论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201412236

氟化钠诱导氧化应激促进大鼠子宫组织炎症反应及其作用机制

廖星贵,李艳丽,邱义稳,周永江,耿艳清,刘学庆,陈雪梅,王应雄,何俊琳 (400016 重庆,重庆医科大学公共卫生与管理学院生殖生物学研究室)

[摘要] **目的** 通过对氟化钠染毒大鼠的炎症反应相关因子及关键信号通路分子的检测,探讨其对大鼠子宫组织细胞氧化损伤的作用机制。**方法** 将30只雌性SD成年大鼠分为3组(10只/组),分别给予蒸馏水(对照组)、100 mg/L氟化钠溶液(100 mg/L氟化钠处理组)、200 mg/L氟化钠溶液(200 mg/L氟化钠处理组)饮用,持续染毒180 d,建立氟化钠染毒动物模型。采用Western blot、免疫组织化学法检测子宫组织炎症相关因子Cox-2、ICAM-1、TNF-α、IL-1β表达;采用ELISA对氧化应激相关分子ROS、MDA、SOD、CAT、GSH进行检测;采用Western blot测定P38、ERK、JNK、PI3K活性物质的表达。**结果** 2个氟化钠处理组大鼠子宫组织炎症相关因子Cox-2、ICAM-1、TNF-α、IL-1β表达量明显高于对照组($P<0.05$);2个氟化钠处理组ROS、SOD、CAT、GSH明显高于对照组,而MDA明显低于对照组($P<0.05$);与对照组相比,2个氟化钠处理组P38、JNK蛋白磷酸化效率增加($P<0.05$),而且ERK、PI3K总蛋白及磷酸化蛋白表达水平均有增加。**结论** 氟化钠可诱导大鼠子宫组织的氧化应激,促进炎症反应发生,MAPK(ERK、JNK、P38)和PI3K信号通路可能参与其中。

[关键词] 氟化钠;氧化应激;P38;JNK信号通路;子宫;炎症反应
[中图法分类号] R392.3; R711.32; R992 [文献标志码] A

Sodium fluoride activates P38 and JNK *via* induction of oxidative stress to promote uterine inflammation in rats

Liao Xinggui, Li Yanli, Qiu Yiwen, Zhou Yongjiang, Geng Yanqing, Liu Xueqing, Chen Xuemei, Wang Yingxiong, He Junlin (Laboratory of Reproductive Biology, School of Public Health and Management, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the mechanism of oxidative damage caused by sodium fluoride (NaF) through detecting inflammation-related factors and signaling pathway molecules in rats. **Methods** NaF poisoning model was established. Thirty adult female SD rats, which had no difference in age and weight, were randomly divided into 3 groups (10 in each group), and then fed with pure water (control group), 100 mg/L NaF (100 mg/L NaF-exposed group) and 200 mg/L NaF (200 mg/L NaF-exposed group), respectively, for 180 days. Inflammation-related factors Cox-2, ICAM-1, TNF-α and IL-1β were measured by Western blotting and immunohistochemistry, and oxidative stress-related factors ROS, MDA, SOD, CAT and GSH were detected by ELISA. In addition, signaling pathway molecules P38, ERK, JNK and PI3K were analyzed by Western blot. **Results** Cox-2, ICAM-1, TNF-α and IL-1β were highly expressed in the endometria of the rats exposed to NaF ($P<0.05$). The levels of ROS, SOD, CAT and GSH were higher in the NaF-exposed groups, but the MDA level was lower compared with the control group ($P<0.05$). In the NaF-exposed groups,

[基金项目] 重庆市地质矿产勘探开发局项目(渝地勘科字[2010]第2号);国家自然科学基金面上项目(30973195)
[通信作者] 何俊琳,E-mail:hejunlin_11@aliyun.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150702.1654.011.html(2015-07-02)

phosphorylation levels of P38 and JNK were significantly increased. Though ERK and PI3K proteins and their phosphorylation levels were also increased in the NaF-exposed groups, there was no significant difference between the NaF-exposed groups and the control group. **Conclusion** NaF activates P38 and JNK *via* induction of oxidative stress to promote inflammation of the endometria in the rats.

