

氟化钠饮水染毒6个月对大鼠骨组织成骨活性标志的影响

代佑罡, 陈宣好, 杨璐琿, 张华, 韦艳

贵州医科大学公共卫生学院, 环境污染与疾病监控省部共建教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550004

摘要:

[背景] 氟中毒是由于长期从空气、食物和饮水中摄入过量的氟而引起的以氟骨症和氟斑牙为主要特征的一种慢性全身性疾病。地方性氟中毒在全国分布广泛且严重, 受威胁人口众多。研究氟中毒相关机制有助于预防和治疗因摄氟过多而造成的氟骨症、氟斑牙等骨相病变。

[目的] 探讨不同浓度氟化钠染毒对大鼠成骨活性标志的影响, 为研究氟中毒机制提供实验数据。

[方法] 将32只SD大鼠按体重均衡随机均分为: 对照组(0 mg/L)、低氟组(50 mg/L)、中氟组(150 mg/L)、高氟组(250 mg/L)。采取饮水染毒方式, 染氟至6个月时分别收集各组大鼠12 h尿液, 测定尿氟浓度; 大鼠经10%水合氯醛麻醉, 心脏采血处死后, 测定血氟浓度; 取左前肢, 液氮研磨, 采用实时荧光PCR法测定 *Col I*、*Runx2* 和 *Osx* mRNA 表达水平; 取右前肢, 液氮研磨, 采用 Western blot 检测 *Col I*、*Runx2* 和 *Osx* 的蛋白表达水平。

[结果] 染毒期间, 大鼠饮食、饮水正常, 精神状况良好, 不同染毒组与对照组相比体重差异均无统计学意义。染氟6个月后, 低、中、高染氟组大鼠尿氟含量 [(9.71±2.33)、(20.36±4.92)、(42.36±4.56) mg/kg] 均高于对照组 [(5.69±1.59) mg/kg], 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 低、中、高染氟组大鼠血氟含量 [(0.19±0.01)、(0.23±0.01)、(0.29±0.02) mg/L] 均高于对照组 [(0.14±0.01) mg/L], 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 且随着染氟剂量的增加, 尿氟和血氟都呈上升趋势 (分别 $r=0.89$ 、 0.90 , 均 $P<0.01$)。染氟6个月后, 低、中、高染氟组大鼠 *Col I* mRNA 表达 [分别为 (0.91±0.28)、(0.87±0.33)、(0.67±0.31)] 均低于对照组 (1.31±0.43), 低、中、高染氟组大鼠 *Runx2* mRNA 表达 [分别为 (0.81±0.33)、(0.78±0.18)、(0.57±0.25)] 均低于对照组 (1.18±0.28), 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 且随着染氟剂量的增加, *Col I* 和 *Runx2* mRNA 的表达都呈下降趋势 ($r=-0.56$ 、 -0.31 , 均 $P<0.05$)。与对照组 (1.01±0.15) 相比, 低、中染氟组大鼠 *Osx* mRNA 表达量 [分别为 (1.31±0.20)、中氟组 (1.49±0.41)] 升高, 但高氟组 (0.58±0.15) 降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。染氟6个月后, 低、中、高染氟组大鼠 *Col I* 蛋白相对表达量 [分别为 (0.17±0.02)、(0.15±0.01)、(0.11±0.03)] 均低于对照组 (0.22±0.03), 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 且随着染氟剂量的增加, *Col I* 蛋白的相对表达量呈下降趋势 ($r=-0.88$, $P<0.05$)。与对照组 [分别为 (0.19±0.03)、(0.16±0.03)] 相比, 低氟组 [分别为 (0.30±0.04) 和 (0.25±0.02)]、中氟组 [(0.26±0.01) 和 (0.31±0.03)] 大鼠的 *Runx2* 蛋白和 *Osx* 蛋白的相对表达量升高, 高氟组 [(0.12±0.02) 和 (0.10±0.03)] 降低, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。

[结论] 氟对骨组织成骨活性标志表达的影响复杂, *Col I* 的表达随着染毒剂量的增加呈下降趋势; 而中、低剂量染毒会促进 *Runx2* 和 *Osx* 的表达, 高剂量时则会抑制其表达。

关键词: 氟化钠; 成骨活性标志; I型胶原蛋白; Runt相关转录因子2; 成骨相关转录因子

Effects of six-month sodium fluoride exposure via drinking water on osteogenic activity markers in rat bone tissues DAI You-gang, CHEN Xuan-hao, YANG Lu-hui, ZHANG Hua, WEI Yan (School of Public Health, Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China)

