

氟对小鼠脾淋巴细胞 ERK 通路相关基因 及蛋白质表达的影响

徐 刚, 王金明, 马淑慧, 詹雅琦, 马海利*

(山西农业大学动物科技学院, 太谷 030801)

摘 要: 为探讨氟化钠对小鼠脾淋巴细胞细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)通路相关基因及蛋白表达的影响, 将体内不同氟质量浓度染毒鼠的脾淋巴细胞和体外不同氟浓度作用的脾淋巴细胞经过细菌脂多糖(LPS)刺激培养后, 采用 Real-time PCR 和 Western blotting 检测 *ras*、*c-raf*、*MEK1*、*ERK1* 在 mRNA 水平的转录变化以及 ERK1 在蛋白质水平的表达差异。结果显示: 小鼠脾淋巴细胞 ERK 通路的激活可被低质量浓度的氟抑制, 但随氟质量浓度增加, 其抑制趋势逐渐减少而转为促进。表明氟化物可通过影响小鼠脾淋巴细胞 ERK 通路的激活, 从而进一步影响免疫系统的功能。

关键词: 氟化钠; 小鼠脾淋巴细胞; ERK1; 基因转录; 蛋白质表达

中图分类号: S859.81

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)11-1888-07

Effects of Fluoride on the Expression of ERK Signaling Pathway Associated Gene and Proteins in the Splenic Lymphocytes of Mouse

XU Gang, WANG Jin-ming, MA Shu-hui, ZHAN Ya-qi, MA Hai-li*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: The current study was undertaken to study the effects of fluoride on the expression of ERK signaling pathway associated gene and proteins in the splenic lymphocytes of mouse. The splenic lymphocytes of the different level of fluoride-treated mouse *in vivo* and the splenic lymphocytes with the different level of sodium fluoride *in vitro* were cultured in RPMI-1640 medium with bacterial lipopolysaccharide, then the mRNA level of *ras/c-raf/MEK1/ERK1* and the protein expression of ERK1 were detected using the Real-time PCR and Western blotting. The results showed that activation of the ERK pathway in mouse splenic lymphocytes can be inhibited by fluoride in low concentrations, but with increasing fluoride concentration, the degree of inhibition was reduced, ERK pathway activation was turn into promoting. These results suggested that fluoride can affect the activation of ERK pathway in mouse splenic lymphocytes, thus further influence the function of the immune system.

Key words: sodium fluoride; mouse splenic lymphocytes; ERK1; gene transcription; protein expression

氟是动物机体生长所必需的微量元素之一, 适量的氟对动物的牙齿和骨骼的钙化、神经兴奋性传

导和酶系统的代谢等均有促进作用^[1], 但过量就会导致动物出现以牙齿和骨骼病变为主要特征的全身

收稿日期: 2014-03-13

基金项目: 山西省高等学校优秀青年学术带头人支持计划(2011)

作者简介: 徐 刚(1987-), 男, 山西大同人, 硕士, 主要从事动物传染病的诊断与防治研究, E-mail: xugangayu@163.com

* 通信作者: 马海利, 教授, E-mail: mahaili1718@126.com

性中毒症状^[2]。近年来,氟对非骨相系统损伤的研究已引起了广大学者的高度重视,包括神经、生殖以及免疫系统等^[3-5]。其中,氟对动物免疫系统的影响尤为广泛而深刻,可造成免疫紊乱、免疫功能降低、细胞免疫和体液免疫出现异常,如可引起淋巴细胞数目的减少、功能的抑制、结构的损伤,巨噬细胞 Fc 受体活性下降,粒细胞的移动及吞噬能力减弱,红细胞免疫黏附能力下降等^[6]。因此,探究氟对免疫系统的毒性机制将会进一步为干预动物氟中毒提供理论依据。

