

网络出版时间: 2017-9-8 12:37 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170908.1237.020.html>

◇预防医学研究◇

镉处理对小鼠睾丸间质细胞 PI3K/AKT 信号通路的影响

姬艳丽^{1,2}, 刘洪茂¹, 穆柯瀚¹, 朱文祥², 徐德祥³

摘要 目的 探讨镉对小鼠睾丸间质细胞 3-磷酸肌醇激酶/蛋白激酶 B(PI3K/AKT) 信号通路的影响。方法 TM3 细胞经 20 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理,分别在加入 CdCl_2 4 h 和 8 h 后收集细胞;对照组给予相应体积的 PBS 8 h 后收集细胞。利用实时定量 RT-PCR 法测定炎症相关细胞因子白细胞介素(IL)-10、肿瘤坏死因子(TNF)- α 、IL-6、单核细胞趋化蛋白(MCP)-1、巨噬细胞炎性蛋白(MIP)-2、MIP-1 和环氧合酶(COX)-2 mRNA 的表达水平以及用 Western blot 法检测细胞 COX-2、AKT 和 p-AKT 蛋白的表达水平。结果 与对照组相比,镉能够显著诱导 TNF- α 和 IL-6 mRNA 的表达($P < 0.01$);镉处理 4 h 组 MCP-1 mRNA 表达水平明显高于对照组($P < 0.01$),而镉处理 8 h 组 MCP-1 mRNA 表达水平与对照组相比差异无统计学意义;镉对 TM3 细胞 MIP-1 和 MIP-2 mRNA 表达差异无统计学意义;镉能够明显诱导 TM3 细胞 COX-2 蛋白和 mRNA 的表达($P < 0.01$)。此外,镉处理组 p-AKT 蛋白表达水平也明显高于对照组($P < 0.01$)。结论 镉可能通过激活 TM3 细胞中 PI3K/AKT 信号通路进而选择性调节部分炎症相关细胞因子的表达。

关键词 镉; 睾丸间质细胞; 炎症; 3-磷酸肌醇激酶/蛋白激酶 B

中图分类号 R 994.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1670-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.020

镉及其化合物是一种生物蓄积性强、毒性持久、具有“三致”作用的重金属毒物^[1],被广泛应用于电镀、合金和镍镉电池等工业生产中以及杀虫剂和磷肥缓释剂等农业生产中^[2]。在日常生活中,一般人群可以经饮水、食用受镉污染的食物和吸烟等途径暴露于较低水平的镉^[3],这对人体健康形成很大的潜在风险。一项体外研究^[4]表明,镉处理可以显著

增加小鼠原代成骨细胞中环氧化酶(cyclooxygenase, COX)-2 的蛋白表达水平;另一项体外研究^[5]也显示,在人原代单核细胞培养过程中给予氯化镉(CdCl_2)处理会刺激肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 的表达;此外,镉暴露被证实可以诱导呼吸道上皮细胞中白细胞介素(interleukin, IL)-8 的表达^[6]。以上的结果提示镉能够诱发炎症,但是其确切的作用机制目前尚不清楚。

该研究以体外培养的 TM3 细胞为研究对象,该细胞位于小鼠睾丸间质,分布于曲细精管之间的疏松结缔组织中,含量占睾丸细胞数量的 2% ~ 4%^[7]。该实验对小鼠睾丸间质细胞进行镉染毒处理,通过相关方法检测细胞内 3-磷酸肌醇激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B, PI3K/AKT) 信号通路中相关蛋白表达水平以及部分炎症相关细胞因子 mRNA 的表达水平,以探讨镉对 TM3 细胞 PI3K/AKT 信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与细胞株 CdCl_2 购自美国 Sigma 公司;逆转录和聚合酶链反应试剂盒(reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 购自美国 Promega 公司;TRIzol 试剂盒购自美国 Invitrogen 公司;PVDF 膜购自美国 Millipore 公司;化学发光增强检测试剂盒购自美国 Thermo 公司; β -actin、COX-2、p-AKT 和 AKT 抗体购自美国 Santa Cruz 公司;18S、COX-2、IL-6、IL-10、TNF- α 、单核细胞趋化蛋白(monocyte chemotactic protein, MCP)-1、巨噬细胞炎性蛋白(macrophage inflammatory protein, MIP)-1、MIP-2 和 COX-2 特异性引物由上海生工生物工程技术服务公司合成;PBS 缓冲液以及 DMEM/F12 培养基购自美国 Hyclone 公司;胰蛋白酶、青霉素-链霉素溶液、马血清及胎牛血清购自江苏碧云天生物技术有限公司;小鼠睾丸间质细胞系 TM3 细胞购自中国科学院上海生命科学研究院。

