

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20181219003

邵丹丹, 于秋丽, 年未未, 等. 内质网应激在不同钙水平下对母鼠氟暴露后仔鼠脑海马细胞的作用[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(6): 152-159

Shao D D, Yu Q L, Nian W W, et al. Effects of endoplasmic reticulum stress on hippocampus of offspring rats with maternal fluoride exposure at different calcium levels [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(6): 152-159 (in Chinese)

内质网应激在不同钙水平下对母鼠氟暴露后仔鼠脑海马细胞的作用

邵丹丹¹, 于秋丽¹, 年未未¹, 汪晓宇¹, 张佳勇¹, 唐乐¹, 欧阳玮², 章子贵^{3,*}

1. 浙江师范大学化学与生命科学学院, 金华 321004

2. 浙江师范大学体育与健康学院, 金华 321004

3. 浙江师范大学行知学院, 金华 321004

收稿日期: 2018-12-19

录用日期: 2019-02-25

摘要: 为探讨内质网应激在不同饲料钙水平下对母鼠氟暴露后仔鼠脑海马细胞的作用, 选用 SD 雌性大鼠 75 只, 雄性大鼠 25 只, 雌鼠随机分为对照组(DZ)、染氟组(RF)、低钙组(LG)、染氟低钙组(LF)和染氟高钙组(HF)。雌鼠染毒 3 个月, 交配产仔, 检测胎鼠与 14 日龄、28 日龄仔鼠脑海马内质网应激伴侣分子 BIP、CHOP 和 CRT 蛋白表达水平。结果显示, 与 DZ 组比, 胎鼠、14 日龄仔鼠 RF 组、LF 组 BIP、CHOP 和 CRT 蛋白表达均显著升高, 差异具有统计学意义($P<0.01$), HF 组 BIP、CHOP 和 CRT 蛋白表达均升高, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 28 日龄仔鼠 RF 组 BIP、CHOP 蛋白表达显著升高, 差异具有统计学意义($P<0.01$), CRT 蛋白表达升高, 差异具有统计学意义($P<0.05$), LF 组 BIP、CHOP 和 CRT 蛋白表达均显著升高, 差异具有统计学意义($P<0.01$), HF 组 BIP、CHOP 和 CRT 蛋白表达均显著升高, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。与 RF 组比, 胎鼠与 14 日龄、28 日龄仔鼠 LF 组 BIP、CHOP 和 CRT 蛋白表达水平升高, 差异具有统计学意义($P<0.01$), 胎鼠、14 日龄仔鼠 HF 组 BIP、CHOP 和 CRT 蛋白表达水平下降, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 28 日龄仔鼠 BIP、CHOP 蛋白表达水平下降, 差异具有统计学意义($P<0.05$)。研究表明, 内质网应激可能参与了母鼠氟暴露致仔鼠脑损伤, 高钙饲料可缓解母鼠氟暴露致仔鼠脑海马神经细胞的损伤, 低钙饲料则进一步加剧了母鼠氟暴露致仔鼠脑海马神经细胞损伤。

关键词: 氟; 钙; 母鼠; 仔鼠; 氟中毒; 内质网应激

文章编号: 1673-5897(2019)6-152-08

中图分类号: R180.4425

文献标识码: A

Effects of Endoplasmic Reticulum Stress on Hippocampus of Offspring Rats with Maternal Fluoride Exposure at Different Calcium Levels

Shao Dandan¹, Yu Qiuli¹, Nian Weiwei¹, Wang Xiaoyu¹, Zhang Jiayong¹, Tang Le¹, Ouyang Wei², Zhang Zigui^{3,*}

1. College of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

2. College of Physical Education and Health Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

3. Xingzhi College, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

Received 19 December 2018

accepted 25 February 2019

基金项目: 国家自然科学基金项目(No.81573101, No.81273015)

作者简介: 邵丹丹(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为污染生态学, E-mail: 1270169250@qq.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: zzg@zjnu.cn

Abstract: To investigate the effects of calcium on fluorosis-induced neuronal endoplasmic reticulum stress in hippocampus of offspring rats. Seventy-five healthy early-weaned SD female rats and twenty-five male rats were used for mating. Female rats were randomly divided into control group (DZ group), fluoride group (RF group), low calcium group (LG group), fluoride and low calcium group (LF group), and fluoride and high calcium group (HF group). After 3 months of feeding, male and female rats were mated and the expression levels of stress partner molecules BIP, CHOP, and CRT protein of hippocampus in fetus and in their litters at 14 or 28 days of age were tested. Compared with the DZ group, the expression of BIP, CHOP and CRT protein of fetus and 14-day-old pups in the RF group, the HF group and the LF group were significantly increased ($P<0.01$ or $P<0.05$), the expression of BIP and CHOP protein in the RF group and the expression of BIP, CHOP and CRT protein in the LF group of 28-day-old rats were significantly increased ($P<0.01$), the expression of CRT protein in the RF group were increased ($P<0.05$). Compared with the RF group, the expression of BIP, CHOP and CRT in the LF group of fetus, 14 and 28-day-old rats were significantly increased ($P<0.01$), the expression of CHOP and CRT protein in the HF group of fetus and 14-day-old pups and the expression of BIP and CHOP protein in 28-day-old pups were decreased ($P<0.05$). It is indicated that endoplasmic reticulum stress is involved in brain damage induced by fluoride exposure in neonates, high calcium diet can relieve damage of neonatal rat hippocampus induced by fluoride exposure, low calcium diet further exacerbated the damage of hippocampus induced by the maternal rats exposure to fluoride.

