

- trichloroethylene [J]. Ind Health, 2009, 47 (2): 107-112.
- [4] XU Xinyun, WU Peiqiao, KE Yuebin, *et al.* Oxidative stress and inducible nitric oxide synthase expression in human hepatocytes treated with trichloroethylene [J]. Toxicological & Environmental Chemistry, 2010, 92 (4): 801-811.
- [5] 徐新云. 职业接触三氯乙烯的皮肤损害特点及诊断探讨 [J]. 中国公共卫生, 2004, 20 (2): 251-252.
- [6] Goon A T, Lee L T, Tay Y K, *et al.* A case of trichloroethylene hypersensitivity syndrome [J]. Arch Dermatol, 2001, 137 (3): 274-276.
- [7] Nakajima T, Yamanoshita O, Kamijima M, *et al.* Generalized skin reactions in relation to trichloroethylene exposure: a review from the viewpoint of drug-metabolizing enzymes [J]. J Occup Health, 2003, 45 (1): 8-14.
- [8] 赵同刚. 化妆品卫生规范 [M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2007: 116-120.
- [9] Liden C, Boman A. Contact allergy to color developing agents in the guinea pig [J]. Contact Dermatitis, 1988, 19 (4): 290-295.
- [10] Hattori H, Yamaguchi F, Wagai Ni, *et al.* An assessment of antigenic potential of β -lactam antibodies, low molecular weight drugs using guinea pig models [J]. Toxicology, 1997, 123 (1-2): 149-160.
- [11] Yokoyama T, Tanahashi M, Kobayashi Y, *et al.* The expression of Bcl-2 family proteins (Bcl-2, Bcl-x, Bax, Bak and Bim) in human lymphocytes [J]. Immunol Lett, 2002, 81 (2): 107-113.
- [12] Kaufmann T, Schlipf S, Sanz J, *et al.* Characterization of the signal that directs Bcl-xL, but not Bcl-2, to the outer mitochondrial membrane [J]. J Cell Biol, 2003, 160 (1): 53-64.
- [13] Cory S, Adams J M. The Bcl-2 family: regulators of the cellular life-or-death switch [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2 (9): 647-656.
- [14] 越飞, 李来玉, 梁丽燕, 等. 三氯乙烯染毒小鼠免疫功能变化研究 [J]. 中国职业医学, 2004, 31 (3): 24-25.

亚砷酸钠对 HaCat 细胞活力及磷酸化蛋白激酶 B 表达的影响

Effect of sodium arsenite on cell viability and phosphorylated protein kinase B expression in HaCat cells

李昕, 刘世宜, 崔琰, 李冰, 孙贵范

LI Xin, LIU Shi-yi, CUI Yan, LI Bing, SUN Gui-fan

(中国医科大学公共卫生学院劳动卫生教研室, 辽宁省砷生物学作用评价及砷中毒防治重点实验室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 为探讨亚砷酸钠 (NaAsO_2) 对人角质形成细胞 (HaCat) 活力及蛋白激酶 B (PKB/Akt) 磷酸化活化的影响, 本研究以 Alamar Blue 还原法检测 NaAsO_2 (0, 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 HaCat 细胞 6 h 后细胞的活力水平; 并以 Western blot 法检测 NaAsO_2 (0, 25, 50 $\mu\text{mol/L}$) 作用于 HaCat 细胞 6 h 后细胞中磷酸化蛋白激酶 B (p-Akt) 的蛋白表达情况。结果表明, NaAsO_2 作用 6 h, Alamar Blue 还原率随 NaAsO_2 染毒剂量的升高而显著下降, 具有显著的剂量-效应关系; NaAsO_2 染毒组细胞内 p-Akt 表达水平与对照组相比均显著提高, 提示砷性肿瘤的发生可能与 p-Akt 蛋白表达水平增高有关。

关键词: 亚砷酸钠 (NaAsO_2); HaCat 细胞株; 蛋白激酶 B (PKB/Akt)

中图分类号: R994.6 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2011)06-0449-03