1.2 培养条件和分组 TM3 细胞在 75 cm^2 培养瓶中贴壁培养,DMEM/F12 培养基含 5% 灭活胎牛血

2017-07-07 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31571557); 2016 年高校优秀中青年骨干人才国外访学研修重点项目(编号: gxfxZD2016039); 安徽医科大学“青年拔尖人才支持计划”

作者单位: 安徽医科大学公共卫生学院¹ 劳动卫生与环境卫生学系、² 卫生检验与检疫学系、³ 卫生毒理学系,合肥 230032

作者简介: 姬艳丽,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: jiyanyan@126.com

清、2.5% 灭活马血清以及 1% 青霉素 - 链霉素溶液,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。取对数生长期细胞,以 0.25% 胰蛋白酶消化,制成 1×10^6 /ml 细胞悬液。加样器接种细胞于 6 个 25 cm² 培养瓶中,每组 2 瓶,每瓶加 10 ml 细胞悬液,置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 36 h,待细胞长满后更换培养基培养液开始染毒, CdCl₂ 剂量为 20 μmol/L, 对照组加相应体积的 PBS, 4 h 后收细胞即为 4 h 组, 再过 4 h 后收对照组和 8 h 组的细胞, 此处收集的细胞用于 Western blot 实验; 加样器接种细胞于 12 个 25 cm² 培养瓶中, 每组 4 瓶, 每瓶加 10 ml 细胞悬液, 置于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养 36 h, 待细胞长满后开始染毒 8 h 组和对照组, CdCl₂ 剂量为 20 μmol/L, 对照组加相应体积的 PBS, 4 h 后收细胞为 4 h 组, 再过 4 h 后收对照组和 8 h 组的细胞, 此处收集的细胞用于 RT-PCR 实验。

1.3 Western blot 检测蛋白的表达 按照参考文献^[8]方法利用 RIPA 提取液提取细胞总蛋白后, 采用 BCA 试剂盒法进行蛋白定量。每孔上 15 μg 蛋白, 进行垂直电泳(浓缩胶电压 60 V, 分离胶电压 120 V) 2.5 h, 再以平行电泳的方式将凝胶中的蛋白条带转移到 PVDF 膜上。转移有蛋白的 PVDF 膜在 5% 的脱脂牛奶中放在 4 ℃ 冰箱中封闭过夜。PVDF 膜分别用一抗(β-actin: 1 : 4 000、p-AKT: 1 : 1 000、AKT: 1 : 1 000、COX-2: 1 : 1 000) 室温孵育 1 ~ 3 h。洗涤后的 PVDF 膜用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG(β-actin: 1 : 100 000)、山羊抗兔 IgG(p-AKT: 1 : 80 000、AKT: 1 : 80 000、COX-2: 1 : 100 000) 于摇床上室温孵育 1 ~ 2 h。洗涤后的 PVDF 膜采用化学发光显影仪检测目的蛋白的表达水平。以目的蛋白条带的灰度值与内参蛋白条带的灰度值的比值表示目的蛋白的相对表达量。

1.4 实时定量 RT-PCR 引物基因由上海生工生物工程技术服务有限公司合成, 其序列见表 1。用 TRIzol 试剂法提取镉处理后的各组细胞总 RNA, 随后用 AMV 法对样品 RNA 进行逆转录。扩增反应使用 LightCycler® 480 PCR 仪, 扩增条件为 94 ℃ 预变性 4 min, 95 ℃ 变性 15 s, 60 ℃ 退火 15 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 共 45 个循环反应^[9]。所有的实时定量数据均使用 PCR 仪软件进行相对定量分析, 用 18S 作内对照。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析。实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。单因素方差分析(one-way ANOVA) 检验各组之间的差异有无统计学意

