·实验研究·

氟对小胶质细胞 ROS 和 NO 含量的影响

Effect of fluoride on contents of ROS and NO in microglia cells

颜凌，王菲，刘盛男，席淑华，孙贵范

YAN Ling, WANG Fei, LIU Sheng-nan, XI Shu-hua, SUN Gui-fan

（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： 观察氟诱导活化后的小胶质细胞 ROS 和 NO 的生成状况，为进一步研究氟致中枢神经系统损伤机制提供实验依据。在细胞培养液中加入不同浓度（0、1、5、10、25、50 μg/ml）的 NaF，培养一定时间后检测小胶质细胞增殖活力、细胞内 ROS 及培养液 NO 含量。氟化钠能够增加细胞内 ROS 含量，50 μg/ml NaF 处理组，细胞内 ROS 含量与暴露时间正相关，1、5 μg/ml NaF 处理组，细胞内 ROS 含量与暴露时间负相关；BV-2 细胞短时间暴露于氟化钠，细胞培养液 NO 含量与染氟剂量正相关，而随着暴露时间延长，细胞培养液 NO 含量随染氟剂量升高而降低；随着时间增加，每个 NaF 处理组 NO 含量均增加。小胶质细胞活化后导致细胞内 ROS、培养液 NO 含量增加，且与时间、剂量相关。

关键词： 氟；小胶质细胞（MG）；ROS；NO

中图分类号： R995；O613.41 **文献标识码：** B

文章编号： 1002-221X(2012)01-0044-03

氟是机体生命活动所必需的微量元素之一，但长期摄入过量的氟会引起氟中毒，造成牙齿、骨骼等硬组织的损伤。有研究报道，长期高氟摄入甚至会危及神经系统[1]。脂质过氧化作用被普遍认为是氟的毒作用机制之一[2,3]，脑组织中富含多不饱和脂肪酸，是脂质过氧化作用的主要底物。当细胞过氧化能力增强时，可引起 ROS 蓄积，过多的活性氧自由基对人体具有损害作用，表现在细胞膜被破坏、血清抗蛋白酶失活、损伤基因导致细胞变异的出现和蓄积。小胶质细胞（microglia，MG）广泛分布在中枢神经系统（central nervous system，CNS），约占胶质细胞数目的 10%～20%，在神经元的生理活动中起着支持、营养、保护及修护等重要作用。本研究以 MG 为切入点，了解氟诱导活化后的小胶质细胞释放 ROS 和 NO 的状况，为进一步研究氟致中枢神经系统损伤机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

氟化钠（NaF），上海生工生物工程有限公司；DMEM 高糖培养基、胎牛血清、MTT，美国 Hyclone 公司；0.25% 胰蛋白酶，GiBoo 公司；DMSO、2′,7′-二氯荧光黄双乙酸盐（DCFH-DA），Sigma 公司；一氧化氮检测测试盒，碧云天生物技术研究所。

超净工作台，CO_2 恒温培养箱，倒置显微镜，流式细胞仪，S·HH·W2-1Cr型恒温水浴箱，3K18 型低速离心机，Sunrse 508Ⅰ型自动酶标分析仪。

1.2 细胞培养与染毒

小鼠小胶质细胞（BV-2）由中国协和医科大学基础医学细胞中心提供。细胞培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基中，置于 CO_2 培养箱中培养。待细胞增殖至培养瓶底 80%～90% 时，1∶3 传代。染毒时，细胞以一定的密度接种至各规格培养板或培养皿，待细胞进入对数生长期至 80% 融合后，以 DMEM 高糖培养基配制一定浓度 NaF 溶液，对细胞染毒。

1.3 细胞增殖活力测定

细胞以 1×10^4 个/ml 的密度接种于 96 孔板，继续培养。加入浓度 0、1、5、10、20、25、50、100 mg/L 的 NaF，分别在染毒 6、12、24、48、72 h，加入 MTT 溶液，继续孵育 4～6 h，终止培养，弃孔内培养上清液，加入 DMSO，振荡 10 min，使结晶充分溶解。490 nm 波长测定吸光度。实验数据以实验组的平均吸光度与对照组的平均吸光度的相对比值（相对活力）表示。