Keywords: fluoride; calcium; maternal rat; offspring; fluorosis; endoplasmic reticulum stress

氟是人体所需的微量元素,地方性氟中毒(简称地氟病)是长期过量摄入氟而引起全身性病变,其中以牙齿、骨骼受损最为明显^[1-2]。地氟病病区范围广,类型复杂,可分为饮水型、燃煤型和饮茶型 3 种类型^[3]。过量氟还能透过血脑屏障,在脑组织中蓄积,引起脑组织过强的氧化应激反应,进而损伤神经系统^[4]。机体摄入氟过量还能通过胎盘屏障,在子代机体中蓄积,并透过血脑屏障对子代动物脑结构和功能造成损伤^[5],但其分子机制尚未明了。

内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是指由于某种原因使细胞内质网发生紊乱的一种亚细胞器病理过程。有研究表明,内质网应激参与了氟骨症的发病机制^[6],但氟中毒引起的脑损伤是否

伴有内质网应激的发生,目前尚未见报道。国内外流行病学调研结果表明,地氟病病区居民膳食普遍低钙,膳食低钙是地氟病的主要促发和加重因素^[7-8]。因此,本研究拟以 SD 大鼠为实验动物,在复制母鼠氟中毒模型的基础上^[9],探讨内质网应激在不同饲料钙水平下对母鼠氟暴露后仔鼠脑海马细胞的作用,评价膳食钙对氟中毒的干预作用。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验动物与分组

选用清洁级初断乳 SD 雌性大鼠 75 只,雄性 25 只,购自浙江省实验动物中心 (SCYK (浙)2003-0001)。饲养于标准环境,适应一周,将雌性大鼠随

表 1 亚慢性氟暴露母鼠实验分组情况
Table 1 Subgroups of female rats in subchronic fluorine expose experiments

组别 Groups	样本数(只) Sample size	染毒处理 Treatment
对照组(DZ) Control (DZ)	15	自来水+常食饲料(钙含量 0.79%) Tap water +common feed (calcium 0.79%)
染氟组(RF) Reference fluoride group (RF)	15	加氟自来水(100 mg·L ⁻¹ NaF)+常食饲料 Fluorinated water (100 mg·L ⁻¹ NaF) + common feed
低钙组(LG) Low calcium group (LG)	15	自来水+低钙饲料(钙含量 0.063%) Tap water + low calcium feed (calcium 0.063%)
染氟低钙组(LF) Fluoride+ low calcium group (LF)	15	加氟自来水+低钙饲料 Fluorinated water + low calcium feed
染氟高钙组(HF) Fluoride+ high calcium group (HF)	15	加氟自来水+高钙饲料(钙含量 7%) Fluorinated water + high calcium feed (calcium 7%)

机分成5组,每组15只,按表1以自由饮水方式染毒3个月,以母鼠血氟及尿氟含量作为亚慢性饮水型氟中毒动物模型复制成功的标准。

染毒结束后,每晚8:00雌雄按1:1的比例合笼交配,次日8:00检查雌鼠的阴栓,记为妊娠0日龄,依次完成受孕工作,并记录妊娠时间。取妊娠19 d的胎鼠20只进行相关实验。母鼠产仔第4天将每窝仔鼠调整为6~8只,在第14天和18天,每窝雌雄各取1~2只,每组共20只,雌雄各半进行相关实验。

1.2 主要实验试剂

兔抗大鼠CRT、BIP和CHOP单克隆抗体(一抗,英国Abcam公司);辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体(二抗,杭州戴格)。

1.3 实验方法

1.3.1 血/尿氟、血/尿钙的测定

1.3.1.1 电极法检测大鼠血/尿氟浓度^[10]

取血/尿样与TISAB混合液(体积比1:1)置于10 mL烧杯中,磁力搅拌器匀速搅拌,插入氟电极和甘汞电极。当电位值改变 $<0.1 \text{ mV} \cdot (2 \text{ min})^{-1}$ 时,读取的电位值作为 E_1 ,然后再在被测液里增加 $\leq 0.1 \text{ mL}$ 的标准NaF溶液,使电位变化为20~30 mV。当电位值改变 $<0.1 \text{ mV} \cdot (2 \text{ min})^{-1}$ 时,读取的电位值作为 E_2 。根据2次电位值的差 $\Delta E = E_1 - E_2$,依据公式计算血/尿氟的含量。

$$C_x = \left[\frac{C_s \times V_s}{V_x} \right] / (10^{\frac{\Delta E}{S}} - 1)$$

