慢性氟中毒大鼠肝脏中 P-糖蛋白和细胞核因子-κB 的表达水平*

张凯琳[1]，吴昌学[2]，官志忠[1,2**]
(1. 贵阳医学院 病理学教研室，贵州 贵阳 550004；2. 贵阳医学院 分子生物学重点实验室，贵州 贵阳 550004)

[摘 要] **目的**：研究慢性氟中毒大鼠肝脏中 P-糖蛋白(P-glycoprotein，P-gp)和细胞核因子 κB(Nuclear factor κB，NF-κB)的表达变化，探讨氟中毒肝脏损害的发病机理。**方法**：将 60 只 SD 大鼠随机分为 3 组，即对照组、小剂量染氟组和大剂量染氟组，分别给予自来水、加 10 mg/L 和 50 mg/L 氟(NaF)的的自来水喂养 6 个月观察 3 组大鼠氟斑牙程度及尿氟，同时取大鼠肝脏；采用蛋白印迹方法检测 P-gp 和 NF-κB 的蛋白表达水平，实时荧光定量 PCR 方法检测 NF-κB mRNA 表达水平。**结果**：6 个月后，小剂量染氟组、大剂量染氟组大鼠氟斑牙程度及尿氟含量明显高于对照组，差异有统计学意义($P<0.05$)；小剂量染氟组、大剂量染氟组大鼠肝脏中 P-gp 和 NF-κB 蛋白和 mRNA 表达高于对照组，差异有统计学意义($P<0.05$)；小剂量染氟组、大剂量染氟组 NF-κB mRNA 表达高于对照组，差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论**：慢性氟中毒引起大鼠肝脏中 P-gp 和 NF-κB 表达明显升高，这可能与氟中毒性肝脏损伤的发生机制有关。

[关键词] 氟中毒；大鼠；P-糖蛋白；细胞核因子 κB；肝
[中图分类号] R361.2；R599.5 [文献标识码] A [文章编号] 1000-2707(2014)06-0817-03

Expression Levels of P-glycoprotein and NF-κB in the Liver of Chronic Fluorosis Rats

ZHANG Kailin[1], WU Changxue[2], GUAN Zhizhong[1,2]
(*1. Department of Pathology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. The Key Laboratory of Molecular Biology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China*)

[**Abstract**] **Objective**: To investigate the expressions of P-glycoprotein (G-pg) and nuclear factor κB (NF-κB) in the liver of chronic fluorosis rats, and to reveal the mechanisms of damaged liver resulted from the toxicity of the fluoride. **Methods**: The SD rats were randomly divided into three groups: control group, small dose fluoride exposure group and large dose fluoride exposure group. Three groups were fed with tap water, 10 mg/L fluoride and 50 mg/L fluoride respectively for six months. Dental fluorosis degrees and urinary fluorine contents, and conditions of rats' livers were observed. The protein and mRNA expression levels of P-gp and NF-κB in livers were detected by Western blotting and quantitative real time PCR method. **Results**: Six months later, dental fluorosis degrees and urinary fluorine contents of small dose group and large dose group were remarkably higher than control group, differences were statistically significant ($P<0.05$); protein expression levels of P-gp and NF-κB in both fluoride exposure groups were significantly higher than those of control group, differences were statistically significant ($P<0.05$); NF-κB mRNA expression levels of both fluoride exposure groups were higher than those of control group, differences were statistically significant ($P<0.05$). **Conclusions**: The increased expressions of P-gp and NF-κB in the liver of rat are induced by chronic fluoro-

*[基金项目]国家自然科学基金(81160335)；科技部支撑计划课题(2013BAI05103)；科技部国际合作项目(2010DFB30530)；贵州省科学技术基金项目[黔科合 J 字(2012)2040 号]；贵州省科技厅项目[黔科合外 Z 字(2012)4010 号]；贵阳医学院院基金第 020 号
**通信作者 E-mail：zhizhongguan@ yahoo. com
网络出版时间：2014－11－19 网络出版地址：http://www. cnki. net/kcms/detail/52. 5012. R. 20141119. 1301. 018. html

sis, which is possible to correlate with the mechanism of liver damages triggered by fluoride poisoning.
[**Key words**] fluorosis; rats; P-glycoprotein; nuclear factor-κB; liver

