

· 论 著 ·

氟和铝对小鼠胚胎成骨细胞骨保护蛋白和核因子 κ B 受体活化因子配体 mRNA 表达的影响

郭晓英, 蔡佑欣, 孙贵范

(中国医科大学公共卫生学院地球化学性疾病研究室, 辽宁省省生物学作用与砷中毒重点实验室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 目的 观察氟和铝对小鼠胚胎成骨细胞株 (MC3T3-E1) 骨保护蛋白 (OPG) 和 NF- κ B 受体活化因子配体 (RANKL) mRNA 表达的影响。方法 在细胞培养液中加入 $50 \mu\text{mol/L}$ 氟化钠或 / 和 $5 \mu\text{mol/L}$ 氯化铝; 72 h 后提取细胞总 mRNA, 用 RT-PCR 方法分析 MC3T3-E1 细胞 OPG 和 RANKL 的 mRNA 表达, 进行半定量分析。结果 与对照组比较, 氟铝联合染毒可显著提高 MC3T3-E1 细胞 OPG mRNA 的表达 ($P < 0.05$), 两者具有协同作用 ($P < 0.05$), 但氟铝联合染毒对 MC3T3-E1 细胞 RANKL mRNA 的表达水平无显著改变; 因此, 与对照组相比, 氟铝联合染毒组 RANKL/OPG 比值显著降低 ($P < 0.05$)。结论 氟铝联合可能通过增加成骨细胞 OPG 基因表达水平来抑制破骨细胞的分化和成熟, 从而抑制骨吸收, 使骨形成大于骨吸收。

关键词: 氟; 铝; 小鼠胚胎成骨细胞株 (MC3T3-E1); 骨保护蛋白 (OPG); 核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL)

中图分类号: R599.9 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2011)01-0003-04

Effects of fluoride and aluminum on mRNA expression of OPG and RANKL in MC3T3-E1 cells

GUO Xiaoying, CAI Youxin, SUN Guifan

(Department of Biogeochemical Disease School of Public Health, China Medical University, Liaoning Provincial Key Laboratory for Arsenic Biological Effect and Poisoning, Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective To explore the effects of fluoride and aluminum on mRNA expression of OPG and RANKL in MC3T3-E1 and mouse osteoblastic cell line. Methods Cells were cultured in medium contained $50 \mu\text{mol/L}$ NaF or / and $5 \mu\text{mol/L}$ AlCl₃. Expressions of OPG mRNA and RANKL mRNA were determined and carried out semiquantitative analysis by RT-PCR 72 h later. Results Compared with that of control group, expressions of OPG mRNA in MC3T3-E1 treated with fluoride and aluminum were increased significantly ($P < 0.05$), fluoride and aluminum had synergistic effect on expressions of OPG mRNA in MC3T3-E1 cells ($P < 0.05$). However, the expression of RANKL mRNA showed no obvious change among different groups. Therefore, the ratio of RANKL/OPG was significantly decreased ($P < 0.05$). Conclusion The results suggested that the combined administration of fluoride and aluminum might inhibit the differentiation and maturation of osteoblast by stimulating expression of OPG mRNA, the decreased ratio of RANKL/OPG indicated that the process of bone formation would be greater than that of bone absorption.

Key words: fluoride; aluminum; mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1); osteoprotegerin (OPG); receptor activator on NF- κ B ligand (RANKL)

氟、铝广泛存在于自然界, 人体可通过饮用水、食物、茶叶等途径同时摄入氟和铝。1984年李福成首次报道了在我国贵州由于用高岭土拌煤烘烤玉米, 使玉米氟、铝含量增高, 引起以骨软化畸形为主的氟铝联合中毒^[1]; 此后在我国西部有饮用砖茶习惯的藏族、蒙古族、哈萨克族等少数民族地区发现了饮茶型氟铝联合中毒^[2,3]。骨骼是氟和铝的共同靶器官, 研究表明氟能促进铝的吸收并蓄积于骨骼^[4]; 流行