式中: C_x 为血清中氟含量($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); C_s 为添加的标准NaF溶液的浓度($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$); V_s 为添加的标准NaF溶液的体积(它的体积不能高于被测液体积的1/50)(mL); V_x 为样品体积(mL); ΔE 为 E_1 与 E_2 之差(以20~30 mV为宜)。

1.3.1.2 采用半定量滴定法检测大鼠血/尿钙^[11]

分别量取血/尿样品、缓冲液和指示剂0.2、1.5和0.5 mL,完全混合均匀以后,等到1 min后呈现出樱桃样红色。用乙二醇-双-(2-氨基乙醚)四乙酸(EGTA)标准液滴定,一边加试剂一边摇匀直到看见杏黄色停止,并纪录EGTA标准液的消耗量。样品总钙($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)=EGTA用量(mL) $\times 10 \times 0.25$ 。

1.3.2 仔鼠脑海马神经细胞内质网应激伴侣分子蛋白检测

1.3.2.1 总蛋白提取

将海马组织剪碎后,按每50 mg的海马组织加入600 μL PIPA裂解液和PMSF混合液(质量比为

99:1)。每个蛋白样品用匀浆器匀浆,冰上静置10 min使之充分裂解。 4°C 、 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心15 min。取上清,加入5 $\times$ 上样缓冲液,比例为4:1;混匀,放入 100°C 水浴锅中煮沸5 min,使蛋白变性;分装, -20°C 保存。

1.3.2.2 Western Blot 测定蛋白表达

测定胎鼠与14日龄、28日龄雌雄仔鼠脑海马细胞中BIP、CHOP和CRT蛋白的表达水平。取各组仔鼠,迅速处死,取海马,提取总蛋白、电泳、转膜、封闭、一抗孵育、洗膜、二抗孵育、洗膜和显影,蛋白条带用Quantity One软件分析系统扫描目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值,内参调整值=目的蛋白灰度值/ β -actin灰度值,计算每一组内参调整值与对照组内参调整值的比值,用以表征该孔样品蛋白表达量。

1.4 数据处理

数据用SPSS20.0进行分析,结果以平均值 $\pm$ 标准差($M \pm SD$)表示,计量数据采用单因素方差分析和方差齐性检验,各组两两比较用LSD检验。以 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 为具有统计显著性。

2 结果(Results)

2.1 亚慢性氟中毒母鼠氟斑牙观察与其血氟/钙和尿氟/钙的测定

2.1.1 母鼠切齿观察

亚慢性氟暴露母鼠氟斑牙情况如图1所示,由图1可知,氟暴露3个月,DZ组和LG组母鼠切齿表面光滑,表现正常;RF组与LF组母鼠牙面白垩色条纹明显且面积较大,表现为明显氟斑牙;HF组母鼠牙面白垩色条纹量少且面积较小,表现为轻度氟斑牙。

2.1.2 母鼠血氟/钙和尿氟/钙的测定结果

母鼠血氟/钙和尿氟/钙的测定结果如表2所示,由表2可知,与DZ组比,LF组母鼠的血氟含量升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与DZ组比,RF组、LF组和HF组母鼠的尿氟含量升高,差异有统计学

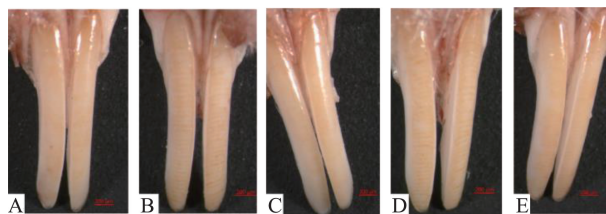


图1 染毒后各组母鼠切齿比较

注:A. DZ; B. RF; C. LG; D. LF; E. HF。

Fig. 1 Comparison of teeth in different treatment groups

Note: A. DZ; B. RF; C. LG; D. LF; E. HF.