动物免疫系统的激活是通过免疫细胞对抗原的识别来启动的,丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPK)信号通路是抗原识别重要的信号通路,直接参与转录因子的活化^[7], MAPK 信号通路主要包括四个分支,即细胞外信号调节蛋白激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)1/2、p38MAPK、ERK5 和 c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK),其中 ERK1/2 的活化是将信号从细胞膜表面受体转导至细胞核的关键所在,因此,深入研究 ERK1/2 通路(细胞外调节蛋白激酶通路)对揭示免疫系统激活途径有着极其重要的意义^[8]。在不同的组织细胞中,ERK 通路所呈现的功能作用也不同,ERK 通路在肺上皮细胞和骨骼细胞中促进增殖,而在神经细胞衍生的细胞系(PC12)中却表现为分化作用^[9-10]。但 ERK 通路在脾淋巴细胞免疫中所呈现的功能,以及在氟化物作用下脾淋巴细胞 ERK 通路中相关因子的数量及功能是否改变尚未见报道。作者通过体内对小鼠进行 NaF 刺激和体外对脾淋巴细胞进行 NaF 作用,探索 ERK 通路相关激酶在脾淋巴细胞中的变化,阐明氟化物对脾淋巴细胞 ERK 通路的影响,进一步揭示氟对免疫系统的作用机制,为有效控制氟的免疫毒性提供作用靶点。

1 材料与方法

1.1 主要材料

NaF、RPMI-1640 培养基(HyClone,北京)、TRIZOL(TaKaRa,大连)、RT-PCR kit(TaKaRa,大连)、qRT-PCR kit(QIAGEN)、ERK1 多克隆兔抗鼠 IgG 抗体(博奥森,北京)、HRP 标记的羊抗兔二抗(博士德,武汉)、培养细胞总蛋白提取试剂盒(博士德,武汉)、蛋白质相对分子质量 marker(Fermentas 公司)。

1.2 动物

试验用 72 只昆明雄性小鼠,体重 20 g 左右,由山西医科大学实验动物中心提供。小鼠饲料均为标准颗粒饲料(氟含量为 $8.40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,采用氟离子电极法测定)由实验动物中心配制提供。小鼠购回后适应性饲养 1 周后用于试验。

1.3 建立体内试验动物模型

48 只小鼠随机分成 4 组,进行分笼饲养,依次为对照组(饮用去离子水)、低氟组(饮用含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaF 的去离子水)、中氟组(饮用含 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaF 的去离子水)和高氟组(饮用含 $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NaF 的去离子水),每组 12 只,整个试验期间所有小鼠自由采食和自由饮水,饲养 90 d。

1.4 小鼠脾淋巴细胞的分离及培养

1.4.1 体内试验 分别取不同组小鼠,断颈法处死后 75% 乙醇浸泡,无菌采取脾并在加含双抗的 PBS 中磨碎,将匀浆液经 80 目尼龙滤网过滤,得到单个核细胞悬液,小心加于淋巴细胞分离液之液面上,400 g 离心 15 min。取中层环状乳白色淋巴细胞层液体,洗涤 2 次,弃去上清。用含 15% 小牛血清的 RPMI-1640 重悬细胞沉淀,接种于细胞培养瓶中,并添加 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脂多糖(LPS)进行刺激,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。

1.4.2 体外试验 取健康小鼠制备脾淋巴细胞,将其分为 4 组,分别添加不同质量浓度的 NaF 进行培养,依次为对照组(无 NaF)、低氟组($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaF)、中氟组($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaF)和高氟组($1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaF)。并在培养基中添加 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 脂多糖(LPS)进行刺激,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 48 h。

1.5 Real-time PCR 检测

收集培养细胞,使用 Trizol 试剂盒提取细胞总 RNA,并用核酸测定仪测定其浓度。按照 TaKaRa 公司反转录试剂盒合成 cDNA。利用 Premier 5.0 引物设计软件,根据 GenBank 上的小鼠 *ras*、*c-raf*、*MEK1*、*ERK1* 和 *β actin* 序列设计 PCR 扩增引物,并通过 NCBI 初步检测引物的特异性。引物由华大基因公司合成(表 1)。

按照 QIAGEN 公司 Real-time PCR 试剂盒进行扩增,反应结束后由熔解曲线判定 PCR 反应的特异性,根据标准曲线以及荧光曲线的 C_T 值计算定量结果。

