

亚砷酸钠对 SD 大鼠肝组织纤维化及上皮-间质转化相关蛋白表达的影响

刁珩, 范丽丽, 阮文丽, 徐慧芬, 宋倩, 何瑞, 王大朋

贵州医科大学, 公共卫生与健康学院毒理学系/环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025



DOI 10.11836/JEOM22113

摘要:

[背景] 长期砷暴露易造成其在肝脏内蓄积, 从而导致肝脏病变。相关研究显示间充质细胞在肝纤维化中起着重要作用, 且上皮-间质转化(EMT)是间充质细胞的主要来源之一。

[目的] 探讨不同剂量亚砷酸钠染毒对 SD 大鼠肝组织纤维化及 EMT 相关蛋白表达的影响。

[方法] 24 只健康初断乳 SD 大鼠随机分为 4 组, 每组 6 只, 雌雄各半, 分别为对照组(10 mL·kg⁻¹ 生理盐水)、2.5 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组、5.0 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组和 10.0 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组, 灌胃染毒, 每天一次, 每周六次。每周称重大鼠一次, 持续 36 周后收集大鼠血清及肝组织, 称重并计算脏器系数。苏木精-伊红(HE)染色和马松(Masson)三色染色观察大鼠肝纤维化损伤病理改变程度; 酶联免疫吸附法(ELISA)检测大鼠血清中肝纤维化相关蛋白透明质酸(HA)、层粘连蛋白(LN)、III 型前胶原氨基端肽(PⅢNP)和 IV 型胶原(COL-IV)分泌水平; Western blotting 法检测大鼠肝组织中肝星状细胞(HSCs)活化相关蛋白 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)和转化生长因子 β 1(TGF- β 1), 以及 EMT 相关标志蛋白 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、锌指转录因子(Snail)表达水平。

[结果] 与对照组相比, 染毒第 36 周时, 10.0 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组雌、雄大鼠体重均降低($P < 0.05$), 肝脏系数增加($P < 0.05$)。病理染色结果显示: 各亚砷酸钠染毒组大鼠肝组织可见大量炎性细胞浸润, 肝实质细胞液化坏死、变性, 同时, 大鼠肝组织胶原纤维阳性着色面积均且随染毒剂量增加而逐渐上升($P < 0.05$)。ELISA 和 Western blotting 结果显示: 5.0、10.0 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组 HA、LN、PⅢNP、COL-IV 分泌水平较对照组和 2.5 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组增加($P < 0.05$); 与对照组相比, 各染毒剂量组大鼠肝组织中 α -SMA、TGF- β 1 蛋白表达均上升($P < 0.05$), E-cadherin 蛋白表达水平下降($P < 0.05$), 而 N-cadherin、Vimentin、Snail 表达水平升高($P < 0.05$)。

[结论] 亚砷酸钠暴露可诱导 SD 大鼠 HSCs 活化及肝纤维化损伤, 导致细胞外基质分泌水平增加, 同时伴有肝组织 EMT, 提示 EMT 与砷致肝纤维化损伤过程密切相关。

关键词: 砷; 肝纤维化; 肝星状细胞; 细胞外基质; 上皮-间质转化

Effects of sodium arsenite on liver fibrosis and expression of epithelial-mesenchymal transformation-related proteins in SD rats DIAO Heng, FAN Lili, RUAN Wenli, XU Huifen, SONG Qian, HE Rui, WANG Dapeng (Department of Toxicology, School of Public Health/Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

Abstract:

[Background] Long-term exposure to sodium arsenite leads to its accumulation in the liver and liver injury as a result. Previous studies showed that mesenchymal cells play an important role in hepatic fibrosis, and epithelial-mesenchymal transformation (EMT) is considered to be a main source of mesenchymal cells.

[Objective] To investigate the effects of sodium arsenite at different doses on liver fibrosis and EMT-related protein expressions in SD rats.

[Methods] Twenty-four healthy weaned SD rats, half male and half female, were randomly divided into four groups according to body weight, with 6 rats in each group. The four groups were control group (gavage with 10.0 mL·kg⁻¹ physiological saline), 2.5 mg·kg⁻¹ sodium arsenite group,

基金项目

国家自然科学基金项目(81872657, 82060582, 81660525); 贵州省第十三批优秀青年科技人才项目(黔科合平台人才[2022]5611号)

作者简介

刁珩(1998—), 男, 硕士生;
E-mail: dhwi111312@163.com

通信作者

王大朋, E-mail: wojushiwdp@126.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2022-04-04

录用日期 2022-11-01

文章编号 2095-9982(2022)12-1404-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

► 引用

刁珩, 范丽丽, 阮文丽, 等. 亚砷酸钠对 SD 大鼠肝组织纤维化及上皮-间质转化相关蛋白表达的影响[J]. 环境与职业医学, 2022, 39(12): 1404-1410.

► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM22113

Funding

This study was funded.

Correspondence to

WANG Dapeng, E-mail: wojushiwdp@126.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2022-04-04

Accepted 2022-11-01

► To cite

DIAO Heng, FAN Lili, RUAN Wenli, et al. Effects of sodium arsenite on liver fibrosis and expression of epithelial-mesenchymal transformation-related proteins in SD rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(12): 1404-1410.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM22113

5.0 mg·kg⁻¹ sodium arsenite group, and 10.0 mg·kg⁻¹ sodium arsenite group. All rats were gavaged 6 d per week for 36 weeks and weighed once a week, the serum and liver tissues of rats were collected and weighed, then the organ coefficient was calculated. Hematoxylin-eosin staining and Masson's trichrome staining were used to determine the pathological changes of hepatic fibrosis in rats. The serum secretion levels of hyaluronic acid (HA), laminin (LN), procollagen III N-terminal propeptide (PIIINP), and collagen IV (COL-IV) in rats were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The protein expressions of HSCs activation-related proteins, such as α -smooth muscle actin (α -SMA) and transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1), as well as EMT-related markers, such as E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, and Snail, were detected by Western blotting.