砷是经国际癌症研究总署 (IARC) 研究确定的人类致癌物, 长期接触可引起肺癌和皮肤癌。砷作为一种致癌物具有其特殊性, 它是 IARC 确认致癌物中仅有的 2 种未能在动物中复制出致癌模型物质。因此, 大多数探讨砷致肿瘤发生机

制的实验研究主要是从砷对培养细胞的影响入手。目前研究认为, 砷本身不具有致突变作用, 而是通过影响细胞内某些信号转导通路、诱导癌基因表达等途径发挥致癌效应^[1,3]。

蛋白激酶 B (PKB/Akt) 是一个参与细胞生长及代谢的重要激酶, 其磷酸化活化与多种肿瘤的发生关系密切。目前, 关于 PKB/Akt 对于砷致皮肤癌发生过程中的作用方面尚缺乏详细报道。因此, 本研究利用正常人皮肤角质形成细胞 HaCat 细胞株进行研究, 探讨 NaAsO_2 对 HaCat 细胞 PKB/Akt 磷酸化活化的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

NaAsO_2 (纯度 $\geq 99.0\%$, 美国 Fluka 公司); DME 培养基 (美国 Hyclone 公司); 胰蛋白酶 (美国 Hyclone 公司); 胎牛血清 (FBS, 美国 Hyclone 公司); Alamar Blue (美国 Sigma 公司); Bio-Rad 蛋白测定试剂盒 (美国 Bio-Rad 公司); PVDF 膜 (美国 Millipore 公司); Akt [(C-20): sc-4618]、p-Akt [(ser473-R): sc-7985-R] 及 β -actin (I-19: sc-4616) 抗体均购自美国 Santa Cruz 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (ZB-2301, 中杉金桥公司); ECL 显色剂 (美国 Pierce 生物技术公司); 预染蛋白 marker (美国 Fermentas 公司)。

超净工作台 (SW-CJ-1FD, 中国苏净集团安泰公司); CO_2 恒温培养箱 (Hera cell 150, 荷兰 Heraeus 公司); 全自动酶标仪 (Labsystems Multiskan Ascent 354, 芬兰 Labsystems 公司); Western blot 装置 (Mini, 美国 Bio-Rad 公司); 电泳凝胶成像分析仪 (IMAGER 5500, 美国 ALPHA 公司)。

收稿日期: 2011-06-22; 修回日期: 2011-07-13

基金项目: 辽宁省教育厅课题 (L2010705): PI3K-PKB/AKT 信号通路在砷致肿瘤发生中的机制研究

作者简介: 李昕 (1975—), 女, 博士, 副教授, 从事砷的生物学作用及砷中毒防治的研究, E-mail: lixin@mail.cmu.edu.cn。

1.2 细胞培养

HaCat 细胞株购自中科院上海细胞库, 细胞常规培养于 DMEM 培养基 (10% FBS, 100 U/ml 青链霉素), 在 5% CO₂、37 °C 条件下培养。

1.3 细胞活力测定

将 HaCat 细胞以 1×10^5 个/ml 密度接种于 96 孔板, 待细胞进入对数生长期后, 分别以不同浓度 NaAsO₂ (0, 5, 10, 25, 50, 100 μmol/L) 作用于 HaCat 细胞 6 h, 每个浓度设 7 个复孔。待染毒终点, 弃去培养液。向含细胞孔中每孔加入含 10% Alamar Blue 的培养液 200 μl。无细胞的 6 个对照孔分为两组, 每组 3 孔。分别是 Alamar Blue + 培养基对照组和单纯培养基对照组。37 °C、5% CO₂ 培养箱中继续孵育 4 h 后, 以酶标仪分别于 540 nm 和 620 nm 测定 OD 值, 并计算还原率。测定应用软件为 Ascent lab system。最终实验结果以各染毒组 Alamar Blue 还原率与对照组 Alamar Blue 还原率的相对比值表示。Alamar Blue 还原率的计算公式如下:

$$\text{还原率} (\%) = (A_{540} - A_{620} \times R) \times 100$$

$$R = (A_{A540} - A_{R540}) / (A_{A620} - A_{R620})$$

A_{A540} : 波长 540 nm Alamar Blue + DMEM 培养基的吸光度;

