

亚慢性氟离子饮水染毒对小鼠肾脏毒性作用及肾组织 STIM1 和 ORAI1 表达的影响

吴璇，丁凡，刘盈莹，吴庆

复旦大学,公共卫生学院/公共卫生安全教育部重点实验室,上海 200032

摘要：

[背景] 氟可以通过诱导胞内钙超载导致细胞损伤。钙池操纵性钙内流(SOCE)对于维持胞内钙稳态具有重要作用,但氟对肾组织 SOCE 的影响是未知的。

[目的] 探究氟离子经饮水亚慢性染毒对小鼠的肾脏毒性,以及对肾脏 SOCE 关键蛋白中的基质相互作用分子 1(STIM1)和钙释放激活钙通道调节分子 1(ORAI1)表达的影响。

[方法] 将 20 只雄性 ICR 小鼠随机分为 4 组,每组 5 只: 分别为 0(对照组)、0.3、3 和 30 mg·L⁻¹ 的氟离子染毒组,饮水染毒 12 周。测定染毒后小鼠的体重及肝肾脏器系数; 观察小鼠肾脏的组织病理学改变; 收集小鼠染毒 12 周末的 24 h 尿液,测定尿肌酐(UCr)、尿钙(UCa)、白蛋白(ALB)和 β 2-微球蛋白(β 2-MG)的水平; 使用蛋白质免疫印迹法检测肾脏中 STIM1 和 ORAI1 的蛋白表达水平; 通过 STIM1 和 ORAI1 荧光共定位进一步验证 STIM1 和 ORAI1 的表达水平。

[结果] 氟离子染毒后,各组间小鼠的体重及肝肾脏器系数差异无统计学意义(均 $P > 0.05$)。光镜下,3、30 mg·L⁻¹ 的氟离子组中,小鼠肾脏组织可见肾小管细胞变性、顶端突出、脱落和扩张等; 小鼠尿液指标可见,各组间小鼠 UCr 差异无统计学意义($P > 0.05$); 与对照组相比,3、30 mg·L⁻¹ 氟离子组中 UCr 校正后的 UCa 水平分别为(0.075 ± 0.014)、(0.081 ± 0.012) mol·mol⁻¹(以每摩尔 UCr 表示),虽略有升高趋势,但差异无统计学意义; ALB 水平在各组间差异也无统计学意义($P > 0.05$); 不同染毒组 β 2-MG 水平有差异,30 mg·L⁻¹ 氟离子组的 β 2-MG 水平为(0.077 ± 0.014) g·mol⁻¹,较对照组升高($P < 0.05$); 蛋白质免疫印迹法结果显示,各组间 STIM1 和 ORAI1 水平差异均具有统计学意义($F=18.411$ 、 6.853 , $P=0.001$ 、 0.013); 与对照组相比,3、30 mg·L⁻¹ 氟离子组中 STIM1 蛋白表达水平升高($P < 0.05$),30 mg·L⁻¹ 氟离子组 ORAI1 蛋白表达水平升高($P < 0.05$); STIM1 和 ORAI1 荧光共定位可见,3、30 mg·L⁻¹ 氟离子组 STIM1 和 ORAI1 的表达上调。

[结论] 氟离子经饮水亚慢性染毒可以上调肾组织 STIM1 和 ORAI1 表达水平,诱导肾损伤。

关键词： 氟；亚慢性染毒；肾毒性；钙池操纵性钙内流；基质相互作用分子 1；钙释放激活钙通道调节分子 1

Effects of subchronic fluoride exposure through drinking water on renal toxicity and the expressions of STIM1 and ORAI1 in renal tissues in mice WU Xuan, DING Fan, LIU Yingying, WU Qing (School of Public Health/Key Laboratory of Public Health Safety of Ministry of Education, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract:

[Background] It has been found that fluoride may cause cell damage by inducing intracellular calcium overload. Store-operated calcium entry (SOCE) plays an important role in maintaining intracellular calcium homeostasis, but the effect of fluoride on renal SOCE is unknown.

[Objective] To explore the renal toxicity and the expression levels of the key proteins of SOCE, stromal interaction molecule 1 (STIM1) and calcium release-activated calcium modulator 1 (ORAI1) in the kidney tissues of mice exposed to fluoride subchronically.

[Methods] Twenty male ICR mice were randomly divided into four groups with five mice in each group, including 0 (control group), 0.3, 3, and 30 mg·L⁻¹ fluoride groups. The mice were given drinking water containing designed fluoride for 12 weeks. Body weight and liver and kidney



DOI 10.11836/JEOM21430

基金项目

中国科学院中国-斯里兰卡联合科教中心资助项目(无编号)

作者简介

吴璇(1995—),女,硕士生;
E-mail: 19211020031@fudan.edu.cn

通信作者

吴庆, E-mail: qingwu@fudan.edu.cn

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-09-12

录用日期 2022-03-15

文章编号 2095-9982(2022)05-0493-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

▶ 引用

吴璇,丁凡,刘盈莹,等.亚慢性氟离子饮水染毒对小鼠肾脏毒性作用及肾组织 STIM1 和 ORAI1 表达的影响[J].环境与职业医学,2022,39(5): 493-498.

