

中国图书资料分类号： R741
密 级： 公开

学校代码： 10679
学 号： 20202015060027



大理大学
DALI UNIVERSITY

硕士学位论文

无机砷通过上调 TUG1 的表达激活 p53 通路促进人类支气管
上皮细胞的凋亡

**Inorganic arsenic-mediated up regulation of TUG1 promoted
apoptosis in human bronchial epithelial by activating the p53
signaling pathway**

学 院	公共卫生学院
专 业	公共卫生
学位类别	专业学位
研究方向	职业病流行病学
论文作者	陈倩
指导教师	文卫华 主任医师
答辩日期	2023 年 5 月 29 日

目 录

前言.....	1
材料与方法.....	3
1. 研究对象.....	3
2. 样品的保存.....	3
3. 细胞实验.....	4
4. 实验试剂和器材.....	5
5. 实验方法.....	9
6. Western Blotting 实验.....	14
7. 统计学分析.....	15
结果.....	16
1. 研究人群一般情况.....	16
2. 尿中砷和砷代谢物水平和甲基化指数	16
3. 外周血淋巴细胞 TUG1 mRNA 表达.....	17
4. 各形态砷与 TUG1 mRNA 表达的相关性.....	18
5. 砷甲基化指数与 TUG1 mRNA 表达水平的关系.....	19
6. 砷对 16HBE 细胞中 TUG1 mRNA 表达的影响.....	19
7. 砷对 16HBE 细胞活力的影响	21
8. 砷对 16HBE 细胞凋亡的影响	22
9. 敲低 TUG1 表达降低 16HBE 细胞的存活率和增加砷诱导的细胞凋亡	24
10. TUG1 敲低后下游基因的变化	26
讨论.....	28
结论.....	31
展望与不足.....	31
参考文献.....	32
附录.....	36
综述 砷与 circRNA 的研究进展	37
参考文献.....	42
该研究基金支持	45

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
AP1	adaptor protein1	衔接蛋白 1
DMA	Dimethylarsinic acid	二甲基胂酸
16HBE	Human bronchial epithelial cells	人支气管上皮细胞
iAs	Inorganic arsenic	无机砷
LncRNA	Long non-coding RNA	长链非编码 RNA
MMA	Methanearsonic acid	一甲基胂酸
mRNA	Messenger ribonucleic acid	信使核糖核酸
NaAsO ₂	Sodium arsenite	亚砷酸钠
OD	Optical density	光密度值
PMI	Primary methylation index	一级甲基化指数
PBS	Phosphate buffered solution	磷酸盐缓冲液
PI	Propidium iodid	碘化丙啶
qRT-PCR	Real-time Quantitative PCR	实时荧光定量核酸扩增检测
siRNA	Small interfering RNA	小干扰 RNA
SMI	Secondary methylation index	二级甲基化指数
tAs	Total arsenic	总砷
TUG1	taurine upregulated gene 1	牛磺酸上调基因 1

摘要

无机砷通过上调 TUG1 的表达激活 p53 通路促进人类支气管上皮细胞的凋亡

目的

砷及其化合物被国际癌症研究所、美国环保局等权威机构列为人类致癌物。本研究通过检测砷暴露人群尿液中砷元素含量及形态，分析其体内 TUG1 基因表达水平，分析不同尿砷化合物中砷元素的分布规律。探究人类正常肺上皮细胞系 16HBE 暴露于不同浓度的砷后，TUG1 的变化情况，以及砷的代谢产物对 TUG1 基因表达的影响。利用 Rfect 敲低 TUG1 后，观察 16HBE 细胞系在无机砷诱导下的凋亡情况；进一步探索在 TUG1 对 16HBE 细胞增殖和凋亡的作用机制，为砷致癌的分子机制以及关于 TUG1 的功能提供理论支持。

方法

在云南省某高污染砷霜厂抽取 74 名砷暴露工人作为砷暴露组，在该地远离工厂 ≥ 10 km 处选择 25 名在该地生活超过一年的人作为对照组，采用问卷调查的方法，参与者们额外提供 10.0 mL 的晨尿液样本和 5.0 mL 的静脉血。研究对象尿样中 iAs 和它的代谢产物 MMA 和 DMA 含量通过氢化物发生—超低温捕集—原子吸收分光光度计来测量。提取外周血 RNA 逆转录，利用 qRT-PCR 检测砷暴露人群 TUG1 mRNA 表达水平。进一步分析 TUG1 基因表达和砷暴露的相关性，得出砷暴露和 TUG1 基因表达之间关系的统计学特征，并通过分析砷暴露与 TUG1 基因表达之间的关系，并对 TUG1 表达与 tAs、iAs、MMA、DMA 的关系进行了初步研究。针对 TUG1 设计特异性沉默片段转染细胞，使细胞内 TUG1 在 16HBE 细胞中的表达量降低，采用 Hoechst/PI 双色实验以及 MTS 实验观察转染细胞的活力和凋亡情况。通过 Western Blotting 实验以确定 TUG1 低表达后，细胞凋亡基因表达，并探讨其在体内增殖和凋亡过程中的机制。

结果

1. 砷暴露组中的 iAs、MMA、DMA 浓度以及 iAs% 和 MMA% 均显著升高，而 DMA%，PMI 和 SMI 低于对照组。

2. 砷暴露人群外周血淋巴细胞 TUG1 mRNA 表达量和对照组相比, 显著升高。且发现研究人群中 TUG1 mRNA 表达量与尿液中的 iAs、MMA、DMA 和 tAs 含量呈正相关关系。

3. 细胞染毒实验发现, 砷染毒 16HBE 细胞的 TUG1 mRNA 表达量显著增加, 呈现剂量依赖性。而砷的代谢物 MMA 和 DMA 对诱导 TUG1 mRNA 表达量显著低于 iAs。

4. TUG1 沉默后, 16HBE 细胞的细胞活力显著降低, 并且加砷处理后细胞活力降低程度较未加砷处理的细胞更加显著。TUG1 沉默后, 16HBE 细胞的凋亡显著增加。

5. 敲低 TUG1 的表达, 通过 Western blotting 实验发现 16HBE 细胞中的 MDM2、FAS、BCL2、Caspase7 以及 p53 的蛋白表达量上升, 且 p53 的磷酸化位点 (Ser392) 也上升。

结论

1. 职业砷暴露人群中体内的砷及其化合物浓度显著升高, 且砷暴露人群中 TUG1 表达量比对照组高。

2. 砷暴露诱导 16HBE 细胞中的 TUG1 表达, 而砷的代谢产物 MMA 和 DMA 诱导 TUG1 的异常表达显著低于同一浓度的无机砷。

3. 沉默 TUG1 显著抑制了 16HBE 细胞的细胞活力并且促进了细胞的凋亡, TUG1 低表达增强了 p53 (Ser392) 位点磷酸化, 主要以 p53 通路的凋亡通路, 上调了 FAS、MDM2、BCL2 的蛋白表达, 激活了 Caspase7 来促进细胞凋亡。

关键词: TUG1; 细胞凋亡; 砷; DMA; p53

ABSTRACT

Inorganic arsenic-mediated upregulation of TUG1 promoted apoptosis in human bronchial epithelial by activating the p53 signaling pathway

Objective

Arsenic and its compounds have been classified as human carcinogens by the International Agency for Research on Cancer and the U.S. Environmental Protection Agency. In this study, we analyzed the distribution pattern of arsenic in different urinary arsenic compounds by detecting the content and morphology of arsenic elements in the urine of arsenic-exposed people and analyzing the expression level of TUG1 gene in their bodies. To investigate the changes of TUG1 in human normal lung epithelial cell line 16HBE after exposure to different concentrations of arsenic, and the effects of arsenic metabolites on TUG1 gene expression. To observe the apoptosis of 16HBE cells induced by inorganic arsenic after TUG1 knockdown using Rfect; to further explore the mechanism of action in TUG1 on proliferation and apoptosis of 16HBE cells, and to provide theoretical support for the molecular mechanism of arsenic carcinogenesis and about the function of TUG1.

Methods

Seventy-four arsenic-exposed workers at a highly contaminated arsenic plant in Yunnan Province were selected as the arsenic-exposed group, and 25 people who had lived at the site for more than one year were selected as the control group at a location ≥ 10 km away from the plant, using a questionnaire in which participants provided an additional 10.0 mL of morning urine sample and 5.0 mL of venous blood. The levels of iAs and its metabolites MMA and DMA in the urine samples of the study subjects were measured by hydride generation-ultra-low temperature trapping-atomic absorption spectrophotometry. Peripheral blood RNA was extracted for reverse transcription, and TUG1 mRNA expression levels in the arsenic-exposed population were detected using qRT-PCR. The correlation between TUG1 gene expression and arsenic exposure was further analyzed, and the statistical characteristics of the relationship between arsenic exposure and TUG1 gene expression were derived. Specific

silencing fragments were designed for TUG1 to transfect cells to reduce intracellular TUG1 expression in 16HBE cells, and the viability and apoptosis of transfected cells were observed by Hoechst/PI two-color assay as well as MTS assay. Western Blotting assay was performed to determine the apoptotic gene expression after low expression of TUG1 and to explore its mechanism in the proliferation and apoptosis process in vivo.

Results

1. iAs, MMA, and DMA concentrations as well as iAs% and MMA% were significantly elevated in the arsenic-exposed group, while DMA%, PMI, and SMI were lower than those in the control group.

2. TUG1 mRNA expression in peripheral blood lymphocytes was significantly elevated in the arsenic-exposed population compared with the control group. And TUG1 mRNA expression was found to be positively correlated with iAs, MMA, DMA and tAs levels in urine in the study population.

3. Cell staining experiments revealed that TUG1 mRNA expression was significantly increased in arsenic-stained 16HBE cells in a dose-dependent manner. And the metabolites of arsenic, MMA and DMA, were significantly lower than iAs in inducing TUG1 mRNA expression.

4. cell viability of 16HBE cells was significantly reduced after TUG1 silencing, and the degree of reduction in cell viability was more significant after arsenic treatment than that of cells without arsenic treatment. apoptosis of 16HBE cells was significantly increased after TUG1 silencing.

5. knocking down the expression of TUG1, the protein expression of MDM2, Fas, BCL2, Caspase7 and p53 were found to be increased in 16HBE cells by Western blotting assay, and p53 phosphorylation sites (Ser392) was also increased.

Conclusion

1. The concentrations of arsenic and its compounds were significantly higher in the occupational arsenic-exposed population, and the expression of TUG1 was higher in the arsenic-exposed population than in the control group.

2. Arsenic exposure induced TUG1 expression in 16HBE cells, while the arsenic metabolites MMA and DMA induced a significantly lower abnormal expression of TUG1 than the same concentration of inorganic arsenic.

3. Silencing of TUG1 significantly inhibited cell viability and promoted apoptosis in 16HBE cells. Low expression of TUG1 enhanced phosphorylation of the p53(Ser392) site, the apoptotic pathway mainly by the p53 pathway, upregulated protein expression of FAS, MDM2, and BCL2, and activated Caspase7 to promote apoptosis.

Key Words: TUG1; apoptosis; arsenic; dimethylarsinic acid (DMA); p53

前言

砷属于类金属元素^[1]，常出现于土壤、空气和水中，是环境中常见污染物之一，被国际癌症研究机构（IARC）列为人类的第一类致癌物质^[2]。许多研究报告表明长期处于砷环境暴露中会增加多种疾病的风险^[3]，包括各种类型的肿瘤^[4]、糖尿病、心血管疾病等等。并且研究发现，无机砷（iAs）是一种强有力的人类致癌物和毒物^[5]，已经影响了全球约 1.6 亿人口的健康^[6]，主要通过饮用水和工业排放产生^[7]，长期接触砷可能会导致多个器官的癌变^[8]。虽然一些参与砷致癌的分子已经被确定，例如，众多研究发现砷在体内外都能激活 AP-1，而 AP-1 是一种促进肿瘤发生发展的中介物^[9,10]。但其涉及的调节机制未知。

LncRNAs（长链非编码 RNA）是一种长达 200 个核苷酸以上的 RNA，缺少蛋白质编码能力^[11]。越来越多的研究表明，LncRNAs 可以通过调控基因转录、转录后修饰以及表观遗传等方式等发挥作用^[12]，在细胞发育、分化、凋亡等多种生物过程具有重要意义^[13]。LncRNAs 贯穿了生物生长发育的整个过程，在癌症的发生发展过程扮演重要角色。LncRNA-CCAT（结肠癌相关转录因子 1）^[14]、LncRNA-ATB^[15] 和 LncRNA-HOTAIR^[16] 在结肠癌中表达均上升，促进结肠癌细胞的增殖和侵袭。最近的研究显示 LncRNAs 在环境污染物产生的毒理学反应对人类疾病的影响中扮演着重要角色，这些疾病包括癌症、心血管疾病、代谢疾病等^[17]。并且越来越多的证据表明，常见的环境污染物（如镉，砷等）暴露会使人体内的 LncRNAs 的表达发生失调，而 LncRNAs 的失调可能参与了环境污染物致癌的过程。例如，肝细胞中 LncRNA MALAT 基因被发现参与了砷诱导肝细胞癌变的过程，并且在肝癌细胞中表达升高^[18]。人支气管上皮细胞中的 LncRNA MEG3 在暴露于镉后，表达下降，并且通过促进细胞周期和细胞凋亡来促进正常细胞向癌细胞的转化^[19]。尽管众多研究表明 LncRNAs 与砷诱导肿瘤发生发展有关，但关于 LncRNA-TUG1 的改变与砷诱导恶性肿瘤的关系及其机制未见报道。

LncRNA-TUG1（牛磺酸上调基因 1）位于人类染色体 22q12.2 上，是一种长度只有 7.2kb 的 LncRNA^[20]，并且在哺乳动物中保持高度保守^[21]。在各种细胞中起着不可缺少的作用，尤其在细胞致癌的过程中发挥着非常重要的作用^[22]，其基因表达异常与多种癌症的发生与发展有关^[23]。例如，LncRNA-TUG1 在人类非小细胞癌中表达增加，通过 EZH2 调控 LIMK2b 促进癌细胞的生长以及增加其化疗耐药性^[24]。

虽然 LncRNA-TUG1 的失调被认为是参与多种癌症的重要机制^[25]，但尚未有关于 LncRNA-TUG1 在砷诱导细胞损伤中的作用的相关报道。结合 LncRNA-TUG1 在多种生物过程中的重要作用，探究一下 LncRNA-TUG1 是否在砷诱导的细胞毒性和致癌性中发挥生物学功能，以及它参与的分子机制。

