

氟染毒对大鼠皮肤成纤维细胞中SOST及DKK1蛋白表达的影响

刘晓利¹, 刘芳盈¹, 孟超¹, 李平¹, 张殿平¹, 宋菁², 刘克俭³

摘要:

[目的] 观察氟染毒对体外培养新生大鼠皮肤成纤维细胞硬骨素(sclerostin, SOST)和Dickkopf-1(DKK1)蛋白表达的影响。

[方法] 采用原代培养方法,将大鼠皮肤成纤维细胞分为对照组(0 mg/L)和7个染氟剂量组(0.000 1、0.001、0.01、0.1、1、10、20 mg/L),分别在4个染氟时间段(24、48、72、96 h)收集细胞培养上清液,应用ELISA法测定SOST和DKK1蛋白表达水平。

[结果] 与染氟0 mg/L组相比,SOST表达量在染氟48 h的0.000 1、0.001、0.01 mg/L组,染氟72 h的1、10 mg/L组及染氟96 h的0.001、0.01、0.1、1 mg/L组均明显下降($P < 0.05$)。与染氟24 h组相比,SOST表达量在染氟48 h的0.01 mg/L组,染氟96 h的0.001、0.01、0.1、1、10 mg/L组均明显下降($P < 0.05$)。与染氟0 mg/L组相比,DKK1表达量在染氟48 h的0.001 mg/L组,染氟72 h的0.01、0.1、1、10、20 mg/L组及染氟96 h的0.01、0.1、1、10、20 mg/L组均明显下降($P < 0.05$)。与染氟24 h组相比,DKK1表达量在染氟48 h的0.000 1、0.001、0.01 mg/L组,染氟72 h的0.001、0.01、1、10、20 mg/L及染氟96 h的0.01、0.1、1、20 mg/L组均明显下降($P < 0.05$)。

[结论] 氟可导致大鼠皮肤成纤维细胞SOST和DKK1蛋白表达下调。

关键词: 硬骨素; DKK1; 成纤维细胞; 氟

引用: 刘晓利, 刘芳盈, 孟超, 等. 氟染毒对大鼠皮肤成纤维细胞中SOST及DKK1蛋白表达的影响[J]. 环境与职业医学, 2017, 34(10): 914-917. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.17156

Effects of fluoride exposure on expression of SOST and DKK1 in rat skin fibroblasts LIU Xiao-li¹, LIU Fang-ying¹, MENG Chao¹, LI Ping¹, ZHANG Dian-ping¹, SONG Jing², LIU Ke-jian³ (1.Zibo Center for Disease Control and Prevention, Zibo, Shandong 255026, China; 2.Department of Epidemiology and Biostatistics, School of Public Health, Peking University, Beijing 100191, China; 3.Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430030, China). Address correspondence to LIU Ke-jian, E-mail: lkj484@sohu.com · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To observe the changes of protein expressions of sclerostin (SOST) and dickkopf-1 (DKK1) in fibroblasts of rat skin following fluoride exposure.

[Methods] Rat skin fibroblasts were cultured with fluoride at different 0, 0.000 1, 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, and 20 mg/L. The expression levels of SOST and DKK1 in cell culture supernatants were detected at four exposure time points (24, 48, 72, and 96 h) by ELISA.

[Results] The expression levels of SOST of the 0.000 1, 0.001, 0.01 mg/L fluoride groups at 48 h, the 1 and 10 mg/L fluoride groups at 72 h, and the 0.001, 0.01, 0.1, and 1 mg/L fluoride groups at 96 h were significantly lower than that of the 0 mg/L fluoride group ($P < 0.05$). The expression levels of SOST of the 0.01 mg/L fluoride group at 48 h and the 0.001, 0.01, 0.1, 1, and 10 mg/L fluoride groups at 96 h were significantly lower than those of the groups at 24 h ($P < 0.05$). The expression levels of DKK1 of the 0.001 mg/L fluoride group at 48 h, the 0.01, 0.1, 1, 10, and 20 mg/L fluoride groups at 72 h, and the 0.01, 0.1, 1, 10, and 20 mg/L fluoride groups at 96 h were significantly lower than that of the 0 mg/L fluoride group ($P < 0.05$). The expression levels of DKK1 of the 0.000 1, 0.001, 0.01 mg/L fluoride groups at 48 h, the 0.001, 0.01, 1, 10, and 20 mg/L fluoride groups at 72 h, and the 0.01, 0.1, 1, and 20 mg/L fluoride groups at 96 h were significantly lower than those of the groups at 24 h ($P < 0.05$).