表 2 母鼠血氟/钙和尿氟/钙的测定结果 ($M\pm SD, n=15$)

Table 2 The contents of blood fluoride/calcium and urine fluoride/calcium in mother rats ($M\pm SD, n=15$)

组别 Groups	血氟/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) Blood fluoride/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	血钙/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) Blood calcium/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	尿氟/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) Urine fluoride/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	尿钙/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) Urine calcium/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
DZ	0.18 ± 0.01	2.38 ± 0.03	0.13 ± 0.09	9.06 ± 0.20
RF	0.19 ± 0.04	2.32 ± 0.02	$4.17\pm 0.46^{**}$	$6.72\pm 0.07^{*}$
LG	0.18 ± 0.04	$1.89\pm 0.03^{**\#\#}$	$0.14\pm 0.06^{\#\#}$	$1.23\pm 0.09^{**\#\#}$
LF	$0.23\pm 0.04^{*}$	$1.78\pm 0.04^{**\#\#}$	$4.43\pm 0.14^{**}$	$0.34\pm 0.01^{**\#\#}$
HF	0.21 ± 0.01	2.64 ± 0.07	$2.07\pm 0.24^{*\#}$	$13.16\pm 0.97^{**\#\#}$

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与 DZ 组比; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与 RF 组比。

Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with DZ group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with RF group.

意义($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 与 DZ 组比, LG 组、LF 组母鼠的血钙含量均下降, 差异有统计学意义 ($P<0.01$); 与 DZ 组比, RF 组、LG 组和 LF 组母鼠的尿钙含量均下降, 差异有统计学意义 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$), HF 组母鼠的尿钙含量升高, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。以上结果表明, 母鼠亚慢性氟中毒模型复制成功。

2.2 大鼠子代脑海马神经细胞内质网应激伴侣分子 BIP、CHOP 和 CRT 蛋白表达水平检测结果

2.2.1 胎鼠脑海马神经细胞内质网应激伴侣分子 BIP、CHOP 和 CRT 蛋白表达的检测结果

胎鼠海马 BIP、CHOP 和 CRT 蛋白表达水平检测结果如图 2 所示, 由图 2 可知, 与 DZ 组比, RF 组、LF 组 BIP 表达水平上升, 差异有统计学意义 ($P<$

0.01); 与 DZ 组比, HF 组 BIP 表达水平上升, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与 RF 组比, LF 组 BIP 表达水平显著上升, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与 RF 组比, HF 组 BIP 表达水平下降, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

与 DZ 组比, RF 组、LF 组 CHOP 表达水平上升, 差异有统计学意义 ($P<0.01$); 与 RF 组比, LF 组 CHOP 表达水平上升, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

与 DZ 组比, RF 组、LF 组 CRT 表达水平上升, 差异有统计学意义 ($P<0.01$), HF 组 CRT 表达水平上升, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与 RF 组比, LF 组 CRT 表达水平上升, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), HF 组 CRT 表达水平下降, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

2.2.2 14 日龄仔鼠脑海马神经细胞内质网应激伴侣分子 BIP、CHOP 和 CRT 蛋白表达的测定结果

14 日龄雌仔鼠海马 BIP、CHOP 和 CRT 蛋白表达水平检测结果如图 3 所示, 图 3 表明, 与 DZ 组比, RF 组、LF 组 BIP 蛋白表达上升, 差异有统计学意义 ($P<0.01$); 与 DZ 组比, HF 组 BIP 蛋白表达上升, 差异有统计学意义 ($P<0.05$); 与 RF 组比, LF 组 BIP 蛋白表达上升, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), HF 组 BIP 蛋白表达下降, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

与 DZ 组比, RF 组、LF 组 CHOP 蛋白表达上升, 差异有统计学意义 ($P<0.01$); 与 RF 组比, LF 组 CHOP 蛋白表达上升, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), HF 组 CHOP 蛋白表达下降, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

与 DZ 组比, RF 组、LF 组和 HF 组 CRT 蛋白表达均上升, 差异有统计学意义 ($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 与 RF 组比, LF 组 CRT 蛋白表达上升, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), HF 组 CRT 蛋白表达下降, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

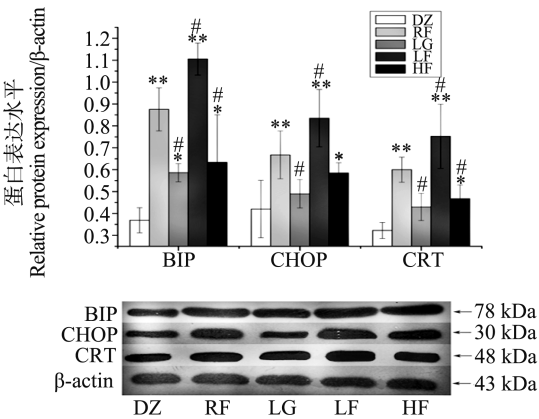


图 2 胎鼠脑海马 BIP、CHOP 和 CRT 蛋白表达水平检测结果

注: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与 DZ 组比; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, 与 RF 组比。

Fig. 2 Results of BIP, CHOP and CRT protein expression in hippocampus of fetus

Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with DZ group; # $P<0.05$, ## $P<0.01$, compared with RF group.

