

# 潜在转化生长因子结合蛋白 2 在镉致人支气管上皮细胞氧化损伤中的作用

任亮, 张昉, 周珊珊, 段鹏, 陈卓航, 张双, 雷毅雄, 杨萍

广州医科大学公共卫生学院预防医学系, 广东 广州 510182

**摘要:** **目的** 研究潜在转化生长因子结合蛋白 2 基因(latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein 2, *LTBP2*) 在氯化镉致人支气管上皮细胞(the human bronchial epithelial cells, 16HBE) 氧化损伤中的作用。**方法** 分别用 10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$  氯化镉处理 16HBE 细胞 24 h, 用 30  $\mu\text{mol/L}$  氯化镉处理 16HBE 细胞 12、24、48 h, 利用 qRT-PCR 法检测细胞 *LTBP2* 基因表达变化。针对目的基因设计特异性 shRNA 序列, 退火并组装到慢病毒载体 pCDH 上, 构建 16HBE 稳定 *LTBP2* 低表达细胞株。分别用硫代巴比妥酸比色法测定丙二醛(malondialdehyde, MDA) 含量、总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) 活力。**结果** 30、40  $\mu\text{mol/L}$  处理组细胞 *LTBP2* mRNA 相对表达与氯化镉浓度为 0  $\mu\text{mol/L}$  对照组比较有统计学意义( $P < 0.05$ ), 且随着氯化镉染毒剂量的增加, *LTBP2* mRNA 表达逐渐升高( $P < 0.01$ )。30  $\mu\text{mol/L}$  氯化镉分别处理 16HBE 细胞 24、48 h, 细胞 *LTBP2* mRNA 基因相对表达与氯化镉未染毒细胞比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。不同浓度氯化镉处理 16HBE 及 *LTBP2* 低表达细胞株 16HBE-sh*LTBP2* 不同时间, 与 16HBE 相比, 氯化镉处理的 16HBE-sh*LTBP2* SOD 含量显著升高( $P < 0.05$ ), 而 MDA 含量显著降低( $P < 0.05$ )。**结论** *LTBP2* 低表达细胞减弱镉致细胞氧化损伤毒性, 提示 *LTBP2* 基因可能在镉致细胞氧化损伤过程中发挥促氧化作用。

**关键词:** 镉; 潜在转化生长因子结合蛋白 2 基因; 人支气管上皮细胞

**中图分类号:** R12 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-3110(2020)01-0021-05 **DOI:** 10.3969/j.issn.1006-3110.2020.01.006

## Role of latent transforming growth factor- $\beta$ binding protein 2 gene in oxidative damage of the human bronchial epithelial cells induced by cadmium

REN Liang, ZHANG Fang, ZHOU Shan-shan, DUAN Peng, CHEN Zhuo-hang, ZHANG Shuang, LEI Yi-xiong, YANG Ping  
Department of Preventive Medicine, School of Public Health, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510182, China

Corresponding authors: YANG Ping, E-mail: yhtgzmu@163.com; LEI Yi-xiong, E-mail: gz-leizeng@163.com

**Abstract:** **Objective** To study the role of latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein 2 (*LTBP2*) gene in oxidative damage of the human bronchial epithelial cells (16HBE) induced by cadmium chloride ( $\text{CdCl}_2$ ). **Methods** 16HBE cells were treated with different doses of  $\text{CdCl}_2$  (10  $\mu\text{mol/L}$ , 20  $\mu\text{mol/L}$ , 30  $\mu\text{mol/L}$  and 40  $\mu\text{mol/L}$ ) for 24 hours, and with 30  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  for 12, 24 and 48 hours, respectively. Quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction (qRT-PCR) assay was used to detect the changes in the expression of *LTBP2*. Specific shRNA sequences were designed according to the target gene. Then it was annealed and assembled on lentivirus vector pCDH. It was successfully constructed for the stable *LTBP2* under-expression in 16HBE cell lines. The contents of malondialdehyde (MDA) and the activity of total superoxide dismutase (SOD) were measured by hydroxylamine method and thiobarbituric acid colorimetry, respectively. **Results** Compared with the control group (0  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$ ), it was significantly different for the relative expression of *LTBP2* mRNA in 30  $\mu\text{mol/L}$  and 40  $\mu\text{mol/L}$  groups (both  $P < 0.05$ ), and the expression of *LTBP2* mRNA increased gradually with the increment of  $\text{CdCl}_2$  dosage ( $P < 0.01$ ). Compared with the control group (0  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$ ), it was significantly different for the relative expression of *LTBP2* mRNA in 16HBE cells which were treated with 30  $\mu\text{mol/L}$   $\text{CdCl}_2$  for 24 and 48 hours, respectively (both  $P < 0.01$ ). Compared with 16HBE, SOD content in 16HBE-sh*LTBP2* increased significantly ( $P < 0.05$ ), but MDA content in 16HBE-sh*LTBP2* decreased significantly ( $P < 0.05$ ) when treated with different concentration of  $\text{CdCl}_2$  for different time points. **Conclusions** The under-expression of *LTBP2* decreased cadmium-induced oxidative damage of 16HBE cells. It is suggested that *LTBP2* gene may play a promoting role in oxidative damage progress induced by  $\text{CdCl}_2$ .

