

氟中毒大鼠生长板 Ihh、PTHrP mRNA 及蛋白表达的变化

潘磊磊, 何杨, 吴思思, 刘爽, 郭晓英, 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, 辽宁省砷生物学作用与砷中毒重点实验室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 目的 观察氟中毒大鼠生长板 Ihh、PTHrP mRNA 及蛋白表达的影响, 探讨 Ihh 信号通路在氟致软骨损伤中的可能作用。方法 32 只 Wistar 大鼠按体重随机分成 4 组, 对照组饮用自来水, 染氟组分别饮用含氟 50、100 和 150 mg/L 的自来水, 3 个月后测定大鼠血清及骨组织氟含量, Real-time PT-PCR 法检测 Ihh、PTHrP mRNA 表达情况, 免疫组化法检测软骨组织中 PTHrP 蛋白表达情况。结果 染氟组大鼠生长板中 Ihh、PTHrP mRNA 表达显著高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。对照组大鼠生长板软骨细胞不表达或极弱表达 PTHrP, 而氟中毒大鼠生长板静止层和肥大层软骨细胞细胞质中 PTHrP 蛋白为阳性表达, 且随染氟剂量增加而升高。结论 过量氟可能通过影响 Ihh、PTHrP mRNA 及蛋白表达水平, 造成生长板软骨增殖、分化失衡。

关键词: 氟中毒; Ihh; PTHrP; 生长板

中图分类号: R599.9

文献标识码: A

文章编号: 1002-221X(2013)04-0253-03

Effect of fluoride on mRNA and protein expression of Ihh and PTHrP in bone growth plate of rat

PAN Lei-lei, HE Yang, WU Si-si, LIU Shuang, GUO Xiao-ying, SUN Gui-fan

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

Abstract: **Objective** To observe the effect of excess fluoride on mRNA and protein expression of Ihh and PTHrP in bone growth plates of rats, thereby further explore the role of Ihh signaling pathway in cartilage damage induced by excessive fluoride ingestion. **Methods** Thirty-two Wistar rats were randomly divided into four groups: control rats were only given tap water, the fluoride exposed rats were given fluoride containing tap water (50, 100 and 150 mg/L of fluorion), three months later, the content of fluoride in serum and bone was determined, and the Ihh, PTHrP mRNA expression was also measured by real-time RT-PCR, and PTHrP protein expression were detected by immunohistochemistry at the same time. **Results** The mRNA expression of Ihh and PTHrP in growth plates of fluoride-treated rats were significantly higher than those of control group ($P < 0.05$), immunohistochemistry showed that the PTHrP protein in growth plate of fluorosis rats was also significantly increased in chondrocytes of quiescent layer and hypertrophic layer than that of control rats. **Conclusion** Excess fluoride exposure may stimulate the expression of Ihh, PTHrP mRNA, resulted in imbalance of chondrocytic proliferation and differentiation in bone growth plate.

Key words: fluorosis; Indian hedgehog (Ihh); parathyroid hormone-related protein (PTHrP); growth plate

国内外研究发现, 饮高氟水的实验大鼠生长板软骨厚度增加, 肥大软骨细胞增多且成熟障碍^[1,2]。郭雄等通过偏食条件下饮水加氟发现, 实验大鼠胫骨变短^[3]; 戴国钧等发现高氟饮水延缓儿童骨骼发育成熟, 表现为骨龄延迟, 且高氟对青春发育期的儿童影响更为明显^[4]。生长板是软骨内成骨的主要发生部位, 正常长骨的纵向生长有赖于生长板软骨细胞的不断增殖和分化, 所以生长板发育直接关系到长骨的生长发育。过量氟可能通过干扰软骨内成骨过程造成骨骼生长发育障碍。软骨内成骨过程受多种生长因子调

控^[5], 其中局部旁分泌生长因子调控作用中的 Indian Hedgehog (Ihh) 信号通路起关键作用^[6,7], Ihh 主要通过 Ihh/PTHrP 信号负反馈轴调控软骨细胞的分化。本实验拟观察氟中毒对大鼠生长板 Ihh、PTHrP mRNA 及蛋白表达的影响, 探讨 Ihh 信号通路在软骨内成骨中的可能作用, 为阐明氟中毒对生长板软骨损伤机制提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