▶ 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21430

Funding

This study was funded.

Correspondence to

WU Qing, E-mail: qingwu@fudan.edu.cn

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2021-09-12

Accepted 2022-03-15

▶ To cite

WU Xuan, DING Fan, LIU Yingying, et al. Effects of subchronic fluoride exposure through drinking water on renal toxicity and the expressions of STIM1 and ORAI1 in renal tissues in mice[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(5): 493-498.

▶ Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21430

organ coefficients of the mice were measured after the exposure; histopathological changes of the mouse kidney were observed; 24 h urine was collected at the end of 12 weeks of exposure to determine the levels of urine creatinine (UCr), urine calcium (UCa), albumin (ALB), and β 2-microglobulin (β 2-MG); the protein expression levels of STIM1 and ORAI1 in the kidney were detected by Western blotting; the fluorescence co-localization of STIM1 and ORAI1 was used to further verify the expression levels of STIM1 and ORAI1.

[Results] After the exposure, there were no differences in body weight as well as liver and kidney organ coefficients among the groups ($P > 0.05$). Under optical microscope, the renal tubular cell showed degeneration, apical protrusion, shedding, and dilation in the 3 and 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ fluoride groups. There was no statistical difference in UCr among the mice in each group ($P > 0.05$). Compared with the control group, the levels of UCa adjusted by UCr in the 3 and 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ fluoride groups were (0.075 ± 0.014) and (0.081 ± 0.012) $\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ (represent by UCr per mol), which had a rising trend but showed no statistical difference. No difference was identified in the level of ALB among the groups ($P > 0.05$). The levels of β 2-MG showed difference in different exposure groups, and the level of urine β 2-MG in the 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ fluoride group was (0.077 ± 0.014) $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, higher than that in the control group ($P < 0.05$). Based on the results of Western blotting, the protein expression levels of STIM1 and ORAI1 showed significant differences among the groups ($F=18.411, 6.853; P=0.001, 0.013$); compared with the control group, the expression levels of STIM1 protein increased in the 3 and 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ fluoride groups ($P < 0.05$), and the protein expression level of ORAI1 in the 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ fluoride group was increased ($P < 0.05$). The fluorescence co-localization results of STIM1 and ORAI1 showed that the expressions of STIM1 and ORAI1 were up-regulated in the 3 and 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ fluoride groups.

[Conclusion] Subchronic exposure to fluoride through drinking water can up-regulate the expression levels of STIM1 and ORAI1 in renal tissues and induce renal injury.

Keywords: fluoride; subchronic exposure; nephrotoxicity; store-operated calcium entry; stromal interaction molecule 1; calcium release-activated calcium modulator 1

氟(fluoride)广泛分布于自然界,是人体必需微量元素之一,对人体正常的生理代谢具有重要作用,而过量摄入氟会导致人体全身性的病理改变,主要引起包括氟斑牙、氟骨症在内的地方性氟中毒,也可以引起脑^[1]、肝脏和肾脏^[2]等在内的非骨组织器官的损伤。我国GB5749—2006《生活饮用水卫生标准》规定的生活饮用水中氟化物限值为1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,然而我国北方地区地下水高氟现象十分普遍,如大同盆地和贵德盆地水氟平均值高于2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,最高可达10.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[3]。

近年来,我国慢性肾病的疾病负担不断增长。慢性肾病因起病隐匿且进展缓慢常发展为终末期肾脏病。除去糖尿病、高血压、肾小球肾炎及阻塞性肾病等明确病因以外,环境因素对肾脏的影响同样值得关注。肾脏是过量氟排泄的重要器官。流行病学研究显示,氟化物暴露与肾功能下降存在相关关系^[2];动物实验表明,过量摄入氟化物可以引起肾脏结构紊乱,肾小管上皮细胞空泡变性^[4],炎症细胞浸润等改变^[5],但其分子机制仍有待研究。

