C}_2\text{H}_6\text{AsNaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0	0.39 \pm 0.02	1.02 \pm 0.10
	100	0.29 \pm 0.02	0.74 \pm 0.40 ^b
	200	0.25 \pm 0.02	0.65 \pm 0.60 ^b
	400	0.20 \pm 0.01	0.50 \pm 0.10 ^b

表注: 与对照组(0 $\mu\text{mol/L}$ 组)相比, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

Annexin V/PI染色结果显示, iAs^{5+} 和 DMA^{5+} 暴露均引起INS-1细胞凋亡。与对照组比较, 200 $\mu\text{mol/L}$ 的 iAs^{5+} 暴露组凋亡细胞显著增多($P < 0.05$)(图2A-E)。100 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMA^{5+} 暴露组凋亡细胞减少($P < 0.05$); 400 $\mu\text{mol/L}$ 的 DMA^{5+} 暴露组凋亡细胞显著增加($P < 0.01$)(图2F-J)。

2.3 两种砷化物对INS-1细胞内活性氧水平的影响 两种砷化物处理INS-1细胞24 h后, 细胞内DCF荧光强度见图3。

iAs^{5+} 和 DMA^{5+} 作用INS-1细胞24 h后, 细胞内活性氧水平显著升高, 并且与 iAs^{5+} 浓度存在剂量依赖关系($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

2.4 两种砷化物对INS-1细胞内P53蛋白表达的影响 iAs^{5+} 作用INS-1细胞48 h后, Western blot检测核内P53蛋白表达, 结果显示随 iAs^{5+} 剂量增加, P53的表达量逐渐增加(图4A)。100, 200 $\mu\text{mol/L}$ iAs^{5+} 处理细胞后, 核内P53蛋白呈剂量依赖性增加($P < 0.05$)。不同浓度 DMA^{5+} 作用INS-1细胞48 h后, 与对照组比较, 染毒组P53蛋白表达差异无显著性意义(图4B)。

3 讨论 Discussion

为探讨不同种类五价砷暴露可能引起INS-1细胞凋亡从而引发糖尿病的机制^[27-28]。实验分别观察了磷酸氢二钠(iAs^{5+})和二甲胍酸钠(DMA^{5+})暴露48 h对INS-1细胞的细胞毒性, MTT实验结果表明, 高剂量暴露 iAs^{5+} ($>50 \mu\text{mol/L}$)、 DMA^{5+} ($>100 \mu\text{mol/L}$)能够降低INS-1的细胞生存率。其结果与以往研究检测各种形态砷对血管内皮细胞和人胚肾细胞相对毒性的结果基本一致^[29-30]。

实验的结果表明高剂量的有机砷和无机砷均诱发了INS-1细胞的凋亡。实验通过流式细胞术试验^[31], 观察到 iAs^{5+} (50-200 $\mu\text{mol/L}$)和 DMA^{5+} (100-400 $\mu\text{mol/L}$)作用于INS-1细胞48 h后, 最高剂量暴露组均有凋亡细胞明显的增多现象, 这一实验结果提示高浓度的 iAs^{5+} 和 DMA^{5+} 暴露使细胞发生凋亡。此外, 实验采用了另一种检测细胞凋亡的方法Hoechst 33258染色法, 用荧光显微镜观察细胞形态, 进一步确定细胞凋亡^[32]。结果显示, 经过 iAs^{5+} 和 DMA^{5+} 作用后的INS-1细胞和对照组相比, 细胞形态存在显著差别。

