

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20170620002

潘丽, 魏倩, 高霞, 等. 丙烯腈诱导的氧化应激对大鼠肝脏内质网应激信号通路的影响[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(2): 77-83

Pan L, Wei Q, Gao X, et al. Effects of acrylonitrile-induced oxidative damage on endoplasmic reticulum stress signaling pathway in rats' liver [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(2): 77-83 (in Chinese)

丙烯腈诱导的氧化应激对大鼠肝脏内质网应激信号通路的影响

潘丽^{1,2}, 魏倩¹, 高霞¹, 石影¹, 郑爱¹, 薛红丽¹, 李芝兰^{1,*}

1. 兰州大学公共卫生学院, 兰州 730000

2. 兰州市妇幼保健院, 兰州 730000

收稿日期: 2017-06-20 录用日期: 2017-10-10

摘要: 为探讨丙烯腈(acrylonitrile, ACN)诱导的大鼠肝脏氧化损伤对内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)信号通路的影响, 我们将 50 只 SPF 级成年雄性 SD 大鼠按体重随机分为 5 组, 每组 10 只。各组分别以 12.5、25.0、50.0 mg·kg⁻¹ ACN 灌胃染毒, N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)干预组先用 300.0 mg·kg⁻¹ NAC 灌胃 30 min 后再灌 50.0 mg·kg⁻¹ ACN, 对照组以 0.5 mL·(100 g)⁻¹ 的玉米油灌胃, 1 次·天⁻¹, 6 天·周⁻¹, 共计 13 周。染毒结束后, 检测肝脏组织氧化还原酶活力及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量, GRP78、CHOP 及 caspase-12 mRNA 及蛋白表达水平。结果显示: 低、中 ACN 组大鼠肝脏 GSH 含量显著低于对照组($P < 0.05$); 低 ACN 组大鼠肝脏 GSH-Px 活力、SOD 活力及 MDA 含量均显著高于对照组($P < 0.05$); 中、高 ACN 组大鼠肝脏 CAT 活力明显低于对照组($P < 0.05$)。NAC 干预后可逆转 ACN 诱导的大鼠肝脏 GSH 含量、MDA 含量及 SOD 活力的变化。RT-PCR 结果显示, 高 ACN 组大鼠肝脏 GRP78、CHOP、caspase-12 mRNA 表达水平与对照组比较均升高($P < 0.05$)。NAC 干预后, CHOP、caspase-12 mRNA 表达水平与高 ACN 组比较均降低($P < 0.05$)。Western Blot 结果显示, 高 ACN 组大鼠肝脏 GRP78、CHOP、caspase-12 蛋白表达水平与对照组比较均升高($P < 0.05$), NAC 干预后可逆转以上作用。结果表明, ACN 慢性染毒对大鼠肝脏的氧化损伤可激活 ERS 信号通路, NAC 可减轻氧化损伤的程度而阻断 ERS 信号通路, 这可能是 ACN 产生肝脏毒性的机制之一。

关键词: 丙烯腈; 肝; 氧化损伤; 内质网应激

文章编号: 1673-5897(2018)2-077-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Acrylonitrile-Induced Oxidative Damage on Endoplasmic Reticulum Stress Signaling Pathway in Rats' Liver

Pan Li^{1,2}, Wei Qian¹, Gao Xia¹, Shi Ying¹, Zheng Ai¹, Xue Hongli¹, Li Zhilan^{1,*}

1. School of Public Health, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China

2. Lanzhou Maternal and Child Health Hospital, Lanzhou 730000, China

Received 20 June 2017 accepted 10 October 2017

Abstract: In order to study the effects of acrylonitrile (ACN)-induced oxidative damage on endoplasmic reticulum stress (ERS) signaling pathways in rat liver, 50 healthy adult male SD rats were randomly divided into 5 groups, 10

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金项目(lzujbky-2016-24)

作者简介: 潘丽(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向为儿少卫生与妇幼保健, E-mail: panl14@lzu.edu.cn