NaF (分析纯, 上海生物工程有限公司), 氯仿、丙异醇 (分析纯, 北京化工厂), RNAiso™ Plus (宝生物工程大连有限公司), PTHrP 蛋白抗体、即用型 SABC 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒 (武汉博士德生物工程有限公司), Real-time PCR 仪 (ABI 7500), 光学显微镜 (OLYMPUS)。

收稿日期: 2012-12-04

基金项目: 国家自然科学基金 (30600509)

作者简介: 潘磊磊 (1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 地方性氟中毒。

通讯作者: 郭晓英, 教授, E-mail: xyguo@mail.cmu.edu.cn。

1.2 实验动物分组及染毒

断乳 1 周雄性 Wistar 大鼠 32 只 (体重 50 ~ 80 g), 由中国医科大学实验动物中心提供 [许可证号: SYXK (辽) 2008—0005]。适应性饲养 1 周后, 按体重随机分为 4 组, 每组 8 只。对照组饮用自来水 (自来水含氟离子 0.118 mg/L), 低氟组、中氟组、高氟组分别饮用含氟离子 50、100、150 mg/L 的自来水, 各组大鼠自由进食普通饲料。动物室温度 18 ~ 23 °C, 相对湿度保持在 45% ~ 55%, 实验周期为 3 个月。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 取材 染毒后乙醚麻醉大鼠后腹主动脉采血, 分离血清, -80 °C 冻存待测。取大鼠左侧胫骨生长板, 迅速放于液氮后 -80 °C 保存, 用于提取 RNA。取大鼠右侧胫骨经 4% 多聚甲醛固定, 用于免疫组化。股骨保存于 -80 °C, 用于骨氟含量测定。

1.3.2 骨氟及血清氟含量测定 骨氟含量采用炉高温燃烧水解法-氟离子选择电极法测定^[8], 血清氟含量采用酸消化扩散法测定^[9]。

1.3.3 Real-time RT-PCR 方法检测大鼠生长板中 Ihh、PTHrP mRNA 表达 取保存于 -80 °C 的大鼠生长板, 研钵研至粉末状, 加入适量 RNAiso™ Plus, 提取生长板中总 RNA, 用 TakaRa 公司 PrimeScript® RT reagent Kit, 按操作步骤进行反转录, Ihh 和 PTHrP 的 Real-time PCR 反应参照 TakaRa 公司 SYBR Premix Ex Taq™ II 说明书进行操作, 引物由上海生工生物工程有限公司合成, 引物序列见表 1。反应条件: 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 95 °C 15 s, 共 40 个循环。反应结束, 根据 Ct 值计算出 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行比较。

表 1 引物序列

基因	引物序列(5'-3')	长度(bp)	复性温度
Ihh	GAGCTCACCCCACTACAA TGACAGAGATGGCCACTGAG	118	57 °C
PTHrP	ATGACAAGGGCAAGTCCATC CGTCTCACCTTGTGGTTT	206	56 °C
GAPDH	GGCAGCTCAAGGCTGAGAATG ATGCTGGTGAAGACGCCAGTA	93	58 °C

1.3.4 免疫组化法检测大鼠生长板中 PTHrP 蛋白表达情况 大鼠胫骨经 4% 多聚甲醛固定, 10% EDTA (pH7.4) 脱钙后, 脱水、石蜡包埋, 制作 5 μm 石蜡切片, 切片经二甲苯脱蜡, 梯度酒精逐级水化, 3% 过氧化氢灭活内源性酶 20 min 后, 5% BSA 封闭 (37 °C 20 min), 一抗 4 °C 过夜, PBS 冲洗 3 次后加生物素化二抗 (37 °C 30 min), DAB 显色, 苏木素复染, 常规酒精脱水, 二甲苯透明, 中型树胶封片观察。

1.4 数据处理

采用 SPSS13.0 统计软件包进行分析。数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 染氟大鼠血清氟和骨氟测定

染氟 3 个月后, 各染氟组大鼠血清氟和骨氟含量随染氟剂量升高而增加, 与对照组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 2。