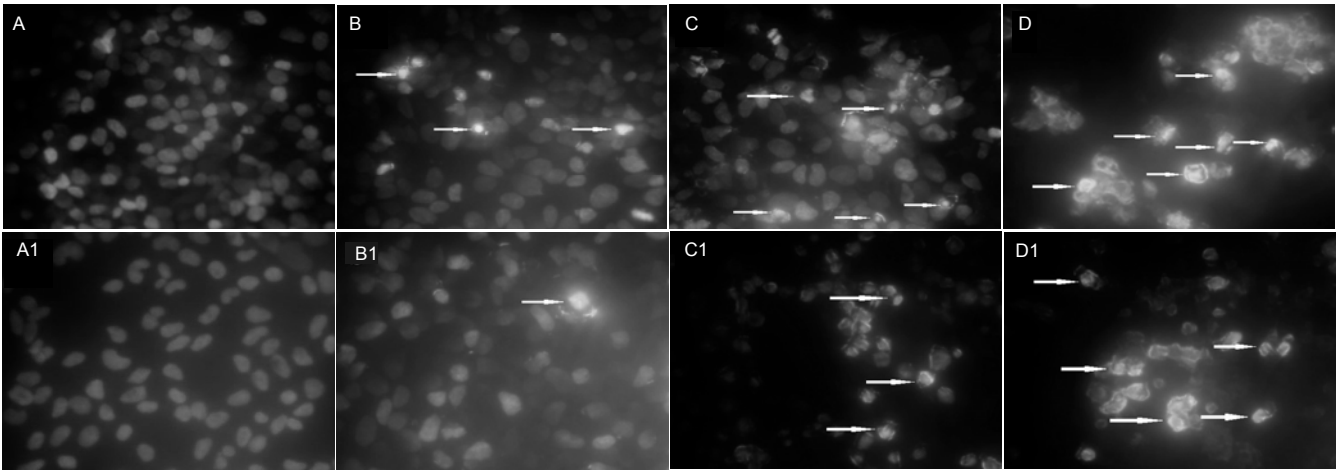


图1 Hoechst 33258 染色法观察 iAs⁵⁺和 DMA⁵⁺暴露对 INS-1 细胞凋亡的影响(×200)

Figure 1 The apoptosis detected by Hoechst33258 staining in iAs⁵⁺- and DMA⁵⁺-treated INS-1 cells (×200)

图注: 图中 A-D 分别为对照组, 50, 100, 200 μmol/L (iAs⁵⁺DMA⁵⁺)。图中 A1-D1 分别为对照组, 100, 200, 400 μmol/L (DMA⁵⁺)。随着毒物剂量的增加, iAs⁵⁺和 DMA⁵⁺各处理组细胞均染色逐渐加深, 荧光增强, 出现凋亡小体(箭头)。

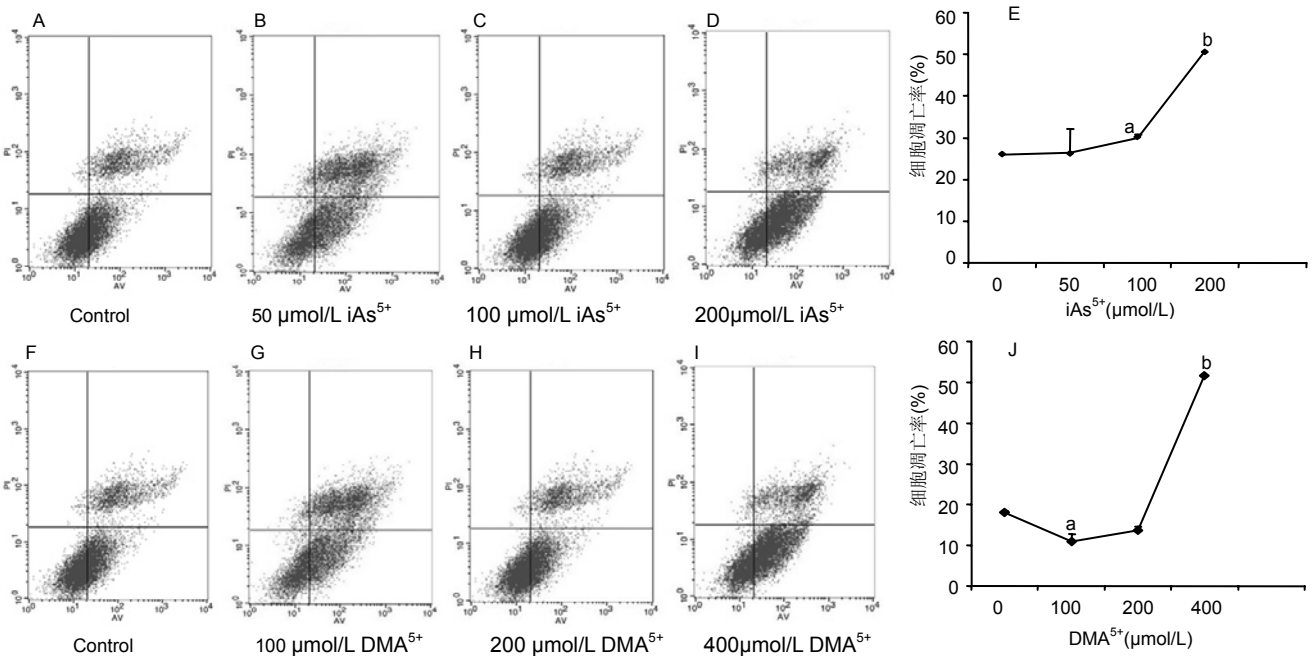


图2 流式细胞仪检测 iAs⁵⁺和 DMA⁵⁺对 INS-1 细胞凋亡的影响

Figure 2 The apoptosis detected by flow cytometry in iAs⁵⁺- and DMA⁵⁺-treated INS-1 cells