[Results] Compared with the control group, the 10.0 mg·kg⁻¹ sodium arsenite group showed decreased body weight ($P < 0.05$) and increased liver coefficient ($P < 0.05$) of female and male rats. The pathological staining showed that, compared with the control group, a large number of inflammatory cells were observed in liver tissue of rats exposed to sodium arsenite, liver parenchymal cells were also liquefied, necrotic, and denatured, and the collagen positive staining area of liver tissue showed an upward trend along with the increase of arsenic exposure dose ($P < 0.05$). The results of ELISA and Western blotting showed that the serum secretion levels of HA, LN, PIIINP, and COL-IV in the 5.0 and 10.0 mg·kg⁻¹ sodium arsenite groups were higher than those in the control group and the 2.5 mg·kg⁻¹ sodium arsenite group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the expressions of α -SMA and TGF- β 1 proteins in liver tissue were increased in each sodium arsenite exposure group ($P < 0.05$), the expression levels of E-cadherin protein were decreased ($P < 0.05$), and the expression levels of N-cadherin, Vimentin, and Snail were increased ($P < 0.05$).

[Conclusion] Sodium arsenite exposure can induce HSCs activation and liver fibrosis injury in SD rats, resulting in increased extracellular matrix secretion levels, accompanied by EMT in liver tissue, suggesting that EMT is closely related to the process of liver fibrosis caused by arsenic.

Keywords: arsenic; hepatic fibrosis; hepatic stellate cell; extracellular matrix; epithelial mesenchymal transformation

砷(arsenic, As)是一种广泛存在于自然界中的类金属毒物,是少数人体内可代谢的毒物之一,分为有机砷与无机砷,其中无机砷危害较大,可通过消化道、呼吸道等途径进入体内^[1]。因无机砷可在体内进行甲基化代谢的特性,砷可在人体多器官组织中积累并造成损害^[2]。肝脏是无机砷代谢的主要场所,体内外研究表明,长期砷暴露易造成其在肝脏内蓄积,从而导致肝脏病变,如肝功能异常、肝肿大、肝纤维化、肝硬化甚至肝癌^[3-4]。其中肝纤维化在还未进入肝硬化、肝癌阶段前尚有逆转的可能,因此减缓和阻断肝纤维化发展是目前防治慢性肝病的重要策略^[5]。

肝纤维化是许多慢性肝病的一个复杂病理生理过程,其特征是肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)明显活化和细胞外基质(extracellular matrix, ECM)过度沉积^[6]。越来越多的研究表明间充质细胞与肝纤维化发生发展密切相关,而上皮-间质转化(epithelial mesenchymal transformation, EMT)是间充质细胞的重要来源之一^[7]。EMT是在某些病理条件下,上皮细胞转化为可移动、迁移、侵袭的间充质细胞,其主要特征表现为上皮细胞标志 E-钙黏蛋白(E-cadherin)表达减少,而间质细胞标志 N-钙黏蛋白(N-cadherin)与波形蛋白(Vimentin)表达明显上升。通过 EMT,肝脏内静止期 HSCs、肝细胞、胆管上皮细胞等可转化成为具有间质表型的肌成纤维样细胞,参与肝纤维化发生发展^[8]。此外,课题组前期研究亦发现,无机砷暴露可导致 HSCs Lx-2 进一步活化,进而增加 ECM 分泌^[9]。但在砷致肝

纤维化损伤过程中,EMT 相关蛋白表达与肝纤维化的关系目前还鲜有报道。本研究通过建立不同浓度砷暴露 SD 大鼠动物模型,探讨该过程中肝组织纤维化及 EMT 相关蛋白的表达变化,为砷致肝纤维化损伤针对性防治提供可能的分子干预靶点。

1 对象与方法

1.1 主要试剂与仪器

亚砷酸钠(优级纯, Sigma, 美国),二甲苯、乙醇、多聚甲醛(分析纯,重庆川东化工有限公司,中国),二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度测定试剂盒、5×十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)蛋白上样缓冲液(上海碧云天生物技术研究所,中国),聚丙烯酰胺凝胶电泳(polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE)凝胶快速制备试剂盒(上海雅酶生物医药科技有限公司,中国),兔抗大鼠 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)多克隆抗体(Abcam, 英国),小鼠抗大鼠转化生长因子 β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)多克隆抗体(上海爱必信公司,中国),兔抗大鼠 Vimentin 抗体(Cell Signaling Technology, 美国),兔抗大鼠 β -肌动蛋白(β -actin)抗体、兔抗大鼠 E-cadherin、兔抗大鼠 N-cadherin、兔抗大鼠锌指转录因子(Snail)抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(Proteintech, 美国),聚偏二氟乙烯膜、增强型化学

发光(enhanced chemiluminescence, ECL)试剂、彩色蛋白标准品(Milipore, 美国), 酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒(上海酶联生物科技有限公司, 中国), 牛血清白蛋白、苏木精-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒、马松(Masson)三色染色试剂盒、放射沉淀免疫法高效裂解液、三羟甲基氨基甲烷盐酸盐-吐温 20 缓冲盐溶液(tris-buffered saline-Tween-20, TBS-T)(北京索莱宝科技有限公司, 中国)。ChemiDoc™ 凝胶成像系统(Bio-Rad, 美国), Multiskan GO 全波长酶标仪(Thermo, 美国), RM2235 手动滚轮式切片机(Leica, 德国), EG1150H 加热石蜡包埋系统(孝感市亚光医用电子有限公司, 中国), 尼康 80i 荧光显微镜(上海尼康仪器有限公司, 中国)。