材料与方法

1. 研究对象

1.1 砷暴露和对照人群的选择

本研究于 2018 年 10 月在云南省某高污染砷霜厂中进行，在该工厂中随机抽取 74 名一线作业工人作为暴露组，其纳入标准为：工作时间 ≥ 3 个月，年龄在 20-60 周岁，没有皮肤破损、呼吸系统、神经系统等疾病以及肿瘤。而对照组的 25 人则选择生活在该地远离砷工厂超过 10 公里以及没有其他可能直接或间接导致机体砷负荷显著升高的地方，年龄在 20-60 周岁，且在当地居住时间超过 1 年，近 3 个月无食用过海鲜和/或使用除草剂的历史。为最大限度地避免内在和外在的混杂因素，所有受试者均未服用任何药物。本次调查形式采用结构式调查问卷，所有人在参与前均签署知情同意，并提供有关其年龄、性别、受教育程度、吸烟和家庭病史的统计信息。此外，参与者同意提供 10.0 mL 的尿液样本和 5.0 mL 的静脉血。本研究方案经云南省疾病预防控制中心审核批准。

2. 样品的保存

2.1 尿液样本

将收集来的尿液样本储存于 50.0 mL 离心管中，4°C 冰盒下保存，在 8 小时内送至云南省疾控中心实验室，-20°C 冰箱保存，完成尿砷化合物含量的测定。

2.2 外周血样

外周血经乙二胺四乙酸（5.0 mL）抗凝后，取 3.0 mL 样品分离出淋巴细胞，按照试剂商提供的试剂说明书进行操作，提取外周血淋巴细胞总 RNA，对淋巴细胞总 RNA 进行逆转录成 cDNA，放入 -80°C 保存。

3. 细胞实验

3.1 细胞株：肺上皮细胞系 16HBE 购自中国科学院动物研究中心。

3.2 MEM 完全培养基的配制

把胎牛血清（55.0 mL）与青链霉素（5.0 mL）的混合液放入 MEM（500.0 mL）培养基中，用手上下颠倒，混匀，置于 4℃的冰箱中。

3.3 细胞冻存

冻存实验开始前 30 min，将-20℃的胰酶置于 37℃恒温水浴锅中，利用紫外线灯杀菌 15 min，从细胞培养箱中取出 16HBE 细胞，于显微镜下观察，细胞长至约 90%，弃 T25 瓶内的废液，加入 1.0 mL PBS 进行润洗，润洗后再加入 0.5 mL 胰酶于 37℃恒温培养箱消化 6 min，观察到细胞大量脱落，加入 2.0 mL 细胞培养液终止消化反应，用巴氏吸管吹打培养瓶内的细胞混合液，使细胞在细胞瓶中均匀地分布，移至离心管，800 rpm 低速离心 5 min 后，弃上清液，向离心管冻存液（1.0 mL）轻轻吹打使细胞充分混匀，随后将细胞移至冻存管中，放入-20℃冰箱中冻存 2 h，最后将其转移到-80℃冰箱中冻存 24 h 后，移入液氮罐中保存以备后续实验使用。

3.4 细胞复苏

- （1）取出冻存的细胞置于 37℃水浴锅中快速解冻。
- （2）用 75%酒精棉球擦拭冻存管外部，将细胞混合液转移到含有 4.0 mL 的 MEM 细胞完全培养基的 T25 瓶中。
- （3）显微镜下观察细胞，细胞贴壁后生长状态良好，及时更换新鲜培养液。

3.5 细胞传代

- （1）显微镜下观察细胞，待细胞铺满 T25 瓶 90%时，弃原有培养基。
- （2）用 1.0 mL PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次，弃洗涤液。
- （3）加 0.5 mL 于 37℃水浴锅预热过的胰酶进入 T25 瓶中润洗，用巴氏滴管吸出后，再加入 1.0 mL 胰酶，放入 37℃恒温箱中消化 6 min。侧边轻拍 T25 培养瓶，观察到细胞大片脱落。
- （4）加入 8.0 mL MEM 细胞完全培养基终止胰酶消化。

4. 实验试剂和器材

4.1 实验试剂（表 1）

表 1 主要实验试剂

试剂	生产厂家
淋巴细胞分离液	天津市灏洋生物制品科技有限公司
RNA Later	Thermo Scientific 生物有限公司
RNA 逆转录试剂盒	Roche 生物有限公司
荧光 PCR 试剂盒	美国 INVITROOGE 公司
Trizol	Invitrogen 生物有限公司
无水乙醇	山东普利斯生物有限公司
75%乙醇、97%乙醇	四川西陇生物有限公司
DEPC 处理水	上海生工生物工程有限公司
实时荧光定量 PCR 试剂盒	上海碧云天生物有限公司
胎牛血清（FBS）	康为生物科技有限公司
青链霉素混合液（100×）	华越洋生物科技有限公司
MEM 培养液	Corning 生物有限公司
胰蛋白酶-EDTA 消化液	上海碧云天生物有限公司
磷酸盐缓冲液（PBS）	上海碧云天生物有限公司
NaAsO ₂ （纯度≤99%）	成都西亚试剂有限公司
一甲基砷酸钠（纯度≤99%）	成都西亚试剂有限公司
二甲基砷酸钠（纯度≤99%）	成都西亚试剂有限公司
Rfect 细胞株小核酸转染试剂	常州百代生物公司
siRNAs 片段	上海吉玛生物公司
无水乙醇	生工生物公司
三氯甲烷	科密欧化学试剂有限公司
逆转录试剂盒	康为世纪生物科技有限公司
MTS 试剂	MCE 生物有限公司
细胞凋亡坏死试剂盒	上海碧云天生物有限公司
Q-PCR 引物	上海杰瑞生物工程有限公司
逆转录试剂盒	Takara 生物有限公司

BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X)

上海碧云天生物有限公司

表 1 主要实验试剂 (续表)

试剂	生产厂家
Forward and Reverse Primer Mix	上海碧云天生物有限公司
PAGE 凝胶快速制备试剂盒	Bio-Rad 生物有限公司
BeyoColor™ 彩色预染蛋白分子量标准	Bio-Rad 生物有限公司
IP 细胞裂解液	上海碧云天生物有限公司
细胞浆细胞核裂解试剂盒	上海碧云天生物有限公司
蛋白酶抑制剂混合物	美伦生物有限公司
BCA 蛋白浓度检测试剂盒	上海碧云天生物有限公司
蛋白上样缓冲液 (4×)	Bio-Rad 生物有限公司
过硫酸铵 (APS)	索莱宝生物有限公司
四甲基乙二胺 (TEMED)	索莱宝生物有限公司
Tween20	美伦生物有限公司
氯化钠	美伦生物有限公司
蛋白磷酸酶抑制剂复合物 I	美伦生物有限公司
十二烷基硫酸钠 SDS	美伦生物有限公司
PVDF 膜	Bio-Rad 生物有限公司
甘氨酸	美伦生物有限公司
甲醇	山东滨州新天阳化工有限公司
无蛋白快速封闭液 (1×)	雅酶生物科技有限公司
Tris	美伦生物有限公司
ECL 化学发光液	上海碧云天生物有限公司
Quick™ Western 一抗/二抗稀释液	上海碧云天生物有限公司
p53 多克隆抗体	杭州华安生物科技有限公司
p53 (Ser392) 多克隆抗体	杭州华安生物科技有限公司
MDM2 多克隆抗体	Santa cruz 生物有限公司
BCL2 多克隆抗体	Protein Tech 生物有限公司
β-actin 多克隆抗体	Protein Tech 生物公司
FAS 多克隆抗体	Protein Tech 生物公司
Casepase-7 抗体	Protein Tech 生物公司
山羊抗兔 IgG-HRP 抗体	杭州华安生物科技有限公司

山羊抗鼠 IgG-HRP 抗体
HO/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒

Protein Tech 生物公司
贝博生物科技有限公司

4.2 实验器材 (表 2)

表 2 实验器材

仪器	生产厂家
-80°C低温冰箱	Thermo Scientific 公司
4°C, -20°C冰箱	青岛海尔有限公司
半干转膜仪	Bio-Rad 公司
移液器及吸头	Eppendorf 公司
冻存管、离心管、EP 管	康为世纪有限公司
乙二胺四乙酸抗凝管	三力医学科技公司
微量移液仪	Eppendorf 公司
实时荧光定量 PCR 仪	Roche 公司
掌上离心机	大龙仪器有限公司
高速低温离心机	Thermo Scientific 公司
普通冰箱	青岛海尔有限公司
酶标仪	Bio Tek 公司
砷分析用氢化物发生器	Shimadzu 公司
原子吸收分光光度计	Shimadzu 公司
电子天平	华兴有限公司
细胞计数板	长沙医疗机械厂
超净工作台	济南鑫贝公司
细胞培养 6、12、96 孔板	Coning 有限公司
恒温 CO ₂ 细胞培养箱	Thermo Scientetic 公司
倒置显微镜	Olympus 有限公司
半干转膜仪	Bio-Rad 有限公司
Western blot 成像系统仪	上海嘉鹏科技有限公司
纯水器	Millipore 有限公司
核酸蛋白测定仪	北京百泰克有限公司
恒温水浴锅	上海现代环境有限公司

5. 实验方法

5.1 尿砷含量测定

将从冰箱中取出的尿样样本置于室温下解冻，加入超纯 Milli-Q 水稀释，2 mol/L 氢氧化钠溶液加入稀释后的尿液样品（1 mol/L）中，95°C 加热 3 小时，中途每间隔 1 小时震荡一次，该过程不会改变 MMA、iAs 和 DMA 的形态。砷形态含量分析的方法采用氢化物发生—超低温捕集—原子吸收分光光度方法。取样量为 1.0 mL，加入 2% 的盐酸和 10% 硼氢化钠的反应液，发生氢化反应，生成砷化氢气体，经过冷却循环系统除去水汽，然后在液氮提供的低温环境中被捕集，最后由于各自的沸点不同而分离，分离物按照先后顺序通过原子分光光度计，即可确定尿液中 iAs、MMA 和 DMA 的含量，尿 As 的总量则通过相加 iAs、MMA 和 DMA 的浓度总和。甲基化指数是砷代谢能力的标志，计算方法如下：初级甲基化指数（PMI）=（MMA+DMA）/总 As。二级甲基化指标（SMI=DMA/MMA）。尿液样品中各种砷化物的百分比（iAs%、MMA%、DMA%）是通过每种砷的浓度除以总砷的浓度来计算的。

5.2 淋巴细胞提取

（1）将淋巴细胞从 -20°C 冰箱中取出，在室温下解冻后，用移液器吸取 500.0 μL 加入无 RNA 酶离心管中。

（2）吸取 300.0 μL 的 PBS 加入含有 300.0 μL 的血样无 RNA 酶的离心管中，充分混匀。

（3）将混匀的 PBS—血液加入 500.0 μL 的淋巴细胞液中，操作过程注意动作尽量轻柔缓慢，使 PBS—血液混合液尽量位于淋巴细胞液的上层。室温下，离心（12 000 rpm, 4 min）。

（4）离心后，吸出上清液丢弃，用移液管吸取中间层的淋巴细胞到新的无 RNA 酶的 EP 管中，在吸取中间层时注意不用吸净，留少许于离心管。

（5）吸取 300.0 μL 的 PBS 到含有淋巴细胞的离心管中，在室温离心（13 000 rpm, 15 min）后，丢弃上清液，位于管底的沉淀即为淋巴细胞。

5.3 样本总 RNA 提取

（1）用巴氏滴管吸弃 6 孔板中原有培养液，加入 PBS 缓冲液洗涤两次，在 6 孔板每个孔中各加入 1.0 mL 的 Trizol 细胞裂解液，放于室温下静置 10 min，让其充分裂解。

（2）将细胞裂解液转移至 1.5 mL 离心管中，室温下静置 5 min。

(3) 向离心管中加入 200.0 μL 氯仿振荡 30 s, 观察到离心管中出现分层现象继续在室温下静置 8 min。

(4) 12 000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 15 min, 观察到离心管中出现明显的分层现象, 小心吸取上清液 510.0 μL 至一个新的 1.5 mL 离心管。

(5) 向新的离心管中加入 510.0 μL 异丙醇, 上下颠倒混匀, 室温下静置 8 min。

(6) 12000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min, 轻弃上清液, 加入 1.0 mL 的 75%无水乙醇, 对沉淀进行洗涤纯化。上下颠倒混匀后, 放入高速离心机 12 000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 6 min, 弃上清液, 观察到管底的沉淀即为提取成功的 RNA。

(7) 在室温下将沉淀干燥 8 min, 加入 65.0 μL 的 RNase-free (含 RNA 酶抑制剂) 水溶解, 用枪头轻轻吹打混匀, 使 RNA 沉淀完全溶解。

(8) 提取的 RNA 用 UV-VIS Spectrophotometer 检测其浓度和纯度, 检验合格后进行逆转录反应。

5.4 RNA 逆转录成 cDNA

按照表 3 配制逆转录反应液。

表 3 逆转录体系

试剂	使用量 (μL)
5 \times RT-Buffer	4.0
10mM dNTP	0.75
5 \times RT Reaction Buffer	3.0
DTT	2.0
HiFiscript enzyme	1.0
Total RNA	0.25
M-MLV(200 U μL)	0.5
RNase Free H ₂ O	至 20

将 200.0 μL 无核酶八连管放于冰盒上, 按上述表中成分加入。涡旋振荡混匀, 短暂离心, 使管壁上的溶液收集到管底, 设置程序为 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 min。

(1) 引物设计与合成

从 NCBI 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 检索获得 TUG1 和 β -actin 的基因序列, 用 primer3 设计引物序列如下:

表 4 基因序列

基因	上游序列	下游序列
TUG1	5'-GAGACACGACTCACCAA-3'	5'-GAAGGTCATTGGCAGGTCCA-3'
β -actin	5'-CCCTGTACGCCAACACAGTGC-3'	5'-ATACTCCTGCTTGCTGATCC-3'

(2) 实时荧光定量反应体系

表 5 实时荧光反应体系

试剂	使用量 (μ L)
BeyoFast™ SYBR Green qPCR Mix (2X)	7.0
Forward and Reverse Primer Mix	0.5
Template cDNA	1.5
RNase-Free Water	6.0
Total volume	15
Forward and Reverse Primer Mix	0.5
Template cDNA	1.5
RNase-Free Water	6.0
Total volume	15

(3) 按照下表进行反应

表 6 实时荧光反应条件

步骤	温度	时间
预变性	95°C	10 min
变性	95°C	8 s
退火	60°C	10 s
延伸	72°C	15 s

(4) 荧光定量分析

通过 LightCycler® 96 SW1.1 软件得到熔解曲线, 根据扩增曲线获得 TUG1 和 β -actin 的 CT 值, 使用 $2^{-\Delta Ct}$ 进行定量分析, 每次实验重复 3 次, CT 值 = (暴露组 TUG1 基因 Ct 值 - 暴露组 β -actin 基因 Ct 值) - (对照组 TUG1 基因 Ct 值 - 对照组 β -actin 基因 Ct 值)。

5.6 敲低 16HBE 细胞中的 TUG1 基因

(1) 进行转染实验前, 将细胞培养瓶内的 16HBE 细胞按照 2.5×10^5 /孔接种于 6 孔板中, 加入 MEM 培养液 (无双抗), 每孔 4.0 mL。