慢性氟中毒不仅损害牙齿(氟斑牙),而且损害骨骼(氟骨症),同时还能引起消化系统、中枢神经系统和泌尿系统等全身各组织器官的广泛损伤[1]。已证实氟化物可造成肝脏的毒性作用,表现为肝细胞排列紊乱,胞浆疏松等病理学改变[2]。P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)是第一个被发现的人腺苷三磷酸结合盒转运蛋白,在人体组织中广泛表达。P-gp 可外向转运多种毒物,保护组织免遭毒性物质的侵害,同时可将药物泵出到细胞外,导致细胞的耐药[3-4]。细胞核因子 κB(nuclear factor κB,NF-κB)是细胞内重要的核转录因子,参与多种基因的表达和调控,其中包括激活 P-gp 表达,从而与许多疾病的发生发展密切相关[5-7]。已发现慢性氟中毒可影响 NF-κB 的转录调控,这可能在氟中毒肝脏损伤中起重要作用[8]。本实验对染氟 6 个月的大鼠肝脏进行检测,研究慢性氟中毒对肝脏中 P-gp 和 NF-κB 的影响,探讨氟中毒肝脏损害的发生机理。

1 材料与方法

1.1 试剂

小鼠抗 P-gp 的单克隆抗体(美国 Abcam 公司),小鼠抗 NF-κB 的多克隆抗体及抗小鼠 IgG(美国 Santa Cruz 公司);ECL 试剂盒(美国 Thermo 公司),RNA 提取剂 Trizol (美国 Invitrogen 公司),cDNA 合成试剂盒(美国 Promega 公司),NF-κB 的 mRNA 引物(上海生工生物工程技术公司),SYBR-Green 预混试剂盒(美国 sigma 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验动物 SD 大鼠 60 只(由贵阳医学院动物实验中心提供),雌雄各半,体重 100 ~ 120 g,随机分为 3 组,每组 20 只。对照组大鼠予自由饮用自来水,含氟(NaF)量 <0.5 mg/L;小剂量染氟组、大剂量染氟组大鼠分别饮用加入 10、50 mg/L NaF 的自来水。3 组大鼠均饲以动物中心配制的标准营养动物,NaF <0.6 mg/kg。饲养 6 个月后,采用三度法观察氟斑牙程度和测定尿氟含量,确定成功复制动物模型后,经股动脉放血处死大鼠,取肝脏待用。

1.2.2 P-gp、NF-κB 蛋白和 mRNA 的测定 采用蛋白印迹法测定大鼠肝脏中 P-gp 和 NF-κB 蛋白的表达。取大鼠肝脏 100 mg,加入蛋白提取液制备组织匀浆,测定蛋白含量,经 10% SDS-PAGE 电泳分离蛋白,转膜,分别用 P-gp 抗体(1∶100)和 NF-κB 抗体(1∶500)4 ℃孵育过夜,再与抗小鼠 IgG 室温孵育 2 h。将膜与 ECL 试剂反应 5 min,用显影胶片曝光,冲洗胶片后用图像分析仪处理,用 β-actin 抗体与同一张膜反应,结果作为内参照物。实时荧光定量 PCR 法测定大鼠肝脏中 NF-κB mRNA 的表达。提取大鼠肝脏总 RNA,通过 2% 的琼脂糖电泳和紫外分光光度计确定总 RNA 完整性、纯度和浓度;逆转录合成 cDNA 后,用实时荧光定量 PCR(real-time PCR)方法测定 NF-κB 的转录水平。引物由上海生工生物技术有限公司合成,NF-κB 上游为 5'-CACTAAATCCAACACAGGCATCAC-3',下游为 5'-GTGTTTCTTTCTCAGGGGGATTC-3',产物长度 119 bp;β-actin 上游 5'-CACCCGCGAGTACAACCTTC-3',下游为 5'-CCCATACCCACCATCACACC-3',产物长度 207 bp。反应条件:变性 95 ℃、45 s,退火 62 ℃、30 s,延伸 70 ℃、45 s,35 个循环。