Abstract:

[Background] Fluorosis is a chronic systemic disease characterized by skeletal fluorosis and

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.19123

基金项目

国家自然科学基金 (81560515); 科技部国家科技支撑计划课题 (2013BAI05B03)

作者简介

代佑罡 (1991—), 男, 硕士;
E-mail: 525538434@qq.com

通信作者

韦艳, E-mail: weiyang925@foxmail.com

伦理审批 已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-03-11

录用日期 2019-05-14

文章编号 2095-9982(2019)08-0725-06

中图分类号 R114

文献标志码 A

►引用

代佑罡, 陈宣好, 杨璐琿, 等. 氟化钠饮水染毒6个月对大鼠骨组织成骨活性标志的影响[J]. 环境与职业医学, 2019, 36(8): 725-730.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19123

Funding

This study was funded.

Correspondence to

WEI Yan, E-mail: weiyang925@foxmail.com

Ethics approval Obtained

Competing interests None declared

Received 2019-03-11

Accepted 2019-05-13

►To cite

DAI You-gang, CHEN Xuan-hao, YANG Lu-hui, et al. Effects of six-month sodium fluoride exposure via drinking water on osteogenic activity markers in rat bone tissues[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(8): 725-730.

►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19123

dental fluorosis caused by long-term intake of excessive fluorine from air, food, and water. Endemic fluorosis is widespread throughout China, and severely threatens a large population. To study the mechanism of fluorosis is helpful to prevent and treat skeletal fluorosis, dental fluorosis, and other bone diseases caused by excessive intake of fluoride.

[Objective] This experiment is designed to investigate the effects of different doses of sodium fluoride on osteogenic activity markers in rats, and to provide experimental data for studying the mechanism of fluorosis.

[Methods] Thirty-two SD rats were randomly divided into one control group (0 mg/L) and three fluoride groups (50, 150, and 250 mg/L, respectively). After six months of fluoride administration via drinking water, urinary samples were collected within 12 h to detect urinary fluoride concentration; then the rats were executed after 10% chloral hydrate anesthesia, and cardiac blood samples were collected to detect serum fluoride concentration; left forelimbs were ground in liquid nitrogen, and the mRNA expressions of *Col I*, *Runx2*, and *Osx* were detected by real-time quantitative PCR; right forelimbs were ground in liquid nitrogen, and the protein expressions of *Col I*, *Runx2*, and *Osx* were detected by Western blot.

[Results] During the fluoride administration period, the rats were in good mental status with normal dietary intake and water consumption, and there was no significant difference in body weight between the exposure groups and the control group. After the designed six-month treatment, the urinary fluoride concentrations of the fluoride groups [(9.71±2.33), (20.36±4.92), and (42.36±4.56) mg/kg] were statistically higher than that of the control group [(5.69±1.59) mg/kg] ($P<0.05$), so were the serum fluoride concentrations [(0.19±0.01), (0.23±0.01), and (0.29±0.02) mg/L vs. (0.14±0.01) mg/L] ($P<0.05$); as the fluoride exposure dose increased, the urinary and serum fluoride concentrations showed rising trends ($r=0.89, 0.90, P_s<0.01$). After the treatment for six months, the mRNA expression levels of *Col I* in the low-dose group (0.91±0.28), the medium-dose group (0.87±0.33), and the high-dose group (0.67±0.31) were statistically higher than that in the control group (1.31±0.43) ($P<0.05$); the mRNA expression levels of *Runx2* in the low-dose group (0.81±0.33), the medium-dose group (0.78±0.18), and the high-dose group (0.57±0.25) were statistically higher than that in the control group (1.18±0.28) ($P<0.05$); as the fluoride exposure dose increased, the mRNA expression levels of *Col I* and *Runx2* showed decreasing trends ($r=-0.56, -0.31, P_s<0.05$). Compared with the control group (1.01±0.15), the mRNA expression levels of *Osx* in the low-dose group (1.31±0.20) and the medium-dose group (1.49±0.41) were increased, and that in the high-dose group (0.58±0.15) was decreased ($P<0.05$). After the treatment for six months, the protein expression levels of *Col I* in the low-dose group (0.17±0.02), the medium-dose group (0.15±0.01), and the high-dose group (0.11±0.03) were statistically lower than that in the control group (0.22±0.03) ($P<0.05$); as the fluoride exposure dose increased, the protein expression level of *Col I* showed a downward trend ($r=-0.88, P<0.05$). Compared with the control group [(0.19±0.03), (0.16±0.03)], the protein expression levels of *Runx2* and *Osx* in the low-dose group [(0.30±0.04), (0.25±0.02)] and the medium-dose group [(0.26±0.01), (0.31±0.03)] were increased, but the expression levels in the high-dose group [(0.12±0.02), (0.10±0.03)] were decreased ($P<0.05$).