义, 组间比较采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 实时定量 PCR 引物的基因序列

基因	基因序列
18S	F: 5'-GTAACCCGTTGAACCCCATTT-3' R: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'
IL-10	F: 5'-GCTCCTAGAGCTGCGGACTGC-3' R: 5'-TGCTTCTCTGCCTGGGGCATCA-3'
TNF-α	F: 5'-CCCTCCTGGCCAACGGCATG-3' R: 5'-TCGGGGCAGCCTTGTCCCTT-3'
IL-6	F: 5'-AGACAAAGCCAGAGTCTCTCAGAGA-3' R: 5'-GCCACTCCTTCTGTGACTCCAGC-3'
MCP-1	F: 5'-GGCTGGAGAGTACAAGAGG-3' R: 5'-GGTCAGCACAGACCTCTCTC-3'
MIP-1	F: 5'-GCAACCAAGTCTTCTCAGCG-3' R: 5'-TGGAATCTTCCGGCTGTAGG-3'
MIP-2	F: 5'-TTGCCTTGACCTGAAGCCCCC-3' R: 5'-GGCACATCAGGTACGATCCAGGC-3'
COX-2	F: 5'-GGGCTCAGCCAGGCAGCAAT-3' R: 5'-GCACTGTGTTGGGGTGGGCT-3'

2 结果

2.1 镉处理对 TM3 细胞炎症因子 mRNA 表达的影响 镉能够显著诱导 TNF-α 和 IL-6 mRNA 的表达($F = 72.42, 37.02$, $P < 0.01$); 而对 IL-10 mRNA 的表达影响差异无统计学意义。见图 1。

2.2 镉处理对 TM3 细胞趋化因子 mRNA 表达的影响 镉处理 4 h 组 MCP-1 mRNA 的表达水平高于对照组($F = 40.89$, $P < 0.01$), 而镉处理 8 h 组 MCP-1 mRNA 表达水平与对照组相比差异无统计学意义; 镉对 TM3 细胞 MIP-1 和 MIP-2 mRNA 表达水平与对照组相比差异无统计学意义。见图 2。

2.3 镉处理对 TM3 细胞 COX-2 mRNA 和蛋白表达的影响 镉处理 4 h 和 8 h 组 COX-2 mRNA 的表达水平均明显高于对照组, 差异有统计学意义($F = 78.55$, $P < 0.01$), 见图 3。此外, Western blot 结果显示: 对照组、镉处理 4 h 和 8 h 组 COX-2 蛋白的灰度值分别为(1.00 ± 0.01)、(2.53 ± 0.25)和(2.87 ± 0.21), 镉处理 4 h 和 8 h 组 COX-2 蛋白表达水平也明显高于对照组($F = 22.33$, $P < 0.01$), 见图 4。

2.4 镉处理对 TM3 细胞 p-AKT 蛋白表达的影响 Western blot 结果显示: 对照组、镉处理 4 h 和 8 h 组 p-AKT 蛋白的灰度值分别为(1.00 ± 0.04)、(9.19 ± 2.25)和(4.52 ± 0.53), 镉能够诱导 AKT 的磷酸化, 在 4 h 和 8 h 时差异有统计学意义($F = 56.84$, $P < 0.01$)。见图 5。