1.3 数据处理

采用 SPSS 17.0 软件,统计用单因素方差分析,数据以均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氟斑牙、尿氟

小剂量染氟组和大剂量染氟组氟斑牙和尿氟水平明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见表 1。

2.2 P-gp 和 NF-κB 蛋白表达

对照组、小剂量染氟组和大剂量染氟组 P-gp 蛋白表达水平分别为(100.00 ± 10.12)%、(203.47 ± 13.69)% 和(218.52 ± 12.58)%,见图 1A;对照组、小剂量染氟组和大剂量染氟组 NF-κB 蛋白蛋白表达分别为(100.00 ± 15.26)%、(389.25 ± 15.36)% 和(412.66 ± 18.92)%,见图 1B;小剂量和大剂量染氟组 P-gp 和 NF-κB 蛋白表达高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1　3 组大鼠氟斑牙程度及尿氟含量

Tab. 1　Dental fluorosis degrees and urinary fluorine contents of rats in the three group

组别	n	氟斑牙程度				尿氟(mg/L)
		0	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	
对照组	20	20	0	0	0	0.64 ± 0.37
小剂量染氟组	20	0	14	6	0	4.17 ± 1.39(1)
大剂量染氟组	20	0	6	13	1	5.70 ± 1.70(1)

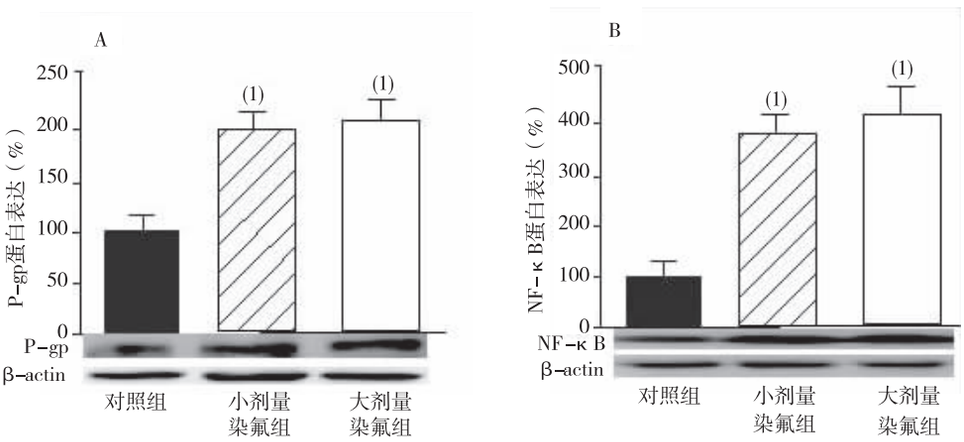
(1) 与对照组相比，$P < 0.05$

2.3　NF-κBmRNA 表达

小剂量染氟组、大剂量染氟组 NF-κBmRNA 表达均高于对照组($P < 0.05$)，见表 2。

3　讨论

过量的氟化物可引起肝脏的损伤，但损伤机制尚未完全阐明。P-gp 的主要功能是防止机体对外来有害物质的摄入和对机体的损害[9]。本实验中结果显示，染氟组大鼠肝脏中 P-gp 蛋白表达水平高于对照组，认为与过量氟摄入后导致机体处于应激或代偿状态有关。P-gp 的应激性增高可能是机体对氟摄入过多所引起的一种自我保护性表现。不过随着肝脏中 P-gp 的表达不断升高，势必会引起机体的耐药现象，可能会为氟中毒的治疗带来一定困难。



注：A 为 P-gp 蛋白表达，B 为 NF-κB 蛋白表达；(1) 与对照组比较，$P < 0.05$

图 1　大鼠肝脏 P-gp 和 NF-κB 蛋白表达

Fig. 1　Protein expression levels of P-gp and NF-κB in rat liver

表 2　大鼠肝脏 NF-κB mRNA 表达

Tab. 2　NF-κB mRNA expression levels in rat liver

组别	NF-κB mRNA
对照组	1.013 ± 0.213
小剂量染氟组	1.561 ± 0.322(1)
大剂量染氟组	1.612 ± 0.193(1)