表 1 Real-time PCR 的引物

Table 1 Primer sequences for Real-time PCR

基因 Gene		引物(5'→3') Primers	产物长度/bp Product length	登录号 GenBank accession number
<i>ras</i>	F	TGACTTGCCAACAAGGACAG	141	NM_010937
	R	TGGCGTATCTCCCTTACCAG		
<i>c-raf</i>	F	GGAGCTTGGAAGACGATCAG	130	NM_029780
	R	TGAGCTTGCCATCATCTGAG		
MEK1	F	CCTTGCAGAAGAAGCTGGAG	130	NM_008927
	R	CCCAGTTCGCTGATCTTCTC		
ERK1	F	TCCTTTTGGATCTGGTCTCG	136	NM_011952.2
	R	CCCCAGCAAAGTGAGAGAAG		
<i>β-actin</i>	F	TTGCTGACAGGATGCAGAAG	141	NM_007393.3
	R	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC		

各目的基因的相对表达量采用 $\Delta\Delta C_T$ 法计算：
 ΔC_T (试验组) = C_T (目的基因) - C_T (内参基因)；

ΔC_T (对照组) = C_T (目的基因) - C_T (内参基因)；

$\Delta\Delta C_T = \Delta C_T$ (试验组) - ΔC_T (对照组)；

目的基因的相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 。

数据用 Microsoft Excel 进行计算, 荧光实时定量 PCR 结果均用均值±标准误($\bar{x} \pm s_x$)表示, 其中各基因的表达量所示结果均与看家基因 *β-actin* 表达量进行校正。

1.6 Western blotting 检测

用培养细胞总蛋白质提取试剂盒提取培养 48 h 的脾淋巴细胞总蛋白质, 检测浓度后上样, 进行 SDS-PAGE 电泳, 后转 PVDF 膜。PVDF 膜用 5% BSA 封闭 1 h, 加入 ERK1 一抗(1:300)4℃过夜。用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入 HRP 标记的二抗(1:10000)37℃摇床孵育 1 h, 孵育结束后, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 min。加入 ECL 显色剂显色后暗室曝光, 获得有条带的胶片, 标定 Marker, 分析扫描, 同时做 *β-actin*(1:1000)对照。用 Image-ProPlus 6.0 软件对小鼠 ERK1 和 *β-actin* 免疫印迹结果分析, 测定目标条带面积和灰度值, 目的蛋白质与内参对比, 进行半定量分析。蛋白质含量 = 条带面积 × 平均灰度; 目的蛋白质半定量值 = 目的蛋白质含量/β-actin 蛋白质含量。

1.7 数据统计分析

数据均用“ $\bar{x} \pm s_x$ ”表示, 用 SPSS17.0 软件进行

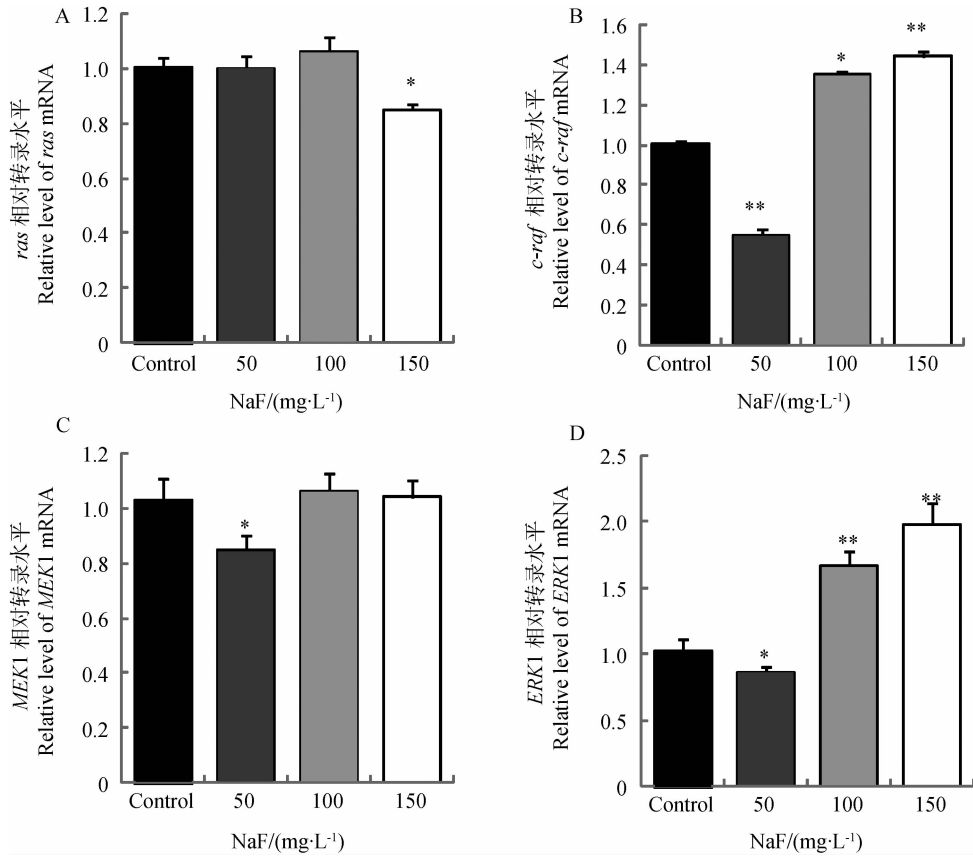
单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异显著, 用 * 表示; $P < 0.01$ 表示差异极显著, 用 ** 表示。

