

NFATc1 在氟中毒大鼠破骨细胞中表达意义*

谢莹, 于燕妮, 陈锡山, 万良斌

摘要:目的 探讨活化 T 细胞核因子(NFAT)在慢性氟中毒大鼠氟骨症破骨细胞中的作用。方法 将 36 只 SD 大鼠按体重随机分为 3 组(每组 12 只,雌雄各半);对照组(饮水含氟 <0.5 mg/L)、低氟组(5.0 mg/L)、高氟组(50.0 mg/L),实验 8 个月后股动脉放血处死大鼠,取大鼠股骨下端,抗酒石酸酸性磷酸酶染色(TRAP)法进行破骨细胞分化鉴定;免疫组织化学法和原位杂交检测各组大鼠股骨组织中 NFATc1 蛋白及其 mRNA 表达。结果 NFATc1 在破骨细胞中表达阳性,与对照组 [(135.90 ± 1.03), (110.45 ± 1.55)] 比较,低氟组大鼠破骨细胞中 NFATc1 蛋白及 mRNA [(156.81 ± 1.26), (132.50 ± 1.58)] 表达均升高 ($P < 0.05$),高氟组大鼠破骨细胞中 NFATc1 蛋白及 mRNA [(135.46 ± 1.19), (110.26 ± 1.37)] 均呈下降趋势,但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 NFATc1 可能是氟中毒氟骨症破骨细胞分化调节的重要环节。

关键词: 氟骨症;破骨细胞;活化 T 细胞核因子(NFAU)

中图分类号: R 599

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2013)04-0530-04

Expression of NFAT mRNA and protein in osteoclasts of rats with chronic fluorosis

XIE Ying, YU Yan-ni, CHEN Xi-shan, et al (Department of Pathology, Guiyang Medical College, Guiyang, Guizhou Province 550004, China)

Abstract: **Objective** To study the role of nuclear factor of activated T cell 1(NFATc1) in the osteoclasts of rats with skeletal fluorosis caused by chronic fluorosis. **Methods** Thirty-six Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups according to their body weight(12 in each group, half male and half female); control group(sodium fluoride [NaF] <0.5 mg/L), low-dose fluoride group(5.0 mg/L NaF), high-dose fluorosis group(50.0 mg/L NaF). The rats were sacrificed after 8 months of fluoride treatment. The number of osteoclast inside the distal femur of the rats was counted by tartrate-resistant acid phosphatase staining(TRAP), and the protein and mRNA levels of NFATc1 inside the distal femur of the rats were detected by immunohistochemistry and in-situ hybridization. **Results** NFATc1 positive osteoclasts were observed. Compared to the control group(135.90 ± 1.03, 110.45 ± 1.55), the protein and mRNA expressions of NFATc1 were higher(156.81 ± 1.26, 132.50 ± 1.58) in the low-dose fluoride group(135.46 ± 1.19, 110.26 ± 1.37) ($P < 0.05$), but decreased in the high-dose fluoride groups ($P > 0.05$). **Conclusion** NFATc1 may play an important role in osteoclasts differentiation and regulation in the skeletal fluorosis caused by chronic fluorosis.

Key words: skeletal fluorosis; osteoclasts; NFATc1

破骨细胞起源于造血单核巨噬细胞系祖细胞,成骨细胞、骨髓基质细胞。研究证实,骨保护蛋白-核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)受体激活因子-NF- κ B 受体激活因子配体(osteoprotegerin-receptor activator for NF- κ B-receptor activator for NF- κ B ligand, OPG-RANK-RANKL)调节轴是影响破骨细胞分化、发育,调节功能的唯一终途径^[1],其相关基因在氟骨症中有表达改变^[2-3]。目前发现 OPG-RANK-RANKL 调节轴下游信号转导通路主要有 4 条^[4],即 NF- κ B 通路、有丝分裂原激活蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)通路、3-磷酸肌醇激酶/蛋白激酶 B(phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B, PI3K/PKB)通路和钙调神经磷酸

酶/活化 T 细胞核因子(calcineurin/nuclear factor of activated T cells, CaN/NFAT)通路。研究表明 PI3K/Akt 通路参与了氟骨症的发生发展^[5]。CaN/NFAT 通路是破骨细胞内与 RANK 相关的第 4 条信号传导通路,活化 T 细胞表面的核因子- κ B 受体激活物配体(RANKL)是破骨细胞分化的必要信号。近年发现,RANKL 下游信号分子活化 T 细胞核因子家族中的 NFATc1 与破骨细胞分化成熟及功能发挥等过程密切相关。本研究通过免疫组织化学和原位杂交方法检测氟骨症破骨细胞中 NFATc1 表达,以探讨 NFATc1 在氟骨症发病机制中作用。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 NFATc1 兔抗鼠多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司,抗体浓度 1:100),SP9000 免疫组化试剂盒、二氨基联苯胺显色试剂盒(北京中杉金桥生物技术有限公司);抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrateresistant acid phosphatase,