(1) 与对照组相比，$P < 0.05$

本实验中染氟组大鼠肝脏中 NF-κB 蛋白表达水平明显高于对照组，mRNA 表达与蛋白表达一致，亦升高，其机制可能是机体摄入过量氟后，氧化应激水平增高从而激活 NF-κB。NF-κB 的上调会促进促炎细胞因子和生长因子等释放，从而引起持久的炎症反应、细胞毒性作用，最终导致细胞死亡造成组织损伤，这也可能是氟致肝脏损伤的途径之一。NF-κB 在细胞中有抗凋亡和促凋亡两方面作用，细胞凋亡是生长发育的一种生理过程，凋亡过多或过少都可发生病理改变，导致疾病发生[10-12]。研究表明，氟作为一种细胞毒性物质，可使人胎肝细胞凋亡率明显升高[13]，本实验中 NF-κB 蛋白和转录表达水平的增高，提示氟可能通过激活 NF-κB，启动下游转录因子，从而抑制抗凋亡基因的表达而使细胞发生凋亡，造成相应组织器官的损伤[14]。有研究结果提示 P-gp 过表达与 NF-κB 活化相关，阻断 NF-κB 活化可以减弱 P-gp 的表达，而激活 NF-κB 可上调 P-gP 表达[15-16]。本实验中染氟大鼠肝脏中 P-gp 和 NF-κB 的蛋白表达均增高，提示染氟大鼠肝脏中 P-gp、NF-κB 过表达可能与氟中毒性肝脏损伤的发生机制有关。

4　参考文献

[1] 李达圣，安东，何平. 贵州省燃煤型地方性氟中毒流行现状调查分析[J]. 中国地方病学杂志，2005(6)：651-654.

（下转第 824 页）

curs or 1esions of cervical cancer in Mexican women [J]. Gyne 0nco, 2003(2):310 - 317.
[4] Herrera L, Kakati S, Gibas L, et al. Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q [J]. Am J Med Genel, 1986(3):473 - 476.
[5] Groden J, Thliveris A, Samowitz W, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis eoli gene [J]. Cell, 1991(60):589 - 600.
[6] Larue L, Delmas V. The Wnt/β - catenin pathway in melanoma[J]. Front Biosci, 2006(11):733 - 742.
[7] Shin Yoshioka, Mandy L. King, Sophia Ran, et al. WNT7A regulates tumor growth and progression in ovarian cancer through the WNT/β-catenin pathway Mol Cancer Res [J]. 2012(3):469 - 482.
[8] Costa VL, Henrique R, Ribeiro FR, et al. Epigenetic regulation of Wnt signaling pathway in urological cancer [J]. Epigenetics, 2010(4):343 - 351
[9] 黄凯,叶建新,陈祥锦,等. 大肠肿瘤 APC 基因蛋白产物的表达及其意义[J]. 福建医药杂志, 2003(2):53 - 54.
[10] Kalan I, Denny L, Pollack A, et al. Human papillomavirus DNA testing for cervical cancer screening in low - resource settings [J]. Nail Cancer Inst, 2000(10):818 - 825.
[11] Juhlin CC, Kiss NB, Villablanca A, et al. Frequent promoter hypermethylation of the APC and RASSF1A tumour suppressors in parathyroid tumours [J]. PLoS One, 2010 (3):9472.
[12] Dulce MH, Laura 0B, Miriam GJ, et al. Association between high 2 risk human papilomavims DNA load and precurs or 1esions of cervical cancer in Mexican women [J]. Gyne 0nco, 2003(2):310 - 317.
[13] Cogliano V, Baan R, Straif K, et al. Carcinogenicity of human papillomavirus [J]. Lancet Oncol, 2005(4):204.
[14] Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer [J]. N Engl J Med, 2003(348): 518 - 527.
[15] Wentzensen N, Sherman ME, Schiffman M, et al. Utility of methylation markers in cervical cancer early detection: appraisal of the state-of-the-science[J]. Gynecol Oncol, 2009(2):293 - 9.
[16] 顾红媛,樊立华. 宫颈癌致病危险因素的研究进展[J]. 实用肿瘤学杂志, 2014(4):367 - 370.
[17] 秦海燕. 宫颈癌 54 例病因分析及治疗体会[J]. 世界最新医学信息文摘:电子版, 2013(1):122 - 123.
[18] 刘兰华. β-连环蛋白和腺瘤样的结肠息肉病蛋白在宫颈上皮内瘤样变及宫颈鳞癌中的表达及意义[J]. 临床和实验医学杂志, 2011(12):915 - 917.

