

## 氟对大鼠骨组织 Twist mRNA 及其蛋白表达的影响<sup>\*</sup>

万 雯, 万良斌, 于燕妮<sup>\*\*</sup>, 万昌武, 官志忠

(贵阳医学院 病理学教研室, 贵州 贵阳 550004)

**[摘 要]** 目的: 观察氟对大鼠骨组织中 Twist mRNA 及其蛋白表达的影响, 探讨 Twist 在氟中毒引起氟骨症发病中的作用。方法: 36 只 SD 大鼠按性别和体重随机分为 3 组, 每组 12 只, 组内雌雄各半; 对照组自由饮用自来水, 低氟组、高氟组分别饮用含氟水 5 mg/L、50 mg/L; 实验 6 个月后股动脉放血处死大鼠, 采用氟离子选择电极法检测大鼠尿氟、骨氟含量; HE 切片观察大鼠股骨下段骨组织病理学改变, 测定骨皮质厚度、骨小梁宽度等骨形态学变化; 采用原位杂交技术及免疫组织化学方法检测慢性氟中毒大鼠 Twist mRNA 及其蛋白表达水平。结果: 与对照组比较, 氟中毒组大鼠尿氟及骨氟含量明显升高, 股骨远端骨皮质增厚、骨小梁数目增多、骨髓腔间隙变小等骨质硬化表现, 形态学计量指标的差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且随染氟剂量增加, 以上病理改变逐渐加重; 与对照组比较, 染氟组 Twist mRNA 及其蛋白表达水平明显降低, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。结论: 氟可导致大鼠骨组织中 Twist mRNA 及其蛋白表达水平降低, Twist 可能参与氟中毒引起的骨骼损伤。

**[关键词]** 氟; 中毒; Twist; 原位杂交; 免疫组织化学; 骨

**[中图分类号]** R595 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2012)03-0221-04

### Effect of Fluoride on the Expression of Twist mRNA and Protein in Bone Tissue of Rats

WAN Wen, WAN Liangbin, YU Yanni, WAN Changwu, GUAN Zhizhong  
(Department of Pathology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To observe the effect of fluoride on the expressions of Twist mRNA and protein in bone tissue of rats, and to explore the role of Twist in pathogenesis of skeletal fluorosis. **Methods:** Thirty-six SD rats were randomly divided into 3 groups with 12 rats in each and half male half female. Controls were fed with tap water, rats of low fluoride and high fluoride groups were fed with water containing fluoride 5 mg/L and 50 mg/L respectively to establish fluorosis models. Rats were sacrificed in 6 months by femoral artery exsanguination. Urinary fluoride and bone fluoride contents of rats were detected by fluoride ion-selective electrode method. HE staining was used to observe pathological changes of bone tissue of rat femoral inferior segment, and the morphological changes such as thickness of cortical bone and width of trabecular were detected. Twist protein and mRNA expression levels were detected with immunohistochemistry and in situ hybridization respectively. **Results:** The fluorine contents of urine and bone in fluorosis groups were higher than those in the control rats. Osteosclerosis manifestations such as thickened cortical bone, increased trabecular number and smaller marrow cavity were found in femoral inferior segment of fluorosis rats, and the differences of these indexes were significant ( $P < 0.05$ ). With the increase of fluoride contents, the pathological changes mentioned above were more serious. Twist mRNA and protein expression levels of fluorosis groups were lower than those of the controls, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** Fluoride can reduce the expression levels of Twist mRNA and protein in bone tissue of rats. Twist may play a role in bone damage caused by fluorosis.

<sup>\*</sup> [基金项目] 国家科技部国际合作重点项目(2010DFB30530), 贵州省科技厅社会发展攻关项目[黔科合 SY 字(2011)3006 号]。

<sup>\*\*</sup> 通讯作者 E-mail: yuyanni@gmc.edu.cn

[Key words] fluorine; poisoning; Twist; in situ hybridization; Immunohistochemistry; bone

地方性氟中毒(简称地氟病)的主要临床表现为氟斑牙和氟骨症。骨是氟影响人体的重要靶器官,长期小剂量氟可促进骨形成,大剂量可引起骨质疏松或骨硬化<sup>[1]</sup>。但迄今为止,氟对骨骼损伤的作用机制尚未完全阐明。本实验通过复制饮水型慢性氟中毒大鼠模型,对大鼠骨组织 Twist 蛋白及其 mRNA 水平进行研究,探讨氟中毒时氟骨症的发病机制,为地方性氟中毒的防治提供依据。