**Key words:** cadmium; latent transforming growth factor- $\beta$  binding protein 2; human bronchial epithelial cell

**基金项目:** 国家自然科学基金(81402716, 81573177); 广州市科技计划项目(201510010109)

**作者简介:** 任亮(1993-), 男, 甘肃陇南人, 硕士在读, 研究方向: 环境毒理与化学致癌。

**通信作者:** 杨萍, E-mail: yhtgzmu@163.com; 雷毅雄, E-mail: gz-leizeng@163.com。

大量流行病学与实验室研究发现,镉可以通过职业接触、吸烟和摄入受污染的食物(谷类、蔬菜)等途径暴露,引起肝脏、肾脏、肺脏、骨骼、脑等多种器官及血液系统的损害<sup>[1-4]</sup>,镉及其化合物与生殖损害、肿瘤、糖尿病和衰老也有一定的关系<sup>[5-6]</sup>。有研究表明镉的毒性作用与其引起的氧化应激有关<sup>[7-9]</sup>,但其损伤机制仍未完全阐明。目前研究发现潜在转化生长因子结合蛋白 2(latent transforming growth factor-β binding protein 2, *LTBP2*)与甲状腺癌、肝癌、多器官肿瘤等肿瘤疾病的发生发展有关<sup>[10-14]</sup>,但其与环境化学物损伤作用机制还未有报道。拟检测氯化镉致支气管上皮细胞(the human bronchial epithelial cells, 16HBE)急性损伤后 *LTBP2* 基因表达,并在 *LTBP2* 缺陷细胞模型上研究镉致细胞氧化应激水平的变化,探讨 *LTBP2* 基因在氯化镉致损伤毒性中的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 正常人支气管上皮细胞(16HBE cells)由广州市呼吸疾病研究所徐军教授馈赠。

1.1.2 试剂 氯化镉(批号: xk13-201-0016,天津市福晨化学试剂厂)、胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司)、分析级无水乙醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇(广州化学试剂厂)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天生物技术)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)测定试剂盒、总超氧化物歧化酶(total super oxide dismutase, T-SOD)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)、TRIzol 试剂盒(美国 Invitrogen 公司)、GoScript™ Reverse Transcription System(美国 Promega 公司)、SYBR Green qPCR Master Mix(美国 Biomega 公司)。

1.1.3 仪器 二氧化碳培养箱(美国 Thermo 公司),电热恒温水浴箱(上海一恒科技有限公司),分析天平(德国 Sartorius 公司),ABI 7500 型实时荧光定量 PCR 系统(美国 Thermo 公司),M μLi-skan GO 全波长酶标仪(美国 Thermo 公司),X-22R 离心机(德国 Beckman 公司),UV-3900 紫外分光光度计(日本 Hitachi 公司),真空冷冻干燥机(北京博医康实验仪器有限公司)。

