

亚慢性氟中毒对大鼠骨组织 Runx2 mRNA表达的影响

郭晓英, 吴思思, 何杨, 孙贵范

(中国医科大学公共卫生学院地球化学性疾病研究室, 辽宁省砷生物学作用与砷中毒重点实验室, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: **目的** 观察亚慢性氟中毒对大鼠骨组织中转录因子 Runx2 mRNA表达的影响, 探讨 Runx2在氟骨症发生中的可能作用。 **方法** 40只 Wistar大鼠按体重随机分成4组, 染氟组大鼠饮用含氟 50、100、150 mg/L的自来水, 对照组大鼠饮用自来水; 3个月后测定大鼠血清及骨组织氟含量, 并采用 SYBR Green Real time RT-PCR法检测骨组织中 Runx2 mRNA表达情况, 同时观察骨组织病理学改变。 **结果** HE染色显示染氟组大鼠呈现骨皮质增厚、骨小梁增多等骨硬化表现; 染氟组大鼠骨组织中 Runx2 mRNA表达显著高于对照组, 且随染毒剂量升高, 表达亦逐渐升高。 **结论** 过量的氟可能通过增加骨组织 Runx2基因表达水平来促进间充质干细胞向成骨细胞系分化, 使骨形成增加。

关键词: 氟中毒; 转录因子 Runx2 实时定量反转录聚合酶连锁反应 (Real time RT-PCR)

中图分类号: R599.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2011)02-0086-03

Effects of subchronic fluorosis on expression of Runx2 mRNA in bone tissue of rat

GUO Xiaoying WU Sisi HE Yang SUN Guifan

(Department of Biogeochemical Disease, Liaoning Provincial Key Laboratory of Arsenic Biological Effect and Poisoning School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: **Objective** Observing the effect of subchronic fluoride poisoning on the expression of Runx2 mRNA in bone tissue of rats to explore the role of Runx2 played in pathogenesis of skeletal fluorosis. **Methods** 40 Wistar rats were divided into four groups randomly according to body weight. Rats in experimental groups were given 50, 100 or 150 mg/L of fluorine containing water, the controls only given tap water. Three months later, the fluorine levels in serum and bone tissue and the expression of Runx2 mRNA in bone tissue, the latter used SYBR Green Real time RT-PCR method, were all detected, meanwhile the pathological change was also examined. **Results** The pathological examination showed that there were some thickening of cortical bone, increasing of bone trabeculae etc., and the detection of Runx2 mRNA expression in bone tissue was also dose dependently risen in the rats treated with fluoride. **Conclusion** The results suggested that high levels of fluoride might enhance the expression of Runx2 in bone tissue, thereby promote the differentiation of mesenchymal stem cells to bone cell and increase the formation of bone.

Key words: fluorosis; transcription factor Runx2; real time reverse transcription polymerase chain reaction (Real time RT-PCR)

氟是人体必需的微量元素之一, 适量的氟对人体具有重要的生理功能, 但长期摄入过量的氟可引起氟斑牙和氟骨症为主的慢性全身性疾病。成骨细胞活跃和骨转换加速是氟骨症的特征性病变^[1]。成骨细胞是骨形成的主要功能细胞, 由多潜能的骨髓间充质干细胞 (mesenchymal stem cells, MSCs) 经骨祖细胞、前成骨细胞等阶段分化而来的。然而, 间充质干细胞具有多向分化潜能, 不同刺激条件下可向成骨细胞、成脂肪细胞、成软骨细胞和成肌细胞分化。Runx2又称核心结合因子 (Cbfa1) 是成骨细胞的特

异性转录因子, 能激活与启动 MSCs向成骨细胞系分化并调节成骨细胞分化和功能, 对骨组织的形成和骨重建起重要作用^[2,3]。为了研究作为调控骨形成关键因子的 Runx2在氟骨症中的作用, 本文通过建立亚慢性氟中毒大鼠模型, 应用 SYBR Green Real time RT-PCR检测过量的氟对大鼠骨组织 Runx2 mRNA表达的影响, 同时结合氟中毒大鼠骨组织的病理学改变, 探讨 Runx2与氟中毒骨相损害之间的关系。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

NaF (分析纯): Bio Basic Inc.; RNA later, RNA Clean up, Qiagen; RNAisoTM Plus, 宝生物工程 (大连) 有限公司; 氯仿、异丙醇 (分析纯): 北京化工厂; Quant cDNA第一链合成试剂盒、RealMaster Mix (SYBR Green), 天根生化科技有限公司; 引物合成:

收稿日期: 2010-11-30 修回日期: 2011-01-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30600509); 氟对破骨细胞分化传导环路的影响

作者简介: 郭晓英 (1974-), 女, 副教授, 博士, 研究方向: 地方病学。E-mail: xyguo@mail.mcu.edu.cn

上海生工生物工程技术有限公司。

冷冻混合球磨仪: Retsch real-time PCR 仪: Roche LightCycler 480 光学显微镜: OLYMPUS

1.2 实验动物分组及染毒

40只清洁级 Wistar大鼠 (体重 100~120 g), 雌雄各半, 由中国医科大学实验动物中心提供 [许可证号: SYXK (辽) 2008-0005]。适应性饲养观察 1 周后, 按体重均衡原则随机分为 4 组, 每组 10 只。对照组饮用自来水 (自来水含 F 为 0.118 mg/L), 染氟组经饮水加入分析纯氟化钠, 低氟组饮用含 F⁻ 50 mg/L (NaF 110.5 mg/L) 的自来水, 中氟组饮用含 F⁻ 100 mg/L (NaF 221 mg/L) 的自来水, 高氟组饮用含 F⁻ 150 mg/L (NaF 331.5 mg/L) 的自来水, 各组大鼠自由进食普通饲料。动物室温度保持在 18~23℃, 相对湿度保持在 45%~55%。实验周期为 3 个月。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 取材 染毒 3 个月末, 乙醚麻醉大鼠后腹主动脉采血, 分离血清, -80℃冻存待测。取每只大鼠右侧股骨远端距生长板 3 mm 的骨组织, 4℃保存于 RNA later 中, 用以提取 RNA。取双侧胫骨, 保存于 -80℃, 用于骨氟含量检测。

1.3.2 骨氟及血清氟含量测定 骨氟含量采用管式炉高温燃烧水解法 氟离子选择电极法测定^[4], 血清氟含量采用酸消化扩散法测定^[5]。

1.3.3 大鼠骨组织病理学观察 大鼠股骨远端 1/3 经 4%多聚甲醛固定, 10% EDTA (pH 7.4) 脱钙后, 脱水、石蜡包埋, 制作 5 μm 石蜡切片, HE 染色, 光学显微镜下观察。

1.3.4 Real-time RT-PCR 方法检测大鼠骨组织中 Runx2 mRNA 表达情况 取保存于 RNA later 中的大鼠骨组织, 用冷冻混合球磨仪研磨至粉末状, 加入适量 RNAiso Plus 室温静置 5 min 12 000×g 4℃离心 5 min 吸取上清液加入 1/5 RNAiso Plus 体积氯仿, 剧烈振荡 15 s 后, 静置 5 min 12 000×g 4℃离心 15 min 吸取上清液加入等体积的异丙醇, 混匀后静置 10 min 12 000×g 4℃离心 10 min 75%乙醇清洗 RNA 后, 加入适量的 RNase free 水溶解沉淀。用 RNA Clean-up 纯化提取的 RNA 于 260 nm 波长检测 RNA 浓度, 取 1 μg 总 RNA 进行逆转录, 反应体系 (10 μl) 包括: 10×RT Mix 1 μl dNTP Mix 1 μl Oligo dT₁₅ 1 μl Quant Reverse Transcriptase 0.5 μl RNase free H₂O 5.5 μl 模板 RNA 1 μl 37℃孵育 60 min 采用 Roche LightCycler 480 荧光定量 PCR

仪行 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 反应。在 Gene Bank 中查找大鼠 Runx2、GAPDH mRNA 序列, 用 Primer 5.0 设计引物 (表 1)。选择 20 μl PCR 反应体系, 加入各反应成分: ReaMaster Mix/SYBR solution 9 μl 上下游引物 (10 mol/L) 各 0.6 μl DNA 模板 2 μl ddH₂O 7.8 μl 反应条件: Runx2 95℃、5 min; 95℃、10 s; 63℃、10 s; 68℃、10 s; 45 个循环。GAPDH 95℃、5 min; 95℃、30 s; 56℃、30 s; 68℃、10 s; 45 个循环。反应结束后, 采用 Roche LightCycler 480 software 分析 PCR 过程, 检测样本的 C 值, 以 GAPDH 为内参基因, 计算 ΔCt (C_{Runx2} - C_{GAPDH})、2^{-ΔΔCt} 值, 根据溶解曲线判断扩增产物的特异性。