## 1 材料与方法

**1.1 氟中毒大鼠模型的建立** 选取 4~5 周龄,质量 80~100 g 健康 SD 大鼠 36 只,由四川大学实验动物中心提供,动物合格证号 SCXK(川)-2006-10。大鼠适应性喂养 1 周后,按性别和体重随机分对照组、低氟组、高氟组,每组 12 只,组内雌雄各半。对照组自由饮自来水,含氟量低于 0.2 mg/L;低氟组饮水中含氟为 5 mg/L,高氟组饮水含氟为 50 mg/L。大鼠常规饲料(贵阳医学院实验动物中心提供,含氟量低于 0.2 mg/L)喂养。实验进行 6 个月后,经股动脉放血处死大鼠,收集各组大鼠 24 h 尿液,测定各组大鼠尿氟含量。

**1.2 主要试剂和仪器** 原位杂交探针序列:Twist 5'-CGGCG AGACT GCGA GCTGG ACACG T,兔抗鼠 Twist 多克隆抗体(1:300,北京博奥森生物技术有限公司);SP-9000 三步法试剂盒、PBS 缓冲液、柠檬酸盐(北京中杉金桥生物技术有限公司)。

**1.3 氟斑牙分度**<sup>[2]</sup> 0 度:牙釉质半透明,表面光滑有光泽;I 度:牙齿表面黄、白相间,白垩条纹清晰;II 度:牙齿表面无光泽,粉笔样白色斑;III 度:牙齿表面出现小沟、裂纹、或部分脱落,牙齿呈锯齿状严重缺损。

**1.4 尿、骨氟含量测定** 尿氟含量采用氟离子选择电极测定;骨氟含量待骨组织灰化后用氟离子选择电极法测定。

**1.5 骨组织病理形态学观察及形态计量学检测** 各组大鼠经中性甲醛固定、常温脱钙、包埋、切片、HE 染色,光镜观察。并用图像分析软件进行骨形态计量学测定。

**1.6 Twist 蛋白水平检测** 采用免疫组化 SP 三步法操作。以 PBS 代替一抗做空白对照。结果判定及分析:在 400 倍下显微镜观察染色切片,成骨细

胞胞浆及胞核出现棕黄色颗粒为阳性表达。随机选取 5 个视野,每个视野随机选取 5 个阳性表达细胞进行平均灰度值测定(Biomias 2001 图像分析系统所测平均灰度值与阳性表达强弱成正比)。

**1.7 Twist mRNA 水平检测** 严格按照试剂盒说明书操作。PBS 代替 mRNA 探针杂交液作为阴性对照。结果判定及分析:根据每个标本所测得的平均灰度值分析目的基因的相对表达量。阳性信号主要为细胞胞浆内显示黄色或棕黄色颗粒,部分阳性信号表达于胞核。Bio-mias2000 彩色图像分析系统进行半定量分析,方法同蛋白测定。

**1.8 统计学处理** 采用 SPSS 11.5 软件进行数据统计分析。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用方差分析检验,多重比较采用 LSD 法检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 氟斑牙发生情况** 染氟 6 月后,低氟大鼠氟斑牙发生率为 66.67%,高氟大鼠氟斑牙发生率为 91.67%,对照组无氟斑牙发生。两者间差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.2 尿氟、骨氟含量测定** 实验 6 个月后,低氟组尿氟含量( $2.06 \pm 0.64$ ) mg/L、骨氟含量( $632.33 \pm 123.21$ ) mg/kg;高氟组尿氟含量( $7.69 \pm 1.96$ ) mg/L、骨氟含量( $1088.75 \pm 156.16$ ) mg/kg 均显著高于对照组尿氟含量( $1.26 \pm 0.17$ ) mg/L、骨氟含量( $305.58 \pm 91.26$ ) mg/kg,各组间比较,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

**2.3 骨组织病理形态学** 光镜下显示,对照组大鼠股骨远端骺板静止层和增生层的软骨细胞排列整齐,骨皮质厚度、骨小梁粗细均匀。染氟大鼠股骨远端骺板增生活跃,骨皮质增厚,骨小梁数目增多,排列紧密,骨髓腔间隙缩小,表现为骨质硬化。且随染氟剂量增加,上述病理学改变逐渐加重。各组间形态计量学指标比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1 和图 1。

**2.4 骨组织 Twist 蛋白表达** Twist 蛋白阳性表达主要位于骨小梁周边的成骨细胞,为细胞浆呈黄色或棕黄色颗粒,部分阳性表达于胞核(图 2)。氟中毒大鼠股骨 Twist 蛋白表达明显低于(低氟组和高氟组分别为  $81.69 \pm 6.67$  和  $78.80 \pm 3.83$ )对照组( $89.59 \pm 5.42$ ),差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 大鼠股骨形态计量学分析结果

Tab. 1 Quantitative analysis results of morphologic changes of femoral tissue in each group