1.2 主要实验方法

1.2.1 细胞培养 16HBE 细胞在含 10%胎牛血清中培养,隔天换液,细胞融合至 80%~90%时,0.25%胰酶消化传代。

1.2.2 qRT-PCR 提取细胞总 RNA,用 GoScript™ Reverse Transcription system 试剂盒将 mRNA 逆转成

cDNA,反应总体积 20 μl,将 RNA 模板与 Oligo dT 引物及随机引物的混合液 10 μl 于 70 ℃,变性 5 min 后置冰上 5 min,再加上 10 μl 逆转录混合液上机反应,每个样本总 RNA 量为 200 ng。以 cDNA 为模板对 *LTBP2* 进行实时定量 PCR 检测,反应体系 20 μl: SYBR Green qPCR Master Mix 10 μl, P1(上游引物 10 μmol/L) 1 μl, P2(上游引物 10 μmol/L) 1 μl, 模板 2 μl, ddH<sub>2</sub>O 7 μl, 反应条件: 预变性 95 ℃ 2 min; 95 ℃ 变性 15 s, 退火 60 ℃ 1 min, 40 个循环。引物根据 Genbank 提供的目的基因 *LTBP2* 提供的 mRNA 序列,使用 Primer 5.0 软件按照 qRT-PCR 技术对引物的要求设计引物,由上海生工公司合成,序列见表 1。目的基因 *LTBP2* mRNA 的相对表达量用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 表示, ΔΔCt = (Ct<sub>目的基因</sub> - Ct<sub>内参基因</sub>)<sub>实验组</sub> - (Ct<sub>目的基因</sub> - Ct<sub>内参基因</sub>)<sub>对照组</sub>。每个组均设 3 个样品,对每个样品进行 1 次测定。

表 1 PCR 引物序列

基因名称	上游引物(5'-3')	下游引物(3'-5')
<i>LTBP2</i>	CAACGAGTCTTGACCCCTGG	ACACACAGCGGCTCCGC
<i>β-actin</i>	ACAGAGCCTCGCCTTTCGCCGAT	CTTGACATGCCGAGCCGTT

1.2.3 构建低表达细胞株 针对目的基因设计特异性 shRNA 序列,退火并组装到慢病毒载体 pCDH 上,用嘌呤霉素进行筛选,低表达细胞株命名为 16HBE-shLTBP2。

1.2.4 氧化应激 收集细胞,提取总蛋白,用反复冻融法破碎细胞,使其释放出细胞内成分。离心后,仔细收集上清液。按照硫代巴比妥酸比色法操作并在吸光度 550 nm 处检测吸光度,计算各组样本 MDA 含量;按照水溶性四唑盐(羟胺)法操作并在吸光度 532 nm 处检测吸光度,计算各组样本超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)含量。每个组均设 5 个平行。

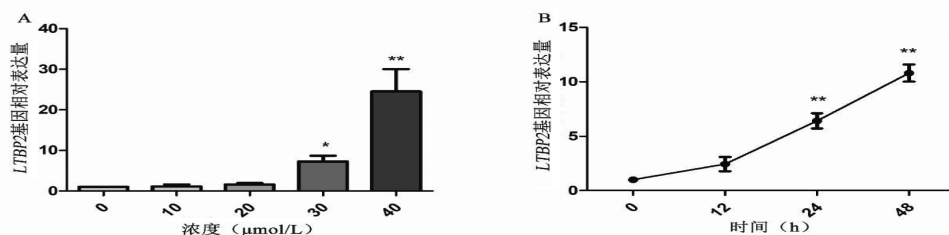
1.3 统计分析 实验数据通过 SPSS 16.0 软件分析,计量资料经正态性检验服从正态分布者,采用  $\bar{x} \pm s$  表示。*LTBP2* 基因表达的组间比较采用单因素方差分析(总体方差齐,进一步通过 SNK-*q* 检验进行多重比较)或 Kruskal-Wallis *H* 检验(总体方差不齐,进一步通过 Dunnett's T3 检验进行多重比较)。细胞株构建、SOD 和 MDA 的组间比较采用两独立样本 *t* 检验。氯化镉剂量与相应指标的关系采用一元线性回归分析,以 α = 0.05 作为检验水准。

2 结果

2.1 氯化镉处理细胞后 *LTBP2* 基因表达变化 分别用 10、20、30、40 μmol/L 氯化镉处理 16HBE 细胞 24 h,利用 qRT-PCR 法检测细胞 *LTBP2* 基因表达,各处理