[Conclusion] The effect of fluoride on the expressions of osteogenic activity markers is complex. As the fluoride exposure dose increases, the *Col I* protein expression level shows a downward trend; whereas, the *Runx2* and *Osx* protein expression levels of the low- and medium-dose fluoride groups are up-regulated, and those of the high-dose fluoride group are down-regulated.

Keywords: sodium fluoride; osteogenic activity marker; collagen type I; runt-related transcription factor 2; osterix

氟是人们日常生活中必不可少的一种微量元素，氟中毒是由于长期从空气、食物和饮水中摄入过量的氟而引起的以氟骨症和氟斑牙为主要特征的一种慢性全身性疾病^[1]。骨骼是氟的主要靶器官，骨相损害的特征为骨组织的骨转换异常，主要表现为骨硬化、骨软化、骨质疏松等^[2]。成骨活性标志是反映成骨活性的重要参照物，国内外有众多研究表明成骨活性标志在诊断骨质疏松、预防关节炎、促进新骨生成等方面起着重要的作用^[3-5]。而I型胶原蛋白 (collagen type I, *Col I*)、Runt相关转录因子2 (Runt-related transcription factor 2, *Runx2*) 和成骨相关转录因子 (osterix, *Osx*) 是常用于检测成骨活性的标志，参与成骨细胞的分化、增殖、调节骨代谢^[6-7]。目前以骨为对象开展氟染毒的研究较少，本次实验通过观察染氟对大鼠骨组织中成骨细胞活性标志的改变，为氟中毒机制提供一定的数据基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要仪器与试剂

选取断乳1个月，体重为110~140 g的清洁级SD大鼠32只。实验设施合格证编号为SYXK (黔) 2012—0001，质量合格证编号为SCXK (黔) 2012—0001；实验动物伦理批准号为：1800308。适应性饲养7 d后，按体重均衡随机将32只大鼠均分为对照组、低氟组、中氟组、高氟组，每组8只。

GZX-9246MBE干燥箱 (上海博迅实业医疗设备厂，中国)，HVE-50高压灭菌锅 (Hirayama, 日本)，Z36HK高速冷冻离心机 (Hermle, 德国)，Beckman Coulter DU 640核酸蛋白分析仪 (Beckman Coulter, 美国)，凝胶成像分析系统 (ChemiDocTMXRS+)、BioRad CFX96实时荧光定量PCR仪 (Bio-Rad, 美国)，CSB-F-2型复合氟电极 (长沙益天实验仪器有限公司春花制作中心，中国)，PHS-3C型PH计 (上海精密科学仪器有限

公司, 中国), MULTISKAN GO 型超级酶标仪 (Thermo Scientific, 美国), Biomias2001 图像分析系统 (四川大学图象图形研究所, 中国)。

NaF (Sigma-Aldrich, 美国), 10% 福尔马林、10% EDTA-2Na、0.5% 伊红染液 (索莱宝, 中国), 总 RNA 提取试剂、SYBR® Premix ExTaq™ II、cDNA 反转录试剂盒 (TaKaRa, 日本), 肌动蛋白 (beta-Actin) 鼠单克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG (Affinity, 美国), Runx2 兔多克隆抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG (武汉三鹰, 中国), Col I 兔多克隆抗体、Osx 兔多克隆抗体 (北京博奥森, 中国), 化学发光试剂 ECL (millipore, 美国), PMSF、RIPA 裂解液、二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白定量检测试剂盒 (上海碧云天公司, 中国)。

1.2 氟化钠染毒

根据大鼠氟化钠 (NaF) 经口 LD₅₀ 为 147.5 mg/kg^[8] 和大鼠每日饮水量为 8~11 mL 设置低、中、高 3 个剂量组的饮水 NaF 浓度为 50 mg/L (1/20 LD₅₀)、150 mg/L (3/20 LD₅₀)、250 mg/L (1/4 LD₅₀)。各组大鼠均自由饮水、摄食。期间观察动物饮食、饮水以及活动状况并记录, 定时监测尿氟情况。于染毒 6 个月后, 将大鼠以 10% 水合氯醛麻醉, 心脏采血并处死全部大鼠, 取四肢骨, 于 -80℃ 保存, 备用。