病学调查结果显示饮茶型氟骨症患者多发生骨关节炎^[5]。成骨细胞分泌的骨保护蛋白 (OPG) 和核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 在调节破骨细胞的形成和活化方面起着关键的作用, OPG、RANKL 和其他细胞因子之间形成了一个精密的调控网络, 是许多骨代谢调节激素或因子在细胞水平发挥作用的共同通道^[6]。本实验拟通过观察氟、铝对小鼠成骨样细胞 MC3T3-E1 细胞骨保护蛋白和核因子 κ B 受体活化因子配体 mRNA 表达的影响, 探讨氟铝联合对骨骼损伤的可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

收稿日期: 2010-09-19 修回日期: 2010-11-23

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30660509); 氟对破骨细胞分化调节信号环路的影响

作者简介: 郭晓英 (1974-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 地方病学。E-mail: xyg@mail.cmu.edu.cn

α -MEM培养液 美国 Gibco公司; 胎牛血清, Hyclone 0.25%胰酶, Sigma NaF 日本和光纯株式会社; AC₃ 上海生物工程有限公司; Trizol Gibco Takara RNA PCR Kit Ver.3.0 大连 Takara公司。

超净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; 倒置显微镜, Nikon公司; 3K18型低速离心机, Sigma公司; CO₂培养箱, Heraeus公司; 2720型 PCR仪, Applied Biosystems公司; HE-120Gen多功能水平电泳槽, 上海天能。

1.2 细胞培养

小鼠颅顶骨前成骨细胞亚克隆 14 (MC3T3-E1 subclone 14) 购自中国科学院细胞库。细胞于 α -MEM培养液 (含 10%胎牛血清, 100 U/m青、链霉素)、5% CO₂、37°C条件下常规培养。

1.3 染毒液的配制

配制 100 mmol/L NaF和 10 mmol/L AlCl₃的储备液, 染毒前分别稀释为 500 μ mol/L NaF和 50 μ mol/L AlCl₃的 10倍工作液。氟铝联合染毒液根据 Chabre的方法^[7], 以 1 mmol/L NaF与 100 mmol/L AlCl₃ 1:1混合, 现用现配。实验分 4组: 对照组、染氟组 (50 μ mol/L NaF)、染铝组 (5 μ mol/L AlCl₃)、氟铝联合染毒组 (50 μ mol/L NaF+5 μ mol/L AlCl₃)。

1.4 细胞总 RNA的提取

将 2×10⁵ 个 MC3T3-E1细胞接种于 25 cm² 培养瓶, 于 5% CO₂培养箱中常规培养 2~3 d后加入含 50 μ mol/L NaF或 5 μ mol/L AlCl₃的培养液培养 3 d弃去培养液, PBS冲洗 2次后加入 1 ml Trizol 反复吹打后室温静置 5 min, 加入氯仿 0.2 ml 振摇 15 s, 室温静置 3 min, 4°C 15 000×g离心 15 min, 吸取 600 μ 上层的无色液相, 移入 1.5 ml EP管中, 加入异丙醇 0.5 ml 颠倒摇匀, 室温静置 10 min, 4°C 15 000×g离心 10 min, 弃去上清液, 加入 75%乙醇 1 ml, 4°C 7 500×g离心 5 min, 弃去上清后室温干燥 5 min, 加入 0.1% DEPC水, 55°C, 10 min溶解 RNA -80°C保存备用。

1.5 RT-PCR

1.5.1 逆转录合成 cDNA 按 RT-PCR试剂盒操作指南配制逆转录反应液, 设定反应条件: 30°C、10 min, 42°C、30 min, 99°C、5 min, 5°C、5 min。

1.5.2 PCR扩增反应 引物设计及合成: 在 Gene Bank中查找小鼠 β -actin, OPG和 RANKL mRNA序列, 用 Primer 5.0设计引物 (表 1), 引物由上海生工合成。PCR反应条件: β -actin, OPG, RANKL, 94°C、2 min, 94°C、30 s, 60°C、30 s, 72°C、30 s,