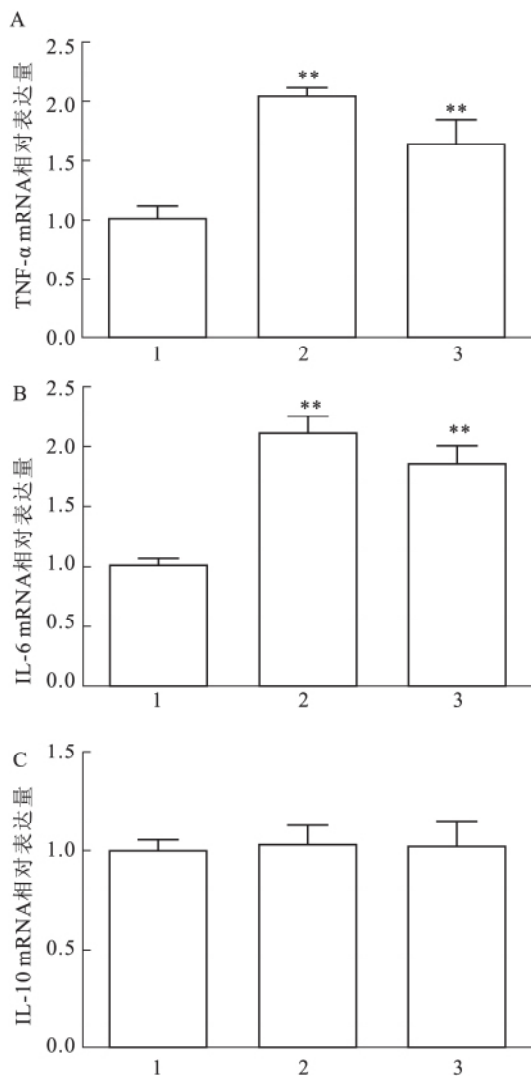


图1 镉处理对 TM3 细胞炎症因子 mRNA 表达的影响

A: TNF- α ; B: IL-6; C: IL-10; 1: 对照组; 2: 4 h 组; 3: 8 h 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

研究^[4-6,10]表明,在不同类型的细胞中,镉对于不同细胞炎症因子和趋化因子表达的调节作用也不尽相同。本研究显示, TM3 细胞暴露于 CdCl_2 一段时间后, TNF- α 和 IL-6 mRNA 的表达水平均明显升高,而 IL-10 mRNA 表达水平并没有受到影响。此外, MCP-1 mRNA 的表达水平在 4 h 时显著升高。以上实验结果提示,镉选择性调节 TM3 细胞趋化因子和炎症因子的表达。

PI3K 家族成员属于原癌基因,是肌醇与磷脂酰肌醇 (phosphatidylinositol, PI) 的重要激酶,正常情况下由 PI3K 活化而产生的类脂产物有以下三类: 3,

4-二磷酸磷脂酰肌醇 [PI (3,4) P₂], 3,5-二磷酸磷脂酰肌醇 [PI (3,5) P₂] 以及 3,4,5-三磷酸磷脂酰肌醇 [PI (3,4,5) P₃] 而 PI (3,4,5) P₃ 作为细胞内的第二信使,其又是 AKT 转位于胞膜并被活化