1.4 细胞内 ROS 的相对含量检测

细胞以 4×10^4 个/ml 的密度接种于 6 孔板。设无 DCFH-DA 探针的孔为阴性对照。继续培养，加入浓度为 0、1、5、10、20、25、50 mg/L 的 NaF，分别染毒 1、6、12、24 h，温 PBS 洗 2 次，加入 DCFH-DA 探针，孵育一定时间后取细胞沉淀，PBS 悬起细胞。488 nm 激发波长，525 nm 发射波长检测刺激后的荧光强度。每次计数10 000个细胞，以有荧光的 DCFH-DA（DCF）的平均荧光强度表示 ROS 生成量。最终实验数据以实验组的平均荧光强度与对照组的平均荧光强度的相对比值（相对荧光强度）表示。

1.5 细胞培养液中 NO 含量的测定

细胞以 1×10^4 个/孔的密度接种于96 孔板中，继续培养。加入浓度 0、1、5、10、20、25、50 mg/L 的 NaF，分别在染毒 1、6、12、24 h 后收集培养液上清，在 96 孔板中加入标准品及样品，每孔分别加 Griess Reagent Ⅰ和 Griess Reagent Ⅱ，540 nm 测定吸光度。

1.6 统计学分析

用 SPSS 13.0 统计软件进行统计分析，用 Kolmogorov-

收稿日期：2011-09-26；修回日期：2011-12-05

作者简介：颜凌（1987—），女，硕士研究生，研究方向：氟中毒。

通讯作者：席淑华，教授，研究方向：氟砷中毒。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

Smirnov 进行数据正态性分析。组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)，用 Levene Statistic 进行方差齐性检验，两两比较采用 LSD-t 检验或 Dunnett $T3$ 检验；相关分析用 Pearson Correlation 或非参数相关，以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 NaF 对 BV-2 细胞增殖活力的影响

BV-2 细胞染毒 6 h 后，100 μg/ml NaF 染毒组细胞增殖活力显著降低，差异有统计学意义($P<0.05$)，但在 1、5 μg/ml NaF 处理组，细胞增殖活力出现一个显著升高现象，且随染氟剂量的增加细胞增殖活力显著降低；染毒 12 h 后，10、100 μg/ml NaF 染毒组细胞增殖活力显著降低，差异有统计学意义($P<0.05$)，且随染氟剂量的增加细胞增殖活力显著降低；染毒 24 h 后，1、5、10、100 μg/ml NaF 染毒组细胞增殖活力显著降低，差异有统计学意义($P<0.05$)，且随染氟剂量的增加细胞增殖活力显著降低；染毒 48 h 后，1 μg/ml NaF 以上染毒组细胞增殖活力显著下降，差异有统计学意义($P<0.05$)，且随染氟剂量的增加细胞增殖活力显著降低；染毒 72 h后，50 μg/ml NaF 以上染毒组细胞增殖活力显著下降，差异有统计学意义($P<0.05$)，且随染氟剂量的增加细胞增殖活力显著降低，见表 1。

表 1 氟化钠对 BV-2 细胞增殖活力的影响($\bar{x}\pm s$，$n=5$)

NaF (μg/ml)	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	R 值	P 值
0	1.000±0.036	1.000±0.017	1.000±0.000	1.000±0.051	1.000±0.009	−0.002	0.994
1	1.077±0.046*	1.000±0.021	0.950±0.010*	0.902±0.037*	1.022±0.034	−0.442	0.027
5	1.068±0.022*	0.984±0.035	0.960±0.010*	0.932±0.033*	1.002±0.031	−0.499	0.011
10	1.026±0.045	0.945±0.014*	0.943±0.016*	0.923±0.019*	1.022±0.031	−0.087	0.680
25	1.014±0.056	0.948±0.059	0.916±0.054	0.844±0.058*	1.027±0.022	−0.137	0.515
50	1.002±0.051	0.939±0.026	0.871±0.042	0.810±0.050*	0.864±0.016*	−0.764	0.000
100	0.903±0.018*	0.781±0.014*	0.707±0.062*	0.718±0.077*	0.502±0.029*	−0.880	0.000
R 值	−0.517	−0.766	−0.809	−0.826	−0.684		
P 值	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000		

注：与对照组相比，* $P<0.05$。

2.2 NaF 对 BV-2 细胞内 ROS 含量的影响

BV-2 细胞染毒 1 h 后，1 μg/ml NaF 以上染毒组细胞内 ROS 含量显著升高，差异有统计学意义($P<0.05$)；染毒 6 h 后，1 μg/ml NaF 以上染毒组细胞内 ROS 含量显著升高，差异有统计学意义($P<0.05$)，且随染氟剂量增加细胞内 ROS 含量显著增加；染毒 12 h 后，10、50 μg/ml NaF 染毒组细胞内 ROS 含量显著升高，差异有统计学意义($P<0.05$)，且随染氟剂量增加细胞内 ROS 含量显著增加；染毒 24 h 后，25 μg/ml NaF 染毒组细胞内 ROS 含量显著升高，差异有统计学意义($P<0.05$)，且随染氟剂量增加细胞内 ROS 含量显著增加，见表 2。

