

邻苯二甲酸酯对软骨细胞凋亡及超微结构的影响

张银昌, 王 强, 宣华兵, 贺华正, 杨 昕

(皖南医学院附属弋矶山医院 关节骨科, 安徽 芜湖 241001)

【摘要】目的: 通过研究塑化剂邻苯二甲酸酯对软骨细胞凋亡因子 bcl-2 和 Bax 蛋白表达及超微结构的影响, 探讨邻苯二甲酸酯在致软骨细胞凋亡中的作用机制。方法: 用软骨细胞体外培养的方法, 原代培养乳鼠关节软骨细胞, 传第 3 代后加药, 按染邻苯二甲酸酯剂量不同分为 0/L (对照)、 10^{-10} /L、 10^{-8} /L、 10^{-6} /L 组, 染邻苯二甲酸酯培养 7 d 后, 透射电镜下观察软骨细胞的超微结构改变, 采用 western-blot 方法检测各实验组中软骨细胞 bcl-2 和 Bax 蛋白的表达。结果: 透射电镜下对照组和 10^{-10} /L 组的软骨细胞呈球形, 粗面内质网发达, 线粒体膜性结构完整; 10^{-8} /L、 10^{-6} /L 组的细胞内可见脂滴明显增多, 胞质内出现大量空泡类物质, 细胞内膜结构不清, 部分细胞出现核固缩。 10^{-8} /L、 10^{-6} /L 组的软骨细胞 bcl-2 的蛋白表达 (0.620 ± 0.041 和 0.530 ± 0.035) 较对照组表达 (0.805 ± 0.032) 显著降低 ($P < 0.01$); 而 Bax 的表达 (0.966 ± 0.038 和 1.280 ± 0.154) 较对照组表达 (0.602 ± 0.045) 显著增加 ($P < 0.01$)。 10^{-10} /L 组软骨细胞中 bcl-2 的表达 (0.878 ± 0.055) 和 Bax 的表达 (0.650 ± 0.039) 与对照组相比均无统计学差异 ($P > 0.05$)。此外, 10^{-8} /L、 10^{-6} /L 组相比, bcl-2 和 Bax 的表达也有显著差异 ($P < 0.01$)。结论: 10^{-8} /L、 10^{-6} /L 浓度的邻苯二甲酸酯可对软骨细胞超微结构造成损伤, 其通过减少抑凋亡因子 bcl-2 的表达和增加促凋亡因子 Bax 的表达, 从而产生促进软骨细胞凋亡的作用。

【关键词】邻苯二甲酸酯; 软骨细胞; bcl-2; Bax

【中图分类号】R 684 **【文献标识码】**A

【DOI】10.3969/j.issn.1002-0217.2015.02.003

Impact of phthalic acid esters on the apoptosis and ultrastructure modification of chondrocytes

ZHANG Yinchang, WANG Qiang, XUAN Huabing, HE Huazheng, YANG Xin

Department of Orthopedics, Yijishan Hospital, Wannan Medical College, Wuhu 241001, China

