

研究论文

亚砷酸钠对辽宁绒山羊皮肤成纤维细胞的毒作用分析

赵凤琴 王祯瑜 张琳琳 孙东禹 王智阅 朴君 朴敬爱 金梅*

(辽宁师范大学生命科学学院/辽宁省生物技术与分子药物研发重点实验室, 大连 116081)

摘要 该研究将辽宁绒山羊作为一种新的砷染毒动物模型来探究亚砷酸钠对其皮肤成纤维细胞的毒性作用, 为砷影响绒山羊皮肤成纤维细胞的毒性效应及毒理作用机制提供理论依据。实验中采用不同浓度(0~120 $\mu\text{mol/L}$)的亚砷酸钠对绒山羊皮肤成纤维细胞分别染毒24、48、72、96 h。通过MTT法检测各实验组亚砷酸钠对细胞增殖与抑制的影响; 用免疫荧光、透射电镜观察细胞骨架、细胞质与细胞器的变化; 用彗星实验检测DNA损伤; 用流式细胞仪检测细胞凋亡及溶酶体和线粒体的变化。研究发现在处理时间为24 h和48 h时, 剂量范围为0~5 $\mu\text{mol/L}$ 的亚砷酸钠能促进绒山羊皮肤成纤维细胞增殖, 5~120 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的亚砷酸钠会引起细胞毒性和基因毒性; 72 h和96 h时各浓度亚砷酸钠始终对细胞生长表现出抑制作用。当处理时间为24 h时, 亚砷酸钠已经对细胞表现出明显的毒物兴奋效应, 因此, 该文选取24 h为亚砷酸钠染毒辽宁绒山羊皮肤成纤维细胞的最佳处理时间。低水平(0~5 $\mu\text{mol/L}$)亚砷酸钠处理细胞时, 此时细胞骨架形态均匀且细胞骨架中微管蛋白聚合, 活细胞数目增多, 细胞器完整, 线粒体膜电位升高, 溶酶体数量增多; 高水平(5~120 $\mu\text{mol/L}$)亚砷酸钠处理细胞时, 细胞骨架形态差异较大, 微管蛋白荧光明显减弱, 细胞器损伤、DNA损伤严重、细胞凋亡数目明显增多, 溶酶体活性和线粒体膜电位($\Delta\Psi\text{m}$)降低, 表明亚砷酸钠诱导的绒山羊皮肤成纤维细胞凋亡机制可能与溶酶体和线粒体途径相关。该研究得出亚砷酸钠对绒山羊皮肤细胞的毒性作用呈“剂量-时间效应”关系, 即作用时间为24 h时, 低浓度的亚砷酸钠会促进细胞增殖, 且对细胞生长起促进作用的最佳浓度为0.5 $\mu\text{mol/L}$, 然而亚砷酸钠(>5 $\mu\text{mol/L}$)会引起绒山羊皮肤成纤维细胞的细胞毒性与基因毒性。

关键词 亚砷酸钠; 辽宁绒山羊; 皮肤成纤维细胞; 细胞毒性; 细胞凋亡; 基因毒性

Toxic Effects of Sodium Arsenite on Liaoning Cashmere Goat Skin Fibroblasts

ZHAO Fengqin, WANG Zhenyu, ZHANG Linlin, SUN Dongyu, WANG Zhiyue,

PIAO Jun, PIAO Jingai, JIN Mei*

(Liaoning Provincial Key Laboratory of Biotechnology and Molecular Drug Discovery, College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116081, China)

Abstract Liaoning cashmere goats were used as a new arsenic-infected animal model to explore the toxic

收稿日期: 2020-12-01 接受日期: 2021-02-02

国家自然科学基金(批准号: 31172188)、辽宁省教育厅科研项目(批准号: L201683652)和大连市科技计划项目(批准号: 2013B12NC090)资助的课题

*通讯作者。Tel: 15841161777, E-mail: jm6688210@163.com

Received: December 1, 2020 Accepted: February 2, 2021

This work was supported by the Fund of National Natural Science Foundation of China (Grant No.31172188), the Scientific Research Project of Liaoning Provincial Education Department (Grant No.L201683652), and the Dalian Science and Technology Project (Grant No.2013B12NC090)

*Corresponding author. Tel:+86-15841161777, E-mail: jm6688210@163.com

URL: <http://www.cjcb.org/arts.asp?id=5500>

effects of sodium arsenite on its skin fibroblasts, providing a theoretical basis for the effects of arsenite on skin fibroblasts of cashmere goats and the mechanism of toxicological action. In the experiment, different concentrations of sodium arsenite (0-120 $\mu\text{mol/L}$) were used to infect skin fibroblasts of cashmere goats for 24, 48, 72, 96 h, respectively. The effects of sodium arsenite on cell proliferation and inhibition were detected by MTT assay. The changes of cytoskeleton, cytoplasm and organelle were observed by immunofluorescence and TEM (transmission electron microscopy). The comet assay was used to detect DNA damage. FCM (Flow cytometry) was used to detect the changes of cell apoptosis, lysosome and mitochondria. Based on all results, at 24 h and 48 h, the lower concentrations of sodium arsenite (0-5 $\mu\text{mol/L}$) were found to induce the proliferation of Liaoning cashmere goat skin fibroblasts, while higher concentrations (5-120 $\mu\text{mol/L}$) inhibited proliferation and could cause cytotoxicity and genotoxicity. Furthermore, at 72 h and 96 h, all concentrations of sodium arsenite always showed inhibitory effects on cell growth. When the treatment time was 24 h, sodium arsenite had shown obvious toxic excitatory effect on cells, so this study chose 24 h as the best treatment time for sodium arsenite to infect cells. When treated with sodium arsenite (0-5 $\mu\text{mol/L}$) for 24 h, the cytoskeleton morphology was uniform and microtubule proteins in the cytoskeleton were polymerized; the organelles were complete; the number of living cells and lysosomes increased; as well as MMP (mitochondrial membrane potential) increased. Nevertheless, when the concentration of sodium arsenite was 5-120 $\mu\text{mol/L}$, there were significant differences in cytoskeleton morphology, and the microtubule protein fluorescence was significantly weakened; the number of organelle damage, DNA damage and apoptosis significantly increased; lysosomal activity and MMP ($\Delta\Psi\text{m}$) were decreased. These results indicate that the mechanism of apoptosis induced by sodium arsenite may be associated with lysosomal and mitochondrial pathways. This study concludes that sodium arsenite on the toxic effects of cashmere goat skin cells show “dose-time-effect” relationship, that is, at 24 h, low concentrations of sodium arsenite can promote cell proliferation, and the optimal concentration for cell growth is 0.5 $\mu\text{mol/L}$. However, sodium arsenite (>5 $\mu\text{mol/L}$) can cause the cytotoxicity and genotoxicity.