[**Key words**] sodium fluoride; oxidative stress; P38; JNK signaling pathway; uterus; inflammation

Supported by the Project of Chongqing Bureau of Geology and Mineral Resources Exploration (2010-2) and the General Program of National Natural Science Foundation of China (30973195). Corresponding author: He Junlin, E-mail: hejunlin_11@aliyun.com

氟(F)是人体必需的微量元素之一,与钙磷代谢有密切关系。但人体中氟元素的安全范围较窄,过量摄入将会对人体多个器官和组织造成损害。国内外研究发现,氟中毒对消化、呼吸、泌尿生殖系统均有不同程度的损害[1]。近年来,已有研究证实过量的氟化钠会损伤生殖系统,造成哺乳动物睾丸结构破坏、精子受精能力丧失等[2],高浓度的氟化物还会导致雌性动物激素分泌紊乱和子代发育异常[3]。课题组前期研究也发现,氟化钠暴露可导致大鼠妊娠率显著降低,血清中类固醇激素明显减少,提示生殖轴功能紊乱可能参与氟化钠的致毒作用[4];进一步研究发现,氟化钠通过引起雌鼠卵巢组织氧化应激,进而导致卵巢颗粒细胞凋亡、卵泡发育异常、卵巢萎缩[5]。同时发现氟化钠暴露可导致子宫组织细胞排列紊乱[9],初步证实了氟化钠暴露对子宫组织形态方面的影响,但是,具体损伤的分子机制尚不明确。本研究从氧化应激、炎症反应方面对氟化钠暴露所致的子宫损伤进行了研究,并进一步探讨其可能的发生机制,旨在为全面理解氟化钠暴露对雌性生殖系统的影响打下基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

酶标仪为美国 Thermo 公司产品,低温高速离心机为 Sigma 公司产品,ChemiDocXRS$^+$荧光化学发光凝胶成像系统,氟离子浓度计、甘汞电极、磁力搅拌器为上海越磁电子科技有限公司产品,氟离子选择电极为上海禹昂自动化科技有限公司产品,显微镜照相系统为日本 Olympus 公司产品。

氟化钠购自天津光复精细化工研究所,环氧化酶-2(Cox-2)、细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、白介素-1β(IL-1β)抗体购自 Abcam 公司,P38、JNK、PI3K 抗体购自 Millpore 公司,ERK 抗体购自 Santa Cruz 公司,β-actin 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司。超敏 ECL 化学发光试剂盒购自 Millpore 公司,组化试剂盒购自武汉博士德公司,DAB 显色试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司,活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽(GSH)ELISA 检测试剂盒购自上海研辉生物科技有限公司。

1.2 建立 SD 大鼠氟化钠暴露模型

将 30 只年龄、体质量无统计学差异的雌性 SD 成年大鼠(8~10 周龄,体质量 160~250 g,购自重庆医科大学实验动物中心)分为 3 组(10 只/组),分别给予蒸馏水(对照组)、100 mg/L 氟化钠溶液(100 mg/L 氟化钠处理组)、200 mg/L 氟化钠溶液(200 mg/L 氟化钠处理组)饮用,持续染毒 180 d。

1.3 血清及子宫组织氟离子浓度检测(氟离子选择电极法)

采集大鼠静脉血,自然凝固后取上清待检;将各组大鼠子宫组织置匀浆器充分碾磨后,倒入离心管中,加入 10 倍体积的生理盐水,3 000 r/min 离心后取上清待检。