1.3 血、尿氟的测定

处死前 24 h, 将各剂量组大鼠放入代谢笼, 禁食、禁水, 收集 12 h 尿液, 按照 WS/T 89—2015《尿中氟化物测定离子选择电极法》测定尿氟浓度。方法的检出限为 0.1 mg/L, 加标回收率为 98.9%~100.5%, 相对标准偏差 (RSD) 为 0.4%~4.1%。

取全血, 置于离心机 4℃、3 000 r/min (离心半径为 5 cm) 离心 10 min, 收集血清, 放置于 -80℃ 冰箱冻存备用。按照 WS/T 212—2001《血清中氟化物的测定离子选择电极法》测定血氟浓度。方法的检出限为 0.012 μg/mL, 加标回收率为 93.6%~99.8%, RSD 为 0.99%~3.39%。

1.4 骨组织中 Col I、Runx2 和 Osx mRNA 的实时荧光 PCR 法检测

大鼠处死后取左前肢, 剔除结缔组织, 用液氮反复研磨成骨粉, 采用 RNAiso Plus 提取骨粉总 RNA。将提取的 RNA 反转录为 cDNA, 置于 -20℃ 冰箱保存, 备用。根据美国国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 上查找到各目的基因 mRNA 序列, 用 Primer 5.0 设计引物, 引物由上海

生工合成。各引物序列如表 1。

表 1 实时定量 PCR 所用引物序列
Table 1 Primer sequences for real-time quantitative PCR

基因 Gene	正向引物 (5'-3') Forward	反向引物 (5'-3') Reverse
Col I	AGAGGCATAAAGGGTCATCGTG	GAGAACCAGCAGAGCCAGGG
Runx2	GAACCAAGAAGGCACAGACAGAA	GGCGGGACACCTACTCTCATACT
Osx	GACTCAACAGCCCTGGGAAAA	GGGTGGGTAGTCATTGGCATAG
GAPDH	AAGTTCAACGGCAGTCAAGG	ACGCCAGTAGACTCCACGACAT

采用 SYBR® Premix ExTaq™ II 进行实时荧光 PCR。每实验样品重复 3 次, 取其平均值。待 PCR 反应结束, 通过溶解曲线检验扩增产物的特异性 (扩增效率为 95%) ; 以 GAPDH 为内参基因, 采用相对定量法 (2^{-ΔΔCt}) 计算 Col I、Runx2 和 Osx 的表达情况。

1.5 骨组织中 Col I、Runx2 和 Osx 蛋白的 Western blot 检测

取大鼠右前肢, 剔除多余结缔组织, 用液氮反复研磨成骨粉。骨粉装入 10 mL 匀浆器, 置于冰上, 加入蛋白裂解液, 反复揉捣, 收集蛋白质样品测定蛋白浓度, 按比例加入上样缓冲液, 煮沸。采用十二烷基硫酸钠 (SDS) 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白, 恒电流转移至 PVDF 膜后放置于含 5% 脱脂奶粉封闭液中, 室温振摇封闭 2 h。加入一抗于 4℃ 孵育过夜, 加入二抗孵育 2 h, 电化学发光显影液显色。

1.6 统计学分析

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析。组间比较采用单因素方差分析; 进一步的组间两两比较时, 若方差齐时, 采用 SNK 检验; 若方差不齐时, 采用 Games-Howell 检验。不符合正态分布的计量资料和计数资料的组间比较采用 Kruskal-Wallis H 秩和检验。使用 Spearman 秩相关分析不同染毒剂量与各指标的相关关系。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 大鼠基本情况

染毒期间, 大鼠饮食饮水正常, 精神状况良好, 相比对照组, 不同染毒组间体重的差异无统计学意义 ($P>0.05$), 见表 2。

2.2 大鼠尿氟和血氟测定结果

染氟 6 个月后, 各染氟组大鼠尿氟含量均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 各染氟组大鼠血氟含量均高于对照组, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) ; 且随着染氟剂量的增加, 尿氟 ($r=0.89$, $P<0.01$) 和血