【Abstract】Objective: To *in vitro* investigate the effects phthalic acid esters (PAEs, a pasticizer) on the expression of Bcl-2 and Bax in chondrocytes and ultrastructure modification as well as the mechanisms in generating apoptosis of the chondrocytes. **Methods:** Primary articular chondrocytes of neonate rat were cultured with *in vitro* technique by the third generation. Then the chondrocytes were infected with PAEs by concentration of 0/L, 10^{-10} /L, 10^{-8} /L and 10^{-6} /L, respectively for 7 days and observed under transmission electron microscope to examine the changes of their ultrastructure. Western blot was performed to determine the expression of Bcl-2 and Bax in chondrocytes in different dosage groups. **Results:** Microscopically, the chondrocytes in dosage group of 10^{-10} /L were in round shape, with abundant rough endoplasmic reticulum (RERs) and complete structure of mitochondria membrane, while in dosage groups of 10^{-8} /L and 10^{-6} /L displayed intensified intracellular lipid droplets, with a number of vacuoles being seen in the cytoplasm, incomplete structure of the intracellular membranes and partial pyknosis of the chromatine. Bcl-2 expression was significantly down-regulated in dosage group of 10^{-8} /L (0.620 ± 0.041) and 10^{-6} /L (0.530 ± 0.035) compared to the control group (0.805 ± 0.032) ($P < 0.01$), whereas Bax significantly increased (0.966 ± 0.038 for 10^{-8} /L and 1.280 ± 0.154 for 10^{-6} /L) compared to the control group (Bcl-2: 0.602 ± 0.045 ; Bax: 0.602 ± 0.045) ($P < 0.01$). There was no statistical difference regarding the expression of Bcl-2 or Bax between 10^{-10} /L group and control group ($P > 0.05$), yet the difference was significant by expression of Bcl-2 and Bax in dosage group of 10^{-8} /L and 10^{-6} /L ($P < 0.01$). **Conclusion:** PAE at concentration of either 10^{-8} /L or 10^{-6} /L may lead to damage to the ultrastructure of chondrocyte. The potential mechanism may be involved in inactivation of the anti-apoptotic Bcl-2 and up-regulated Bax eventually result in apoptosis of the chondrocytes.

【Key words】 phthalate esters; chondrocyte; Bcl-2; Bax

自 2011 年台湾饮料塑化剂恶意添加事件, 到方便面塑化剂事件, 再到 2012 年白酒塑化剂事件, 塑化剂引发的食品安全问题愈演愈烈。2013 年卫生

部进一步将婴幼儿食品、白酒、食用油、方便食品等纳入塑化剂风险监测的重点食品。邻苯二甲酸酯类是塑化剂的主体, 由于塑料工业生产以及塑料制品

基金项目: 皖南医学院中青年科研基金项目 (WK2012F07)

收稿日期: 2014-06-10

作者简介: 张银昌 (1983-) 男, 主治医师 (电话) 15178548583 (电子信箱) zhangyinchang_0216@163.com;

王 强 男, 副主任医师, 博士, 硕士生导师 (电子信箱) 879870162@qq.com 通讯作者。

处理过程中的释放,使得邻苯二甲酸酯类通过多种途径污染食物,如大气、饮用水、土壤、食品包装材料等。邻苯二甲酸酯(phthalic acid esters, PAEs)是一大类脂溶性化合物,PAEs与产品基质间为非共价结合,容易从产品中释放进入周围环境。PAEs可通过呼吸道、消化道和皮肤等途径进入人体,目前国内外研究发现,人群PAEs污染状况已相当严重,近年来,乳腺癌、卵巢癌及睾丸癌等的发病率有明显上升的趋势,研究表明,这一结果与人类日益增加的环境雌激素的暴露有关^[1],流行病学及某些临床资料表明^[2],这一现象与工业污染所带来的使人类越来越多地暴露在人工合成的内分泌干扰物中有关,环境雌激素是环境内分泌干扰物中的一大类,这类物质进入人和动物体内后可通过多种机制产生拟雌激素或抗雌激素作用,其结果可导致人体生殖功能障碍、出生缺陷、生长发育异常、代谢紊乱等。目前国外对环境雌激素的研究已取得若干进展^[3],动物与临床研究发现绝经后妇女骨关节炎发病率高于男性,低雌激素水平妇女骨关节炎发病率增加,提示雌激素在骨关节炎的发病中起作用^[4]。目前关于环境雌激素对生殖系统的危害的研究较多,但对关节退变的影响国内外研究未见报道。本实验拟通过环境雌激素(邻苯二甲酸酯)对体外培养的关节软骨细胞中凋亡相关因子 bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响及对软骨细胞超微结构的影响,来探讨此类化合物调节雌激素反应性软骨细胞增殖和凋亡的分子生物学机制,为预防关节退变提供新思路。

