

PM_{2.5}降尘诱导 A549 细胞 G2/M 期阻滞的机制研究

杨 洁¹, 霍婷婷², 王玉琳¹, 董发勤², 曾娅莉³, 邓建军^{1,3}

(1. 西南医科大学, 四川 泸州 646000; 2. 西南科技大学 固体废物处理与资源化教育部重点实验室, 四川 绵阳 621010;
3. 四川绵阳四〇四医院, 四川 绵阳 621000)

摘 要: PM_{2.5}降尘作用于 A549 细胞后, MTT 法检测细胞存活率, 扫描电镜观察细胞形态, 流式细胞术检测细胞周期改变, RT-PCR 检测周期阻滞相关基因 p53、p21、CDK1、c-myc 和 lncRNA H19 的表达水平, Western-blot 检测周期蛋白 cyclin B1 表达。通过转染 H19 siRNA 干扰 H19 的表达, RT-PCR 检测其对 p53、c-myc 及 CDK1 表达的影响, 以探讨 PM_{2.5}降尘诱导 A549 细胞周期阻滞的作用机制。结果显示, PM_{2.5}降尘暴露可降低 A549 细胞存活率, 随作用浓度及时间增加呈递减趋势, 并可观察到细胞形态破坏, 细胞膜表面吸附聚集大量粉尘颗粒。PM_{2.5}作用于细胞 24 h 后, A549 细胞增殖阻滞在 G2/M 期, 周期阻滞相关基因 p53、p21 及 H19 表达增加, CDK1 及 cyclin B1 表达降低。此外, 转染 H19 siRNA 后成功干扰 H19 的表达, 并调控 CDK1 表达进一步降低。综合以上结果, PM_{2.5}降尘处理 A549 细胞后可通过激活 p53 及 p21 活性, 抑制 CDK1 和 cyclin B1 表达水平, 诱导 G2/M 期阻滞从而抑制细胞增殖。短期暴露于 PM_{2.5}后, lncRNA H19 在染毒细胞中可能发挥特异性癌基因的作用, 通过与 p53 及 c-myc 结合参与调控细胞周期, 干扰 H19 低表达使细胞 G2/M 期阻滞更加明显。

关键词: PM_{2.5}降尘; A549 细胞; G2/M 期阻滞; 毒性机制

中图分类号: P579

文献标识码: A

文章编号: 1000-6524(2017)06-0894-09

Mechanism of G2/M phase arrest in A549 cells induced by PM_{2.5} dust-fall

YANG Jie¹, HUO Ting-ting², WANG Yu-lin¹, DONG Fa-qin², ZENG Ya-li³ and DENG Jian-jun^{1,3}

(1. Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. School of Environment and Resource, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China; 3. Sichuan Mianyang 404 Hospital, Mianyang 621000, China)

Abstract: In this study, A549 cells were exposed to PM_{2.5} dust-fall of different concentrations. MTT assay was used to evaluate cell viability. Cell morphology was observed through Scanning Electron Microscopy (SEM). Flow cytometry was used to detect the cell cycle induced by PM_{2.5}. Then the expression levels of p53, p21, CDK1, c-myc and lncRNA H19 were detected by RT-PCR, and cyclin B1 was measured by Western-blot. In addition, the expression of p53, c-myc and CDK1 in A549 cell was detected after transferring H19 siRNA, with the purpose of investigating the mechanism of A549 cell cycle arrest induced by PM_{2.5}. The results showed that, compared with the control group, A549 cell viability was declined in a dose-dependent manner and time-dependent effect. It was observed that cell morphology was changed and the cell membrane surface adsorbed a large amount of dust particles. The proliferation of A549 cells was inhibited in G2/M phase after being treated by PM_{2.5} for 24 h, and the expression of CDK1 and cyclin B1 was decreased by increasing the expression of p53, p21 and H19. In addition, the expression of H19 was successfully inhibited by transferring H19 siRNA, and

收稿日期: 2017-08-30; 接受日期: 2017-10-30

基金项目: 国家自然科学基金项目(41472046, 41602033); 四川省科技计划项目(2016JY0045)

作者简介: 杨 洁(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: PM_{2.5}对细胞周期的影响研究, E-mail: 13568425145@163.com; 通讯作者: 邓建军(1972-), E-mail: jianjundeng0801@163.com。

then the expression of CDK1 was further decreased. It is inferred that exposure to PM_{2.5} could inhibit the expression of CDK1 and cyclin B1 by activating p53 and p21 activity, induce G2/M phase arrest, and finally inhibit A549 cell proliferation. In addition, after being exposed to PM_{2.5}, lncRNA H19 may play a specific oncogenes role in treated cells in that it participated in the cell cycle progression by binding to p53 and c-myc, and hence low expression of H19 caused G2/M phase arrest more obviously.

Key words: dust-fall (PM_{2.5}); A549 cell; G2/M phase arrest; cytotoxicity mechanism

Fund support: Projects of the National Natural Science Foundation of China(41472046, 41602033); Projects of the Science and Technology of Sichuan Province, China(2016JY0045)

大气细颗粒物(PM_{2.5})是影响空气质量的首要污染物,包括直接排放到大气的一次颗粒物及通过光化学氧化、催化氧化转化生成的二次颗粒物。2016 年绿色和平组织调查显示,我国 362 座城市中有 310 座城市 PM_{2.5}年均浓度超过环境空气质量标准(2010, 35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$),四川省占 7 座城市:自贡、成都、南充、宜宾、泸州、德阳、绵阳。其中绵阳地区空气质量指数(AQI)超过 200, PM_{2.5}的日平均浓度约为 88 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ 。流行病学统计显示,PM_{2.5}与居民呼吸系统疾病的发生发展密切相关,可随呼吸进入人体,导致心肺系统疾病的发病率和死亡率显著上升(Nicky *et al.*, 2012; Bilancia, 2015)。