Keywords sodium arsenite; Liaoning cashmere goat; skin fibroblast; cytotoxicity; apoptosis; genotoxicity

砷是自然界分布极广的类金属元素,我国是受砷中毒影响较重的国家之一^[1]。自然界中砷多以化合物的形式存在,近年来,一些砷制剂(阿散酸、洛克沙肿等)被用于动物饲料中,以促进动物生长^[2-3];还有一些砷化合物[如三氧化二砷(As_2O_3)、砷酸钠等]用作木材防腐剂、杀虫剂和杀菌剂等^[4]。这些砷制剂的广泛使用导致动物经食物或饮水摄入过多残留的砷从而引发慢性砷中毒。砷化合物分为有机砷(如一甲基砷酸、二甲基砷酸)和无机砷,其中,无机砷多以三价(如三氧化二砷、亚砷酸钠等)和五价(雄黄、雌黄等)状态存在,一般来说,三价砷比五价砷毒性大,约为60倍,且三价砷易与体内巯基(-SH)结合,会在机体的肝、肾、肺等部位蓄积,特别是在角蛋白含量较多的皮肤、毛发和指甲中蓄积。皮肤被认为是亚砷酸盐毒性最敏感的器官之一^[5]。

辽宁绒山羊是我国严禁出境的珍贵品种资源之一,主要分布在中国辽宁省的瓦房店、庄河、辽阳以及盖州等地,所产山羊绒具有产绒量高、绒纤

维长、粗细度适中等优越品质。但在畜牧养殖过程中用于促进动物生长发育的砷制剂饲料以及工农业中砷化合物添加剂的使用,直接或间接导致砷在绒山羊的皮肤和体内蓄积,致使受影响的靶器官之一的羊皮肤正在发生着一系列变化,并最终会影响到羊绒的品质。

当前学术界主要从细胞和分子水平来探究环境污染砷对动物(人、鹿、鼠等)细胞的影响。MUHAMMAD等^[6]在研究砷化物对巴基斯坦泰迪山羊雄鹿的精液质量和生殖激素的毒性作用时发现,当每天喂予雄鹿砒霜(主要成分为 As_2O_3)的处理量为5 mg时,会对雄鹿的生殖产生不良影响,同时还发现了维生素C可以有效改善砷对精液质量和激素的不良影响。LIBIA等^[7]研究亚砷酸钠对人表皮角质细胞的增殖影响发现,亚砷酸钠在0.001到0.010 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时诱导细胞增殖,但在高浓度(>0.5 $\mu\text{mol/L}$)时抑制细胞增殖,产生细胞毒性效应。XIE等^[8]发现,砷在0.5~10.0 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围对人类支气管成纤

维细胞和上皮细胞是有细胞毒性的。研究表明,无机砷化物可诱导DNA损伤,一般认为砷在高剂量下才诱导细胞DNA断裂损伤,从而引起基因毒性^[9]。ZHANG等^[10-11]发现,亚砷酸钠可以诱导人类皮肤细胞DNA单链断裂。有研究者利用彗星实验检测得出亚砷酸钠可引起人肺细胞和淋巴细胞DNA单链断裂,说明亚砷酸钠具有基因毒性作用^[12]。在高浓度时,砷可抑制细胞分化,导致基因组不稳定和细胞凋亡^[13-14]。研究表明,溶酶体和线粒体在细胞凋亡中起着重要的作用,其作用机制是外界条件刺激诱导细胞凋亡的重要途径^[15-16]。也有文献表明外源刺激可以使细胞内容酶体稳定性破坏从而释放相关酶类并作用于线粒体,使线粒体膜的稳定性遭到破坏,导致细胞凋亡^[17]。目前,研究砷染毒机制的实验对象多为人、鹿、小鼠细胞,尤以对肝细胞影响的研究居多,而对于砷影响绒山羊皮肤细胞的相关研究还未展开。因此,本研究以亚砷酸钠为染毒物质,采用MTT、免疫荧光检测、透射电镜分析、彗星实验以及流式细胞术检测亚砷酸钠对绒山羊皮肤成纤维细胞毒性、基因毒性与细胞凋亡的情况,初步探究环境污染物砷对绒山羊皮肤细胞增殖和细胞凋亡的作用,为后续研究砷导致绒山羊皮肤细胞损伤及环境因素对绒山羊皮肤细胞生长的影响提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物采集

实验动物购自中国辽宁省大连市金石滩的绒山羊养殖场。研究涉及的动物实验经由辽宁师范大学动物保障与使用委员会批准。

1.2 绒山羊皮肤成纤维细胞的分离、培养与处理

在绒山羊腹部剪取皮肤,用无菌PBS冲洗,75%酒精浸泡5 min,再用大量无菌PBS冲洗,将组织剪成1 mm×1 mm×1 mm体积的碎块,加入2倍体积混合酶液,37℃消化30~45 min,1 500 r/min离心5 min,弃上清,加无菌PBS清洗并离心2次后,弃上清,往沉淀中加适量完全培养基(Hyclone, 美国),重悬后所有细胞在37℃、5% CO₂条件下培养。

1.3 MTT检测

将辽宁绒山羊皮肤成纤维细胞扩增培养,待细胞生长至对数期时,调整细胞密度为5×10⁴个/mL,分别接种至96孔细胞培养板中培养,每孔100 μL,每

个浓度梯度3个复孔。用不同浓度(0~120 μmol/L)的亚砷酸钠(Sigma, 纯度≥99%)进行给药处理,培养24、48、72、96 h,每孔加入10 μL的MTT(Sigma, 美国),避光条件下培养3~4 h后,吸去培养液,每孔加入150 μL DMSO(Invitrogen, 美国),于摇床上混匀10 min,将酶标仪调至492 nm波长进行检测。结果为3次实验的均值。

1.4 免疫荧光检测

根据MTT实验筛选出24 h的数据更能明显反映出增殖和抑制的趋势,所以后续实验均选用不同浓度的亚砷酸钠处理24 h的细胞。将其完全附着在盖玻片的表面上,PBS漂洗3次,用4%多聚甲醛固定10 min。然后于室温条件封闭在10% FBS中10 min。加入抗微管蛋白一抗(Abcam, 美国),4℃孵育过夜,PBS洗涤。加入FITC标记的鬼笔环肽(Actin-Trakcer Green, C1033),CY3标记二抗(带有红色荧光CY3标记的二抗),37℃孵育30 min。细胞核用蓝色荧光(Hoechst33258, 中国, C1017)染色30 s,PBS漂洗3次后封片,免疫荧光显微镜下拍照。

1.5 透射电镜分析

收集用不同浓度亚砷酸钠处理24 h后的细胞,加2.5%戊二醛进行固定,再用1%锇酸固定,丙酮脱水处理,包埋剂与丙酮3:1处理样品,70℃恒温过夜。超薄切片后加醋酸铀染色液(Spi-Chem, 美国)和柠檬酸铅染液(Spi-Chem)染色,用电镜观察。

1.6 彗星实验

细胞收集后制成单细胞悬液,用PBS冲洗后5 000 r/min离心5 min,离心后将细胞浓度调整为10⁶~10⁷个/mL,取10 μL约含1 000个细胞的细胞悬液和75 μL 0.5%低熔点琼脂糖LMA在37℃条件下混匀,迅速盖上盖玻片。用细胞裂解液裂解1 h,裂解后,置于加电泳缓冲液(0.186 g Na₂EDTA、6 g NaOH、500 mL双蒸水,pH13)的水平凝胶电泳中,DNA解旋20 min,在25 V、300 mA条件下电泳20 min。电泳后置于Tris-HCl(pH7.5)缓冲液中15 min,然后用50 μL 30 μg/mL的溴化乙锭(Sigma)染色20 min。利用荧光显微镜观察和CASP软件分析。

1.7 细胞凋亡检测

将绒山羊皮肤细胞接种至6孔板中,接种密度为10⁵个/孔(细胞达到80%黏连),每孔加入1 mL培养液。细胞经胰酶消化后,收集细胞悬液,用PBS调整细胞浓度,75%冰乙醇固定细胞1~2 h,取200 μL细胞悬液与10 μL PI混匀,室温孵育45 min,冷PBS溶液

洗涤细胞, 流式上机检测, CELL Quest软件分析细胞散点图, 根据各象限细胞数计算凋亡细胞比例。

1.8 溶酶体分析

将细胞铺板于24孔板中, 密度为 5×10^4 个/mL, 给予不同浓度的亚砷酸钠进行处理, 于24 h后去除细胞培养液, 加入至37 °C温育的Lyso-Tracker Red染色液中, 与细胞共孵育30~120 min, 每组随机选择50个细胞测量其荧光强度, 用共聚焦显微镜进行观察分析。

1.9 线粒体膜电位($\Delta\Psi_m$)分析

将细胞铺板于24孔板中, 密度为 5×10^4 个/mL, 给予不同浓度的亚砷酸钠进行处理, 于24 h后取出细胞培养液, 加入至37 °C预温育的Mito-Tracker Green染色液中, 与细胞共孵育30 min, 用荧光显微镜观察进行拍照, 图像软件分析。