过量摄入氟化物可以干扰人体钙的正常代谢^[6]并导致胞内钙超载^[7],进而引发细胞死亡而加重损伤,提示钙超载可能在氟化物致细胞损伤的过程中起重要作用。钙池操纵性钙内流(store-operated calcium entry, SOCE)的激活是引起细胞钙超载的关键^[8],其中基质相互作用分子1(stromal interaction molecule 1, STIM1)和钙释放激活钙通道调节分子1(calcium release-activated

calcium modulator 1, ORAI1)是SOCE中的关键蛋白。当细胞膜上的受体激活后,激活磷脂酶C(phospholipase C, PLC)水解磷脂酰肌醇-4,5二磷酸[phosphatidylinositol(4,5) bisphosphate, PIP2]释放甘油二酯(diacylglycerol, DAG)和三磷酸肌醇(inositol-1,4,5-triphosphate, IP3),IP3与内质网上的三磷酸肌醇受体(inositol 1,4,5-triphosphate receptor, IP3R)结合后,引起内质网钙库释放。当STIM1检测到内质网钙库排空,STIM1将发生构象变化并移动至细胞膜与钙通道蛋白ORAI1相互作用而触发钙内流。SOCE参与调控机体多种正常生理活动,同时参与多种疾病的病理过程。以往研究发现,六价铬可以通过激活SOCE诱导肝细胞内钙超载进而引起细胞凋亡而促进肝细胞损伤^[9];STIM1的过表达可以促进直肠癌的进展及转移等^[10]。但过量氟暴露是否可以异常激活肾脏细胞SOCE仍然未知。

本研究拟建立氟离子经饮水亚慢性染毒模型,且染毒剂量包含环境可接触剂量,以观察氟离子暴露下,肾脏组织结构功能的变化及SOCE关键蛋白STIM1和ORAI1的表达,探讨氟染毒是否干扰小鼠肾脏组织的正常结构功能,是否改变SOCE关键蛋白STIM1和ORAI1的表达,为进一步研究氟的肾脏毒性及其可能机制提供新思路。

1 对象与方法

1.1 试剂及器材

1.1.1 主要试剂 氟化钠(AccuStandard,美国),STIM1

蛋白抗体(CST, 美国), ORAI1 蛋白抗体(Sigma-Aldrich, 美国), 白蛋白(albumin, ALB)和 β 2-微球蛋白(β 2-microglobulin, β 2-MG)试剂盒(武汉华美生物工程有限公司, 中国), 肌酐(creatinine, Cr)试剂盒和钙(Ca)测试盒(南京建成生物工程研究所, 中国)。

1.1.2 主要器材 CS-6 台式离心机(Beckman, 美国), 精密电子分析天平(Eppendorf, 德国), 倒置荧光显微镜(尼康, 日本), 透射电子显微镜(FEI, 美国), 蛋白成像系统(Syngene, 英国), 电泳仪、电泳槽、转膜槽(BioRad, 美国), PVDF 膜(Millipore, 美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物培养及染毒 6~8 周雄性 SPF 级 ICR 小鼠 20 只, 购买于上海斯莱克实验动物有限责任公司 [SCXK(沪)2017-0005]。动物房通风、卫生条件良好, 室温为 (23 ± 2) °C, 相对湿度为 40%~60%(质量分数), 维持 12 h 明暗周期, 小鼠自由进食、水。由于我国 GB5749—2006《生活饮用水卫生标准》规定的生活饮用水中氟化物限值为 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 结合本课题组前期关于水氟超标地区水氟浓度的研究调查, 本实验设置染毒质量浓度(后称浓度)为 0.3、3、30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 共 3 个氟离子染毒组。小鼠适应 1 周后, 随机分为 4 组, 1 个对照组给予蒸馏水, 3 个染毒组的饮用水使用氟化钠、蒸馏水配制成相应浓度染毒液, 以氟离子计, 分别为 0.3、3、30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氟离子, 采用自由饮水方式染毒 12 周。本次动物实验过程均符合复旦大学动物伦理规范, 并获得复旦大学伦理委员会批准(批准号: 2020 公卫 JS-007)。

1.2.2 脏器系数计算 小鼠染毒 12 周, 称重后处死, 剥离肝脏及肾脏。使用滤纸吸干组织后电子天平称重, 并记录组织湿重(g)。计算肝脏脏器系数(%)及肾脏脏器系数(%) (质量分数)。

1.2.3 病理学观察 取每组小鼠的部分肾脏组织固定在 4%(体积分数)中性甲醛中 24 h。组织固定后分别使用 75%、85%、90%、95%(体积分数)、无水乙醇的梯度乙醇和二甲苯脱水。将脱水后的组织放入包埋框中融化的石蜡内, -20 °C 促凝。将蜡块修整后即置于石蜡切片机, 切片。石蜡切片依次置于二甲苯、无水乙醇及 95%、90%、80%、70%(体积分数)的梯度乙醇中脱蜡, 蒸馏水冲洗 5 min 后依次放入苏木素、伊红染液中, 脱水封片。显微镜镜检并采集图像分析。

1.2.4 UCr、UCa、ALB 和 β 2-MG 水平测定 染毒 12 周, 结束前收集每组 24 h 尿液。经 $1000\times g$, 4 °C 离心 15 min, 收集上清并分装, 置于 -80 °C 冰箱保存。根据 Cr、Ca 测定试剂盒及 ELISA 试剂盒的说明书, 分别检测每组