分别配制 10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}mol/L 氟离子溶液,取 10 mL 样品溶液和 10 mL 总离子强度调节缓冲液加入到一个定容试管中,用超纯水定容至 100 mL。连接仪器电源预热 30 min 后,氟电极接仪器负极、汞电极接仪器正极,两级插入超纯水后,开动搅拌器,使电位 < −320 mV。将 10^{-7}mol/L 氟离子溶液倒入烧杯,放入磁性搅拌棒,插入干净电极,搅拌,读取并记录数值。根据所测结果做出标准曲线,然后测出待测溶液中氟离子浓度所对应的电位,从而换算出氟离子浓度值。

1.4 Western blot 检测 Cox-2、ICAM-1、TNF-α、IL-1β 和 P38、ERK、JNK、PI3K 蛋白表达

染毒完成后,收集新鲜的大鼠子宫组织,加入预冷的组织裂解液及 PMSF,冰上碾磨片,静置 30 min,裂解产物 4 ℃ 12 000×g 离心 15 min,上清液用 BCA 法测定蛋白浓度。用 SDS-PAGE 凝胶电泳分离后将蛋白转至 PVDF 膜上,将膜用 PBST 配制的 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1 h 后,分别用 Cox-2、ICAM-1、TNF-α、IL-1β、

P38、pP38、ERK、pERK、JNK、pJNK、PI3K、pPI3K 一抗 4 ℃ 孵育过夜，PBST 清洗 5 次，每次 5 min，再与辣根过氧化物酶标记的二抗 37 ℃反应，用 PBST 充分洗涤后，用 ECL 化学发光液于凝胶成像系统成像，用 Quantity One 分析条带灰度值，并用目的蛋白/内参灰度值表示蛋白相对表达量。

1.5 免疫组织化学法检测 Cox-2、ICAM-1 蛋白表达及分布

染毒完成后的大鼠脱臼处死后，取出子宫组织放于4%多聚甲醛固定 6 h，然后分别在 70%、80%、95%、100%酒精梯度脱水、透明、浸蜡、包埋。将蜡块置于切片机切出 5 μm 厚的石蜡切片。将切片脱蜡、水化后，置于枸橼酸盐缓冲液（pH =6.0）中，于微波炉高火沸腾，转中低火解冻 15 min，室温冷却。滴加 H_2O_2 于组织上，室温孵育 15 min 消除内源性过氧化物酶后，PBS 清洗。加入山羊血清封闭液 37 ℃封闭 3 min 后，倾去血清，分别滴加 Cox-2、ICAM-1 一抗，4 ℃ 过夜后，充分清洗，滴加生物素标记的二抗，37 ℃ 孵育 30 min，PBS 洗 3 次，每次 10 min，滴加辣根过氧化物标记的链霉素亲和素，37 ℃孵育 30 min，充分清洗后用 DAB 显色，观察到适度深浅的棕黄色后终止反应并用苏木精复染，常规脱水、透明后用中性树胶封片，于显微镜照相系统采集图像。

1.6 ELISA 检测 ROS、MDA、SOD、CAT、GSH 水平

为探索氧化应激是否参与了氟化钠所导致的大鼠子宫组织炎症反应，我们对氧化损伤指标 ROS、MDA 和抗氧化损伤指标 SOD、CAT、GSH 进行了检测。大鼠子宫组织处理方法同 1.3 所述，上清液送上海研辉生物科技有限公司用 ELISA 检测 ROS、MDA、SOD、CAT、GSH 水平。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计学分析，行单因素方差分析，统计图利用 GraphPad Prism 5.0 软件绘制。

