

蒋成兰,李舒婷,江金鋈,等.职业砷暴露工人尿砷代谢产物与 Dicer 表达的关联及 Dicer 在细胞增殖中的作用 [J]. 中国环境科学, 2025,45(5):2905-2912.
Jiang C L, Li S T, Jiang J Y, et al. Association between urinary arsenic metabolites and dicer expression in occupational arsenic-exposed workers and the role of dicer in cell proliferation [J]. China Environmental Science, 2025,45(5):2905-2912.

职业砷暴露工人尿砷代谢产物与 Dicer 表达的关联及 Dicer 在细胞增殖中的作用

蒋成兰,李舒婷,江金鋈,杨雪飞,路大艳,何越峰* (昆明医科大学云南省公共卫生与生物安全重点实验室暨公共卫生学院, 云南 昆明 650500)

摘要: 探讨在体内和体外砷与 Dicer 表达的关系及 Dicer 在细胞增殖中的作用,体内实验选择云南某高污染砷厂工人作为砷暴露组,附近村庄无砷接触史的居民作为对照组,检测尿液中不同形态砷含量、外周血中 Dicer mRNA 表达水平。结果表明,与对照组相比,砷暴露组尿中外周血中 Dicer mRNA 的相对表达水平显著升高,Dicer mRNA 表达水平与尿中无机砷、一甲基砷酸、二甲基砷酸呈正相关。体外实验以不同浓度(1.5, 3, 4.5 $\mu\text{mol/L}$)的亚砷酸钠及 4.5 $\mu\text{mol/L}$ 的一甲基砷酸、二甲基砷酸、亚砷酸钠处理人上皮支气管细胞 16HBE,检测 Dicer mRNA 和蛋白表达;敲低 16HBE 细胞内 Dicer 表达水平,检测细胞活力和增殖,结果表明,16HBE 细胞中 Dicer mRNA 和 Dicer 蛋白表达水平在 3, 4.5 $\mu\text{mol/L}$ 组均显著高于对照组,在一甲基砷酸组和二甲基砷酸组无变化。敲低 Dicer 抑制细胞活力和增殖,敲低 Dicer 和亚砷酸钠联合作用下,细胞增殖率下降更多。

关键词: 职业砷暴露; Dicer; 16HBE 细胞; 增殖

中图分类号: X503.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2025)05-2905-08

Association between urinary arsenic metabolites and dicer expression in occupational arsenic-exposed workers and the role of dicer in cell proliferation. JIANG Cheng-lan, LI Shu-ting, JIANG Jin-yun, YANG Xue-fei, LU Da-yan, HE Yue-feng* (Yunnan Provincial Key Laboratory of Public Health and Biosafety, School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming 650500, China). *China Environmental Science*, 2025,45(5): 2905-2912

Abstract: This study investigated the relationship between Dicer expression levels and urinary arsenic metabolites both in vivo and in vitro, as well as examined the role of Dicer in cell proliferation. For the epidemiological analysis, workers from a high arsenic-polluted factory in Yunnan Province were selected as the arsenic-exposed group, while residents from nearby villages without arsenic exposure history were recruited as controls. Urinary arsenic species (inorganic arsenic, monomethylarsonic acid [MMA], and dimethylarsinic acid [DMA]) were quantified, and Dicer mRNA expression levels in peripheral blood were measured. It was found that the relative Dicer mRNA expression in the arsenic-exposed group was significantly elevated compared to controls. Furthermore, Dicer mRNA levels were positively correlated with urinary inorganic arsenic, MMA, and DMA concentrations. For in vitro experiments, human bronchial epithelial cells (16HBE) were treated with sodium arsenite (1.5, 3, 4.5 $\mu\text{mol/L}$) or 4.5 $\mu\text{mol/L}$ MMA, DMA, or sodium arsenite. Dicer mRNA and protein expression were analyzed by RT-qPCR and Western blot. Additionally, Dicer expression was knocked down in 16HBE cells using siRNA, and cell viability and proliferation were assessed via CCK-8 and EdU assays. It was observed that Dicer mRNA and protein levels in 3 and 4.5 $\mu\text{mol/L}$ sodium arsenite-treated cells were significantly upregulated compared to untreated controls, whereas no changes were detected in MMA- or DMA-treated groups. Knockdown of Dicer was shown to suppress cell viability and proliferation. Notably, sodium arsenite exposure combined with Dicer knockdown resulted in a more pronounced reduction in cell proliferation rates.

Key words: occupational arsenic exposure; Dicer; 16HBE cells; proliferation

砷是一种有毒类金属,长期接触砷引起健康问题。职业性暴露多以无机砷化合物为主^[1-3],主要通过呼吸道和皮肤等途径进入机体,无机砷(iAs)进入人体以后,在肝脏中代谢为一系列甲基化产物,如一甲基砷酸(MMA)、二甲基砷酸(DMA),最终通过尿液排出体外。砷作为世界癌症机构确定的 I 类致癌物,与皮肤癌、前列腺癌、消化道癌、肺癌等多种癌症的

发生发展相关^[4-6]。然而砷致癌的作用及机制仍需进一步阐明。细胞增殖是细胞正常发育的生理过程,其失衡是诱发癌症的重要因素。砷暴露会引发重要功

收稿日期: 2024-10-28

基金项目: 云南省科技厅基础研究专项-面上项目(202401AT070177);国家自然科学基金(82160607);云南省创新团队(202405AS350016)

* 责任作者, 教授, heyuefeng@kmmu.edu.cn

能基因表达改变,进而影响细胞的增殖.Dicer是加工前体 microRNA 的酶体,可以将未成熟的 microRNA 加工成为有功能的成熟 microRNA^[7]. Dicer 可通过改变小非编码 RNA 影响基因的表达,进而参与细胞增殖、凋亡等生物过程^[8-9].Dicer 在许多癌症中表达异常^[10-12],但较少有研究报道 Dicer 在砷致癌中的作用,故本研究分析职业砷暴露与 Dicer 基因表达的关系,并探讨 Dicer 在砷致人支气管上皮细胞(16HBE)增殖中的作用,为砷的毒性和致癌机制提供参考依据及作为效应生物标志物的潜能.