研究报道,PM_{2.5}暴露可通过炎症反应、免疫毒性、氧化应激和基因毒性等诱导细胞损伤,导致一系列病理改变(Michael *et al.*, 2013; Zeng *et al.*, 2016; 杨洁等, 2016; Jia *et al.*, 2017),但关于 PM_{2.5}暴露诱导细胞周期改变及机制尚不清楚。细胞周期的调节是一个复杂的生物过程,由细胞周期蛋白(cyclin)、细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinases, CDKs)和细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子(cyclin-dependent kinase inhibitor, CDKI/CIP)调节,任何一部分异常均可引起细胞周期紊乱。研究显示长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)参与许多细胞过程,包括细胞氧化应激、细胞凋亡、细胞周期调节、细胞活力和细胞代谢等(Spizzo *et al.*, 2012)。其中 lncRNA H19 在肺癌中表达量升高,并与相邻染色体区域的 c-myc 配对共同扩增,在细胞周期中发挥类似于癌基因的作用。然而,短期暴露于 PM_{2.5}后, lncRNA H19 是否参与细胞周期阻滞过程,其表达模式和功能尚未明确。因此,本文以四川省空气质量超标的 7 个城市之一的绵阳 PM_{2.5}为研究对象,探讨 PM_{2.5}对 A549 细胞周期改变的损伤机制,以期为进一步研究其体外毒理学机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料与仪器

绵阳地区降尘样本由西南科技大学固体废物处理与资源化教育部重点实验室提供。使用卧式行星球磨机(转速 40 Hz)于乙醇中研磨 8 h 后,激光粒度分析仪测定研磨后样品在水溶液中的分散粒度,结果显示大部分粉尘粒径 $\leq 2.5 \mu\text{m}$,符合本实验要求粒度。采用 X 射线衍射仪对样本的主要物相分析结果如图 1 所示,PM_{2.5}降尘中主相为石英。

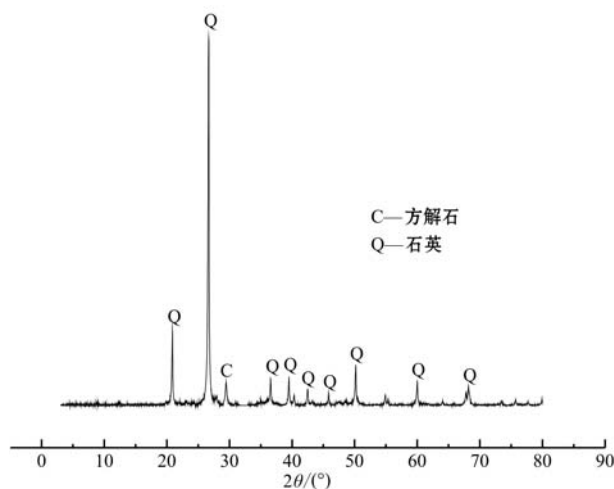


图 1 绵阳地区降尘 PM_{2.5}的 XRD 谱图

Fig. 1 XRD spectrum of PM_{2.5} collected in Mianyang, Sichuan

主要试剂:改良型 RPMI 1640 培养基,胎牛血清(Hyclone); MTT (Methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide)(碧云天);细胞周期检测试剂盒(凯基); TaKaRa MiniBEST Universal RNA Extraction Kit (9767), PrimScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser (RR047A), SYBR (r) Premix Ex Taq™ II (RR820A/B) (TaKaRa); PCR 引物(生

工);抗 Cyclin B1(ab32053, Abcam); Lipo6000TM 转染试剂(碧云天)。

主要仪器:倒置相差荧光显微镜(Axio Observer A1, Zeiss), 微孔板分光光度计(PowerWave XS2, BioTek), 扫描电镜(TM-1000, Hitachi), 流式细胞仪(FACS Calibur, BD), 逆转录仪器(Mastercycler Pro S, Eppendorf), 荧光定量 PCR 仪器(7500 Fast, ABI), Western 电泳仪(164-5051, BIO-RAD)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

人肺上皮细胞株(A549 细胞)购自中国科学院上海生命科学研究院,接种于 25 cm² 培养瓶中,添加含 10% 胎牛血清和 1% 双抗(100 U/mL 青霉素, 100 μg/mL 链霉素)的改良型 RPMI-1460 培养基,于 37℃、5% CO₂、饱和湿度培养箱中培养。待细胞贴壁长至 85% 左右,用 0.25% 的胰蛋白酶消化细胞,培养液终止消化,离心收集细胞,适量培养基重悬细胞,按 1:2 比例传代,继续培养。

1.2.2 细胞活力测定

将 A549 细胞以每孔 200 μL 接种于 96 孔培养板中,于 5% CO₂、37℃、饱和湿度的培养箱中培养过夜。次日分别于每孔加入 0、12.5、25、50、100 和 200 μg/mL 共 6 个浓度的 PM_{2.5} 悬液各 200 μL,每组设 6 个平行孔,继续培养 12、24 和 48 h。加入 10 uL MTT 孵育 4 h 后弃上清液,加入二甲基亚砷溶解结晶后使用紫外分光光度计在 490 nm 波长处测量光密度值(A),并根据公式(1)计算细胞的增值率。为消除粉尘影响,实验设置空白对照组、细胞对照组、粉尘对照组、实验组,其中① 空白对照组:仅加培养基;② 细胞对照组:加细胞悬液和培养基;③ 粉尘对照组:加 PM_{2.5} 悬液和培养基;④ 实验组:加 PM_{2.5} 悬液、细胞悬液和培养基。

$$\text{细胞活力}(\%) = (A_{\text{实验组}} - A_{\text{粉尘对照组}}) /$$

$$(A_{\text{细胞对照组}} - A_{\text{空白对照组}}) \times 100\% \quad (1)$$

1.2.3 细胞形态观察

将 A549 细胞接种于内置灭菌爬片的 12 孔板中,培养 24 h 后分别以每孔 2 mL 加入 50 和 100 μg/mL 的 PM_{2.5} 粉尘悬液,同时设定细胞对照组。染色培养 24 h 后取出细胞爬片,4℃ 预冷的 2.5% 戊二醛固定过夜,0.1 mol/L PBS(磷酸盐缓冲溶液)洗涤 3 次,每次 10 min。随后 1% 锇酸于 4℃ 固定 1 h, PBS 清洗细胞爬片 3 次。利用梯度乙醇(30%、50%、70%、80%、90% 和 95%)脱水各 10 min,100%