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: lizhl@lzu.edu.cn

rats in each group, according to the body weight. The rats' groups were treated with 0, 12.5, 25, 50.0 mg·kg⁻¹ ACN via gavage, respectively. NAC group were treated by intragastric administration of 300.0 mg·kg⁻¹ NAC after 30 min of reperfusion 50.0 mg·kg⁻¹ ACN, 1 time per day, 6 days per week for 13 weeks. The levels of GSH and MDA, the activity of SOD, GSH-Px, CAT in liver tissue were measured by spectrophotometry method. The mRNA and protein expressing levels of ERS-related GRP78, CHOP and caspase-12 were detected by RT-PCR and Western Blot. The results showed that the levels of GSH in low and middle ACN group were significantly decreased compared to control group. The activity of GSH-Px and SOD, the levels of MDA in low dose group was significantly increased compared to control group. CAT activity in middle and high dose groups were significantly decreased in comparison with the control group. Compared with high ACN group, GSH levels was significantly increased in NAC intervention group, and also MDA levels and SOD activity were significantly decreased. GRP78, CHOP and caspase-12 in high ACN group showed significant higher mRNA levels than that in the control group. The expression of CHOP and caspase-12 mRNA in NAC group were significantly lower than that in high ACN group. Western Blot showed that the expression levels of GRP78, CHOP and caspase-12 protein in high ACN group were significantly higher than that in control group. The expression levels of GRP78, CHOP, and caspase-12 protein in NAC group were lower than that in high ACN group. Our study indicated that exposure to ACN could induce oxidative damage on rats' liver, and then activate ERS signaling pathway. NAC could reduce the degree of oxidative damage and antagonize the ERS signaling pathway. Further study is needed to find the mechanism of this oxidative damage induced by ACN on ERS signaling pathway.

Keywords: acrylonitrile; liver; oxidative damage; endoplasmic reticulum stress

丙烯腈(acrylonitrile, ACN)是石化工业中合成腈纶纤维等高分子材料的重要中间单体^[1],属于高毒类有机氰化物。Abo-Salem 等^[2]用 50 mg·kg⁻¹ ACN 对雄性 Wistar 大鼠染毒后,发现血清 AST、ALT、直接胆红素、总胆红素升高,肝汇管区炎症、组织混乱,肝细胞毗邻的汇管区出现气球样变,淋巴细胞浸润及脂肪滴,Guang 等^[3]对大鼠 ACN 灌胃染毒后,发现大鼠肝脏组织 MDA 含量升高, CAT 活性降低, GSH 含量降低;金娜^[4]对小鼠的研究也得到相似的结果,提示 ACN 可通过扰乱机体的氧化平衡状态,诱导实验动物肝组织损伤。彗星实验发现 ACN 染毒剂量与肝细胞 DNA 拖尾率存在剂量-反应关系,提示 ACN 可造成肝细胞 DNA 损伤^[5]。

氧化应激是指因抗氧化机制受损引发的自由基和活性氧与蛋白、脂质及核酸等体内高分子反应,致使后者的结构功能出现损害的状态^[6]。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是指当外界毒物或刺激引起内质网(endoplasmic reticulum, ER)的内环境发生改变,导致 ER 内未折叠蛋白或错误折叠蛋白堆积,ER 为了应对其内环境的改变而发生的应激反应。最近几年的相关研究发现,大多数物质引起的肝脏损伤与氧化应激有关^[7-8],而氧化应激的产物 ROS,可通过氧化内质网膜,影响内质网膜上

Ca²⁺ 离子泵的功能,引起细胞内 Ca²⁺ 平衡紊乱,诱发 ERS 和细胞凋亡^[9],故氧化应激是 ERS 的敏感因子。体外实验研究发现 ERS 诱导剂毒胡萝卜素(thapsigargin, TG)及布雷菲尔德菌素 A(blebbistatin A, BFA)诱导的海马神经元细胞凋亡与细胞内 ROS 的积累有关,且芹菜素(apigenin, AP)、N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)、GSH 等抗氧化剂可明显通过抑制 ROS 的产生而降低 TG 及 BFA 引起的 ERS,提示 TG 及 BFA 诱导海马神经元细胞 ERS 是通过 ROS 的积累产生氧化应激所致,AP 可通过抗氧化的作用抑制 ERS 引起的细胞凋亡和 ERS 相关蛋白的表达^[10],认为氧化应激可诱导 ERS 的产生。当发生 ERS 时,细胞可依赖相应的信号转导调节机制来应对 ERS 以保证细胞的正常功能。但当应激反应过强,机体无法完成损伤修复时,则启动相应的凋亡通路诱导细胞凋亡的发生。NAC 是 L-半胱氨酸的乙酰化合物,可通过干扰自由基的生成和清除已生成自由基来发挥抗氧化作用,增加机体应对氧化应激的能力。