1 材料与方法

1.1 实验动物 20 只新生 1 周 SD 大鼠。

1.2 主要试剂和仪器 兔抗鼠 Bcl-2 及 Bax 单克隆抗体(Cell Signaling 公司)、DMEM 高糖培养液、胎牛血清、II 型胶原酶、双垂直蛋白电泳仪及电泳槽、电热恒温水浴箱、恒温培养振荡器、离心机、倒置显微镜、无菌操作台等。

1.3 关节软骨的分离与培养 取新生 1 周 SD 大鼠处死,无菌条件下切取双侧髌膝关节软骨,放入培养皿,放入加双抗 DMEM 中漂洗几次,剪碎大小约 1 mm × 1 mm × 1 mm,再次用加双抗 DMEM 漂洗,除去上清液后将软骨组织移入另一个培养皿,加入 II 型胶原酶,37℃ 消化 4 h。消化后将细胞悬液过滤,1 000 r/min 离心 5 min,弃去上清液,加入含 10% 胎牛血清、双抗(青霉素 100 U/mL、链霉素 100 U/mL)的 H-DMEM 培养基,计数板计数,以 1×10^5 /mL 接种于培养瓶,置于 CO₂ 培养箱中培养。48 h 后观察

细胞贴壁情况,更换培养液,每 3 d 换液 1 次。倒置显微镜下观察细胞生长情况。当倒置显微镜下观察软骨细胞成片长满瓶壁后,倾去培养液,加入 0.25% 胰蛋白酶 + 0.02% 乙二胺四乙酸进行传代培养。

1.4 分组 将传代培养的软骨细胞以 1×10^5 /mL 每培养瓶分成 4 组。用无菌去离子水配制邻苯二甲酸酯浓度为 0、 10^{-10} /L、 10^{-8} /L、 10^{-6} /L,每组 6 个平行样。染邻苯二甲酸酯培养 7 d 后进行后续实验。

1.5 制备和观察透射电镜标本 弃去培养瓶内的培养液,加 0.25% 胰蛋白酶 37℃ 消化 1~2 min,再加入 1.5 mL 完全培养液(含胎牛血清)终止消化。用吸管吹打形成细胞悬液。将细胞悬液吸入尖底 EP 管内,1 000 r/min 离心 5 min。弃去上清液,再加 1.5 mL 完全培养液漂洗,1 000 r/min 离心 5 min。重复 3 次,加入胎牛血清 1 mL 混匀后 5 000 r/min 离心 5 min。弃去胎牛血清,加 2% 戊二醛,体积数为离心后 EP 管底沉淀体积的 50 倍,4℃ 冰箱保存,在电镜室取材后再用 1% 锇酸后固定 1 h,环氧树脂包埋切片,摄片观察并进行拍照。

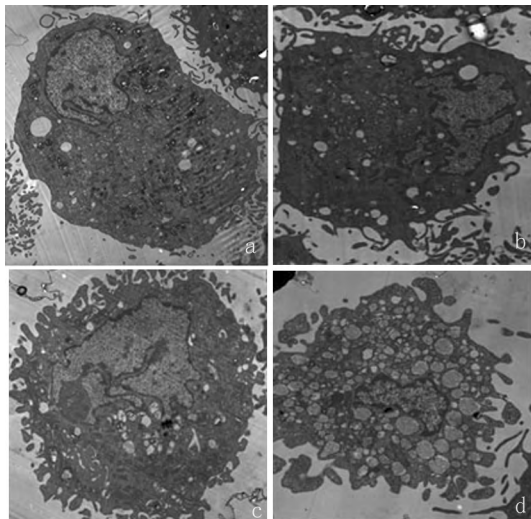
1.6 Western blot 实验 提取软骨细胞中的总蛋白,用 BCA 法进行蛋白定量。总蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转至 NC 膜上,用 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h,随后加入稀释的一抗(1:1 000),4℃ 过夜。漂洗后加入稀释的二抗,室温孵育 1 h。显色试剂盒显色后,凝胶图像处理系统扫描并进行灰度值分析。