1.10 统计学分析

采用SPSS 19.0软件进行统计学分析。数据以均值±标准偏差表示, 采用单因素方差分析, 差异显著表示为 $P < 0.05$, 差异极显著表示为 $P < 0.01$ 。

2 结果

2.1 亚砷酸钠对绒山羊皮肤成纤维细胞的细胞毒性

2.1.1 亚砷酸钠对绒山羊皮肤成纤维细胞增殖与抑制的影响 按照0、2、5、10、15、30、60、120、240、480 $\mu\text{mol/L}$ 亚砷酸钠给药处理后进行MTT检测, 没有找到对细胞生长起促进作用的最佳浓度以及产生毒性作用的临界浓度。因此, 后期对浓度作

了相应的调整, 从5 $\mu\text{mol/L}$ 继续往下稀释到2.5、1、0.5、0.1 $\mu\text{mol/L}$, 同时将最高浓度设定在120 $\mu\text{mol/L}$, 继续MTT检测实验。检测后的数据显示, 24 h和48 h均出现明显的先增殖后抑制的趋势, 存在一定的剂量效应关系。但48 h细胞的增殖效果要弱于24 h, 细胞的抑制效果较24 h稍明显; 而72 h和96 h时只出现抑制作用, 由于亚砷酸钠在24 h时, 已经对细胞产生了明显的毒性效应, 因此选取24 h进行后续实验。24 h时, 亚砷酸钠浓度为0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时对绒山羊皮肤细胞有明显的促进增殖作用; 浓度在1~2.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 增殖效果减弱; 而浓度范围为5~120 $\mu\text{mol/L}$ 时对绒山羊皮肤成纤维细胞产生显著的毒性作用($P < 0.05$)。见表1和表2。根据MTT实验的结果, 选择24 h条件下的四个浓度组进行下面的实验, 分别为对照组(0 $\mu\text{mol/L}$)、增殖组(增殖, 0.5 $\mu\text{mol/L}$)、临界组(临界, 5 $\mu\text{mol/L}$)和半致死浓度组(IC_{50} , 45.66 $\mu\text{mol/L}$)。亚砷酸钠对绒山羊皮肤细胞的 IC_{50} 浓度值利用Curve 1.4软件估算。

2.1.2 亚砷酸钠对绒山羊皮肤成纤维细胞骨架的影响 荧光显微镜观察, 结果表明, 与对照组相比, 增殖组细胞骨架伸展, 细胞形态均匀, 轮廓较清晰, 核周红色荧光较密集排列, 促进微管蛋白聚合; 临界组的细胞形态有所改变, 细胞间隙变大, 细胞微丝收缩明显, 细胞骨架形态差异较大, 核周红色荧光较分散排列; IC_{50} 组的细胞皱缩, 形态不均匀, 细胞间隙更大, 细胞微丝收缩更明显, 细胞骨架形态差异更大, 核周红色荧光较弱, 抑制微管蛋白聚合(图1)。

2.1.3 亚砷酸钠对绒山羊皮肤成纤维细胞质和细胞

表1 亚砷酸钠对绒山羊皮肤成纤维细胞增殖的影响

Table 1 Effects of sodium arsenite on skin fibroblast proliferation

浓度/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Concentration / $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	D_{492}			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0	0.785±0.003	0.896±0.010	1.096±0.008	1.176±0.050
0.1	0.789±0.005	0.907±0.005	1.079±0.004*	1.105±0.003
0.5	0.865±0.002**	0.927±0.005**	1.048±0.004**	1.049±0.006*
1.0	0.846±0.009**	0.918±0.005*	1.006±0.003**	0.991±0.005**
2.5	0.814±0.014*	0.914±0.008	0.963±0.003**	0.939±0.005**
5.0	0.769±0.006*	0.859±0.006**	0.918±0.005**	0.880±0.006**
10.0	0.744±0.009**	0.824±0.007**	0.874±0.003**	0.828±0.006**
15.0	0.666±0.007**	0.733±0.004**	0.754±0.006**	0.690±0.008**
30.0	0.559±0.008**	0.582±0.008**	0.517±0.006**	0.439±0.005**
60.0	0.287±0.003**	0.226±0.004**	0.199±0.004**	0.191±0.003**
120.0	0.236±0.002**	0.200±0.008**	0.174±0.002**	0.153±0.003**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与对照组比较。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs CK group.

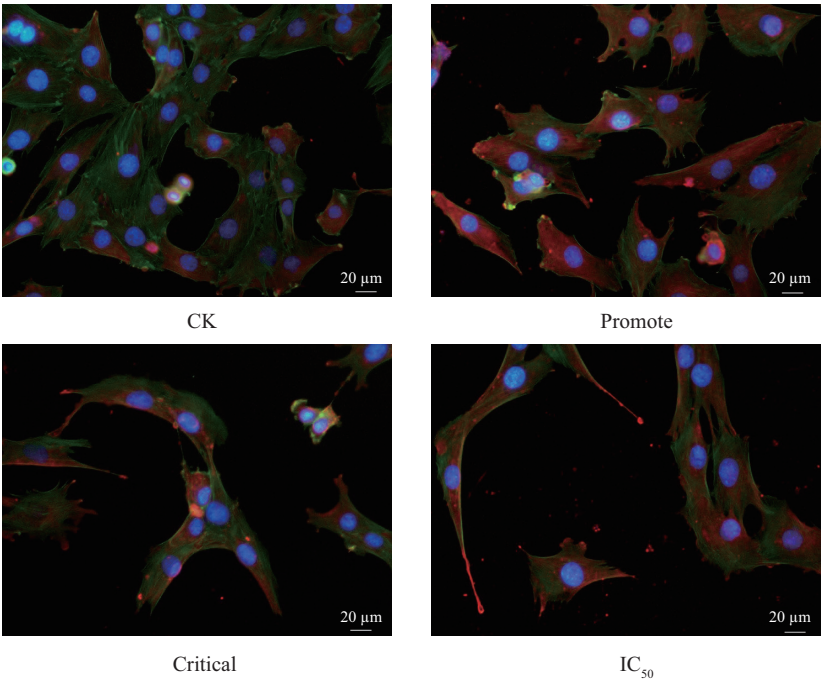
器的影响 透射电镜超微结构分析发现, 对照组和增殖组细胞质分布均匀, 细胞器清晰可见, 有丰富的内质网和线粒体, 内质网边界明显, 同时线粒体膜完整, 嵴清晰; 临界组细胞质稍有弥散, 细胞器仍可见, 但视野下的内质网数量减少且内质网呈扩张状态且已不清晰, 同时线粒体肿胀疏松, 嵴模糊; IC₅₀组细胞质分布弥散, 不均匀, 细胞器已呈不清晰或无的状态, 其中线粒体膜不完整, 嵴断裂, 内质网等已呈现不清晰的状态(图2)。

2.2 亚砷酸钠对绒山羊皮肤成纤维细胞的基因毒性

本研究利用彗星实验进一步探究亚砷酸钠对绒山羊皮肤成纤维细胞的基因毒性。结果显示, 空白对照组细胞DNA部分保持球形(有头无尾), 增殖组DNA仍呈球形未有拖尾现象, 然而临界组开始出现拖尾现象, IC₅₀组细胞DNA则产生较明显的彗星样拖尾(图3)。增殖组和临界组以I级DNA链断裂为主, 而IC₅₀组出现I、II、III级DNA链断裂, 随着浓度

表2 亚砷酸钠对绒山羊皮肤成纤维细胞的抑制率/%
Table 2 Inhibition rates of sodium arsenite on skin fibroblasts of cashmere goats /%

浓度/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Concentration / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	抑制率 Inhibition rates			
	24 h	48 h	72 h	96 h
0.1	-0.552 016 985	-1.227 678 571	1.909 090 909	6.065 759 637
0.5	-10.191 082 800	-3.497 023 810	4.757 575 758	10.827 664 400
1.0	-7.770 700 637	-2.418 154 762	8.545 454 545	15.702 947 850
2.5	-3.694 267 516	-2.046 130 952	12.454 545 450	20.153 061 220
5.0	2.080 679 406	4.166 666 667	16.545 454 550	25.170 068 030
10.0	5.180 467 091	8.072 916 667	20.515 151 520	29.591 836 730
15.0	15.159 235 670	18.229 166 670	31.454 545 450	41.354 875 280
30.0	28.832 271 760	35.081 845 240	52.969 696 970	62.698 412 700
60.0	63.481 953 290	74.813 988 100	81.939 393 940	83.758 503 400
120.0	69.893 842 890	77.715 773 810	84.212 121 210	86.961 451 250



蓝色荧光为染核, 绿色荧光为微丝, 红色荧光为微管。
The blue fluorescence is stained nucleus, green fluorescence is microfilament, and red fluorescence is microtubule.