(2) 将 10D/管的 TUG1-siRNA (序列见表 7) 干粉, 4°C 下离心 (12 000 rpm, 1 min), 加入 125.0 μL 无 RNase 水混匀, 分装置于 -20°C 的冰箱中保存。

表 7 si-TUG1 序列

TUG1 基因	序列
siRNA1	Forward:5'-CCACCUUACUACUGACGAATT-3'
	Reverse:5'-UUCGUCAGUAGUAAGGUGGTT-3'
siRNA2	Forward:5'-CCAUUGGGAUCAAAUCAAAATT-3'
	Reverse:5'-UUUGAUUUGAUCCCAAUGGTT-3'
Negative control	Forward:5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'
	Reverse:5'-ACGUGACACGUUCGGAGAATT-3'

(3) 细胞培养 19 h 后, 准备两个离心管, 分别加入 TUG1-siRNA 溶液 12.0 μL 和 24.0 μL 的 Rfect, 然后分别向两个管中加入 600.0 μL 的无血清培养基, 混匀后室温下放置 5 min。

(4) 5 min 后, 将 TUG1 siRNA 混合液加入到含有 Rfect 混合液的离心管中, 用移液器吹打混匀后, 室温下继续孵育 20 min。

(5) 在等待的 20 min 里, 弃 6 孔板原有的培养基, 每孔加入 800.0 μL 的无双抗培养基, 然后放入 37°C 细胞培养箱中。

(6) 向 6 孔板里加入 TUG1-siRNA 和 Rfect 混合液的混合液 200.0 μL , 放入细胞培养箱中继续培养 24 h。

(7) 24 h 后更换为 MEM 完全培养基, 继续培养。72 h 后, 提取 RNA 进行 PCR 操作, 检测 TUG1 表达情况, 确定转染效率。

5.7 MTS 实验

(1) 在 96 孔板中, 接种处于对数生长期的细胞 (每孔接种 7 000 个), 并向每孔补完全培养基 100.0 μL 。

(2) 19 h 后, 按前述转染程序对 TUG1 进行转染, 每孔加入 50.0 μL 的 siRNA-RFect 混合液混匀, 于细胞培养箱中培养 72 h。

(3) 72 h 后, 每孔加入 10.0 mL 的 MTS 溶液后, 于培养箱内孵育, 并在每次间隔 15 min 时用酶标仪 (490 nm) 检测 OD 值。

(4) 计算细胞存活率 = (siRNA-TUG1 的 OD 值 - 空白组 OD 值) / (siRNA-NC 组 OD 值 - 空白组 OD 值) $\times 100\%$

5.8 细胞凋亡与坏死实验

(1) 按照细胞密度为 2.5×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 在培养箱中培养 19 h, 加入 siRNA-RFect 混合液, 继续培养 72 h。

(2) 弃原有培养液, 每孔加入 1.0 mL 的 PBS 洗涤。每孔加入 5.0 μL 的 Hoechst 染色液和 5.0 μL 的 PI 染色液。混匀, 室温下避光孵育 20 min。

(3) 用 PBS 洗去多余染色液, 并在各孔内加 100.0 μL 的 PBS 观察细胞染色情况, 经 Hoechst 染色后可见细胞亮蓝色亮点, 这是细胞早期凋亡的表现, 而 PI 染色的细胞可见呈红色亮点, 为细胞晚期凋亡现象。

5.9 细胞处理

(1) 配制亚砷酸钠溶液: 用电子秤称定 0.0761 克亚砷酸钠, 用 DMSO 溶解, 转移至 500.0 mL 容量瓶中, 最终浓度为 2.0 mmol/L。使用 MEM 培养基稀释为 1.5 $\mu\text{mol/L}$, 3.0 $\mu\text{mol/L}$, 4.0 $\mu\text{mol/L}$, 4.5 $\mu\text{mol/L}$, 6.0 $\mu\text{mol/L}$, 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 。

(2) 配制一甲基砷酸溶液和二甲基砷酸溶液: 电子天平称取 0.1619 g 一甲基砷酸钠和 0.2140 g 二甲基砷酸钠溶于少量去离子水, 转移至 500.0 mL 容量瓶中定容, 配置成 2.0 mmol/L 溶液, 用 MEM 培养基稀释成 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 。

(3) 加药: 16HBE 细胞接种于 6 孔板中于培养箱中培养 24 h, 向每孔加入不同浓度的亚砷酸钠: 1.5 $\mu\text{mol/L}$, 3.0 $\mu\text{mol/L}$, 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 。加药后继续培养 24 h, 用于后续操作。

6. Western Blotting 实验

6.1 蛋白样品制备

(1) 在细胞转染 72 h 后, 弃原有培养液, 每孔加入 1.0 mL PBS 洗涤两次, 于冰盒上进行操作。

(2) 配制 IP 裂解液, 每孔的配制如下: 200.0 μ L 裂解液+4.0 μ L AEBSF+2.0 μ L 蛋白酶抑制剂+2.0 μ L 蛋白磷酸化酶抑制剂。

(3) 在每个孔中加入 200.0 μ L 裂解液混合液, 置于冰上 15 min。

(4) 15 min 后, 用细胞刮板沿 6 孔板边缘的细胞轻刮, 随后将细胞裂解液混合溶液转移到离心管中。

(5) 涡旋 3 次, 每次 30 s, 每次间隔 5 min, 使细胞裂解充分。涡旋结束, 4 $^{\circ}$ C, 12 000 rpm, 离心 8 min。

(6) 离心结束, 取上清液 160.0 μ L 到新的离心管中, 加入 53.0 μ L 的 Lodding buffer (4 \times) 于 97 $^{\circ}$ C, 5 min 进行预变性, -20 $^{\circ}$ C 保存。

(7) 根据 BCA 说明书, 取 2.0 μ L 蛋白于核酸测定仪蛋白浓度。

6.2 SDS-PAGE 电泳实验

(1) 按照凝胶配方配制分离胶: 3.75 mL 的 ResolverA+3.75 mL 的 ResolverB+35 μ L 的 APS+3.5 μ L 的 TEMED 涡旋摇匀立刻灌胶, 加入 1.0 mL 异丙醇液封。

(2) 待胶体不再随着异丙醇晃动, 弃异丙醇加入去离子水清洗, 倾倒入去离子水, 剩余水分用滤纸吸去。

(3) 配合成胶按照以下配方: 1.0 mL 的 stackerA+1.0 mL 的 stackerB+2.0 μ L 的 APS+10.0 μ L TEMED 后涡旋摇匀立刻灌胶, 梳子以垂直的角度插入胶体中, 室温放置 30 min。

(4) 30 min 后, 在电泳池中放入配制好的电泳胶, 垂直向上拔出梳子。

(5) 使用微样上样器, 以 BCA 测出的浓度为依据进行上样。

(6) 在电泳槽加满电泳液, 120V, 110 min 电泳。

6.3 转膜

(1) 用 1 \times 转膜液浸泡两片海绵垫, 用甲醇活化 PVDF 膜 2 min。

(2) 按蛋白分子量进行切胶, 随后, 按照海绵垫、膜、胶、海绵垫的顺序分别放入快速转膜仪中, 以 20V, 进行转膜 20 min。

6.4 封闭

- (1) 转膜结束, 取出 PVDF 膜, 以 5 min 的间隔用 TBST 洗涤 4 次。
- (2) 用无蛋白快速封闭液对 PVDF 膜进行封闭, 时间为 15 min。
- (3) 封闭结束后, 用 TBST 洗涤 4 次, TBST 每 5 min 更换一次。
- (4) 将一抗稀释液 (2.0 mL) 加入到 PVDF 膜中, 在 4°C 条件下放于摇床中培养 24 h。
- (5) 孵育后, 再次用 TBST 洗涤 4 次, 间隔时间为 5 min, 开始孵育二抗 2 h。
- (6) 二抗孵育结束后, 再次使用 TBST 洗涤 4 次, 每次间隔 5 min。

6.5 显影

- (1) 将 ECL 化学发光液 A 和 B 等体积混匀, 均匀滴涂在转印膜上, 直至完全覆盖。
- (2) 将膜放到化学发光装置中, 对结果进行记录。

7. 统计学分析

论文的实验结果数据 $\text{Mean} \pm \text{SEM}$ 表示。SPSS 21.0 或 GraphPad Prism 7.0 统计软件在进行流行病学分析, 经正态性检验尿砷及其代谢产物、甲基化指数均不符合正态分布, 将 tAs、iAs、MMA 和 DMA 的数据进行了对数转换。正态数据结果以平均值和标准差表示, 非正态数据结果以中位数和百分位数 (P_{25} , P_{75}) 表示, 显著性检验水准 $\alpha=0.05$, 使用 GraphPad Prism 7.0 软件进行统计图表的制作。

结果

1. 研究人群一般情况

招募的 74 名砷暴露人群，年龄均在 36.01 ± 5.21 ，无重大疾病史，当地非职业暴露人员（对照组）25 名，均龄在 35.25 ± 3.45 ，两组在性别，吸烟，饮酒分布的没有统计学意义 ($P < 0.05$)，结果如下表。

表 8 研究人群的一般情况

类别	对照组 (n=25)	暴露组 (n=74)
年龄 ($\bar{x} \pm s$) (年)	35.25 ± 3.45	36.01 ± 5.21
吸烟史 (是/否) (年)	15/10	45/29
性别 (男/女)	16/9	46/28
饮酒史 (是/否) (年)	12/13	36/38
受教育时间 (年)		
<6	6	19
6-9	10	28
≥ 9	9	27

2. 尿中砷和砷代谢物水平和甲基化指数

结果显示，与对照组相比，砷暴露组中的 iAs、MMA、DMA 浓度均显著升高，并且 iAs% 和 MMA% 也有显著升高，而 DMA% 则低于对照组，比较两组的砷甲基化指数，砷暴露组与对照组相比，PMI 和 SMI 均下降，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)，结果如下表：

表 9 研究人群尿中砷的水平

类别	对照组 (n=25) (中位数, $P_{25} \sim P_{75}$)	暴露组 (n=74) (中位数, $P_{25} \sim P_{75}$)
iAs	1.56 (0.88-2.60)	104.69 (51.51-253.35) **
MMA	1.57 (0.94-2.12)	156.43 (62.81-351.61) **
DMA	15.25 (10.20-22.59)	603.66 (174.92-1233.24) **
tAs	18.82 (12.01-27.03)	822.39 (325.59-1906.47) **

表 9 研究人群尿中砷的水平 (续表)

类别	对照组 (n=25) (中位数, P25-P75)	暴露组 (n=74) (中位数, P25-P75)
IAs%	9.72 (5.46-15.83)	13.71 (9.21-20.79) **
MMA	8.15 (6.51-10.34)	19.07 (17.02-22.70) **
DMA	83.30 (76.59-86.54)	64.36 (56.28-74.05) **
PMI	90.27 (84.16-94.53)	86.28 (79.20-90.78) *
SMI	90.49 (88.47-91.96)	76.46 (71.42-80.50) **

注: iAs: 无机砷; MMA: 一甲基砷酸; DMA: 二甲基砷酸; tAs: 总砷; PMI: 一级甲基化指数; SMI: 二级甲基化指数。*与对照组比较, $P < 0.05$ 。 **与对照组比较, $P < 0.05$ 。

3. 外周血淋巴细胞 TUG1 mRNA 表达

经正态性检验后, 暴露组和对照组 TUG1 mRNA 的表达情况利用两独立样本检验进行分析。结果表明, 砷暴露人群中的 TUG1 表达较对照组显著上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明砷对人体外周血淋巴细胞中的 TUG1 mRNA 有显著的影响, 结果如图 1 所示。

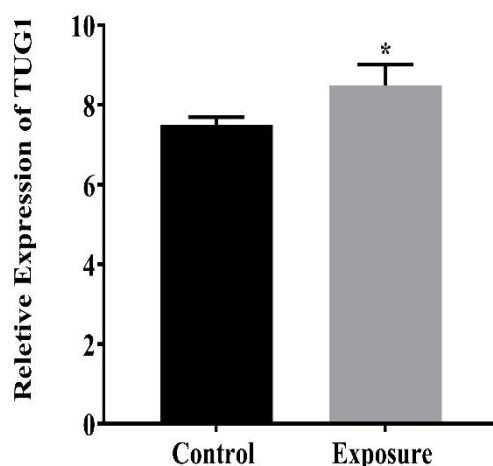


图 1 两组人群外周血淋巴细胞 TUG1 mRNA 表达情况

注: *与对照组比较, $P < 0.05$ 。

4. 各形态砷与 TUG1 mRNA 表达的相关性

结果表明，所有研究对象外周血淋巴细胞 TUG1 mRNA 表达与 tAs、iAs、MMA、DMA 的含量呈正相关关系，结果见表 10 和图 2。

表 10 尿砷种类与 TUG1 mRNA 表达水平关系

变量	Log(tAs)		iAs%		MMA%		DMA%	
	R 值	P 值	R 值	P 值	R 值	P 值	R 值	P 值
TUG1 基因表达	0.06257	0.0125	0.05745	0.0169	0.06995	0.0082	0.069	0.0742