A_{R540} : 波长 540 nm 时 DMEM 培养基的吸光度;

A_{A620} : 波长 620 nm Alamar Blue + DMEM 培养基的吸光度;

A_{R620} : 波长 620 nm 时 DMEM 培养基的吸光度;

A_{540} : 波长 540 nm 时的样品吸光度;

A_{620} : 波长 620 nm 时样品吸光度。

1.4 p-Akt 蛋白表达水平测定

1.4.1 蛋白提取及浓度测定 HaCat 细胞株接种于 10 cm 培养皿, 待细胞进入对数生长期后以 NaAsO₂ 作用于细胞, 终浓度分别为 0、25、50 μmol/L, 染毒时间 6 h。待染毒终点, 弃去含砷培养液, PBS 清洗 3 次, 最后一次吸净 PBS, 加入细胞裂解液 (100 μl/皿), 冰上裂解 30 min 后, 用细胞刮收集细胞, 离心 (4 °C, 12 000 × g, 5 min) 后取上清蛋白, 以 Bio-Rad 试剂盒法测定蛋白浓度。

1.4.2 Western blot 蛋白检测 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行蛋白表达水平检测。特异性一次抗体为抗 Akt (1:500 稀释)、p-Akt (1:500 稀释) 及 β-actin 抗体 (1:1 000 稀释)。特异性二次抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG (1:5 000 稀释)。以 ECL 液显色后, 立即用凝胶成像分析仪对其进行曝光显像, 并用凝胶成像分析系统进行蛋白灰度值分析, 最终结果以各实验组的平均灰度值与对照组的平均灰度值的相对比值表示。

1.5 统计学分析

用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析, 对照组与各染毒组间差异的比较采用单因素方差分析法 (ANOVA), 并以 LSD 法进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NaAsO₂ 对 HaCat 细胞活力的影响

不同浓度 NaAsO₂ 作用于 HaCat 细胞 6 h 后, 各染毒组 Alamar Blue 还原率均显著低于对照组 ($P < 0.01$), 细胞活力

随染毒剂量增高而下降, 详见表 1。

表 1 NaAsO₂ 染毒 6 h 后 HaCat 细胞活力 ($\bar{x} \pm s$, $n = 7$)

NaAsO ₂ (μmol/L)	细胞活力 (%)
0	100.00 ± 1.13
5	96.40 ± 1.05*
10	94.29 ± 2.52*
25	87.90 ± 1.97*
50	79.86 ± 2.58*
100	70.95 ± 2.34*