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: 81072255、81372941)

[作者简介] 刘晓利(1986—),女,硕士生;研究方向: 氟中毒; E-mail: 527422802@qq.com

[通信作者] 刘克俭, E-mail: lkj484@sohu.com

[作者单位] 1. 山东省淄博市疾病预防控制中心, 山东 淄博 255026; 2. 北京大学医学部公共卫生学院流行病学与卫生统计学系, 北京 100191; 3. 华中科技大学同济医学院公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系, 湖北 武汉 430030

[Conclusion] Fluoride can cause down-regulation of expression of SOST and DKK1 in rat skin fibroblasts.

Keywords: sclerostin; dickkopf-1; fibroblast; fluoride bone injury

Citation: LIU Xiao-li, LIU Fang-ying, MENG Chao, et al. Effects of fluoride exposure on expression of SOST and DKK1 in rat skin fibroblasts[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2017, 34(10): 914-917. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2017.17156

由于长期的氟暴露引起氟在体内蓄积,导致以广泛性骨质增生硬化为主要表现的慢性代谢性骨病,即氟性骨损伤,是严重危害暴露人群身心健康和阻碍社会发展的公共卫生问题。研究发现,Wnt/ β -catenin信号转导通路在骨形成中发挥重要作用,被认为是调控成骨细胞分化和骨基质形成的关键途径^[1]。硬骨素(sclerostin, SOST)及Dickkopf-1(DKK1)是Wnt/ β -catenin信号通路的重要调控因子,通过与Wnt蛋白的共受体——低密度脂蛋白受体相关蛋白5/6(low density lipoprotein receptor related protein 5/6, LRP5/6)结合,进而抑制Wnt/ β -catenin信号通路发挥作用,抑制成骨细胞分化和骨周化骨的形成^[2]。研究发现,在DKK1基因敲除的小鼠中,DKK1表达功能的缺失会导致小鼠骨量的增加,而DKK1的过度表达会导致小鼠骨量的下降^[3]。SOST的过度表达会导致小鼠骨量减少,SOST基因敲除的小鼠则表现为骨密度增加、骨强度增加和骨形成加速^[4]。前期本课题组对SD大鼠进行16 mg/kg和32 mg/kg连续90 d的染氟实验,结果发现氟可导致成骨抑制因子SOST和DKK1表达水平降低,且染氟剂量与SOST和DKK1表达水平存在剂量-效应关系^[5]。成纤维细胞向成骨细胞方向转化并发挥成骨细胞作用,被认为是氟中毒引起的骨周围组织硬化骨化的重要因素。本研究观察在不同染毒时间和染毒剂量的氟作用下,新生大鼠皮肤成纤维细胞中SOST及DKK1蛋白表达水平的变化,为研究SOST及DKK1在氟中毒发病机制中的作用提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

CO₂培养箱(ThermoForma,美国)、VD21100型超净工作台(北京东联哈尔仪器制造有限公司,中国)、37XA-Z倒置式生物显微镜(上海光学仪器厂,中国)、centrifuge5415d型多功能酶标仪(Eppendorf,德国)、DMEM培养基(Hyclone,美国)、无支原体胎牛血清(杭州四季青公司,中国)、胰酶细胞消化液(碧云天生物技术有限公司,中国)、青霉素-链霉素溶液(碧云天生物技术有限公司,中国)、SOST检测试剂盒(北