氟($r=0.90$, $P<0.01$)都呈上升的趋势($P<0.01$)。见表3。

表2 不同浓度氟化钠染毒不同时间后大鼠体重变化
($n=8$, $\bar{x}\pm s$, g)

Table 2 Body weight changes of rats exposed to sodium fluoride at different concentrations over time

组别 Group	染毒前 Before exposure	2个月 2 months	4个月 4 months	6个月 6 months
对照组 Control	352±37.34	440.12±46.68	522.38±38.28	660.25±53.44
低氟组 Low-dose fluoride	368±39.05	460.63±48.82	556.75±76.69	655.88±57.96
中氟组 Medium-dose fluoride	351±50.54	439.63±63.17	549.00±53.65	620.00±75.38
高氟组 High-dose fluoride	361±31.48	452.13±39.35	552.63±74.48	636.25±89.73
<i>F</i>	0.020	0.360	0.669	0.933
<i>P</i>	0.888	0.852	0.410	0.342

表3 不同浓度氟化钠染毒6个月后大鼠尿氟、血氟水平
($\bar{x}\pm s$, $n=8$)

Table 3 Urinary and serum fluoride levels of rats exposed to sodium fluoride at different concentrations for six months

组别 Group	尿氟 (mg/kg) Urinary fluoride	血氟 (mg/L) Serum fluoride
对照组 (Control)	5.69±1.59	0.14±0.01
低氟组 (Low-dose fluoride)	9.71±2.33 ^a	0.19±0.01 ^a
中氟组 (Medium-dose fluoride)	20.36±4.92 ^{ab}	0.23±0.01 ^{ab}
高氟组 (High-dose fluoride)	42.36±4.56 ^{abc}	0.29±0.02 ^{abc}
<i>F</i>	440.15	330.37
<i>P</i>	<0.01	<0.01

[注] a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与低氟组比较, $P<0.05$; c: 与中氟组比较, $P<0.05$ 。

[Note] a: Compared with the control group, $P<0.05$; b: Compared with the low-dose fluoride group, $P<0.05$; c: Compared with the medium-dose fluoride group, $P<0.05$ 。

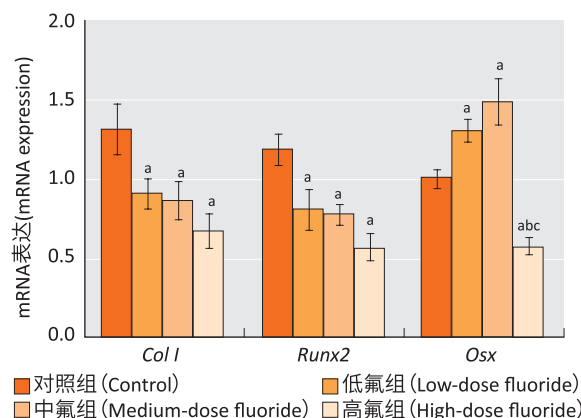
2.3 大鼠骨组织 *Col I*、*Runx2* 和 *Osx* mRNA 的表达

染氟6个月后,各染氟组大鼠 *Col I* mRNA 和 *Runx2* mRNA 表达量均低于对照组,差异有统计学意义 ($P<0.05$); 且随着染氟剂量的增加, *Col I* 和 *Runx2* mRNA 的表达都呈下降趋势 (r 分别为 -0.56 和 -0.31 , 均 $P<0.05$)。低氟、中氟组大鼠 *Osx* mRNA 表达量高于对照组 ($P<0.05$), 高氟组 *Osx* mRNA 表达量低于其他各组大鼠 ($P<0.05$)。见图1。

2.4 大鼠骨组织 *Col I*、*Runx2* 和 *Osx* 蛋白表达

染氟6个月后,各染氟组大鼠 *Col I* 蛋白相对表达量均低于对照组 ($P<0.05$); 且随着染氟剂量的增加, *Col I* 的蛋白相对表达量呈下降趋势 ($r=-0.88$, $P<0.05$)。低氟和中氟组大鼠 *Runx2* 和 *Osx* 蛋白表达量均高于对照组,差异有统计学意义 ($P<0.05$); 但高氟组的 *Runx2* 和 *Osx* 蛋白表达量均低于其他各组大鼠,差