表 2 氟化钠对 BV-2 细胞内 ROS 含量的影响($\bar{x}\pm s$，$n=4$)

NaF (μg/ml)	1 h	6 h	12 h	24 h	R 值	P 值
0	1.000±0.054	1.000±0.016	1.000±0.087	1.000±0.088	−0.001	0.996
1	1.600±0.053*	1.295±0.100*	0.944±0.092	1.208±0.171	−0.523	0.037
5	1.668±0.088*	1.574±0.126*	1.020±0.318	1.300±0.119	−0.509	0.044
10	1.497±0.051*	1.294±0.192*	2.084±0.234*	1.232±0.057	−0.146	0.590
25	1.543±0.039*	1.494±0.185*	1.569±0.578	1.675±0.133*	−0.212	0.431
50	1.559±0.111*	1.602±0.318*	1.771±0.032*	2.482±0.363	0.846	0.001
R 值	0.284	0.511	0.500	0.934		
P 值	0.189	0.013	0.015	0.000		

注：与对照组相比，* $P<0.05$。

2.3 NaF 对 BV-2 细胞培养液中 NO 含量的影响

BV-2 细胞染毒 1 h 后，5、10、25、50 μg/ml NaF 处理组细胞培养液中 NO 含量显著高于对照组，差异有统计学意义($P<0.05$)，且随染氟剂量增加细胞培养液中 NO 含量显著增高；染毒 6 h 后，尽管各 NaF 处理组细胞培养液中 NO 含量与对照组相比差异不显著，但 NO 含量随染氟剂量增加显著增加；染毒 12 h 后，50 μg/ml NaF 处理组细胞培养液中 NO 含量显著低于对照组，差异有统计学意义($P<0.05$)，且 NO 含量随染氟剂量增加呈降低趋势；染毒 24 h 后，NO 含量也随染氟剂量增加呈降低趋势，但各 NaF 处理组细胞培养液中 NO 含量差异无统计学意义，见表 3。

3 讨论

本实验结果显示，BV-2 细胞染毒后，细胞增殖活力与染毒剂量负相关，说明氟暴露浓度升高，小胶质细胞增殖受到抑制；此外，细胞增殖活力与暴露时间负相关，说明氟暴露时间延长，小胶质细胞增殖受到抑制；染毒 6 h 后，1、5 μg/ml NaF 处理组细胞增殖活力出现一个显著升高现象，推测在氟暴露早期，小剂量的氟促进小胶质细胞的增殖，需要进一步研究。

体内活性氧自由基具有一定的功能，如参与免疫和信号

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3 氟化钠对 BV-2 细胞培养液中 NO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

NaF (μg/ml)	1 h	6 h	12 h	24 h	*R* 值	*P* 值
0	0.402 ± 0.260	1.234 ± 0.268	2.802 ± 0.353	4.158 ± 1.036	0.935	0.000
1	0.600 ± 0.222	1.117 ± 0.365	3.311 ± 0.801	3.763 ± 0.777	0.863	0.000
5	1.119 ± 0.257*	1.175 ± 0.304	2.802 ± 0.595	4.441 ± 0.739	0.934	0.000
10	1.119 ± 0.463*	1.117 ± 0.405	2.746 ± 0.339	3.763 ± 0.944	0.881	0.000
25	1.489 ± 0.222*	1.292 ± 0.101	2.350 ± 0.196	3.876 ± 0.595	0.929	0.000
50	1.489 ± 0.222*	1.760 ± 0.365	1.616 ± 0.353*	2.463 ± 0.098	0.777	0.003
R 值	0.693	0.601	−0.760	−0.613		
P 值	0.001	0.008	0.000	0.007		

注：与对照组相比，* $P < 0.05$。

传导过程。但过多的活性氧自由基就会有破坏作用，主要有细胞膜破坏、血清抗蛋白酶失活、基因损伤导致细胞变异。本实验研究结果显示，氟化钠能够增加细胞内 ROS 含量，说明氟能够引起小胶质细胞过氧化，产生活性氧自由基；50 μg/ml NaF 处理组，细胞内 ROS 含量与暴露时间正相关，说明随暴露时间延长，活性氧自由基在细胞内逐渐蓄积；1、5 μg/ml NaF 处理组，细胞内 ROS 含量与暴露时间负相关，这可能与细胞中抗氧化系统的代偿能力有关。