1.2 动物分组及染毒

健康清洁级初断乳 SD 大鼠 24 只, 体重(100±10)g, 雌雄各半, 购于辽宁长生生物技术有限公司, 动物合格证号 [SCXK(辽)2015-0001]。大鼠饲养于贵州医科大学动物实验中心, 许可证号 [SYXK(黔)2018-0001], 适应性饲养 1 周后随机分为 4 组, 每组 6 只。根据课题组前期研究^[10-11]设置对照组(给予 10 mL·kg⁻¹ 生理盐水)、2.5 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组、5.0 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组、10.0 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组, 灌胃处理, 每天一次, 一周六次, 染毒 36 周。实验期间所有大鼠在清洁级动物房内(室内温度 22~24 °C, 湿度为 60%~70%, 昼夜节律为 12 h 昼夜交替)分笼饲养, 自由饮水, 喂食标准饲料。本实验经贵州医科大学动物伦理审查委员会批准(No.1800233), 实验过程符合动物伦理学要求。

1.3 大鼠称重及血清、肝组织采集

实验期间观察动物一般情况, 每周称重一次。染毒结束后, 称取大鼠重量, 随即腹腔注射 0.9%(质量分数)的戊巴比妥钠进行麻醉, 使用非抗凝采血管心脏真空负压取血, 随后立即分离肝组织, 称重并计算脏器系数。采用 4%(体积分数)多聚甲醛溶液固定肝右叶, 其余肝组织装于无菌、无酶冻存管, -80 °C 低温冰箱保存, 以备肝脏病理学观察和 Western blotting 检测。血样以离心半径 6 cm, 3000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 收集血清于 -80 °C 低温冰箱保存以备 ELISA 相关指标检测。

1.4 大鼠肝脏病理学观察

固定后的肝组织经脱水、石蜡包埋后, 采用切片机进行组织切片(5 μm)。将切片浸泡在二甲苯中脱蜡, 乙醇梯度脱水后, 常规 HE 和 Masson 染色, 最后用中性树胶封固, 晾干后光学显微镜下观察、拍照并进行病理分析。Masson 染色切片在光学显微镜下通过摄

像头采集图像并利用 ImageJ 1.8.0 图像分析系统进行单位(视场)面积纤维组织面积测量。每张切片(每例动物标本)随机选取 5 个区域(视场), 计算各剂量组大鼠肝组织内胶原纤维阳性着色面积的均值, 反映肝组织纤维化的严重程度。

1.5 ELISA 法检测大鼠血清肝纤维化相关指标

大鼠血清严格按照 ELISA 试剂盒说明书标示的步骤, 检测 ECM 主要成分透明质酸(hyaluronic acid, HA)、层粘连蛋白(laminin, LN)、III 型前胶原氨基端肽(procollagen III N-terminal propeptide, PIII NP)和 IV 型胶原(collagen IV, COL-IV)的分泌水平。

1.6 Western blotting 法检测大鼠肝组织 HSCs 活化、EMT 相关蛋白表达

称取 200 mg 肝脏组织, 剪碎, 加入 1.2 mL 放射沉淀免疫法裂解液和少许氧化钛研磨珠, 机械研磨使裂解液和肝脏组织充分接触, 形成匀浆后转移至 1.5 mL EP 管中, 离心半径 6 cm, 12000 r·min⁻¹ 4 °C 离心 15 min 取上清转移至 1.5 mL EP 管, 即为肝组织总蛋白。

采用 BCA 蛋白浓度试剂盒进行定量, 提取的总蛋白加入 5×SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液加热煮沸 10 min 变性, 样品冷却后取等量蛋白进行电泳, 接着转移至聚偏二氟乙烯膜上。将膜于含 7%牛血清白蛋白的 1×TBS-T 中封闭 2 h, 分别加入稀释后的一抗 α-SMA(1:2000)、TGF-β1(1:500)、E-cadherin(1:2000)、N-cadherin(1:1500)、Vimentin(1:2000)、Snail(1:500)和 β-actin(1:2000), 4 °C 孵育过夜。次日 1×TBS-T 洗涤 3 次, 每次 12 min, 加入 1:2000 辣根过氧化物酶标记二抗, 室温孵育 2 h, 1×TBS-T 洗涤 3 次, 每次 12 min。

采用 ECL 荧光发光试剂进行显色反应, 图像用凝胶成像系统 Image J 1.8.0 软件分析蛋白条带平均光密度值。采用目标蛋白和内参蛋白(β-actin)的平均光密度比值表示蛋白的相对表达水平。

1.7 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。计量资料采用 SPSS 24.0 软件进行统计学分析, 多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA), 进一步组间两两比较, 方差齐选用采用 Bonferroni 检验, 方差不齐选用 Tamhane's T2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 不同浓度砷染毒大鼠体重及肝脏系数

与对照组相比, 染毒第 36 周时, 5.0 mg·kg⁻¹ 亚

砷酸钠组雄性大鼠体重降低($P < 0.05$); 与对照组、 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $5.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组相比, 染毒第 36 周时, $10.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组雄性大鼠体重降低($P < 0.05$); 与对照组相比, 染毒第 36 周时, $10.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组雌性大鼠体重降低($P < 0.05$); 染毒第 18 周时, $2.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $5.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 、 $10.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组雄性、雌性大鼠体重差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

染毒第 36 周时, 与对照组、 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 $5.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组相比, $10.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组雄性大鼠肝脏重量和肝脏系数上升($P < 0.05$); 与对照组和 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组相比, $10.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组雌性大鼠肝脏系数增加($P < 0.05$); 其余各亚砷酸钠染毒组雌性大鼠肝脏重量及肝脏系数与对照组相比, 差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