组细胞 *LTBP2* mRNA 相对表达为  $(1.10 \pm 0.55)$ 、 $(1.66 \pm 0.34)$ 、 $(7.36 \pm 1.32)$  和  $(24.50 \pm 5.55)$ 。经 Kruskal-Wallis  $H$  检验,不同浓度处理组的 *LTBP2* 基因表达比较,差异有统计学意义( $H=12.32, P<0.05$ )。对图 1A 的数据进行一元线性回归分析,结果显示:回归方程为  $\hat{y}=5.33x-8.85$  ( $\hat{y}$  为 *LTBP2*mRNA 相对表达量,  $x$  为氯化镉浓度),  $R^2=0.66, F=25.6, P<0.01$ , 回归方程成立。提示随着染毒浓度的增加, *LTBP2*mRNA 表达逐渐升高,变化趋势呈现明显的剂量-效应关系。用  $30 \mu\text{mol/L}$  氯化镉分别处理 16HBE 细胞 12、24、48 h,细胞 *LTBP2* mRNA 基因相对表达分别为  $(2.43 \pm$

$0.65)$ 、 $(6.41 \pm 0.70)$ 、 $(10.80 \pm 0.79)$ 。方差分析结果显示,不同时间处理组的 *LTBP2* 基因表达比较,差异有统计学意义( $F=129.73, P<0.01$ )。经两两比较,24、48 h 处理组的 *LTBP2* 基因表达高于染毒时间为 0 h 的对照组,差异有统计学意义( $P<0.01$ )。对图 1B 的数据进行一元线性回归分析,结果显示:回归方程为  $\hat{y}=3.35x-3.25$  ( $\hat{y}$  为 *LTBP2*mRNA 相对表达量,  $x$  为处理时间),  $R^2=0.94, F=143.68, P<0.01$ , 回归方程成立。提示随着染毒时间的增加, *LTBP2* mRNA 表达逐渐升高,变化趋势呈现明显的时间-效应关系。见图 1。



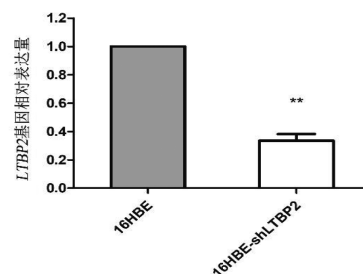
注:A:10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$  氯化镉处理 16HBE 细胞 24 h *LTBP2* mRNA 相对表达水平;B:30  $\mu\text{mol/L}$  氯化镉处理 16HBE 细胞 12、24、48 h *LTBP2* mRNA 相对表达水平;与对照组相比, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ 。

图 1 氯化镉作用 16HBE 细胞 *LTBP2*mRNA 相对表达水平

2.2 构建 *LTBP2* 基因低表达细胞株 为探讨 *LTBP2* 基因在氯化镉致细胞损伤中的机制,构建 *LTBP2* 基因低表达 16HBE 细胞株,采用 qRT-PCR 检测 16HBE、16HBE-sh*LTBP2* 细胞中 *LTBP2* 基因的表达情况。与 16HBE 相比,16HBE-sh*LTBP2* 中 *LTBP2* 基因的表达量为  $(0.33 \pm 0.05)$ ,差异有统计学意义( $t=30.72, P<0.01$ )。 *LTBP2* 基因沉默效率达到 66.59%。见图 2。

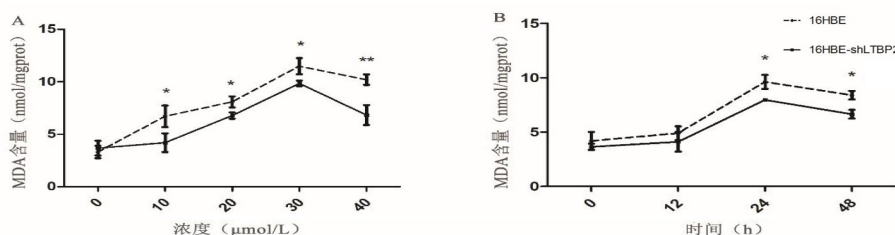
2.3 氯化镉处理细胞中 MDA 含量 用 10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$  氯化镉处理 16HBE 及 16HBE-sh*LTBP2* 细胞 24 h,对相同浓度氯化镉处理的 16HBE 及 16HBE-sh*LTBP2* 细胞进行  $t$  检验,在 10、20、30 和 40  $\mu\text{mol/L}$  剂量,与 16HBE 相比,16HBE-sh*LTBP2* MDA 含量显著降低,且差异有统计学意义( $P<0.05$ )。用 30  $\mu\text{mol/L}$  氯化镉处理 16HBE 及 16HBE-sh*LTBP2* 细胞 12、24、