72°C、8 min, β -actin 25个循环; OPG 30个循环; RANKL 40个循环。

表 1 引物序列

基因	引物序列 (5'-3')	长度 (bp)
β -actin Sense	GAGACCTTCAACACCCCAGC	446
β -actin Anti-sense	CCACAGGATTCCATACCCAA	
OPG Sense	CACIGCACAGTGAGGAGAA	346
OPG Anti-sense	GTGCTGCAGTTGCTGTGTTT	
RANKL Sense	CAGCATCGCTCTGTCTCTGTA	107
RANKL Anti-sense	CTGCGTTTTCATGGAGTCTCA	

1.5.3 琼脂糖凝胶电泳 取 10 μ l PCR扩增产物与 2 μ l loading buffer混合均匀后上样, 电泳条件为电压 120 V, 电流 100 mA, 紫外灯下观察、拍照并应用 Image 软件测算电泳条带的灰度值。

1.6 统计学分析

结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS13.0统计软件进行统计分析, 多样本均数的比较采用单因素方差分析 (One Way ANOVA), 氟和铝交互作用分析采用 2×2析因方差分析, P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氟和铝对 MC3T3-E1细胞 OPG mRNA表达的影响

氟、铝单独及联合染毒 72 h对 MC3T3-E1细胞 OPG mRNA表达水平的影响见图 1。经过对 3次实验结果进行凝胶电泳图像灰度分析发现, 与对照组相比, 染氟组、染铝组 MC3T3-E1细胞 OPG与 β -actin灰度比值无显著变化; 而氟铝联合染毒组 OPG与 β -actin灰度比值显著升高 (P<0.05) (图 2)。采用 2×2析因方差分析, 氟、铝联合对 OPG mRNA表达水平升高有协同作用 (F=8.364, P=0.02)。

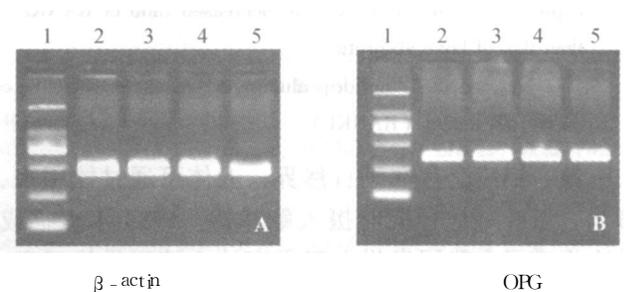
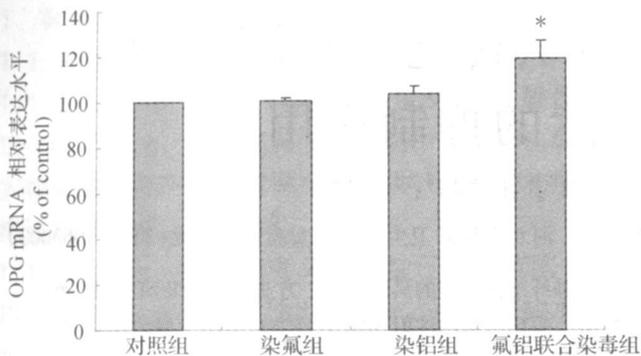


图 1 氟和铝对 MC3T3-E1细胞 OPG mRNA表达的影响

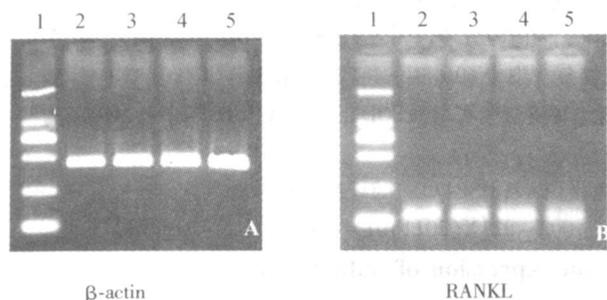
2.2 氟和铝对 MC3T3-E1细胞 RANKL mRNA表达的影响

图 3为 MC3T3-E1细胞染毒后 RANKL mRNA表达情况。对 3次实验结果进行凝胶电泳图像灰度分析发现, 与对照组相比, 染氟组、染铝组及氟铝联合染毒 72 h对 MC3T3-E1细胞 RANKL与 β -actin灰度比值无显著变化 (图 4)。