近年来的研究发现,许多肝脏疾病的发病机制与 ERS 诱导的细胞凋亡相关^[11],而关于 ACN 引起的肝损伤是否与 ERS 有关,目前尚未见报道。故本文以 ACN 对 SD 大鼠慢性染毒,同时设定 N-乙酰半

胱氨酸(NAC)干预组,探讨 ACN 慢性染毒引起大鼠肝脏氧化损伤对 ERS 信号通路的影响,为 ACN 肝脏毒性机制深入研究提供科学依据。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 实验动物及分组

SPF 级成年健康雄性 SD 大鼠 50 只,体重 250~300 g,由甘肃中医药大学医学实验动物中心提供(动物合格证号:SCXK(甘)2011-0001),适应性饲养 1 周后,按照体重随机分为 5 组,每组 10 只,以 12.5、25.0、50.0 mg·kg⁻¹ ACN^[12]灌胃染毒,NAC 组先用 300.0 mg·kg⁻¹ NAC 灌胃 30 min 后再灌 50.0 mg·kg⁻¹ ACN^[13],以玉米油(0.5 mL·(100 g)⁻¹)作为阴性对照组,1 次每天、6 天每周,共计 13 周。大鼠染毒期间实验室温度(22±1)℃,湿度 50%,昼夜交替各 12 h,自由饮水,普通饲料喂养。

1.2 试剂

丙烯腈(分析纯,纯度>99%)购于天津四通化工厂,NAC 购买于美国 Amresco 公司,GSH、GSH-Px、MDA、SOD、CAT 试剂盒购于南京建成生物工程研究所,BCA 蛋白定量试剂盒购于上海碧云天生物有限公司,GRP78 一抗(兔抗大鼠)、CHOP 一抗(小鼠抗大鼠)、caspase-12 一抗(兔抗大鼠)购于美国 SAB 公司,GAPDH 一抗(兔抗大鼠)购于美国 Abcam 公司,β-tubulin 一抗(兔抗大鼠)、HRP 标记的山羊抗兔二抗、HRP 标记的山羊抗小鼠二抗购于 Elabscience 公司,引物由上海生物工程有限公司设计合成。

1.3 氧化还原相关酶的测定

染毒结束后,处死大鼠。每组随机选取 6 只大鼠,称取 100~200 mg 肝脏组织按重量(g):匀浆介质(mL)=1:9 的比例充分研磨,低温离心(4℃,2 500 r·min⁻¹,10 min)后分装上清,按照试剂盒操作说明的步骤完成氧化还原酶指标的测定。

1.4 RT-PCR 检测步骤

实验开始前将所需实验器材高压灭菌,采用 Trizol 法提取肝脏总 RNA,0.1% DEPC 水溶解 RNA 后测定 RNA 浓度并定量至 500 ng·μL⁻¹备用。根据 20 μL RNA 反转录反应体系(Total RNA 10 μL, RNase Free dH₂O 6 μL, 5×PrimeScript RT Master Mix Perfect Real Time 4 μL)条件,42℃反转录反应 60 min 后 70℃加热 5 min 终止反应,完成肝脏 RNA 反转录为 cDNA。采用实时荧光定量 PCR 检测肝脏组织 GRP78、PERK、CHOP、caspase-12、β-actin mRNA 表达水平(引物序列见表 1),PCR 反应体

系为 20 μL,反应条件为 95℃预变性 2 min,95℃变性 10 s,55℃退火 15 s,40 个循环。最后采用 Pfaffl 法分析 mRNA 的相对表达量^[14]。

1.5 Western Blot 检测步骤

提取肝脏组织蛋白进行定量与变性制备蛋白样品,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳结束后将目的蛋白转移至 PVDF 膜上,4℃、200 mA 转膜 75 min 后 220 mA 转膜 75 min。在 TBST 配制的 5%脱脂奶粉中封闭 3 h,4℃水平摇床过夜孵育一抗(GRP78、CHOP、caspase-12、GAPDH、β-tubulin^①蛋白一抗用含 5%脱脂奶粉的 TBST 稀释,稀释比例分别为 1:500、1:1000、1:500、1:2000、1:1000),TBST 漂洗 5 次,每次 5 min,室温水平摇床孵育二抗 2 h 后(山羊抗兔单克隆二抗稀释比例为 1:2000,山羊抗小鼠单克隆二抗稀释比例为 1:4000,二抗均用 5% TBST 稀释),取出目的蛋白条带,TBST 漂洗 5 次,每次 5 min。将目的蛋白的 PVDF 膜放置在凝胶成像曝光仪中滴加 ECL 发光液曝光,保存目的蛋白条带,采用 Image J 图像分析软件进行蛋白条带灰度值分析,目的蛋白相对表达量的计算公式为:

$$\text{目的蛋白相对表达量} = \frac{\text{目的蛋白条带灰度值}}{\text{内参蛋白条带灰度值}}$$

1.6 统计分析

采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析,数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间各指标比较均采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果(Results)