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

试剂:10%硼酸钠、2mol/L 氢氧化钠均购自日本和光纯药工业株式会社,1%盐酸购自北京化学试剂研究所,肌酐测定试剂盒购自杭州德安奇生物工程有限公司,亚砷酸钠购自成都西亚试剂公司, MMA、DMA 购自美国 AccuStandard 公司, MEM 培养基美国 Corning 公司、胎牛血清购自北京全式金生物技术股份有限公司,青霉素-链霉素混合液购自北京华越洋生物科技有限公司,二甲基亚砷购自美国 Sigma Aldrich 公司, RNA Isolate 提取试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司,荧光定量试剂盒、HiFiScript cDNA Synthesis Kit 购自江苏康为世纪生物科技有限公司, Rfect 小核酸转染试剂购自常州百代生物科技有限公司, siRNA 和 FAM-siRNA 由上海吉玛基因公司合成, CCK-8 购自美国 MCE 公司, Omni-ECL™ 化学发光检测试剂盒购自上海雅酶生物医药科技有限公司, 兔 Dicer 多克隆抗体、 β 肌动蛋白(Actin)抗体购自美国 Proteintech 公司、PBS、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、蛋白酶抑制剂混合物(通用性, 100 \times)、蛋白裂解液、Beyoclick™ EdU 细胞增殖试剂盒、胰蛋白酶消化液购自上海碧云天生物技术有限公司.

主要仪器和设备: ASA-2SP 型砷形态前处理装置、AA-6800 型原子吸收分光光谱仪(193.7nm)、SRAF-16C 型电磁炉均由日本 Shimadzu 公司生产. LC96 实时荧光定量聚合酶链式反应仪(Roche, 德国), 二氧化碳培养箱(Thermo Forma, 美国), 核酸蛋白测定仪(Eppendorf, 德国), XDS-1B 型倒置生物显微镜(莱卡, 德国), 荧光酶标仪(Bio-Rad, 美国), 研究级倒置荧光显微镜(Nikon, 日本), 超灵敏多功能成像仪

(GE, 美国).

1.2 方法

1.2.1 研究对象 本研究于 2017~2018 年, 选择云南某高污染砷霜厂 76 名工人作为砷暴露组人群, 选择无砷接触史的 23 名居民作为对照组, 暴露组的工人通过空气吸入高浓度无机砷化合物(主要生产纯度为 99%的三氧化二砷). 对照组人群来自附近的距离工厂约 10~50km 的村庄的居民, 没有砷接触史, 3 个月内没有其他明显的砷暴露途径. 所有参与者都有相同的生活方式, 且与肿瘤和周围神经系统的退行性疾病无关. 本研究已经过昆明医科大学医学伦理委员会的审查批准, 所有参与者均已签署知情同意书.

1.2.2 尿砷含量的检测 用一次性尿液采样瓶现场收集晨尿 15mL. 将 2mL 的氢氧化钠(2mol/L)加入 1mL 尿样中, 在 100℃ 条件下加热 3h, 期间每隔 1h 进行振荡混合处理. 经过上述消化步骤后, iAs、MMA 及 DMA 的形式保持不变. 采用 1% 盐酸和 10% 硼酸钠作为反应介质, 利用氢化物发生法结合原子吸收分光光度计测定样品中的总砷含量, 此方法对于 3 种形态的砷化物的检测限均为 1ng, RSD<5%, 回收率分别为 81%~92%, 88%~98% 和 89%~103%. 使用肌酐测定试剂盒测定尿肌酐, 尿中各形态砷含量均以肌酐值校正. 采用 iAs、MMA 及 DMA 总和表示总砷(tAs)以评价砷暴露水平, 通过一甲基化指数(FMI)、二甲基化指数(SMI)、DMA%、MMA% 和 iAs% 等评估砷在体内甲基化的效率. TAs、MMA%、DMA% 和 iAs%、FMI、SMI 计算公式分别如下所示:

$$tAs = iAs + DMA + MMA \quad (1)$$

$$iAs\% = iAs / tAs \times 100\% \quad (2)$$

$$MMA\% = MMA / tAs \times 100\% \quad (3)$$

$$DMA\% = DMA / tAs \times 100\% \quad (4)$$

$$FMI = MMA / tAs \quad (5)$$

$$SMI = DMA / MMA \quad (6)$$

1.2.3 外周血淋巴细胞分离 采用一次性乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管现场收集清晨空腹静脉血, 并于 15min 内采用淋巴细胞分离液分离外周血中淋巴细胞并立即进行后续实验.