48 h,对相同时间处理的 16HBE 及 16HBE-sh*LTBP2* 细胞进行  $t$  检验,在 24、48 h,与 16HBE 相比,16HBE-sh*LTBP2* MDA 含量显著降低,且差异有统计学意义( $P<0.05$ )。见图 3。



注:与 16HBE 相比, \*\*  $P<0.01$ 。

图 2 16HBE 和 16HBE-sh*LTBP2* 细胞中 *LTBP2*mRNA 相对表达水平



注:A:10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$  氯化镉处理 16HBE 及 16HBE-sh*LTBP2* 细胞 24 h MDA 含量;B:30  $\mu\text{mol/L}$  氯化镉处理 16HBE 及 16HBE-sh*LTBP2* 细胞 12、24、48 h MDA 含量;与相同处理的 16HBE 细胞相比, \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$ 。

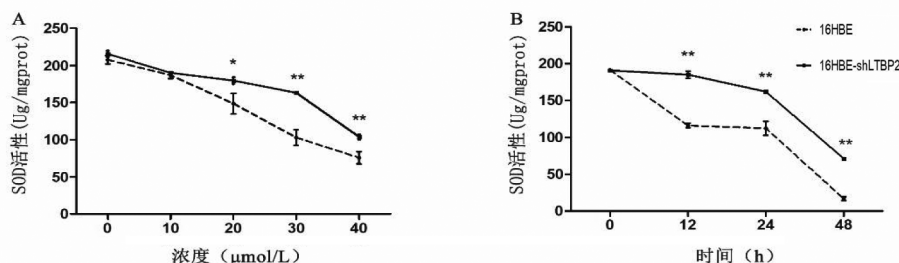
图 3 氯化镉处理细胞中 MDA 含量

2.4 氯化镉处理细胞中 SOD 活力 分别用 10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$  氯化镉处理 16HBE 及 16HBE-sh*LTBP2*



细胞 24 h, 对相同浓度氯化镉处理的 16HBE 及 16HBE-shLTBP2 细胞进行 *t* 检验, 在 20、30 和 40  $\mu\text{mol/L}$  剂量, 与 16HBE 相比, 16HBE-shLTBP2 SOD 活力较高, 且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。对图 4A 的两组数据分别进行一元线性回归分析, 提示随着氯化镉染毒剂量的增加, 16HBE 及 16HBE-shLTBP2 细胞 SOD 活力逐渐降低, 变化趋势呈现明显的剂量-效应关系 ( $P < 0.05$ )。用 30  $\mu\text{mol/L}$  氯化镉处理 16HBE 及 16HBE-

shLTBP2 细胞 12、24、48 h, 对相同时间处理的 16HBE 及 16HBE-shLTBP2 细胞进行 *t* 检验, 与 16HBE 相比, 16HBE-shLTBP2 SOD 活力较高, 且差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。对图 4B 的两组数据分别进行一元线性回归分析, 提示随着作用时间的延长, 16HBE 及 16HBE-shLTBP2 细胞 SOD 活力逐渐降低, 变化趋势呈现明显的时间-效应关系 ( $P < 0.05$ )。



注: A: 10、20、30、40  $\mu\text{mol/L}$  氯化镉处理 16HBE 及 16HBE-shLTBP2 细胞 24 h SOD 活力; B: 30  $\mu\text{mol/L}$  氯化镉处理 16HBE 及 16HBE-shLTBP2 细胞 12、24、48 h SOD 活力; 与相同处理的 16HBE 细胞相比, \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ 。