1.7 统计分析 数值结果以均数 ± 标准差表示,采用 SPSS 16.0 软件进行完全随机设计的单因素方差分析和 *q* 检验。

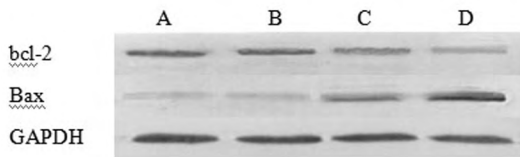
2 结果

2.1 透射电子显微镜观察 电镜下观察到染邻苯二甲酸酯浓度为 0、 10^{-10} /L 组的软骨细胞呈球形,表面有许多突起,细胞核偏一侧,胞质内含有丰富的粗面内质网和高尔基复合体,线粒体较少,可见散在脂滴,线粒体膜性结构尚可(图 1a、b)。 10^{-8} /L、 10^{-6} /L 组软骨细胞表面微绒毛呈膜样突起,细胞内膜结构不清,细胞核固缩,胞质内脂滴增多,出现大量空泡类物质,考虑为粗面内质网扩张,脱颗粒(图 1c、d)。

2.2 凋亡相关蛋白表达的检测 染邻苯二甲酸酯后,通过 Western-blot 方法检测各组软骨细胞内 bcl-2 和 Bax 蛋白表达情况,并通过内参 GAPDH 对总蛋白定量(见图 2)。



a. 0 组; b. 10^{-10} /L 组; c. 10^{-8} /L 组; d. 10^{-6} /L 组
图 1 电镜下软骨细胞超微结构(×5 000)



A、B、C、D 分别代表 0 、 10^{-10} /L、 10^{-8} /L、 10^{-6} /L 组
图 2 染邻苯二甲酸酯各组软骨细胞 bcl-2、Bax 和 GAPDH 蛋白的表达

2.2.1 bcl-2 蛋白的表达 Western-blot 结果显示 10^{-10} /L 组软骨细胞 bcl-2 蛋白表达与对照组无统计学差异 ($P > 0.05$)。 10^{-8} /L、 10^{-6} /L 组软骨细胞 bcl-2 蛋白表达明显低于对照组 ($P < 0.01$) ,且 10^{-6} /L 组较 10^{-8} /L 组也显著降低 ($P < 0.01$) ,具有统计学意义(表 1)。

表 1 各组软骨细胞 bcl-2、Bax 蛋白表达

组别	n	邻苯二甲酸酯浓度	bcl-2 / GAPDH	Bax / GAPDH
对照组	20	0	0.805 ± 0.032	0.602 ± 0.045
低浓度组	20	10^{-10} /L	0.878 ± 0.055 *	0.650 ± 0.039 *
中浓度组	20	10^{-8} /L	0.620 ± 0.041 Δ	0.966 ± 0.038 Δ
高浓度组	20	10^{-6} /L	0.530 ± 0.035 Δ ☆	1.280 ± 0.154 Δ ☆
F 值			298.1	276.3
P 值			0.000	0.000

与对照组相比 $\Delta P < 0.01$, * $P > 0.05$; 与中浓度组相比 ☆ $P < 0.01$

2.2.2 Bax 蛋白的表达 Western-blot 结果显示 10^{-10} /L 组 Bax 蛋白表达与对照组相比 ($P > 0.05$) 无统计学意义。 10^{-8} /L、 10^{-6} /L 组软骨细胞 Bax 蛋白表达较对照组显著增加 ($P < 0.01$) ,且 10^{-6} /L 组与 10^{-8} /L 组相比也有所增加 ,具有统计学意义 ($P < 0.01$) ,见表 1。

3 讨论

骨性关节炎是中老年最常见的骨关节疾病 ,其

发病及进展过程受年龄、激素、环境、基因等多种因素影响。绝经后妇女发病率高于男性 ,低雌激素水平妇女 OA 发病率增加 ,提示雌激素在 OA 的发病中起重要作用 ,我们的前期研究也证实关节退变及关节炎的发生发展与雌激素水平的关系^[5-6]。Cooley 等^[7]发现孕产期使用过雌激素替代治疗(estrogen replacement therapy ,ERT) 的妇女腕掌关节 OA 发病率高 ,而早年母乳喂养的妇女腕掌关节 OA 发病率低。雌激素通过与关节中的雌激素受体结合起作用 ,调节软骨细胞的增殖与凋亡。