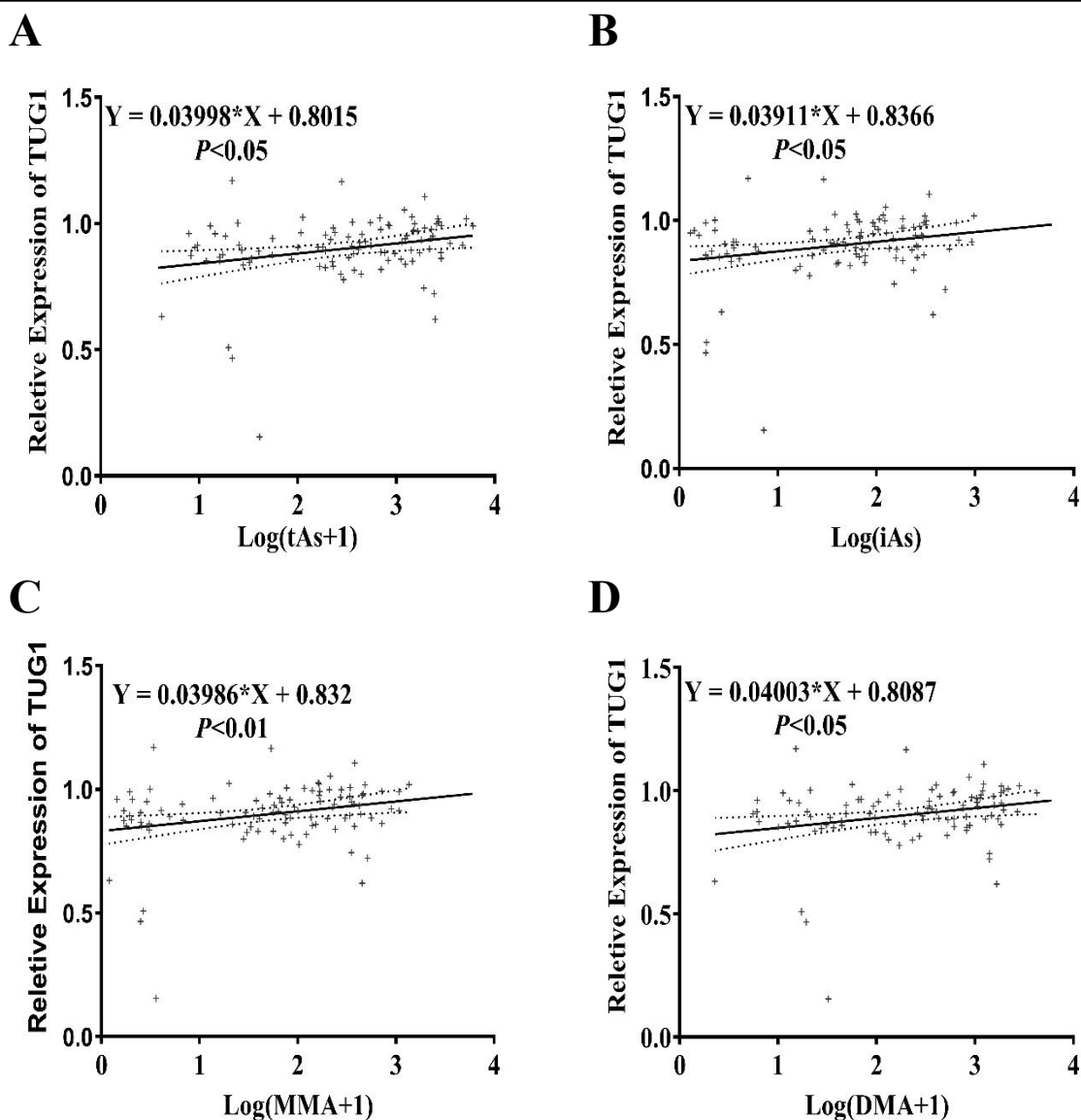


图 2 外周血 TUG1 mRNA 表达与尿中各种类砷的相关性分析散点图

5. 砷甲基化指数与 TUG1 mRNA 表达水平的关系

采用 ANOVA 的 LSD 方法，分别对样本高代谢组（n=51）和低代谢组（n=48）进行比较，结果见图 3。高 PMI 组值 TUG1 mRNA 表达水平比低 PMI 组值升高（ $P < 0.01$ ），高 SMI 组 TUG1 mRNA 表达水平和低 SMI 组相比值降低，没有统计学意义。

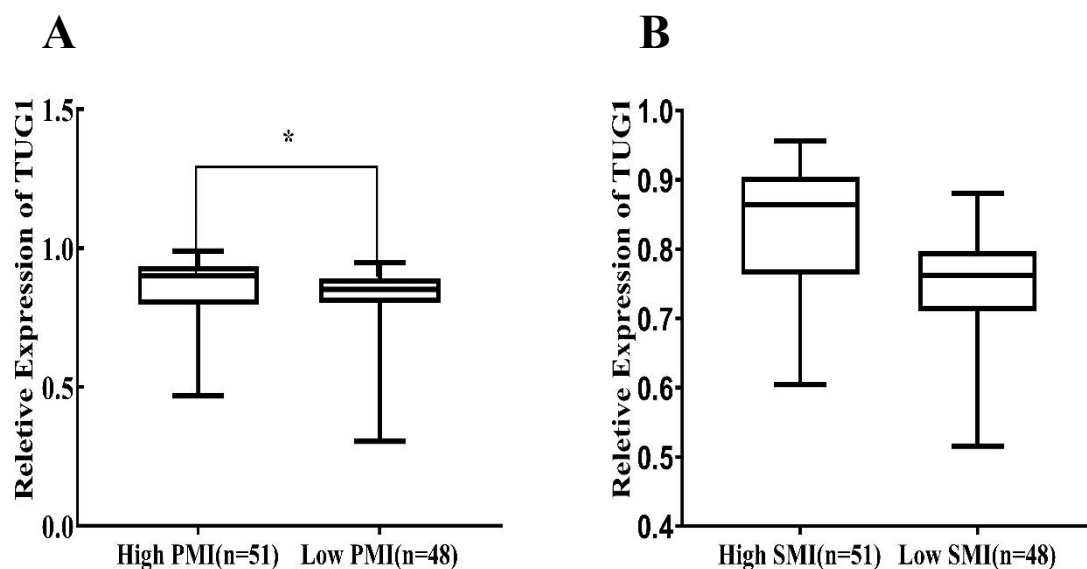


图 3 砷甲基化指数与 TUG1 mRNA 表达情况

注：*与对照组比较， $P < 0.05$ 。

6. 砷对 16HBE 细胞中 TUG1 mRNA 表达的影响

6.1 不同浓度 NaAsO₂ 对 16HBE 细胞中 TUG1 mRNA 表达的影响

经流行病学证实，砷暴露者外周血中 TUG1 mRNA 的表达会升高，采用体外细胞砷染毒实验进一步验证 16HBE 细胞暴露于砷后 TUG1 mRNA 的表达变化。通过实时定量聚合酶链反应（qRT-PCR）分析，测定了三种浓度的亚砷酸盐（1.5、3 和 4.5 $\mu\text{M/L}$ ）处理 16HBE 细胞后 TUG1 的 mRNA 表达水平。结果显示，砷浓度的增加会导致 TUG1 的表达量显著增加（ $P < 0.05$ ），并且呈剂量依赖性见图 4。

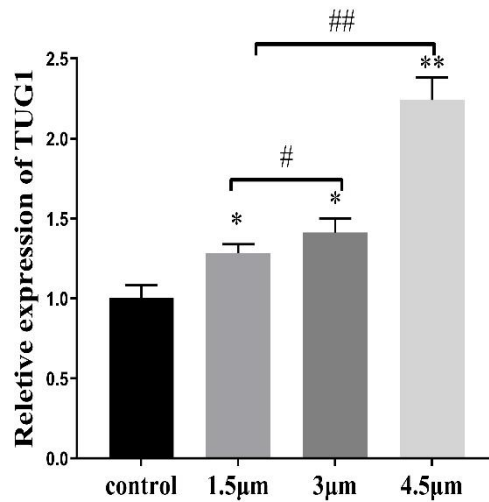


图 4 不同浓度砷对 16HBE 细胞 TUG1 表达的影响

注：16HBE 细胞暴露于不同浓度 iAs (1.5, 3, 4.5 $\mu\text{M/L}$) 48 h, control 组表示不加砷处理。*与对照组比较, $P < 0.05$ 。**与对照组比较, $P < 0.01$ 。#与加 iAs (1.5 $\mu\text{M/L}$) 比较, $P < 0.05$ 。##与加 iAs (1.5 $\mu\text{M/L}$) 比较, $P < 0.01$ 。

6.2 砷代谢物对 16HBE 细胞中 TUG1 mRNA 表达影响

以 4.5 $\mu\text{M/L}$ 的 iAs 和同样浓度的 MMA 和 DMA 对 16HBE 细胞染毒 48 h, 检测细胞中 TUG1 基因的 mRNA 相对表达水平, 结果见图 5, 砷处理组和砷代谢物处理组的 TUG1 表达均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 其中相同浓度 iAs 诱导 TUG1 表达能力显著高于同样浓度的 MMA 和 DMA。

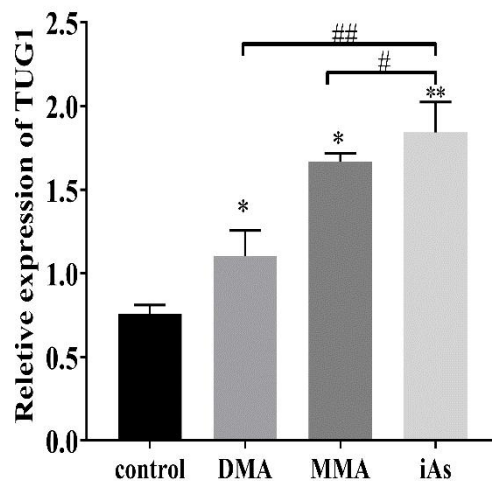


图 5 砷和砷代谢物对 16HBE 细胞中 TUG1 mRNA 表达的影响

注：16HBE 细胞被 iAs (4.5 $\mu\text{M/L}$), MMA (4.5 $\mu\text{M/L}$), DMA (4.5 $\mu\text{M/L}$) 染毒, 其中 control 组不加砷处理, *与对照组比较, $P < 0.05$ 。#与加 iAs (4.5 $\mu\text{M/L}$) 比较, $P < 0.05$ 。##与加 iAs (4.5 $\mu\text{M/L}$) 比较, $P < 0.01$ 。

7. 砷对 16HBE 细胞活力的影响

7.1 不同浓度的 NaAsO₂ 对 16HBE 细胞存活率的影响

为了研究砷诱导的 16HBE 细胞的细胞毒性，培养 16HBE 细胞时，用不同浓度的砷（1、1.5、3、4.5、6 和 7.5 $\mu\text{M/L}$ ），使用 MTS 法测定砷暴露后的活细胞数量。结果显示，砷处理组的 16HBE 细胞的活力较对照组（0 $\mu\text{M/L}$ ）显著较低（ $P < 0.05$ ），且砷浓度在 3-7.5 $\mu\text{M/L}$ 暴露 48 h 后，16HBE 细胞的细胞活力以剂量依赖性显著降低，其存活率逐渐降低，见图 6。因此，在后续实验中为了控制细胞存活数量，我们选择染毒 16HBE 的砷浓度为 1.5 $\mu\text{M/L}$ 、3 $\mu\text{M/L}$ 和 4.5 $\mu\text{M/L}$ 。

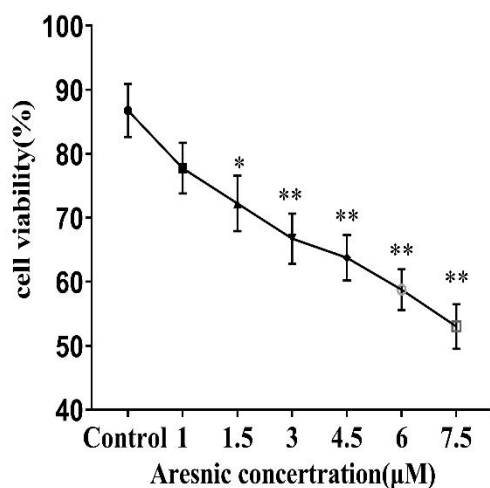


图 6 不同浓度砷对 16HBE 细胞活力的影响

注：细胞暴露于不同浓度 NaAsO₂（0、1、1.5、3、4.5、6、7.5 $\mu\text{M/L}$ ）细胞活力降低，其中 control 组表示不加砷处理。*与对照组比较， $P < 0.05$ 。**与对照组比较， $P < 0.01$ 。

7.2 砷和砷代谢物对 16HBE 细胞存活率的影响

为了探究砷代谢物对 16HBE 细胞活力的影响，我们选择将 16HBE 细胞暴露于 MMA（4.5 $\mu\text{M/L}$ ）、DMA（4.5 $\mu\text{M/L}$ ）以及 NaAsO₂（4.5 $\mu\text{M/L}$ ），结果显示，与对照组相比，染毒的 16HBE 细胞的细胞活力显著降低，但同样浓度的 iAs 降低细胞活力水平较同浓度的 MMA 和 DMA 更显著，所以 MMA 和 DMA 对于细胞毒性远低于相同浓度的 iAs。

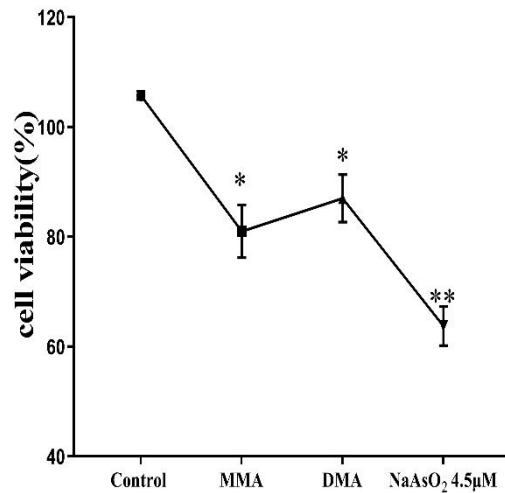


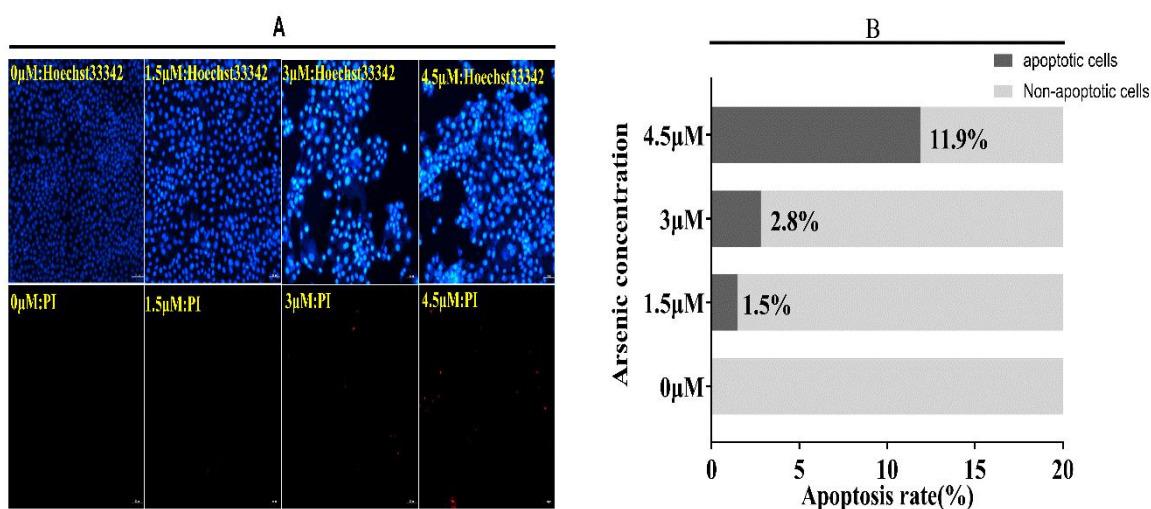
图 7 砷和砷代谢物对 16HBE 细胞活力的影响

注：细胞暴露于 NaAsO₂ (4.5 μM/L)，MMA (4.5 μM/L)，DMA (4.5μM/L)，其中 control 组表示不加砷处理。细胞活力降低，*与对照组比较， $P < 0.05$ 。**与对照组比较， $P < 0.01$ 。

