

六价铬致癌机制的研究进展

武红叶(综述)/曾明*(审校)

(中南大学湘雅公共卫生学院毒理学系,湖南长沙 410078)

【摘要】对国内外关于六价铬的致癌机制研究进展进行了综述,着重介绍了六价铬通过还原中间产物、ROS引起DNA损伤和干扰细胞凋亡及周期调控以及影响核转录因子等途径可能存在的致癌作用。

【关键词】铬;致癌性

中图分类号:R994.3

文献标识码:A

文章编号:1004-616X(2006)06-0491-03

铬及其化合物广泛地应用于工业生产,并通过含铬“三废”形式污染生活环境而危害人们健康。流行病学调查和动物实验已证实六价铬(Cr^{6+})具有致癌性,各国学者分别从不同角度对铬的致癌机理进行了研究并取得一些可喜的成果。我们拟就这方面的研究进展做一综述。

1 铬在自然界的存在形式及其致癌作用

自然界中铬主要以三价和六价的形式存在。一般认为,三价铬(Cr^{3+})是人类所需的微量元素,六价铬的毒性明显高于三价铬,这是因为 Cr^{6+} 易通过细胞膜的阴离子通道迅速进入细胞内,而 Cr^{3+} 几乎不能通过细胞膜。 Cr^{6+} 进入细胞后最终还原为 Cr^{3+} ,但在还原过程中产生许多中间产物,如四价铬(Cr^{4+})和五价铬(Cr^{5+})及活性氧自由基(ROS)等,这些中间产物可能造成DNA的损伤。

六价铬可以通过三种方式包括皮肤接触,食物摄入和呼吸道吸入进入人体。由于 Cr^{6+} 的强氧化性,可氧化皮肤表面蛋白,自身被还原成 Cr^{3+} ,此外胃酸可很快将 Cr^{6+} 还原 Cr^{3+} ,因此经皮肤和消化道吸收 Cr^{6+} 的含量很低。职业接触主要由呼吸道吸入 Cr^{6+} ,所引起的肿瘤主要是呼吸系统的癌变。流行病学研究证实接触六价铬化合物工人肺癌死亡率比正常人群高30~40倍。长期职业暴露于六价铬导致肺毒性并可增加呼吸道癌症(主要是肺癌和鼻咽癌)的发病率。动物实验研究证明,六价铬诱导动物肿瘤发生率增加,在注射部位和植入部位也可诱导肿瘤。研究发现难溶或不溶的颗粒状 Cr^{6+} 化合物,如醋酸铬可直接被细胞吞噬,并在细胞内缓慢溶解释放,并且 Cr^{6+} 的还原过程本身就很长,因此它们的致癌性比可溶性或易溶性的 Cr^{6+} 化合物更强。国际癌症研究机构(IRAC,1990)将 Cr^{6+} 列为确认人类致癌物^[1]。