1.2.4 细胞培养与处理 人支气管上皮细胞系 16HBE 购自中国科学院昆明动物研究所. 16HBE 细

胞接种于含体积分数为 10% 的 FBS、1% 青/链霉素的 MEM 培养基中, 37°C、5% CO₂ 条件下培养。将对数生长期的 16HBE 细胞, 以 1.5×10^5 个/孔密度接种于六孔板中, 培养 24h 后, 进行后续两种处理: (1) 不同浓度亚砷酸钠处理。分为对照组和染砷组, 根据课题组既往实验结果得出的半数抑制浓度及最佳染毒结果^[13], 低、中、高染砷组的染毒剂量分别为 1.5, 3, 4.5 μmol/L, 染毒时间为 48h; (2) 不同亚砷酸盐处理, 分别予终浓度为 4.5 μmol/L 的 MMA、DMA 和亚砷酸钠处理 48h, 对照组细胞不予处理, 收获细胞进行后续实验。每组三复孔。亚砷酸钠、MMA 和 DMA 分别溶于水配制成 2 mmol/L 储存液。

1.2.5 细胞转染 Dicer 的 siRNA 片段由上海吉玛制药技术有限公司合成。SiRNA 序列如下: SiDICER1 sense GGACGGUGUUCUUGUCAAA, antisense UUGACCAAGAACACCGUCC; SiDICER 2 sense GAGAAGCAAAAAGGUCAGC, antisense GCUGACCUUUUGCUUCUC; NC sense UUCU-CCGAACGUGUCACGU, antisense ACGUGACAC-GUUCGAGAA。使用 RFect 小核酸转染试剂在 16HBE 细胞中进行转染 siRNA 片段, 转染完 72h 后, 用于后续实验。同时 RFect 小核酸转染试剂在 16HBE 细胞中进行转染荧光标记的 FAM-siRNA, 转染完 6h, 荧光显微镜观察转染效率。

1.2.6 CCK-8 测定细胞活力 将 16HBE 细胞悬液以每孔 3×10^3 个接种到 96 孔板里, 培养 19h 后, siRNA 片段转染细胞 72h。每孔加入 100 μL MEM 和 10 μL CCK8 的混合液, 在培养箱孵育 1h, 用酶标仪测定波长为 450nm 的光密度(D)。细胞增殖率(%)公式(处理组的 OD 值)/(对照组的 OD 值)×100%。对照组细胞增殖率调整为 100%。

1.2.7 EdU(5-乙炔基-2'-脱氧尿苷)染色测定细胞增殖能力 采用 Beyoclick™ EdU 细胞增殖试剂盒检测细胞增殖情况。操作按照制造商的说明进行。将 16HBE 细胞悬液以每孔 1.5×10^4 个接种于 6 孔板中, 培养 19h, siRNA 转染 72h 后, 加入 10 μmol/L EdU 在 37°C 下孵育 2h, 固定和通透后, 加入反应混合液, 置于黑暗中 30min, 随后用 Hoechst33342 染色 15min。荧光显微镜观察细胞染色情况, 其中红色为 EdU 染色细胞, 蓝色为 Hoechst33342 染色细胞。使用 ImageJ 软件对染色细胞进行计数。

1.2.8 RNA 提取与逆转录 使用 Trizol 方法提取总 RNA, 分光光度计测定 RNA 的纯度和浓度, 所有样本的 260/280 在 1.9~2.1 之间。利用逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。反应体系 20 μL, 反应液在冰上配制, 逆转录反应条件: 42°C 50min(反转录反应), 85°C 5min(反转录酶失活), 结束后 cDNA 放于 -20°C 保存。

1.2.9 实时荧光定量聚合酶链式反应(qRT-PCR) 采用荧光定量试剂盒进行 qRT-PCR, 内参基因为 β-肌动蛋白(β-actin)。引物序列如下: Dicer 上游引物 TGGGTCCTTTCTTTGGACTG, 下游引物 CTGG-TTTGCAGAGTTGACCA; β-actin 上游引物 CCCT-GTACGCCAACACAGTGC, 下游引物 ATACTCCT-GCTTGCTGATCC。反应条件为: 95°C 变性 10s, 60°C 退火 15s, 72°C 延伸 10s, 共 40 个循环, 实验重复 3 次。定量分析采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法。

1.2.10 蛋白免疫印迹(Western blot) 提取各组细胞的总蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度, 进行 SDS-PAGE 电泳, Dicer 以 300mA 湿转 3h 后转到 PVDF 膜, β-actin 用 20V 电压半干转 25min 至 PVDF 膜, 快速封闭液室温封闭 1h, 一抗(目的蛋白 Dicer 浓度为 1:1400, 内参蛋白 β-actin 浓度为 1:1000)4°C 过夜孵育, TBST 洗膜, 二抗室温孵育 2h, TBST 洗膜, 最后使用化学发光底物进行曝光。蛋白条带的光密度分析使用 ImageJ 软件。目的蛋白的相对表达量用目的蛋白与内参蛋白灰度值的比值表示。

1.2.11 统计学分析 数据的统计分析采用 spss 软件。对尿砷数据进行以 10 为底对数转化, 使数据服从正态分布后进行相应统计。采用 Pearson 相关性和线性回归分析研究人群外周血白细胞中 Dicer mRNA 表达与尿中 iAs、MMA、DMA 含量及百分比、PMI 和 SMI 之间的关系。体外实验独立重复 3 次。多组之间比较采用单因素方差分析, 两组之间的比较采用 Student's *t*-test, 组间率的比较采用卡方检验。检验标准为 $\alpha=0.05$ 。* $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 尿砷水平及各形态砷的构成情况

如表 1 所示: 砷暴露组尿中 iAs、MMA、DMA 和 tAs 含量均显著高于对照组($P<0.05$), MMA% 显著高于对照组($P<0.05$), DMA% 和 SMI 显著低于对照

组($P < 0.05$).对照组与砷暴露组 iAs%和 PMI 无显著差异($P > 0.05$).