本实验研究发现:与对照组相比 ,经含有中、高浓度邻苯二甲酸酯的培养液培养后的软骨细胞凋亡相关因子 bcl-2 表达明显减少 ,而 Bax 的表达则明显增多 ,超微结构观察到对软骨细胞损伤明显 ,说明中、高浓度邻苯二甲酸酯对软骨细胞凋亡作用远大于增殖作用;而低浓度邻苯二甲酸酯作用后的软骨细胞与对照组相比凋亡作用与增殖作用相等。邻苯二甲酸酯对软骨细胞的作用可能是通过与雌激素受体结合或影响细胞信号传导途径等其他方式模仿或部分模仿雌激素发挥类似于雌激素效应 ,通过使体内氧自由基水平上升、NO 过量产生及微量元素含量变化而引起 ,诱导软骨细胞的凋亡^[8]。软骨细胞凋亡在关节退变的发展中起着非常重要的作用 ,bax 是细胞凋亡促进因子 ,bcl-2 是凋亡抑制因子 ,bax 对 bcl-2 的表达和功能具有调节作用 ,故 bax/bcl-2 蛋白表达的比例是细胞凋亡或存活的决定因素之一^[9] ,已知 bcl-2 具有抑制凋亡的作用 ,而 Bax 与 bcl-2 的作用相反 ,可以促进细胞凋亡。Zolton 等认为 bcl-2/Bax 的比例决定了细胞对凋亡刺激的敏感性。当 bcl-2 蛋白过多 ,bcl-2/Bax 异源二聚体占主导地位 ,细胞免于死亡;当 Bax 蛋白增多 Bax/Bax 同源二聚体占主导地位 ,则细胞易于死亡。因此 ,细胞内 bcl-2 和 Bax 的表达量决定了 bcl-2/Bax 和 Bax/Bax 二聚体的比例 ,而这一比例又决定了细胞对凋亡信号的易感性 ,是决定细胞存亡的关键。

本实验研究结果证实了中、高浓度邻苯二甲酸酯作用的软骨细胞 bcl-2 蛋白表达降低 ,而 Bax 蛋白表达升高 ,证明中、高浓度邻苯二甲酸酯可促进软骨细胞凋亡 ,证实严重的塑化剂污染加重对关节的损害作用。

【参考文献】

[1] Bontoux L. The European strategy on endocrine disruptors: progress to date and EU/US cooperation [J]. Folia Histochem Cytobiol 2001 , 39 Suppl 2: 9-11.

• 基础医学 •

文章编号: 1002 - 0217(2015) 02 - 0113 - 04

miRNA-449b 在胃癌组织中的表达及与淋巴结转移的关系

林爱琴 汪根莲 段仁杰 李铁臣

(皖南医学院 分子生物学研究室 安徽 芜湖 241002)

【摘要】目的: 通过对胃癌组织及癌旁组织中 miRNA-449b 表达的比较, 分析 miRNA-449b 与胃癌发生及淋巴结转移的关系, 为进一步探讨其在胃癌中的作用机制提供依据。方法: 收集 30 例胃癌及癌旁组织标本, 提取组织总 RNA; 茎环法反转录成 cDNA; 用实时荧光定量 PCR 方法检测 miRNA-449b 在组织中的表达水平。结果: 相比于癌旁组织, miRNA-449b 在胃癌组织中有 23 例(76. 67%) 表达下调, 7 例(23. 33%) 表达上调, 其平均表达水平低于癌旁组织, 差异有统计学意义($t = 2. 395$, $P = 0. 023$, $P < 0. 05$)。miRNA-449b 在 17 例有淋巴结转移的样本中 16 例表达下调(94. 12%) , 13 例无淋巴结转移的样本只有 7 例表达下调(53. 85%) , 淋巴结转移组与无淋巴结转移组 miRNA-449b 的下调比例, 经卡方检验, 差异有统计学意义($P = 0. 025$, $P < 0. 05$)。结论: miRNA-449b 与胃癌的发生及淋巴结转移相关。