2 六价铬致癌的几种可能机制

2.1 对DNA的损伤作用

2.1.1 铬还原产物直接攻击DNA

在 Cr^{6+} 被还原过程中可引起多种DNA损伤,包括 Cr -DNA加合物、DNA-DNA交联、DNA-蛋白质交联、去碱基化及氧化反应等^[2]。实验证明 Cr^{6+} 不能直接与核酸分子反应,而 Cr^{6+} 还原产物 Cr^{3+} 、 Cr^{4+} 和 Cr^{5+} 可与DNA结合,是导致DNA损伤的主要物质。 Cr^{5+} 能和DNA结合形成 Cr^{5+} -DNA·复合物,该复合物具有明显的DNA解旋或断裂作用;而直接证明 Cr^{4+} -DNA·的存在比较困难,因为它的存在非常短暂^[3]。一种稳定的带正电荷的高价复合物[Cr^{5+} -Salen]被证明可以直接氧化DNA碱基(主要是鸟嘌呤),形成DNA加合物-8-羟脱氧鸟苷(8-OHdG),并在复制时使模板DNA发生G→T突变;此外 Cr^{5+} 可通过与脱氧核糖环C'1的氢结合进而夺取氢原子或氢离子,而使DNA脱氧核糖环断裂^[4]。研究认为铬的致癌性与非氧化机制有很强的生物相关性,可能是 Cr^{4+} 或 Cr^{5+} 与DNA直接作用导致DNA的损伤^[5]。除中间产物 Cr^{4+} 、 Cr^{5+} 外,在细胞内 Cr^{6+} 被还原的终产物-稳定的 Cr^{3+} ,也可能是 Cr^{6+} 导致DNA损伤的原因。研究表明 Cr^{6+} 引起的DNA-交联包括氨基酸(AA)、肽或蛋白质与DNA的交联以及DNA链间交联,而这些交联都是由 Cr^{3+} 与DNA核苷酸的磷酸基或碱基配位结合而介导形成的三重复合物。这些DNA-交联可引起DNA聚合酶束缚,改变DNA复制的保真性,破坏基因表达或染色质的结构,并且较难修复,在DNA复制时,易造成一些重要基因如肿瘤抑制基因p53的失活,在肿瘤激发和促进阶段起着重要作用^[6]。 Cr^{6+} 暴露工人外周淋巴细胞中的GSH大量消耗,从而使 Cr^{6+} 在细胞内的还原产物- Cr^{3+} 与DNA结合形成 Cr^{3+} -DNA加合物,导致了 Cr^{6+} 暴露工人的DNA损伤^[7]。因此在细胞内 Cr^{3+} 毒性很可能在 Cr^{6+} 致癌性方面比 Cr^{5+} 更重要,其原因是:① Cr^{5+} 很容易被细胞内存在的还原剂所还原;② Cr^{3+} 可以与DNA的磷酸骨架及鸟嘌呤的N-7原子共价结合形成 Cr^{3+} -DNA加合物,而 Cr^{3+} -DNA加合物从动力

收稿日期:2005-05-27;修订日期:2006-04-05

作者简介:武红叶(1980-)女,山西省朔州市人,硕士研究生,研究方向:分子毒理学。

* Correspondence to: ZENG Ming, Tel: 0731-4805461, E-mail: mingz19@yahoo.com.cn

学角度讲比较惰性,与氧化的 DNA 相比,不易被酶所修复与重组;③个体在暴露 Cr^{6+} 后形成的 Cr^{3+} 可以在细胞内蓄积,并在体内停留相当长的时间^[8]。