表 1 亚砷酸钠染毒对大鼠体重的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects on body weight of rats after exposure to NaAsO_2 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

单位(Unit): g

| 组别 | 雄性 | | | 雌性 | | |
|--|------------|-------------|---------------------------|------------|-------------|-------------------------|
| | 染毒前 | 第18周 | 第36周 | 染毒前 | 第18周 | 第36周 |
| 对照组 | 131.0±4.58 | 487.3±15.50 | 621.7±3.51 | 132.3±4.04 | 292.7±11.68 | 355.3±6.11 |
| $2.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组 | 127.3±1.53 | 483.3±9.29 | 609.7±10.02 | 135.0±2.00 | 293.7±6.43 | 348.7±8.74 |
| $5.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组 | 134.7±5.51 | 484.3±6.51 | 599.7±6.11 ^a | 127.7±3.06 | 292.7±6.03 | 343.7±7.02 |
| $10.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组 | 133.3±1.53 | 489.3±1.53 | 579.7±1.53 ^{abc} | 132.3±4.16 | 285.3±9.61 | 334.3±3.06 ^a |
| F | 2.12 | 2.08 | 24.89 | 2.37 | 0.58 | 5.45 |
| P | 0.16 | 0.18 | <0.01 | 0.15 | 0.64 | <0.05 |

[注] a: 与对照组相比, $P < 0.05$; b: 与 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组相比, $P < 0.05$; c: 与 $5.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组相比, $P < 0.05$ 。

表 2 染毒第 36 周时亚砷酸钠染毒对大鼠肝脏重量及其脏器系数的影响($n=3, \bar{x} \pm s$)

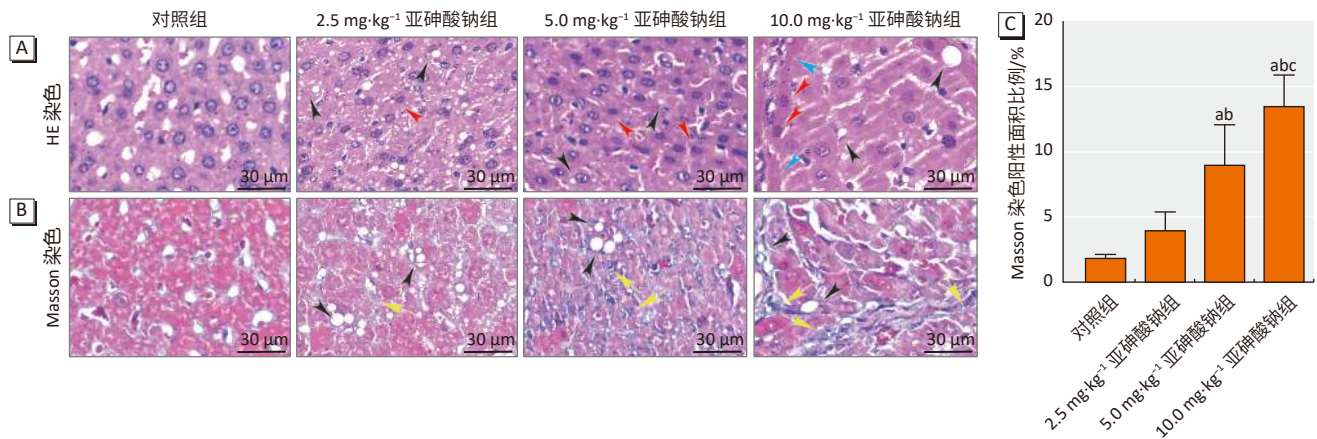
Table 2 Effects on liver weight and liver organ coefficient in rats after exposure to NaAsO_2 at the 36th week ($n=3, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | 雄性 | | 雌性 | |
|--|---------------------------|--------------------------|-----------|-------------------------|
| | 重量/g | 脏器系数/% | 重量/g | 脏器系数/% |
| 对照组 | 14.43±0.52 | 2.32±0.07 | 7.55±0.22 | 2.13±0.09 |
| $2.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组 | 14.13±0.16 | 2.32±0.04 | 7.70±0.24 | 2.20±0.07 |
| $5.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组 | 14.16±0.10 | 2.36±0.01 | 7.73±0.33 | 2.25±0.05 |
| $10.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组 | 14.96±0.33 ^{abc} | 2.58±0.06 ^{abc} | 8.03±0.19 | 2.40±0.03 ^{ab} |
| F | 4.37 | 19.67 | 1.90 | 9.75 |
| P | <0.05 | <0.01 | 0.21 | <0.01 |

[注] a: 与对照组相比, $P < 0.05$; b: 与 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组相比, $P < 0.05$; c: 与 $5.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组相比, $P < 0.05$ 。

2.2 不同浓度砷染毒致 SD 大鼠肝纤维化病理改变

HE 染色结果显示, 对照组肝组织结构基本正常, 肝小叶形态完整, 肝细胞呈条索状排列齐整, 未有肝实质细胞变性、脂肪空泡、炎性浸润细胞及肝纤维组织增生等病理性改变。各染砷剂量组可见大量炎性细胞浸润, 肝实质细胞液化坏死、变性。随着砷染毒剂量上升, 脂肪空泡密度及大小增加, 肝细胞索排列逐渐紊乱, 中央静脉周围及窦周纤维沉积逐渐增多, 纤维化程度加深, 其中 $10.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组最为明显。见图 1A。