【关键词】胃癌; miRNA-449b; 淋巴结转移**【中图分类号】**R 735. 2 **【文献标识码】**A**【DOI】**10. 3969/j. issn. 1002-0217. 2015. 02. 004

Expression of miRNA-449b in gastric cancer and lymph node metastasis

LIN Aiqin, WANG Genlian, DUAN Renjie, LI Tiechen

Laboratory of Molecular Biology, Wannan Medical College, Wuhu 241002, China

【Abstract】Objective: To investigate the expression of miRNA-449b in gastric cancer and its adjacent tissue and incidence of lymph node metastasis for elucidating the mechanisms of this gene in development of gastric cancer. **Methods:** The specimen together with adjacent tissues was obtained in 30 patients of gastric carcinoma. Total RNA was extracted from these tissues, and reversely transcribed into cDNA by stem-loop technique. Real-time fluorescence quota PCR was used to determine miRNA-449b expression in the tissues. **Results:** Expression of miRNA-449b was down-regulated in 23 cases (76. 67%) and up-regulated in 7 (23. 33%) . The expression level was generally lower than that of the adjacent tissues($t = 2. 395$, $P = 0. 023$, $P < 0. 05$) . The miRNA-449b expression was down-regulated in 16 of 17 cases with lymph node metastasis (94. 12%) , and in 7 of 13 without metastasis (53. 85%) , which suggested significant difference by Chi-square test ($P = 0. 025$, $P < 0. 05$) . **Conclusion:** miR-449b is associated with the development of gastric cancer and presence of lymph node metastasis.

【Key words】gastric cancer; miRNA-449b; lymph node metastasis

基金项目: 皖南医学院中青年科研基金项目(WK201309)

收稿日期: 2014-10-20

作者简介: 林爱琴(1982-) , 女, 助理实验师, (电话) 13855363548, (电子信箱) linaiqin945@ 163. com;

李铁臣, 男, 教授, 硕士生导师, (电子信箱) tiechenli@ 126. com, 通讯作者。

- [2] Hoyer PB. Reproductive toxicology: current and future directions [J]. Biochem Pharmacol 2001; 62(12): 1557 - 1564.
- [3] Akingbemi BT, Hardy MP. Oestrogenic and antiandrogenic chemicals in the environment: effects on male reproductive health [J]. Ann Med 2010; 33(6): 391 - 403.
- [4] Sowers MR, McConnell D, Jannausch M, et al. Estradiol and its metabolites and their association with knee osteoarthritis [J]. Arthritis Rheum 2006; 54(8): 2481 - 2487.
- [5] 张银昌, 王文波. 雌激素 α 、 β 受体在大鼠椎间盘组织中的免疫组织化学定位 [J]. 中国矫形外科杂志, 2012, 20(21): 1981 - 1984.
- [6] 张银昌, 王强, 杨昕, 等. 雌激素受体在椎间盘组织中的表达及意义 [J]. 中国脊柱脊髓杂志, 2013, 23(8): 739 - 743.
- [7] Cooley HM, Stankovich J, Jones G, et al. the association between hormonal and reproductive factors and hand osteoarthritis [J]. Maturitas 2003; 45(4): 257 - 265.
- [8] Ashok RA, Steven BA. The role of nitric oxide in articular cartilage break down in osteoarthritis [J]. Current Opinion in Rheumatology, 1998, 10: 263 - 268.
- [9] Krajewska M, Krajewska S, Epstein JI, et al. Immunohistochemical analysis of Bcl-2, Bax, Bcl-X, and mcl-1 expression in prostate cancers [J]. Am J Pathol, 1996, 148: 1567 - 1576.