2.1.2 ROS 引起 DNA 氧化损伤

六价铬在还原过程中与分子氧 (O_2) 经过一系列反应可产生 ROS 如羟基自由基 ($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子 ($\text{O}_2^{\cdot-}$)、过氧化氢 (H_2O_2) 等,ROS 可引起 DNA 氧化损伤,这可能对 Cr^{6+} 的致癌性起着重要作用。体外实验证实 Cr^{3+} 、 Cr^{4+} 和 Cr^{5+} 均可与 H_2O_2 相互作用产生 $\cdot\text{OH}$ 增高并诱导 DNA 断裂, DNA 断裂程度与 $\cdot\text{OH}$ 的相对量呈正相关,并且这些断裂受 $\cdot\text{OH}$ 清除剂及过氧化氢酶的抑制^[9]。研究显示 Cr^{6+} 与烟溶液反应产生 $\cdot\text{OH}$,且 $\cdot\text{OH}$ 的生成量与 DNA 的断裂数呈正相关, $\cdot\text{OH}$ 清除剂可抑制 Cr^{6+} 与烟溶液反应诱导的 DNA 断裂;尽管很难判定 Cr^{6+} 与烟溶液中哪种化合物反应产生 $\cdot\text{OH}$,但可推测 $\cdot\text{OH}$ 在诱导 DNA 链断裂中起主要作用;用电子顺磁共振 (ESR) 还观察到当烟溶液的量不变而重铬酸钾 ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) 的浓度升高时,二甲基吡咯氮氧化物 - $\cdot\text{OH}$ (DMPO-OH 加合物) 信号亦明显增强,进一步说明 Cr^{6+} 和烟溶液协同诱导的 DNA 单链断裂是由 $\cdot\text{OH}$ 介导的^[10]。以 Cr^{6+} 和 Cr^{5+} 作用于分离 DNA,可产生 8-OHdG 并受到 $\cdot\text{OH}$ 清除剂的抑制,过氧化酶可使 Cr^{6+} 导致的 DNA 碱基氧化下降到本底水平^[11]。这些实验证明铬化合物致 DNA 损伤和 8-OHdG 的形成都与 $\cdot\text{OH}$ 的产生有关, $\cdot\text{OH}$ 是 DNA 的主要毒性物质和最终断裂剂。用 Cr^{6+} 对小鼠染毒诱导其体内微核率上升的同时,脂质过氧化终产物丙二醛 (MDA) 亦升高,二者呈显著相关性,推测 Cr^{6+} 是细胞过氧化损伤的启动因子,损伤细胞膜上各种脂质结构,导致脂质过氧化反应,从而产生一系列的自由基,引起 DNA 链的断裂、损伤,使细胞突变或癌变^[12]。尽管已证实 Cr^{6+} 还原过程产生的 ROS 造成 DNA 氧化损伤,但仍有几个问题值得考虑:①现有研究报道多为体外实验结果,而在体外反应体系中,所采用的与铬反应产生 ROS 的 H_2O_2 浓度为非生理浓度;②体外实验中铬暴露浓度较高导致培养细胞死亡,而不论细胞坏死或凋亡过程 ROS 的产生均可能是线粒体崩解的结果,因而必须有测试系统能区分在细胞死亡过程中铬还原产生 ROS 的作用;③在大多数研究中所采用的靶细胞为肿瘤细胞,一般认为肿瘤细胞体现着一种异常的氧化还原平衡,对于研究细胞死亡和 ROS 的产生是不理想的。

2.1.3 干扰 DNA 损伤的修复

近年来六价铬干扰 DNA 修复的现象已引起各国学者的关注。研究发现 Cr^{6+} 能够诱导 SOS 修复 (易错修复) 相关基因的表达,造成 DNA 修复有明显误差,可能使细胞发生高频率突变及癌变^[2]。铬处理人肺癌 A549 细胞发现 Cr^{6+} 能降低 8-OHdG DNA 糖基化酶的 mRNA 和蛋白质表达水平,进而影响清除 8-OHdG 的有效性,抑制 DNA 损伤的修复^[13]。 Cr^{6+} 引起 DNA 聚合酶束缚也可能是影响 DNA 修复的原因。DNA 重组修复和多重切除修复机制可能在 Cr^{6+} 致 DNA 损伤的修复中具有重要作用。实验显示 Cr^{6+} 对 DNA 修复的干扰效应与其暴露剂量有关:在低毒性小剂量暴露时, Cr^{6+} 能够诱导修复基因表达从而有效地清除 DNA 损伤如 DNA-蛋白质交联 (DPC),而随着 Cr^{6+} 暴露剂量增加细胞毒性增大时, DNA 损伤则不能修复^[9]。目前关于 Cr^{6+} 与 DNA 损伤修复的研究资料不多,其确切机制尚需进一步研究。