乙醇脱水 2 次,每次 15 min。取出爬片,自然干燥,喷金上机,扫描电镜观察细胞形态。

1.2.4 细胞周期检测

实验分为细胞对照组、PM_{2.5} 染毒组(50 和 100 μg/mL)。按照上述步骤将 A549 细胞接种于 6 孔板中,待细胞贴壁后长至约 85% 时,分别以每孔 3 mL 加入含 50 和 100 μg/mL PM_{2.5} 的培养液。共培养 24 h 后胰酶消化收集细胞, PBS 洗涤重悬细胞,调整细胞计数为 5 × 10⁵ 个/mL。70% 乙醇于 4℃ 固定过夜,染色前用 PBS 洗去固定液,加 100 μL RNase A 于 37℃ 水浴 30 min,400 μL 碘化丙啶于 4℃ 避光染色 30 min,流式细胞仪检测 DNA 含量,将细胞周期分为 G0/G1-S 及 G2/M 期。

1.2.5 RT-PCR 检测 CDK1, p21, p53, c-myc 及 H19 表达水平

实验组使用 100 μg/mL PM_{2.5} 染毒 A549 细胞,并设置细胞对照组,每组分别加入 5 mL 不含血清培养基和染毒培养基于培养瓶中,制备为(5~10) × 10⁶ 个/mL 的单细胞悬液。根据细胞 RNA 提取试剂盒要求操作,依次加入相应体积的裂解液、70% 乙醇、Buffer RWA、Buffer RWB 及 RNase free H₂O,收集 RNA。PCR 引物寡核苷酸序列参照 Genbank 中的基因 DNA 序列,用引物设计软件 primer premier 5 软件设计与合成,由上海生物工程技术有限责任公司合成,以 β-actin 作为内参,RT-PCR 检测实验组及对照组 A549 细胞 CDK1, p21, p53, c-myc 及 H19 基因的表达水平。引物序列详见表 1。按照 RT-PCR 试剂盒要求加样体系操作,用 ABI 7500 Fast 荧光定量 PCR 仪检测每个扩增循环后 SYBR(r)Green 荧

表 1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer details used in qRT-PCR

	序列名称	碱基序列(5'-3')
p53	正义序列	CCTCACCATCATCACACTGG
	反义序列	TGAGTTCCAAGGCCTCATTC
p21	正义序列	GACACCACTGGAGGGTAGCT
	反义序列	GGCGTTTGGAGTGGTAGAAAT
CDK1	正义序列	TGGAGAAGGTACCTATGGAGTTG
	反义序列	CCAGGAGGGATAGAATCCAA
c-myc	正义序列	CACCGAGTCGTAGTCGAGGT
	反义序列	GCTGCTTAGACGCTGGATTT
H19	正义序列	GGTAGAAAAAGCAACCACGAAGC
	反义序列	ACATAAACCTCTGTCTGTGAGTGCC
β-actin	正义序列	TCCTCTCCCAAGTCCACACA
	反义序列	GCACGAAGGCTCATCATTTCA

注: A—腺嘌呤, T—胸腺嘧啶, C—胞嘧啶, G—鸟嘌呤。

光信号水平,运用溶解曲线检测扩增产物纯度。PCR 扩增结果用 Ct 值来表示,目的基因的相对表达率(relative expression, RQ)采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 方法计算。

1.2.6 Western-blot 测定周期蛋白 cyclin B1 表达水平

根据前述步骤收集对照组及 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PM_{2.5} 染毒组细胞,加入 200 μL 冰预冷裂解缓冲液,混匀后冰浴 30 min 以充分裂解。随后 4℃,13 000 g 离心 10 min,收集分装上清液,−20℃ 储存。将 15 μL 调整为相同浓度的蛋白裂解液加入 5 μL SDS 上样缓冲液混匀,在 12% 分离胶上电泳分离细胞裂解物,并转移到硝酸纤维素膜上。添加 5% 脱脂奶粉振荡 2 h 封闭,加入至含抗-cyclin B1(用一抗稀释液稀释)的平皿中,4℃ 摇床振荡孵育过夜。继续用 5% 脱脂奶粉封闭液稀释二抗,室温摇床振荡反应 2 h。随后 ECL 化学发光法进行显色反应,使用 G: BOX chemiXR5 成像,使用 Gel-Pro32 软件对结果进行灰度分析。

1.2.7 siRNA 转染干扰 H19 表达

转染前,取对数期 A549 细胞接种于 6 孔培养板中,待细胞长至 30%~50% 时更换为不含抗生素的培养液。实验分为非转染组、H19 siRNA 转染组和阴性对照转染组,引物序列见表 2。按照 Lipo6000TM 转染试剂盒要求加样体系进行操作,H19 siRNA 转染组添加 Lipo6000TM 转染试剂和 siRNA 的混合物,阴性对照转染组添加 Lipo6000TM 转染试剂和 NC 的混合物,进行转染。6 h 后更换培养液,继续培养 3 d。随后分别使用 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PM_{2.5} 染毒 3 组 A549 细胞 24 h,根据 1.2.5 的步骤提取细胞总 RNA,进行 RT-PCR 观察 H19 的干扰效果,并检测转染 H19 siRNA 后 p53、CDK1 和 c-myc 的表达水平。

表 2 PCR 干扰引物序列

Table 2 Primer details used in siRNA

序列名称		碱基序列(5'-3')
si-RNA	正义序列	GCCUUUGAAUCCGGACACATT
	反义序列	UGUGUCCGGAUUCAAGGCTT
NC	正义序列	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	反义序列	ACGUGACACGUUCGGAGAATT

注: A—腺嘌呤, T—胸腺嘧啶, C—胞嘧啶, G—鸟嘌呤, U—尿嘧啶。

1.3 统计学分析

使用 EXCEL 进行数据计算及整理,利用统计学软件 SPSS19.0 进行统计学分析。均值比较采用单因素 ANOVA 分析进行显著性检验,多组间的两两

比较使用 LSD 检验。两独立样本若满足正态分布且方差齐性,组间比较采用独立样本 t 检验;否则,组间比较采用非参数 Mann-Whiney U 检验。 $p<0.05$ 为差异有统计学意义, $p<0.01$ 为差异有显著统计学意义。通过绘图软件 Origin 8.0 进行图形绘制。