表 2 各组大鼠血清氟和骨氟含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清氟 (mg/L)	骨氟 (mg/kg)
对照组	8	0.035 ± 0.016	156.668 ± 10.272
染氟 50 mg/L 组	8	0.216 ± 0.082 **	401.366 ± 42.512 **
染氟 100 mg/L 组	8	0.340 ± 0.043 **	1009.420 ± 120.146 **
染氟 150 mg/L 组	8	0.442 ± 0.111 **	2197.906 ± 182.309 **

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

2.2 氟对大鼠生长板 Ihh、PTHrP mRNA 表达的影响

由表 3 可见, 随着染氟剂量的增加, Ihh mRNA 的表达水平呈上升趋势, 其中 150 mg/L 染毒浓度组 Ihh mRNA 的表达水平显著高于对照组 ($P < 0.01$)。PTHrP mRNA 的表达水平也高于对照组, 呈升高趋势, 但差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 3 氟对大鼠生长板 Ihh、PTHrP mRNA 表达的影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Ihh RNA 相对表达含量	PTHrP RNA 相对表达含量
对照组	8	1.32 ± 0.125	1.20 ± 0.090
染氟 50 mg/L 组	8	2.88 ± 0.351	1.53 ± 0.139
染氟 100 mg/L 组	8	3.32 ± 0.257	1.93 ± 0.223
染氟 150 mg/L 组	8	3.88 ± 0.182 *	1.61 ± 0.154

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

2.3 氟对大鼠生长板 PTHrP 蛋白表达的影响

对照组大鼠生长板中, 各层软骨细胞不表达或极弱表达 PTHrP 蛋白 (封三图 1A), 而染氟组大鼠生长板静止层与肥层中可见大量软骨细胞质中 PTHrP 阳性表达, 且随染氟剂量增加表达量呈明显升高趋势 (封三图 1B、C、D)。

3 讨论

Ihh 通过 Ihh/PTHrP 信号负反馈通路调控软骨细胞的增殖、分化。Ihh 由定向前肥大软骨细胞分泌, 通过直接作用于软骨膜上的 Ihh 信号系统成分直接或间接刺激关节面软骨细胞 PTHrP 的分泌, PTHrP 反馈作用表达于非定向前肥大软骨细胞 PTH/PTHrP 受体而延迟其分化并保持其增殖状态, 进而影响前肥大软骨细胞 Ihh 分泌, 形成环路调节^[10]。因此, Ihh/PTHrP 信号途径决定了生长板增殖层软骨细胞柱的长度, 从而调节了骨的纵向生长速率^[11-13]。

本实验采用饮水加氟的方法, 3 个月后成功建立

了氟中毒大鼠模型。通过 Real-time RT-PCR、免疫组化等检测发现氟中毒大鼠软骨组织中 Ihh、PTHrP mRNA 及蛋白表达水平随染氟剂量的升高而增加。以上结果提示氟可能通过刺激大鼠生长板软骨中前肥大细胞 Ihh 的表达升高,进而通过 Ihh/PTHrP 信号负反馈通路使 PTHrP 表达升高,PTHrP 通过保持增殖区软骨细胞的增殖状态并抑制其转变为肥大区软骨细胞而增加柱状软骨区的长度。这与郭雄等研究发现过量氟使大鼠胫骨生长板增厚,增殖层和肥大层软骨细胞堆积病理学结果一致。此外,李广生等研究发现过量氟引起的生长板软骨改变,还包括预备钙化层不能钙化、干骺端血管不能正常侵入所致肥大软骨细胞滞留^[2],这也是过量氟导致生长板增厚的原因。

生长板在长骨生长中扮演重要角色,生长板中软骨细胞只有经过协调有序的增殖、分化和矿化等过程才能保证长骨的正常生长。我们通过实验发现过量氟可通过 Ihh 信号通路影响软骨细胞的增殖和分化,在氟所致的软骨内成骨损伤中 Ihh 信号通路的其它相关因子及是否还有其他信号通路如 BMP、SOX 等参与还需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Bely M, Ferencz G. Experimental osteofluorosis and arthrofluorosis in rats [J]. Clin Rheumatol, 1996, 15: 529-530.
- [2] 李广生, 杨同书, 井玲, 等. 过量氟对软骨的损害 [J]. 中国

地方病防治杂志, 1991, 6: 196-198.