异有统计学意义 ($P<0.05$)。见图2。

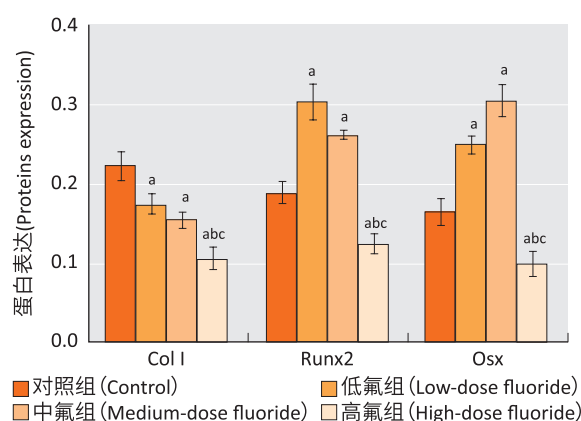
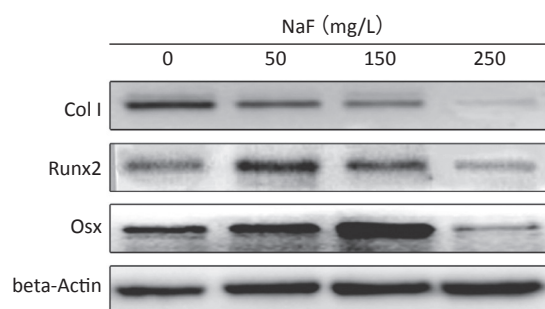


[注] a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与低氟组比较, $P<0.05$; c: 与中氟组比较, $P<0.05$ 。

[Note] a: Compared with the control group, $P<0.05$; b: Compared with the low-dose fluoride group, $P<0.05$; c: Compared with the medium-dose fluoride group, $P<0.05$ 。

图1 氟化钠对大鼠骨组织 *Col I*、*Runx2* 和 *Osx* mRNA 表达的影响

Figure 1 Effects of sodium fluoride on the mRNA expressions of *Col I*, *Runx2*, and *Osx* in bone tissues of rats



[注] a: 与对照组比较, $P<0.05$; b: 与低氟组比较, $P<0.05$; c: 与中氟组比较, $P<0.05$ 。

[Note] a: Compared with the control group, $P<0.05$; b: Compared with the low-dose fluoride group, $P<0.05$; c: Compared with the medium-dose fluoride group, $P<0.05$ 。

图2 氟化钠对大鼠骨组织 *Col I*、*Runx2* 和 *Osx* 蛋白表达的影响

Figure 2 Effects of sodium fluoride on the protein expressions of *Col I*, *Runx2*, and *Osx* in bone tissues of rats

3 讨论

长期过量摄入氟可引起氟中毒, 氟中毒的特征是以氟骨症和氟斑牙为主要表现的一种慢性全身性疾病。氟具有很强的亲骨性, 会在骨组织中大量蓄积, 最终形成氟斑牙和氟骨症。骨是具有新陈代谢的组织, 机体中的骨组织在破骨细胞和成骨细胞作用下不断进行重建, 这个过程就是骨转换^[9], 而氟骨症的主要特征就是骨转换异常。本实验通过构建动物模型, 模拟氟中毒并检测大鼠骨组织中成骨活性标志的变化, 为氟中毒机制提供实验依据。课题组前期比较了SD大鼠与Wistar大鼠对氟斑牙的易感性^[10], 发现SD大鼠对氟斑牙易感性强于Wistar大鼠, 故选用SD大鼠作为本研究的实验对象。人体中的氟大约75%通过肾脏以尿氟的形式排出^[11], 且血氟是检测机体氟蓄积相对稳定的指标^[12], 因此本实验通过检测SD大鼠尿氟和血氟浓度来反映氟中毒动物模型的构建情况, 确保实验数据的准确。

骨的形成是由多功能干细胞分化骨髓间充质干细胞; 再由骨髓间充质干细胞分化为前成骨细胞, 此时*Runx2*发挥作用, 促进成骨细胞的分化; 随后前成骨细胞转化为成熟成骨细胞, 此时*Osx*在*Runx2*下游起着促进成骨分化的作用; 接着成骨细胞逐渐堆积, 形成骨基质, 而Col I是骨组织钙化细胞外基质中的主要组成部分, 是骨基质中的主要蛋白质, 在成骨细胞增殖早期已经开始分泌, 并随着基质的成熟而增加^[13]; 最后随着骨基质的逐渐钙化, 最终形成骨, 而整个成骨活动也随之完成。Pitaru等^[14]曾发现在缺乏合成胶原所需抗坏血酸的体外培养环境中, 成骨细胞增殖加快, 合成更多的胶原纤维来满足骨基质成熟的需求, 可见Col I是成骨细胞向骨基质成熟方向分化的标志。本研究中各氟化钠染毒组Col I的mRNA与蛋白表达量均低于对照组, 且呈下降的趋势。提示过量的氟摄入会抑制骨组织Col I的表达。另有报道指出, 在染氟浓度0.1~1 mg/L时骨髓基质细胞中的Col I表达受到促进, 而在染氟浓度达到10 mg/L时Col I的表达受到明显抑制^[15]。本研究结果也显示, 过量的氟摄入会抑制Col I mRNA的表达, 具体机制有待进一步研究。