* 基金项目:科技部国际合作项目(2010DFB30530);贵州省科技厅社会发展攻关项目(黔科合 SY[2011]3006 号)

作者单位:贵阳医学院病理学教研室,贵州 贵阳 550004

作者简介:谢莹(1986-),女,湖南邵阳人,硕士在读,研究方向:地方性氟中毒。

通讯作者:于燕妮,E-mail:gyxybl2010@163.com

TRAP)染色试剂盒(天津血液研究所);NFATc1 原位杂交试剂盒(天津灏洋生物制品科技有限责任公司);Biomias 彩色图像分析仪系统(四川大学图像图形研究所)。

1.2 动物分组及处理 选取 4~5 周龄,体重 80~100 g 健康清洁级 SD 大鼠 36 只(四川大学实验动物中心),合格证号:SCXK(川)-2006-10。适应性喂养 1 周后,按体重随机分为 3 组,每组 12 只,组内雌雄各半,对照组自由饮用氟含量 <0.5 mg/L 自来水;低、高氟组分别自由饮用含氟 5.0、50.0 mg/L 自来水。各组大鼠饲以常规饲料(贵阳医学院实验动物中心提供,含氟量 <0.6 mg/kg)。8 个月后,收集大鼠 24 h 尿样,经股动脉放血处死大鼠。取股骨下端,剔除肌肉和结缔组织等软组织,一侧股骨立即投入中性甲醛固定液中,充分固定,脱钙,另一侧大鼠股骨于 -80 °C 冰箱保存待用。

1.3 指标及方法

1.3.1 大鼠氟斑牙发生情况 8 个月时,观察大鼠氟斑牙发生情况。氟斑牙分度标准为:Ⅰ度:门牙表面黄白相间,白垩条纹清晰;Ⅱ度:牙表面无光泽、可见粉笔样白色斑;Ⅲ度:牙表面出现小沟、裂纹或部分脱落,牙齿呈锯齿状严重缺损。

1.3.2 尿氟、骨氟含量检测 氟离子选择电极法测定尿氟;骨标本先炭化、灰化后再采用氟离子选择电极法测定骨氟。

1.3.3 骨组织形态计量 石蜡切片,苏木素-伊红染色(hematoxylin-eosin stain, HE),应用彩色图像分析仪测量股骨干骺端骨皮质厚度、骨小梁宽度、骨髓腔宽度、骨小梁百分比,每组每项指标随机选取 5 个视野,测定 5 个数值,取平均值。

1.3.4 破骨细胞计数 采用 TRAP 染色法,根据 TRAP 试剂盒说明书进行,阳性结果为胞质中出现鲜红色颗粒沉淀,阴性则胞质无着色。显微镜下计数每张切片所有阳性染色的破骨细胞。

1.3.5 破骨细胞中 NFATc1 蛋白表达检测 采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase method, SP)免疫组织化学染色法检测大鼠股骨下段破骨细胞中 NFATc1 蛋白表达情况,同时用磷酸盐缓冲液作为阴性对照,细胞浆或胞核出现棕黄色颗粒为阳性。每张切片随机选取 5 个视野,每个视野随机选取 5 个阳性表达区域,通过图像分析系统计算平均灰度值,进行蛋白定量分析(灰度值与蛋白表达水平呈正比)。

1.3.6 NFATc1 mRNA 检测 原位杂交检测大鼠股骨下段破骨细胞中 NFATc1 mRNA 表达。NFATc1 探针合成序列:5'-TGGTG GTGAC AGTTT TCCCC GTGAT TCG,按照原位杂交试剂盒说明书

操作。细胞浆或胞核显棕黄色为阳性。

1.4 统计分析 采用 SPSS 11.5 统计软件,首先对计量资料进行正态性检验及方差齐性检验,组间资料比较应用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠氟斑牙发生情况 对照组牙齿生长良好,低氟组大鼠氟斑牙检出率为 66.67% (8/12),高氟组氟斑牙检出率为 91.67% (11/12);染氟组大鼠牙齿呈现白色粉笔样改变(白垩状),少数大鼠牙齿表面出现小沟、裂纹甚至脱落,牙齿呈现锯齿状严重缺损。