- [3] 许鹏, 郭雄. 过量氟化物摄入对实验大鼠胫骺板软骨细胞分化的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2001, 7 (4): 293-296.
- [4] 戴国钧, 李晶, 张志瑜, 等. 地方性氟中毒病区青少年骨龄延迟及其干预的研究 [J]. 中国地方病学杂志, 1991, 10 (6): 349-351.
- [5] Bitgood M J, McMahon A P. Hedgehog and BMP genes are coexpressed at many diverse sites of cell-cell interaction in the mouse embryo [J]. Dev Biol, 1995, 172: 126-138.
- [6] Olsen B R, Reginato A M, Wang W. Bone development [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000, 16: 191-220.
- [7] Molecular mechanisms of endochondral bone development [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2005, 328 (3): 658-665.
- [8] 张志瑜, 翟城, 钱聪, 等. 高温燃烧水解氟电极法测定骨氟化物水平实验条件的研究 [J]. 中国地方病学杂志, 2006, 5 (4): 450-452.
- [9] 张志瑜, 韩冰, 钱聪. 痕量氟化物快速测定方法建立 [J]. 中国公共卫生, 2011, 27 (2): 255-256.
- [10] Kugimiya F, Tei Y. Regulation of chondrogenesis by PTH/PTHrP signaling [J]. Clin Calcium, 2003, 13: 19-24.
- [11] Karaplis A C. Lethal skeletal dysplasia from targeted disruption of the parathyroid hormone-related peptide gene [J]. Genes Dev, 1994, 8: 277-288.
- [12] Lanske B. PTH/PTHrP receptor in early development and Indian hedgehog-regulated bone growth [J]. Science, 1996, 273: 663-666.
- [13] Weir E C. Targeted overexpression of parathyroid hormone-related peptide in chondrocytes causes chondrodysplasia and delayed endochondral bone formation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1996, 93: 10240-10245.

(上接第 249 页)

本调查各工作场所粉尘最大超限倍数均高于国家职业卫生标准。对接尘剂量与尘肺病发病关系分析表明,累积接尘量与尘肺的发病之间呈高度正相关 ($r=0.93$, $P<0.05$),且随着累积接尘量的增加尘肺患病率有逐渐增加的趋势,相关回归分析方程为 $y=0.07x-3.68$ 。从表 6 结果可见,当累积接尘量达成 100 mg/年时,尘肺发病率迅速增加至 9.04%,而要控制尘肺病发病率在 1% 以下时,累积接尘量应控制在 50 mg/年以下。

建议锡冶炼生产企业要对所使用的原料和辅料中的 SiO_2 含量进行控制,冶炼工在进行投料、出渣、清洁等瞬间粉尘较高浓度作业时,一定要加强抽风除尘和个人防尘用品的使用。

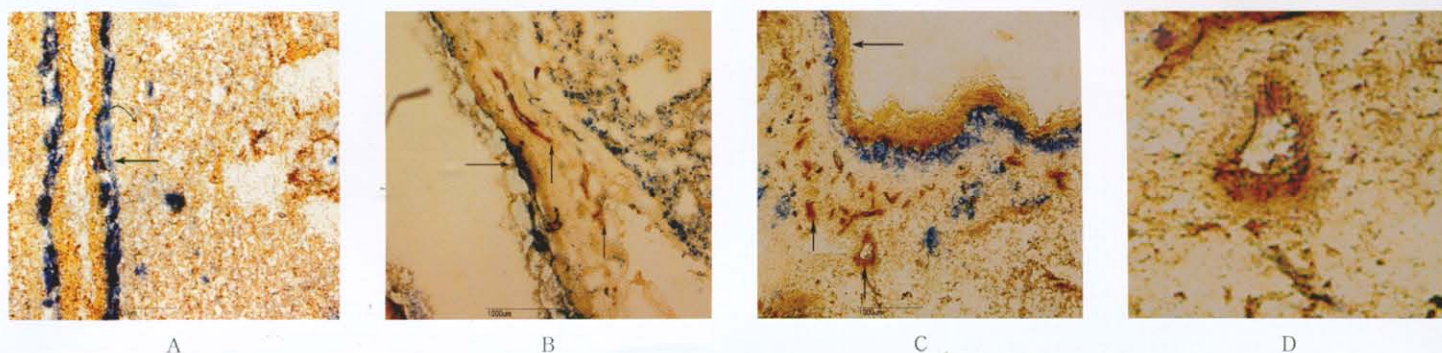
参考文献:

- [1] Dondon C C. Stannic oxide pneumoconiosis [J]. AMJ Roent, 1950, 63: 797.
- [2] 广西省卫生厅砂防组. 锡尘肺 [J]. 人民保健, 1960, 2: 64.
- [3] GB5748—85, 作业场所空气中粉尘测定方法 [J].
- [4] GBZ/T192.1—2007, 工作场所空气中粉尘测定 第 4 部分: 粉尘总尘浓度 [J].
- [5] GBZ/T192.4—2007, 工作场所空气中粉尘测定 第 4 部分: 游

离二氧化硅含量测定 [J].

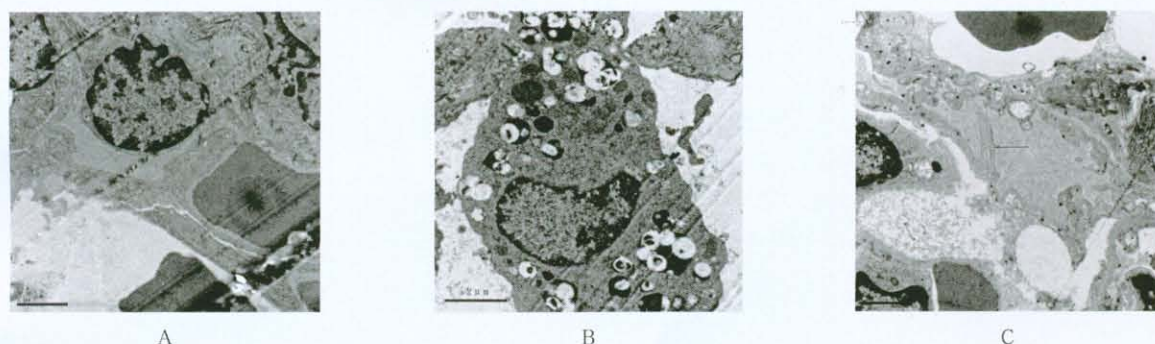
- [6] 曾令民, 杨喜英, 王力珩, 等. X 射线衍射 Rietveld 全谱拟合法测定粉尘中游离的 SiO_2 [J]. 分析化学, 2008, 36 (5): 599-603.
- [7] GBZ/T192.3—2007, 工作场所空气中粉尘测定 第 4 部分: 粉尘分散度 [J].
- [8] 张照寰, 陆培廉, 施寿康. 粉尘接触量与发病关系统计方法 [J]. 中华预防医学杂志, 1984, 18 (1): 7-9.
- [9] 李东红, 龚文武, 李津. 试用队列寿命表法分析尘肺病人的发病情况 [J]. 中国卫生统计, 1999, 16 (5): 282-283.
- [10] 王锐. 锡尘肺 (附 117 例分析) [J]. 工业卫生与职业病, 1994, 20 (6): 338-341.
- [11] 罗学昌, 王剑波, 付强, 等. 云锡冶炼工尘肺发病情况调查 [J]. 工业卫生与职业病, 2000, 26 (3): 164-165.
- [12] 刘敬东, 黄曙海, 李承柱, 等. 高锡低硅粉尘对冶炼工肺部影响及其 X 线动态观察 [J]. 铁道劳动安全卫生与环保, 1990, 66 (4): 15-19.
- [13] 谢汝能. 对尘肺几个问题的看法 [J]. 冶金劳动卫生, 1981, 3: 183-185.
- [14] 叶航生. 锡尘肺二十年动态观察 [J]. 职业医学, 1983, 10 (1): 9-10.
- [15] 葛宪民, 李小萍, 王力珩, 等. 锡末沉着症患者 X 线胸片长期动态观察 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2011, 29 (7): 550-552.
- [16] 钟金球. 肺锡末沉着症 25 年回顾 [J]. 职业与健康, 2001, 17 (4): 9-11.