[注] A: HE 染色, B: Masson 染色, C: Masson 染色胶原纤维阳性面积变化。图 A 中黑色箭头所指为脂肪空泡, 红色箭头所指为炎性浸润, 蓝色箭头所指为纤维沉积。图 B 中黑色箭头所指为脂肪空泡, 黄色箭头所指为蓝色的胶原纤维。a: 与对照组相比, $P < 0.05$; b: 与 $2.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组相比, $P < 0.05$; c: 与 $5.0 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 亚砷酸钠组相比, $P < 0.05$ 。

图 1 亚砷酸钠染毒后大鼠肝脏病理学变化及组织形态学变化

Figure 1 Pathological changes and histomorphological changes in rat liver after exposure to NaAsO_2

Masson 染色结果显示, 对照组大鼠肝细胞排列规则、齐整, 肝小叶结构清晰完整, 肝组织在门静脉周围未见明显阳性纤维着色; 各染砷组大鼠随着染毒剂量增加, 肝细胞逐渐排列不规则、松散, 出现大量脂肪空泡, 肝小叶结构异常, 在汇管区周围组织间隙变宽且出现明显胶原纤维着色。见图 1B。

定量结果显示, 与对照组相比, 各染砷剂量组大鼠肝组织胶原纤维阳性着色面积随剂量的增加而逐渐升高, 其中 5.0、10.0 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组较对照组增加 ($P < 0.05$)。见图 1C。

2.3 亚砷酸钠染毒后大鼠血清 ECM 相关蛋白分泌水平变化

与对照组和 2.5 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组相比, 5.0、10.0 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组大鼠血清 HA、LN、PIIINP、COL-IV 分泌水平均上升 ($P < 0.05$); 与 5.0 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组相比, 10.0 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组大鼠血清 HA、LN、COL-IV 分泌水平均上升 ($P < 0.05$)。见表 3。

表 3 亚砷酸钠染毒后大鼠血清中 ECM 相关蛋白分泌水平 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Secretion levels of ECM-related proteins in serum of rats after exposure to NaAsO₂ ($n=6, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | HA | LN | PIIINP | COL-IV |
|--------------------------------|---------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|
| 对照组 | 40.98±6.29 | 42.57±6.98 | 4.67±0.29 | 8.25±1.09 |
| 2.5 mg·kg ⁻¹ 亚砷酸钠组 | 45.36±7.23 | 46.63±9.43 | 5.71±0.92 | 9.53±1.50 |
| 5.0 mg·kg ⁻¹ 亚砷酸钠组 | 71.12±7.23 ^{ab} | 72.46±9.47 ^{ab} | 10.24±1.08 ^{ab} | 16.58±1.99 ^{ab} |
| 10.0 mg·kg ⁻¹ 亚砷酸钠组 | 88.38±9.67 ^{abc} | 89.50±11.91 ^{abc} | 12.55±2.97 ^{ab} | 20.32±3.40 ^{abc} |
| <i>F</i> | 50.39 | 32.05 | 30.54 | 41.99 |
| <i>P</i> | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 |

[注] a: 与对照组相比, $P < 0.05$; b: 与 2.5 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组相比, $P < 0.05$; c: 与 5.0 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组相比, $P < 0.05$ 。

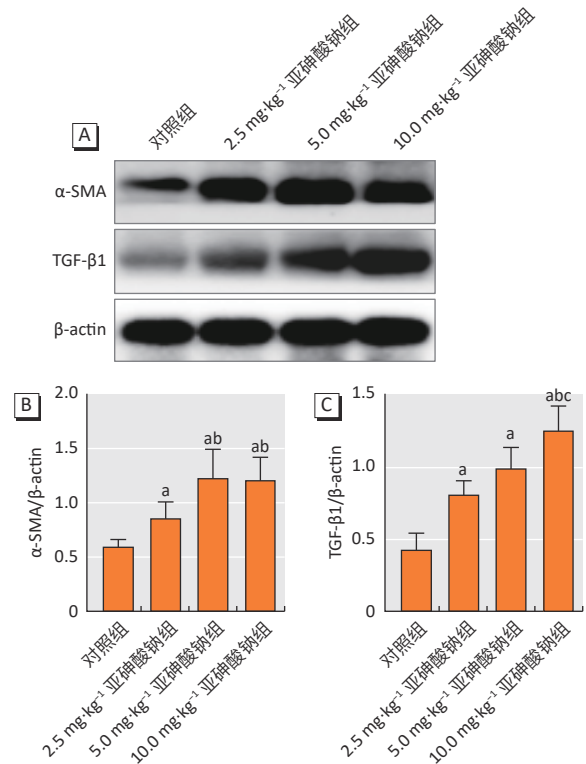
2.4 亚砷酸钠染毒后大鼠肝组织 HSCs 活化相关蛋白表达变化

与对照组相比, 各染砷剂量组大鼠肝组织中 α -SMA、TGF- β 1 蛋白表达均上升, 见图 2A; 其中 5.0、10.0 mg·kg⁻¹ 剂量组 α -SMA 蛋白表达高于 2.5 mg·kg⁻¹ 剂量组 ($P < 0.05$), 见图 2B; 10.0 mg·kg⁻¹ 剂量组 TGF- β 1 蛋白表达高于 2.5、5.0 mg·kg⁻¹ 剂量组 ($P < 0.05$), 见图 2C。

2.5 亚砷酸钠染毒后大鼠肝组织 EMT 相关蛋白表达变化

各染砷剂量组大鼠肝组织 E-cadherin 蛋白表达水平均低于对照组 ($P < 0.05$), 而 N-cadherin、Vimentin、Snail 表达水平较对照组均上升 ($P < 0.05$); 与 2.5 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组相比, 5.0 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组 N-cadherin 蛋白表达增加 ($P < 0.05$); 与 5.0 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组相