2.1 ACN 染毒及 NAC 干预对大鼠肝脏抗氧化能力及脂质过氧化的影响

单因素方差分析结果显示,低、中 ACN 组大鼠肝脏 GSH 含量与对照组比较均降低($P<0.05$);低 ACN 组大鼠肝脏 GSH-Px 活力与对照组比较升高($P<0.05$)。低、高 ACN 组大鼠肝脏 SOD 活力及 MDA 含量与对照组比较均升高($P<0.05$)。中、高 ACN 组大鼠肝脏 CAT 活力与对照组比较均降低($P<0.05$)。NAC 干预后可逆转 ACN 诱导的大鼠肝脏 GSH 含量、MDA 含量及 SOD 活力的改变。结果见表 2。

① 由于实验中目的蛋白分子量与内参蛋白分子量接近,选择一个内参蛋白无法区分,所以实验选择 GAPDH、β-tubulin 2 个内参蛋白。

2.2 ACN 染毒及 NAC 干预对大鼠肝脏 ERS 相关基因表达水平的影响

RT-PCR 结果显示,高 ACN 组大鼠肝脏 GRP78、CHOP、caspase-12 mRNA 表达水平与对照组比较均

升高($P<0.05$);低、中 ACN 组大鼠肝脏 GRP78、CHOP mRNA 表达水平与对照组比较均升高($P<0.05$)。NAC 干预后,大鼠肝脏 CHOP、caspase-12 mRNA 表达水平与高 ACN 组比较均降低($P<0.05$)。结果见表 3。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequence

基因名称 Gene name		引物序列 Primer sequence
GRP78	Forward	5'-CGC GCT CGA TAC TGG CTG TGA CTA-3'
	Reverse	5'-TTC ATC TTG CCG GCG CTG TG-3'
CHOP	Forward	5'-CCT GTC CTC AGA TGA AAT TGG-3'
	Reverse	5'-ACC ACT CTG TTT CCG TTT CCT-3'
caspase-12	Forward	5'-AAA GGG ATA GCC ACT GCT GAT-3'
	Reverse	5'-GAG AGC CAC TCT TGC CTA CCT-3'
β -actin	Forward	5'-AAC CCT AAG GCC AAC CGT GAA AAG-3'
	Reverse	5'-CGA CCA GAG GCA TAC AGG GAC AAC-3'

表 2 丙烯腈 (ACN) 染毒及 N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 干预对大鼠肝脏抗氧化能力及脂质过氧化的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 2 Effects of acrylonitrile (ACN) on oxidative damage and lipid peroxidation and the intervention in effects of N-acetylcysteine (NAC) in rats liver ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别 Groups	GSH /($\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\text{ prot}$)	GSH-Px /($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ prot}$)	SOD /($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ prot}$)	CAT /($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ prot}$)	MDA /($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ prot}$)
对照组(Control)	44.13 $\pm$ 1.83	422.38 $\pm$ 24.13	688.13 $\pm$ 20.43	43.01 $\pm$ 2.86	0.37 $\pm$ 0.01
低 ACN 组(12.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ACN)	36.02 $\pm$ 4.24*	510.69 $\pm$ 45.99*	888.76 $\pm$ 18.39*	39.24 $\pm$ 0.50	0.56 $\pm$ 0.08*
中 ACN 组(25.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ACN)	34.13 $\pm$ 5.79*	439.51 $\pm$ 32.93	699.89 $\pm$ 81.81	31.46 $\pm$ 2.90*	0.42 $\pm$ 0.08
高 ACN 组(50.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ACN)	38.81 $\pm$ 6.57	376.28 $\pm$ 88.00	842.86 $\pm$ 77.51*	30.09 $\pm$ 7.30*	0.54 $\pm$ 0.02*
NAC 组(300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ NAC+50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ACN)	53.08 $\pm$ 5.27 [#]	412.27 $\pm$ 41.16	654.19 $\pm$ 58.12 [#]	32.09 $\pm$ 2.80	0.39 $\pm$ 0.07 [#]
<i>F</i>	6.932	4.553	13.605	9.724	5.460
<i>P</i>	0.006	0.011	0.000	0.000	0.014

注:与对照组比较,* $P<0.05$,与高 ACN 组比较,[#] $P<0.05$ 。

Note: compared with control,* $P<0.05$; compared with high ACN group, [#] $P<0.05$.