图 4 氯化镉处理细胞中 SOD 活力

### 3 讨论

工农业生产所造成的镉污染已成为危害生态环境和人畜健康最严重的一种公害<sup>[15]</sup>。各国学者进行的流行病学、动物实验中, 发现镉会提高肺癌<sup>[16]</sup>等肿瘤的患病风险。到目前为止, 镉的致癌分子机制尚不清楚。Mirčić 等<sup>[17]</sup>的研究发现, 镉能诱导细胞氧化损伤, 产生活性氧自由基 (reactive oxygen species, ROS), 认为是镉致癌的重要机制<sup>[18]</sup>。镉通过抑制 SOD、谷胱甘肽还原酶等自由基, 清除酶活性而增强 ROS 对细胞造成损伤。本实验结果表明, 使用氯化镉处理 16HBE 细胞, 当染毒剂量在 20、30 和 40  $\mu\text{mol/L}$  时, SOD 活力随着染毒剂量的增加而逐渐减少, 与 Mirčić 等的研究结果一致。而 MDA 作为一种反映脂质过氧化程度的生物指标, 一般可以通过检测 MDA 含量来反映细胞氧化损伤的程度<sup>[19-20]</sup>。本研究结果发现, 16HBE 细胞的 MDA 含量随着染毒浓度的增加总体呈上升趋势, 提示细胞氧化损伤程度随着染毒剂量增加逐渐加重, 验证了氯化镉通过诱导氧化损伤导致细胞损伤。

LTBP2 基因作为潜在转化生长因子  $\beta$  的一部分, 其功能性影响与特定的细胞类型、组织起源和间质环境等有关。本研究是在氯化镉染毒的 16HBE 细胞中检测 LTBP2 mRNA 的表达。随着氯化镉染毒剂量的上升, LTBP2 mRNA 表达逐渐升高。随着氯化镉染毒时间的延长, LTBP2 mRNA 表达也逐渐升高。提示 LTBP2 基因在细胞急性损伤中可能发挥作用。

Suri 等<sup>[21]</sup>研究发现, LTBP2 基因和氧化应激之间

存在联系, 并会共同作用激活 TGF 和 BMP 信号通路, 影响 ECM 基因表达和细胞凋亡。为了探讨 LTBP2 基因是否通过氧化应激影响镉致细胞损伤, 本课题构建了 LTBP2 基因低表达细胞 16HBE-shLTBP2 细胞。分别用不同浓度氯化镉处理 16HBE 及 16HBE-shLTBP2 细胞不同时间, 发现与 16HBE 相比, 氯化镉处理的 16HBE-shLTBP2 SOD 含量较高, 且差异具有显著性 ( $P < 0.01$ )。而与 16HBE 相比, 氯化镉处理的 16HBE-shLTBP2 MDA 含量降低, 其差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。提示 LTBP2 基因表达水平降低会减弱氯化镉致细胞氧化损伤水平。

综上所述, 镉致细胞急性损伤过程中 LTBP2 基因表达升高, LTBP2 基因低表达后镉致细胞氧化损伤减弱, 提示 LTBP2 基因可能在镉致细胞急性损伤过程中发挥促氧化作用。

### 参考文献

- [1] Rafati MR, Rafati MR, Kazemi S, et al. Cadmium toxicity and treatment: an update[J]. Caspian J Intern Med, 2017, 8(3):135-145.
- [2] Mezynska M, Brzóska MM. Environmental exposure to cadmium—a risk for health of the general population in industrialized countries and preventive strategies[J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2018, 25(4):3211-3232.
- [3] 金媛媛, 周蓉, 匡兴亚. 镉致肾损伤机制的研究进展[J]. 环境与职业医学, 2018, 35(2):180-184.
- [4] 李继猛, 胡文武, 张兵, 等. 某锌粉厂镉作业工人血镉、尿镉、尿  $\beta_2$ -微球蛋白动态观察[J]. 实用预防医学, 2018, 25(12):1438-1440.
- [5] Wu M, Song J, Zhu C, et al. Association between cadmium exposure and diabetes mellitus risk: a prisma-compliant systematic review and meta-analysis[J]. Oncotarget, 2017, 8(68):113129-113141.