图1 亚砷酸钠处理24 h细胞骨架荧光标记合并图

Fig.1 Cytoskeleton fluorescent labeling merge graph after 24 h sodium arsenite treatment

的增加, DNA链断裂程度加强, 亚砷酸钠引起细胞DNA尾的百分比(DNA彗星尾巴占总DNA的百分数)明显升高, DNA损伤越来越严重, 其差异具有统计学意义($P<0.01$)(表3)。说明了高浓度亚砷酸钠可以引起绒山羊皮肤成纤维细胞DNA链断裂, 从而引起

DNA损伤。

2.3 亚砷酸钠对绒山羊皮肤成纤维细胞凋亡的检测

将绒山羊皮肤成纤维细胞用亚砷酸钠处理24 h, 并用Annexin V-FITC和PI染色。流式细胞仪定量检测

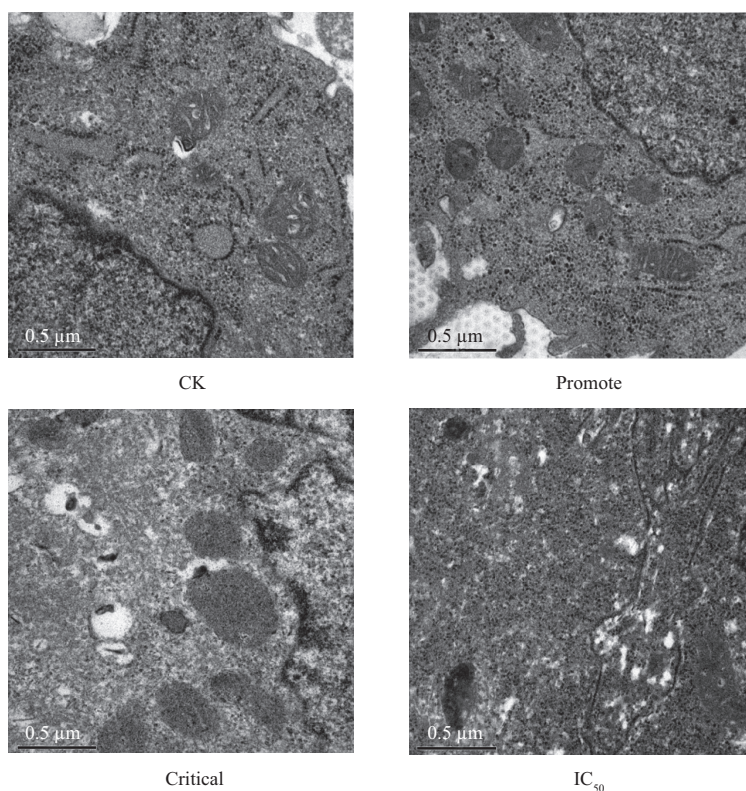


图2 亚砷酸钠处理24 h细胞质与细胞器形态变化图

Fig.2 Cytoplasm and Organelle change after 24 h sodium arsenite treatment

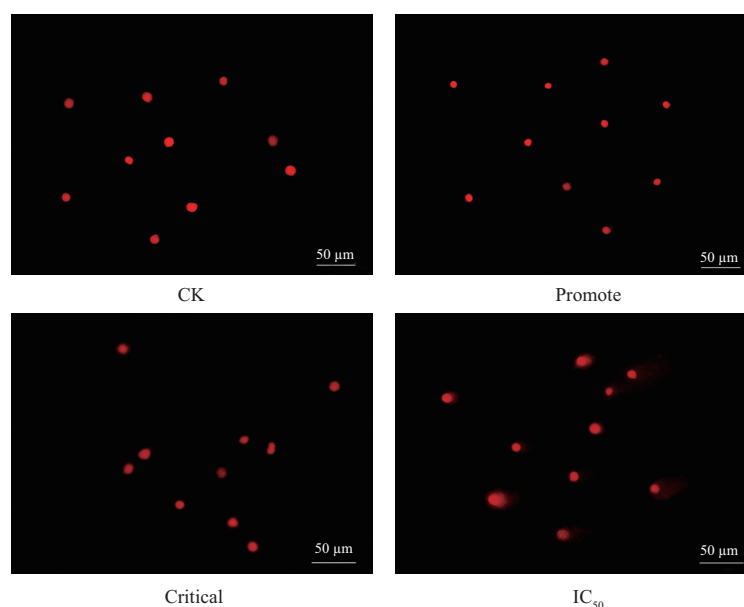


图3 亚砷酸钠处理24 h细胞DNA荧光标记合并图

Fig.3 Cellular DNA fluorescent labeling merge graph after 24 h sodium arsenite treatment

各组细胞凋亡数量,经统计学分析,与对照组相比,临界组和IC₅₀组的亚砷酸钠使凋亡细胞数增加($P<0.01$),增殖组凋亡细胞数目减少($P<0.05$)(图4和图5)。表明低浓度的亚砷酸钠对细胞有增殖的作用,而超过临界浓度的亚砷酸钠使细胞凋亡,且凋亡率随着亚砷酸钠