注: 与 0 μmol/L 组相比, * $P < 0.01$ 。

2.2 NaAsO₂ 对 p-Akt 蛋白表达水平的影响

由图 1 可见, 25 及 50 μmol/L NaAsO₂ 作用于 HaCat 细胞 6 h 后, 染毒组细胞内 p-Akt 蛋白表达水平均显著高于对照组。

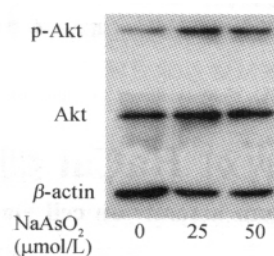


图 1 NaAsO₂ 染毒 6 h 对 p-Akt 蛋白表达水平的影响

3 讨论

近年来的研究发现, p-Akt 高表达现象普遍存在于多种肿瘤发生的过程中。有少量报道指出, 砷致肿瘤的发生可能与 PKB/Akt 的磷酸化活化有关。Liu 等^[9] 研究发现, 低浓度砷 (0.01 ~ 1 μmol/L) 作用于乳腺上皮 MCF10A 细胞株 72 h, 可显著激活 PKB/Akt, 促进细胞周期从 G₁ 期向 S/G₂ 期进展, 诱导细胞周期蛋白 cyclin D1 表达, 促进细胞增殖, 并具有剂量-效应和时间-效应关系。Wen 等^[10] 将小鼠气道上皮 SAEC 细胞分别进行短期 (0.5、2.0 μg/ml, 3 个月) 及长期 (0.5 μg/ml, 1 年) 砷暴露后, 均发现细胞中 PKB/Akt 的磷酸化表达水平显著增高, 细胞增殖率及非锚定依赖生长能力显著增强, 提示砷致肺癌的发生可能与 PKB/Akt 有关。Zhang 等^[11] 将小鼠上皮 JB6 细胞株暴露于 2 μmol/L NaAsO₂ 16 周, 发现磷酸化 PKB/Akt 及其下游效应因子 p70S6K 的表达水平均显著增高, 同时细胞增殖及恶性转化水平增高。但到目前为止, 关于 PKB/Akt 在砷致肿瘤发生过程中作用的研究报道相对较少。

为探讨砷致皮肤癌的发生是否与 PKB/Akt 的磷酸化活化有关, 本研究以正常人皮肤角质形成细胞 HaCat 细胞株进行研究, 探讨 NaAsO₂ 对 HaCat 细胞中 PKB/Akt 磷酸化活化的影响。结果发现: 25 及 50 μmol/L NaAsO₂ 作用于 HaCat 细胞 6 h 后, 细胞内 p-Akt 的蛋白表达水平均显著高于对照组, 提示 NaAsO₂ 能诱导 HaCat 细胞 p-Akt 蛋白的表达, 说明砷致皮肤癌的发生可能与 PKB/Akt 的磷酸化活化有关。但砷暴露下, 活化的 PKB/Akt 如何通过调节其下游调控凋亡、调控细胞周期的信号因子及转录因子参与砷性皮肤癌的发生过程还有待进一步研究。

(下转第 454 页)

疗卫生机构取得了职业健康检查资质,并开展了相应的工作,在扩大职业健康检查的范围和覆盖率、保护劳动者的健康等方面取得了一定成绩。为了全面了解我市职业健康检查机构的工作质量,2009 年 12 月市卫生局组织专家对 8 家职业健康检查机构进行了督导检查,现报告如下。

1 调查方法

以调查表形式,对职业健康检查机构的工作量,仪器设备情况,健康检查过程的质量控制,个体报告、总结报告的规范性进行调查,并随机抽取了部分 X 线胸片,对职业病网络直报进行了现场检查。

2 结果

2.1 基本情况

被调查的 8 家机构,有 1 家为综合医院,7 家为厂矿职工医院,医院规模、专业技术人员数、专职职业病防治人员数、仪器设备基本可满足体检需要,8 家均未取得职业病诊断资质。

2.2 存在的问题

2.2.1 超出批准范围进行了职业健康检查的有 4 家,项目包括甲醇作业、电离辐射作业、锰作业、苯胺作业、氢氟酸作业等。

2.2.2 对职业危害种类界定不清或错误的有 2 家,如体检时将接害种类描述为酸碱作业、煤气作业、刺气作业、有害气体、有机溶剂等;还有的机动车驾驶员不按特种作业(职业机动车驾驶作业)而按汽油作业体检;电工作业按有机溶剂体检项目体检;电镀作业按镅作业检查,未按铬作业检查,因此未作皮肤和鼻镜检查;电焊作业没有按锰接害因素检查,而按铝作业检查。

2.2.3 体检表中的检查内容、个体结论、总结报告书写不够规范的有 6 家,主要有不按规范中所确定的目前未见异常、复查、疑似职业病、职业禁忌证、其他疾病或异常 5 种结论出具体检报告,没有复查的建议,也没有复查的结论。有的机构高温作业岗位的 2 级、3 级高血压患者既未建议复查,也未列为职业禁忌证;对噪声作业上岗前体检达到职业禁忌证标准而未识别,还有的电测听结果计算方法错误,结论和电测听图不符或不进行年龄修正就判定为感音性聋;有的进行苯、噪声、粉尘作业职业健康体检时依据的标准是修订前的旧标准,有 1 家直接出具了噪声聋的结论。