表 1 砷暴露组与对照组尿砷水平及各形态砷的构成情况
Table 1 Comparative analysis of urinary arsenic metabolites and arsenic speciation profiles between occupationally arsenic-exposed workers and non-exposed controls

项目	对照组	砷暴露组($n=76$)
尿中砷含量 [($\bar{x} \pm s$), $\mu\text{g/g cr}$]	iAs	2.00 \pm 0.30
	MMA	1.54 \pm 0.19
	DMA	15.23 \pm 1.88
	tAs	18.78 \pm 2.20
尿中各形态砷的构成情况($\bar{x} \pm s$)	iAs%	13.75 \pm 11.65
	MMA%	8.47 \pm 2.36
	DMA%	77.78 \pm 12.27
	PMI	1.19 \pm 1.32
	SMI	10.12 \pm 3.83

注:与对照组相比,* $P < 0.05$.

2.2 Dicer mRNA 的相对表达水平与尿砷含量、各形态砷构成的关系

图 1 结果表明,砷暴露组外周血中 Dicer mRNA 的相对表达水平显著高于对照组($P < 0.05$). Dicer mRNA 表达与尿中 iAs($r=0.304, P=0.0022$)、MMA ($r=0.344, P=0.0005$)和 DMA($r=0.378, P=0.0002$)含量均呈正相关,与 iAs%($r=-0.117$)、MMA %($r=0.068$)、DMA %($r=0.067$)、PMI($r=0.109$)、SMI($r=-0.079$)无显著相关性(P 值均 > 0.05).

2.3 Dicer 在不同浓度亚砷酸钠处理 16HBE 细胞中的表达

与对照组比较,1.5, 3, 4.5 $\mu\text{mol/L}$ 组 16HBE 细胞中 Dicer mRNA 相对表达水平均显著升高($P < 0.05$, 图 2a),3 和 4.5 $\mu\text{mol/L}$ 组 16HBE 细胞中 Dicer 蛋白相对表达水平显著升高($P < 0.05$,图 2b 和 2c).

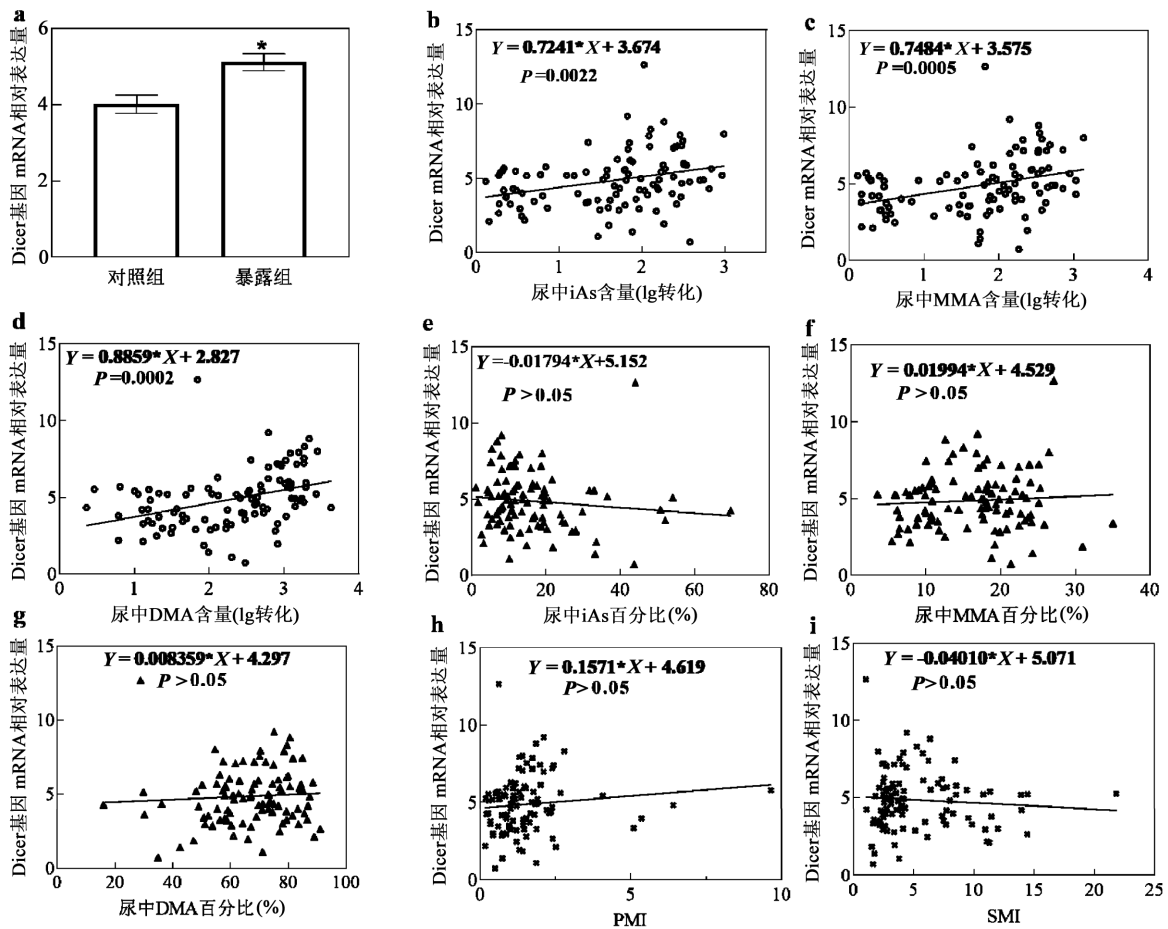


图 1 砷霜厂工人外周血细胞 Dicer mRNA 的表达与砷暴露之间的关系

Fig.1 Association between peripheral blood cell Dicer mRNA expression levels and occupational arsenic exposure in arsenic-exposed factory workers

a,qRT-PCR 检测职业砷暴露人群 Dicer mRNA 相对表达水平;b-i,采用线性相关分析 Dicer mRNA 相对表达水平与尿中 iAs 含量(b)、MMA 含量(c)、DMA 含量(d)、iAs 百分比(e)、MMA 百分比(f)、DMA 百分比(g)、PMI(h)和 SMI(i)的关系