肺淋巴管增生在矽肺大鼠发病过程中的作用(正文见250~252页)



注：淋巴管呈棕黄色，血管内壁呈棕黄色，外壁呈蓝色；其中A为正常对照组大鼠肺组织，可见外壁被染成蓝色的血管（“—”标记处），未发现淋巴管阳性；B、C分别为模型组14d和28d大鼠肺组织，图中“—”为血管，“↑”为淋巴管；D为模型组28d大鼠肺组织中淋巴管，可见其管壁薄，管腔呈不规则状。

图1 不同处理组的大鼠肺实质区经5'-核苷酸酶-碱性磷酸酶双重染色结果（×200）



注：A为正常对照组大鼠肺组织，可见毛细血管紧贴肺泡壁；B为模型组大鼠肺组织内尘细胞，可见大量溶酶体吞噬异物；C为模型组大鼠肺组织内增生的淋巴管，图中“—”为淋巴管瓣膜。

图2 不同处理组大鼠肺组织透射电子显微镜观察结果（×8000）

氟中毒大鼠生长板Ihh、PTHrP mRNA及蛋白表达的变化（正文见253~255页）

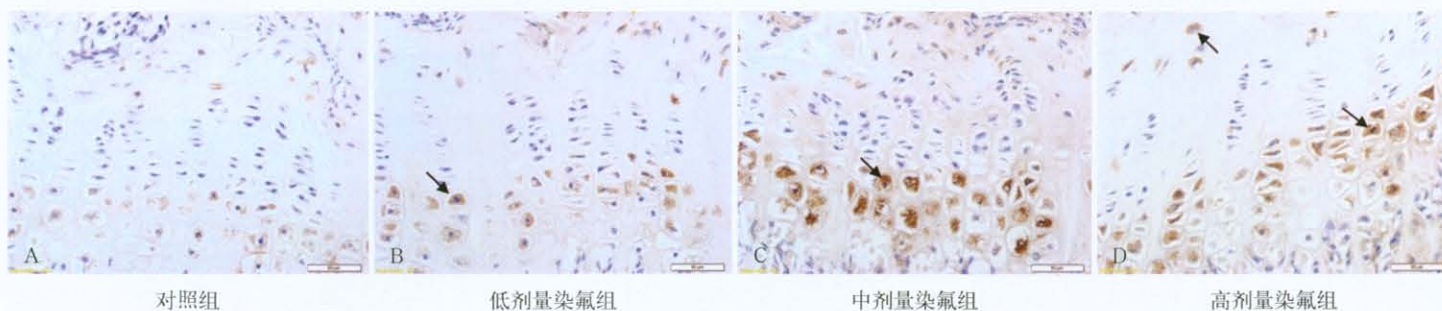


图1 大鼠生长板PTHrP蛋白表达结果（免疫组化，×400）

丙烯酰胺亚慢性染毒大鼠脑组织线粒体形态变化对能量代谢的影响 (正文见275~276页)

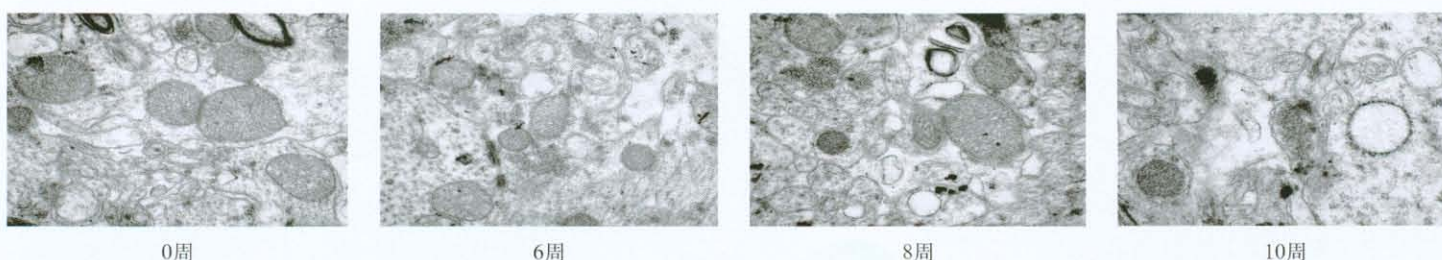


图1 不同时间点大鼠脑组织线粒体超微结构变化（×20.0k）