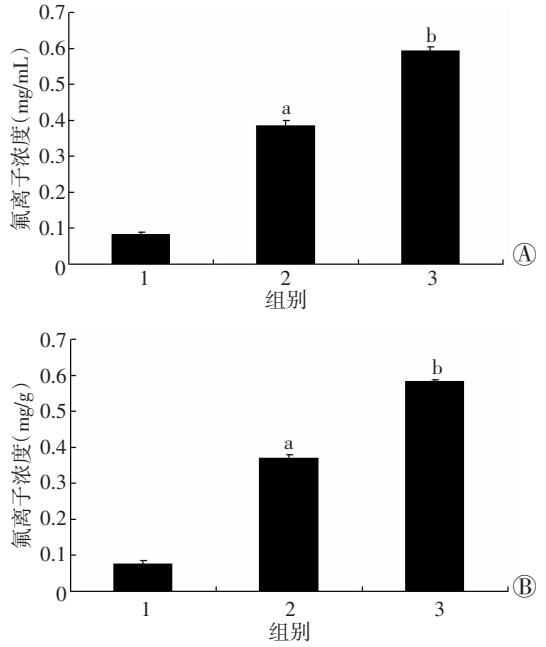
2 结果

2.1 模型验证

动物血清及子宫组织中的氟离子浓度测定结果显示，氟化钠处理组氟离子浓度明显高于对照组（$P < 0.05$，图 1），表明模型建立成功。

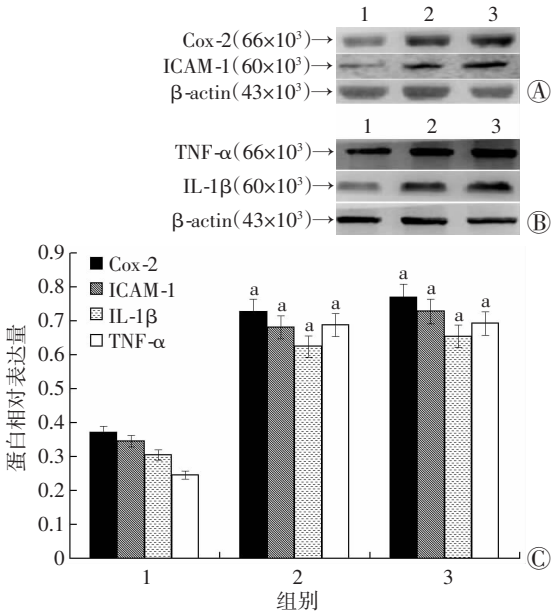
2.2 氟化钠处理导致大鼠子宫组织发生炎症反应

100 mg/L、200 mg/L 氟化钠处理组大鼠子宫组织炎症相关因子 Cox-2、ICAM-1、TNF-α、IL-1β 表达水平均明显高于对照组（$P <0.05$，图 2）。进一步用免疫组化检测 Cox-2、ICAM-1 的表达及分布，结果发现氟化钠处理组 Cox-2、ICAM-1 广泛表达于子宫基质中，而对照组未见明显阳性表达（图 3）。