每只小鼠的 UCr、UCa、ALB 和 β 2-MG 水平。UCa、ALB 和 β 2-MG 的测定值经 UCr 校正。

1.2.5 STIM1 和 ORAI1 蛋白表达测定 采用蛋白质免疫印迹法(Western blotting, WB)检测, 取各组小鼠 50 mg 肾皮质部分, 提取总蛋白。经制胶、加样、电泳、转膜、封闭、一抗孵育、洗膜、二抗孵育、洗膜和显影, 使用蛋白成像系统曝光条带, 并计算条带的灰度值, 根据内参灰度值计算目的蛋白的相对表达量。

1.2.6 STIM1 和 ORAI1 荧光共定位 取石蜡切片, 依次将石蜡切片放入二甲苯、无水乙醇及 85%、75%(体积分数)梯度乙醇脱蜡, 蒸馏水冲洗 5 min。将组织切片进行抗原修复后加一抗 4 °C 孵育过夜。洗涤、孵育二抗、洗涤、DAPI 复染细胞核后封片。使用倒置荧光显微镜采集图像并分析。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行数据分析。计量资料经过正态性检验后符合正态分布, 数据以均数 \pm 标准差呈现; 多组间比较使用单因素方差分析, 两两比较使用 LSD 检验。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠体重及肝肾脏器系数

单因素方差分析结果显示, 染毒 12 周后, 各组间小鼠体重、肝脏和肾脏脏器系数差异均没有统计学意义(均 $P > 0.05$)。见表 1。

表 1 亚慢性氟染毒 12 周后小鼠体重及肝肾脏器系数
($\bar{x} \pm s, n = 5$)

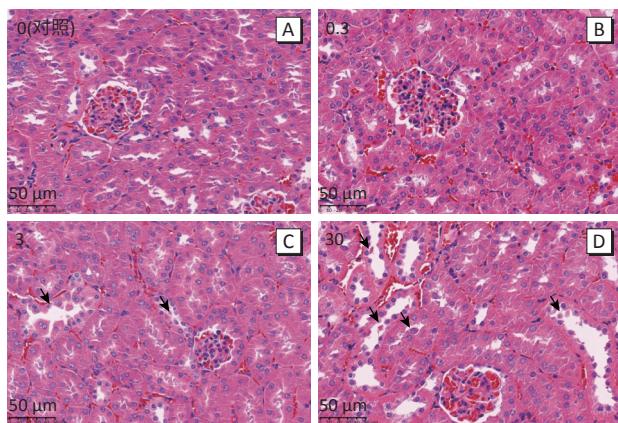
Table 1 Body weight and liver and kidney organ coefficients of mice after subchronic fluoride exposure for 12 weeks
($\bar{x} \pm s, n = 5$)

浓度组别(Dose group)/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	体重(Body weight)/g	肝脏系数(Liver coefficient)/%	肾脏系数(Kidney coefficient)/%
0	48.12 ± 6.08	4.42 ± 0.26	0.79 ± 0.09
0.3	44.68 ± 3.74	4.24 ± 0.51	0.72 ± 0.06
3	47.22 ± 3.79	4.22 ± 0.09	0.70 ± 0.07
30	45.76 ± 1.36	4.42 ± 0.29	0.80 ± 0.07
F	0.694	0.579	2.382
P	0.569	0.637	0.108

2.2 小鼠肾脏组织病理学观察结果

HE 染色可见, 对照组肾小管结构完整, 细胞排列

整齐,形态规则。 $0.3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟离子组未见明显损伤; $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟离子组可见肾小管上皮细胞扩张、脱落等; $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟离子组可见较为明显的肾小管上皮细胞变性、顶端突出、扩张、脱落等现象,肾小球未见明显损伤。见图1。



[注] A: 对照组; B、C、D 分别为 0.3 、 3 、 $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟离子组。黑色箭头表示肾小管细胞变性、顶端突出、脱落和扩张。

[Note] A: Control group; B, C, and D: 0.3 , 3 , and $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ fluoride groups. Black arrows indicate renal tubular cell degeneration, apical protrusion, shedding, and dilation.

图1 亚慢性氟染毒 12 周后小鼠肾脏组织病理学观察结果
(HE 染色)

Figure 1 Histopathological observation results of mouse kidney after subchronic fluoride exposure for 12 weeks (HE staining)

2.3 小鼠尿液中 UCr、UCa、ALB 和 β2-MG 水平

单因素方差分析结果显示,各组间小鼠 UCr 水平差异无统计学意义($P > 0.05$);与对照组相比, 3 、 $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟离子组中 UCa 水平有升高趋势,但差异尚无统计学意义;尿 ALB 水平差异在各组间无统计学意义($P > 0.05$); $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟离子组的 β2-MG 水平高于对照组($P < 0.05$)。见表2。