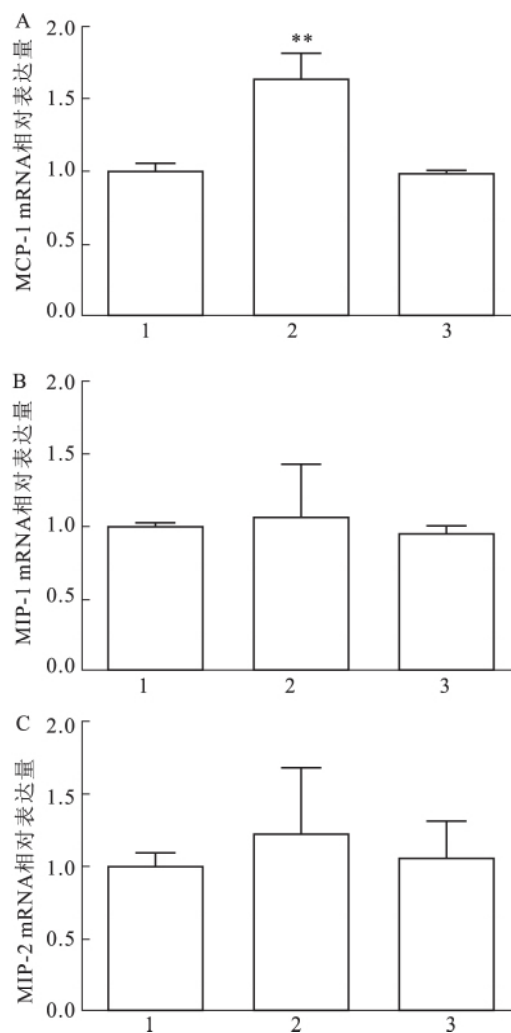


图2 镉处理对 TM3 细胞趋化因子 mRNA 表达的影响

A: MCP-1; B: MIP-1; C: MIP-2; 1: 对照组; 2: 4 h 组; 3: 8 h 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

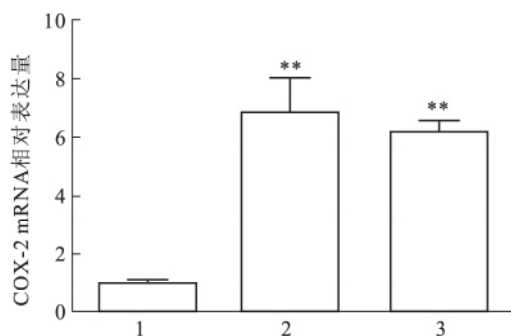


图3 镉处理对 TM3 细胞 COX-2 mRNA 表达的影响

1: 对照组; 2: 4 h 组; 3: 8 h 组; 与对照组比较: ** $P < 0.01$

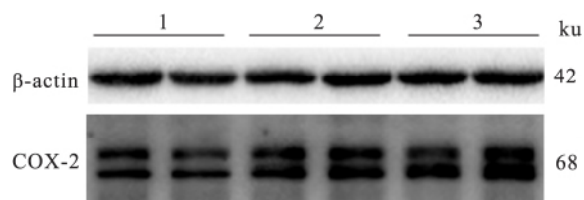


图4 镉处理 TM3 细胞 COX-2 蛋白表达的影响

1: 对照组; 2: 4 h 组; 3: 8 h 组

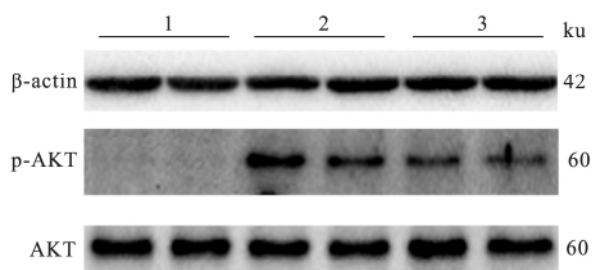


图5 镉处理 TM3 细胞 p-AKT 蛋白表达的影响

1: 对照组; 2: 4 h 组; 3: 8 h 组

所必需的^[11]。AKT 也被称为蛋白激酶 B, 是分子量约为 60 ku 的丝/苏氨酸蛋白激酶, 哺乳动物中的 AKT 是病毒原癌基因 v-AKT 的同源物, AKT 家族的成员有三个亚型: AKT1、AKT2 和 AKT3。其中 AKT1 和 AKT2 在人体各组织中普遍表达, 而 AKT3 的表达则具有组织特异性。AKT 是 PI3K 信号转导通路中的一个重要分子, AKT 磷酸化水平的表达量可以间接反映 PI3K 的活性。PI3K 和 AKT 组成的 PI3K/AKT 信号通路是细胞功能中一条重要的通路, 对包括生长、生殖、迁移和存活等都具有调控作用^[12]。PI3K/AKT 信号通路还是调控炎症表达的重要通路之一^[13]。COX 又称为前列腺素合成酶, 其是花生四烯酸合成前列腺素的关键限速酶, 主要有两种异构体: 结构型 COX-1 和诱导型 COX-2。COX-1 在组织细胞中恒量表达, 其主要的生理功能是催化生理性前列腺素合成而参与机体生理功能调节; COX-2 一般在生理条件下无法检测到, 其主要是在病理情况下由一种或多种因素刺激产生, 能促进相关部位前列腺素合成, 进而诱发相关部位产生炎症相关因子而参与炎症^[14]。而越来越多的研究^[15-16]表明 COX-2 是 PI3K/AKT 信号通路的下游靶基因, PI3K/AKT 信号通路的激活能够诱导 COX-2 的表达。本实验研究的结果显示, CdCl₂ 明显升高 TM3 细胞 p-AKT 的蛋白水平, 同时显著诱导 COX-2 蛋白和 mRNA 的表达水平。以上结果提示 CdCl₂ 能够激活 TM3 细胞 PI3K/AKT 信号通路。