浓度的升高而显著上升,在IC₅₀组时细胞凋亡率显著增加。

2.4 亚砷酸钠对绒山羊皮肤成纤维细胞溶酶体的影响

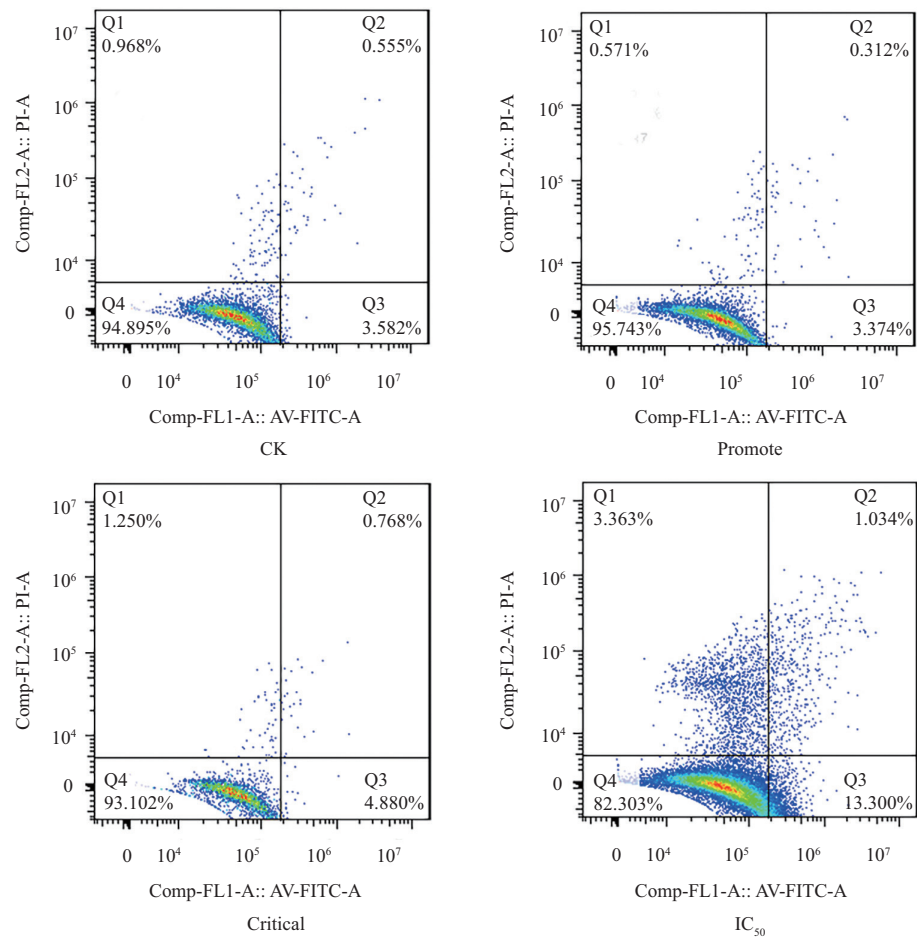
细胞凋亡是细胞自主性死亡的过程,溶酶体和

表3 亚砷酸钠处理24 h DNA链断裂分类结果

Table 3 The results of DNA chain fracture classification after 24 h sodium arsenite treatment

组别 Groups	时间 Time	尾部DNA/% Tail DNA /%	DNA链断裂分级 Degree of DNA strand breaks		
			Degree I	Degree II	Degree III
CK	24 h	0.71±1.21	100%	0	0
Promote	24 h	0.49±0.58	100%	0	0
Critical	24 h	1.06±1.07	100%	0	0
IC ₅₀	24 h	20.45±12.57**	50%	40%	10%

I级:彗星尾长/彗星头长>0,且≤1;II级:彗星尾长/彗星头长>1,且<2;III级:彗星尾长/彗星头长≥2; ** $P<0.01$,与对照组比较。
Degree I: comet tail length/comet head length >0 and ≤1; degree II: comet tail length/comet head length >1 and <2; degree III: comet tail length/comet head length ≥2; ** $P<0.01$ vs CK group.



Q1: 坏死细胞; Q2: 晚期凋亡细胞; Q3: 早期凋亡细胞; Q4: 完整细胞。
Q1: necrotic cells; Q2: late apoptotic cells; Q3: early apoptotic cells; Q4: intact cells.

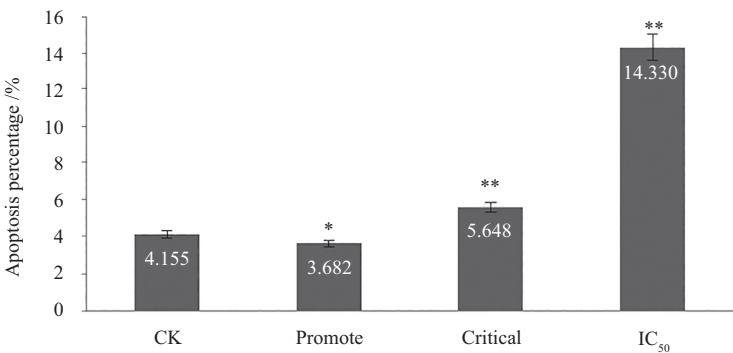
图4 亚砷酸钠处理24 h绒山羊皮肤成纤维细胞凋亡

Fig.4 Apoptosis in skin fibroblasts after 24 h sodium arsenite treatment

线粒体的变化在此过程中起着重要的作用。激光共聚焦显微镜检测分析绒山羊皮肤成纤维细胞溶酶体的变化, 如图6和表4所示, 与对照组相比, 增殖组的细胞溶酶体数量较多, 活性升高, 变化较明显, 以圆形或椭圆形为主($P<0.01$); 临界组溶酶体数量稍增多, 无明显差异; IC_{50} 组的溶酶体大量外泄, 细胞核皱缩, 活性明显降低($P<0.01$)。

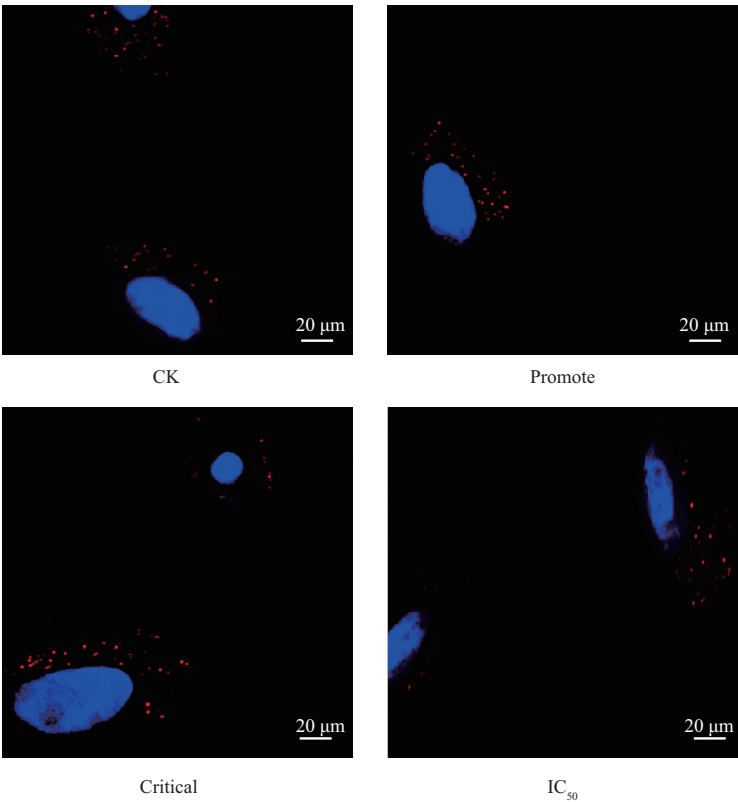
2.5 亚砷酸钠对绒山羊皮肤成纤维细胞线粒体及线粒体膜电位的影响

荧光显微镜观察结果显示, 对照组中的线粒体数目多, 线粒体形态完整, 内部的嵴丰富清晰, 多为囊状和管状; 增殖组的线粒体则明显增多, 结构更加清晰; 临界组和 IC_{50} 组的线粒体都明显减少, 形态不完整, 细胞线粒体内部嵴明显变得模糊(图7)。



* $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与对照组比较。
* $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs CK group.

图5 亚砷酸钠处理24 h细胞凋亡率柱形图
Fig.5 Column of apoptosis rate after 24 h sodium arsenite treatment



蓝色荧光是细胞核, 红色荧光是溶酶体。
The blue fluorescence is the nucleus and the red fluorescence is the lysosome.

图6 亚砷酸钠处理24 h溶酶体荧光标记合并图
Fig.6 Lysosome fluorescent labeling merge graph after 24 h sodium arsenite treatment

表4 亚砷酸钠处理24 h溶酶体数变化结果

Table 4 The results of changes in lysosome number after 24 h sodium arsenite treatment

时间 Time	对照 CK	增殖 Promote	临界 Critical	半致死浓度 IC ₅₀
24 h	18.16±0.25	37.21±1.62 ^{**}	18.23±0.16	16.29±0.58 ^{**}

^{**}*P*<0.01, 与对照组比较。

^{**}*P*<0.01 vs CK group.