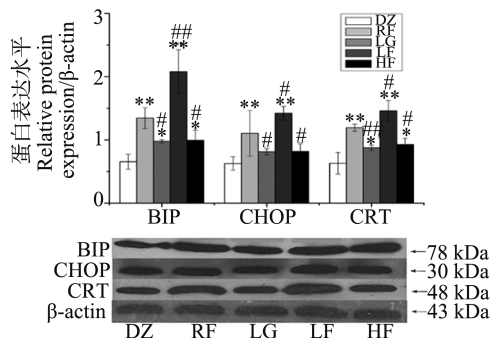


图3 14日龄雌鼠脑海马BIP、CHOP和CRT蛋白表达检测结果

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与DZ组比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与RF组比。

Fig. 3 Results of BIP, CHOP and CRT protein expression in hippocampus of 14-day-old female rats

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with DZ group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with RF group.

14日龄雄鼠脑海马BIP、CHOP和CRT蛋白表达检测结果如图4所示,图4表明,与DZ组比,RF组、LF组BIP表达水平上升,差异有统计学意义($P < 0.01$),HF组BIP表达上升,差异有统计学意义($P < 0.05$);与RF组比,LF组BIP蛋白表达上升,差异有统计学意义($P < 0.05$),HF组BIP蛋白表达下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

与DZ组比,RF组、LF组CHOP表达上升,差异有统计学意义($P < 0.01$),HF组CHOP表达上升,差异有统计学意义($P < 0.05$);与RF组比,LF组CHOP

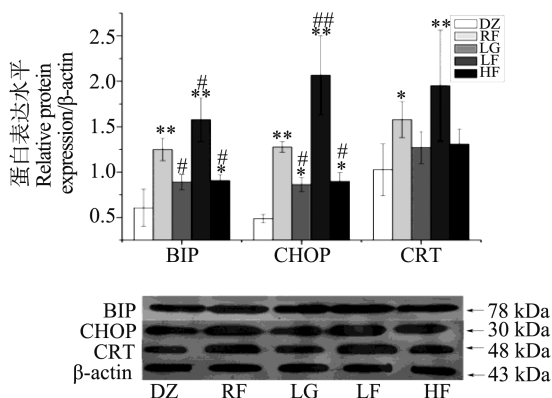


图4 14日龄雄鼠脑海马BIP、CHOP和CRT蛋白表达检测结果

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与DZ组比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与RF组比。

Fig. 4 Results of BIP, CHOP and CRT protein expression in hippocampus of 14-day-old male rats

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with DZ group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with RF group.

蛋白表达上升,差异有统计学意义($P < 0.01$),HF组CHOP蛋白表达下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

与DZ组比,LF组CRT表达上升,差异有统计学意义($P < 0.01$);与RF组比,LF组CRT表达上升,差异有统计学意义($P < 0.01$),HF组CRT表达下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2.3 28日龄仔鼠脑海马神经细胞内质网应激伴侣分子BIP、CHOP和CRT蛋白表达的测定结果

28日龄雌鼠脑海马BIP、CHOP和CRT蛋白表达检测结果如图5所示,图5表明,与DZ组比,RF组、LF组BIP表达上升,差异有统计学意义($P < 0.01$),HF组BIP表达上升,差异有统计学意义($P < 0.05$);与RF组比,LF组BIP表达上升,差异有统计学意义($P < 0.01$),HF组BIP表达下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

与DZ组比,RF组、LF组CHOP表达上升,差异有统计学意义($P < 0.01$);与RF组比,HF组CHOP表达下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

与DZ组比,RF组、LF组CRT表达上升,差异有统计学意义($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与RF组比,LF组CRT表达上升,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

28日龄雄鼠脑海马BIP、CHOP和CRT蛋白表达检测结果如图6所示,图6表明,与DZ组比,RF组BIP表达上升,差异有统计学意义($P < 0.05$),LF组BIP表达上升,差异有统计学意义($P < 0.01$);与RF组

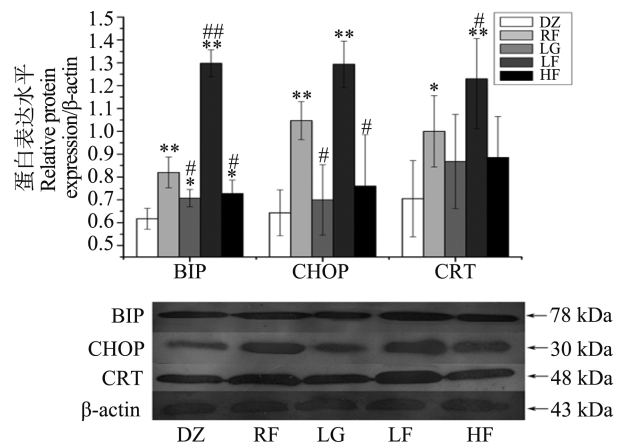


图5 28日龄雌鼠脑海马BIP、CHOP和CRT蛋白表达检测结果

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与DZ组比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与RF组比。

Fig. 5 Results of BIP, CHOP and CRT protein expression in the hippocampus of 28-day-old female rats

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with DZ group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with RF group.