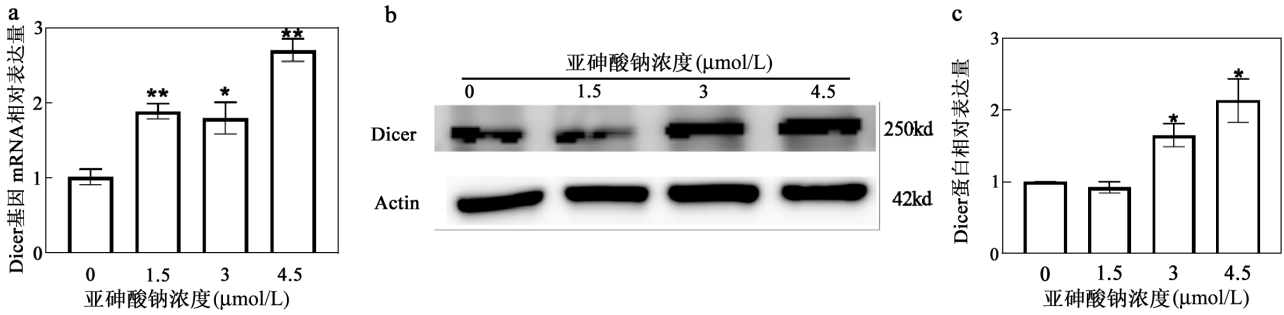


图 2 不同浓度亚砷酸钠处理 16HBE 细胞后 Dicer mRNA 和蛋白表达水平

Fig.2 Dicer mRNA and protein expression in 16HBE cells following exposure to varying concentrations of sodium arsenate a, qRT-PCR 检测 Dicer mRNA 表达; b, Western blot 检测 Dicer 蛋白表达; c, Dicer 蛋白的相对表达水平. 与 0 组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

2.4 Dicer 在不同亚砷酸盐处理 16HBE 细胞中的表达

与对照组比较, 16HBE 细胞中 Dicer mRNA 的表达在 MMA 和 DMA 组无显著变化, 亚砷酸钠组显

著高于其余 3 组 ($P < 0.05$, 图 3a). 与对照组比较, MMA 和 DMA 组 16HBE 细胞中 Dicer 蛋白水平无变化, 亚砷酸钠组 Dicer 蛋白水平显著高于其余 3 组 ($P < 0.01$, 图 3b 和 3c).

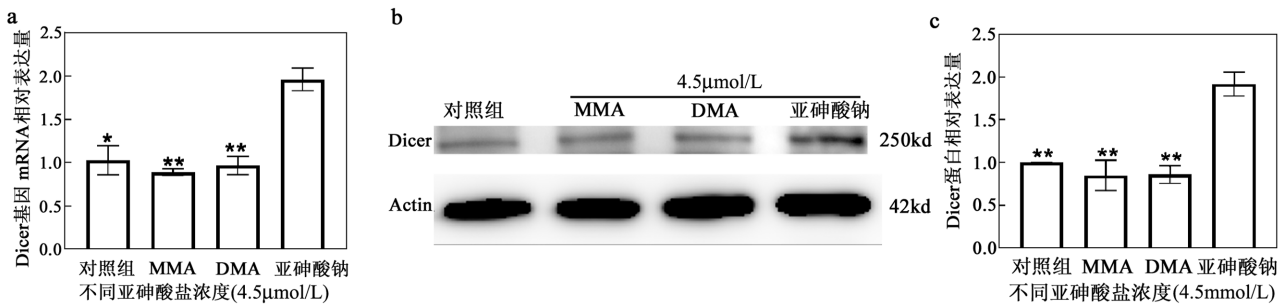


图 3 不同亚砷酸盐处理 16HBE 细胞后 Dicer mRNA 和蛋白表达水平

Fig.3 Effects of arsenite salts on Dicer mRNA and protein expression in human bronchial epithelial (16HBE) cells

a, qRT-PCR 检测 Dicer mRNA 表达; b, Western blot 检测 Dicer 蛋白表达; c, Dicer 蛋白的相对表达水平. 与亚砷酸钠组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

2.5 16HBE 细胞 siRNA 干扰 Dicer 效率验证

图 4a 结果显示, 荧光标记的 FAM-siRNA 转染结果显示细胞转染成功. 图 4b 结果表明, 与 NC 对

照组相比, SiDicer 组的 Dicer mRNA 相对表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 说明 16HBE 细胞中 Dicer 沉默成功.

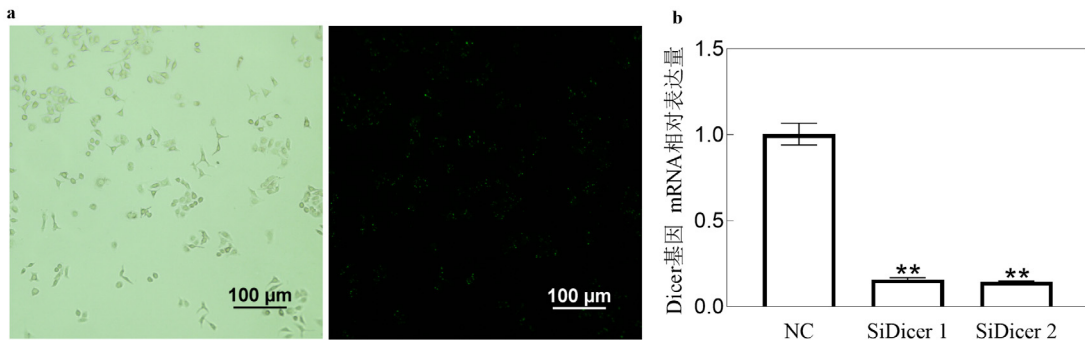


图 4 16HBE 细胞 siRNA 干扰 Dicer 效率

Fig.4 Evaluation of Dicer knockdown efficiency in human bronchial epithelial (16HBE) cells using siRNA-mediated silencing

a, 荧光显微镜观察荧光标记的 FAM-siRNA 转染结果; b, qRT-PCR 检测 siRNA 干扰 16HBE 细胞后 Dicer mRNA 表达水平. **与 NC 组相比, $P < 0.01$