2.2 各组大鼠尿氟、骨氟含量(表 1) 与对照组比较,染氟组大鼠尿氟、骨氟含量均升高,且呈现剂量效应($P < 0.05$)。

表 1 各组大鼠尿氟、骨氟含量($\bar{x} \pm s, n = 12$)

组别(mg/L)	尿氟含量(mg/L)	骨氟含量(mg/kg)
对照组	1.26 ± 0.17	305.58 ± 91.26
染氟组 5.0	2.06 ± 0.64 ^a	632.33 ± 123.21 ^a
50.0	7.69 ± 1.96 ^{ab}	1 088.75 ± 156.16 ^{ab}

注:与对照组比较, a $P < 0.05$;与低氟组(5.0 mg/L)比较, b $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠骨组织形态计量观察结果(表 2)

HE 染色光镜下显示,对照组大鼠骨皮质厚度均匀、骨小梁宽度均匀、数目适中、排列有序。与对照组比较,各染氟组大鼠骨小梁增生、变粗、排列紊乱,骨髓腔变窄,呈骨质硬化表现。形态计量指标显示,与对照组比较,各染氟组大鼠骨皮质变厚、骨小梁增宽、骨小梁密度增大,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。

2.4 破骨细胞鉴定及计数(图 1) TRAP 染色显示大部分破骨细胞位于股骨干骺端成骨区边缘骨小梁周边,形态不规则,体积较大,一般含多个核。对照组和低、高氟组破骨细胞数目分别为(1.26 ± 0.23)、(3.45 ± 1.85)、(2.74 ± 1.85)个,与对照组比较,低氟组破骨细胞数目增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);与低氟组比较,高氟组破骨细胞数目减少,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

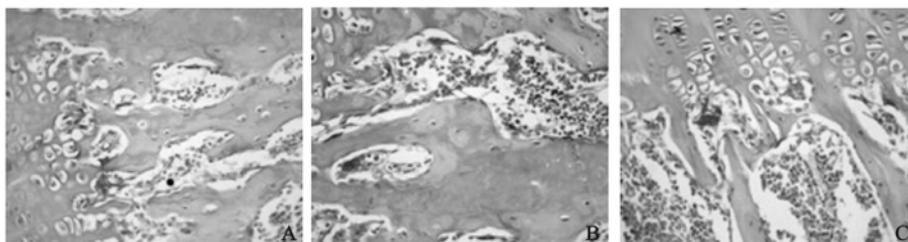
2.5 NFATc1 蛋白及 mRNA 表达(图 2、3)

NFATc1 在破骨细胞中表达阳性,对照组及低、高氟组大鼠破骨细胞中 NFATc1 蛋白及 mRNA 表达分别为(135.90 ± 1.03)、(110.45 ± 1.55)及(156.81 ± 1.26)、(132.50 ± 1.58)和(135.46 ± 1.19)、(110.26 ± 1.37),与对照组比较,低氟组均有升高($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠股骨形态计量学分析结果($\bar{x} \pm s, n = 12$)

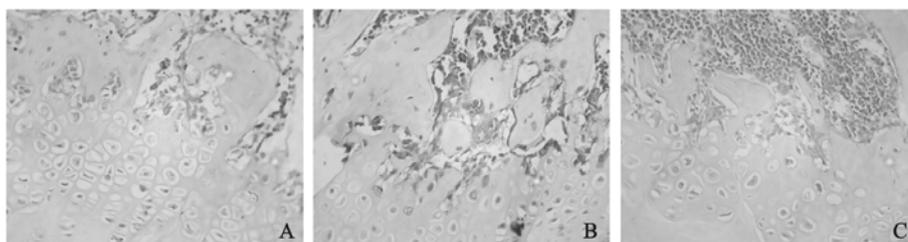
组别(mg/L)	骨小梁厚度 (μm)	骨髓腔宽度 (μm)	骨皮质厚度 (μm)	骨小梁密度 (%)
对照组	74.41 \pm 4.42	124.76 \pm 4.52	216.72 \pm 4.23	36.11 \pm 4.17
染氟组 5.0	92.79 \pm 5.07 ^a	104.43 \pm 3.01 ^a	232.82 \pm 7.01 ^a	44.63 \pm 2.71 ^a
50.0	105.06 \pm 4.58 ^{ab}	96.00 \pm 3.83 ^{ab}	254.41 \pm 3.99 ^{ab}	52.68 \pm 3.07 ^{ab}