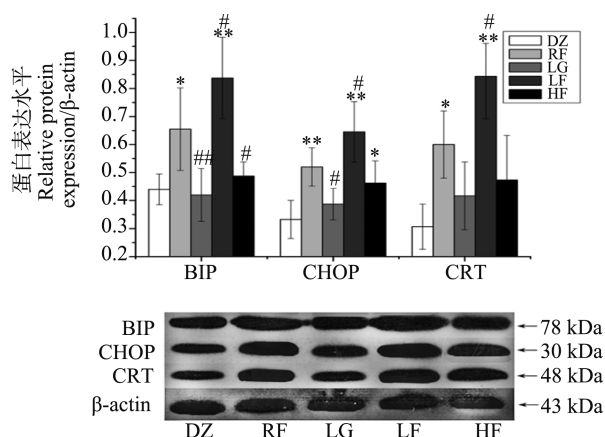


图6 28日龄雄鼠脑海马 BIP、CHOP 和 CRT 蛋白表达检测结果

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与 DZ 组比; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与 RF 组比。

Fig. 6 Results of BIP, CHOP and CRT protein expression in the hippocampus of 28-day-old male rats

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with DZ group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with RF group.

比, LF 组 BIP 表达上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), HF 组 BIP 表达下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

与 DZ 组比, RF 组、LF 组 CHOP 表达上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 RF 组比, LF 组 CHOP 表达上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

与 DZ 组比, RF 组 CRT 表达上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), LF 组 CRT 表达上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$); 与 RF 组比, LF 组 CRT 表达上升, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论 (Discussion)

氟中毒能引起机体骨相和非骨相器官的损伤, 使机体产生脑损伤^[3], 过量摄入氟还能通过胎盘屏障, 在子代机体中蓄积, 并透过血脑屏障影响子代脑功能^[5], 但其分子机制尚未明了。内质网是机体蛋白质加工、合成和运输的重要场所, 也是细胞内重要的钙储存库之一。研究表明, 细胞处于病毒感染、营养剥夺、 Ca^{2+} 超载和氧化应激等环境时, 会造成内质网功能障碍, 折叠蛋白能力下降, 最终使未折叠蛋白在内质网内积聚产生 ERS^[12]。ERS 时, 细胞为缓解 ERS 状态, 通过内质网与细胞核之间的信号反馈系统, 调节内质网功能, 减少未折叠蛋白的积聚, 即未折叠蛋白反应 (unfolded protein response, UPR)。UPR 的主要功能有: ①停止蛋白质转运与翻译, 减

少蛋白质在内质网内进一步积聚; ②促进内质网伴侣分子表达, 加速未折叠蛋白折叠; ③激活内质网顺式作用元件, 降解错误折叠蛋白和未折叠蛋白。

内质网途径是 caspase 引发凋亡的 3 条途径之一^[13-15], 近年来逐渐引起关注。CHOP、BIP 和 CRT 是 ERS 的伴侣分子, 其作用是帮助细胞内多肽的结构完成正确组装, 并最终在组装完成后与之分离^[16]。CHOP 又名生长阻滞和 DNA 损伤诱导性基因 153, 是内质网应激特异转录因子^[17]。正常生理条件下, CHOP 呈低表达状态, 当表达升高时, 可抑制下游抑凋亡 BCL-2 等表达^[18], 诱导细胞凋亡。BIP 是钙结合蛋白, 正常生理条件下, BIP 参与调控合成蛋白质的折叠与转运, 与内质网跨膜蛋白结合并抑制其活性, 维持细胞内钙平衡^[19]。CRT 是钙网蛋白, 参与蛋白质折叠, 调控细胞内钙稳态^[20]。氟中毒属于“钙矛盾”疾病^[21-22] (即机体整体缺钙而细胞内钙离子超载), 细胞内 Ca^{2+} 平衡紊乱会诱导 BIP、CRT 等的表达, 诱发 ERS, 持久的 ERS 会诱导细胞凋亡, 加重对组织细胞的损伤。本研究中, 母鼠氟暴露后仔鼠脑海马细胞 CHOP、BIP 和 CRT 蛋白表达显著上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 这证明, 母鼠氟暴露后仔鼠脑海马细胞产生 ERS, ERS 可能参与了母鼠氟暴露后仔鼠脑损伤。