图注: 图中 A-D, F-I 分别为对照组, 50, 100, 200 μmol/L iAs⁵⁺和 DMA⁵⁺的流式细胞检测结果。E, J 为 iAs⁵⁺和 DMA⁵⁺干预后凋亡细胞计数结果。与对照组(0 μmol/L 组)比较, ^aP < 0.05, ^bP < 0.01。

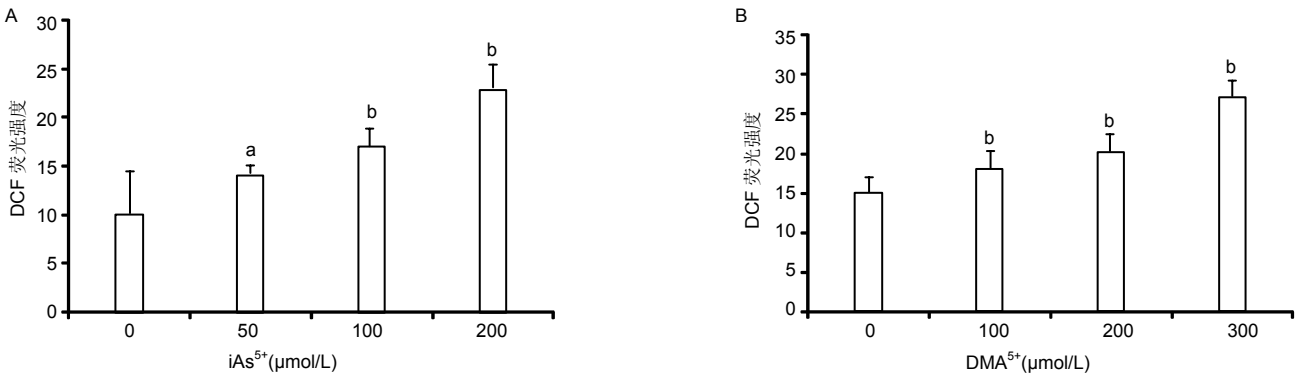


图3 iAs⁵⁺和 DMA⁵⁺对 INS-1 细胞内活性氧水平的影响

Figure 3 The intracellular reactive oxygen species level in iAs⁵⁺- and DMA⁵⁺-treated INS-1 cells

图注: 图中 A, B 为 iAs⁵⁺和 DMA⁵⁺干预后 INS-1 细胞内活性氧水平的变化。与对照组(0 μmol/L 组)比较, ^aP < 0.05, ^bP < 0.01。