比, 10.0 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组 E-cadherin 表达下降 ($P < 0.05$), 而 N-cadherin、Vimentin 表达则上升 ($P < 0.05$)。见表 4。



[注] A: 各组大鼠 α -SMA、TGF- β 1 和 β -actin 蛋白条带图; B: α -SMA 蛋白相对表达量; C: TGF- β 1 蛋白相对表达量。a: 与对照组相比, $P < 0.05$; b: 与 2.5 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组相比, $P < 0.05$; c: 与 5.0 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组相比, $P < 0.05$ 。

图 2 亚砷酸钠染毒后大鼠肝组织 HSCs 活化相关蛋白条带图及其相对表达

Figure 2 Expression levels of HSCs activation-related proteins in rat liver after exposure to NaAsO₂

表 4 亚砷酸钠染毒后大鼠肝组织 EMT 相关蛋白表达 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 4 Expression levels of EMT-related proteins in rat liver after exposure to NaAsO₂ ($n=6, \bar{x} \pm s$)

| 组别 | E-cadherin | N-cadherin | Vimentin | Snail |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| 对照组 | 1.01±0.27 | 0.38±0.07 | 0.57±0.09 | 0.48±0.11 |
| 2.5 mg·kg ⁻¹ 亚砷酸钠组 | 0.59±0.13 ^a | 0.66±0.12 ^a | 0.73±0.12 ^a | 0.94±0.18 ^a |
| 5.0 mg·kg ⁻¹ 亚砷酸钠组 | 0.45±0.09 ^a | 0.89±0.15 ^{ab} | 0.87±0.17 ^a | 0.98±0.24 ^a |
| 10.0 mg·kg ⁻¹ 亚砷酸钠组 | 0.28±0.04 ^{abc} | 1.23±0.20 ^{abc} | 1.25±0.14 ^{abc} | 1.11±0.22 ^{ab} |
| <i>F</i> | 116.54 | 97.64 | 68.21 | 28.72 |
| <i>P</i> | <0.01 | <0.01 | <0.05 | <0.05 |

[注] a: 与对照组相比, $P < 0.05$; b: 与 2.5 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组相比, $P < 0.05$; c: 与 5.0 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组相比, $P < 0.05$ 。

3 讨论

本研究以不同浓度亚砷酸钠染毒 SD 大鼠 36 周, 结果发现 10.0 mg·kg⁻¹ 染砷组大鼠体重较对照组下降, 而肝脏系数则较对照组升高; 病理染色结果显示, 与

对照组相比,各亚砷酸钠染毒组大鼠肝组织可见大量炎性细胞浸润,大鼠肝组织胶原着色面积上升,且均随染砷剂量增加而逐渐上升,表明不同浓度亚砷酸钠染毒 SD 大鼠 36 周可造成不同程度肝纤维化损伤。

长期砷暴露会导致肝纤维化损伤,目前公认 HSCs 活化是肝纤维化中的关键事件。国内外研究显示 TGF- β /Smad 信号通路是调节纤维化的重要途径,而 HSCs 活化后分泌的 TGF- β 1 是最有效的促纤维化因子^[12]。在本研究中,采用不同剂量亚砷酸钠染毒 SD 大鼠后, α -SMA 与 TGF- β 1 表达水平随染砷剂量增加而上升,与上述通路研究结果相一致。

ECM 由胶原蛋白(I、II、III 和 IV 型)和非胶原糖蛋白(LN、纤维连接蛋白和蛋白多糖)组成^[13],其异常积聚是肝纤维化的典型特征。此外,ECM 过度沉积导致肝窦内皮细胞向血管型内皮细胞转化,从而促使 ECM 成分中 COL-IV 和 LN 等基底膜成分大量分泌^[14]。HA 是一种由 HSCs 合成的 ECM 成分,能敏感地反映肝纤维化损伤程度;PIIINP 多应用于慢性肝病肝纤维化的早期诊断和预后评估^[15]。目前临床上认为 ECM 的主要成分 HA、LN、PIIINP、COL-IV 是肝纤维化发生的生物标志物^[16]。本研究发现不同浓度砷致肝纤维化损伤中,10.0 mg·kg⁻¹ 亚砷酸钠组 ECM 主要成分 HA、LN、PIIINP、COL-IV 分泌水平升高。

研究表明 TGF- β 1 不仅是强烈的促纤维化因子,且已被确定为肝脏中 EMT 的诱导剂^[17-18]。最近的研究证实,高脂饮食可通过激活肝细胞中 TGF- β 及相关因子,进而诱导 EMT 的发生,促进上皮标志蛋白 E-cadherin 低表达,间质细胞标志相关蛋白 N-cadherin、Vimentin、Snail1 和 Snail2 的高表达,最终造成肝损伤^[19]。在器官纤维化过程中,EMT 在组织再生、器官修复相关过程中持续发生并最终导致器官纤维化乃至器官破坏^[20]。本研究在砷诱导的大鼠肝纤维化损伤模型,发现随染砷剂量的增加,大鼠肝组织中上皮标志蛋白 E-cadherin 表达逐渐下降,而间质细胞标志蛋白 N-cadherin、Vimentin 和 Snail 则升高,表明砷诱导肝组织 EMT 进程与肝纤维化损伤密切相关。

值得注意的是,ECM 成分在促进上皮细胞 EMT 中发挥重要作用。Chilvery 等^[21]研究发现,在对小鼠进行胆管结扎处理后,ECM 沉积与 EMT 进程呈现正相关关系。此外,在硫代乙酰胺诱导的肝纤维化损伤中发现, α -SMA、TGF- β 1、I 型胶原等 ECM 成分均参与肝细胞 EMT 过程,进而加重肝纤维化损伤^[22]。不同剂量亚砷酸钠染毒可诱导大鼠血清 ECM 主要成分分泌水平异