2.4 小鼠肾脏中 STIM1 和 ORAI1 的蛋白表达水平

单因素方差分析显示,各组间 STIM1 和 ORAI1 表达水平差异均具有统计学意义($F=18.411$ 、 6.853 , $P=0.001$ 、 0.013)。与对照组相比, 3 、 $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟离子组中 STIM1 蛋白表达水平升高($P < 0.05$), $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟离子组 ORAI1 蛋白表达水平升高($P < 0.05$)。见图2。

2.5 小鼠肾脏中 STIM1 和 ORAI1 的双荧光定位

通过小鼠肾脏中 STIM1 和 ORAI1 的双荧光定位可以发现,与对照组相比, 3 、 $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟离子组上调了 STIM1 和 ORAI1 的表达, $30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟离子组最为明显。见图3。

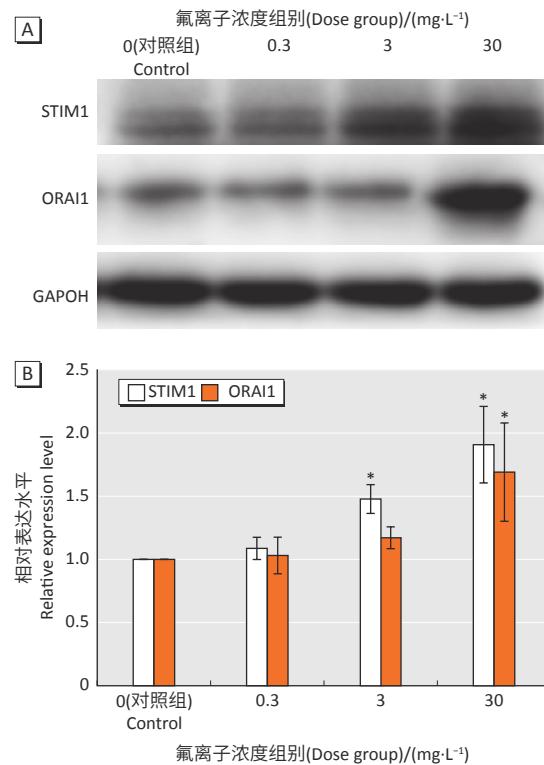
表2 亚慢性氟染毒 12 周后小鼠尿液中 UCr、UCa、ALB 和 β2-MG 水平($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 2 The levels of UCr, UCa, ALB, and β2-MG in urine of mice after subchronic fluoride exposure for 12 weeks ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

浓度组别(Dose group)/(mg·L ⁻¹)	UCr/(μmol·L ⁻¹)	UCr校正后(UCr-adjusted)		
		UCa/(mol·mol ⁻¹)	ALB/(g·mol ⁻¹)	β2-MG/(g·mol ⁻¹)
0(对照)(Control)	27297.310 ± 6056.177	0.059 ± 0.008	3.638 ± 0.781	0.052 ± 0.012
0.3	32700.379 ± 11181.906	0.064 ± 0.024	2.743 ± 0.811	0.048 ± 0.022
3	25209.241 ± 4661.611	0.075 ± 0.014	3.572 ± 1.024	0.058 ± 0.011
30	24001.362 ± 8199.276	0.081 ± 0.012	3.588 ± 1.348	$0.077 \pm 0.014^*$
F		1.181	2.042	0.891
P		0.348	0.148	0.467
				0.040

[注]*: 与对照组相比, $P < 0.05$ 。

[Note] *: Compared with the control group, $P < 0.05$.