近年来, 微量元素钙与氟的关系令人关注。有研究表明, 机体摄入过量氟后, 氟可直接攻击氧, 干扰氧化代谢导致活性氧 (ROS) 增多, 从而影响细胞钙离子通道、胞内钙库, 导致钙稳态失衡^[23]。饲料低钙高氟能使大鼠成骨、破骨功能活跃, 并伴有骨组织细胞的内质网应激, 加速骨转换从而造成骨相器官的损伤^[24]。本研究参照文献报道的饲料低钙剂量^[25], 分别用高钙和低钙饲料喂养氟中毒母鼠, 探讨内质网应激在不同钙水平下对母鼠氟暴露后仔鼠脑海马细胞的作用。结果发现, 食低钙饲料和高氟水组的仔鼠海马神经细胞 BIP、CHOP 和 CRT 蛋白表达水平与饮用高氟水组比升高十分显著, 而食用高钙饲料和高氟水组的仔鼠与饮用高氟水组的仔鼠脑海马细胞 CHOP 蛋白表达水平则显著下降, BIP 和 CRT 蛋白表达显著上升或无明显变化。这样的实验结果提示, 适当水平的钙摄入可能是氟中毒的治疗途径之一, 而膳食低钙可加重氟致脑损伤。

总之, 内质网应激在不同钙水平下对母鼠氟暴露后仔鼠脑海马细胞的作用可能是: 妊娠期, 母鼠氟暴露后, 氟通过胎盘屏障后在胎鼠体内积蓄, 胎鼠体

内的氟透过血脑屏障进入脑组织内,在仔鼠脑发育过程中,产生 ERS,使内质网应激伴侣分子 BIP、CHOP 和 CRT 表达异常,最终导致脑损伤。而饲料高钙(钙含量 7%)能逆转仔鼠上述脑海马细胞内质网应激伴侣分子的表达趋势,从而改善母鼠氟暴露后仔鼠脑海马细胞的损伤,饲料低钙(钙含量 0.063%)与饮用高氟水对仔鼠脑海马细胞具有协同毒性作用。上述研究结果也提示,虽然目前我国各饮水型地氟病区饮用水治理后氟含量都已基本达标,但改水前母体摄入过量氟对仔代脑功能的影响仍不容忽视。

致谢:本文由国家自然科学基金项目(No.81573101, No.81273015)资助。

通讯作者简介:章子贵(1960—),男,教授,主要研究方向为地方性饮水型氟中毒。

参考文献(References):

- [1] Kumar H, Boban M, Tiwari M. Skeletal fluorosis causing high cervical myelopathy [J]. *Journal of Clinical Neuroscience*, 2009, 16(6): 828-830
- [2] Xiang Q Y, Zhou M H, Wu M, et al. Relationships between daily total fluoride intake and dental fluorosis and dental caries [J]. *The Journal of Biomedical Research*, 2009, 23(1): 33-39
- [3] 郝阳,孙殿军,魏红联,等. 中国大陆地方性氟中毒防治动态与现状分析[J]. *中华地方病学杂志*, 2002, 21(1): 63-68
Hao Y, Sun D J, Wei H L, et al. Analysis on the prevention and control of endemic fluorosis in mainland China [J]. *Chinese Journal of Endemic Diseases*, 2002, 21(1): 63-68 (in Chinese)
- [4] Gao Q, Liu Y J, Guan Z Z. Oxidative stress might be a mechanism connected with the decreased alpha 7 nicotinic receptor influenced by high-concentration of fluoride in SH-SY5Y neuroblastoma cells [J]. *Toxicology in Vitro*, 2008, 22(4): 837-843
- [5] 张璟,祝文静,章子贵. 孕鼠氟暴露对仔鼠学习记忆能力的影响[J]. *中国公共卫生*, 2009, 25(11): 1347-1348
Zhang J, Zhu W J, Zhang Z G. Influence of fluorosis on learning memory of pup rats and activities of SOD and content of MDA in brain [J]. *Chinese Journal of Public Health*, 2009, 25(11): 1347-1348 (in Chinese)
- [6] 张凯强,张颖,顾何锋,等. 内质网应激分子在慢性氟中毒大鼠成釉细胞中的表达[J]. *北京口腔医学*, 2014, 22(4): 181-186
Zhang K Q, Zhang Y, Gu H F, et al. Expression of endoplasmic reticulum stress chaperone in chronic fluorosis rat ameloblasts [J]. *Beijing Journal of Stomatology*, 2014, 22(4): 181-186 (in Chinese)
- [7] 黄辉. 氟病区人群健康效应与钙代谢相关基因关系的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2007: 26-29
Huang H. Study on the relationship between health effect of fluoride-exposed people and calcium metabolism related genes polymorphisms [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2007: 26-29 (in Chinese)
- [8] Mohamed N E. The role of calcium in ameliorating the oxidative stress of fluoride in rats [J]. *Biological Trace Element Research*, 2016, 170: 128-144
- [9] Sun Y, Ke L, Zhang Z, et al. Effects of different levels of calcium intake on brain cell apoptosis in fluorosis rat offspring and its molecular mechanism [J]. *Biological Trace Element Research*, 2017, 176: 355-366
- [10] 柳月珍,陈寿权,李章平. 急性有机氟吸入中毒患者血尿氟浓度变化及临床应用价值[J]. *中华急诊医学志*, 2010, 19(10): 1078-1081
Liu Y Z, Chen S Q, Li Z P. Variation and clinical application value of fluoride concentrations in the serum and urine in patients with acute organic fluoride poisoning by inhaling [J]. *Chinese Journal of Emergency Medicine*, 2010, 19(10): 1078-1081 (in Chinese)
- [11] 万桂敏,莫志亚,刘忠杰,等. 地方性氟中毒患者多项检验指标的测定及分析[J]. *中国地方病学杂志*, 2001, 20(2): 137-139
Wan G M, Mo Z Y, Liu Z J, et al. Determination and analysis on multimark of test of the patients with endemic fluorosis [J]. *Chinese Journal of Endemiology*, 2001, 20(2): 137-139 (in Chinese)
- [12] Liu Y J, Guan Z Z, Gao Q, et al. Increased level of apoptosis in rat brains and SH-SY5Y cells exposed to excessive fluoride—A mechanism connected with activating JNK phosphorylation [J]. *Toxicology Letters*, 2011, 204: 183-189
- [13] Bouman L, Schlierf A, Lutz A K, et al. Parkin is transcriptionally regulated by ATF4: Evidence for an interconnection between mitochondrial stress and ER stress [J]. *Cell Death & Differentiation*, 2011, 18(5): 769-782
- [14] Zhang Y, Berger S A. Increased calcium influx and ribosomal content correlate with resistance to endoplasmic reticulum stress-induced cell death in mutant leukemia cell lines [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2004, 279(8): 6507-6516
- [15] Brown J M, Attardi L D. The role of apoptosis in cancer