1：对照组；2：100 mg/L 氟化钠处理组；3：200 mg/L 氟化钠处理组

图 1 离子选择电极法测定血清（A）和子宫（B）中的氟离子浓度



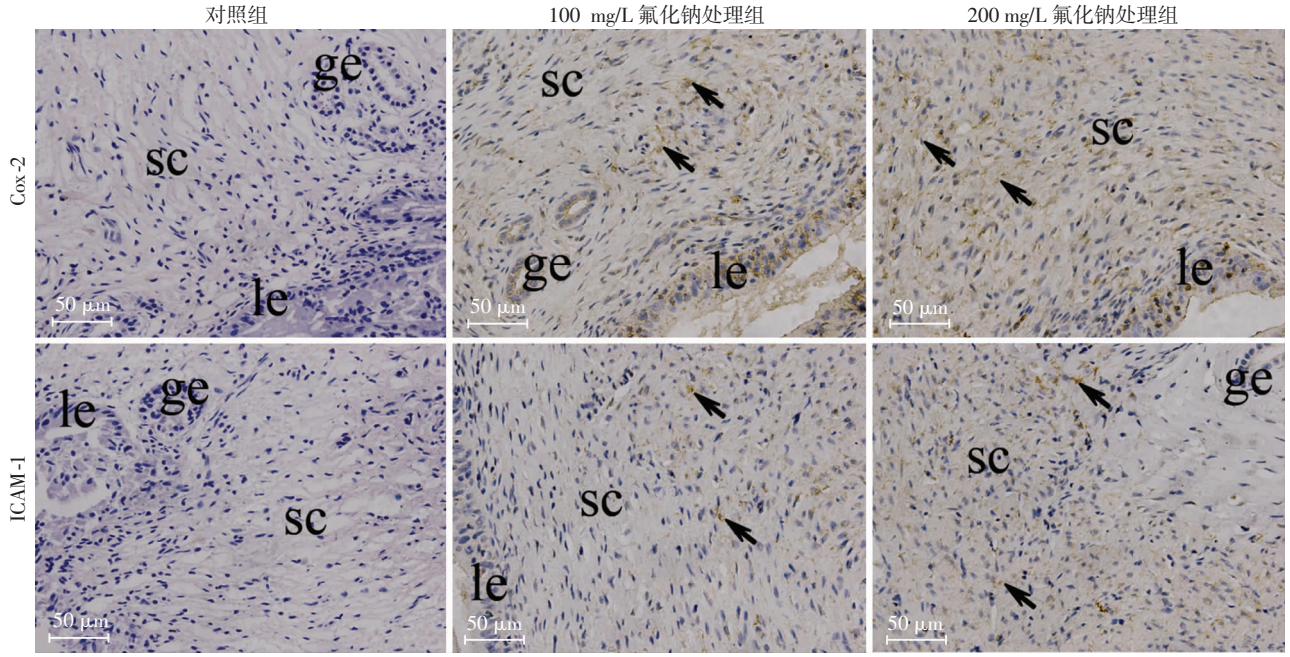
1：对照组；2：100 mg/L 氟化钠处理组；3：200 mg/L 氟化钠处理组