2 结果与分析

2.1 PM_{2.5}降尘对 A549 细胞存活率的影响

不同浓度 PM_{2.5} 与 A549 细胞作用 12、24 和 48 h 后,细胞存活率改变如图 2(与对照组相比,** $p<0.01$;与同一染毒浓度不同染毒时间对比,# $p<0.05$)所示。与对照组(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)相比,当粉尘浓度为 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、作用时间为 12 h 时,细胞存活率下降至 $(85.36\pm4.69)\%$,此时差异具有统计学意义。当粉尘浓度达 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、作用时间为 48 h 时,细胞活力下降最明显,约为 $(55.87\pm3.87)\%$ 。相同处理时间下,细胞存活率随染毒浓度增加而递减;相同处理浓度下,细胞存活率随暴露时间增加而呈现递减趋势。

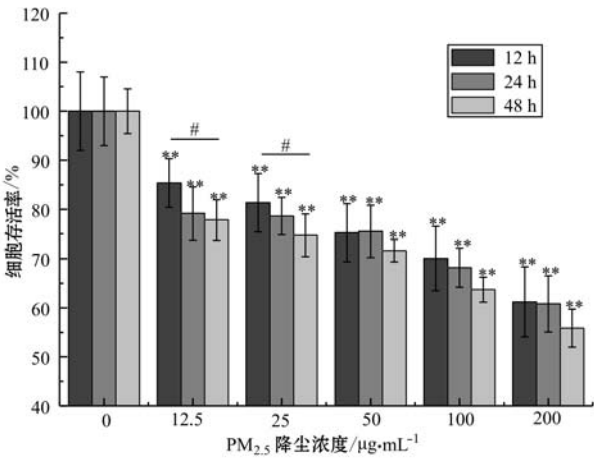


图 2 PM_{2.5}降尘对 A549 细胞存活率的影响

Fig. 2 The effect of PM_{2.5} exposure on cell viability

2.2 PM_{2.5}降尘对 A549 细胞形态的影响

根据细胞毒性试验,选取 50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PM_{2.5} 开展暴露实验,扫描电镜进行细胞形态观察如图 3 所示。图 3a 和 3b 为对照组正常细胞,生长状态良好,细胞形状规则呈梭型,表面光滑,轮廓清晰。图 3A 和 3B 分别为 50 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PM_{2.5} 作用 24 h 后的细胞,染毒组可见细胞形态异常,多以圆形

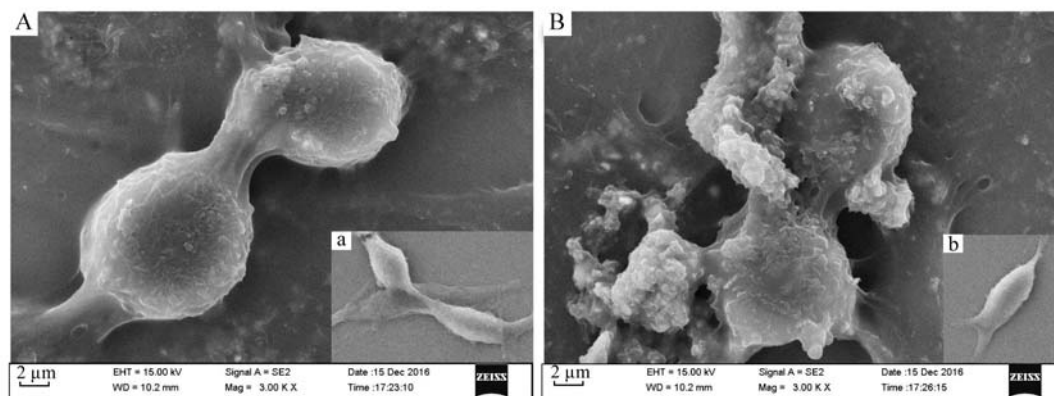


图 3 $PM_{2.5}$ 引起 A549 细胞形态结构破坏

Fig. 3 Cell morphology and structure damage induced by dustfall $PM_{2.5}$ for 24 h

a, b—对照组; A, B— $PM_{2.5}$ 染毒组; A—50 $\mu g/mL$; B—100 $\mu g/mL$

a, b—cell in control group; A, B—cell after exposure to $PM_{2.5}$ at 50 $\mu g/mL$ and 100 $\mu g/mL$

及椭圆形存在,细胞膜表面吸附聚集大量粉尘颗粒,并且随 $PM_{2.5}$ 浓度增加,细胞异常更为明显。

2.3 $PM_{2.5}$ 降尘对 A549 细胞周期的影响

真核细胞周期分为 4 个阶段,包括 G1 期(从有丝分裂完成到 DNA 复制开始之前)、S 期(DNA 复制时期)、G2 期(从 DNA 复制完成到有丝分裂开始之

前)和 M 期(有丝分裂时期),细胞沿着 $G1 \rightarrow S \rightarrow G2 \rightarrow M \rightarrow G1$ 进行运转。G1 期和 G2/M 期 DNA 含量分别为 $2n$ 和 $4n$,S 期则介于 $2n$ 和 $4n$ 之间,因此,利用流式细胞仪可测定细胞周期。本实验检测经 50 $\mu g/mL$ 和 100 $\mu g/mL$ 的 $PM_{2.5}$ 处理后 A549 细胞周期改变情况,对照组及实验组结果如图 4 所示。与