表 3 ACN 染毒及 NAC 干预对大鼠肝脏内质网应激 (ERS) 相关基因表达水平的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 3 Effect of ACN on expression of endoplasmic reticulum stress (ERS) related genes and the intervention in effects of NAC in rats liver ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别(Groups)	GRP78	CHOP	caspase-12
对照组(Control)	0.77 $\pm$ 0.13	0.83 $\pm$ 0.11	0.63 $\pm$ 0.17
低 ACN 组(12.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ACN)	1.07 $\pm$ 0.19*	1.15 $\pm$ 0.19*	0.72 $\pm$ 0.21
中 ACN 组(25.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ACN)	1.06 $\pm$ 0.07*	1.12 $\pm$ 0.15*	1.00 $\pm$ 0.42
高 ACN 组(50.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ACN)	1.13 $\pm$ 0.25*	1.10 $\pm$ 0.12*	1.22 $\pm$ 0.19*
NAC 组(300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ NAC+50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ACN)	0.88 $\pm$ 0.14	0.88 $\pm$ 0.05 [#]	0.78 $\pm$ 0.07 [#]
<i>F</i>	3.925	6.413	3.731
<i>P</i>	0.016	0.002	0.027

注:与对照组比较,* $P<0.05$,与高 ACN 组比较,[#] $P<0.05$ 。

Note: compared with control,* $P<0.05$; compared with high ACN group, [#] $P<0.05$.

2.3 ACN 染毒及 NAC 干预对大鼠肝脏 ERS 相关蛋白表达水平的影响

Western Blot 结果显示,高 ACN 组大鼠肝脏 GRP78、CHOP、caspase-12 蛋白表达水平与对照组比较均升高。NAC 干预后,大鼠肝脏 GRP78、CHOP、caspase-12 蛋白表达水平与高 ACN 染毒组比较均降低。结果见表 4。

3 讨论 (Discussion)

机体内由于细胞呼吸和能量代谢时刻发生着有氧化,在细胞中产生活性氧(ROS)分子,如 $\cdot\text{O}_2$ 和 $\cdot\text{OH}$ 等自由基,当细胞受到内外环境的刺激后,氧自由基及其代谢产物在体内聚集导致氧化应激^[15],从而破坏了机体的氧化与抗氧化系统之间的平衡。GSH 是非酶自由基清除剂^[16],可与体内产生的各种自由基缀合,维持体内氧化和抗氧化之间的平衡,本研究中低、中 ACN 染毒组大鼠肝脏 GSH 含量降低,可能是因为 ACN 与 GSH 缀合导致 GSH 的消耗。高 ACN 染毒组 GSH 和对照组比较降低但差异无统计学意义,这可能是过高的 ACN 对 GSH 的消耗,机体会代偿性增加 GSH。SOD 是生物体内重要的抗氧化酶, $\cdot\text{O}_2$ 可在 SOD 的催化作用下通过歧化反应

被转化为 H_2O_2 和 O_2 , H_2O_2 通过 CAT、GSH 被转化为 H_2O 和 O_2 ^[17],于是有毒的 $\cdot\text{O}_2$ 在 SOD 和 CAT 的作用下生成了无毒的 H_2O 和 O_2 ,清除了机体自由基,将体内自由基控制在无害水平,对维持细胞内氧化还原状况非常重要。中、高 ACN 染毒组大鼠肝脏 CAT 水平降低,降低了机体抗氧化能力,低 ACN 组大鼠肝脏 GSH-Px 水平升高,低、高 ACN 组大鼠肝脏 SOD 水平升高,这可能是因为 ACN 染毒后在其代谢过程中产生了过多的自由基,机体为了维持其本身的氧化-抗氧化之间的平衡状态,代偿性增高 GSH-Px 及 SOD 活力以及时清除机体多余的自由基,避免损伤加重。MDA 是生物体内产生的自由基作用于脂质后发生过氧化反应的终产物,是反映机体脂质过氧化损伤最具代表性的指标^[18]。其含量多少反映了机体细胞受自由基攻击程度的水平,染毒后,低、高 ACN 组大鼠肝脏 MDA 含量与对照组比较升高,提示 ACN 染毒后通过改变组织脂质过氧化水平及抗氧化能力可引起机体的氧化损伤。NAC 作为一种常用的抗氧化剂,可及时清除机体产生的活性氧,NAC 干预后增强了机体抵抗氧化损伤的能力,减轻脂质过氧化水平,对 ACN 诱导的肝脏氧化损伤发挥明显的保护作用,进一步验证了 ACN