综上所述, 镉可能通过激活 TM3 细胞中 AKT 的磷酸化水平来诱导 COX-2 的表达, 进而选择性调节部分炎症相关细胞因子(如 IL-6、TNF- α 、MCP-1)表达。然而, 镉对众多炎症相关信号通路的确切作用机制目前尚不清楚, 需要进一步探讨镉对 TM3 细胞促炎作用的分子机制。

参考文献

- [1] 丁文军, 许群. 国家污染物环境健康风险名录 - 化学第一分册[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 2009: 197-204.
- [2] Hellström L, Persson B, Brudin L, et al. Cadmium exposure pathways in a population living near a battery plant [J]. Sci Total Environ, 2007, 373(2-3): 447-55.
- [3] Byrne C, Divekar S D, Storch G B, et al. Cadmium-a metallo-hormone [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, 238(3): 266-71.
- [4] Romare A, Lundholm C E. Cadmium-induced calcium release and prostaglandin E2 production in neonatal mouse calvaria are dependent on COX-2 induction and protein kinase C activation [J]. Arch Toxicol, 1999, 73(4-5): 223-8.
- [5] Haase H, Ober-Blöbaum J L, Engelhardt G, et al. Cadmium ions induce monocytic production of tumor necrosis factor- α by inhibiting mitogen activated protein kinase dephosphorylation [J]. Toxicol Lett, 2010, 198(2): 152-8.
- [6] Cormet-Boyaka E, Jolivet K, Bonnegarde-Bernard A, et al. An NF- κ B-independent and Erk1/2-dependent mechanism controls CXCL8/IL-8 responses of airway epithelial cells to cadmium [J]. Toxicol Sci, 2012, 125(2): 418-29.
- [7] Chen H, Ge R S, Zirk B R. Leydig cells: from stem cells to aging [J]. Mol Cell Endocrinol, 2009, 306(1-2): 9-16.
- [8] 刘洪茂, 穆柯瀚, 姬艳丽, 等. 阴囊短暂、轻度热处理对小鼠睾丸应激反应的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(4): 521-5.
- [9] 冷银芝, 李应配, 罗时猛, 等. 双酚 A 对小鼠 3T3-L1 前脂细胞分化的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(9): 1281-5.
- [10] Huang Y Y, Xia M Z, Wang H, et al. Cadmium selectively induces MIP-2 and COX-2 through PTEN-mediated Akt activation in RAW264.7 cells [J]. Toxicol Sci, 2014, 138(2): 310-21.
- [11] 黄秀兰, 崔国辉. PI3K/AKT 信号通路与肿瘤细胞凋亡关系的研究进展 [J]. 癌症, 2008, 27(3): 331-6.
- [12] Marwick J A, Chung K F, Adcock I M. Phosphatidylinositol 3-kinase isoforms as targets in respiratory disease [J]. Ther Adv Respir Dis, 2010, 4(1): 19-34.
- [13] Låg M, Rodionov D, Ovreik J, et al. Cadmium-induced inflammatory responses in cells relevant for lung toxicity: Expression and release of cytokines in fibroblasts, epithelial cells and macrophages [J]. Toxicol Lett, 2010, 193(3): 252-60.
- [14] Biswas S, Bhattacharjee P, Paterson C A, et al. Ocular inflammatory responses in the EP2 and EP4 receptor knockout mice [J]. Ocul Immunol Inflamm, 2006, 14(3): 157-63.