2.2 诱导细胞凋亡调控异常

研究表明 Cr^{6+} 诱导癌症发生机制之一可能是凋亡的失控^[14]。 Cr^{6+} 诱导细胞凋亡的机制主要是 $p53$ 依赖性途径。 $p53$ 基因是重要的抑癌基因,其生物学功能是在 G 期监视 DNA 的完整性,诱导 DNA 损伤修复、损伤细胞凋亡和组织分化,保护基因完整性以及抑制肿瘤发生。若 $p53$ 基因突变失活,则失去对细胞的监视作用,有 DNA 损伤的细胞可能不经修复进行分裂增殖而形成肿瘤。 $p53$ 基因是多种肿瘤中突变频率最高的抑癌基因,大约 60% 的肿瘤中有 $p53$ 的突变。检测发现铬接触工人肺癌 $p53$ 基因的非转录链发生 G→T 点突变^[15]。用重铬酸钾染毒的大鼠,其肺组织 $p53$ 基因外显子 7 有两个损伤热点^[16]。 Cr^{6+} 还原的中间产物作用产生的 DNA 加合物,可激活 $p53$ 上游激酶如 DNA 依赖蛋白激酶 (DNA-dependent protein kinases, DNA-PK) 诱导 $p53$ 基因活化和细胞凋亡^[17]。人类肺肿瘤细胞株暴露于 Cr^{6+} 后, $p53$ 水平和转录能力都增加^[18],但 Cr^{6+} 不能持续地激活 $p53$,而且可能影响 $p53$ 与 DNA 的连接而使 $p53$ 突变失活^[14],这似乎可以解释为什么 Cr^{6+} 可以诱导 $p53$ 水平增加,同时又可以致癌。

环境中 Cr^{6+} 与其它致癌物共存时可通过协同作用诱导凋亡异常而促进细胞癌变过程。致癌金属镉与 Cr^{6+} 同时存在时通过抑制天冬氨酸半胱氨酸蛋白酶 -caspase3 活性使凋亡阻滞,促使细胞恶性转化^[19]。在人类正常肺成纤维细胞中 Cr^{6+} 能增强终致癌物苯并芘二醇环氧化物与 $p53$ 的外显子 7、8 位点结合而使 $p53$ 发生突变,这些基因结合位点成为正常肺细胞转化为癌变细胞的“启动热点”^[20]。

Cr^{6+} 在细胞内还原过程中产生的 ROS,不仅能引起脂质过氧化和 DNA 氧化损伤等,而且参与 Cr^{6+} 诱导的凋亡异常。 Cr^{6+} 诱导细胞凋亡过程可检测到 ROS 呈剂量依赖性升高,加入抗氧化剂可阻止线粒体损伤和凋亡;ROS 可激活 $p53$ 而增强 Cr^{6+} 诱导的凋亡^[21]。

2.3 对细胞周期的干扰作用

细胞周期是细胞生命活动的基本过程,细胞在周期时相的变迁中进入增殖、分化、衰老和死亡等生理过程,若细胞周期调控异常,则细胞将进入病理状态,如增殖失控、低分化或未分化直至形成肿瘤。细胞周期调控机制复杂,遗传性毒物诱导的 DNA 损伤、ROS 和细胞凋亡与细胞周期调控异常的关系密切。目前关于 Cr^{6+} 对细胞周期影响的研究资料较少。有报道指出低剂量 Cr^{6+} ($3\sim 9 \mu\text{mol/L}$) 能上调细胞周期蛋白激酶 (cyclin-dependent kinase, CDK) 的抑制因子 $p21$ 和 $p15$,同时伴随着细胞周期蛋白 A (CyclinA) 基因表达的下降以及生长阻滞和 DNA 损伤基因 (growth arrest and DNA damage genes, GADD) $GADD45$ 表达的升高,使细胞阻滞于 G_1 期而抑制细胞生长^[22]。 Cr^{6+} 引起的 DNA 损伤可诱导 $GADD45$ 活化而抑制蛋白磷酸酶 CDC25B 和 CDC25C 活性。CDC25 是细胞分裂周期蛋白 (cell division cyclin, CDC2, 又称 CDK1) 的重要启动因子,而 CDC2 对维持细胞周期的正常运行有重要作用, CDC2 活性的抑制使细胞发生 G_2/M 期阻滞而诱导凋亡^[23]。用 Cr^{6+} 处理的 A549 细胞发生 G_2/M 阻滞,活性氧 H_2O_2 的产生可能起着重要作用^[24]。也有研究显示低浓度的 Cr^{6+} 促进细胞各期的过渡而高浓度时则使细胞停止在 S 期,其机理尚不清楚^[16]。