常增加,且伴随肝组织 EMT 发生发展,提示砷致 ECM 沉积与肝组织 EMT 存在密切关联。

综上所述,本研究结果显示亚砷酸钠暴露可促使大鼠 HSCs 活化及肝纤维化损伤,并导致 ECM 分泌水平增加,该过程伴随肝组织 EMT 发生发展,表明在砷暴露大鼠肝组织中,HSCs 活化、ECM 沉积和 EMT 三者相互影响,共同参与砷致肝纤维化损伤过程。然而,本研究仅在描述性观察层面发现上述关联,后续研究有必要针对砷致 HSCs 活化、ECM 沉积和 EMT 相互作用机制进行深入探讨,以期砷致肝纤维化损伤针对性防治提供新策略。

参考文献

- [1] MARTÍNEZ-CASTILLO M, ARCÍA-MONTALVO EA, ARELLANO-MENDOZA MG, et al. Arsenic exposure and non-carcinogenic health effects [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2021, 40(S12): S826-S850.
- [2] CHEN QY, COSTA M. Arsenic: a global environmental challenge [J]. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 2021, 61: 47-63.
- [3] SAMELO RR, DE MEDEIROS P D C, DE CARVALHO CAVALCANTE DN, et al. Low concentrations of sodium arsenite induce hepatotoxicity in prepubertal male rats [J]. *Environ Toxicol*, 2020, 35(5): 553-560.
- [4] EL-SAAD A M A, AL-KAHTANI MA, ABDEL-MONEIM A M. N-acetylcysteine and meso-2, 3 -dimercaptosuccinic acid alleviate oxidative stress and hepatic dysfunction induced by sodium arsenite in male rats [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2016, 10: 3425-3434.
- [5] DAWOOD RM, EL-MEGUID MA, SALUM GM, et al. Key players of hepatic fibrosis [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2020, 40(10): 472-489.
- [6] EZHILARASAN D, SOKAL E, NAJIMI M. Hepatic fibrosis: It is time to go with hepatic stellate cell-specific therapeutic targets [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2018, 17(3): 192-197.
- [7] YANG X, JIANG ZT, LI Y, et al. Non-coding RNAs regulating epithelial-mesenchymal transition: Research progress in liver disease [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 150: 112972.
- [8] GEERVLIE E, MORENO S, BAIAMONTE L, et al. Matrix metalloproteinase-1 decorated polymersomes, a surface-active extracellular matrix therapeutic, potentiates collagen degradation and attenuates early liver fibrosis [J]. *J Control Release*, 2021, 332: 594-607.
- [9] 阮文丽, 范丽丽, 徐慧芬, 等. 丝裂原诱导基因6在砷致人肝星状细胞活化及细胞外基质沉积中的作用 [J]. *环境与职业医学*, 2022, 39(2): 200-205. RUAN WL, FAN LL, XU HF, et al. Role of mitogen-inducible gene 6 in the activation of human hepatic stellate cells and deposition of extracellular matrix induced by sodium arsenite [J]. *J Environ Occup Med*, 2022, 39(2): 200-205.
- [10] LING D, LIU Y, WANG D, et al. Imbalanced inflammatory response in subchronic arsenic-induced liver injury and the protective effects of *Ginkgo biloba* extract in rats: Potential role of cytokines mediated cell-cell interactions [J]. *Environ Toxicol*, 2021, 36(10): 2073-2092.
- [11] 侯腾, 马璐, 张爱华. 大鼠肝脏组蛋白H3K18乙酰化水平与砷诱导肝损伤的关联性研究 [J]. *中华地方病学杂志*, 2020, 39(5): 325-331. HOU T, MA L, ZHANG AH. The association between histone modification of H3K18 acetylation and hepatic injury induced by arsenic in rats [J]. *Chin J Endemiol*, 2020, 39(5): 325-331.
- [12] DAI J, XU M, ZHANG X, et al. Bi-directional regulation of TGF- β /Smad pathway by arsenic: A systemic review and meta-analysis of in vivo and in vitro

studies[J]. *Life Sci*, 2019, 220: 92-105.

[13] PIPERIGKOU Z, KYRIAKOPOULOU K, KOUTSAKIS C, et al. Key matrix remodeling enzymes: functions and targeting in cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(6): 1441.

[14] MCQUITTY CE, WILLIAMS R, CHOKSHI S, et al. Immunomodulatory role of the extracellular matrix within the liver disease microenvironment[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 574276.

[15] MA HY, DONG L, QUAN SZ, et al. Comparison of four markers of hepatic fibrosis and hepatic function indices in patients with liver cirrhosis and hepatoma[J]. *Ann Palliat Med*, 2021, 10(4): 4108-4121.

[16] Hernandez-G V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis[J]. *Annu Rev Pathol*, 2011, 6: 425-56.

[17] KIM SM, HUR WH, KANG BY, et al. Death-associated protein 6 (Daxx) alleviates liver fibrosis by modulating Smad2 acetylation[J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1742.

[18] YU K, LI Q, SHI G, et al. Involvement of epithelial-mesenchymal transition in liver fibrosis[J]. *Saudi J Gastroenterol*, 2018, 24(1): 5-11.

[19] KWAPISZ O, GÓRKA J, KORLATOWICZ A, et al. Fatty acids and a high-fat diet induce epithelial-mesenchymal transition by activating TGFβ and β-catenin in liver cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(3): 1272.

[20] MARCONI GD, FONTICOLI L, RAJAN TS, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): The Type-2 EMT in wound healing, tissue regeneration and organ fibrosis[J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1587.