京荣志海达生物科技有限公司,中国)、DKK1ELISA试剂盒(上海拜力生物科技有限公司,中国)。

1.2 大鼠成纤维细胞的原代培养

本实验采用组织块贴壁法培养新生大鼠皮肤成纤维细胞。将新生SD大鼠背部皮肤消毒后,置入-20℃冰箱中低温麻醉20 min,剥取2~3 cm²背部皮肤,放入体积分数75%乙醇中浸泡消毒10 s,之后转移至含双抗的PBS中浸泡1 min。将皮片剪成约1 mm³大小的组织块,均匀、平展地接种于6孔板板底,进行贴壁,贴壁后将6孔板盖好,翻转倒置放入37℃、体积分数5%二氧化碳(CO₂)、体积分数95%空气的培养箱中2 h,使组织块略干涸。之后,取出6孔板,每孔加入含质量分数10%胎牛血清、100 U/mL青霉素、100 mg/L链霉素的DMEM培养液各2 mL,常规培养。

1.3 染氟处理

取对数期细胞制备的单细胞悬液,以每孔 4×10^4 个细胞的密度接种于24孔培养板中,每孔加100 μ L染氟液和900 μ L含质量分数6%胎牛血清的DMEM培养基。采用氟化钠制备染氟液,每个剂量组氟离子的质量浓度为0.000 1、0.001、0.01、0.1、1、10、20 mg/L,染氟时间分别为24、48、72、96 h,每个剂量组设置6孔,同时设置对照组(0 mg/L)6孔。在不同的时间取细胞上清液,1 000 r/min,109 \times g,离心10 min,取上清于-20℃保存备用。

1.4 ELISA法测定SOST和DKK1蛋白表达水平

采用ELISA法测定SOST和DKK1蛋白表达水平,稀释5倍后的上清液与酶标试剂按质量浓度1:1的比例加入96孔酶标板中,空白对照孔不加样品及酶标试剂,标准孔加标准品及酶标试剂,轻轻晃动均匀,37℃温育60 min;弃去液体,甩干,用稀释后的洗涤液PBST进行洗涤并甩干,重复洗涤5次;每孔加入显色剂,37℃避光显色15 min;加终止液终止反应;以空白孔调零,在450 nm波长下测量各孔的吸光度值并计算SOST和DKK1蛋白表达水平。

1.5 统计学分析

采用SPSS 18.0软件进行统计学处理,采用单因

素方差分析、SNK 检验进行组间均数的比较, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 氟对成纤维细胞 SOST 表达的影响

由表 1 可见, 与 0 mg/L 组相比, SOST 表达量在染氟 48 h 时 0.000 1、0.001、0.01 mg/L 组, 染氟 72 h 时 1、10 mg/L 组, 染氟 96 h 时 0.001、0.01、0.1、1 mg/L 组均明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。与染氟 24 h 相比, SOST 表达量在染氟 48 h 时 0.01 mg/L 组, 染氟 96 h 时 0.001、0.01、0.1、1、10 mg/L 组均明显下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 氟对新生大鼠皮肤成纤维细胞 SOST 表达的影响
($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}, n=6$)

氟离子浓度 (mg/L)	SOST 蛋白表达水平			
	24h	48h	72h	96h
0	25.5 ± 1.73	25.8 ± 1.64	26.8 ± 0.82	22.6 ± 0.99
0.000 1	22.2 ± 2.49	20.6 ± 1.20*	24.5 ± 2.64	21.4 ± 0.80
0.001	22.8 ± 3.62	20.7 ± 1.71*	24.3 ± 2.68	18.1 ± 1.73*#
0.01	24.9 ± 2.36	19.2 ± 1.18*#	24.2 ± 2.88	20.1 ± 0.33*#
0.1	23.9 ± 3.80	24.6 ± 2.02	24.9 ± 4.93	20.4 ± 0.72*#
1	23.8 ± 0.47	24.6 ± 2.16	23.3 ± 3.10*	19.8 ± 1.50*#
10	25.4 ± 1.99	25.1 ± 1.09	23.8 ± 1.93*	22.6 ± 2.51#
20	25.5 ± 2.52	27.2 ± 0.45	25.6 ± 1.71	24.2 ± 1.19