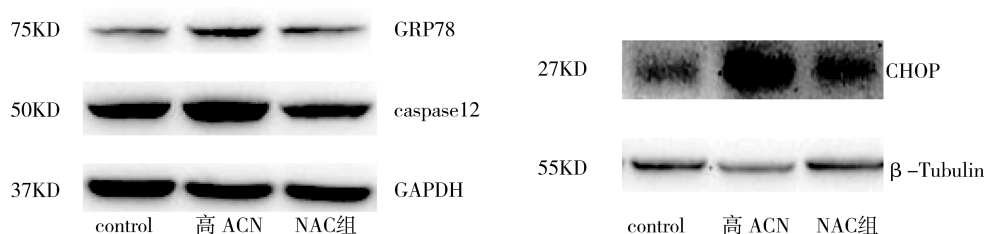


图1 ACN 染毒及 NAC 干预对大鼠肝脏内质网应激相关蛋白表达水平的影响的免疫印记图

Fig. 1 Western Blot analysis on effect of ACN on expression of ERS related proteins and the intervention in effects of NAC in rats liver

表4 ACN 染毒及 NAC 干预对大鼠肝脏 ERS 相关蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 4 Effect of ACN on expression of ERS related proteins and the intervention in effects of NAC in rats liver ($\bar{x} \pm s, n=6$)

分组(Groups)	GRP78	CHOP	caspase-12
对照组(Control)	0.47±0.08	0.76±0.06	0.75±0.08
高 ACN 组(50.0 mg·kg ⁻¹ ACN)	0.93±0.13*	1.05±0.10*	1.07±0.13*
NAC 组(300 mg·kg ⁻¹ NAC+50 mg·kg ⁻¹ ACN)	0.60±0.20 [#]	0.77±0.12 [#]	0.86±0.16 [#]
F	16.146	20.221	10.179
P	0.000	0.000	0.002

注:与对照组比较,* $P<0.05$,与高 ACN 组比较,[#] $P<0.05$ 。

Note: compared with control,* $P<0.05$; compared with high ACN group,[#] $P<0.05$.

诱导的大鼠肝脏损伤是由氧化应激引起。

内质网是机体内蛋白质合成、折叠及运输场所,也是细胞内 Ca^{2+} 储存的主要场所^[19]。在紫外线、缺氧、营养物质缺乏、病毒、氧化应激、毒性物质等各类理化因素存在的情况下可损伤内质网的功能从而诱发 ERS^[20]。正常状态下,内质网中存在的分子伴侣葡萄糖调节蛋白 78 (glucose-regulated protein, GRP78)与内质网膜上的双链 RNA 样内质网激酶(double-stranded RNA like endoplasmic reticulum kinase, PERK)、活化转录因子 6(activating transcription factor-6, ATF6)和肌醇需要酶 1(inositol-requiring enzyme-1, IRE1)3 种跨膜蛋白相互结合而没有活性,当 ERS 发生时,大量的未折叠蛋白或错误折叠蛋白将会在内质网腔内聚集而扰乱内质网的正常功能,此时 GRP78 将与 3 种跨膜蛋白发生解离,转而去结合堆积的未折叠或错误折叠蛋白,起到协助蛋白折叠的功能,降低 ERS,因此 GRP78 已被广泛认为是 ERS 发生的标志性分子^[21]。同时,与 GRP78 解离的 3 种感受蛋白被暴露激活,通过 PERK、ATF6、IRE1 这 3 种途径启动 ERS。ERS 作为细胞自我保护机制,正常情况下参与机体应对外在刺激的多重信号传导及基因网络调控,具有保护细胞维持其免受损伤的作用,但当 ERS 过度时,可通过多种方式导致细胞信号错误^[22],反而激活 ERS 相关的凋亡蛋白 CHOP 及 caspase-12 等,导致细胞凋亡^[23]。CHOP 是一种 ERS 特异性转录因子^[24],也是 ERS 介导细胞由抗凋亡向促凋亡转化的重要信号分子^[25]。ERS 过强时,可通过 IRE-1、PERK 和 ATF6 的活化促进 CHOP 的大量表达,进而抑制抗凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白的表达,使细胞对 ERS 的敏感性增加,促进凋亡^[26];caspase-12 是一类鼠源性的内质网膜结合蛋白,正常情况下,caspase-12 以无活性的酶原形式(procaspase-12)存在,当活化之后转变为有活性的 caspase-12,可介导细胞凋亡过程,其机制是活化后的 caspase-12 进一步激活 ERS 分子 caspase-9,活化后的 caspase-9 有效切割和活化下游的 caspase-3,最终引起细胞凋亡,因此 caspase-12 被认为是 ERS 介导凋亡路径的重要标志物^[27]。ERS 发生后,GRP78 与复合物分离,转而去结合堆积在内质网腔内的未折叠蛋白,从而使 caspase-12 暴露活化,启动细胞凋亡途径^[28]。本研究中,ACN 染毒后上调肝脏 GRP78 mRNA 及蛋白表达水平启动 ERS,再通过上调 CHOP、caspase-12 mRNA 及蛋白表达水平启动了 ERS 相关凋亡通路,认为 ACN 引起的