2 结果

2.1 Real-time PCR 检测氟对脾淋巴细胞 *ras*、*c-raf*、*MEK1* 和 *ERK1* 的影响

2.1.1 体内结果 由 Real-time PCR 检测结果(图 1)可知, 低氟质量浓度($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时, *c-raf*/*MEK1*/*ERK1* 基因的转录量减少, 且与对照组相比 *MEK1* 和 *ERK1* 的转录差异显著($P < 0.05$), *c-raf* 的转录差异极显著($P < 0.01$); 中氟质量浓度($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时, *c-raf*/*ERK1* 基因的转录量增加, 且 *c-raf* 的转录差异显著($P < 0.05$), *ERK1* 的转录差异极显著($P < 0.01$); 高氟浓度($150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时, *ras* 基因的转录量减少, 而 *c-raf*/*ERK1* 基因的转录量则增加, 且 *ras* 的转录差异显著($P < 0.05$), *c-raf* 与 *ERK1* 的转录差异极显著($P < 0.01$)。

2.1.2 体外结果 由 Real-time PCR 检测结果(图 2)可知, 与对照组相比, 低氟浓度($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)时, *ras*/*c-raf*/*MEK1*/*ERK1* 基因的转录量均有所减少, 且 *ras* 与 *c-raf* 的转录差异显著($P < 0.05$), *MEK1* 与 *ERK1* 的转录量差异极显著($P < 0.01$); 中氟浓度($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)时, *ras* 与 *ERK1* 基因的转录量显著或极显著减少($P < 0.05$, $P < 0.01$); 高氟浓度($1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)时, *c-raf*/*MEK1*/*ERK1* 基因的转录量显著或极显著增加($P < 0.05$, $P < 0.01$)。



A. *ras* 基因转录; B. *c-raf* 基因转录; C. *MEK1* 基因转录; D. *ERK1* 基因转录。* 表示与 control 组相比 $P < 0.05$, ** 表示与 control 组相比 $P < 0.01$

A. *ras* transcription; B. *c-raf* transcription; C. *MEK1* transcription; D. *ERK1* transcription. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 Real-time 检测体内氟化物对脾淋巴细胞 *ras*、*c-raf*、*MEK1* 和 *ERK1* 基因转录的影响

Fig. 1 Real-time PCR analysis of *ras*, *c-raf*, *MEK1*, *ERK1* transcription in the splenic lymphocytes induced by fluoride *in vivo*

2.2 Western blotting 检测 ERK1 蛋白质的表达

2.2.1 体内结果 由 Western blotting 检测结果(图 3)可知,与对照组相比,低氟浓度($50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时,ERK1 蛋白质的表达量减少,且差异极显著($P < 0.01$);而中氟质量浓度($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和高氟质量浓度($150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)时,ERK1 蛋白质的表达量均显著增加($P < 0.05$)。