*Runx2*是runt结构域基因家族的转录因子, 成骨细胞等可表达, 是成骨特异性转录因子, 可促进成骨细胞的分化及骨形成, 尤其是在调控软骨内成骨过程中起着重要的作用^[16-17]。Lee等^[18]观察到, 氟化钠

可以促进成骨细胞中具有代表性的一些骨基质蛋白如*Runx2*、*Osx*的表达。本实验发现, *Runx2* mRNA表达量在各染氟组均低于对照组, 而*Runx2*蛋白表达量在低氟、中氟组时高于对照组, 高氟组低于对照组, 出现mRNA表达和蛋白表达趋势的不一致, 而Yang等^[19]在实验中也发现氟化钠染毒抑制大鼠骨组织*Runx2* mRNA的表达, 这是在氟处理的骨髓间充质干细胞中, *Smad3*表达降低, 从而调控了*Runx2* mRNA的表达, 但可能*Smad3*对*Runx2*蛋白表达的影响很小, 具体机制有待进一步研究。本课题组前期在氟化钠染毒对骨肉瘤细胞UMR-106的成骨活性标志影响研究中发现*Runx2* mRNA和蛋白的表达量都是在低剂量时升高, 随着染氟剂量的增加转而呈下降的趋势^[20], 与本研究结果有一定相似。提示氟化钠摄入量的不同可能会使*Runx2*的表达有不同程度的上升或下降。

最早发现*Osx*是一种成骨细胞特异性转录因子, 在机体骨形成和矿化中具有重要作用^[21]。Zhou等^[22]通过敲除*Osx*严重破坏了成骨细胞的成熟、形态和功能。本实验中低氟、中氟组大鼠骨组织*Osx* mRNA/蛋白表达均较对照组上升, 高氟组*Osx* mRNA/蛋白表达则低于对照组。这与以往研究比较吻合, 杨丹等^[23]和张亚楼等^[24]均观察到, 氟化钠可以刺激成骨细胞分化增殖, 使*Osx*表达增加, 在细胞实验中发现低剂量氟染毒会促进*Osx*的表达, 高剂量氟染毒抑制*Osx*的表达。提示氟化钠对*Osx*的表达可能起着复杂的双向调节作用。

综上所述, 在氟中毒导致的骨代谢异常活动中, *Col I*、*Runx2*和*Osx*作为常用于检测成骨细胞活性的标志, 表现出了较好的特异性。氟对骨组织成骨活性标志表达的影响复杂, 随着染毒剂量的增加, *Col I*的表达呈下降趋势; 而中、低剂量下会促进*Runx2*和*Osx*的表达, 高剂量时会抑制其表达。另外, 本研究只检测了染氟6个月对大鼠成骨细胞活性标志表达情况, 未揭示氟染毒对大鼠成骨细胞活性标志表达随时间的动态变化, 其机制探讨也不够深入, 但为后续进一步研究提供了一定参考价值。

参考文献

- [1] 陈媛, 熊传龙, 张琦, 等. 氟中毒暴露途径及健康效应研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2016, 33(1): 84-87.
- [2] SAMAL P, JENA D, MAHAPATRA A, et al. Fluorosis: an epidemic hazard and its consequences on livestock