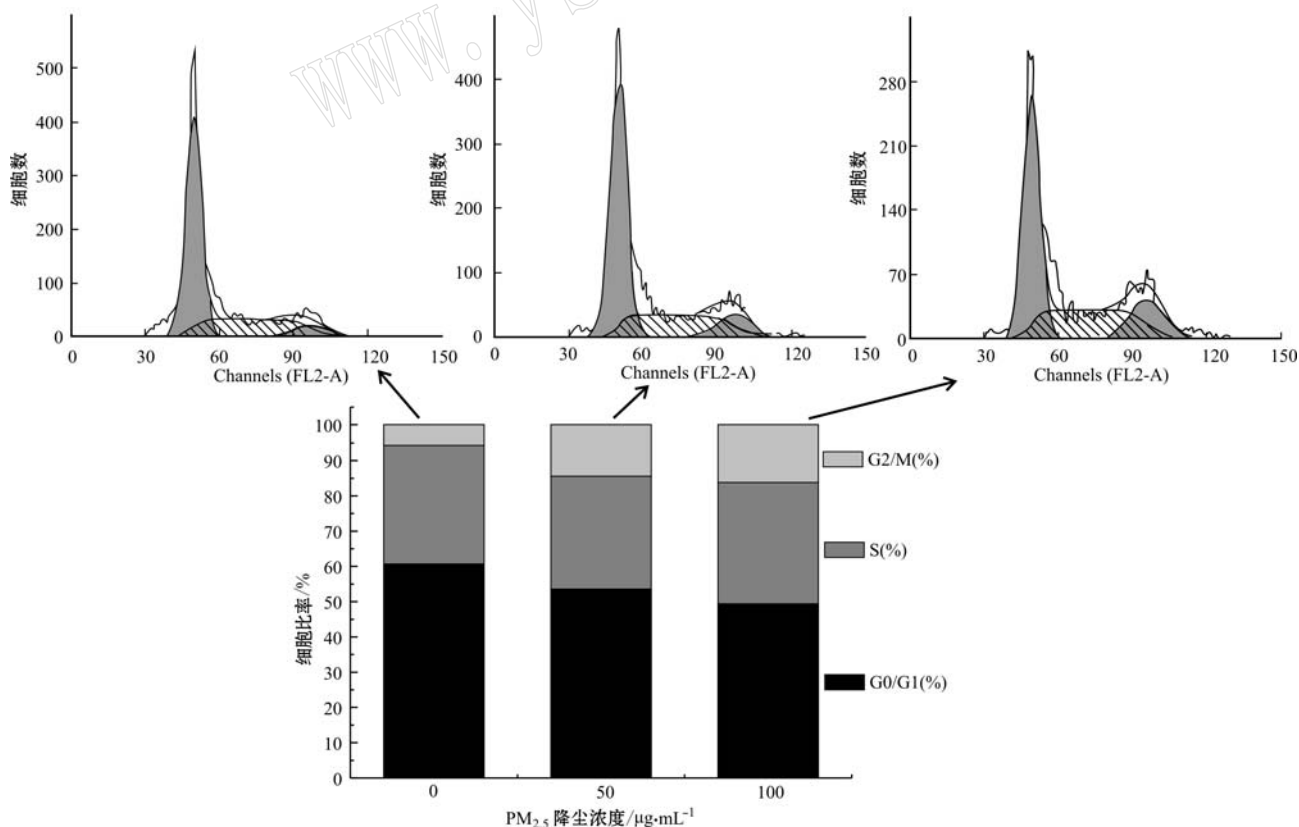


图 4 $PM_{2.5}$ 处理 A549 细胞 24 h 后的细胞周期变化

Fig. 4 The cell cycle alteration of A549 cells after being treated with $PM_{2.5}$ for 24 h

对照组相比,低浓度 PM_{2.5}处理 A549 细胞后,处在 G0/G1 期的细胞比率由 60.72% 减少至 53.57%,处在 S 期的细胞比率无明显变化,处在 G2/M 期的细胞比率显著增加,由 5.68% 增加至 14.43%,差异有统计学意义。随着染毒浓度增加至 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, G2/M 期的细胞比率增加更加明显。

2.4 PM_{2.5}降尘暴露对 p53、p21 和 CDK1 基因及周期蛋白 cyclin B1 表达的影响

PM_{2.5}暴露诱导 A549 细胞分裂阻滞在 G2/M 期,该期阻滞主要由上调的 p53 和 cyclin B/CDK1 蛋

白复合体介导。采用 RT-PCR 检测周期阻滞相关基因 p53、p21 和 CDK1 的表达水平,结果如图 5 所示。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PM_{2.5}处理 A549 细胞后, p53 及 p21 相对表达水平增加, CDK1 相对表达水平降低,差异具有统计学意义($p < 0.01$)。采用 Western-blot 法检测中周期蛋白 cyclin B1 表达水平,结果如图 6 所示, PM_{2.5}作用于 A549 细胞后 cyclin B1/GAPDH 灰度比值降低,表明 cyclin B1 表达水平降低,抑制 G2/M 期细胞向 G1 期过渡,从而使细胞阻滞在 G2/M 期。

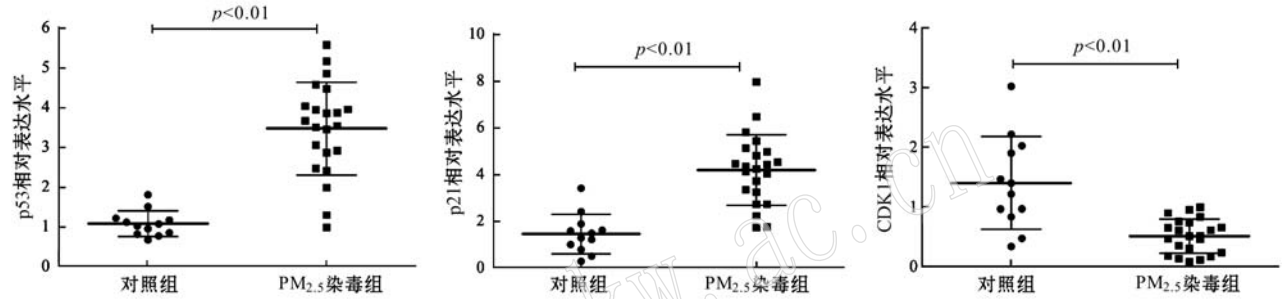


图 5 PM_{2.5}处理 A549 细胞后 p53、p21 和 CDK1 的表达

Fig. 5 The expression of p53, p21 and CDK1 in A549 cells after being treated with PM_{2.5}

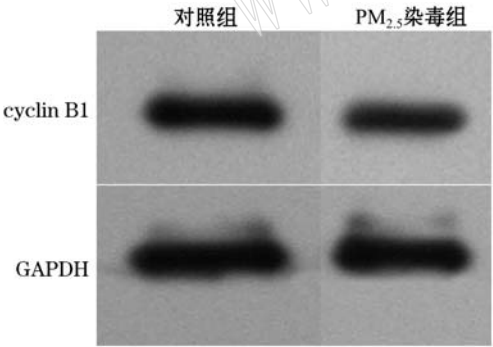


图 6 PM_{2.5}处理 A549 细胞后 cyclin B1 的表达

Fig. 6 The expression of cyclin B1 in A549 cells after being treated with PM_{2.5}