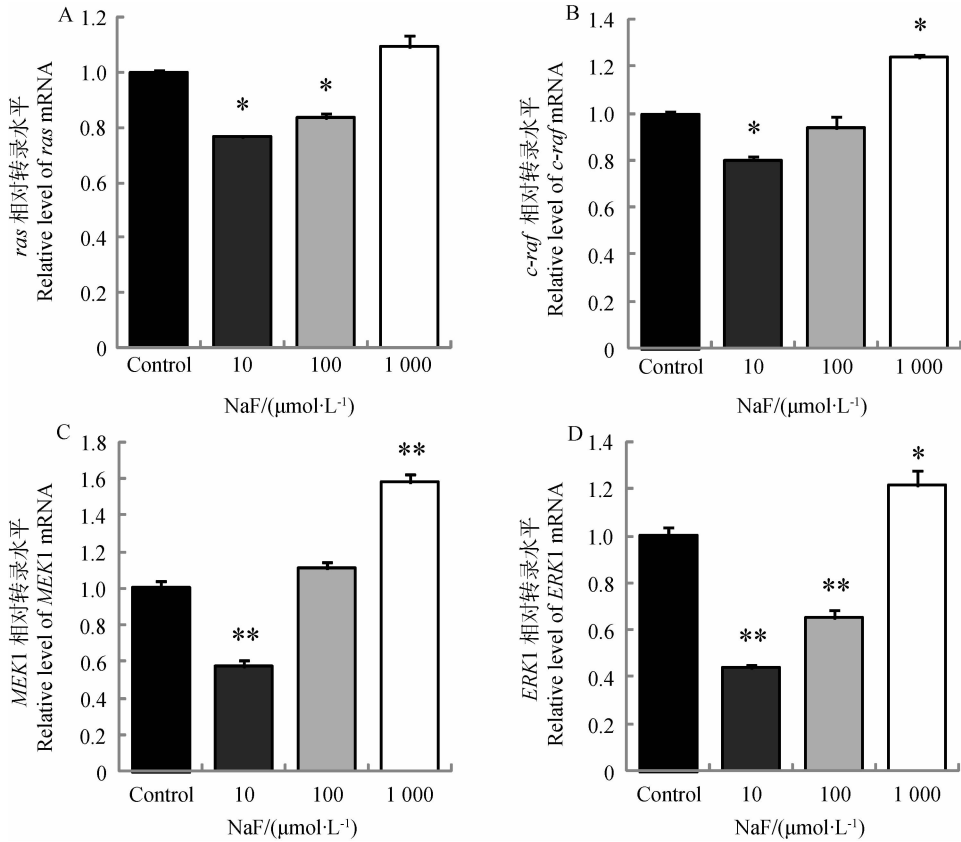
2.2.2 体外结果 由 Western blotting 检测结果(图 4)可知,与对照组相比,低氟浓度($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)和中氟浓度($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)时,ERK1 蛋白的表达量均极显著减少($P < 0.01$);而高氟浓度($1000 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)时,ERK1 蛋白质的表达量增加,且差异极显著($P < 0.01$)。

3 讨论

氟对机体免疫的影响方式是多样的,它能抑制

细胞内蛋白质的合成,抑制 DNA 的合成,引起染色体的损伤,导致细胞内多种酶活性的降低等,进而抑制免疫细胞的生成及其增殖和分化,使免疫系统的代谢发生障碍。细胞免疫的活性降低、功能受抑制,最终导致机体免疫功能下降^[11]。脾是机体最大的外周免疫器官,为各种成熟淋巴细胞定居的场所,负责对血源性抗原产生免疫应答。张广和等^[12]研究发现氟中毒小鼠脾的骨髓和红髓中淋巴细胞减少,郭晓英等^[13]发现高浓度的氟能显著降低脾淋巴细胞对促有丝分裂剂的反应,提示过量氟可影响机体的免疫功能。