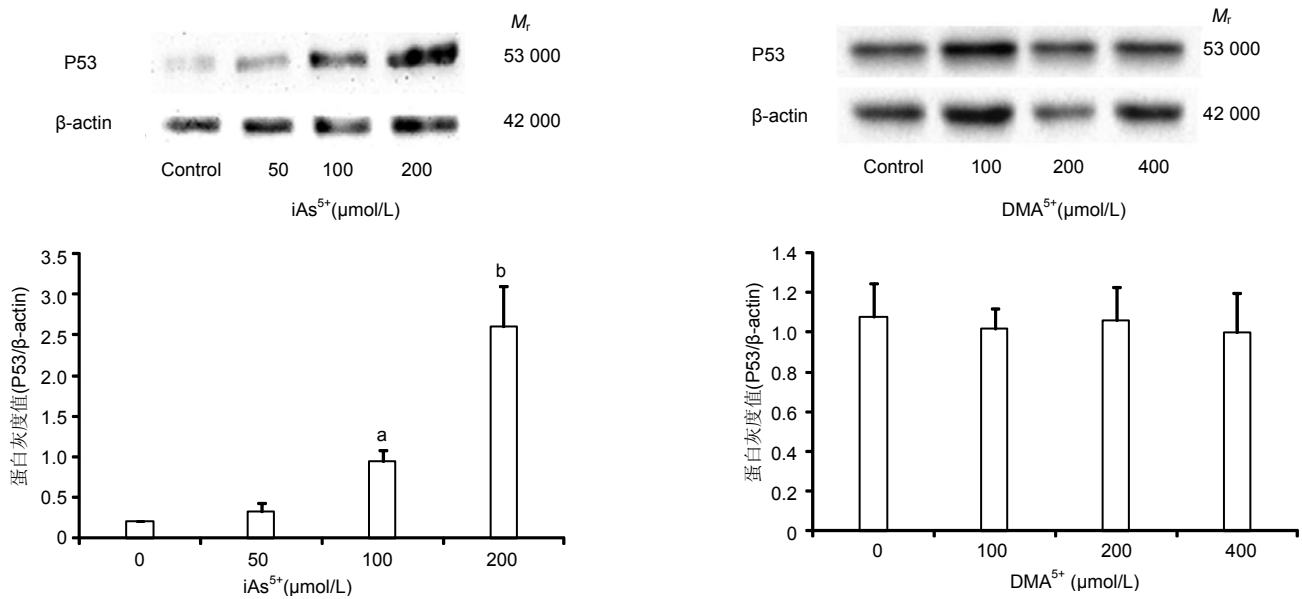


图4 iAs^{5+} 和 DMA^{5+} 对 INS-1 细胞核内 P53 蛋白表达的影响

Figure 4 The expression of P53 protein in iAs^{5+} - and DMA^{5+} -treated INS-1 cells

图注: 图中 A, B 为 iAs^{5+} 和 DMA^{5+} 干预后 INS-1 细胞核内 P53 蛋白的表达。与对照组(0 $\mu mol/L$ 组)比较, ^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ 。

随着药物剂量的增加, 凋亡的细胞在紫外光激发下发射明亮的蓝色荧光, 细胞膜边缘不平整, 细胞核固缩, 不完整, 部分染色质出现浓缩状态, 高度凝聚、边缘化, 细胞核裂解为碎块出现凋亡小体和核碎裂, 并且随着剂量增加而愈发明显。

在众多机制研究中, 砷诱发活性氧自由基产生并导致氧化损伤的学说受到广泛关注, 活性氧能够造成DNA损伤并导致遗传毒性^[33]。活性氧作为细胞调控中的一种信号分子, 可诱导细胞凋亡^[34]。实验小组在前期研究发现亚砷酸钠(iAs^{3+})可以诱发INS-1细胞内活性氧水平的显著升高^[17]。实验结果表明高剂量 iAs^{5+} 和 DMA^{5+} 暴露24 h均可以诱发INS-1细胞内活性氧水平的显著升高。结果证实五价无机砷及有机砷通过上调细胞内活性氧水平诱导INS-1细胞的凋亡。二甲基砷能与氧分子反应生成二甲基砷自由基和超氧阴离子自由基(O_2^-), 之后加入另一个分子氧, 从而产生二甲基砷过氧自由基^[35]。无机砷化合物本身发生氧化还原反应能产生超氧阴离子(O_2^-)、羟基自由基(OH)等活性氧^[36], 如亚砷酸盐氧化成砷酸盐的过程中会产生 H_2O_2 。现在普遍接受的砷的代谢途径是, 无机砷经生物消化吸收后通过一系列代谢过程被转化, iAs^{3+} 的氧化甲基化与 iAs^{5+} 的还原反应交替进行。 iAs^{5+} 在还原酶的作用下被还原成相对应的 iAs^{3+} , 再由 iAs^{3+} 甲基化为MMA和DMA形式排出。所以无机砷诱发的INS-1细胞氧化应激是无机砷化合物本身还是进一步甲基化代谢生成的活性物质诱发的氧化应激起主要作用还有待进一步探讨。

作为一个重要的抑癌基因, P53调控着细胞周期和凋亡信号通路, 与细胞凋亡的发生密切相关^[37]。在实验中, 分别给予砷剂48 h后, 用Western blot检测发现 iAs^{5+} 作用后的INS-1细胞核内P53蛋白表达增多, 而 DMA^{5+} 作用后的