[注]*: 与染氟 0 mg/L 组相比, $P < 0.05$; #: 与染氟 24 h 组相比, $P < 0.05$ 。

2.2 氟对成纤维细胞 DKK1 表达的影响

由表 2 可见, 与 0 mg/L 组相比, DKK1 表达量在染氟 48 h 时 0.001 mg/L 组, 染氟 72 h 时 0.01、0.1、1、10、20 mg/L 组, 染氟 96 h 时 0.01、0.1、1、10、20 mg/L 组均明显下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。与染氟 24 h 相比, DKK1 表达量在染氟 48 h 时 0.000 1、0.001、0.01 mg/L 组, 染氟 72 h 时 0.001、0.01、1、10、20 mg/L, 染氟 96 h 时 0.01、0.1、1、20 mg/L 组均明显下降, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 氟对新生大鼠皮肤成纤维细胞 DKK1 表达的影响
($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/L}, n=6$)

氟离子浓度 (mg/L)	DKK1 蛋白表达水平			
	24h	48h	72h	96h
0	24.1 ± 3.00	20.4 ± 1.27	25.1 ± 1.14	26.4 ± 1.79
0.000 1	24.3 ± 1.14	19.7 ± 2.49#	24.1 ± 1.60	25.8 ± 1.21
0.001	26.4 ± 2.07	16.3 ± 3.71*#	23.3 ± 2.49#	25.0 ± 1.05
0.01	24.5 ± 2.49	17.3 ± 1.18#	21.1 ± 0.68*#	22.1 ± 0.94*#
0.1	24.2 ± 1.36	22.3 ± 0.81	22.9 ± 0.94*	19.6 ± 1.31*#
1	25.1 ± 1.87	23.3 ± 2.28	21.8 ± 0.43*#	20.5 ± 0.79*#
10	23.1 ± 1.81	23.6 ± 1.55	21.0 ± 1.77*#	23.5 ± 0.74*
20	26.0 ± 1.94	23.5 ± 1.69	18.3 ± 1.80*#	21.3 ± 1.12*#

[注]*: 与染氟 0 mg/L 组相比, $P < 0.05$; #: 与染氟 24 h 组相比, $P < 0.05$ 。

3 讨论

SOST 和 DKK1 可以直接参与骨代谢的调节, 尽管 SOST 和 DKK1 都是通过与 LRP5/6 结合来调节 Wnt/ β -catenin 信号通路的, 但是它们之间并没有相互作用, 因为它们在结构上完全不同^[6]。在作为 LRP5/6 调节因子的时候, SOST 和 DKK1 是独立起作用的, DKK1 通过与 LRP5/6 的第三个 β 螺旋区域相结合来抑制 Wnt/LRP/受体蛋白(frizzled protein, Fz)三聚体的形成, 而 SOST 则是通过与 LRP5/6 的第一或是第二个 β 螺旋区域相结合来抑制 Wnt/LRP/Fz 三聚体的形成^[7]。

本研究观察了不同剂量的氟在不同作用时间段对外培养新生大鼠皮肤成纤维细胞 SOST 和 DKK1 蛋白表达水平的影响。本研究中剂量的设置参考了其他研究者的氟染毒细胞实验, 如井玲及魏海峰在研究氟对外成纤维细胞作用时, 将氟浓度设置为 0.1、1.0、10.0、100.0、1 000.0、10 000.0、20 000.0 $\mu\text{g/L}$ ^[8-9], 本研究参考其剂量设置并进行多次细胞增殖毒性实验, 通过观察氟对外培养大鼠皮肤成纤维细胞增殖活性的影响设定剂量范围^[10], 因此本研究剂量的选择具有一定的实验基础。

本研究利用 ELISA 法测定氟对外培养成纤维细胞 SOST 和 DKK1 表达的影响。研究发现, SOST 和 DKK1 表达在染氟高剂量组和低剂量组均较对照组相比有明显下降趋势, 且随着时间的延长, SOST 和 DKK1 的表达也呈下降趋势。Pan 等^[11]在研究氟对原代培养大鼠成骨细胞分化影响时发现, 氟可促进成骨细胞型胶原蛋白 $\alpha 1$ 、碱性磷酸酶的表达并可抑制成骨细胞 DKK1 的表达。而氟对 SOST 蛋白表达水平的影响研究比较少, 但 SOST 与 DKK1 共同作为 Wnt/ β -catenin 信号通路的抑制蛋白, 且 SOST 在骨骼系统相关疾病中起到重要作用, 因此本研究同时对两种蛋白进行了研究。