一氧化氮由 *L*-精氨酸受 NOS 催化产生，脑组织中含有 NOS，并可产生一氧化氮的细胞有神经元、血管内皮细胞、血管平滑肌细胞、小胶质细胞和星形胶质细胞等[4]。iNOS 能够持续大量地催化 NO 产生，而 NO 具有潜在神经毒性，过量 NO 可通过多种途径损伤膜性结构、蛋白质及 DNA，导致神经元坏死或凋亡[5,6]。本实验研究结果显示，BV-2 细胞短时间（1、6 h）暴露于氟化钠，细胞培养液 NO 含量与染氟剂量正相关，推测在氟暴露早期，一氧化氮合酶水平升高，催化生成 NO；随暴露时间延长（12、24 h），细胞培养液 NO 含量随染氟剂量增加而降低，推测长时间大剂量氟暴露，可能会抑制一氧化氮合酶活性，需要今后进一步研究。本研究还发现，随着时间的增加，每个浓度组细胞培养液中 NO 含量均增加，说明随暴露时间延长，NO 在培养液中逐渐蓄积；0 μg/ml NaF 处理组，细胞培养液中 NO 含量与暴露时间正相关，可能由于染毒时培养液中血清的消耗刺激了 NO 的生成。

参考文献：

[1] 谭郁彬. 氟对机体代谢及各系统的影响[J]. 中国地方病防治杂志，1994，9（4）：230.

[2] Wang Y N，Xiao K Q，Liu J L，*et al*. Effect of long term fluoride exposure on lipid composition in rat liver[J]. Toxicology，2000，146：161-169.

[3] Guan Z Z，Xiao K Q，Zheng X Y，*et al*. Changed celluar membrane lipid composition and lipid peroxidation of kidney in rats with chronic fluorosis[J]. Arch Toxicol，2000，74：602-608.

[4] De Vente J，Hopkins D A，Markerink-van Ittersum M，*et al*. Distribution of nitric oxide synthase and nitric oxide-receptive，cyclic GMP-proceducing structures in the rat brain[J]. Neuroscience，1998，87：207-241.

[5] Haas J，Storch-Hagenlocher B，Biessmann A，*et al*. Inducible nitric oxide synthase and arginnosuccinate synthetase：co-induced in brain tissue of patients with Alzheimer's dementia and following stimulation with β-amyloid 1-42 in vitro[J]. Neuroscience Letters，2002，322（2）：121-125.

[6] Law A，Gauthier S，Quirion R. Say NO to Alzheimer's disease：the putative links between nitric oxide and dementia of the Alzheimer's type[J]. Brain Res Brain Res Rev，2001，35（1）：73-96.

纳米硫化铅包裹方式对毒代动力学的影响

Package mode of lead sulfide nanoparticles on toxicokinetics in mice

李清钊[1]，徐厚君[1]，曹燕花[1]，郝玉兰[1]，郑国颖[1]，闫立成[1]，刘钊[2]

LI Qing-zhao，XV Hou-jun[1]，CAO Yan-hua[1]，HAO Yu-lan[1]，ZHENG Guo-ying[1]，YAN Li-chang[1]，LIU Zhao[2]

（1. 河北联合大学公共卫生学院，河北 唐山 063000；2. 南开大学环境科学学院，天津 300192）

摘要： 126 只昆明小鼠随机分为 3 个组，分别给予未包裹、巯基乙酸包裹、巯基乙醇包裹纳米硫化铅。采用腹腔注射法一次性染毒 0.2 ml（200 mg/kg）。于染毒后第 0.5、1、6、12、24、36、48 小时各时点取血，检测血铅含量。随着小鼠染毒时间的增加，血铅上升到一定峰值后逐渐降低。小鼠染毒后 48 h 内，3 组样品中血铅浓度呈未包裹组 > 巯基乙酸组 > 巯基乙醇组，毒代动力学铅浓度-时间曲线符合一级吸收二室模型，毒代动力学参数显示，巯基乙醇组代谢最快，而未包裹组代谢最慢。提示包裹后纳米硫化铅在血中含量低，代谢速度快。

关键词： 纳米硫化铅；电感耦合等离子体质谱仪；毒代动力学

中图分类号： R114 **文献标识码：** B

收稿日期： 2011-03-15；**修回日期：** 2011-06-07

作者简介： 李清钊（1963—），女，高级实验师，研究方向：环境毒理学。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net