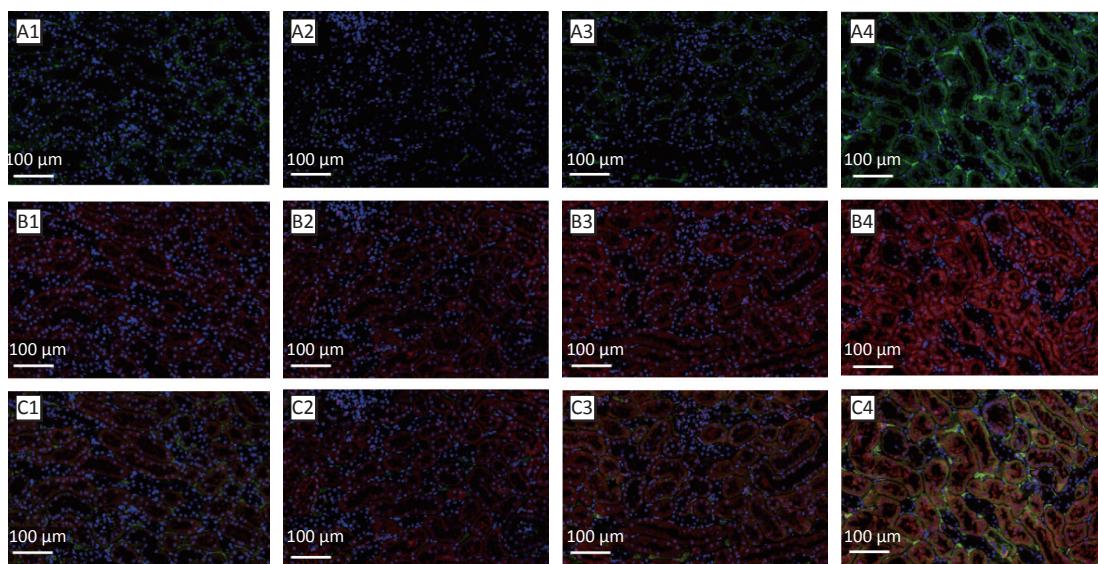


[注] A: STIM1 和 ORAI1 蛋白电泳图; B: STIM1 和 ORAI1 蛋白表达水平; *: 与对照组相比, $P < 0.05$ 。

[Note] A: The electrophoresis diagram of STIM1 and ORAI1 proteins; B: The expression levels of STIM1 and ORAI1 proteins; *: Compared with the control group, $P < 0.05$.

图2 亚慢性氟染毒 12 周后小鼠肾脏中 STIM1 和 ORAI1 的蛋白表达水平($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Figure 2 The protein expression levels of STIM1 and ORAI1 in mouse kidney after subchronic fluoride exposure for 12 weeks ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



[注] A: STIM1, 绿色荧光; B: ORAI1, 红色荧光; C: STIM1 和 ORAI1 的共定位, 黄色荧光; 1、2、3、4 分别表示 0(对照)、0.3、3、30 mg·L⁻¹ 氟离子组。

[Note] A: STIM1, green fluorescence; B: ORAI1, red fluorescence; C: Co-localization of STIM1 and ORAI1, yellow fluorescence; 1, 2, 3, and 4 represent 0 (control), 0.3, 3, and 30 mg·L⁻¹ fluoride groups respectively.

图3 亚慢性氟染毒 12 周后小鼠肾脏中 STIM1 和 ORAI1 的双荧光定位

Figure 3 Fluorescence co-localization of STIM1 and ORAI1 in mouse kidney after subchronic fluoride exposure for 12 weeks

3 讨论

本研究通过模拟经饮水的氟暴露途径,建立了氟离子经饮水亚慢性染毒模型,以探究氟离子亚慢性染毒对小鼠的肾脏损伤。研究发现,3、30 mg·L⁻¹ 氟离子组小鼠可见肾小管损伤,SOCE 关键蛋白中的 STIM1 和 ORAI1 表达上调。

目前,我国仍存在地下水氟超标的现状。根据调查结果显示,我国黄土高原浅层地下水氟浓度为 0.12~13.30 mg·L⁻¹,深层地下水氟浓度为 0.30~3.00 mg·L⁻¹,高达 73.1% 的浅层地下水和 22.2% 的深层地下水氟超过 1.5 mg·L⁻¹^[11]。我国 GB5749—2006《生活饮用水卫生标准》规定的生活饮用水中氟化物限值为 1.0 mg·L⁻¹,本实验设置氟离子的染毒浓度分别为 0.3、3、30 mg·L⁻¹,其中 0.3 mg·L⁻¹ 符合我国生活饮用水卫生标准,3 mg·L⁻¹ 超过我国生活饮用水卫生标准但仍是环境中可接触的浓度,30 mg·L⁻¹ 是按照 10 倍递增设置的染毒浓度。

染毒 12 周后,各浓度组小鼠体重稳定,肝肾脏系数未观察到明显改变。HE 染色结果提示,3、30 mg·L⁻¹ 氟离子组均出现不同程度的肾小管损伤,尤其是 30 mg·L⁻¹ 氟离子组,提示氟离子经饮水亚慢性染毒可以诱导小鼠肾脏损伤。小鼠尿指标可见,各组小鼠 UCr、UCa 水平没有明显改变; 30 mg·L⁻¹ 氟离子组中尿 β2-MG 升高。本研究中各尿液指标均用 UCr 进行校正。UCa 水平随着染毒浓度有一定升高趋势,可能是由于氟具有较强的亲骨性,过量摄入氟化物可以干扰体内钙的代谢,导致 UCa 有一定升高趋势^[12],但是各组间差异尚无统计

学意义。尿 ALB 是肾小球损伤诊断的生物标志^[13],本研究中各组尿 ALB 没有明显变化,与 HE 结果一致。β2-MG 主要在肾小管进行重吸收,当肾小管轻微损伤时,即可观察到尿 β2-MG 明显增加^[14],实验结果表明氟离子经饮水亚慢性染毒可以诱导小鼠肾小管损伤。