表 1 引物序列

基因		引物序列 (5'-3')	长度 (bp)
Runx2	Sence	TAACGGTCTTCACAAATCCTC	145
Runx2	Anti-sense	GGCGGTCAGAGAACAACTA	
GAPDH	Sence	GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG	143
GAPDH	Anti-sense	ATGGTGGTGAAGACGCCAGTA	

1.4 数据处理

采用 SPSS 13.0 统计软件包进行分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠骨氟及血清氟测定

染氟 3 个月后, 各染氟组大鼠骨氟和血清氟含量显著高于对照组 (P<0.01), 而且随染氟剂量增高, 骨氟和血清氟含量逐渐升高 (表 2)。

表 2 大鼠骨氟和血清氟含量 (n=10 $\bar{x} \pm s$)

组别	骨氟 (mg/kg)	血清氟 (mg/L)
对照组	197.695±20.325	0.035±0.016
低氟组	394.526±64.740**	0.216±0.082**
中氟组	793.140±58.438**	0.340±0.043**
高氟组	1 670.340±148.304**	0.442±0.111**

注: 与对照组比较, ** P<0.01

2.2 氟对大鼠骨组织病理学影响

正常组大鼠骨皮质厚度均匀, 骨皮质和骨小梁表面可见单层排列的成骨细胞, 骨小梁附近可见少量散在分布的破骨细胞, 骺板软骨细胞柱状排列整齐 (见封三图 1A、B)。染毒组大鼠骨皮质增厚, 骨小梁增多、排列致密、小梁间网眼缩小, 骺板增厚, 增殖层软骨细胞和肥大层软骨细胞大量堆积且排列紊乱 (见封三图 1C、D)。随染氟剂量增加, 以上病理学

改变逐渐加重。

2.3 氟对大鼠骨组织 Runx2 mRNA表达的影响

由表 3可见,低、中、高氟组 Runx2 mRNA相对表达水平显著高于对照组,差异具有统计学意义 (P<0.05),且随染毒剂量升高,Runx2 mRNA相对表达水平逐渐升高。

表 3 氟对大鼠骨组织 Runx2 mRNA表达的影响 (x±s)

组别	n	Runx2 mRNA相对表达量
对照组	10	1.852±0.859
低氟组	10	44.972±15.353*
中氟组	10	85.034±17.133**
高氟组	10	145.420±30.872**

注:与对照组比较,*P<0.05 **P<0.01。

3 讨论

骨是人体至关重要的组织,人的一生中骨重建在不断进行,而骨重建过程中破骨与成骨过程的平衡是维持正常骨量的关键。成骨细胞是骨形成的主要功能细胞,负责骨基质的合成、分泌和钙化。成骨细胞是由具有多向分化潜能的骨髓间充质干细胞经骨祖细胞、前成骨细胞、成骨细胞等多个独立阶段分化而来的。Runx2属于 run结构域基因家族的转录因子。现已确认 Runx2为成骨特异性转录因子,通过作用于多条信号转导通路及多种调节蛋白影响多个成骨特异性基因的表达,在成骨细胞发育、分化和骨形成过程中起着至关重要的作用^[2,3]。Runx2能激活与启动间充质干细胞向成骨细胞系分化并调节成骨细胞的成熟,对膜内和软骨内成骨均有控制作用。

Komori等^[6]及 Otto等^[7]应用靶基因阻断或定点突变技术,成功地复制了 Runx2基因缺失或突变小鼠模型,并对其胚胎骨骼发育过程进行了研究。结果发现 Runx2^{-/-}小鼠成骨细胞分化完全受阻,出生后因没有肋骨不能呼吸而很快死亡。X线和组织切片显示完全没有骨化组织和成骨细胞形成,软骨膜区无血管和间充质细胞的侵入,因此整个软骨内成骨和膜内成骨过程均终止。进一步利用 Runx2^{-/-}颅盖骨细胞进行体内、体外研究,表明即使在有骨形态发生蛋白 2 (BMP-2)存在的条件下也不能分化为成骨细胞,但是这些细胞却保留着向脂肪细胞和软骨细胞分化的能力^[8]。而 Runx2^{+/-}小鼠的骨发育异常较轻,仅表现为锁骨发育不全和颅骨骨化的延迟等,类似于人体的锁骨头颅发育障碍综合征 (cleidocranial dysplasia