8. 砷对 16HBE 细胞凋亡的影响

8.1 不同浓度的 NaAsO₂ 对 16HBE 中的细胞凋亡的影响

将染毒的细胞培养 72 h 后，进行 Hoechst/PI 凋亡染色实验。结果如图 8 所示，与对照组 (0 μM/L) 相比，染毒后的 16HBE 细胞中检测到大量的细胞凋亡现象（经 Hoechst 染色后细胞呈现亮蓝色为细胞早期凋亡现象；经 PI 染色后细胞呈现亮红色为细胞晚期凋亡现象），且随着染毒剂量的增加，凋亡现象更为显著，凋亡的细胞呈剂量依赖性增加。加 NaAsO₂ (4.5 μM/L) 凋亡的细胞显著多于 NaAsO₂ (1.5 μM/L) 的凋亡细胞数，而 NaAsO₂ (1.5 μM/L) 的凋亡细胞数显著高于未处理的对照组。

图 8 不同浓度的 NaAsO_2 对 16HBE 中的细胞凋亡的影响

8.2 砷代谢物对 16HBE 细胞中的细胞凋亡影响

16HBE 细胞暴露于 MMA (4.5 $\mu\text{M}/\text{L}$)、DMA (4.5 $\mu\text{M}/\text{L}$) 和相同浓度的 iAs, 使用 Hoechst33342/PI 双染色法检测细胞凋亡, 细胞凋亡是一种生理类型的细胞死亡, 其特征是广泛的 DNA 片段和形态学特征, 凋亡细胞呈现核荧光均匀分布。结果显示, MMA 和 DMA 组凋亡细胞死亡率无显著差异, 但是相比对照组 (0 $\mu\text{M}/\text{L}$) 细胞凋亡增加, 见图 9。

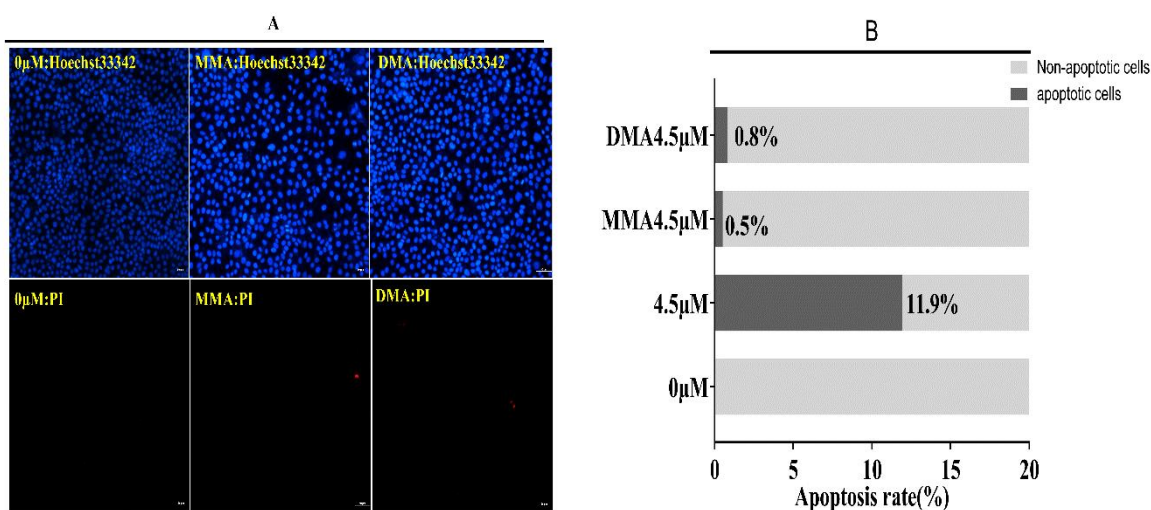


图 9 砷代谢物对 16HBE 中的细胞凋亡的影响

9. 敲低 TUG1 表达降低 16HBE 细胞的存活率和增加砷诱导的细胞凋亡

9.1 TUG1 基因敲低效率检测

利用 Rfect 小核酸转染试剂细胞毒性低，转染效率高。可将 NC-siRNA 和两组不同片段的 TUG1-siRNA 转染进 16HBE 细胞，培养 72 h 后，以 PCR 检测 TUG1 基因的表达水平，以此来确定 TUG1-siRNA 片段的转染效率，两组 TUG1-siRNA 的 TUG1 mRNA 表达均低于 TUG1-NC 组，差异具有统计学意义，表明 TUG1 基因在 16HBE 细胞中被成功敲低，其表达量降低。

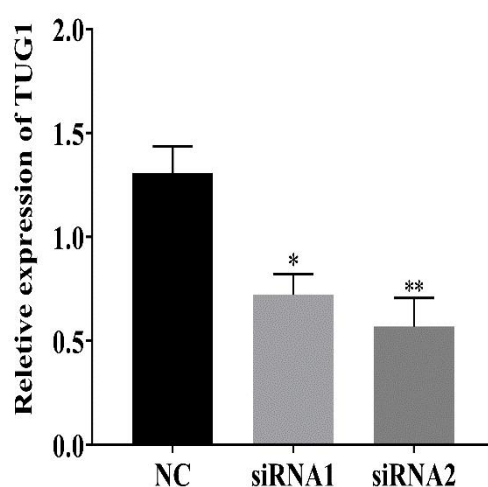


图 10 沉默片段 siRNA1 和 siRNA2 在 16HBE 细胞中的沉默效果

注：*与对 NC 比较， $p < 0.05$ ，**与 NC 比较， $p < 0.01$ 。

9.2 敲低 TUG1 后细胞活力检测

为了探讨 TUG1 对细胞活力的影响，将 TUG1 基因沉默片段转染至 16HBE 细胞中 72 h 后，进行 MTS 细胞活力检测。结果显示，与对照组（NC 组）相比，转染了 TUG1 基因的 16HBE 细胞的细胞活力降低。将 TUG1 低表达的细胞用 $3 \mu\text{M/L}$ 的 iAs 处理 48 h，转染组的细胞活力较 NC 组显著降低（ $P < 0.05$ ），表明 TUG1 低表达时砷诱导 16HBE 细胞凋亡增加，且细胞活力降低程度比不加 iAs 大。表明加砷后，叠加了 si-TUG1 基因诱导细胞凋亡的能力。

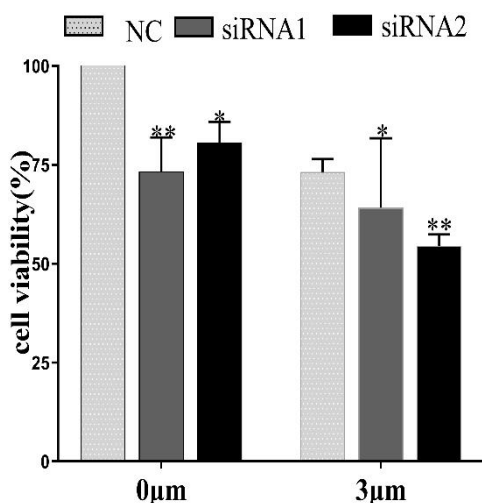


图 11 TUG1 敲低后细胞活力检测

注：*与对 NC 比较， $P < 0.05$ ，**与 NC 比较， $P < 0.01$ ，TUG1-siRNA 转染后 16HBE 细胞活力显著降低，使用 3 $\mu\text{M/L}$ 的 iAs 孵育 16HBE 细胞 48 h，相比单纯敲低 TUG1 后细胞活力下降更为显著。

9.3 TUG1 敲低后细胞凋亡和坏死检测

用 HO/PI 双染色法验证细胞凋亡和坏死，结果显示，与 NC-TUG1 组相比，TUG1-siRNA 组的凋亡细胞（蓝色荧光）和坏死细胞（红色荧光）数量显著增加，见图 12。在砷处理的 3 $\mu\text{M/L}$ 转染细胞中，与未处理的 TUG1-siRNA 组相比，HO/PI 双染色试验获得的坏死细胞数更多，见图 13。

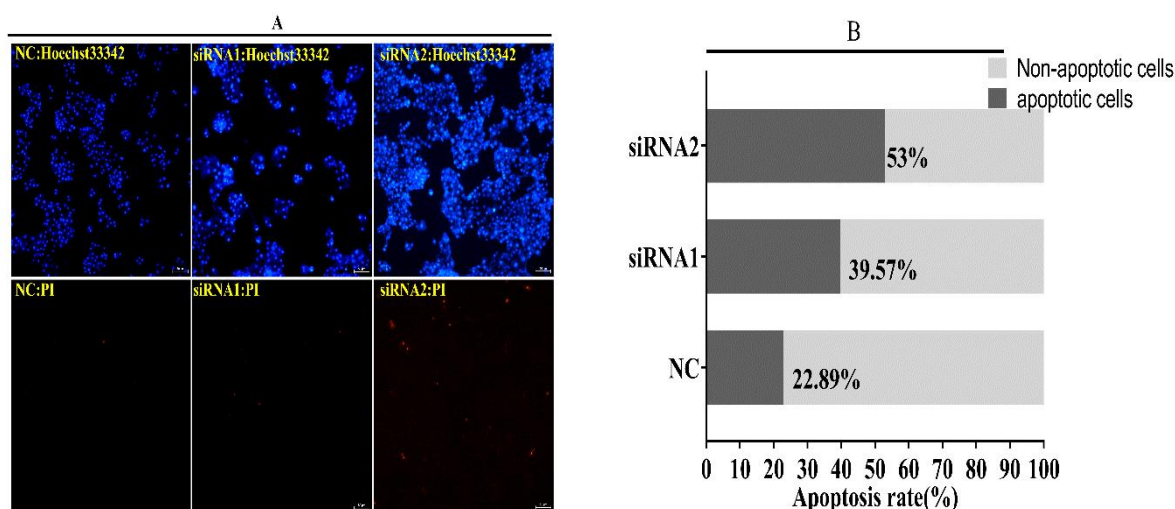


图 12 TUG1 敲低后对 16HBE 细胞凋亡坏死的影响

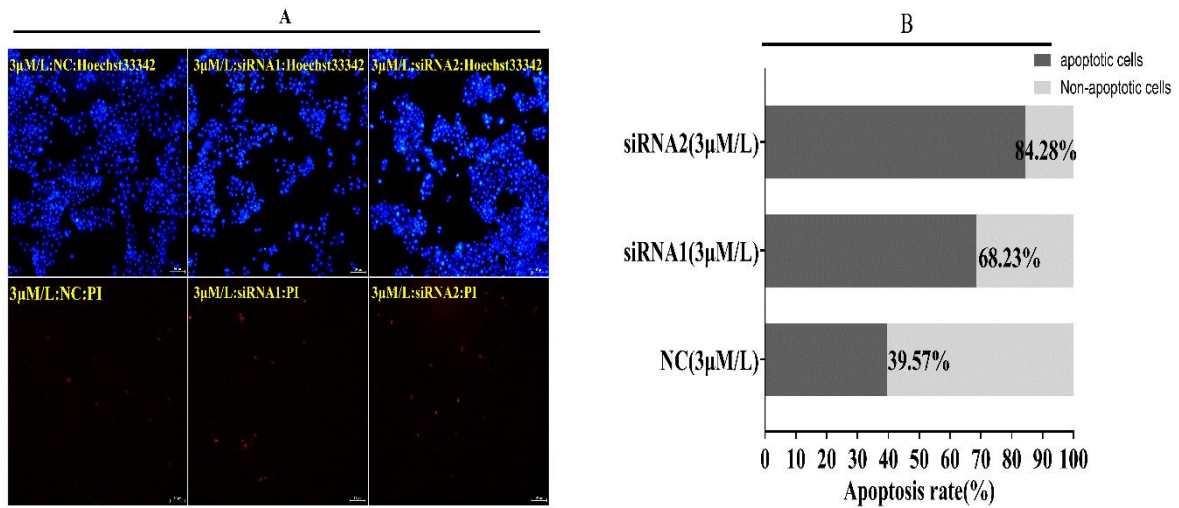


图 13 TUG1 敲低后加 NaAsO₂ (3 μM/L) 对 16HBE 细胞凋亡坏死的影响

10. TUG1 敲低后下游基因的变化

Western blotting 实验用来证实 TUG1 敲低后对 16HBE 细胞中 p53 信号通路相关蛋白表达的调控作用。如图 14 所示，结果显示，TUG1-siRNA 组中 p53、MDM2、Caspase 7、FAS 和 BCL2 的蛋白水平显著升高，因为 p53 最常见的翻译后修饰是磷酸化。也通过 Western blotting 实验分析确定了 p53 (Ser392) 位点的磷酸化状态，结果显示，在 TUG1-siRNA 组中，p53 在 Ser392 位点的磷酸化水平也增加了。

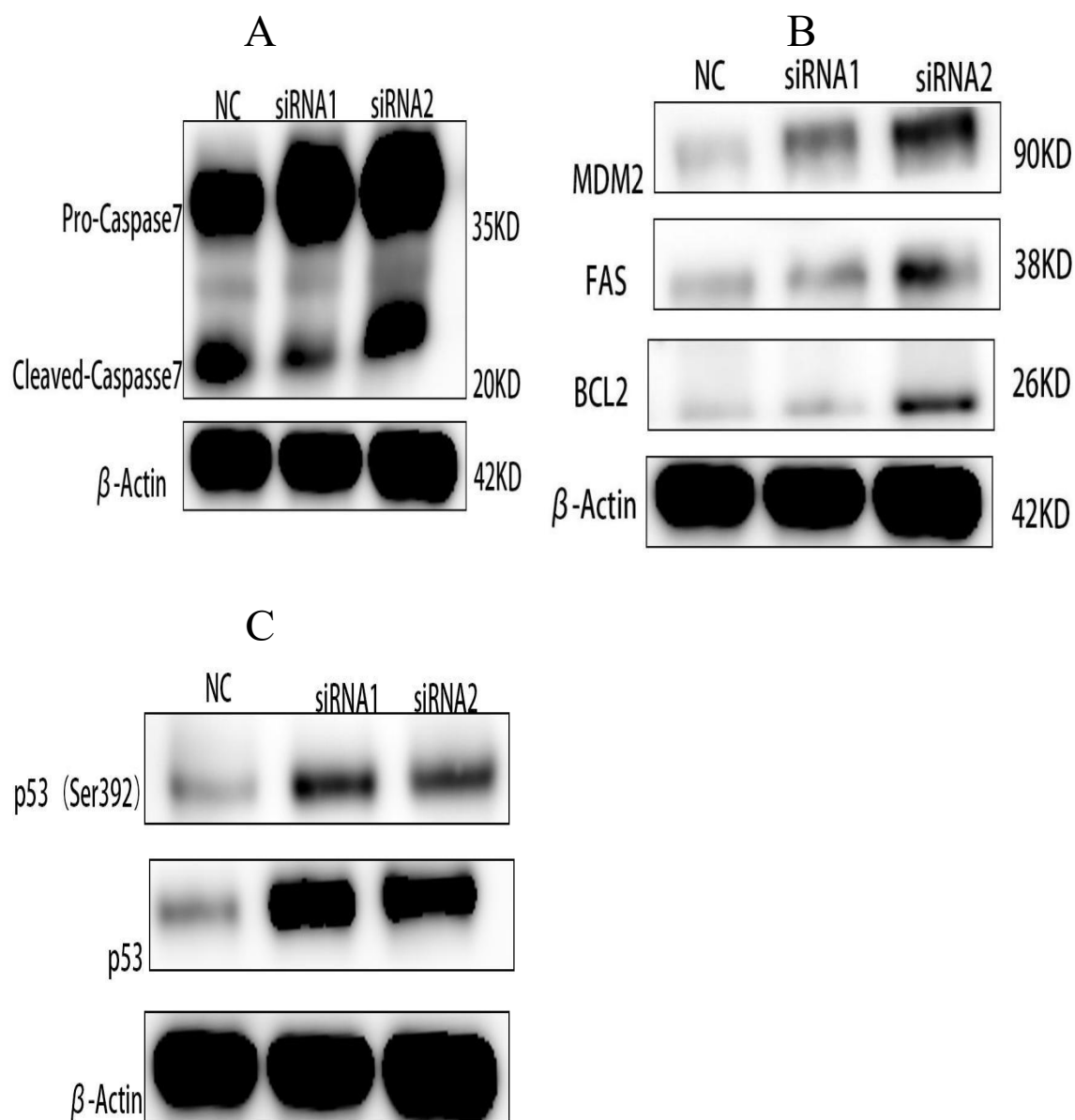


图 14 TUG1 敲低后 p53 通路相关基因的变化

通过 Western blotting 实验检测 TUG1 沉默后的 16HBE 细胞中 Caspase7、MDM2、FAS、BCL2、p53、p-p53 (Ser392) 的蛋白表达。