组别	<i>n</i>	骨皮质厚度(μm)	骨小梁宽度(μm)	骨小梁面积比(%)	骨髓腔间隙(μm)
对照组	12	216.72 ± 4.23	74.41 ± 4.42	36.11 ± 4.17	124.76 ± 4.52
低氟组	12	232.82 ± 7.01 <sup>(1)</sup>	92.79 ± 5.07 <sup>(1)</sup>	44.63 ± 2.71 <sup>(1)</sup>	104.43 ± 3.01 <sup>(1)</sup>
高氟组	12	254.41 ± 3.99 <sup>(1)(2)</sup>	105.06 ± 4.58 <sup>(1)(2)</sup>	52.68 ± 3.07 <sup>(1)(2)</sup>	96.00 ± 3.83 <sup>(1)(2)</sup>

注：<sup>(1)</sup>与对照组比较, $P < 0.05$ ;<sup>(2)</sup>与低氟组比较, $P < 0.05$ 。

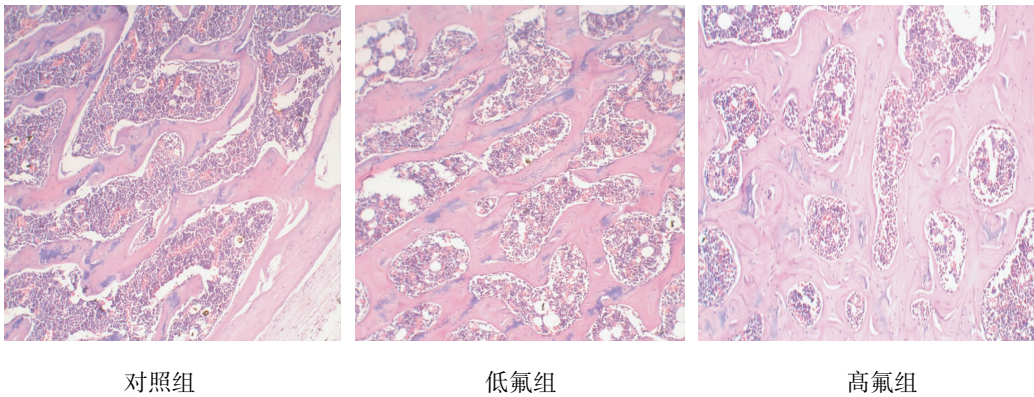


图 1 大鼠股骨组织形态学观察(HE × 100)

Fig. 1 Morphologic changes of femoral tissue of rats in each group( HE × 100)

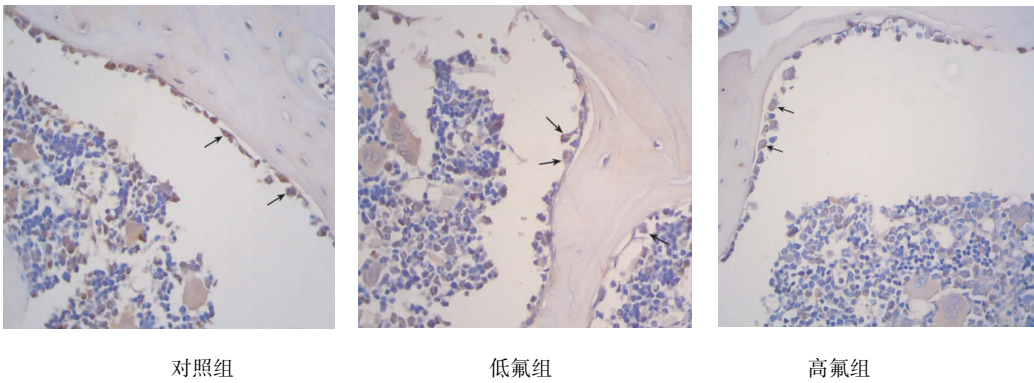


图 2 Twist 在各组大鼠骨组织成骨细胞中的表达(SP × 400)

Fig. 2 The expression of Twist protein in bone tissue of rats in each group(SP × 400)

**2.5 骨组织 Twist mRNA 表达** 氟中毒大鼠股骨 Twist mRNA 表达明显低于(低氟组和高氟组分别为  $76.07 \pm 4.08$  和  $74.29 \pm 3.67$ )对照组 ( $83.32 \pm 2.76$ ), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。低氟与高氟组间比较无统计学意义( $P > 0.05$ ) (图 3)。