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图2 氟和铝对 MC3T3-E1 细胞 OPG mRNA 表达的影响



1: Marker; 2: 对照组; 3: 染氟组; 4: 染铝组; 5: 氟铝联合染毒组

图3 氟和铝对 MC3T3-E1 细胞 RANKL mRNA 表达的影响

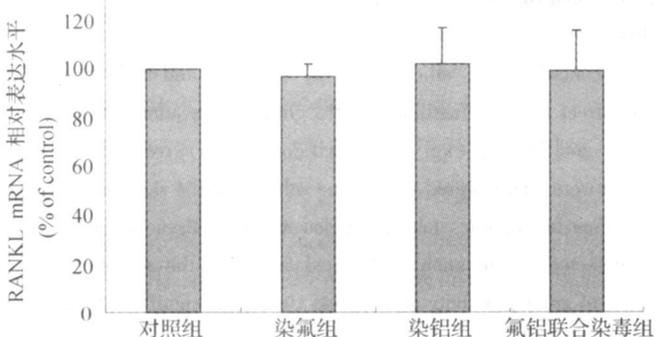


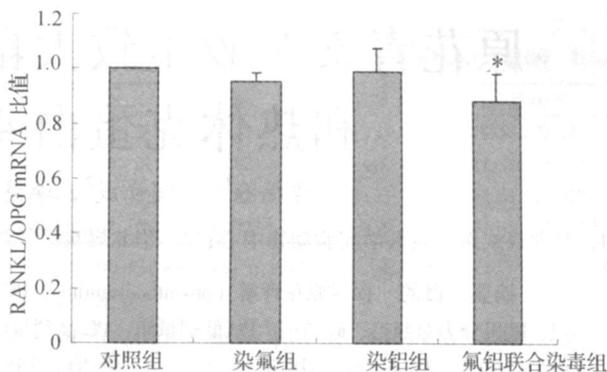
图4 氟和铝对 MC3T3-E1 细胞 RANKL mRNA 表达的影响

2.3 氟铝联合对 MC3T3-E1 细胞 RANKL/OPG mRNA 表达比值的影响

如图 5 所示, 与对照组比较, 染氟组、染铝组 MC3T3-E1 细胞 RANKL/OPG mRNA 表达比值无显著变化; 而氟铝联合染毒组 RANKL/OPG mRNA 表达比值显著降低 ($P < 0.05$)。

3 讨论

骨是由成骨细胞 (osteoblast OB) 和破骨细胞 (osteoclast OC) 共同作用维持的组织, 成年后骨不断进行更新和改造, 即骨重建 (bone remodeling), 成骨细胞控制的骨形成和破骨细胞控制的骨吸收之间的平衡保证了骨重建的正常进行。在骨重建过程中, 破骨细胞是“启动子”, 成骨细胞是“调节者”, 骨



注: 与对照组比较, * $P < 0.05$

图5 氟和铝对 MC3T3-E1 细胞 RANKL/OPG 的影响

保护蛋白、NF- κ B 受体活化因子配体是偶联成骨细胞和破骨细胞分化、活化与生物活性的主要因子。OPG 是一个分泌型的 TNF 受体, 是骨代谢的重要负调控因子, 能抑制 OC 生成、活化, 减少骨吸收, 增加骨密度, 它主要通过直接结合成骨/基质细胞上的 RANKI 发挥骨保护作用。RANKI 是诱导 OC 生成的关键性细胞因子, 通过作用于 OC 上的受体 RANK 刺激 OC 形成、分化和活化, 增强骨吸收。OPG 竞争性结合 RANKL, 阻断 RANKI 与其靶信号受体 RANK 的结合, 抑制 RANKL/RANK 对破骨细胞信号转导的活化, 减少 OC 生成, 发挥抗骨质疏松作用。因此, RANKL/OPG 比值决定破骨细胞分化、成熟及功能^[8]。