2.5 PM_{2.5}降尘暴露对 c-myc 和 lnc-RNA H19 基因表达的影响

采用 RT-PCR 检测 c-myc 和 lnc-RNA H19 的表达水平,结果如图 7 所示。100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PM_{2.5}处理 A549 细胞后, c-myc 相对表达水平由对照组的 1.14 ± 0.44 增加至 1.46 ± 0.59 ,但差异无统计学意义($p = 0.13$)。同时,与对照组相比,实验组细胞 lnc-RNA H19 相对表达水平升高,差异具有统计学意义

($p < 0.01$)。提示 PM_{2.5}作用于 A549 细胞后, lncRNA H19 与 c-myc 配对共同扩增发挥作用。

2.6 转染 H19 siRNA 后对染毒组 A549 细胞 H19 表达的影响

转染 H19 siRNA 后继续培养 3 d, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PM_{2.5}作用于转染后的 A549 细胞 24 h,结果如图 8 所示。H19 siRNA 转染组与空白对照(未转染组)、阴性对照(NC 转染组)相比, H19 相对表达减少,差异有统计学意义($p < 0.001$),提示转染 H19 siRNA 成功抑制了 H19 基因表达水平。

2.7 转染 H19 siRNA 后对染毒组 A549 细胞 p53、c-myc 及 CDK1 基因表达的影响

转染 H19 siRNA 后染毒组 A549 细胞 p53 及 CDK1 表达改变如图 9 所示。与空白对照组(未转染组)比较, p53 及 c-myc 的相对表达水平降低,但差异无统计学意义; CDK1 相对表达水平明显降低,由未转染组的 1.11 ± 0.26 降低至 0.65 ± 0.21 ,差异有统计学意义。即干扰 H19 表达后,可不同程度影响周期阻滞相关基因 p53、c-myc 和 CDK1 的表达水平,其中对 CDK1 表达抑制最明显。

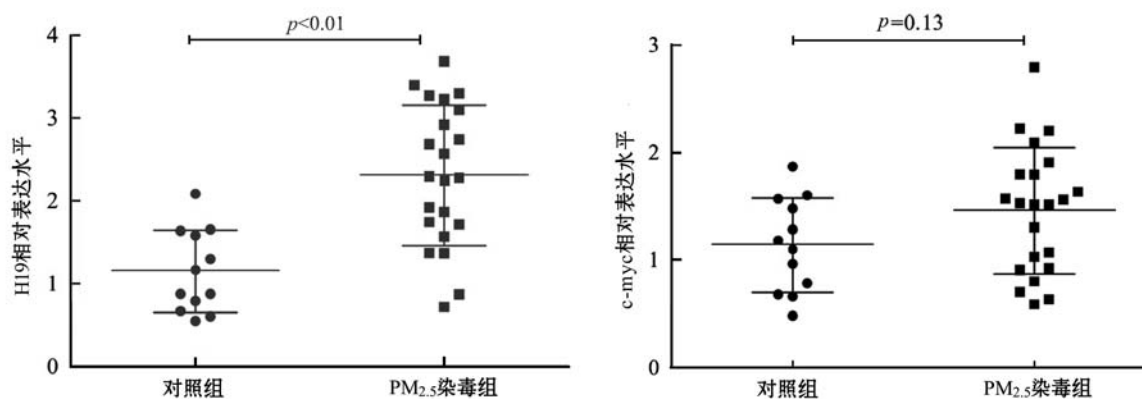


图 7 $PM_{2.5}$ 处理 A549 细胞后 c-myc 和 lnc-RNA H19 的表达

Fig. 7 The expression of c-myc and lnc-RNA H19 in A549 cells after being treated with $PM_{2.5}$

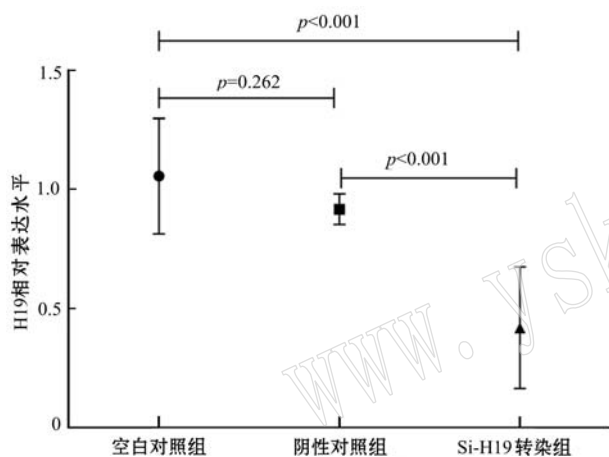


图 8 转染 H19 siRNA 后染毒组 A549 细胞 H19 的表达水平

Fig. 8 The expression of H19 in A549 cell by transferring H19 siRNA

3 讨论

随着我国工业化和城市化进程的加快,生态及环境健康问题日渐显著,全国范围内频繁发生雾霾, $PM_{2.5}$ 已成为严重影响公众健康的环境因素之一。据世界卫生组织(WHO)最新评估显示,每年约有 800 万人死于空气污染,约占全球总死亡的八分之一,在全球疾病负担中排名第 6(www.who.int/mediacentre/news/releases/2014/air-quality/zh)。 $PM_{2.5}$ 可随呼吸进入呼吸系统,运送到肺泡和血液中,导致急性支气管炎、急性肺炎、哮喘及肺部肿瘤等疾病。尽管 $PM_{2.5}$ 的肺毒性机制已成为时下研究热点,然而关于其诱导细胞周期改变及具体机制尚不清楚。因此,基于本课题组前期研究,本次实验着重于研究 $PM_{2.5}$ 降尘对 A549 细胞周期的影响,探讨其诱导 A549 细