WB 检测小鼠肾皮质部分 STIM1 和 ORAI1 的蛋白表达水平,3 mg·L⁻¹ 氟离子组 STIM1 表达高于对照组,30 mg·L⁻¹ 氟离子组 STIM1 和 ORAI1 表达上调; 同时 STIM1 和 ORAI1 荧光共定位结果提示,3、30 mg·L⁻¹ 氟离子组中 STIM1 和 ORAI1 的蛋白表达上调,与 WB 结果一致。以往研究表明,过量摄入氟化物可以导致细胞内钙超载^[15],钙超载与多种结局相关,如凋亡^[16]、炎症^[17]、焦亡^[18]等,提示钙超载可能在氟化物致细胞损伤过程中起重要作用。SOCE 是维持细胞内钙稳态的关键,由内质网上的 STIM1 蛋白和质膜上 ORAI1 钙离子通道共同介导,Waldron 等^[19]的研究发现,选择性抑制 ORAI1,可以缓解胰腺炎模型小鼠胰腺泡细胞的钙超载,降低急性胰腺炎小鼠的炎症反应和细胞死亡,而其表达异常升高则会引发 SOCE,导致细胞内的钙超载。在本研究中,氟离子经饮水亚慢性染毒导致肾脏 STIM1 和 ORAI1 蛋白表达水平较对照组升高,提示 SOCE 的异常激活和细胞内钙超载的发生。

在本研究的条件下,0.3 mg·L⁻¹ 氟离子组的各指标与对照组相比没有明显差异; 30 mg·L⁻¹ 氟离子组的 HE 染色可见肾小管损伤,肾小管损伤指标 β2-MG 升高,SOCE 关键蛋白中的 STIM1 和 ORAI1 的蛋白表达

水平升高; $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 氟离子浓度作为可接触的环境超标浓度, 在本研究中虽然没有改变肾功能指标, 但 HE 染色可见肾小管结构的改变, STIM1 和 ORAI1 的蛋白表达水平升高, 即 $3 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的氟离子可以损伤肾脏, 提示地下水高氟地区应推进降氟改水等措施。本研究仅包含染毒 12 周时的数据, 且尚缺乏氟离子引起 STIM1 和 ORAI1 表达上调的上下游机制探讨, 仍需进一步研究。

综上所述, 氟离子经饮水亚慢性染毒可以导致小鼠肾小管细胞损伤, 导致肾组织中 STIM1 和 ORAI1 蛋白表达上调。

参考文献

- [1] DEC K, ŁUKOMSKA A, SKONIECZNA-ŻYDECKA K, et al. Long-term exposure to fluoride as a factor promoting changes in the expression and activity of cyclooxygenases (COX1 and COX2) in various rat brain structures[J]. *Neurotoxicology*, 2019, 74: 81-90.
- [2] MALIN AJ, LESSEUR C, BUSGANG SA, et al. Fluoride exposure and kidney and liver function among adolescents in the United States: NHANES, 2013-2016[J]. *Environ Int*, 2019, 132: 105012.
- [3] FENG F, JIA Y, YANG Y, et al. Hydrogeochemical and statistical analysis of high fluoride groundwater in northern China[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2020, 27(28): 34840-34861.
- [4] LUO Q, CUI H, DENG H, et al. Histopathological findings of renal tissue induced by oxidative stress due to different concentrations of fluoride[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(31): 50430-50446.
- [5] KIDO T, TSUNODA M, SUGAYA C, et al. Fluoride potentiates tubulointerstitial nephropathy caused by unilateral ureteral obstruction[J]. *Toxicology*, 2017, 392: 106-118.
- [6] BA Y, ZHU JY, YANG YJ, et al. Serum calcitonin levels, and dental fluorosis in children exposed to different concentrations of fluoride and iodine in drinking water[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2010, 123(6): 675-679.
- [7] YU Q, SHAO D, ZHANG R, et al. Effects of drinking water fluorosis on L-type calcium channel of hippocampal neurons in mice[J]. *Chemosphere*, 2019, 220: 169-175.
- [8] LOPEZ J J, JARDIN I, ALBARRÁN L, et al. Molecular basis and regulation of store-operated calcium entry[M]//ISLAM S. Calcium Signaling. Cham: Springer, 2020: 445-469.
- [9] LIANG Q, ZHANG Y, ZENG M, et al. The role of IP3 R-SOCCs in Cr(vi)-induced cytosolic Ca^{2+} overload and apoptosis in L-02 hepatocytes[J]. *Toxicol Res (Camb)*, 2018, 7(3): 521-528.
- [10] WANG JY, SUN J, HUANG MY, et al. STIM1 overexpression promotes colorectal cancer progression, cell motility and COX-2 expression[J]. *Oncogene*, 2015, 34(33): 4358-4367.
- [11] SU H, KANG W, LI Y, et al. Fluoride and nitrate contamination of groundwater in the Loess Plateau, China: sources and related human health risks[J]. *Environ Pollut*, 2021, 286: 117287.
- [12] SANTOYO-SANCHEZ MP, DEL CARMEN SILVA-LUCERO M, ARREOLA-MENDOZA L, et al. Effects of acute sodium fluoride exposure on kidney function, water homeostasis, and renal handling of calcium and inorganic phosphate[J]. *Biol Trace Elem Res*, 2013, 152(3): 367-372.
- [13] BUSER MC, INGBER SZ, RAINES N, et al. Urinary and blood cadmium and lead and kidney function: NHANES 2007-2012[J]. *Int J Hyg Environ Health*, 2016, 219(3): 261-267.
- [14] SHIN J R, KIM S M, YOO J S, et al. Urinary excretion of β_2 -microglobulin as a prognostic marker in immunoglobulin A nephropathy[J]. *Korean J Intern Med*, 2014, 29(3): 334-340.
- [15] DHARMARATNE R W. Exploring the role of excess fluoride in chronic kidney disease: a review[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2019, 38(3): 269-279.
- [16] HE F, WU Q, XU B, et al. Suppression of Stim1 reduced intracellular calcium concentration and attenuated hypoxia/reoxygenation induced apoptosis in H9 C2 cells[J]. *Biosci Rep*, 2017, 37(6): BSR20171249.
- [17] ZHU ZD, YU T, LIU HJ, et al. SOCE induced calcium overload regulates autophagy in acute pancreatitis via calcineurin activation[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2): 50.
- [18] WANG M, WANG R, SUN H, et al. Ginsenoside Rb1 ameliorates cardiotoxicity triggered by aconitine via inhibiting calcium overload and pyroptosis[J]. *Phytomedicine*, 2021, 83: 153468.
- [19] WALDRON RT, CHEN Y, PHAM H, et al. The Orai Ca^{2+} channel inhibitor CM4620 targets both parenchymal and immune cells to reduce inflammation in experimental acute pancreatitis[J]. *J Physiol*, 2019, 597(12): 3085-3105.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 丁瑾瑜)