- population [J]. *Indian Farmer*, 2016, 3 (3) : 180-184.
- [3] 商玲玲, 葛少华. 骨形成蛋白-2与其他生长因子联合应用对骨再生的影响 [J]. *口腔医学*, 2017, 37 (11) : 1029-1033.
- [4] DATTA HK, NG WF, WALKER JA, et al. The cell biology of bone metabolism [J]. *J Clin Pathol*, 2008, 61 (5) : 577-587.
- [5] 杨传俊, 孙红, 邓进. 生物学标志物在骨关节炎诊断中的应用进展 [J]. *医学综述*, 2019, 25 (4) : 631-636.
- [6] LI XN, LV P, SUN Z, et al. Role of unfolded protein response in affecting osteoblast differentiation induced by fluoride [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2014, 158 (1) : 113-121.
- [7] RAGHAVENDRAN HR, MOHAN S, GENASAN K, et al. Synergistic interaction of platelet derived growth factor (PDGF) with the surface of PLLA/Col/HA and PLLA/HA scaffolds produces rapid osteogenic differentiation [J]. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 2016, 139 : 68-78.
- [8] 姜新强, 汪明星. 氟中毒与大鼠骨密度变化的关系 [J]. *中国地方病防治杂志*, 2015, 30 (4) : 285.
- [9] 孙殿军, 高彦辉. 从骨转换角度探讨氟骨症发生的分子机制 [J]. *中国地方病学杂志*, 2008, 27 (3) : 239-241.
- [10] 曾贝贝, 张业芳, 夏敏, 等. SD大鼠与Wistar大鼠对氟斑牙易感性的比较 [J]. *环境与健康杂志*, 2015, 32 (10) : 867-871.
- [11] 吴俊华, 李丹丹, 杨丹, 等. 饮茶型氟中毒病区藏族和哈萨克族人群尿氟和尿pH水平差异 [J]. *中华地方病学杂志*, 2015, 34 (2) : 81-83.
- [12] 韩峰, 王云春, 李正官. 应用扩散-电极法测定血清中微量氟化物 [J]. *中国地方病学杂志*, 2006, 25 (2) : 201-203.
- [13] 唐莉. 氟与骨相关蛋白的关系 [J]. *国外医学卫生学分册*, 2009, 36 (3) : 179-183.
- [14] PITARU S, MELCHER AH. Organization of an oriented fiber system in vitro by human gingival fibroblasts attached to dental tissue : relationship between cells and mineralized and demineralized tissue [J]. *J Periodontal Res*, 1987, 22 (1) : 6-13.
- [15] 王春红. 氟对骨髓基质细胞及其产物OPG、RANKL和相关细胞因子的影响 [D]. 长春 : 吉林大学, 2006.
- [16] BANIWAL SK, SHAH PK, SHI Y, et al. Runx2 promotes both osteoblastogenesis and novel osteoclastogenic signals in ST2 mesenchymal progenitor cells [J]. *Osteoporos Int*, 2012, 23 (4) : 1399-1413.
- [17] 张琳琳. 氟对大鼠生长板软骨内成骨的影响及EGFR信号通路在其中的调控作用 [D]. 沈阳 : 中国医科大学, 2018.
- [18] LEE M, ARIKAWA K, NAGAHAMA F. Micromolar levels of sodium fluoride promote osteoblast differentiation through Runx2 signaling [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2017, 178 (2) : 283-291.
- [19] YANG C, WANG Y, XU H. Fluoride regulate osteoblastic transforming growth factor- β 1 signaling by mediating recycling of the type I receptor ALK5 [J]. *PLoS One*, 2017, 12 (1) : e0170674.
- [20] 吴彦秋, 陈宣好, 代佑罡, 等. 氟化钠对大鼠成骨肉瘤细胞UMR-106成骨活性标志物的影响 [J]. *现代预防医学*, 2018, 45 (5) : 883-886, 891.
- [21] NAKASHIMA K, ZHOU X, KUNKEL G, et al. The novel zinc finger-containing transcription factor osterix is required for osteoblast differentiation and bone formation [J]. *Cell*, 2002, 108 (1) : 17-29.
- [22] ZHOU X, ZHANG Z, FENG JQ, et al. Multiple functions of osterix are required for bone growth and homeostasis in postnatal mice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107 (29) : 12919-12924.
- [23] 杨丹, 于燕妮, 邓超男, 等. 氟对大鼠骨组织Osterix mRNA及其蛋白表达影响 [J]. *中国公共卫生*, 2011, 27 (8) : 1008-1009.
- [24] 张亚楼, 刘开泰, 刘继文, 等. 氟对成骨细胞Runx2和Osterix及COL I A2表达的影响 [J]. *中国地方病学杂志*, 2011, 30 (1) : 23-26.
- (英文编辑 : 汪源 ; 编辑 : 童玲, 丁瑾瑜 ; 校对 : 龚士洋)