[21] CHILVERY S, BANSOD S, SAIFI MA, et al. Piperlongumine attenuates bile duct ligation-induced liver fibrosis in mice via inhibition of TGF-β1/Smad and EMT pathways[J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 88: 106909.

[22] FENG S, TONG H, GAO JH, et al. Anti-inflammation treatment for protection of hepatocytes and amelioration of hepatic fibrosis in rats[J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(5): 1213.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 汪源)

· 告知栏 ·

《环境与职业医学》杂志 2022 年审稿专家名单

(按姓氏汉语拼音首字母顺序排列)

- | | | | | | | | | | |
|-----|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 白云 | 班婕 | 卞倩 | 蔡美琴 | 蔡倩 | 常秀丽 | 陈波 | 陈承志 | 陈春晖 | 陈德 |
| 陈建武 | 陈健 | 陈钧强 | 陈敏健 | 陈青松 | 陈仁杰 | 陈涛 | 陈卫红 | 陈晓红 | 陈远华 |
| 陈章健 | 程旻娜 | 崔红梅 | 崔雷 | 崔留欣 | 戴俊明 | 戴宇飞 | 邓芙蓉 | 丁春光 | 丁钢强 |
| 丁文军 | 丁振华 | 董瑞华 | 段化伟 | 范红敏 | 范宏亮 | 房中则 | 高建军 | 高林峰 | 高宇 |
| 古晓娜 | 谷桂珍 | 关里 | 郭彩霞 | 郭新彪 | 郭雁飞 | 何丽华 | 何云 | 洪峰 | 洪新宇 |
| 胡天锡 | 黄波 | 黄德寅 | 黄敏 | 黄楠 | 黄素丽 | 贾光 | 贾晓东 | 菅向东 | 姜岳明 |
| 蒋守芳 | 蒋兆强 | 金辉 | 金克峙 | 金泰虞 | 金永堂 | 晋小婷 | 居静娟 | 阚海东 | 兰东 |
| 兰亚佳 | 雷立健 | 李宝平 | 李奔 | 李富业 | 李涵 | 李煌元 | 李健 | 李树新 | 李涛 |
| 李湫湫 | 李伟 | 李卫华 | 李艳博 | 李永波 | 厉曙光 | 梁戈玉 | 梁晓军 | 林华亮 | 林立 |
| 林敏 | 林楠 | 林忠宁 | 刘宝英 | 刘聪 | 刘菲菲 | 刘海宽 | 刘和亮 | 刘继文 | 刘克俭 |
| 刘烈刚 | 刘敏 | 刘起展 | 刘冉 | 刘涛 | 刘跃伟 | 卢国栋 | 卢伟 | 陆荣柱 | 路小婷 |
| 罗斌 | 罗春燕 | 吕斌 | 马文军 | 马文军 | 毛翎 | 毛振兴 | 孟晓静 | 聂继盛 | 牛丕业 |
| 牛侨 | 帕它木·莫合买提 | 潘小川 | 彭娟娟 | 钱海雷 | 秦立强 | 邱伟 | 瞿涤 | 任爱国 | 任利华 |
| 单晓梅 | 沈朝烨 | 沈福海 | 沈孝兵 | 沈鑫 | 沈学锋 | 施小明 | 史慧静 | 舒为群 | 宋海燕 |
| 宋宏 | 宋琦如 | 宋瑞金 | 宋伟民 | 孙道远 | 孙桂菊 | 孙品 | 孙蓉丽 | 孙文均 | 谈立峰 |
| 汤乃军 | 唐焕文 | 唐敬龙 | 唐萌 | 田耀华 | 田英 | 童世庐 | 万伟国 | 汪春红 | 汪国权 |
| 汪严华 | 汪作为 | 王爱红 | 王德军 | 王华 | 王焕强 | 王继伟 | 王劲峰 | 王丽敏 | 王莉娜 |
| 王美林 | 王墨培 | 王守林 | 王霞 | 王友洁 | 王志宏 | 王忠旭 | 王祖兵 | 邬春华 | 吴春峰 |
| 吴辉 | 吴南翔 | 吴庆 | 吴荣山 | 吴少伟 | 吴炜 | 伍一军 | 席淑华 | 向建军 | 肖斌 |
| 肖国兵 | 肖萍 | 熊丽蓓 | 徐东群 | 徐秋凉 | 徐望红 | 徐燕意 | 徐苑苑 | 徐兆发 | 徐志伟 |
| 薛涛 | 闫永建 | 严茂胜 | 杨迪 | 杨飞 | 杨光红 | 杨瑾 | 杨婧 | 杨克敌 | 杨磊 |
| 姚耿东 | 姚三巧 | 殷浩文 | 尹艳 | 于典科 | 余金明 | 余善法 | 余小金 | 余晓丹 | 虞慧婷 |
| 袁晶 | 袁涛 | 臧嘉捷 | 曾强 | 曾强 | 曾晓雯 | 翟成凯 | 詹铭 | 张春芝 | 张恒东 |
| 张慧东 | 张建彬 | 张洁 | 张娟 | 张美辨 | 张强 | 张勤 | 张勤丽 | 张青 | 张荣 |
| 张晓峰 | 张雪涛 | 张艳淑 | 张玉彬 | 张云权 | 张蕴晖 | 张增利 | 张忠彬 | 张遵真 | 章敏华 |
| 赵斌 | 赵金镞 | 赵琦 | 赵一鸣 | 郑金平 | 郑杨 | 郑玉建 | 周惠嘉 | 周建伟 | 周良 |
| 周文慧 | 周显青 | 周雪 | 周志俊 | 周紫垣 | 朱宝立 | 朱国英 | 朱晓俊 | 朱益民 | 朱珍妮 |