本研究从细胞实验角度研究氟对 SOST 和 DKK1 蛋白表达水平的影响, 尚存在许多局限性。一是本研究未进行重组蛋白干预实验, 干预实验能更加明确此两种蛋白能否成为氟中毒早期干预的新靶点; 二是未研究氟作用下 SOST 和 DKK1 mRNA 转录水平的变化, 后续课题组将进行更加深入的研究。

参考文献

- [1] Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors[J]. J

- Biol Chem, 2006, 281(32): 22429-22433.
- [2] Shi Y C, Worton L, Estehen L, et al. Effects of continuous activation of vitamin D and Wnt response pathways on osteoblastic proliferation and differentiation[J]. Bone, 2007, 41(1): 87-96.
- [3] Yamabuki T, Takano A, Hayama S, et al. Dkkopf-1 as a novel serologic and prognostic biomarker for lung and esophageal carcinomas[J]. Cancer Res, 2007, 67(6): 2517-2525.
- [4] Balemans W, Van Hul W. Human genetics of SOST[J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2006, 6(4): 355-356.
- [5] 李长城. SOST/DKK1 调控 Wnt 通路在氟性骨损伤发生中作用的实验研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2012.
- [6] Bourhis E, Wang W, Tam C, et al. Wnt antagonists bind through a short peptide to the first β -propeller domain of LRP5/6[J]. Structure, 2011, 19(10): 1433-1442.
- [7] Bodine P V, Zhao W, Kharode Y P, et al. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice[J]. Mol Endocrinol, 2004, 18(5): 1222-1237.
- [8] 井玲. 氟化物刺激成纤维细胞成骨表型表达及其在氟骨症骨周化骨发生机制中的作用[D]. 长春: 吉林大学, 2006.
- [9] 魏海峰. 染氟成纤维细胞和成骨细胞 IGF-1 及 bFGF 的表达及其意义[D]. 长春: 吉林大学, 2007.
- [10] 刘晓利, 李长城, 刘克俭, 等. 氟对成纤维细胞核心结合因子 $\alpha 1$ 及增殖活性量 - 效关系的影响[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(28): 5232-5236.
- [11] Pan L, Shi X, Liu S, et al. Fluoride promotes osteoblastic differentiation through canonical Wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. Toxicol Lett, 2014, 225(1): 34-42.

(收稿日期: 2017-02-15; 录用日期: 2017-05-17)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 汪源; 校对: 陈姣)

【告知栏】

《临床职业病学》(第三版) 书讯

北京大学第三医院赵金垣教授主编的新书《临床职业病学》(第三版), 将于2017年10月由北京大学医学出版社出版发行。该书前两版由于紧密结合实际, 资料丰富, 且附有思考题、病例介绍及点评等内容, 具有很好的教学性、可读性、趣味性及引导性。深受读者好评, 不少地方甚至将其列为继续教育的规范教材。

本书第三版针对我国重新修改《职业病防治法》之后, 法定职业病范围大幅调整扩展带来的新问题, 重新编排章节, 内容大幅扩充, 增加了数十种新病因, 强化了职业病管理、预防章节, 进一步汲取了国内外相关学科理论和临床最新进展, 提出和更新了不少重大传统概念, 如职业病与工伤、急性中毒与工伤、职业性呼吸系统疾病分类、职业性脑白质病概念、职业性急性肾损伤分级等; 展示了不少职业性难治性疾病如矽肺、CO 中毒迟发脑病、化学性呼吸窘迫综合征、三氯乙烯药疹样皮炎等新的治疗策略, 对指导临床实践, 开拓研究思路, 均具有重要价值。

本书不仅可用于高等院校长学制医学生的教学, 也可用作职业病专业研究生和临床医师高级专业参考书, 对综合医院内科、急诊科及劳动卫生、环境医学专业医师也具有参考价值。