2.4 对核转录因子的影响

核转录因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B) 属于 Rel 基因家族, 是一种重要的核转录因子。要由 50 kD 蛋白 (p50) 和 65 kD 蛋白 (p65/RelA) 组成的异源二聚体。研究表明 NF- κ B 活化进入细胞核与其目的基因结合, 调控免疫、炎症、致癌、促进或拮抗凋亡等多种基因的表达, 其活性失控与肿瘤的发生或发展密切相关。在 Cr^{6+} 诱导肿瘤形成的过程中, ROS 可能是启动 NF- κ B 活性的上游信号^[25], NF- κ B 的活化及随后原癌基因如 *c-myc* 表达而抑制凋亡, 可能对肿瘤形成起着一定作用。目前对于 Cr^{6+} 究竟是诱导还是抑制 NF- κ B 活性还有一些争议。

细胞内 Cr^{6+} 还原产生的 ROS 可激活另一核转录因子催化蛋白 -1 (AP-1)。NF- κ B 和 AP-1 可促进许多基因的表达, 如白细胞介素 -6 (IL-6) 和白细胞介素 -8 (IL-8), IL-6 的过表达可能导致慢性炎症和肿瘤的形成^[26]。在体外 Cr^{6+} 对 AP-1 的诱导是通过丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen activated protein kinase, MAPK) 蛋白家族调节。该家族蛋白包括四种蛋白家族 ERK, JNK, p38 和 BMAPK-1, 可以传递多种细胞功能信号, 包括增殖、凋亡和分化。在人类支气管上皮细胞, Cr^{6+} 可促进 ERK-1、ERK-2、JNK 和 p38 的磷酸化, 进而影响 AP-1 和 NF- κ B 的活性^[27]。可见 AP-1 与 NF- κ B 有协同作用, 它们与机体肿瘤发生都有密切关系, 均受 ROS 诱导表达, 从而在 Cr^{6+} 致癌过程中有重要作用。

参考文献:

[1] 魏大成. 铬暴露与多发性原发性鼻腔癌的关系[J]. 国外医学医学地理分册, 2003, 24(2): 69-70.

[2] 史黎薇. 铬化合物对健康影响的研究进展 [J]. 卫生研究, 2003, 32(4): 410-412.

[3] Bose RN. Mechanisms of DNA damage by chromium(V) carcinogens [J]. *Nucleic Acid Res*, 1998, 26(7): 1588-1596.

[4] Sugden KD, Campo CK, Martin BD. Direct oxidation of guanine and 7, 8-dihydro-8-oxoguanine in DNA by a high-valent chromium complex: a possible mechanism for chromate genotoxicity[J]. *Chem Res Toxicol*, 2001, 14(9): 315-322.

[5] Zhitkovich A, Song Y, Quievryn G, et al. Non-oxidative mechanisms are responsible for the inductive of mutagenesis by reduction of Cr(VI) with cysteine: role of ternary DNA adducts in Cr(III)-dependent mutagenesis [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(2): 549-560.

[6] Quievryn G, Messer J, Zhitkovich A. Carcinogenic chromium(VI) induces cross-linking of vitamin C to DNA *in vitro* and in human lung A549 cell[J]. *Biochemistry*, 2002, 41(9): 3156-3167.

[7] Quievryn G, Goulart M, Messer G, et al. Reduction of Cr(VI) by cysteine: significance in human lymphocytes and formation of DNA damage in reactions with variable reduction rates[J]. *Mol Cell Biochem*, 2001, 222(1-2): 107-118.

[8] Jeejeebhoy KN. Chromium and parenteral nutrition[J]. *J Trace Elem Exp Med*, 1999, 12(2): 85-89.