MAPK 信号通路主要作用于细胞增殖、细胞形态的调节和细胞凋亡,同时具有高保守性,目前在众多低等原核细胞和高等哺乳类细胞内均发现多条并行的 MAPK 信号通路^[14]。而细胞内所有的 MAPKs 的激活主要通过三个酶促级联反应来完成信号转导:在激活蛋白(包括 ras 超家族 GTPase,连

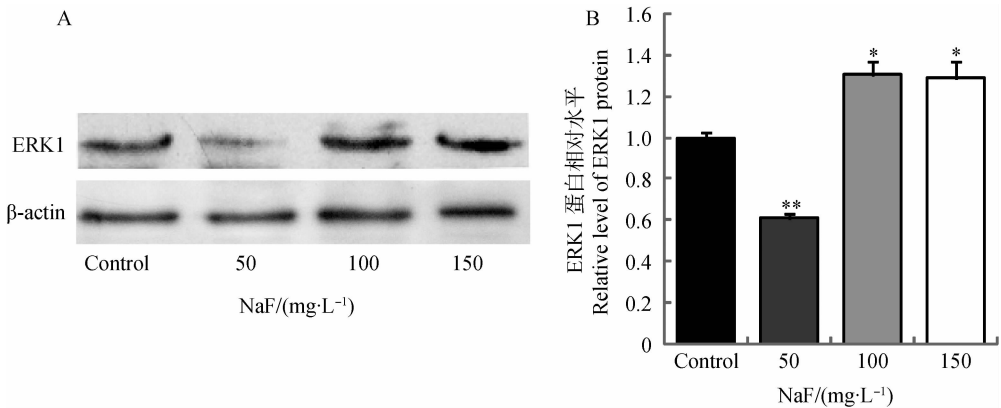


A. *ras* 基因转录;B. *c-raf* 基因转录;C. *MEK1* 基因转录;D. *ERK1* 基因转录。* 表示与 control 组相比 $P < 0.05$, ** 表示与 control 组相比 $P < 0.01$

A. *ras* transcription;B. *c-raf* transcription;C. *MEK1* transcription;D. *ERK1* transcription. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 2 Real-time PCR 检测体外氟化物对脾淋巴细胞 *ras*、*c-raf*、*MEK1* 和 *ERK1* 基因转录的影响

Fig. 2 Real-time PCR analysis of *ras*, *c-raf*, *MEK1*, *ERK1* transcription in the splenic lymphocytes induced by fluoride *in vitro*



A. 免疫印迹图,B. 分析结果,* 表示与 control 组相比 $P < 0.05$, ** 表示与 control 组相比 $P < 0.01$

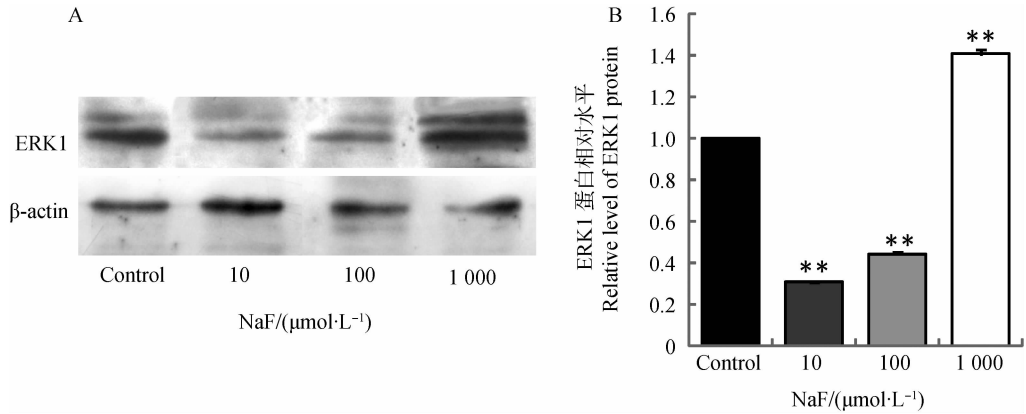
A. The Western blotting result of ERK1, B. The Western blotting analysis of ERK1 expression, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 3 Western blotting 检测体内氟化物对脾淋巴细胞 ERK1 蛋白表达的影响