大鼠肝脏氧化损伤可能是诱导肝脏 ERS 发生的原因之一。NAC 干预后,可明显下调肝脏 GRP78、CHOP、caspase-12 mRNA 及蛋白表达水平而阻止 ERS 的发生,进一步说明 ACN 引起的大鼠肝脏氧化损伤是引起 ERS 发生的原因之一。

致谢:感谢北京大学公共卫生学院崔富强研究员在文章修改中给予的帮助。

通讯作者简介:李芝兰(1962-),女,硕士研究生导师,教授,兰州大学公共卫生学院儿少卫生与妇幼保健学研究所所长,研究方向为妇女劳动卫生与生殖健康。

参考文献 (References):

- [1] 赵乾龙. 丙烯腈诱导的氧化应激对雄性大鼠睾丸细胞 NF- κ B 信号通路影响的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2016: 1
Zhao Q L. Effects of acrylonitrile-induced oxidative stress on NF- κ B signaling pathway in testis cells of male rats [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2016: 1 (in Chinese)
- [2] Abo-Salem O M, Abd-Ellah M F, Ghonaim M M. Hepatoprotective activity of quercetin against acrylonitrile-induced hepatotoxicity in rats [J]. Journal of Biochemical & Molecular Toxicology, 2015, 25(6): 386-392
- [3] Guang X, Rong L, Wen X, et al. Curcumin pretreatment protects against acute acrylonitrile-induced oxidative damage in rats [J]. Toxicology, 2010, 267(1-3): 140-146
- [4] 金娜. 丙烯腈对小鼠肝、脑、睾丸组织脂质过氧化及抗氧化能力影响的研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2011: 10-11
Jin N. Effects of acrylonitrile on lipid peroxidation and antioxidant capacity in liver, brain and testis of mice [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2011: 10-11 (in Chinese)
- [5] Nakagawa Y, Toyozumi T, Sui H, et al. *In vivo*, comet assay of acrylonitrile, 9-aminoacridine hydrochloride monohydrate and ethanol in rats [J]. Mutation Research/Genetic Toxicology & Environmental Mutagenesis, 2015, 786-788: 104-113
- [6] 赵文玺, 金梅花, 李天, 等. 草苈蓉水萃取物对四氯化碳致肝损伤小鼠肝脏氧化应激的干预作用[J]. 中国中药杂志, 2013, 38(6): 875-878
Zhao W X, Jin M H, Li T, et al. Effects of aqueous extract of *Boschniakia rossica* on liver oxidative stress in mice with liver injury induced by carbon tetrachloride [J]. Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine, 2013, 38 (6): 875-878 (in Chinese)
- [7] 王超, 李侃, 张燕翔, 等. 槲皮素固体分散体对小鼠四氯化碳急性肝损伤氧化应激的影响[J]. 现代预防医学, 2013, 40(15): 2872-2876