[9] O'Brien TJ, Ceryak S, Patiemo SR. Complexities chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms[J]. *Mut Res*, 2003, 533(1-2): 3-36.

[10] 刘翔, 卢果芬, 刘世杰. 六价铬与烟溶液反应诱导质粒 DNA 单链

断裂[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2000, 18(3): 165-167.

[11] Faux SP, Gao M, Chipman JK, et al. Production of 8-hydroxydeoxyguanosine in isolated DNA by chromium(VI) and chromium(V) [J]. *Carcinogenesis*, 1992, 13(9): 1667-1669.

[12] 李丁, 李勤, 安静, 等. 六价铬对小鼠诱变作用与脂质过氧化关系[J]. *环境与健康杂志*, 2001, 18(6): 362-363.

[13] Hodges NJ, Chipman JK. Down-regulation of the DNA-repair endonuclease 8-oxo-guanine DNA glycosylase1(hOGG1) by sodium dichromate in cultured human A549 lung carcinoma cells[J]. *Carcinogenesis*, 2002, 23(1): 55-60.

[14] Chen F, Shi X. Intracellular signal transduction of cell in response to carcinogenic metals[J]. *Crit rev oncol hematol* 2002, 42(1): 105-121.

[15] Kondo K, Hino N, Sasa M, et al. Mutation of the p53 gene in human lung cancer from chromate-exposed worker[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 239(1): 95-100.

[16] 熊开容, 张治位, 衡正冒. 应用依赖随机化末端连接物聚合物链反应技术研究重铬酸钾对大鼠肺 p53 基因 DNA 损伤 [J]. *卫生研究*, 2003, 32(3): 189-197.

[17] Carlisle DL, Pritchard DE, Singh J, et al. Chromium(VI) induces p53-dependent apoptosis in diploid human lung and mouse dermal fibroblasts[J]. *Mol Carcinog*, 2000, 28(2): 111-118.

[18] Ye JP, Wang SW, Leonard SS, et al. Role of reactive oxygen species and p53 in chromium(VI)-induced apoptosis[J]. *Biol Chem*, 1999, 274(49): 34974-34980.

[19] Cai Yuan, Maria Kadiiska, William E, et al. Possible role of caspase-3 inhibition in cadmium-induced blockage of apoptosis[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2000, 164(3): 321-329.

[20] Harris GK, Shi XL. Signaling by carcinogenic metals and metal-induced reactive oxygen species[J]. *Mut Res*, 2003, 533(1-2): 183-200.

[21] Jianping Ye, Suwei Wang, Stephen S, et al. Role of reactive oxygen species and p53 in chromium(VI)-induced apoptosis[J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(49): 34974-34980.

[22] Ceryak S, Zingariello C, O'Brien T, et al. Induction of pro-apoptotic and cell cycle-inhibiting gene in chromium(VI)-treated human lung fibroblasts: lack of effect of ERK[J]. *Mol Cell Biochem*, 2004, 255(1-2): 139-149.

[23] O'Brien TJ, Fornsaglio JL, Ceryak S, et al. Effects of hexavalent chromium on the survival and cell cycle distribution of DNA repair-deficient *S. cerevisiae* [J]. *DNA Repair (Amst)*, 2002, 1(8): 617-627.

[24] Pritchard DE, Ceryak Ha L, Fornsaglio JL, et al. Mechanism of apoptosis and determination of cellular fate in chromium(V)-exposed populations of telomerase-immortalized human fibroblasts[J]. *Cell Growth Differ*, 2001, 12(10): 487-96.

[25] Ding M, Shi X. Molecular mechanisms of Cr(VI)-induced carcinogenesis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2002, 234/235(1-2): 293-300.

[26] Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer[J]. *Nature*, 2002, 420(6917): 860-867.

[27] Chen F, Ding M, Lu Y, et al. Participation of MAP kinase p38 and Ikkapab kinase in chromium(VI)-induced NF-kappaB and AP-1 activation[J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2000, 19(3): 231-238.