(下转第 1679 页)

Indole compound GY3 induces cell apoptosis of breast cancer MCF-7 through AMPK /COX-2 pathway

Hu Chujiao, Zhou Bo, Yang Ying, et al

(Guizhou Chemical Drug Research and Development Engineering

Technical Center, Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

Abstract Objective To investigate the effect of compound GY3 (GY3) on proliferation and apoptosis of breast cancer Michigan cancer foundation-7 (MCF-7) cells, and regulating downstream factors of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase/cyclooxygenase-2 (AMPK/COX-2) signal pathway. **Methods** MTT assay was used to measure the inhibition rate of different concentration of GY3, 5-minoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR), celecoxib and AICAR combined with celecoxib on MCF-7 cells. Cell apoptosis rate was detected by FCM assay. The expressions of acetyl-coa carboxylase product of phosphorylation, phosphorylated acetyl-Co A carboxylase (P-ACC) and COX-2 were assayed in MCF-7 cells cultured with different concentration of GY3 and GY3 + Compound C by Western blot. **Results** GY3 inhibited MCF-7 cell growth in a concentration dependent manner ($P < 0.01$, $P < 0.05$). GY3 induced apoptosis of MCF-7 cells ($P < 0.05$). GY3 could increase P-ACC and down-regulate COX-2 expression ($P < 0.01$, $P < 0.05$). AMPK inhibitor Compound C could restore activation of AMPK and inhibition of COX-2 by GY3. **Conclusion** GY3 could inhibit COX-2 expression by activating AMPK, and subsequently induce apoptosis of MCF-7 cells.

Key words indole derivative compound; breast cancer; AMPK; COX-2; apoptosis

(上接第 1673 页)

[15] Foster J G, Blunt M D, Carter E, et al. Inhibition of PI3K signaling spurs new therapeutic opportunities in inflammatory/autoimmune disease and hematological malignancies [J]. *Pharmacol Rev*, 2012, 64(4): 1024-54.

[16] Chen B C, Kang J C, Lu Y T, et al. Rac1 regulates peptidoglycan-induced nuclear factor- κ B activation and cyclooxygenase-2 expression in RAW 264.7 macrophages by activating the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46(6): 1179-88.

Effect of cadmium on PI3K/AKT signal pathway in mouse leydig cells

Ji Yanli^{1,2}, Liu Hongmao¹, Mu Kehan¹, et al

(¹Dept of Occupational and Environmental Health, ²Dept of Inspection and Quarantine Health, School of Public Health, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To study the effects of cadmium on phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B (PI3K/AKT) signal pathway in mouse leydig cells. **Methods** TM3 cells (mouse leydig cell line) were incubated with 20 μ mol/L CdCl₂ and collected cells at 4 h and 8 h after cadmium exposure. The control group was incubated with corresponding volume PBS and collected cells after 8 h. The mRNA expression levels of interleukin (IL)-10, tumor necrosis factor (TNF)- α , IL-6, monocyte chemotactic protein (MCP)-1, macrophage inflammatory protein (MIP)-2, MIP-1 and cyclooxygenase (COX)-2 were detected by RT-PCR; the protein expression levels of COX-2, AKT and p-AKT were measured by Western blot. **Results** Compared with the control group, cadmium significantly increased the mRNA expression levels of IL-6 and TNF- α ($P < 0.01$); the mRNA expression level of MCP-1 was also increased at 4 h group after cadmium exposure ($P < 0.01$), however, cadmium did not affect the mRNA expression level of MCP-1 at 8 h group after cadmium exposure. No significant differences on the mRNA expression levels of MIP-1 and MIP-2 were observed between the control group and cadmium groups. Cadmium markedly up-regulated the mRNA and protein levels of COX-2 in TM3 cells ($P < 0.01$). In addition, compared with the control group, the protein expression of p-AKT also was significantly increased in cadmium groups ($P < 0.01$). **Conclusion** These results suggest that cadmium could activate PI3K/AKT signal pathway which might partially contribute to cadmium-induced the secretion of some inflammatory cytokines in mouse testicular leydig cells.

Key words cadmium; leydig cell; inflammation; PI3K/AKT