Fig. 3 Western blotting analysis of ERK1 expression in the splenic lymphocytes induced by fluoride *in vivo*

接蛋白等)的诱导下,MAPKKK 可被激活而磷酸化下游的激酶 MAPKK,MAPKK 进而磷酸化 MAPK

的酪氨酸或苏氨酸残基,导致该蛋白激酶的活化,活化的 MAPK 可进入细胞核内,使核内转录因子磷酸



A. 免疫印迹图;B. 分析结果, * 表示与 control 组相比 $P < 0.05$, ** 表示与 control 组相比 $P < 0.01$
 A. Western blotting result of ERK1;B. Analysis of ERK1 expression, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 4 Western blotting 检测体外氟化物对脾淋巴细胞 ERK1 蛋白质表达的影响

Fig. 4 Western blotting analysis of ERK1 expression in the splenic lymphocytes induced by fluoride *in vitro*

化并激活靶基因,形成脊椎动物细胞信息传入核内的 MAPK 级联磷酸化效应^[15]。ERK 通路是哺乳动物细胞 MAPK 信号转导通路最为重要的一部分,主要由一个三级酶联功能单位构成,即 raf、MEK 和 ERK 激酶,在上游激活蛋白 ras 的作用下,raf 被磷酸化从而导致 MEK 和 ERK 依次被磷酸化激活将信号从表面受体传导至细胞核,进而介导多种转录活化,参与细胞的各种功能调节^[16-17]。

本试验通过对体内外氟中毒小鼠的脾淋巴细胞进行培养,同时经 Real-time PCR 方法对脾淋巴细胞 ERK 通路中 *ras*、*c-raf*、*MEK1*、*ERK1* 进行基因转录水平的检测,并通过 Western bolt 检测 ERK1 在蛋白质水平表达的变化。表明氟对小鼠脾淋巴细胞 ERK 通路中各因子的影响,除 *ras* 基因无明显转录差异外,*c-raf*、*MEK1*、*ERK1* 基因和 ERK1 蛋白表达量均表现双向性,即随氟浓度的增加而出现由减少到逐渐增加的变化趋势,本研究结果与前人报道一致。E. V. Thrane 等曾通过添加抑制剂 PD98059 抑制 MEK1/2 后,发现氟化钠引起的肺上皮细胞凋亡数量将会增加,所以 ERK 的活化很明显的刺激了细胞的增殖能力,提示在氟化钠的作用下,肺上皮细胞中 ERK 的激活会阻碍细胞凋亡、维持细胞继续增殖和生长^[10]。K. H. Lau 等认为一定剂量的氟能特异性抑制成骨细胞内蛋白酪氨酸磷酸酶(PTP)的活性,进一步导致 MAPK/ERK 有丝分裂信号转导途径中起关键作用的信号转导蛋白磷酸化水平持续增加,增强由生长因子介导的促骨细胞增殖作用,表明氟可以促进 PTP 的活化,使 MAPK/ERK 信号转导能力增加,促进促骨细胞的

增殖作用^[18]。N. V. Bogatcheva 等研究肺动脉内皮细胞中 MAPK/ERK 信号变化时,发现 MAPK/ERK 信号通路的转导会在氟化物作用下激活^[19]。因此,本试验结果说明氟化物通过影响 ERK 通路相关基因的转录以及蛋白的翻译,进而刺激脾淋巴细胞的增殖。但是,在 A549 人肺上皮细胞和人成釉细胞谱系细胞中,一定剂量的氟化物也会促进 MAPK 通路中 p38MAPK、JNK 的激活,抑制细胞的增殖而促进细胞凋亡,最终导致细胞凋亡率增加,细胞数目减少^[20-21]。因此,推断氟化钠对脾淋巴细胞的影响,可能是由于同时激活了增殖和凋亡两条通路,而凋亡通路的激活占主导地位所致,但其具体作用机制,仍需继续研究氟化钠对凋亡通路的影响,进一步确认此结论。

4 结 论

氟化钠可以在一定浓度范围内影响小鼠脾淋巴细胞 ERK 通路的激活,从而进一步影响免疫系统的功能。

参考文献:

- [1] 王俊东,董希德. 畜禽营养代谢与中毒病[M]. 北京:中国林业出版社,2001:223-247.
- [2] WANG J, HONG J, LI J, et al. Effect of high fluoride and low protein on tooth matrix development in goats [J]. *Fluoride*, 2002, 35(1): 51-55.
- [3] WAN S, ZHANG J, WANG J. Effects of high fluoride on sperm quality and testicular histology in male rats [J]. *Fluoride*, 2006, 39(1): 17-21.