本研究从基因水平观察了氟和铝联合对 MC3T3-E1 细胞 OPG、RANKI 表达的影响, 发现氟铝联合可提高成骨细胞 OPG mRNA 的表达, 且二者具有协同作用, 而对 RANKL mRNA 的表达无显著性影响, 使成骨细胞表达的 RANKL/OPG 比值显著降低。由此可见氟铝联合系以 RANKL/RANK/OPG 系统为靶点, 通过上调 OPG 的表达, 竞争性诱导结合成骨细胞上的 RANKL, 致使 RANKI 不能与破骨细胞及其前体细胞上的 RANK 结合, 从而抑制破骨细胞的分化和成熟, 降低破骨细胞的骨吸收功能, 使骨重建中的骨形成大于骨吸收。砖茶型氟骨症患者 X 线检查表明, 骨内改变主要是骨质增多^[9]。流行病学调查结果也显示饮茶型氟中毒氟骨症患者多发生骨关节病, 并伴有不同程度的骨硬化、骨质疏松、骨间膜改变及韧带连接点钙化等表现, 但以骨硬化为主^[5]。本研究结果提示氟铝联合通过 RANKL-RANK-OPG 调控轴抑制破骨细胞的骨吸收, 促进骨形成, 增加骨密度, 可能是氟铝联合中毒所致的骨硬化的分子机制之一。

(下转第 8 页)

矽肺是因长期吸入游离 SiO_2 粉尘微粒所致的以肺间质纤维化为主的全身性病变。目前矽肺的自由基理论认为,当机体吸入大量 SiO_2 粉尘微粒时,肺泡巨噬细胞 (AM) 会因吞噬游离 SiO_2 粉尘而被激活,激活状态的 AM 一方面会合成并释放许多细胞因子,如 HDGF、 $\text{TNF-}\alpha$ 、 IL-1 、 $\text{TGF}\beta_1$ 等,另一方面会产生大量氧自由基,从而损害肺组织结构和细胞,导致矽肺的发生^[1-3]。本实验显示,矽尘吸入会导致大鼠肺内淋巴细胞、单核巨噬细胞浸润以及肉芽肿的形成直至大面积纤维化;PC 组虽可见类似变化,但程度明显减轻提示 PC 能够减轻 SiO_2 诱导的大鼠肺纤维化。

研究表明,细胞因子在肺纤维化发展过程中起着重要的作用,它们构成一个复杂的细胞外信号转导分子的网络系统及链式反应关系^[4];越来越多的研究表明抗氧化剂能通过细胞因子网络调节肺纤维化,其中 $\text{TGF}\beta_1$ 是一类重要的生长调节细胞因子,在细胞的生长、分化、免疫调节及细胞外基质合成调节中具有重要作用^[5-9]。它的过度表达可加快肺间质纤维化,导致广泛的细胞外基质蛋白如胶原、纤维黏连蛋白和弹性蛋白的蓄积和肌成纤维细胞集聚等。在培养的人肺成纤维细胞中, $\text{TGF}\beta_1$ 是通过诱导热休克基因转录因子 1 (heat shock transcription factor 1) 三聚体的形成以及与其诱导 HSP47 的热激元件 (heat shock element) 的结合促进 HSP47 合成增加,作为胶原特异性分子伴侣的 HSP47 可能是控制组织器官纤维化最好的分子靶点之一^[7-9]。

本实验结果显示,矽肺组中 SOD 活力明显低于对照组,而 $\text{TGF}\beta_1$ 和 HSP47 的表达都明显高于对照组,提示 SiO_2 可使大鼠体内抗氧化能力下降,造成氧化损伤,加速促纤维化因子的表达,从而加快肺纤维化进程,此与自由基理论基本相符。PC 是从天然

植物中提取的生物类黄酮,在抗动脉粥样硬化、抗病毒、抗肿瘤、抗炎症、抗过敏等许多功能上均显示了一定效果,由于来源于自然,使用时几乎无副作用,已成为目前抗氧化剂研究和开发的一大热点。本实验发现,PC 能有效提高染尘大鼠血清 SOD 活力,能有效减少 $\text{TGF}\beta_1$ 和 HSP47 在肺组织中的表达,抑制和延缓肺纤维化的进展。提示 PC 可能通过氧化抗氧化机制提高机体抗氧化能力,减少氧化损伤所导致的促纤维化细胞因子的表达,达到延缓肺纤维化的作用,但 PC 如何通过细胞因子网络来达到延缓肺纤维化的作用机制还有待进一步的探讨和研究。