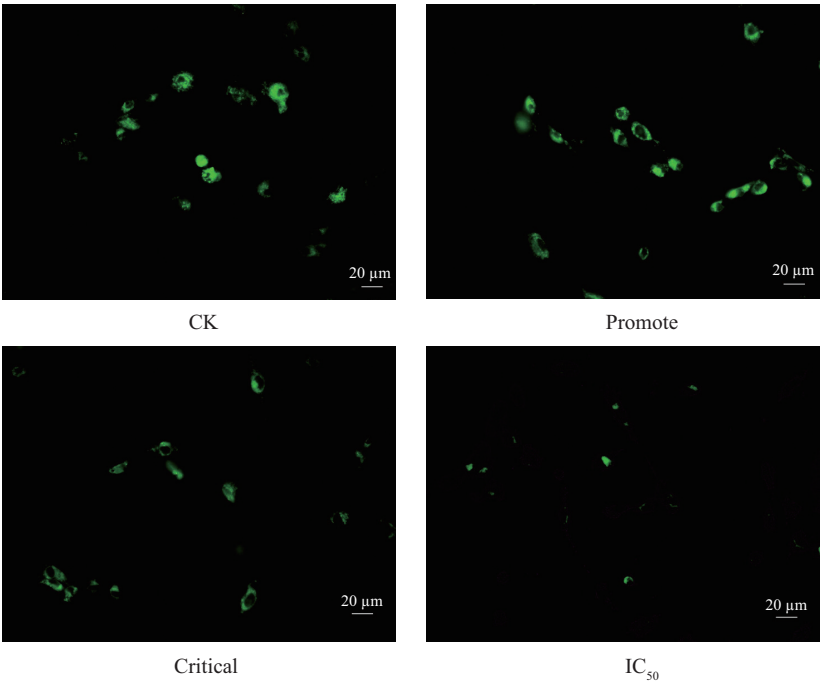
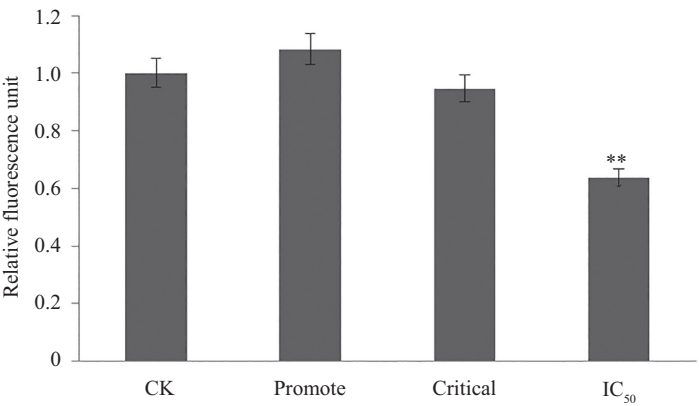


图7 亚砷酸钠处理24 h线粒体荧光染色图

Fig.7 Mitochondria fluorescence staining graph after 24 h sodium arsenite treatment



^{**}*P*<0.01, 与对照组比较。

^{**}*P*<0.01 vs CK group.

图8 亚砷酸钠处理24 h MMP值变化柱形图

Fig.8 MMP values after 24 h sodium arsenite treatment

明亚砷酸钠的作用剂量越大, 相应的作用效果也越明显。

亚砷酸钠对绒山羊皮肤成纤维细胞 $\Delta\Psi_m$ 的

影响如图8所示。与对照组相比, 24 h的IC₅₀组平均荧光强度下降, 膜电位明显降低, 具有显著差异 (*P*<0.01); 24 h的增殖组和临界组平均荧光强度虽然

有所上升和下降, 但与对照组相比无显著差异。结果表明, 亚砷酸钠可以使 $\Delta\Psi_m$ 下降, 损伤线粒体。

3 讨论

砷化合物是自然界中一种常见的环境毒物, 且亚砷酸钠是砷元素在环境中的主要存在形式。毒物兴奋效应是毒理学用来描述毒性因子(刺激)的双相剂量效应的一个术语, 即高剂量致毒因素(包括毒物、辐射、热、机械刺激等)对生物体有害, 而低剂量致毒因素对生物体有益。这种双相剂量效应在上世纪40年代被定义为毒物兴奋效应。在体外和体内实验中, 低浓度的砷可促进细胞生长和增殖^[18-20], 这其实就是著名的“hormesis”效应。本实验结果显示, 亚砷酸钠染毒24 h后剂量范围为0~5 $\mu\text{mol/L}$ 的亚砷酸钠可以刺激细胞生长, 促进羊皮肤细胞增殖, 且当亚砷酸钠浓度为0.5 $\mu\text{mol/L}$ 时, 对细胞的增殖促进效果最好; 5~120 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的亚砷酸钠会抑制细胞增长且引起较强的细胞毒性($P<0.05$)(表1和表2)。说明无机三价砷对绒山羊皮肤成纤维细胞增殖有双向调节作用, 通过与人表皮角质细胞和肺细胞的比较, 发现亚砷酸钠对这些细胞的细胞毒性是相似的, 都呈现细胞毒物兴奋效应^[21-23]。然而, 砷对不同类型细胞产生毒性的浓度有所不同, 例如, ORTEGA-MORALES等^[24]发现当山羊接触0.15~5.45 $\mu\text{mol/L}$ 砷饮用水, 会出现体重减轻、心脏和呼吸频率的改变、行为变化、侧翼脱发和鼻子和嘴角化症等生理现象; XIE等^[8]得出砷在0.5~10 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度范围对人肺细胞是有细胞毒性的; WANG等^[25]发现0.125~10 $\mu\text{mol/L}$ 的亚砷酸钠在处理鱼的鳍细胞和卵巢细胞时会对细胞产生毒性作用; 本研究则发现5~120 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的亚砷酸钠处理绒山羊皮肤成纤维细胞对细胞产生明显毒性作用, 这与其他学者的研究报道相比, 对细胞产生毒性的亚砷酸钠浓度较高。究其原因, 一方面是不同的类型细胞对砷的吸收程度不同, 导致细胞中砷的积累含量不同, 且不同受试动物种属对砷的敏感度不同, 同时不同类型的动物细胞的中毒表现, 毒性指标不同; 另一方面是砷对不同类型细胞甲基化代谢活动不同或DNA甲基化和细胞周期蛋白磷酸化的改变导致的毒性作用不同^[26-27]。除了亚砷酸钠对细胞的毒性作用与剂量相关外, 同时本实验发现随着染毒作用时间的延长, 48 h的毒物兴奋效应减弱, 72 h和96 h的毒物兴奋效应会逐渐消失, 仅对

细胞生长产生抑制作用, 表明亚砷酸钠对辽宁绒山羊皮肤成纤维细胞的作用体现为“剂量-时间效应”关系。

细胞骨架由微丝、微管及中间丝三部分构成, 细胞骨架与细胞形态密切相关, 并参与细胞多种功能, 如细胞分裂、分化、基因表达等。其中, 微管是细胞骨架的主要成分, 在有丝分裂中起着重要作用, 是许多药物和毒物的作用靶点, 有毒物质与微管蛋白的亲合作用会导致细胞骨架形态的改变甚至细胞骨架的溶解, 影响细胞形态、分裂、代谢及运动, 进而诱发细胞毒性^[28]。三价砷与富含巯基的组织蛋白(微管蛋白、角蛋白、酶等)具有高度的亲和力^[29-30], 这种亲和力通过影响微管动力学来影响纺锤体的形成, 扰乱纺锤体的结构, 进而影响细胞分裂, 导致细胞异常增殖; 同时目前研究表明, 砷会抑制多种酶的酶活性, 干扰酶的功能及转录调控, 对生物体多种功能产生影响, 这些都可能是三价砷染毒细胞的毒性机制。在本研究中, 不同浓度亚砷酸钠干扰绒山羊皮肤成纤维细胞后, 细胞骨架发生明显改变。当为增殖浓度(0~5 $\mu\text{mol/L}$)时, 细胞骨架伸展, 微管蛋白增加; 随着浓度(5~120 $\mu\text{mol/L}$)的增加细胞形态有所改变, 细胞微丝收缩明显, 细胞骨架形态差异较大, 微管蛋白严重缺失。因此可以说明, 亚砷酸钠可以诱导绒山羊皮肤成纤维细胞骨架发生改变, 低浓度时微管蛋白增加并促进细胞分裂, 从而使细胞增殖; 随着亚砷酸钠浓度的增加, 毒性作用明显, 细胞骨架形态改变, 高浓度三价砷抑制了微管蛋白的合成, 使微管结构紊乱, 从而干扰纺锤体的形成及结构, 并且将影响细胞分裂、分化等多种功能。通过对比三价砷染毒肺细胞、鱼的鳍细胞和卵巢细胞、人成纤维细胞、辽宁绒山羊的皮肤成纤维细胞, 研究者发现这些细胞中微管缺失, 细胞骨架产生缺陷^[31-32]。至于三价砷诱发的毒性作用是由于细胞骨架微管蛋白的缺失导致染色体断裂, 还是因为细胞周期被干扰引起细胞功能的改变, 还需从分子水平上进一步探究。另外, 本研究还通过透射电镜分析发现, 较高浓度的亚砷酸钠使细胞质与细胞器形态发生改变, 细胞器破裂, 细胞质分布不均匀, 表明亚砷酸钠破坏了绒山羊皮肤成纤维细胞的内部结构, 产生明显的细胞毒性。