- development and treatment response [J]. *Nature Reviews Cancer*, 2005, 5(3): 231-237
- [16] Takemura G, Fujiwara H. Role of apoptosis in remodeling after myocardial infarction [J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2004, 104(1): 1-16
- [17] 袁长青, 丁振华. Caspase 的活化及其在细胞凋亡中的作用[J]. *生理科学进展*, 2002, 33(3): 220-224
Yuan C Q, Ding Z H. Activation and function of caspases in apoptosis [J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2002, 33(3): 220-224 (in Chinese)
- [18] Jie Q, Wang D, Guo H, et al. The protective effect of lacidipine on myocardial remodeling is mediated by the suppression in expression of GPR78 and CHOP in rats [J]. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2015, 427: 945076
- [19] 姜山, 谢青. 内质网应激与细胞凋亡[J]. *国际流行病学传染病学杂志*, 2004, 31(6): 330-333
Jiang S, Xie Q. Endoplasmic reticulum stress and cell apoptosis [J]. *Epidemiology Lemology Foreign Medical Sciences*, 2004, 31(6): 330-333 (in Chinese)
- [20] Bromati C R, Lellissantos C, Yamanaka T S, et al. UPR induces transient burst of apoptosis in islets of early lactating rats through reduced AKT phosphorylation via ATF4/CHOP stimulation of TRB3 expression [J]. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative & Comparative Physiology*, 2011, 300(1): R92-R100
- [21] 官志忠. 燃煤污染型地方性氟中毒[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2014: 291-297
- [22] Zhang Y, Sun X, Li T, et al. Effects on expression of osteogenesis gene in the osteoblast with endoplasmic reticulum stress induced by fluoride [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2014, 43(6): 967-971
- [23] 王丽华, 孙殿军, 石玉霞, 等. 蛋白质和维生素 C 对饮茶型氟中毒大鼠各器官病理形态学改变的影响[J]. *中华地方病学杂志*, 2002, 21(4): 254-257
Wang L H, Sun D J, Shi Y X, et al. The effects of protein and vitamin C on pathological and morphological changes of organs from rats with drinking tea fluorosis [J]. *Chinese Journal of Endemiology*, 2002, 21(4): 254-257 (in Chinese)
- [24] 张凯强, 张颖, 刘璐, 等. 氟对大鼠切牙成釉细胞内质网伴侣分子表达的影响[J]. *上海口腔医学*, 2013, 22(5): 481-486
Zhang K Q, Zhang Y, Liu L, et al. Effects of fluoride on the expression of endoplasmic reticulum chaperone in ameloblast of rat incisor [J]. *Shanghai Journal of Stomatology*, 2013, 22(5): 481-486 (in Chinese)
- [25] 徐辉, 赵志涛, 井玲, 等. 氟中毒大鼠骨组织中内质网应激实验研究[J]. *中华地方病学杂志*, 2009, 28(1): 36-40
Xu H, Zhao Z T, Jing L, et al. Study on endoplasmic reticulum stress in bone tissue of fluorosis rats [J]. *Chinese Journal of Endemiology*, 2009, 28(1): 36-40 (in Chinese)
- ◆