INS-1细胞核内P53蛋白表达无明显变化。各种细胞应激如DNA损伤、组织缺氧和氧化应激等使P53转录后通过乙酰化, 磷酸化和甲基化等被活化^[38]。活性氧还可上调P53基因的表达, 使DNA的合成无法从G₁期进入S期, 抑制细胞生长, 如果细胞试图越过分裂障碍, 则会激活自杀机制而导致凋亡^[39]。实验结果表明, iAs^{5+} 作用后产生活性氧, 可导致细胞DNA损伤, 激活P53蛋白的表达, 诱导细胞发生凋亡; 而 DMA^{5+} 虽然诱导活性氧升高及凋亡, 但并未影响P53蛋白的表达, 说明 DMA^{5+} 可能通过其他凋亡因子来实现对细胞凋亡的诱导。这一实验结果差异显示 iAs^{5+} 在INS-1细胞内可能不是通过一般甲基化代谢为DMA而产生活性氧, 提示 iAs^{5+} 与 DMA^{5+} 在胰岛细胞中代谢不同, 诱导胰岛细胞凋亡的作用机制也不相同。

大量的研究表明胰岛 β 细胞的损伤或凋亡对糖尿病的发生起着至关重要的作用^[40], 但砷导致胰岛 β 细胞凋亡机制比较复杂, 尚不明确。实验表明, 五价无机砷和甲基化砷都能诱发氧化应激, 可见氧化应激是砷化物普遍存在的致病机制。砷化物的毒性大小主要取决于砷的价态、甲基化程度、所带的电荷和与靶分子活性部位的相互作用等。不同砷化物在体内代谢途径不同, 其导致胰岛 β 细胞凋亡的途径也可能不同, 砷化物致胰岛细胞凋亡而引起糖尿病的机制仍有待于进一步研究。