参考文献:

- [1] 高衍新,王瑞. 矽尘致肺纤维化机制及细胞因子在矽肺纤维化中的作用 [J]. 中国工业医学杂志, 2008 21 (1): 31-35
- [2] 靳清汉,李庆海,万恩广,等. 矽肺发病机理研究进展 [J]. 济宁医学院学报, 2008 34 (4): 332-334
- [3] 蔡后荣,郑培德,戴令娟,等. 肺间质纤维化前胶原和肿瘤坏死因子 α 基因表达 [J]. 中华结核和呼吸杂志, 1998 21 (12): 753-755
- [4] Slemenao G, Adam F, Maschio N, et al. Immune mechanisms in interstitial lung disease [J]. Allergy, 2000 55: 1103-1120
- [5] 郝长付,姚武,吴逸明. $\text{TGF}\beta_1$ 在实验性矽肺大鼠肺组织中的表达及其意义 [J]. 医学论坛杂志, 2006 27 (7): 42-43
- [6] 徐志勇,焦洁,姚武,等. CIGF 和 $\text{TGF-}\beta_1$ 在实验性矽肺肺组织中的表达及其意义 [J]. 环境与职业医学, 2008 35 (10): 1830-1832
- [7] Sasaki H, Sato T, Yamauchi N, et al. Induction of heat shock protein 47 synthesis by $\text{TGF-}\beta$ and IL-1 beta via enhancement of the heat shock element binding activity of heat shock transcription factor [J]. J Immunol, 2002 168: 5178-5183
- [8] Amenomori M, Mukae H, Sakamoto N, et al. HSP47 in lung fibroblasts is a predictor of survival in fibrotic nonspecific interstitial pneumonia [J]. Respir Med, 2010 104 (6): 895-901
- [9] Nakayama S, Mukae H, Sakamoto N, et al. Pirfenidone inhibits the expression of HSP47 in $\text{TGF-}\beta$ 1-stimulated human lung fibroblasts [J]. Life Sci, 2008 82 (3-4): 210-217
- [10] 曹进,赵燕,刘箭卫,等. 砖茶型氟中毒成人的氟骨症 [J]. 卫生研究, 2003 32 (2): 141-143
- [11] 曹进,赵燕,刘箭卫,等. 砖茶型氟中毒成人的氟骨症 [J]. 中国地方病学杂志, 2008 27 (2): 121-123
- [12] Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption [J]. J Bone Miner Res, 2000 15 (1): 2-12
- [13] Chabre M. Aluminum fluoride and beryllium fluoride complexes: a new phosphate analogs in enzymology [J]. Trends Biochem Sci, 1990 15 (1): 6-10
- [14] Aubin JE, Bonnelly E. Osteoprotegerin and its ligand: A new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption [J]. Osteoporos Int, 2000 11 (11): 905-913

(上接第 5 页)

参考文献:

- [1] 李福成. 高岭土拌煤烘烤玉米引起疾病的报告 [J]. 中华预防医学杂志, 1988 22 (4): 225-227
- [2] 白学信,杨兴太,梁代华,等. 饮茶型氟中毒——四川省阿坝藏族自治州壤塘县氟病调查 [J]. 中国地方病学杂志, 1986 5 (2): 110-113
- [3] 刘庆斌,王五一,刘学慧,等. 内蒙古陈巴尔旗饮茶型氟铝联合中毒调查 [J]. 中国地方病学杂志, 2005 24 (1): 50-52
- [4] 李福成,吴非,张华,等. 高氟促进铝蓄积与过量铝危害的实验研究 [J]. 微量元素与健康研究, 1999 16 (2): 15-18
- [5] 孙殿军,高彦辉,于光前,等. 饮茶型氟中毒流行特征的研究