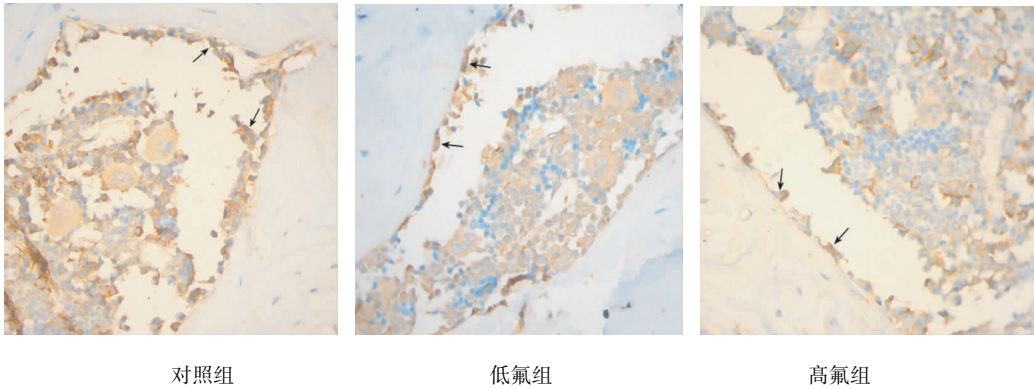


图 3 各组大鼠骨组织 Twist mRNA 表达 (ISH × 400)

Fig. 3 The expression of Twist mRNA in bone tissue of rats in each group( ISH × 400)

### 3 讨论

骨重建是由骨形成和骨吸收两个过程协调完成的。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,而破骨细胞则在骨吸收方面起着重要作用,二者的平衡共同维持骨的结构、形态和强度。氟是一种已知可影响骨形成的非激素因子,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以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<sup>[3]</sup>。

本实验采用饮水加氟的方法建立动物模型,6个月后各染氟组大鼠均出现不同程度的氟斑牙,尿氟和骨氟含量均显著高于对照组,且高氟组明显高于低氟组,表明成功建立慢性氟中毒大鼠模型。观察氟中毒大鼠骨形态学变化发现,染氟大鼠股骨远端骺板增生活跃,骨皮质增厚,骨小梁数目增多,排列紧密,骨髓腔间隙缩小,表现为骨质硬化,且高氟组病变明显重于低氟组,表明存在过量氟蓄积引起的骨骼损伤。

Twist 是一种胚胎发育过程中对骨骼发育起关键调控作用的转录因子。Hayashi<sup>[4]</sup>和 Reinhold<sup>[5]</sup>等研究发现 Twist 可抑制 BMP 的转录活性从而拮抗其促成骨细胞分化功能,Yousfi 等<sup>[6]</sup>研究发现 Twist 的突变可引起 ALP 和 I 型胶原蛋白的表达显著降低, Twist-/-还可逆转 Runx2-/-小鼠的颅骨发育异常并促进软骨内成骨,提示 Twist 可能在骨组织发育过程中是一个负性调控基因。本实验通过免疫组织化学方法对氟中毒大鼠骨组织的研究显示, Twist 蛋白的表达主要分布于大鼠成骨细胞。对照组阳性细胞表达较多,着色较深,明显强于染

氟组,而低氟组与高氟组的表达变化差异不明显。说明大鼠体内氟的蓄积下调了 Twist 蛋白的表达,并且 Twist 下调的水平与染氟有一定关系。进一步运用原位杂交方法检测各染氟组 Twist mRNA 的表达发现,染氟大鼠骨组织中 Twist mRNA 的阳性细胞表达明显低于对照组大鼠,表明氟对 Twist 在基因表达水平上同样存在负调节作用。Twist 表达的下调可能是由于成骨细胞受到高氟的刺激后,通过一系列调节对 Twist 起到了负性调节作用,从而导致 Twist 表达水平的降低,而过量的氟对调控 Twist 的具体信号通路尚待进一步研究。

### 4 参考文献

- [1] McDoragh MS, Witing PF, Wilsom PM, et al. Systematic review of water fluoridation[J]. BMJ, 2000(7265):855 - 859.
- [2] 邹华章,朱伟光,朱风,等. 氟斑牙 I 临床诊断综合分度法的研究[J]. 中国校医, 2008(6):611 - 614.
- [3] 李广生. 氟斑牙和氟骨症发生机制研究的进展与启示[J]. 中国地方病学杂志, 2009(2):121 - 122.
- [4] Hayashi M, Nimura K, Kashiwagi K, et al. Comparative roles of Twist-1 and Id1 in transcriptional regulation by BMP signaling[J]. J Cell Sci, 2007, 120:1350 - 1357.
- [5] Reinhold MI, Kapadia RM, Liao z, et al. Wnt-inducible transcription factor Twist1 inhibits chondrogenesis[J]. J Bio Chem, 2006(3):1381 - 1388.
- [6] Yousfi M, Lasmoles F, Marie P J. TWIST inactivation reduces CBFA1/RUNX2 expression and DNA binding to the osteocalcin promoter in osteoblasts[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002(3):641 - 644.

(2012-04-09 收稿)

编辑:潘 娅