2.6 敲低 Dicer 对亚砷酸钠处理前后 16HBE 细胞增殖的影响

CCK8 结果显示(图 5),与对照组 NC 相比, SiDicer1 和 SiDicer2 组的细胞活力分别下降了 19%和 15%($P<0.05$);在亚砷酸钠处理情况下,与对照组 NC 相比, SiDicer1 和 SiDicer2 组的细胞活力分别下降了 18%($P<0.05$)和 30%($P<0.01$).EdU 染

色结果显示,对照组 NC 增殖率分别是 SiDicer1 和 SiDicer2 组的 2.8 和 1.6 倍, SiDicer1 和 SiDicer2 组的细胞增殖率比 NC 组分别下降了 20%和 12% ($P<0.01$,图 6);在亚砷酸钠处理情况下,对照组 NC 增殖率均是 SiDicer1 和 SiDicer2 组的 4 倍, SiDicer1 和 SiDicer2 组的细胞增殖率比 NC 组均下降了 7%($P<0.05$,图 7).

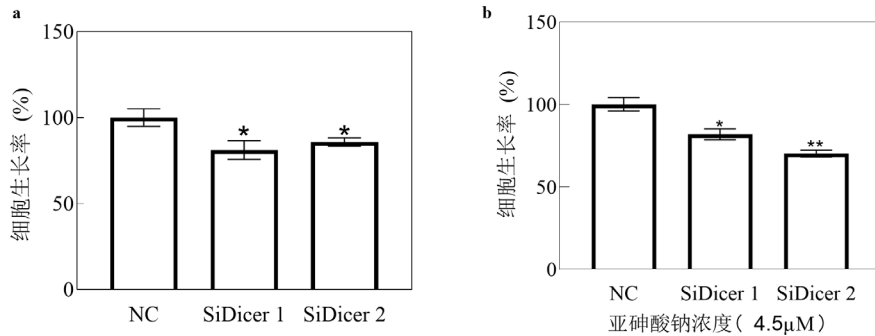


图 5 采用 CCK-8 实验检测 Dicer 敲低后的 16HBE 细胞在亚砷酸钠处理前后的细胞活力变化

Fig.5 CCK-8 assay was performed to measure viability changes in Dicer-silenced 16HBE cells pre- and post-sodium arsenite exposure a,敲低 Dicer 后 16HBE 细胞的活力水平;b,亚砷酸钠与 si-Dicer 共同处理后,16HBE 细胞活力水平.与 NC 组相比,* $P<0.05$;** $P<0.01$.

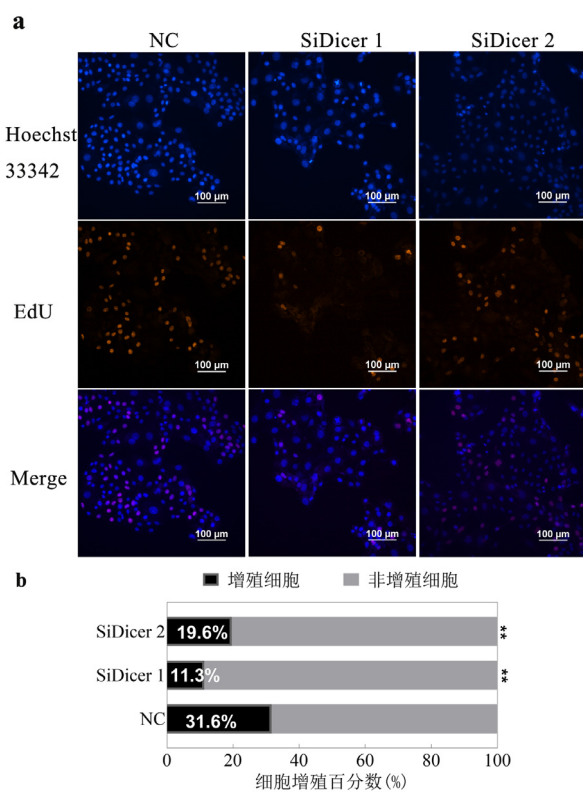


图 6 EdU 染色实验检测敲低 Dicer 后 16HBE 细胞的增殖能力

Fig.6 EdU assay was performed in Dicer-silenced 16HBE cells a,荧光显微镜观察细胞的增殖能力,蓝色为 Hoechst 33342 染色细胞,红色为 EdU 染色细胞;b,卡方检验分析细胞增殖率(%),与 NC 组相比,