- [4] ZHANG M, WANG A, HE W, et al. Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons [J]. *Toxicology*, 2007, 236(3): 208-216.
- [5] LOFTENIUS A, ANDERSSON B, BUTLER J, et al. Fluoride augments the mitogenic and antigenic response of human blood lymphocytes *in vitro* [J]. *Caries Res*, 1999, 33(2): 148-155.
- [6] 张侃侃. 氟对大鼠脾脏 MAPK 信号通路相关基因及蛋白表达的影响[D]. 山西: 山西农业大学, 2010.
- [7] ROBINSON M J, COBB M H. Mitogen-activated protein kinase pathways[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1997, 9(2): 180-186.
- [8] 马莲环, 刘建. ERK1/2 的研究进展[J]. 国外医学: 生理、病理科学与临床分册, 2005, 25(3): 279-282.
- [9] TRAVERSE S, GOMEZ N, PATERSON H, et al. Sustained activation of the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade may be required for differentiation of PC12 cells. Comparison of the effects of nerve growth factor and epidermal growth factor[J]. *Biochem J*, 1992, 288(2): 351-355.
- [10] THRANE E V, REFSNES M, THORESEN G H, et al. Fluoride-induced apoptosis in epithelial lung cells involves activation of MAP kinases p38 and possibly JNK[J]. *Toxicol Sci*, 2001, 61(1): 83-91.
- [11] 韩博, 尹文利, 史言, 等. 氟对动物机体免疫功能的影响[J]. 动物医学进展, 1999, 20(3): 9-11.
- [12] 张广和, 于志慧, 杜小平, 等. 氟中毒对小鼠脾脏组织形态学研究[J]. 国外畜牧学(猪与禽), 2009, 29(3): 105-107.
- [13] 郭晓英, 孙贵范, 金亚平, 等. 氟对小鼠脾淋巴细胞增殖反应的影响[J]. 中国地方病学杂志, 2001, 20(11): 32-33.
- [14] 姜勇, 罗深秋. 细胞信号转导的分子基础与功能调控[M]. 北京: 科学出版社, 2005.
- [15] KYRIAKIS J M, AVRUCH J. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation[J]. *Physiol Rev*, 2001, 81(2): 807-869.
- [16] MURPHY L O, SMITH S, CHEN R H, et al. Molecular interpretation of ERK signal duration by immediate early gene products[J]. *Nat Cell Biol*, 2002, 4(8): 556-564.
- [17] LEWIS T S, SHAPIRO P S, AHN N G. Signal transduction through MAP kinase cascades[J]. *Adv Cancer Res*, 1998, 74: 49-139.
- [18] LAU K H, BAYLINK D J. Molecular mechanism of action of fluoride on bone cells[J]. *J Bone Miner Res*, 1998, 13(11): 1660-1667.
- [19] BOGATCHEVA N V, WANG P, BIRUKOVA A A, et al. Mechanism of fluoride-induced MAP kinase activation in pulmonary artery endothelial cells[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2006, 290(6): L1139-L1145.
- [20] RIDLEY W, MATSUOKA M. Fluoride-induced cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E₂ production in A549 human pulmonary epithelial cells[J]. *Toxicol Lett*, 2009, 188(3): 180-185.
- [21] ZHANG Y, LI W, CHI H S, et al. JNK/c-Jun signaling pathway mediates the fluoride-induced down-regulation of MMP-20 *in vitro* [J]. *Matrix Biol*, 2007, 26(8): 633-641.

(编辑 白永平)