(上接第 492 页)

- [19] LEE MS, HANG JQ, ZHANG FY, et al. Household solid fuel use and pulmonary function in an urban population in Shanghai, China[J]. *Occup Environ Med*, 2013, 70(2): 120-125.
- [20] 王广雷. 颗粒物暴露致肺部炎性反应及细胞器功能紊乱的机制研究[D]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2019.
- WANG G L. The mechanisms of pulmonary inflammatory response and organelle dysfunction induced by particulate matter exposure[D]. Beijing: Chinese Center for Disease Control and Prevention, 2019.
- [21] ZHOU YM, ZOU YM, LI XC, et al. Lung function and incidence of chronic obstructive pulmonary disease after improved cooking fuels and kitchen ventilation: a 9-year prospective cohort study[J]. *PLoS Med*, 2014, 11(3): e1001621.
- [22] PÉREZ-PADILLA R, REGALADO J, VEDAL S, et al. Exposure to biomass smoke and chronic airway disease in Mexican women. A case-control study[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1996, 154(3 Pt 1): 701-706.
- [23] 李宜珊, 牛雅倩, 康睿男, 等. 不同海拔高度居住人群肺功能的对比研究[J]. 西北国防医学杂志, 2018, 39(3): 145-147.
- LI YS, NIU YQ, KANG RN, et al. Comparative study of pulmonary function among residents at different altitudes[J]. *Med J Natl Defend Forces Northwest China*, 2018, 39(3): 145-147.
- [24] 胡明冬, 李琦, 贺斌峰, 等. 高原不同海拔暴露对肺通气功能及代偿能力的影响[J]. 中华肺部疾病杂志(电子版), 2017, 10(1): 10-14.
- HU M D, LI Q, HE B F, et al. Study on pulmonary ventilation function and its compensation in different high altitude[J]. *Chin J Lung Dis(Electronic Edition)*, 2017, 10(1): 10-14.
- [25] 耿冠楠, 肖清扬, 薛涛, 等. 中国大气成分近实时追踪数据集 [EB/OL]. [2021-06-25]. <http://tapdata.org.cn>.
- GENG G N, XIAO Q Y, XUE T, et al. Tracking Air Pollution in China [EB/OL]. [2021-06-25]. <http://tapdata.org.cn>.
- [26] PERALTA G P, MARCON A, CARSON A E, et al. Body mass index and weight change are associated with adult lung function trajectories: the prospective ECRHS study[J]. *Thorax*, 2020, 75(4): 313-320.
- [27] MIRABELLI M C, PREISSER J S, LOEHR L R, et al. Lung function decline over 25 years of follow-up among black and white adults in the ARIC study cohort[J]. *Respir Med*, 2016, 113: 57-64.
- [28] RAJ T J B. Altered lung function test in asymptomatic women using biomass fuel for cooking[J]. *J Clin Diagn Res*, 2014, 8(10): BC01-BC03.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 丁瑾瑜)