讨论

砷是一种有毒的类金属元素，在对人类健康构成重大潜在威胁的有毒物质中排名第一^[26]，广泛分布于地壳中。无机砷和有机砷化合物通过人为使用（如杀虫剂、药品、玻璃制造和半导体）被引入到环境中^[27]。在玻璃制造厂、金属冶炼厂和燃煤电厂等工业来源附近，发现砷的浓度超过 1000 ng/m^3 ^[28, 29]。砷影响全球约 1.6 亿人口的健康^[30, 31]，变成了影响全球人的一个健康问题^[32]。砷最常见的形式是 iAs ^[33]，砷暴露被发现会诱发贫血^[34]、皮肤、呼吸系统、神经病变和人类恶性肿瘤^[33]，在美国卫生与公众服务关于致癌物的第九份报告中，将砷化合物列为人类致癌物^[35]。

Chen 等人在台湾东北部的一项为期 12 年的随访队列研究中发现，即使砷浓度 $< 100 \text{ } \mu\text{g/L}$ ，但是其接触的人肺癌和尿路癌症的风险增加^[36, 37]。分析了两种人群中尿砷种类的含量，发现暴露组人员尿液中的 iAs 、 MMA 和 DMA 显著高于对照组中的含量，其中暴露组人员尿液中总砷浓度（ tAs ）中位数为 $822.39 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ，远远超过了美国工业协会制定的总尿砷浓度阈值 $35 \text{ } \mu\text{g/mL}$ ^[12]，这是因为在砷冶炼工厂作业的工人是职业砷高暴露人群，而这些人具有两个特点：一是职业砷暴露人群是长期慢性接触砷，所以其接触砷化合物浓度高。二是工厂内的砷化合物存在形式为烟气和粉尘，职业暴露工人通过呼吸道和皮肤接触砷，而在职业环境报告指出当人们通过吸入性接触到砷时，会导致总砷的暴露^[38]。还发现，职业砷暴露人群中的砷甲基化指数， PMI 和 SMI 均低于对照人群。在哺乳动物中，无机砷的甲基化反应发生在肝脏中^[39]，砷冶炼工厂的工人由于长期处于砷暴露环境中，所以体内有大量砷化物需要持续代谢转化，但是远远超过了肝脏的甲基转化的能力，导致砷化物长期在体内蓄积，致使尿砷水平升高。这提示砷冶炼工厂的工人已经存在职业砷暴露损害，这种蓄积慢慢会对各种器官产生有害影响，最终可能会导致癌变。

发现砷暴露提高了 TUG1 的水平，随着砷浓度的升高， TUG1 的 mRNA 水平随之升高，与 iAs 、 MMA 、 DMA 的浓度呈现正相关。表明砷化合物有上调 TUG1 表达的作用。 MMA 和 DMA 是无机砷进入人体后，经过一系列氧化甲基反应所产生的代谢物^[40]。由于 MMA 和 DMA 的半衰期比 iAs 短，容易溶于水，所以能尽快通过肾脏排出体外^[41]。由于不同形态的砷在人体内的代谢率不同，对基因表达的影响也会不同^[42]。用一甲基砷酸与二甲基砷酸处理 16HBE 细胞后，发现 MMA 和 DMA 诱导 TUG1 表达的能力低于同浓度的 iAs ，提示 TUG1 可能具有特异性的表达模式，并在砷诱导的毒性和致癌性中发挥重要作用。砷代谢后诱导 TUG1 基因的能力减弱。

值得注意的是，砷可通过影响基因表达和通路变化来介导细胞凋亡增殖。由此猜测，TUG1 基因是否也介导了砷诱导细胞异常凋亡增殖的过程。通过特异性沉默 TUG1，发现低表达 TUG1 可促进 16HBE 细胞凋亡。LncRNA TUG1 基因，一个与癌症相关的基因，具有组织表达特异性。在恶性肿瘤细胞中的功能具有两面性，可以发挥致癌功能，同时也可以作为抑癌基因。当 TUG1 作为肿瘤抑制基因时，通过抑制细胞增殖和促进细胞凋亡发挥作用。TUG1 的下调可以抑制 Bcl-2、CyclinD1 的表达，增加 Caspase3 的表达来抑制人类恶性黑色素瘤细胞的增殖^[43]。TUG1 在人胶质瘤中作为肿瘤抑制因子，通过激活 Caspase-3 和 Caspase-9 介导的内在通路，抑制 Bcl-2 介导的抗凋亡通路，促进胶质瘤细胞凋亡发挥作用^[44]。细胞凋亡是细胞内环境稳态的自主程序性死亡过程^[45]，是一种消除异常细胞的手段。而肿瘤的发生即为细胞增殖和细胞凋亡动态失衡的结果。在本次研究中，16HBE 细胞在 TUG1 敲低后活力下降，提示 si-TUG1 显著抑制了 16HBE 细胞的增殖，参与诱导细胞凋亡过程。经过亚砷酸钠染毒后，染毒组的细胞活力显著低于未染毒组。细胞活力的高低取决于细胞凋亡与细胞增殖数量的比值，我们的实验结果显示。在 TUG1 敲低组砷诱导细胞凋亡数量显著增加。表明 iAs 通过促进 16HBE 细胞的凋亡来抑制细胞活力。

已知由 p53 介导的信号转导通路在调节细胞凋亡过程中发挥着重大作用。而 p53 通路介导的凋亡途径分为 p53 依赖性和 p53 非依赖性途径^[46]。其中 p53 依赖性途径是指 p53 蛋白直接结合抗凋亡蛋白 Bcl-2 来增加线粒体外膜通透性，从而促进细胞凋亡^[43]。在本次研究中，当沉默 TUG1 片段成功转染进入到 16HBE 细胞中。会激活 p53 蛋白，TUG1 是激活 p53 的直接转录靶点，当 TUG1 沉默后，p53 被激活，许多由 p53 调控的凋亡基因如 Bcl-2 和 MDM2 的表达会发生上调。有研究证实，当 MDM2 被激活时，会对细胞的异常增殖起到促进作用，因此导致肿瘤的发生^[47]。MDM2 是 p53 的靶基因，p53 能够特异性结合在 mdm2 基因的启动子区域，从而激活该基因的转录^[48, 49]。

当细胞发生应激反应时，会通过改变蛋白的结构来介导这一复杂反应。而蛋白质磷酸化是真核细胞最常见的共价修饰方式^[50]。当 TUG1 敲低后，p53 磷酸化位点 392 被激活，其蛋白水平和活性发生改变，p53 的稳定性及与反应元件的结合能力发生改变。当 p53 发生磷酸化时，作为转录因子调控多种下游靶基因的表达，从而启动细胞周期阻滞、凋亡、衰老和分化等细胞学效应^[51]。目前为止，人们已经发现了关于 p53 磷酸化的 30 个位点^[52]，不同位点作用不同。如 Ser6 和 9 的磷酸化可以通过 TGF- β 通路促进肿瘤发生和癌细胞的转移。p53 Ser15 和 Ser20 的磷酸化修饰可以影响细胞的周期阻滞和 DNA 损伤修复^[53]。

当在 16HBE 细胞中，TUG1 被敲低后 Caspase7 和 FAS 的表达均上调。Fas 蛋白 FAS 是一种糖基化跨膜蛋白分子，属于 I 型跨膜蛋白^[54]。Caspases7 作为一种酶原存在，可被 FAS 激活，导致细胞凋亡^[55]。因此，一个合理的假设是，沉默 TUG1 作为一可以激活 FAS/Caspase 7，从而促进了细胞凋亡。

在本研究中，通过实验发现了砷剂量依赖性诱导 TUG1 的表达，以及 p53 信号通路在 LncRNA TUG1 调控中的重要性。p53 蛋白激活并上调了砷诱导的细胞损伤中 TUG1 的表达。此项研究阐明了砷诱导毒性与 LncRNA-TUG1 变化的关系，提高了在表观遗传水平上对砷毒性的认识。在此研究中，强调了 LncRNA-TUG1 与 p53 通路的关联，并研究了 LncRNA TUG1-p53 调控网络是否与砷凋亡相关。

本研究首次表明 TUG1 参与了 16HBE 细胞对砷的反应的生物过程。需要更复杂的研究来证实我们的结果，但研究结果仍为未来对这一主题的研究提供了基础。计划进一步研究 TUG1 参与砷诱导的细胞凋亡的分子机制。

结论

1. 职业暴露砷工人外周血 TUG1 mRNA 表达升高，且 TUG1 mRNA 的表达与尿液中 tAs、iAs、MMA 和 DMA 成正相关关系。
2. 亚砷酸钠诱导 16HBE 细胞中 TUG1 的表达，而砷的代谢产物一甲基砷酸与二甲基砷酸引起 TUG1 的表达异常表达显著低于同一浓度的亚砷酸钠。
3. 砷诱导通过 p53 通路诱导 TUG1 的表达，激活相关凋亡基因 Bcl-2、MDM2 等。
4. 敲低 TUG1 的表达能降低 16HBE 细胞的细胞活力，在砷诱导下细胞凋亡数量增加。

展望与不足

在本研究中，通过实验，证明了砷呈剂量依赖性诱导 TUG1 的表达，以及 p53 信号通路在 LncRNA TUG1 调控中的重要性。认为 p53 蛋白激活并上调了砷诱导的细胞损伤中 TUG1 的表达。本研究首次表明 TUG1 参与了 16HBE 细胞对砷的反应的生物过程。我们的实验缺少动物实验，后续需要更多的研究来证实我们的结果，目前的研究结果为未来对这一主题的研究提供了基础，继续探讨 TUG1 调控蛋白的 miRNA 靶点。

参考文献

- [1] NURCHI V M, BUHA DJORDJEVIC A, CRISPONI G, et al. Arsenic Toxicity: Molecular Targets and Therapeutic Agents [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2): 235.
- [2] 郭莹莹, 翟毓秀, 林洪, et al.海产品中砷化合物检测方法的研究进展[J].*水产科学*, 2008, 27(12): 674-9.
- [3] GAO M, LI C, XU M, et al.LncRNA UCA1 attenuates autophagy-dependent cell death through blocking autophagic flux under arsenic stress[J].*Toxicology Letters*,2018,284:195-204.
- [4] 魏亚萍, 侯祥庆, 蓝园, et al.As3MT,N6AMT1 基因-环境交互作用对砷暴露所致皮肤损伤影响[J].*中国公共卫生*, 2019,35(2):92-188.
- [5] 安艳. 饮水砷致癌危险度评价中的不确定性[J].*国外医学: 医学地理分册*, 2011,32(2):4-71.
- [6] LEONARD A, LAUWERYS R. Carcinogenicity, teratogenicity and mutagenicity of arsenic [J]. *Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology*, 1980, 75(1): 49-62.
- [7] CHEN C-J, WANG C-J. Ecological correlation between arsenic level in well water and age-adjusted mortality from malignant neoplasms [J]. *Cancer research*,1990,50(17):4-5470.
- [8] FEENSTRA L, ERKEL J, VASAK L. Arsenic in groundwater: Overview and evaluation of removal [J]. *International groundwater resources assessment centre*,2007,(12):46-79.
- [9] YANG H, LI J, JIANG L, et al.The rs878081 polymorphism of AIRE gene increases the risk of rheumatoid arthritis in a Chinese Han population: a case-control study[J].*Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2018,51:12-90.
- [10] LIU C-X, CHEN L-L.Circular RNAs: Characterization, cellular roles, and applications[J].*Cell*,2022,(78):12-34
- [11] GAO M, LI C, XU M, et al.LncRNA MT1DP Aggravates Cadmium-Induced Oxidative Stress by Repressing the Function of Nrf2 and is Dependent on Interaction with miR-365[J].*Advanced Science*,2018, 5(7):1800087.
- [12] 王萌婕.无机砷通过上调 LncRNA MEG3 表达诱导 A549 细胞凋亡及其机制研究[D]; 昆明医科大学, 2021.
- [13] SUN M, TAN J, WANG M, et al.Inorganic arsenic-mediated upregulation of AS3MT promotes proliferation of nonsmall cell lung cancer cells by regulating cell cycle genes[J].*Environmental toxicology*,2021,36(2):12-204.
- [14] 施宏辉, 蒲金定, 何建行.非小细胞肺癌 A549 中 lncRNA-CCAT1 上游调控序列的 Myc 结合模式预测[J].*实用癌症杂志*, 2019,34(6):7-874.
- [15] 罗吉, 罗燕, 李勇敏, et al.健脾消癌方对结肠癌 TGF-β/lncRNA-ATB/miR-200a 信号通路的影响[J].*中国实验方剂学杂志*, 2018,24(6):6-161.
- [16] SUN X, CAI Y, HU X, et al.Long noncoding RNA MAFG-AS1 facilitates bladder cancer tumorigenesis via regulation of miR-143-3p/SERPINE1 axis [J].*Translational Cancer Research*,2020,9(11):7214.
- [17] WU Z-H, WANG X-L, TANG H-M, et al.Long non-coding RNA HOTAIR is a powerful predictor of metastasis and poor prognosis and is associated with epithelial-mesenchymal transition in colon cancer[J].*Oncology reports*,2014,32(1):395-402.
- [18] HE X, TAN X, WANG X, et al.C-Myc-activated long noncoding RNA CCAT1 promotes colon cancer