2.2.4 X 线胸片达不到尘肺诊断质量的有 6 家机构,主要是所拍胸片灰雾度大,锐利度不佳,有 1 家的胸片无胸片号,有异物影,还有 1 家医院的胸片均为废片。

2.2.5 电测听室的设计有缺陷,有 1 家体检机构测听室的墙壁大部分使用了玻璃隔断,隔音效果达不到要求,还有的单位用于体检的部分设备没有经过质量技术监督局的鉴定。

2.2.6 有 3 家职业健康检查机构不申请“健康危害因素监测信息系统”网络直报的账户和密码,体检信息没有进行网络直报。

3 结论和建议

通过调查发现,我市取得职业健康检查资质的 8 家非疾控体系的医疗机构,仪器设备等条件与临床检查检验能力基本能满足其申请的职业健康检查资质要求。存在的问题主要是这些机构的专业技术人员在职业健康检查方面的业务能力偏低,尤其是主检医师的专业水平。这些职业健康检查机构中大多没有从事过职业病防治工作 3 年以上的中级以上职称的专业技术人员(8 家中仅有 1 家有专职的具有主治医师以上职称的职业病医师),体检和出具体检报告的医师,大多为没有经过专业培训的临床医师,对职业病防治有关的法律法规和标准不熟悉,职业健康监护的目的不清楚,个别的将职业健康体检混同于一般的健康检查,没有起到早期发现职业病、职业健康损害和职业禁忌证的作用,更谈不上跟踪观察职业病及职业健康损害的发生、发展规律及分布情况,尤其是不能起到评价职业健康损害与作业环境中职业病危害因素的关系及危害程度、识别新的职业病危害因素和高危人群的作用。

当前我国的职业危害形势仍然十分严峻,仅仅依靠疾控体系来完成庞大的职业健康体检有困难,如何规范和管理非疾控体系从事职业健康体检的医疗机构的理念和技术行为,使他们在职业健康体检工作中真正起到(1)及时发现职业禁忌证,筛选职业危害易感人群;(2)及时发现职业性健康损害,评价健康变化与职业危害因素的关系;(3)及时发现、诊断职业病,以利及时治疗或安置职业病人;(4)为职业危害评价、职业危害治理效果(干预措施效果)评价提供科学依据;(5)进行目标干预;(6)为行政执法提供证据的作用就彰显重要。建议卫生行政部门和监督部门制定定期培训、考核和检查的长效机制,加强专业人员的职业道德和技术素养建设,提高职业卫生服务的质量和效益,对检查考核中达不到要求的限期整改,仍无效的要取消其相应的资质,对出具不正确体检结论的,尤其是对接害职工或用人单位造成损失的责任医师和有关领导要给予相应的处罚。只有这样,职业健康检查工作才能健康有序地发展,职业健康检查机构才能真正成为工人健康的守护神。

(上接第 450 页)

参考文献:

- [1] Schuhmacher-Wolz U, Dieter H H, Klein D, *et al.* Oral exposure to inorganic arsenic: evaluation of its carcinogenic and non-carcinogenic effects [J]. *Crit Rev Toxicol*, 2009, 39 (4): 271-298.
- [2] Druwe I L, Vaillancourt R R. Influence of arsenate and arsenite on signal transduction pathways: an update [J]. *Arch Toxicol*, 2010, 84 (8): 585-596.
- [3] Liu Y, Hock J M, Sullivan C, *et al.* Activation of the p38 MAPK/

Akt/ERK1/2 signal pathways is required for the protein stabilization of CDC6 and cyclin D1 in low-dose arsenite-induced cell proliferation [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111 (6): 1546-1555.

- [4] Wen G, Hong M, Calaf G M, *et al.* Phosphoproteomic profiling of arsenite-treated human small airway epithelial cells [J]. *Oncol Rep*, 2010, 23 (2): 405-412.

- [5] Zhang Y, Wang Q, Guo X, *et al.* Activation and up-regulation of translation initiation factor 4B contribute to arsenic-induced transformation [J]. *Mol Carcinog*, 2011, 50 (7): 528-538.