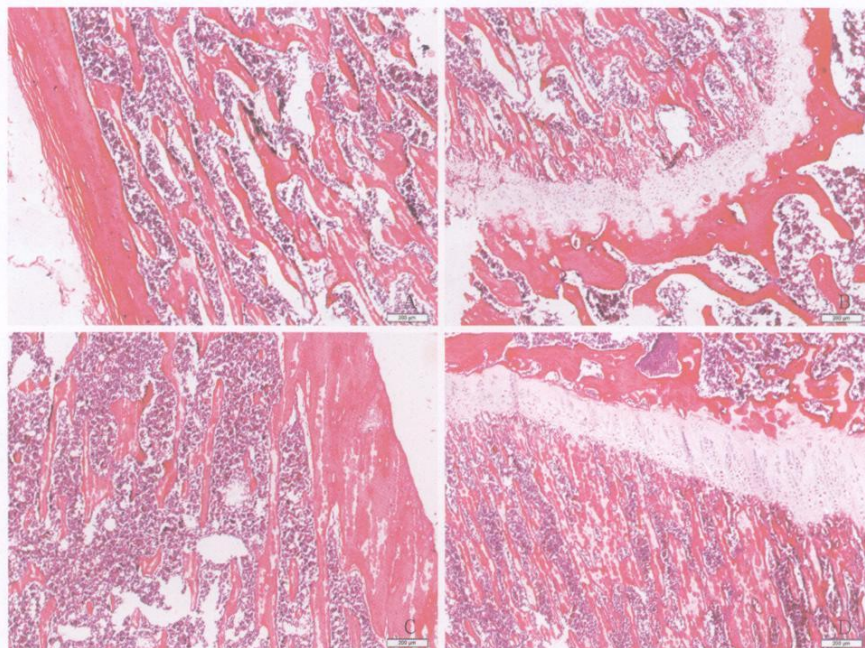
CCD)。

氟骨症是慢性氟中毒最严重的临床表现,其病理表现复杂多样。研究表明在氟骨症的发生发展过程中高骨转换状态是其重要特征,慢性氟中毒的骨硬化主要是由于成骨活动增强所致^[1]。本实验采用饮水加氟的方法,3个月后低、中、高染氟组血清氟和骨氟含量均显著高于对照组,且各染氟组大鼠均出现不同程度的氟斑牙,表明已成功建立了亚慢性氟中毒大鼠模型。骨组织病理学检查发现染氟组大鼠出现骨皮质增厚、骨小梁增多等骨硬化表现。我们同时采用 SYBR Green Real time PCR对大鼠骨组织进行了 Runx2基因表达的检测,发现过量氟可显著上调大鼠骨组织 Runx2 mRNA的表达。此结果与李丹等^[9]对体外培养大鼠乳鼠成骨细胞染氟后 Runx2表达上调相一致,表明氟通过过量表达的 Runx2促进间充质干细胞向成骨细胞系分化,进而增加骨形成。近年来的研究发现,多条信号传导通路参与对 Runx2表达的调控,如 Wnt/β-catenin通路、BMP/Smads通路、1,25二羟维生素 D/VDR/VDRE通路^[5],那么过量氟究竟是通过何种信号传导通路来上调 Runx2表达的,尚需进一步研究。

参考文献:

[1] 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.
[2] Komori T. Runx2, a multifunctional transcription factor in skeletal development [J]. J Cell Biochem. 2002 87 (1): 1-8.
[3] Otto F, Lian JB, Stein M. Upstream and downstream targets of Runx proteins [J]. J Cell Biochem. 2003 89 (1): 9-18.
[4] 张志瑜,翟城,钱聪,等. 高温燃烧水解氟电极法测定骨氟化物水平实验条件的研究 [J]. 中国地方病学杂志, 2006 25 (4): 450-452.
[5] 张志瑜,韩冰,钱聪. 痕量氟化物快速测定方法建立 [J]. 中国公共卫生, 2011 27 (2): 255-256.
[6] Komori T, Yagi H, Nomura S, et al. Targeted disruption of Cbfa1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts [J]. Cell. 1997 89 (5): 755-764.
[7] Mundlos S, Otto F, Mundlos C, et al. Mutations involving the transcription factor Cbfa1 cause cleidocranial dysplasia [J]. Cell. 1997 89 (5): 773-779.
[8] Kobayashi H, Gao Y, Ueda C, et al. Multilineage differentiation of cbfa1-deficient calvarial cells in vivo [J]. Biochem Biophys Res Commun. 2000 273 (2): 630-636.
[9] 李丹,王育珊,李艳辉,等. 氟对大鼠成骨细胞 Runx2表达的影响 [J]. 中国地方病学杂志, 2008 27 (4): 368-370.