- cell proliferation and invasion[J].*Tumor Biology*,2014,(35):8-12181.
- [19] LIN H-P, REA M, WANG Z, et al.Down-regulation of lncRNA MEG3 promotes chronic low dose cadmium exposure-induced cell transformation and cancer stem cell-like property[J].*Toxicology and Applied Pharmacology*,2021,430:115724.
- [20] 高小燕, 张韶辉, 魏广和.长链非编码 RNA 牛磺酸上调基因 1 与冠状动脉支架内再狭窄的相关性[J].*临床心血管病杂志*, 2022,38(1):39-43.
- [21] LIANG S, ZHANG S, WANG P, et al.LncRNA, TUG1 regulates the oral squamous cell carcinoma progression possibly via interacting with Wnt/ β -catenin signaling[J].*Gene*,2017,608:49-57.
- [22] 陈猛云, 樊晓明.长链非编码 RNA 在结直肠癌发生发展中的研究进展[J].*复旦学报(医学版)*, 2021,48(2):70-267.
- [23] LI L, ZHANG Q, WANG Y, et al.Knockdown of lncRNA TUG1 attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury through regulating miR-142-3p[J].*BioFactors*, 2021, 47(5):27-819.
- [24] NIU Y, MA F, HUANG W, et al.Long non-coding RNA TUG1 is involved in cell growth and chemoresistance of small cell lung cancer by regulating LIMK2b via EZH2[J].*Molecular Cancer*,2017,16(1):5.
- [25] BALIOU S, KYRIAKOPOULOS A M, SPANDIDOS D A, et al.Role of taurine, its haloamines and its lncRNA TUG1 in both inflammation and cancer progression. On the road to therapeutics[J].*International journal of oncology*,2020, 57(3):64-634.
- [26] ROSEN B P, LIU Z.Transport pathways for arsenic and selenium: a minireview[J].*Environment international*,2009,35(3):5-512.
- [27] CARLIN D J, NAUJOKAS M F, BRADHAM K D,et al.Arsenic and Environmental Health: State of the Science and Future Research Opportunities[J].*Environmental Health Perspectives*,2016,124(7):9-890.
- [28] GUÉRIN T. EVALUATION OF CERTAIN CONTAMINANTS IN FOOD - WHO Technical Report Series,No.959,2011[J].2011, 45:134-567.
- [29] AITIO.Arsenic and Arsenic Compounds - Environmental Health Criteria, No. 224 -Second Edition[J].2001,46:25-67.
- [30] BENCKO V, SYMON K.Health aspects of burning coal with a high arsenic content: I. Arsenic in hair, urine, and blood in children residing in a polluted area[J].*Environmental Research*,1977,13(3):85-378.
- [31] BENCKO V, RAMEŠ J, FABIÁNOVÁ E, et al.Ecological and human health risk aspects of burning arsenic-rich coal [J]. *Environmental geochemistry and health*,2009,(31)43-239.
- [32] RATNAIKE R N.Acute and chronic arsenic toxicity[J].*Postgraduate Medical Journal*,2003,79(933):6-391.
- [33] STATES J C, SRIVASTAVA S, CHEN Y, et al.Arsenic and cardiovascular disease[J].*Toxicological sciences*,2009,107(2):23-312.
- [34] HECK J E, CHEN Y, GRANN V R, et al.Arsenic exposure and anemia in Bangladesh: a population-based study[J].*Journal of occupational and environmental medicine*,2008,7-80.
- [35] SANDERS A P, MESSIER K P, SHEHEE M, et al. Arsenic in North Carolina: public health implications[J].*Environment international*,2012,38(1):6-10.
- [36] CHEN C-L, CHIOU H-Y, HSU L-I, et al.Arsenic in drinking water and risk of urinary tract cancer: a follow-up study from northeastern Taiwan[J].*Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*,2010,19(1):10-101.

- [37] CHEN C-L, CHIOU H-Y, HSU L-I, et al. Ingested arsenic, characteristics of well water consumption and risk of different histological types of lung cancer in northeastern Taiwan[J]. *Environmental research*, 2010,110(5):62-422.
- [38] TCHOUNWOU P B, YEDJOU C G, UDENSI U K, et al. State of the science review of the health effects of inorganic arsenic: perspectives for future research[J]. *Environmental toxicology*, 2019,34(2):188-202.
- [39] 雷梦瑾, 龙艳敏, 胡立刚, et al. 砷化合物的摄入调控机制[J]. *环境化学*, 2022,41(5):79-1469.
- [40] 刘秀丽, 汪倩, 宋超, et al. 不同砷形态在水产品中的毒理及转化研究进展[J]. *农学学报*, 2019,9(12):33.
- [41] BOZACK A K, SAXENA R, GAMBLE M V. Nutritional influences on one-carbon metabolism: effects on arsenic methylation and toxicity[J]. *Annual review of nutrition*, 2018,(38):29-401.
- [42] WEI B, YU J, KONG C, et al. An investigation of the health effects caused by exposure to arsenic from drinking water and coal combustion: arsenic exposure and metabolism [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2017,(24):54-24356.
- [43] YAN G, WANG X, YANG M, et al. Long non-coding RNA TUG1 promotes progression of oral squamous cell carcinoma through upregulating FMNL2 by sponging miR-219 [J]. *American Journal of Cancer Research*, 2017,7(9):1899.
- [44] LI J, ZHANG M, AN G, et al. LncRNA TUG1 acts as a tumor suppressor in human glioma by promoting cell apoptosis [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2016,241(6):9-644.
- [45] DADMARZ R, SGAGIAS M K, ROSENBERG S A, et al. CD4+ T lymphocytes infiltrating human breast cancer recognise autologous tumor in an MHC-class-II restricted fashion [J]. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 1995, 40:1-9.
- [46] 谢婷婷, 张爱华. p53 介导的线粒体凋亡通路在燃煤型砷中毒大鼠肝损伤中的作用 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2014, 28(2):5-210.
- [47] DEBEN C, DESCHOOLMEESTER V, LARDON F, et al. TP53 and MDM2 genetic alterations in non-small cell lung cancer: Evaluating their prognostic and predictive value [J]. *Critical reviews in oncology/hematology*, 2016, 99:63-73.
- [48] BARAK Y, JUVEN T, HAFFNER R, et al. mdm2 expression is induced by wild type p53 activity [J]. *The EMBO journal*, 1993, 12(2): 8-461.
- [49] WU X, BAYLE J H, OLSON D, et al. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop [J]. *Genes & development*, 1993, 7(7a):32-1126.
- [50] 郭瑞, 李绍军. p53 蛋白的结构与功能及磷酸化修饰的生物学效应研究概述 [J]. *生物学教学*, 2020, 45(5): 2-5.
- [51] 令吉明, 王建, 徐晓琳, et al. p53 蛋白磷酸化及其功能 [J]. *生命科学*, 2018, 30(3):40-233.
- [52] JI X, HUANG Q, YU L, et al. Bioinformatics study of cancer-related mutations within p53 phosphorylation site motifs [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014, 15(8):98-13275.

- [54] ENARI M, MATSUSHIMA-HIBIYA Y, MIYAZAKI M, et al. Studies of ATM kinase activity using engineered ATM sensitive to ATP analogues (ATM-AS) [J]. *ATM Kinase: Methods and Protocols*, 2017, 56-145.
- [55] YANG B F, XIAO C, LI H, et al. Resistance to fas-mediated apoptosis in malignant tumours is rescued by KN-93 and cisplatin via downregulation of c-FLIP expression and phosphorylation [J]. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2007, 34(12):51-1245.
- [56] LI B, HUANG N, WEI S, et al. lncRNA TUG1 as a ceRNA promotes PM exposure-induced airway hyper-reactivity [J]. *Journal of hazardous materials*, 2021, 416:125878.

附录

1/1

云南省疾病预防控制中心科学研究伦理委员会
伦理审查批件

批件号	伦审批 2020-07 号		
项目名称	MiRNA 对砷甲基化代谢关键酶调控机制及其遗传毒性		
项目来源	国家自然科学基金		
研究单位与部门	职业健康与放射卫生所		
主要研究者	文卫华		
审查方式	会议审查	审查日期	2020. 3. 12
审查委员	查舜、代解杰、李瑛、林丽、王荣华、高莉、杨祖顺		
审查文件	1、 知情同意书；2、研究方案及相关资料；3、主要研究者简历；4、参与单位情况		
审查意见	同意		
批件有效期	2021 年 1 月-2024 年 12 月		
主任委员签字			
伦理委员会 (盖章)	云南省疾病预防控制中心科学研究伦理委员会		
日期	2020 年 3 月 13 日		

综述

砷与 circRNA 的研究进展

摘要: 砷是一种环境性污染物，主要存在于水资源及食物链中。随着工业、农业和医药的快速发展，砷主要通过开采和冶炼含砷矿物、半导体等释放到人类生活环境中，对全球约 1.6 亿人的健康构成严重威胁。流行病学调查显示，长期砷暴露可导致多种疾病发生，如皮肤癌、肺癌、膀胱癌和肝癌，认知缺陷，心血管疾病，高血压及糖尿病等。流行病学将砷归为危险人类健康的因素之一。环状 RNA (Circular RNA) 是一种非编码 RNA 具有共价闭环结构，在人类健康和疾病中扮演重要角色。因此，本研究将详细介绍砷对 circular RNAs 的作用，为研究砷致癌分子机制提供理论依据。

关键词: 砷; circular RNAs; 疾病

Advances in the study of arsenic and circRNA

ABSTRACT: Arsenic is an environmental pollutant that is mainly found in water resources and the food chain. With the rapid development of industry, agriculture and medicine, arsenic has been released into the human living environment mainly through mining and smelting of arsenic-containing minerals, semiconductors, and herbicides, posing a serious threat to the health of about 160 million people worldwide. Epidemiological surveys show that long-term arsenic exposure can lead to the development of a variety of diseases, such as skin, lung, bladder and liver cancers, cognitive deficits, cardiovascular disease, hypertension and diabetes. Epidemiology classifies arsenic as one of the risk factors for human health. Circular RNA, a non-coding RNA with a covalent closed-loop structure, plays an important role in human health and disease. Therefore, this study will detail the role of arsenic in Circular RNAs and provide a theoretical basis for studying the molecular mechanism of arsenic carcinogenesis.

Keywords: Arsenic; circular RNAs; Diseases.

前言

无机砷 (inorganic arsenic, iAs) 是一种广泛的环境有毒物质, 在对人类健康构成重大潜在威胁的有毒物质中排名第一^[1]。人类主要通过吸入性, 饮用水接触^[2], 现有的实验证据表明砷可以通过氧化应激^[3]、基因毒性损伤和促凋亡途径来发挥其毒性损害作用。环状 RNA (circRNAs) 是一种具有生物活性的核酸分子^[4], 和信使 RNA 不同的是, 环状 RNA 以一种特殊的共价闭环的结构形式存在^[5]。环状 RNA 在 40 多年前就被发现, 因为其含量低, 被看作是 RNA 剪接错误的副产品。环状 RNA 可影响与癌症相关蛋白质的表达, 在癌细胞的增殖、迁移、侵袭和凋亡中发挥着重要作用, 可作为癌症诊断、预后和临床病理特征的可行和重要的生物标志物, 在乳腺癌细胞^[6]和宫颈癌^[7]等细胞中均有表达, 越来越多的证据表明, 环状 RNA 在砷暴露相关疾病的调控中发挥着关键作用。

1.circRNAs 的概述

circRNAs 的发现始于 Sanger^[8] 等人在 1976 年的实验中, 发现植物病毒是由 circRNA 形成的单链共价闭环分子^[9]。Hsu MT 利用电子显微镜发现在猴子肾脏 CV-1 细胞的细胞质中存在一种 circRNA^[10]。1996 年, 发现人细胞中 RNA 转录本的外显子结构, 随着测序技术的发展, 发现人类细胞中 circRNA 的数量也日益增多, 现已知的 circRNA 已经达到 30000 多种^[11]。circRNA 是一种非编码 RNA, 而非编码 RNA 类型包括转移 RNAs (tRNAs)、核糖体 RNAs (RNAs)、小 RNA (如 microRNAs) 和长 ncRNAs (LncRNAs)^[12]。circRNAs 主要分布在细胞质中, 不具备直接编码蛋白质的功能。通过反向剪接等机制建立环状 RNA, 因为其独有环状结构, 所以和线性 mRNA 相比较, 更能够承受 Rnase 酶的消化, 因此它的结构稳定, 高度保守^[13]。circRNA 主要有四种种类: (1) 外显子 circRNA, 具备与 miRNA 结合的化学元件, circRNA 具有下面的特征: 在基因转录后, 可以调控基因表达^[14]。(2) 内含子来源的 circRNA, 主要是核 RNA。(3) 外显子-内含子 circRNA, 主要存在于细胞核, 经科学家推测, 有调控基因, 转录和选择性剪切等功能, 而这些功能在基因表达过程中发挥着重要的作用。

2.circRNAs 的功能

circRNAs 是多种生物学进程中重要的表达载体^[15]。在生物体内发挥着广泛的生理作用。可以作为 RNA 海绵与 miRNA 结合, 通过抑制 mRNA 与 miRNA 在 3' 非翻译区域的结合, 间接调控其下游目标基因的表达^[16]。通过 mRNA 调节的结合蛋白

(RNA binding protein, RBP) 结合 mRNA 结构改变, 从而改变其剪接模式或稳定, 从而调节蛋白编码基因的表达, circRNAs 通过与 mRNA 调节的结合蛋白 (RNA binding protein, RBP) 结合^[17], 进而改变剪接模式或 mRNA 稳定性, 进而调节蛋白编码基因的表达^[18]。一些 circRNA 分子具有可编码蛋白的开放阅读框, 并通过的翻译方式, 直接翻译蛋白或多肽来执行生物学功能^[19]。circRNAs 可以通过与 RNA 聚合酶 II 复合物相互作用来促进基因转录^[20-22]。

3.circRNAs 翻译的调控机制

目前的翻译方法有两种, 一种是通过腺苷甲基化改造 RNA 碱基的修饰过程, 即 N-6-甲基腺苷 (m6A) 修饰, 研究结果发现, 大约半数的雄性生殖细胞里, 含有通过 m6A 修饰的开窗阅读框, 它们能够翻译上百种蛋白质与多肽^[23]。另一种是在 circRNA 翻译过程中添加一个 RNA 功能元件, 即 IRES (内部核糖体进位点) 元件。在没有传统的翻译启动因子时, IRES 可以在 circRNA 上产生两个序列, 以启动翻译。因为 circRNA 独特的环状结构, 只有经由 IRES 招募核糖体启动翻译^[24]。