A、B：Cox-2、ICAM-1、TNF-α、IL-1β 蛋白 Western blot 检测结果；C：半定量分析结果 a：$P<0.05$，与对照组比较

图 2 Western blot 检测大鼠子宫组织炎症相关因子 Cox-2、ICAM-1、TNF-α、IL-1β 的表达

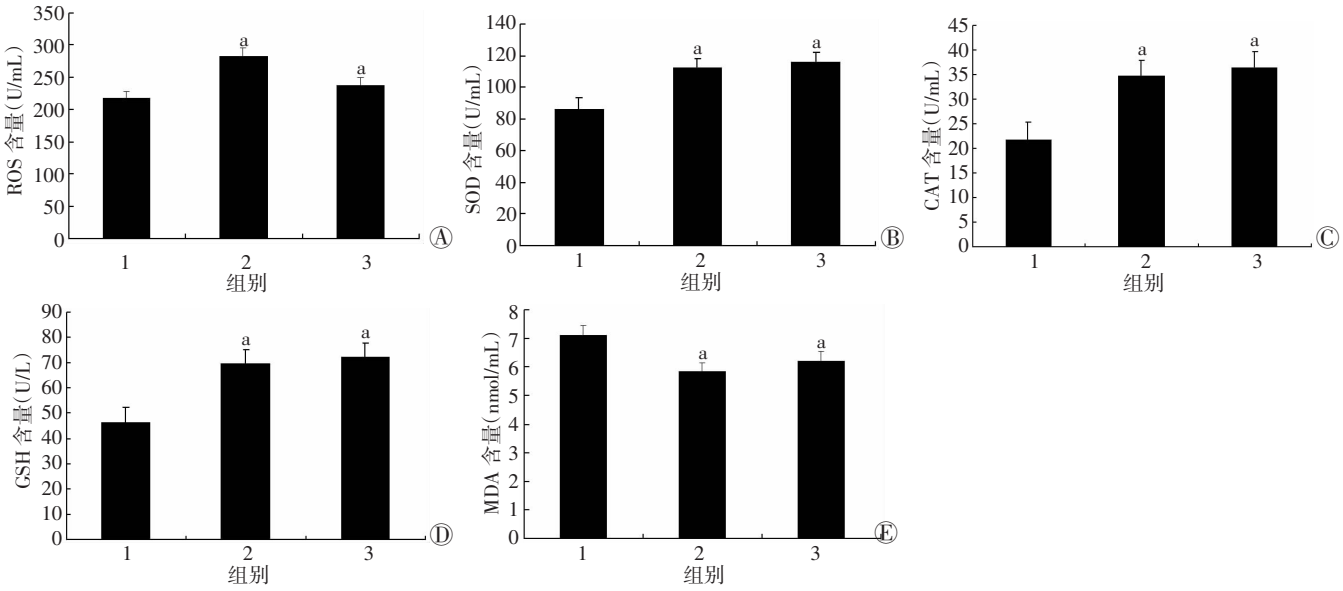
2.3 氟化钠处理引起大鼠子宫组织氧化-抗氧化系统失衡

与对照组相比，氟化钠处理导致大鼠子宫组织 ROS 及抗氧化酶类 SOD、CAT、GSH 明显增高（图 4A～D，$P<0.05$）。进一步对脂质过氧化物 MDA 的水平进行了检测，与对照组相比，100 mg/L 氟化钠处理组与 200 mg/L 氟化钠处理组 MDA 水平都明显降低（$P<0.05$，图 4E）。结果证实，氟化钠处理导致大鼠子宫组织产生大量过氧化物，同时，也激发机体产生大量的抗氧化物质，打破了机体氧化系统与抗氧化系统之间的平衡。



ge：腺上皮；le：腔上皮；sc：基质细胞 ↑：示棕色为阳性表达

图 3 免疫组化检测 Cox-2、ICAM-1 在子宫组织的表达及分布 （S-P）

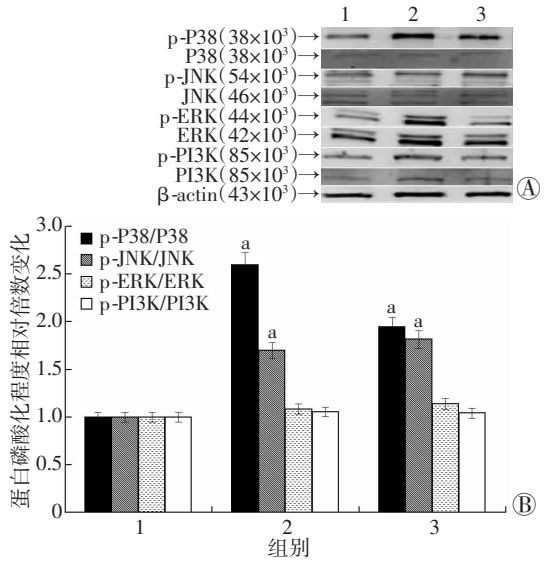


A：ROS；B：SOD；C：CAT；D：GSH；E：MDA 1：对照组；2：100 mg/L 氟化钠处理组；3：200 mg/L 氟化钠处理组

图 4 ELISA 检测各组子宫组织氧化应激指标变化

2.4 氟化钠处理导致大鼠子宫组织MAPK(ERK、JNK、P38)和PI3K信号通路相关蛋白表达增高

氟化钠处理组P38、JNK的磷酸化效率较对照组明显增高($P<0.05$),虽然ERK和PI3K的磷酸化效率和对照组比较无明显差异($P>0.05$),但两者的总蛋白量和磷酸化蛋白水平在氟化钠处理组均升高(图5)。