注:与对照组比较, a $P < 0.05$; 与低氟组(5.0 mg/L)比较, b $P < 0.05$ 。



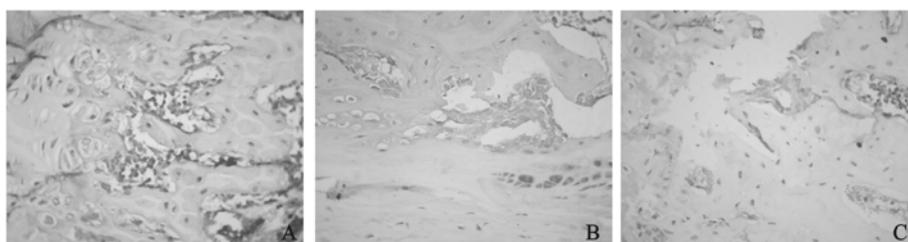
注:A:对照组;B:低氟组;C:高氟组。

图 1 破骨细胞鉴定(TRAP 染色, $\times 400$)



注:A:对照组;B:低氟组;C:高氟组。

图 2 破骨细胞 NFAT 蛋白表达(SP, $\times 400$)



注:A:对照组;B:低氟组;C:高氟组。

图 3 破骨细胞 NFAT mRNA 表达(原位杂交, $\times 400$)

3 讨论

氟骨症是氟中毒最严重的临床表现,通过动物实验和体外细胞培养发现骨转换加速是氟骨症的病变特征,其中破骨性吸收占相当重要地位^[6]。NFATc1 主要通过钙调节信号途径被激活^[7],破骨细胞分化最主要的通路为 RANKL/RANK 信号转导通路^[8],NFATc1 是该通路下游信号分子^[9]。曲勃颖等^[10]在研究犬乳恒牙替换生理过程中发现 NFATc1 的表达与乳恒牙替换过程中的破骨细胞分化和功能状态密切相关。刘凤祥等^[11]通过体外培养细胞发现,磨损颗粒诱导破骨细胞分化调节的机

制可能与 CaN/NFAT2 途径激活有关。进一步研究表明,在没有 RANKL 刺激情况下,单独激活 NFATc1 就可以诱导前体破骨细胞分化为成熟破骨细胞,而将 NFATc1 特异性阻断后,破骨细胞前体细胞将不能分化为破骨细胞。由此可以推测 NFATc1 对破骨细胞分化十分重要。

本研究结果显示,与对照组比较,各染氟组大鼠骨皮质变厚、骨小梁增宽、骨小梁密度增大,且有剂量效应,表明氟中毒大鼠骨组织骨骼病变呈骨质硬化表现,结果还显示,破骨细胞中 NFATc1 基因及蛋白水平在低氟组表达增强,高氟组表达降低,与 TRAP 计数结果一致。表明低氟组破骨活动增强,

骨吸收活跃,而在高氟组,可能是由于染氟剂量过高、时间过长,造成破骨细胞严重受损,使其不能发挥正常生理功能,导致骨形成超过骨吸收,从而造成骨量增加,这种病理性转换最终引发骨质硬化改变,导致氟骨症的发生。提示 NFATc1 表达与破骨细胞分化和功能密切相关,NFATc1 参与了氟骨症的发生发展过程。

参考文献

- [1] 叶超群,纪树荣,钟兴明. RANKL-RANK-OPG 骨调节轴[J]. 首都体育学院学报,2006,18(6):61-64.
- [2] 肖宇明,孙秀娟,于燕妮,等. 丹蓝仙硼疗氟胶囊对氟中毒大鼠骨保护素/核因子- κ B 受体活化因子配体/核因子 κ B 受体活化因子系统表达水平的影响[J]. 中国地方病学杂志,2010,29(5):487-492.
- [3] 孙秀娟,于燕妮,肖宇明,等. 丹蓝仙硼疗氟胶囊对氟中毒大鼠骨保护蛋白配体和巨噬细胞集落刺激因子基因及其蛋白表达水平的影响[J]. 中华病理学杂志,2010,39(10):695-700.
- [4] 姚静,侯加法. OPG/RANKL/RANK 系统的研究进展[J]. 动物医学进展,2006,27(2):5-9.
- [5] 朱海振,于燕妮,邓超男,等. 氟对大鼠骨组织 PI3K 和 Akt mRNA 及其蛋白表达的影响[J]. 中国地方病学杂志,2011,30(3):261-265.
- [6] 李广生,井玲,徐辉. 地方性氟中毒发病机制的研究进展[J]. 中华病理学杂志,2005,34(10):632-634.
- [7] Sun L, Peng YZ, Zaidi N, et al. Evidence that calcineurin is required for the genesis of bone-resorbing osteoclasts[J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2007, 292:285-291.
- [8] Sundaram K, Nishimura R, Senn J, et al. RANK ligand signaling modulates the matrix metalloproteinase-9 gene expression during osteoclast differentiation [J]. Exp Cell Res, 2007, 313(1):168-178.
- [9] Han KY, Yang D, Chang EJ. Inhibition of osteoclast differentiation and bone resorption by sauchinone [J]. Biochemical Pharmacology, 2007, 74(6):911-923.
- [10] 曲勃颖,黄洋,赵晶,等. 犬乳恒牙替换期间活化 T 细胞核因子 NFATc1 表达的研究[J]. 现代口腔医学杂志,2009,23(6):627-630.
- [11] 刘凤祥,朱振安,毛远青,等. 钛颗粒诱导破骨细胞分化过程中活化 T 细胞核因子 c1 的表达[J/CD]. 中华关节外科杂志,2009,3(1):44-50.