** $P<0.01$

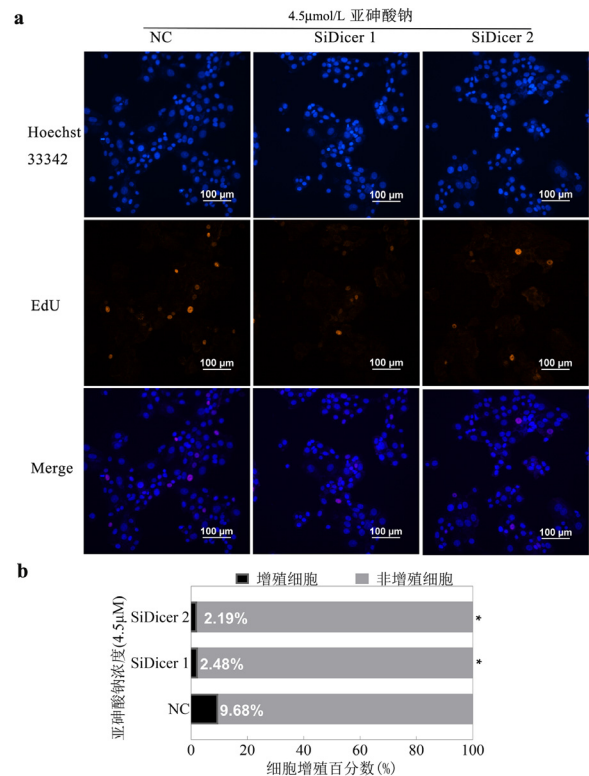


图 7 EdU 染色实验检测亚砷酸钠与 si-Dicer 共同处理后 16HBE 细胞的增殖能力

Fig.7 EdU assay was performed in Dicer-silenced 16HBE cells following sodium arsenite (NaAsO₂) exposure a,荧光显微镜观察细胞的增殖能力,蓝色为 Hoechst 33342 染色细胞,红色为 EdU 染色细胞;b,卡方检验分析细胞增殖率(%),与 NC 组相比,* $P<0.05$

3 讨论

砷是一种自然存在的具有毒性和致癌性的类金属,可引发高血压、心血管疾病、糖尿病、神经系统疾病、肾脏疾病、癌症等多种疾病.基因组改变、信号传导和细胞突变凋亡均参与砷的致癌过程^[14-16].有研究表明砷可影响重要基因的差异表达进而参与砷的致癌过程^[17].众多研究表明 Dicer 在许多癌症中异常表达,其致癌或抑癌功能因不同癌症而异,例如 Dicer 在卵巢癌、乳腺癌中低表达,并与差的预后相关,与此相反,Dicer 在前列腺癌中高表达,并与肿瘤转移相关^[18-21].故为确定职业砷暴露与 Dicer 基因表达的关系,本研究以云南省长期职业性砷霜厂工人为研究对象,探讨其尿样中 iAs、MMA 和 DMA 及总砷含量与 Dicer 基因 mRNA 相对表达水平的关系,结果表明,职业砷暴露显著上调人群 Dicer 基因 mRNA 相对表达水平,Dicer mRNA 的相对表达水平与尿中 iAs、MMA、DMA 及总砷含量均呈正相关.

砷的甲基化是砷代谢的重要机制,无机砷(iAs)及其代谢物的生物转化在砷致癌中起到关键作用^[22-23].甲基化产物通过尿液排出,iAs%、MMA%、DMA%、PMI、SMI 是体现甲基化能力的良好指标^[24].本研究进一步分析 Dicer 基因 mRNA 相对表达水平与 iAs%、MMA%、DMA%、PMI、SMI 与的关系,结果表明,Dicer mRNA 的相对表达水平与上述指标无显著相关性,预示砷的甲基化代谢对 Dicer 表达影响不大.

本研究进一步通过 qRT-PCR 和 Western blot 评估了不同浓度亚砷酸钠及其代谢产物 MMA 和 DMA 染毒人支气管上皮细胞系 16HBE 中 Dicer mRNA 和蛋白的表达量.结果表明,在不同浓度亚砷酸钠染毒 16HBE 细胞中 Dicer mRNA 和蛋白的表达水平逐渐升高,但其代谢产物 MMA 和 DMA 并未明显诱导 Dicer 异常表达.最近研究也显示,亚砷酸钠可诱导 HOTAIR 表达显著升高,但其甲基化代谢产物 MMA 和 DMA 并不能显著诱导其高表达^[25].据此,我们推测无机砷而非其代谢产物诱导了 Dicer 异常表达.

细胞增殖异常是恶性肿瘤最大特征之一,砷可诱导基因异常表达,从而参与细胞增殖过程^[26].研究

发现 Dicer 缺失可激活 p53 通路,抑制小鼠成纤维细胞的生长,促进其衰老,Dicer 缺失可导致组织细胞的凋亡^[27-29].但 Dicer 在无机砷影响细胞增殖中作用尚无报道.本研究结果显示,敲低 Dicer 表达可显著抑制 16HBE 细胞的增殖,无机砷和敲低 Dicer 联合作用导致 16HBE 细胞的增殖下降更多,预示无机砷可通过 Dicer 影响细胞的增殖.

4 结论

4.1 职业砷暴露人群中 Dicer mRNA 表达显著升高,且与尿中砷代谢产物含量呈正相关,

4.2 不同浓度亚砷酸钠可诱导 16HBE 细胞 Dicer mRNA 和蛋白表达,敲低 Dicer 显著抑制 16HBE 细胞的活力和增殖.