(2014-08-20 收稿,2014-10-15 修回)
中文编辑: 文箐颍; 英文编辑: 赵 毅

(上接第 819 页)

[2] 边晓燕,吴振铎,李红,等. 氟对大鼠肝细胞影响及 SOD 阻断因子的透射电镜研究[J]. 中国地方病学杂志, 1993(3):136 - 137.
[3] Rigor R R, Hawkins B T, Miller D S. Activation of PKC isoform β1 at the blood-brain barrier rapidly decrease P-glycoprotein activity and enchances drug delivery to the brain [J]. Cereb Blood FlowMetab, 2010(7):1373 - 1383.
[4] Miller D S. Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier[J]. Trends Pharmacol Sci, 2010(6):246 - 254.
[5] Calzado MA, Bacher S, Schmitz ML. NF-KappaB inhibitors for the treatment of inflammatory diseases and cancer [J]. Curr Med chem, 2007(3):367 - 376.
[6] Garcia MG, Alaniz LD, Cordo RUSSO RI, et al. PI3K/Akt inhibition modulates multidrug resistance and activates NF-kappa B in murine lymphoma cell lines[J]. Leuk Res, 2009(2):288 - 296.
[7] Shish JM, Chiang TA, Chang WT, et al. Plumbagin inhibits TPA-induced MMP-2 and u-PA expressions by reducing binding activities of NF-kappa and AP-1 via ERK signaling Pathway in A549 human Iung cancer cells[J]. Mol Cell Biochem, 2010(1):181 - 193.
[8] Zhang MZ, Wang W, Xia T, et al. Effect of fluoride on DNA damage, Sphase cell cycle arrest and the expression of NF-κB in primary cultured rat hippocam pal neurons [J]. Toxicol Lett, 2008(1):1 - 5.
[9] Fantappie O, Solazzo M, Lasagna N, et al. P-glycoprotein mediates celecoxib-induced apoptosis in multiple drug-resistant cell lines[J]. Cancer Res, 2007(10): 4915 - 4923.
[10] Yu CH, Argyropoulos G, Zhang Y, et al. Neuroinflammation activates Mdrlb efflux transport through NF-κB: Promoter analysis in BBB endothelia[J]. Cell Physiol Biochem, 2008(56):745 - 756.
[11] 苏剑东,吴灵飞. NF-κB 与细胞凋亡[J]. 世界华人消化杂志, 2007(12):1411 - 1416.
[12] 刘素荣,叶孟. NF-κB 和凋亡相关的调控途径[J]. 现代实用医学, 2009(1):86 - 88.
[13] 褚启龙,王爱国,夏涛,等. 氟致人胎肝细胞氧化应激与细胞凋亡关系研究[J]. 中国地方病学杂志, 2004(2):105 - 107.
[14] Campbell KJ, Rocha S, Perkins ND. Active repression of antiapoptotic gene expression by RelA (65) NF-kappaB [J]. Mol Cell, 2004(6):853 - 865.
[15] Uwe S. Anti-inflammatory interventions of NF-kappaB signaling: Potential applications and risks[J]. Biochem Pharmacol, 2008(8):1567 - 1579.
[16] Yu CH, Argyropoulos G, Zhang Y, et al. Neuroinflammation activates Mdrlb efflux transport through NF-κB: Promoter analysis in BBB endothelia[J]. Cell Physiol Biochem, 2008(56):745 - 756.

(2014-08-22 收稿,2014-09-24 修回)
中文编辑: 文箐颍; 英文编辑: 赵 毅