高水平的砷化物可通过产生大量活性氧(reactive oxygen species, ROS)引起DNA损伤, 同时砷又可

抑制DNA的修复,促进其他致突变剂的作用,诱发细胞突变以及增加基因组的不稳定性,从而对细胞产生基因毒性,但其诱导基因毒性的分子机制有待进一步研究。本研究结果表明,随着亚砷酸钠浓度的增加,细胞DNA均出现彗星样拖尾现象,且DNA链出现不同程度的断裂,导致DNA损伤,对绒山羊皮肤成纤维细胞产生基因毒性,且DNA损伤程度与亚砷酸钠的剂量有关。DEEPSHIKHA等^[33]的研究表明,慢性砷暴露于淋巴细胞可引起DNA单链的断裂,细胞呈现彗星样拖尾现象,引起DNA损伤。ZERTASHIA等^[34]报道,随着亚砷酸钠浓度的增加,大鼠卵巢细胞的DNA彗星拖尾现象越明显,DNA损伤越严重。当损伤的DNA不能及时修复时,即可激活DNA依赖性的蛋白激酶,从而促进凋亡相关蛋白的表达,进而引起细胞凋亡^[35]。YIH等^[36]研究发现,亚砷酸钠能使DNA损伤,通过抑制G₂周期检测点的活性导致CGL-2细胞凋亡。另外,高浓度砷化物可诱导基因的缺失突变、染色体损伤等。WANG等^[37]发现高浓度亚砷酸盐会造成斑马鱼的GH/IGF轴相关基因和神经相关基因显著减少,从而对斑马鱼的内分泌系统产生破坏作用,导致斑马鱼胚胎发育毒性。

砷可通过细胞增殖与凋亡参与各种生物的整体生命过程,高浓度砷会抑制NF- κ B活性以及细胞分化,导致细胞凋亡失控而引发各种症状。在细胞凋亡的过程中,溶酶体(lysosome)的数量及形态变化起着重要作用,目前研究普遍认为,溶酶体通透性增加存在于早期的凋亡级联反应,促进其他凋亡反应^[38]。在鱼类中,高浓度砷会导致鱼肝细胞的溶酶体异常以及凋亡小体和自体吞噬泡的数量增加。本研究结果表明,高浓度的亚砷酸钠使绒山羊皮肤成纤维细胞溶酶体膜稳定性发生改变,溶酶体外泄,活性降低。当细胞内溶酶体膜稳定性明显下降后,溶酶体内的酸性水解酶(如酸性神经鞘磷脂酶和组织蛋白酶D)释放进入至细胞质,诱发了DNA损伤,而且在高浓度的刺激作用下,细胞内溶酶体膜的损伤呈剂量依赖关系,高浓度的亚砷酸钠对溶酶体膜损伤严重,导致溶酶体内容物的大量释放,引发了细胞的快速凋亡,这一结果说明了亚砷酸钠诱导的细胞凋亡机制与溶酶体损伤有关。线粒体作为多种促细胞凋亡信号转导分子的靶点,在细胞凋亡中起着决定性作用。当细胞受到外界诱导物

刺激时,细胞的线粒体上通透性转换孔开放,进而影响线粒体的功能,导致线粒体膜电位发生改变以及细胞色素C及其他促凋亡因子的释放和激活,最终导致细胞发生凋亡^[39]。本研究结果发现,高浓度亚砷酸钠干扰的绒山羊皮肤成纤维细胞线粒体内部结构变模糊,嵴已经无法辨认,同时 $\Delta\Psi_m$ 显著下降。表明高浓度亚砷酸钠干扰后线粒体膜已经受到破坏,膜电位发生改变,线粒体损伤,这将影响一些促凋亡因子的释放或氧化应激,从而导致细胞凋亡,也说明了线粒体损伤机制是亚砷酸钠诱导绒山羊皮肤细胞凋亡的一个重要途径。另外,本次实验也证明了亚砷酸钠导致的绒山羊皮肤成纤维细胞DNA损伤与细胞内容酶体和线粒体遭到破坏有关,即在亚砷酸钠浓度较高时,溶酶体和线粒体膜稳定性被破坏,线粒体膜电位改变,DNA损伤严重,进而细胞凋亡数目增多,其相互作用之间的联系有待于进一步研究。

4 结论

本研究探究了亚砷酸钠对辽宁绒山羊皮肤成纤维细胞的毒性作用,发现亚砷酸钠对辽宁绒山羊皮肤成纤维细胞的毒作用体现为“剂量-时间效应”关系,即当作用时间为24 h且亚砷酸钠浓度为0~5 $\mu\text{mol/L}$ 时,会促进辽宁绒山羊成纤维细胞增殖,且其最佳促进浓度为0.5 $\mu\text{mol/L}$;但当其超过5 $\mu\text{mol/L}$ 时,细胞骨架形态改变,溶酶体和线粒体遭到破坏,DNA严重受损,细胞凋亡率显著增加,表现为明显的细胞毒性和基因毒性作用。至于三价砷对绒山羊皮肤成纤维细胞的毒性分子生物学机制以及三价砷诱发凋亡的溶酶体和线粒体途径则正在进一步研究中。

参考文献 (References)

- [1] SUN G, XU Y, ZHENG Q, et al. Arsenicosis history and research progress in Mainland China [J]. Kaohsiung J Med Sci, 2011, 27(9): 377-81.
- [2] AZEVEDO L S, PESTANA I A, MENEGUELLI-SOUZA A C, et al. Risk of exposure to total and inorganic arsenic by meat intake among different age groups from Brazil: a probabilistic assessment [J]. Environ Sci Pollut R, 2018, 25(35): 35471-8.
- [3] 黄连喜, 姚丽贤, 何兆桓, 等. 施用含洛克沙肿鸡粪对蔬菜生长及砷累积的影响[J]. 中国生态农业学报(HUANG L X, YAO L X, HE Z H, et al. Effect of chicken manure with roxarsone on growth and arsenic accumulation in vegetables [J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture), 2012, 20(11): 1437-42.