参考文献:

- [1] Nurchi V M, Djordjevic A B, Crisponi G, et al. Arsenic toxicity: Molecular targets and therapeutic agents [J]. *Biomolecules*, 2020,10(2): 235.
- [2] Pershagen G. Lung cancer mortality among men living near an arsenic-emitting smelter [J]. *American Journal of Epidemiology*, 1985, 122:684-694.
- [3] De Gregori I, Fuentes E, Rojas M, et al. Monitoring of copper, arsenic and antimony levels in agricultural soils impacted and non-impacted by mining activities, from three regions in Chile [J]. *Journal of Environmental Monitoring*, 2003,5:287-295.
- [4] Sassano M, Seyyedsalehi Ms, Siea Ac, et al. Occupational arsenic exposure and digestive and head and neck cancers: A systematic review and meta-analysis [J]. *Environmental Research*, 2024,260: 119643.
- [5] Folesani G, Galetti M, Petronini Pg, et al. Interaction between occupational and non-occupational arsenic exposure and tobacco smoke on lung cancerogenesis: A systematic review [J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2023,20(5): 4167.
- [6] Román M D, Niclis C, Aballay L R, et al. Do Exposure to arsenic, occupation and diet have synergistic effects on prostate cancer risk? [J]. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 2018,19:1495-1501.
- [7] Di Leva G, Garofalo M, Croce C M. MicroRNAs in cancer [J]. *Annual Review of Pathology*, 2014,9:287-314.
- [8] Zapletal D, Kubicek K, Svoboda P, et al. Dicer structure and function: conserved and evolving features [J]. *EMBO Reports*, 2023,24(7): e57215.
- [9] Vergani-Junior C A, Tonon-Da-Silva G, Inan M D, et al. DICER: structure, function, and regulation [J]. *Biophysical Reviews*, 2021, 13(6):1081-1090.
- [10] Tseng C F, Chen L T, Wang H D, et al. Transcriptional suppression of Dicer by HOXB-AS3/EZH2 complex dictates sorafenib resistance and

- cancer stemness [J]. *Cancer Science*, 2022,113(5):1601-1612.
- [11] Shan W, Sun C, Zhou B, et al. Role of Dicer as a prognostic predictor for survival in cancer patients: a systematic review with a meta-analysis [J]. *Oncotarget*, 2016,7(45):72672-72684.
- [12] Zhao H, Jin X, Su H, et al. Down-regulation of Dicer expression in cervical cancer tissues [J]. *Medical Oncology*, 2014,31(5):937.
- [13] Yu J, Li S, Shen S, et al. The transcript NR 134251.1 of lncRNA APTR with an opposite function to all transcripts inhibits proliferation and induces apoptosis by regulating proliferation and apoptosis-related genes [J]. *Human & Experimental Toxicology*, 2023;42:9603271221150247.
- [14] Rager Je, Yosim A, Fry Rc. Prenatal exposure to arsenic and cadmium impacts infectious disease-related genes within the glucocorticoid receptor signal transduction pathway [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014,15(12):22374-22391.
- [15] Shimoda Y, Kato K, Asami S, et al. Differences in apoptotic signaling and toxicity between dimethylmonothioarsinic acid (DMMTAV) and its active metabolite, dimethylarsinous acid (DMAIII), in HepaRG cells: Possibility of apoptosis cascade based on diversity of active metabolites of DMMTAV [J]. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, 2018,50:188-197.
- [16] Suzuki T, Yamashita S, Ushijima T, et al. Genome-wide analysis of DNA methylation changes induced by gestational arsenic exposure in liver tumors [J]. *Cancer Science*, 2013,104(12):1575-1585.
- [17] Sun M, Cheng H, Yu T, et al. Involvement of a AS3MT/c-Fos/p53 signaling axis in arsenic-induced tumor in human lung cells [J]. *Environmental Toxicology*, 2023,38(3):615-627.
- [18] Wang X, Chen H, Wen Y, et al. Dicer affects cisplatin-mediated apoptosis in epithelial ovarian cancer cells [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2018,18(5):4381-4387.
- [19] Su Cm, Hsu Tw, Chen Ha, et al. Chaperone-mediated autophagy degrade Dicer to promote breast cancer metastasis [J]. *Cellular Physiology*, 2023,238(4):829-841.
- [20] Faber C, Horst D, Hlubek F, et al. Overexpression of Dicer predicts poor survival in colorectal cancer [J]. *European Journal of Cancer*, 2011,47(9):1414-1419.
- [21] Chiosea S, Jelezcova E, Chandran U, et al. Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma [J]. *The American Journal of Pathology*, 2006,169(5):1812-1820.
- [22] Bakir M B, Salama M A, Refaat R, et al. Evaluating the therapeutic potential of one-carbon donors in nonalcoholic fatty liver disease [J]. *European Journal of Pharmacology*, 2019,847:72-82.
- [23] Deshpande A A, Bhatia M, Laxman S, et al. Thiol trapping and metabolic redistribution of sulfur metabolites enable cells to overcome cysteine overload [J]. *Microbial Cell*, 2017,4(4):112-126.
- [24] Kuo C C, Moon K A, Wang S L, et al. The association of arsenic metabolism with cancer, cardiovascular disease, and diabetes: A systematic review of the epidemiological evidence [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2017,125(8):087001.
- [25] Tan J, Sun M, Luo Q, et al. Arsenic exposure increased expression of HOTAIR and LincRNA-p21 in vivo and vitro [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2021,28(1):587-596.
- [26] Wang M, Tan J, Jiang C, et al. Inorganic arsenic influences cell apoptosis by regulating the expression of MEG3 gene [J]. *Environmental Geochemistry and Health*, 2021,43(1):475-484.
- [27] Mudhasani R, Zhu Z, Hutvagner G, et al. Loss of miRNA biogenesis induces p19Arf-p53 signaling and senescence in primary cells [J]. *The Journal of Cell Biology*, 2008,181(7):1055-1063.
- [28] Harris K S, Zhang Z, Mcmanus M T, et al. Dicer function is essential for lung epithelium morphogenesis [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006,103(7):2208-2213.
- [29] Roche B, Arcangioli B, Martienssen R. New roles for Dicer in the nucleolus and its relevance to cancer [J]. *Cell Cycle*, 2017,16(18):1643-1653.

作者简介: 蒋成兰(1986-),女,山东临沂人,讲师,博士,主要从事职业砷暴露效应与机制研究.发表论文 6 篇.jiangchenglan@163.com.