- Wang C, Li K, Zhang Y X, et al. The effects of quercetin solid dispersion on the oxidative stress of acute liver injury in mice [J]. Modern Preventive Medicine, 2013, 40 (15): 2872-2876 (in Chinese)
- [8] 李桃园, 王昕, 赵旋, 等. 柚皮素对四氯化碳致小鼠化学性肝损伤中氧化应激介质生成影响的实验研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2010, 26(6): 420-423
- Li T Y, Wang X, Zhao X, et al. Experimental study on the effect of naringin on the formation of oxidative stress media in mice with chemical liver injury induced by carbon tetrachlorium [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2010, 26(6): 420-423 (in Chinese)
- [9] Zhou Y T, Xiao H B, Ming-Gang B I. ROS and endoplasmic reticulum stress [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2011, 27(5): 597-600
- [10] Choi A Y, Choi J H, Lee J Y, et al. Apigenin protects HT22 murine hippocampal neuronal cells against endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. Neurochemistry International, 2010, 57(2): 143-152
- [11] Reddy R K, Mao C, Baumeister P, et al. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: Role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation [J]. Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(23): 20915-20924
- [12] 尚文静. 丙烯腈对大鼠外周血内皮祖细胞功能的影响[D]. 上海: 复旦大学, 2012: 11-13
- Shang W J. Effects of acrylonitrile on endothelial function of peripheral blood endothelial cells in rats [D]. Shanghai: Fudan University, 2012: 11-13 (in Chinese)
- [13] Esmat A, El-Demerdash E, El-Mesallamy H, et al. Toxicity and oxidative stress of acrylonitrile in rat primary glial cells: Preventive effects of N-acetylcysteine [J]. Toxicology Letters, 2007, 171(3): 111-118
- [14] 陈军义. 丙烯腈对雄性大鼠血清性激素分泌及睾酮合成酶 mRNA 表达的影响[D]. 兰州: 兰州大学, 2016: 25-27
- Chen J Y. Effects of acrylonitrile on serum sex hormone secretion and testosterone synthase mRNA expression in male rats [D]. Lanzhou: Lanzhou University, 2016: 25-27 (in Chinese)
- [15] Pi J, Zhang Q, Fu J, et al. ROS signaling, oxidative stress and Nrf2 in pancreatic beta-cell function [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2010, 244(1): 77-83
- [16] Franco R, Schoneveld O J, Pappa A, et al. The central role of glutathione in the pathophysiology of human diseases [J]. Archives of Physiology & Biochemistry, 2008, 113(4-5): 234-258
- [17] Klaunig J E, Wang Z, Pu X, et al. Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2010, 254(2): 86-99
- [18] Farombi E O, Adelowo O A, Ajimoko Y R. Biomarkers of oxidative stress and heavy metal levels as indicators of environmental pollution in African cat fish (*Clarias gariepinus*) from Nigeria Ogun River [J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2007, 4(2): 158-165
- [19] Gong J, Wang X Z, Wang T, et al. Molecular signal networks and regulating mechanisms of unfolded protein response [J]. Journal of Zhejiang University-Science B (Biomedicine and Biotechnology), 2017, 18(1): 1-14
- [20] Wu J, Kaufman R J. From acute ER stress to physiological roles of the unfolded protein response [J]. Cell Death and Differentiation, 2006, 13(3): 374-384
- [21] Zhu X, Zhang X, Yu L, et al. Hepatic overexpression of GRP94 in a rabbit model of parenteral nutrition-associated liver disease [J]. Gastroenterology Research and Practice, 2015: Article ID 269831
- [22] Xu X, Liu T, Zhang A, et al. Reactive oxygen species-triggered trophoblast apoptosis is initiated by endoplasmic reticulum stress via activation of caspase-12, CHOP, and the JNK pathway in infection in mice [D]. Bristol: University of Bristol, 2012, 80(6): 2121-2132
- [23] Hitomi J, Katayama T, Taniguchi M, et al. Apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress depends on activation of caspase-3 via caspase-12 [J]. Neuroscience Letters, 2004, 357(2): 127-130
- [24] Oyadomari S, Mori M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress [J]. Cell Death and Differentiation, 2004, 11(4): 381-389
- [25] Tabas I, Ron D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress [J]. Nature Cell Biology, 2011, 13(3): 184-190
- [26] Puthalakath H, O'Reilly L A, Gunn P, et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim [J]. Cell, 2007, 129(7): 1337-1349
- [27] Pal S, Ghosh M, Ghosh S, et al. Atorvastatin induced hepatic oxidative stress and apoptotic damage via MAPKs, mitochondria, calpain and caspase 12 dependent pathways [J]. Food & Chemical Toxicology, 2015, 83: 36-47
- [28] Tan Y, Dourdin N, Wu C, et al. Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(23): 16016-16024 ◆