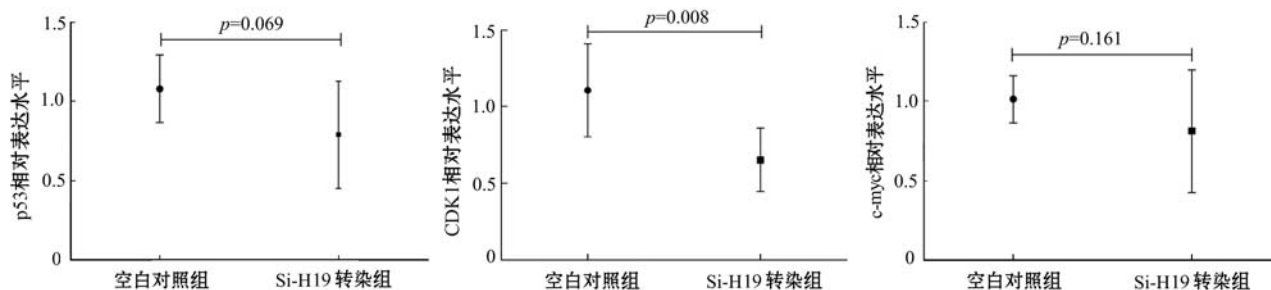


图 9 转染 H19 siRNA 后染毒组 A549 细胞 p53 和 CDK1 基因的表达水平

Fig. 9 The expression of p53 and CDK1 in A549 cell by transferring H19 siRNA

胞周期阻滞的可能机制。

活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使 MTT 还原,通过 MTT 试验可以检测体外培养细胞的增殖能力,反映 PM_{2.5} 的毒性作用大小(Li *et al.*, 2013)。李秋月等(2017)利用 CHO 细胞研究侧流烟气颗粒物的毒性,表明颗粒物暴露可抑制细胞增殖,降低细胞存活力。这与本实验结果是一致的,绵阳地区 PM_{2.5}降尘主相为石英(SiO₂),经不同浓度 PM_{2.5} 作用于 A549 细胞后,观察到细胞形态皱缩破坏,细胞增殖明显受抑,并存在剂量及时间效应关系。有研究提出,真核细胞分裂增殖是通过细胞周期运转来实现的,经 G1 关卡、中期关卡和 G2 关卡 3 个调控点调控(Dodson *et al.*, 2007)。粉尘暴露可通过改变细胞周期进程进而诱导有丝分裂阻滞,随后阻滞细胞出现染色质浓缩及染色质断裂,最终诱导细胞凋亡及坏死(Gualtieri *et al.*, 2011; Yuan *et al.*, 2016)。因此,本实验进一步通过流式细胞仪分析显示,PM_{2.5}染毒引起 A549 细胞 G0/G1 期细胞减少,S 期细胞无明显变化,G2/M 期细胞数增多,提示 PM_{2.5}可以导致 A549 细胞停滞在 G2/M 期,从而抑制细胞增殖。染毒 A549 细胞 G2/M 期停留时间延长,可能与 G2/M 检查点主要由 cyclin B-CDK1 蛋白复合体介导,cyclin B-CDK1 与中心粒组分相互作用,调控细胞周期中 DNA 复制和着丝粒形成有关(Zitouni *et al.*, 2016)。此外,还可能与 PM_{2.5} 作用于细胞后,CDK1-cyclinB 复合物以组蛋白 H1 为作用底物磷酸化细胞骨架蛋白,异常调控染色体集聚及微丝的重组等,阻止 DNA 复制到有丝分裂的进程,导致细胞周期的 G2/M 期停滞有关(Khan *et al.*, 2011)。

Guo 等(2015)研究则认为 PM_{2.5} 暴露可引起细胞 G2/M 期停滞,通过激活抑癌基因 p53 活性,上调细胞周期蛋白激酶抑制剂 p21 表达,进一步下调细胞周期蛋白依赖性激酶 CDK1 和细胞周期蛋白 cyclin B 表达水平,导致细胞生长停滞甚至细胞凋亡(Longhin *et al.*, 2013)。基于本课题组前期研究成果,本实验利用 PM_{2.5} 作用于 A549 细胞,检测到 p53 及 p21 基因相对表达水平增加,CDK1 基因及周期蛋白 cyclin B1 相对表达水平降低。因抑癌基因 p53 是一系列细胞损伤反应的介质,包括在细胞周期阻滞、DNA 损伤修复、细胞凋亡、信号转导等方面的重要调控作用。而 CKI-p21 启动子中含有 p53 结合域,是 p53 的下游信号分子,p53 通过转录激活 p21 的表

达来结合抑制 PCNA(增殖细胞核抗原)的表达,作用于 CDK1-cyclin B 复合物并抑制其活性(Cheng *et al.*, 2009; Godoy *et al.*, 2013),因此我们的结果提示 cyclin B1 表达降低可抑制 G2/M 期细胞向 G1 期过渡,从而使细胞停留在 G2/M 期。

越来越多证据表明 lncRNAs 可与多种癌基因及抑癌基因(如 c-myc 和 p53)相互作用,进而影响 P53、AKT 等信号通路,通过调控细胞周期进程来执行其生物功能,但 lncRNA H19 在 PM_{2.5} 诱导的 A549 细胞周期停滞中的作用机制尚未研究清楚。因此,本实验利用 RT-PCR 检测到 PM_{2.5} 暴露后细胞 H19 表达水平增加,并通过转染 H19 siRNA 干扰 H19 表达后,不同程度影响 p53、c-myc 和 CDK1 的表达水平,其中染毒组 A549 细胞 CDK1 表达显著降低,提示 G2/M 期细胞可能进一步增多。其机理可能是:一方面,H19 的启动子调节区可与 c-myc 基因结合,激活 c-myc 发挥转录因子的作用,提高组蛋白乙酰转移酶(HAT)及 RNA 聚合酶 II(RNAP II)的活性,调控细胞周期、蛋白质合成和线粒体功能(Zhang *et al.*, 2016)。另一方面,H19 可能作为 p53 的下游功能执行者,直接参与调控细胞 G2/M 期阻滞过程。此外,研究发现 H19 在多种肿瘤细胞增殖过程中发挥特异性癌基因的作用(Zhang *et al.*, 2014, 2016),当 PM_{2.5} 作用于 A549 细胞,干扰 H19 表达后细胞阻滞更加显著,即 H19 高表达可促进染毒细胞增殖,H19 低表达可则使细胞 G2/M 期阻滞更加明显,提示染毒 A549 细胞存在部分肿瘤细胞特性。鉴于肿瘤细胞的形成是一个长期过程,接下来将通过 PM_{2.5} 长期隔代染毒 A549 细胞,诱导 A549 细胞恶性转化,进一步探讨 PM_{2.5} 的毒性效应及机制。