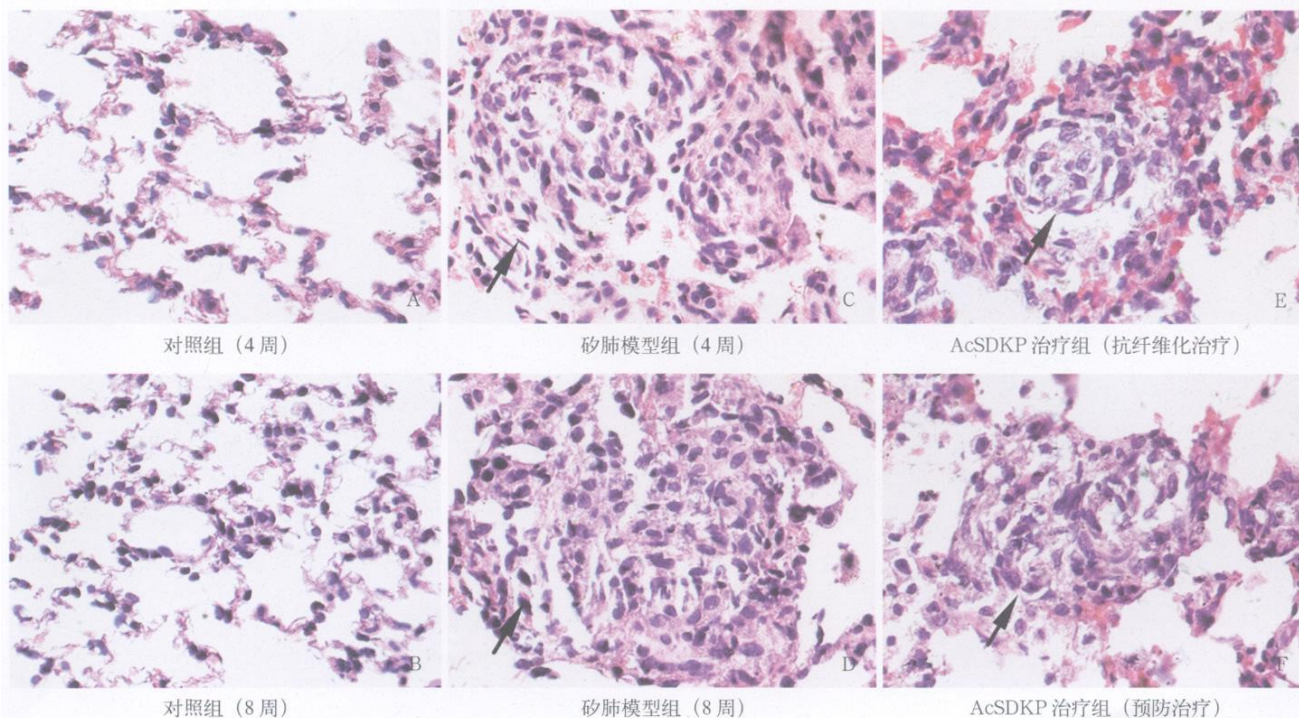
亚慢性氟中毒对大鼠骨组织 Runx2 mRNA 表达的影响 (正文见 86~88 页)



A、B——对照组, C、D——150 mg/L 染氟组

图1 氟中毒大鼠骨组织病理学改变 (HE, 40 ×).

AcSDKP 经由 PDGF 介导的细胞外信号调节激酶 1/2 的调节通路在大鼠矽肺纤维化形成中的作用(正文见 106~110 页)



注: C、D、E、F 图中箭头所指为细胞纤维性矽结节的形成, 矽结节面积 AcSDKP 治疗组 (E、F) 较矽肺模型组 (C、D) 有所减小。

图1 AcSDKP 对矽肺大鼠肺内矽结节形成的影响 (HE, 200 ×)