作者贡献: 全部作者均参与了实验设计、实施和评估。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: P53—作为一个重要的抑癌基因, 调控着细胞周期和凋亡信号通路。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Yang W, Lu J, Weng J, et al. Prevalence of diabetes among men and women in China. *N Engl J Med.* 2010;362(12):1090-1101.
- [2] Sciandrello G, Barbaro R, Caradonna F, et al. Early induction of genetic instability and apoptosis by arsenic in cultured Chinese hamster cells. *Mutagenesis.* 2002;17(2):99-103.
- [3] 孙贵范. 深入研究慢性砷中毒的分子作用机制[J]. 中国地方病学杂志, 2004, 23(1): 1-2.
- [4] 洪峰. 无机砷的肾脏损伤作用研究进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2002, 29(1): 7-30.
- [5] Wang Y, Zhao FD, Liao YJ, et al. Arsenic exposure and glutamate-induced gliotransmitter release from astrocytes. *Neural Regen Res.* 2012; 7(31): 2439-2445.
- [6] Das AK, Sahu R, Dua TK, et al. Arsenic-induced myocardial injury: protective role of *Corchorus olitorius* leaves. *Food Chem Toxicol.* 2010;48(5):1210-1217.
- [7] Tseng CH, Tai TY, Chong CK, et al. Long-term arsenic exposure and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus: a cohort study in arseniasis hyperendemic villages in Taiwan. *Environ Health Perspect.* 2000;108(9):847-851.
- [8] Chui HF, Chang CC, Tsai SS, et al. Does arsenic exposure increase the risk for diabetes mellitus. *J Occup Environ Med.* 2006;48(1):63-67.
- [9] Wang JP, Wang SL, Lin Q, et al. Association of arsenic and kidney dysfunction in people with diabetes and validation of its effects in rats. *Environ Int.* 2009;35(3):507-511.
- [10] Lam DW, Leroith D. The worldwide diabetes epidemic. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2012;19(2):93-96.
- [11] Cheng XB, Hsieh YT, Tu ST, et al. Obesity and low target attainment rates in Chinese with type 2 diabetes. *Eur J Inter Med.* 2012;23(4):101-105.
- [12] Navas-Acien A, Silbergeld EK, Pastor-Barriuso R, et al. Arsenic exposure and prevalence of type 2 diabetes in US adults. *JAMA.* 2008;300(7):814-822.
- [13] Wang JP, Wang SL, Lin Q, et al. Association of arsenic and kidney dysfunction in people with diabetes and validation of its effects in rats. *Environ Int.* 2009;35(3):507-511.
- [14] Tseng CH. Arsenic Exposure and Diabetes Mellitus in the United. *JAMA.* 2008;300(23):2728.
- [15] Gong Z, Lu X, Ma M, et al. Arsenic speciation analysis. *Talanta.* 2002;58(1):77-96.
- [16] 彭珊苗, 蔡原. 砷的生物学指标研究进展[J]. 中国工业医学杂志, 2006, 19(3): 168-171.
- [17] Pan X, Jiang L, Zhong L, et al. Arsenic induces apoptosis by the lysosomal-mitochondrial pathway in INS-1 cells. *Environ Toxicol.* 2014[Epub ahead of print].
- [18] Martín-Pardillos A, Sosa C, Sorribas V. Arsenic increases Pi-mediated vascular calcification and induces premature senescence in vascular smooth muscle cells. *Toxicol Sci.* 2013;131(2):641-653.
- [19] Calatayud M, Devesa V, Vélez D. Differential toxicity and gene expression in Caco-2 cells exposed to arsenic species. *Toxicol Lett.* 2013;218(1):70-80.
- [20] Ding H, Shi J, Wang Y, et al. Neferine inhibits cultured hepatic stellate cell activation and facilitates apoptosis. *Eur J Pharmacol.* 2011;650(1):163-169.
- [21] Ninsontia C, Pongjit K, Chaotham C, et al. Silymarin selectively protects human renal cells from cisplatin-induced cell death. *Pharm Biol.* 2011;49(10):1082-1090.
- [22] Wongtongtair S, Chanvorachote P, Hutamekalin P, et al. Barakol-induced apoptosis in P19 cells through generation of reactive oxygen species and activation of caspase-9. *Ethnopharmacol.* 2011;137(2):971-978.
- [23] Bedner E, Li X, Gorczyca W, et al. Analysis of apoptosis by laser scanning cytometry. *Cytometry.* 1999;35(3):181-195.
- [24] Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods.* 2000;243(1): 167-190.
- [25] LeBel CP, Ischiropoulos H, Bondy SC. Evaluation of the probe 2',7'-dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. *Chem Res Toxicol.* 1992;5(2):227-231.
- [26] Sohn JH, Han KL, Lee SH, et al. Protective effects of panduratin A against oxidative damage of tert-butylhydroperoxide in human HepG2 cells. *Biol Pharm Bull.* 2005;28(6):1083-1086.
- [27] IARC. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk to humans. Some Drinking-Water Disinfectants and Contaminants, Including arsenic. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum. 2004;84:1-477.
- [28] 陆景坤, 陈朝军, 翟小涵, 等. 不同砷化合物对人皮肤成纤维细胞系的毒性研究[J]. 中国地方病防治杂志, 2011, 26(5): 328-331.
- [29] 李冰, 陆春伟, 孙贵范. 不同砷化合物对血管内皮细胞毒性的研究[J]. 卫生研究, 2006, 35(6): 700-702.
- [30] 陆景坤, 陈朝军, 刘小雷. 不同砷化合物对人胚肾细胞系HEK-293细胞的毒性研究[J]. 环境与健康杂志, 2011, 28(1): 25-28.
- [31] Afanasyev VN, Korol BA, Matylevich NP, et al. The use of flow cytometry for the investigation of cell death. *Cytometry.* 1993;14(6):603-609.
- [32] 徐跃飞, 任凤, 赵宝昌. Adinbitor对人胃癌MGC803细胞增殖及凋亡作用[J]. 实用癌症杂志, 2009, 24(3): 233-236.
- [33] Epe B. Genotoxicity of singlet oxygen. *Chem Biol Interact.* 1991;80(3):239-260.
- [34] Martindale JL, Holbrook NJ. Cellular response to oxidative stresses: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol.* 2002;192(1):1-15.
- [35] Yamanaka K, Hoshino M, Okamoto M, et al. Induction of DNA damage by dimethylarsine, a metabolite of inorganic, is for the major part likely due to its peroxy radical. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;168(1):58-64.
- [36] Kitchin KT. Recent advances in arsenic carcinogenesis: Modes of action, animal model systems, and methylated arsenic metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001;172(3): 249-261.
- [37] Pietsch EC, Sykes SM, McMahon SB, et al. The P53 family and programmed cell death. *Oncogene.* 2008;27(50):6507-6521.
- [38] 杨从容, 王雅棣. 活性氧、锰超氧化物歧化酶和P53的相互作用及对肿瘤的影响[J]. 癌变·畸变·突变, 2011, 23(3): 238-241.
- [39] 李玉祥, 罗小平, 廖玲洁, 等. 高氧对新生大鼠肺caspase-3和P53基因表达及肺细胞凋亡的影响[J]. 中华儿科杂志, 2005, 43(8): 585-590.
- [40] Diaz-Villasenor A, Sanchez-Soto MC, Cebrian ME. Sodium arsenite impairs insulin secretion and transcription in pancreatic beta-cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006;214(1): 30-34.