4 结论

(1) PM_{2.5} 降尘作用于 A549 细胞可破坏细胞形态,降低细胞活力,并存在剂量及时间依赖性关系。

(2) PM_{2.5} 降尘作用于 A549 细胞后可通过激活 p53 及 p21 活性,抑制 CDK1 和 cyclin B1 表达水平,诱导细胞 G2/M 期阻滞从而抑制细胞增殖。

(3) 短期暴露于 PM_{2.5} 降尘后,lncRNA H19 在 A549 细胞中可能发挥特异性癌基因的作用,通过与 p53 及 c-myc 结合参与细胞周期进程,干扰 H19 低表达使细胞 G2/M 期阻滞更加明显。

References

- Bilancia M. 2015. Relationships between mild PM₁₀ and ozone urban air levels and spontaneous abortion: clues for primary prevention[J]. Int. J. Environ. Health Res., 25(6): 1~16.
- Cheng Y, Qiu F, Ye Y, *et al.* 2009. Oridonin induces G2/M arrest and apoptosis via activating ERK-p53 apoptotic pathway and inhibiting PTK-Ras-Raf-JNK survival pathway in murine fibrosarcoma L929 cells[J]. Arch Biochem Biophys, 490(1): 70~75.
- Dodson H, Wheatley S P and Morrison C G. 2007. Involvement of centrosome amplification in radiation-induced mitotic catastrophe[J]. Cell Cycle, 6(3): 364~370.
- Environmental Air Quality Standard. 2010. GB 3095-2012. Beijing: China Environmental Science Press(in Chinese).
- Godoy P R, Mello S S, Magalhães D A, *et al.* 2013. Ionizing radiation-induced gene expression changes in TP53 proficient and deficient glioblastoma cell lines[J]. Mutat Res. 756(1~2): 46~55.
- Gualtieri M, Ovreik J, Møllerup S, *et al.* 2011. Airborne urban particles (Milan winter-PM_{2.5}) cause mitotic arrest and cell death: effects on DNA, mitochondria, AhR binding and spindle organization[J]. Mutat Res., 713(1~2): 18~31.
- Guo H, Cui H, Peng X, *et al.* 2015. Dietary NiCl₂ causes G2/M cell cycle arrest in the broiler's kidney[J]. Oncotarget, 6(34): 35 964~35 977.
- Jia Y Y, Wang Q and Liu T. 2017. Toxicity research of PM_{2.5} compositions in vitro[J]. Int. J. Environ Res. Public Health, 14(3): 232~248.
- Khan M, Rasul A, Yi F, *et al.* 2011. Jaceosidin induces p53-dependent G2/M phase arrest in U87 glioblastoma cells[J]. Asian Pac. J. Cancer Prev., 12(12): 3 235~3 238.
- Li L, Ye X P, Lu A Z, *et al.* 2013. Hyperglycemia magnifies bupivacaine-induced cell apoptosis triggered by mitochondria dysfunction and endoplasmic reticulum stress[J]. J. Neurosci. Res., 91(6): 786~798.
- Li Qiuyue, Zhang Huashan, Tian Lei, *et al.* 2017. Effects of different-size particles in sidestream cigarette smoke on micronuclear rate and cell cycle in CHO cells[J]. J. Prev. Med. Chin. PLA, 35(2): 110~113(in Chinese with English abstract).
- Longhin E, Holme J A, Gutzkow K B, *et al.* 2013. Cell cycle alterations induced by urban PM_{2.5} in bronchial epithelial cells: characterization of the process and possible mechanisms involved[J]. Part Fibre Toxicol, 10(1): 63~91.
- Michael S, Montag M and Dott W. 2013. Pro-inflammatory effects and oxidative stress in lung macrophages and epithelial cells induced by ambient particulate matter[J]. Environ Pollut., 183: 19~29.
- Nicky P, Michelle P, Bianca C, *et al.* 2012. An epidemiological appraisal of the association between heart rate variability and particulate air pollution: a meta-analysis[J]. Heart, 98(15): 1 127~1 135.
- Spizzo R, Almeida M I, Colombatti A, *et al.* 2012. Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research? [J]. Oncogene, 31(43): 4 577~4 587.
- Yang Jie, Deng Jianjun, Liu Jinbo, *et al.* 2016. Research progress on lung toxicity mechanism of fine particulate matters[J]. J. Environ. Occup. Med., 33(6): 615~619(in Chinese with English abstract).
- Yuan X, Wang Y, Li L, *et al.* 2016. PM_{2.5} induces embryonic growth retardation: Potential involvement of ROS-MAPKs-apoptosis and G0/G1 arrest pathways[J]. Environ Toxicol, 31(12): 2 028~2 044.
- Zeng Y L, Deng J J, Huo T T, *et al.* 2016. Assessment of genetic toxicity with major inhalable mineral granules in A 549 cells[J]. Appl. Clay Sci., 119: 175~182.
- Zhang E, Li W, Yin D, *et al.* 2016. c-myc regulated long non-coding RNA H19 indicates a poor prognosis and affects cell proliferation in non-small-cell lung cancer[J]. Tumour Biol., 37(4): 5 653~5 653.
- Zhang E B, Han L, Yin D D, *et al.* 2014. C-myc induced long noncoding H19 affects cell proliferation and predicts a poor prognosis in patients with gastric cancer[J]. Med. Oncol., 31(5): 1~8.
- Zitouni S, Francia M E, Leal F, *et al.* 2016. CDK1 prevents unscheduled PLK4-STIL complex assembly in centriole biogenesis[J]. Curr. Biol., 26(9): 1 127~1 137.

附中文参考文献

- 环境空气质量标准. 2010. GB 3095-2012[S]. 北京: 中国环境科学出版社.
- 李秋月, 张华山, 田 蕾, 等. 2017. 侧流烟气不同尺度颗粒物对CHO细胞微核率和细胞周期的影响[J]. 解放军预防医学杂志, 35(2): 110~113.
- 杨 洁, 邓建军, 刘靳波, 等. 2016. PM_{2.5}的肺毒性机制研究进展[J]. 环境与职业医学, 33(6): 615~619.