- [4] LIU Y, HOCK J M, SULLOVAN C, et al. Activation of the p38 MAPK/Akt/ERK1/2 signal pathways is required for the protein stabilization of CDC6 and cyclin D1 in low-dose arsenite-induced cell proliferation [J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(6): 1546-55.
- [5] ALI W, HUA Z, JUNAI M, et al. Insights into the mechanisms of arsenic-selenium interactions and the associated toxicity in plants, animals, and humans: a critical review [J]. *Crit Rev Env Sci Tec*, 2020, 3(18): 1-47.
- [6] MUHAMMAD Z, MAQBOOL A, MUHAMMAD-KASHIF S, et al. Sodium arsenite toxicity on hematology indices and reproductive parameters in Teddy goat bucks and their amelioration with vitamin C [J]. *Environ Sci Pollut R*, 2020, 27(13): 15223-32.
- [7] LIBIA V, MIROSLAV S, PATTERSON R, et al. Differential effects of trivalent and pentavalent arsenicals on cell proliferation and cytokine secretion in normal human epidermal keratinocytes [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2001, 172(3): 225-32.
- [8] XIE H, HUANG S P, SARAH M, et al. Arsenic is cytotoxic and genotoxic to primary human lung cells [J]. *Mutat Res Gen Tox En*, 2014, 11(760): 33-41.
- [9] RAVAL J K, JAISWAL V, PATEL J M, et al. Genotoxicity studies of arsenic, lead and their interaction in wistar rats [J]. *IJCMAS*, 2018, 7(11): 3536-9.
- [10] ZHANG A, FENG H, YANG G, et al. Unventilated indoor coal-fired stoves in Guizhou province, China: cellular and genetic damage in villagers exposed to arsenic in food and air [J]. *Environ Health Persp*, 2007, 115(4): 653-8.
- [11] DENG F, JIN Y, WANG H, et al. Study of the inhibitory effect of PhAsO on gap junctional communication and its damages to cellular DNA of human skin fibroblast cells [J]. *JCR*, 2002, 31(3): 151-3.
- [12] HAO J, SONG J Q, SUN X, et al. Sodium arsenite inhibits lung fibroblast differentiation and pulmonary fibrosis [J]. *Pharmacology*, 2019, 104(5/6): 368-76.
- [13] SHEN S, LEE J, WEINFELD M, et al. Attenuation of DNA damage-induced p53 expression by arsenic: a possible mechanism for arsenic co-carcinogenesis [J]. *Mol Carcinogen*, 2010, 47(7): 508-18.
- [14] WEI L H, LAI K P, CHEN C A, et al. Arsenic trioxide prevents radiation enhanced tumor invasiveness and inhibits matrix metalloproteinase-9 through down regulation of nuclear factor kappaB [J]. *Oncogene*, 2005, 24(3): 390-8.
- [15] LIU L, ZHANG N, DOU Y Y, et al. Lysosomal dysfunction and autophagy blockade contribute to IMB-6G-induced apoptosis in pancreatic cancer cells [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 41862.
- [16] WU J, NI Y, WANG X, et al. Role of mitochondrial DNA in oxidative damage induced by sodium arsenite in human bronchial epithelial cells [J]. *J Toxicol Env Heal A*, 2019, 82(18): 990-6.
- [17] ZHAO M, ANTUNES F, EATON J W, et al. Lysosomal enzymes promote mitochondrial oxidant production, cytochrome C release and apoptosis [J]. *FEBS J*, 2010, 270(18): 3778-86.
- [18] CLEWELL H J, THOMAS R S, KENYON E M, et al. Concentration- and time-dependent genomic changes in the mouse urinary bladder following exposure to arsenate in drinking water for up to 12 weeks [J]. *Toxicol Sci*, 2011, 123(2): 421-32.
- [19] GENTRY P R, MCDONALD T B, SULLIVAN D E, et al. Analysis of genomic dose-response information on arsenic to inform key events in a mode of action for carcinogenicity [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2009, 51(1): 1-14.
- [20] AN Y, LIU T T, LIU X, et al. Rac1 and Cdc42 play important roles in arsenic neurotoxicity in primary cultured rat cerebellar astrocytes [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2016, 170(1): 173-82.
- [21] STYBLO M, DEL RAZO L M, VEGA L, et al. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells [J]. *Arch Toxicol*, 2000, 74(6): 289-99.
- [22] ZHAO R, HOU Y, ZHANG Q, et al. Cross-regulations among NRFs and KEAP1 and effects of their silencing on arsenic-induced antioxidant response and cytotoxicity in human keratinocytes [J]. *Environ Health Persp*, 2012, 120(4): 583-9.
- [23] YANG P, HE X Q, PENG L, et al. The role of oxidative stress in hormesis induced by sodium arsenite in human embryo lung fibroblast (HEL F) cellular proliferation model [J]. *J Toxicol Env Heal A*, 2007, 70(11): 976-83.
- [24] ORTEGA-MORALES N B, CUETO-WONG J A, BARRIENTOS-JUAREZ E, et al. Toxicity in goats exposed to arsenic in the Region Lagunera, Northern Mexico [J]. *Pol J Vet Sci*, 2020, 7(2): 59.
- [25] WANG Y C, CHUANG R H, TUNG L C. Comparison of the cytotoxicity induced by different exposure to sodium arsenite in two fish cell lines [J]. *Aquat Toxicol*, 2004, 69(1): 67-79.
- [26] DOPP E, RECKLINGHAUSEN U V, DIAZ-BONE R A, et al. Cellular uptake, subcellular distribution and toxicity of arsenic compounds in methylating and non-methylating cells [J]. *Environ Res*, 2010, 110(5): 435-42.
- [27] CHANG Y W, SINGH K P. Arsenic induces fibrogenic changes in human kidney epithelial cells potentially through epigenetic alterations in DNA methylation [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 4713-25.
- [28] STANTON R A, GERNERT K M, NETTLES J H, et al. Drugs that target dynamic microtubules: a new molecular perspective [J]. *Med Res Rev*, 2011, 31(3): 443-81.
- [29] VALKO M, MORRIS H, CRONIN M T. Metals, toxicity and oxidative stress [J]. *Curr Med Chem*, 2005, 12: 1161-208.
- [30] HUGHES M F. Arsenic toxicity and potential mechanisms of action [J]. *Toxicol Lett*, 2002, 133(1): 1-16.
- [31] ZHAO Y Z, TOSELLI P, LI W. Microtubules as a critical target for arsenic toxicity in lung cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Int J Env Res Pub He*, 2012, 9(2): 474-95.
- [32] HELGA S, ROBERT H, TZUTZUY R, et al. Prevention of aneuploidy by S-adenosyl-methionine in human cells treated with sodium arsenite [J]. *Mutat Res*, 2007, 617(1/2): 16-22.
- [33] DEEPSHIKHA M, SWARAN J S F. Differential oxidative stress and DNA damage in rat brain regions and blood following chronic arsenic exposure [J]. *Toxicol Ind Health*, 2008, 24(4): 247-56.
- [34] ZERTASHIA A, SAMINA J, SAJIDA B, et al. Genotoxicity of sodium arsenite and DNA fragmentation in ovarian cells of rat [J]. *Toxicol Lett*, 2009, 190(1): 81-5.
- [35] BABANGIDA S, IBRAHIM S, MUHAMMAD A, et al. The role of molecular modelling strategies in validating the effects of chrysin on sodium arsenite-induced chromosomal and DNA damage [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2018, 37(10): 1037-47.
- [36] YIH L H, HSUEH S W, LUU W S, et al. Arsenite induces prominent mitotic arrest via inhibition of G2 checkpoint activation in

- CGL-2 cells [J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(1): 53-63.
- [37] WANG L, YAN R, YANG Q, et al. Role of GH/IGF axis in arsenite-induced developmental toxicity in zebrafish embryos [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2020, 201: 110820.
- [38] NEBAHAT Y, MEHMET-CAN P, YASEMIN A, et al. Protective effects of curcumin on biochemical and molecular changes in sodium arsenite-induced oxidative damage in embryonic fibroblast cells [J]. *J Biochem Mol Toxic*, 2019, 33(7): e22320 .
- [39] DUAN T X, HU T, WU C Y, et al. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is involved in NaAsO₂-induced apoptosis of human hepatic cells through activation of ERK signaling [J]. *Toxicol In Vitro*, 2020, 66: 104857.