4.circRNAs 翻译与肿瘤

circRNAs 可以在癌症过程中转录出新的蛋白质, 具有抗癌作用^[25]。Yang Y 等人发现 Circ-FBXW7 可以编码蛋白质 FBXW7-185aa, Circ-FBXW7 的过度表达明显抑制胶质瘤的发生发展^[26, 27]。2018 年, 研究报道了 circ-SHPRH 所翻译的 SHPRH-146a 蛋白, 含有 146 个氨基酸, 是一种肿瘤抑制蛋白^[28]。该蛋白表达升高降低胶质瘤细胞的恶性行为, 延长胶质瘤患者的生存时间^[29]。在胃癌中, circ-MAPK1 可以编码出一种新型蛋白 (含有 109 个氨基酸), 当该蛋白表达量低时, 胃癌患者预后效果差^[30]。circRNAs 基因编码的蛋白表达机制可以为治疗癌症提供靶向药, 作为肿瘤诊断的标志物, 用于预测癌症的预后。

5. circRNAs 的靶向信号通路与癌症

circRNA 主要由前体 mRNA 通过剪接产生, 随着 RNA-seq 的应用。发现 circRNA 表达的变化在癌症的起始和进展中发挥重要作用。它们可以通过靶向相关信号通路参与癌症进展的调控。circTTBK2 作为 miR-217 的海绵体, 上调 miR-7 的表达, 通过一系列反应, 激活 PI3K/AKT 和 ERK 信号通路, 从而抑制胶质瘤的恶性进展^[31]。circITCH 能够通过激活 Wnt 通路来抑制食管鳞状细胞癌的发展^[32, 33]。circPIP5K1A 作

为海绵体，使 miR-671-5p 通过上调，激活胃癌中的 KRT80 和 PI3K/AKT 通路来促进肿瘤进展^[34]。

6. circRNAs 作为分子海绵体与癌症

circRNAs 可以作为基因分子海绵结合 miRNA，从而在转录后蛋白质的水平调节基因的过度表达^[34-36]，进一步参与癌症的细胞增殖的发生发展^[37]。Zhang 等人发现 circ100269 可作为 miR630 的海绵体，与其相互作用，参与胃癌的发生发展。Li 等人^[38]证实 circ-ITCH 作为 miRNA 分子海绵，与多个 miRNA 结合，如果与 miR-7 和 miR-17 结合时，则能增加食管鳞状上皮癌相关血清中的 miR-7 和 miR-17 的表达^[39]。当与 miR-216b 结合时，则会在鼻咽癌发展中产生抑制作用^[40]。Zhong 等发现 circTCF25 可以作为 miR-103a-3p 以及 miR-107 的分子海绵，而 circTCF25 的过度表达能够抑制 miR-103a-3p 及 miR-107，从而增强 CDK6 表达，致使体内、外癌细胞的增殖和转移增强^[41]。

7. 砷

虽然遗传物质对疾病的发生有影响，但已知环境化学品暴露也会影响人类健康^[42]。工业环境中铅、铜和锌的冶炼，发电厂所燃烧的化石燃料，半导体业的生产，以及农药制造等均存在吸入性砷暴露的情况。地方性砷中毒和工农业生产导致的砷污染已经对上千万人口的健康造成危害^[43]，我国是砷污染严重国家之一。砷暴露会影响人类的健康，长期砷暴露会增加罹患肺癌、皮肤癌、肝癌、肾癌和膀胱癌等的风险^[44, 45]。

8. 砷与 circRNAs

长期砷暴露会通过调节 circRNA 的形成，来促进正常细胞的恶性转化。刘起展等人发现亚砷酸钠会导致肝细胞的 circRNA100284 参与了亚砷酸钠诱导肝细胞恶化的过程，其原理是利用 circRNA_100284 与 miR-21 结合，通过催化细胞周期加速来促进细胞增殖作用达到促进正常肝细胞转化为肝癌细胞^[46]。有实验证明了环状 RNA 可以通过直接与其 miRNA 结合，改变下游靶基因的表达，从而参与砷暴露诱导的肺癌的进展。李飞等人发现在砷暴露下，circRNA_BRWD1 的表达降低导致其直接结合的 mRNA（c-JUN、c-MYC 和 CDK6 mRNA）的稳定性增强，从而增加其表达。这一机制促进了肺细胞的恶性转化，最终导致肺癌^[47, 48]。

结语与展望

近年来,关于砷致肿瘤作用机制的研究取得了不少新进展,尤其在分子机制方面,发现环状 RNA 在砷致癌中扮演着重要角色,环状 RNA 是防御肿瘤启动的重要组成部分,其在肿瘤内的表达失衡可能是砷导致健康效应的早期关键事件。目前的砷染毒实验证明 cirRNA 表达改变可引发健康效应,但缺乏有效的人类研究予以补充 cirRNA 在砷致健康效应的相关机制。未来应结合流行病学实验,综合的探讨分析砷暴露导致 cirRNAs 表达,综合的探讨分析砷暴露导致 CircRNAs 表达异常在肿瘤中特殊和重要作用机制,进一步为砷危害高危人群筛查和相关疾病早诊早治提供新思路。

参考文献

- [1] 张吉超. 水体中不同形态砷沿食物链传递特征及其去除方法研究[D]; 广州大学, 2022.
- [2] 王佳婷, 方衡, 杨林洁, et al. 大米中的砷形态对小鼠各组织中砷代谢分布及其病理特征的影响[J]. 现代食品科技, 2020, 36(04): 9-17.
- [3] 张慧杰. PIN1 介导的 ROS 产生在 NAC 拮抗砷诱导肝毒性中的作用机制研究[D]; 广西大学, 2022.
- [4] 李瑞华, 韩明盛, 李雪华, et al. 胚胎期砷暴露对成年小鼠海马神经炎症反应的影响[J]. 山西医药杂志, 2019, 48(14):50-1647.
- [5] 孙宝飞, 杨丹, 罗道朋, et al. 微小 RNA-155 和脑源性神经生长因子在砷对 PC12 细胞损伤中的表达及意义[J]. 贵州医科大学学报, 2023, 48(02):6+64-42.
- [6] 高明明, 俞兆儿, 姚丹, et al. 环状 RNA hsa_circ_0005579 在子痫前期患者胎盘中的表达及对滋养层细胞增殖、迁移及侵袭的影响[J]. 南京医科大学学报(自然科学版), 2022, 42(08): 8-11 12.
- [7] 黎秋容, 庄燕群, 王慧. 同质医疗理念创新型护理在宫颈癌术后患者中的应用效果[J]. 齐鲁护理杂志, 2023, 29(06): 8-115.
- [8] CHEN F, HUANG C, WU Q, et al. Circular RNAs expression profiles in plasma exosomes from early-stage lung adenocarcinoma and the potential biomarkers [J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2020, 121(3): 3-255.
- [9] ROCHA R A, GIMENO-ALCAÑIZ J V, MARTÍN-IBÁÑEZ R, et al. Arsenic and fluoride induce neural progenitor cell apoptosis [J]. Toxicology Letters, 2011, 203(3): 44-237.
- [10] WANG H, YU Y, FAN S, et al. Knockdown of Long Noncoding RNA TUG1 Inhibits the Proliferation and Cellular Invasion of Osteosarcoma Cells by Sponging miR-153 [J]. Oncol Res, 2018, 26(5):73-66 5.
- [11] HUANG G, LI S, YANG N, et al. Recent progress in circular RNAs in human cancers [J]. Cancer letters, 2017, 404:8-18.
- [12] HAN C, SEEBACHER N A, HORNICEK F J, et al. Regulation of microRNAs function by circular RNAs in human cancer [J]. Oncotarget, 2017, 8(38): 64622.
- [13] ALMOUH M, RAZMARA E, BITARAF A, et al. Circular RNAs play roles in regulatory networks of cell signaling pathways in human cancers [J]. Life Sciences, 2022, 120975.
- [14] BARRETT S P, SALZMAN J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions [J]. Development, 2016, 143(11):47-1838.
- [15] ZHENG L, LIANG H, ZHANG Q, et al. circPTEN1, a circular RNA generated from PTEN, suppresses cancer progression through inhibition of TGF- β /Smad signaling[J]. Molecular Cancer, 2022, 21(1): 41.
- [16] XIAO M-S, AI Y, WILUSZ J E. Biogenesis and functions of circular RNAs come into focus [J]. Trends in cell biology, 2020, 30(3): 40-226.
- [17] LI J, SUN D, PU W, et al. Circular RNAs in cancer: biogenesis, function, and clinical significance [J]. Trends in cancer, 2020, 6(4): 36-319.
- [18] XIAO T, ZOU Z, XUE J, et al. LncRNA H19-mediated M2 polarization of macrophages promotes myofibroblast differentiation in pulmonary fibrosis induced by arsenic exposure [J]. Environmental Pollution, 2021, 268:115810.

- [19] LI X, YANG L, CHEN L-L. The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs [J]. *Molecular cell*, 2018, 71(3): 42-428.
- [20] KRISTENSEN L S, ANDERSEN M S, STAGSTED L V, et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs [J]. *Nature Reviews Genetics*, 2019, 20(11):91-675.
- [21] VICENS Q, WESTHOF E. Biogenesis of circular RNAs [J]. *Cell*, 2014, 159(1):4-13.
- [22] ZHOU R, WU Y, WANG W, et al. Circular RNAs (circRNAs) in cancer [J]. *Cancer letters*, 2018, 425: 42-145.
- [23] YU C-Y, KUO H-C. The emerging roles and functions of circular RNAs and their generation [J]. *Journal of biomedical science*, 2019, 26(1): 1-12.
- [24] LIU C-X, CHEN L-L. Circular RNAs: Characterization, cellular roles, and applications [J]. *Cell*, 2022, 434:123-456.
- [25] CHEN L-L. The expanding regulatory mechanisms and cellular functions of circular RNAs [J]. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2020, 21(8):90-475.
- [26] YANG Y, GAO X, ZHANG M, et al. Novel role of FBXW7 circular RNA in repressing glioma tumorigenesis [J]. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 2018, 110(3):15-304.
- [27] BOLHA L, GLAVAČ D. Circular RNA FBXW7: Implication in glioma tumorigenesis [J]. *Transl Cancer Res*, 2018, 7:S4-S521.
- [28] BEGUM S, YIU A, STEBBING J, et al. Novel tumour suppressive protein encoded by circular RNA, circ-SHPRH, in glioblastomas [J]. *Oncogene*, 2018, 37(30): 7-4055.
- [29] ZHOU M, LI L, CHEN B, et al. Circ-SHPRH suppresses cadmium-induced transformation of human bronchial epithelial cells by regulating QKI expression via miR-224-5p [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 220:112378.
- [30] 潘大维, 赵源, 梁佳卉, et al. 环状 RNA 翻译在癌症中的研究进展 [J]. *生命科学*, 2021, 33(9): 60-1153.
- [31] ZHENG J, LIU X, XUE Y, et al. TTBK2 circular RNA promotes glioma malignancy by regulating miR-217/HNF1 β /Derlin-1 pathway [J]. *Journal of hematology & oncology*, 2017, 10(1): 1-19.
- [32] LI F, ZHANG L, LI W, et al. Circular RNA ITCH has inhibitory effect on ESCC by suppressing the Wnt/ β -catenin pathway [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(8): 6001.
- [33] CESANA M, CACCHIARELLI D, LEGNINI I, et al. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA [J]. *Cell*, 2011, 147(2): 69-358.
- [34] TAN X, FU Y, CHEN L, et al. miR-671-5p inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by downregulating FOXM1 expression in breast cancer [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(1):293.
- [35] HANSEN T B, JENSEN T I, CLAUSEN B H, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. *Nature*, 2013, 495(7441): 8-348.
- [36] REN S, LIN P, WANG J, et al. Circular RNAs: promising molecular biomarkers of human aging-related diseases via functioning as an miRNA sponge [J]. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 2020, 18:29-215.
- [37] PANDA A C. Circular RNAs act as miRNA sponges [J]. *Circular RNAs: biogenesis and functions*, 2018, 67-79.

- [38] GUO W, ZHANG J, ZHANG D, et al. Polymorphisms and expression pattern of circular RNA circ-ITCH contributes to the carcinogenesis of hepatocellular carcinoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(29): 48169.
- [39] YANG C, YUAN W, YANG X, et al. Circular RNA circ-ITCH inhibits bladder cancer progression by sponging miR-17/miR-224 and regulating p21, PTEN expression [J]. *Molecular cancer*, 2018, 17(1): 1-12.
- [40] ZHANG F, LUO J, SHI X, et al. Circ-0012417/miR-29c-5p Axis Stimulates Thyroid Cancer Growth [J]. 2020,
- [41] ZHONG Z, LV M, CHEN J. Screening differential circular RNA expression profiles reveals the regulatory role of circTCF25-miR-103a-3p/miR-107-CDK6 pathway in bladder carcinoma [J]. *Scientific reports*, 2016, 6(1): 30919.
- [42] PANDEY S, RAI R, RAI L C. 27 - Biochemical and molecular basis of arsenic toxicity and tolerance in microbes and plants [M]/FLORA S J S. *Handbook of Arsenic Toxicology (Second Edition)*. Oxford; Academic Press. 2023:59-709.
- [43] GAO T, TIAN H, NIU H, et al. Soil phosphatase assay to evaluate arsenic toxicity should be performed at the soil's actual pH [J]. *Science of The Total Environment*, 2023, 859:160184.
- [44] PANDEY N, XALXO R, CHANDRA J, et al. Bacterial consortia mediated induction of systemic tolerance to arsenic toxicity via expression of stress responsive antioxidant genes in *Oryza sativa* L [J]. *Bio catalysis and Agricultural Biotechnology*, 2023, 47:102565.
- [45] GHOSH J, SIL P C. Mechanism for arsenic-induced toxic effects [M]. *Handbook of arsenic toxicology*. Elsevier. 2023:52-223.
- [46] 薛均超, 刘起展. circRNA_100284 通过 miR-217 调控细胞周期在亚砷酸钠所致 HaCaT 细胞恶性转化中的作用及机制; proceedings of the 2018 环境与健康学术会议——精准环境健康: 跨学科合作的挑战论文汇编, F, 2018 [C].
- [47] 戴翔宇. 外泌体 circRNA_100284 在亚砷酸钠所致肝细胞恶性转化中的作用及分子机制 [D]; 南京医科大学, 2019
- [48] 戴翔宇, 陈超, 刘起展. 外泌体 circRNA_100284 在亚砷酸钠所致肝细胞恶性转化中的作用; proceedings of the 2018 环境与健康学术会议——精准环境健康: 跨学科合作的挑战论文汇编, F, 2018 [C].

该研究基金支持

- [1] 国家自然科学基金地区项目，miRNAs 对砷甲基化代谢关键酶调控机制及其遗传毒性。
(编号: 802060591)
- [2] 云南省万人计划一名医专项。(编号: YNWR-MY-2018-012)
- [3] 云南省医学领军人才培养专项。(编号: L-2018016)
- [4] 云南省教育厅科学研究基金项目，As₂O₃ 染毒细胞 LncRNA 表达变化及影响因素研究。
(编号: 2019Y0259)