收稿日期:2012-05-26

(解学魁编辑 周欣琳校对)

· 实验研究 ·

微囊藻毒素-LR 对小鼠肝甲基转移酶活性影响*

何灏逾¹, 农清清¹, 韦宏旷¹, 陆继培¹, 李春宏¹, 荆敏²

摘要:目的 观察微囊藻毒素-LR (MCLR) 暴露对小鼠肝组织 DNA 甲基转移酶 (DNMTs) 活性的影响。方法 80 只昆明小鼠,雌雄各半,随机分为 4 组,每组 20 只,即对照组(生理盐水)及 MCLR 低、中、高剂量组 (MCLR 5、10、20 μ g/kg),1 次/d 经腹腔注射染毒,分别于染毒第 11、21 d 测定肝功能生化指标,观察肝脏组织形态学变化,检测 DNMTs 酶活性。结果 染毒 11 d 时,与对照组比较,低剂量 MCLR 组小鼠肝脏谷丙转氨酶 (ALT)、谷草转氨酶 (AST) 和碱性磷酸酶 (ALP) 无明显变化,高剂量组 ALT、AST、ALP 酶活性均升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);染毒 21 d 时,与对照组比较,各剂量 MCLR 组小鼠肝脏 ALT 和 AST 水平均升高,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);染毒 11、21 d 时,低、中、高 MCLR 组小鼠 DNMTs 酶活性分别为 (89 135.7 \pm 14 334.7)、(92 645.8 \pm 15 962.3)、(70 481.3 \pm 15 621.3) 和 (59 115.6 \pm 9 884.6)、(83 310.7 \pm 15 066.3)、(86 612.5 \pm 20 572.8) RFU/(h \cdot mg),均高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 MCLR 暴露可引起 ALT、AST、ALP 水平升高,肝组织 DNMTs 酶活性升高。

关键词:微囊藻毒素-LR (MCLR);DNA 甲基转移酶 (DNMTs) 活性;肝功能

中图分类号:R-33

文献标志码:A

文章编号:1001-0580(2013)04-0533-03

Effect of microcystin-LR on DNA methyltransferase activity in mouse liver

HE Hao-yu*, NONG Qing-qing, WEI Hong-kuang, et al (* Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region 530021, China)

Abstract: Objective To observe the effects of microcystin-LR (MCLR) on methyltransferase activity in mice liver. **Methods** Eighty mice were randomly divided into 0, 5, 11 and 21 μ g/kg group according to the dose of MCLR. MCLR was administered for 10 and 20 days, respectively. The liver function and DNA methyltransferase activity were determined. Morphological changes of livers were observed. **Results** Compared with the 0 μ g/kg group, the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) in serum of the 5 μ g/kg group were not obviously different after the exposure of 11 days. The levels of ALT, AST, and ALP in 20 μ g/kg group

* 基金项目:广西自然科学基金(2012GXNSFAA053155);广西高等学校重点资助科研项目(201202ZD024);2011 年广西高校优秀人才资助计划项目
作者单位:1. 广西医科大学公共卫生学院职业卫生与环境毒理学教研室,广西 南宁 530021; 2. 广西医科大学第一附属医院检验科
作者简介:何灏逾(1986-),男,广西柳州人,硕士在读,研究方向:环境毒理学。
通讯作者:农清清, E-mail: nnqq26@163.com