1:对照组;2:100 mg/L氟化钠处理组;3:200 mg/L氟化钠处理组

A:Western blot检测结果;B:半定量分析结果 a:$P<0.05$,与对照组比较

图5 Western blot检测氟化钠处理对MAPK(ERK、JNK、P38)和PI3K信号通路的影响

3 讨论

随着氟化物在生活和医疗工作中的运用增多,关于氟中毒与人类身体健康之间的关系研究也越来越多。在生殖系统方面,流行病学调查提示随着氟化物含量增高,男性生育力降低[6]。动物实验也表明,长期接触高剂量氟化钠会导致异常精子增多、精子丧失受精能力等[7]。近年来,关于氟中毒对生殖系统的影响有了进一步的进展。Dimcevici-Poesina等[8]研究发现,氟化钠对附睾上皮细胞及精细胞均有直接损害作用。Wang等[9]则发现氟化钠对精子的损害作用是通过氧化应激以及c-Fos的过表达来实现的。另一方面,研究者也对氟中毒的挽救方法进行了探索。Kumar等[10-11]发现维生素D、E能在一定程度上减轻氟中毒对雄性生殖系统的危害。研究显示雌性生殖系统对氟化钠处理更为敏感,当母体暴露于足够高浓度的氟化钠时,雌激素、孕激素、黄体生成素的分泌均会下降,最终可导致妊娠率下降及子代发育异常[12]。后加祥等[13]也得到了相似的结论。但是,目前关于氟中毒对生殖系统影响的分子机制研究尚不深入,且氟对女性生殖毒性的研究较少,特别是氟中毒对子宫内膜损伤的具体机制[14]。

本课题组前期研究证实,氟化钠处理可导致雌性大鼠卵巢和子宫的结构损伤,从而影响生育能力[15]。进一步的机制研究表明,氟化钠对SD大鼠卵巢的损伤是通过激活ERK、JNK信号通路诱导氧化应激造成大鼠卵巢细胞凋亡实现的[5]。本研究通过对雌性SD大鼠子宫组织的进一步研究,发现在氟化钠处理组子宫组织的Cox-2、ICAM-1、TNF-α、IL-1β蛋白表达比对照组高,证实氟化钠会导致子宫组织发生炎症反应。由于氧化应激是诱导炎症发生的重要机制之一[16],并且课题组已在前期实验中证明了氟化钠可诱导氧化应激[5],故本研究对氧化应激的情况进行了检测,结果显示,氟化钠亦能导致大鼠子宫组织产生较多的ROS,同时该过程也激发了机体产生大量抗氧化物如SOD、CAT、GSH,最终导致了氧化系统及抗氧化系统的不平衡。但是,氧化损伤可导致脂质及过氧化,从而使组织中MDA水平增高。本实验结果显示,与对照组相比,氟化钠处理组子宫内膜MDA含量没有增加反而下降,可能是由于机体内氧化-抗氧化系统处于一个动态变化的过程。有研究发现,使用溴联苯醚(BDE3)处理翡翠贻贝之后,组织中的SOD活性受到诱导,而MDA的水平却可以呈现出诱导后抑制或者抑制-诱导的反复变化[17]。本实验仅对氟化钠染毒后一个特定的时间点的子宫组织进行了MDA含量测定,其水平的降低可能是由于抗氧化物一过性激活所致。因此,在大鼠子宫组织中,氟化钠诱导的氧化应激是炎症反应发生的重要原因。通常PI3K/Akt和MAPK信号通路是参与氧化应激的重要信号通路[18]。本课题组对PI3K和MAPK家族成员ERK、JNK、P38的检测结果显示P38、JNK的磷酸化效率在氟化钠处理组明显增高,ERK和PI3K的表达及磷酸化水平也升高,提示MAPK、PI3K信号通路在氟化钠诱导的子宫组织发生氧化应激性炎症反应中可能发挥了重要作用。本研究发现了氟化钠通过氧化应激激活炎症反应损害大鼠子宫内膜组织,并进一步进行了分子机制的探讨,加深了我们对于氟的生殖毒性的理解。

本实验仅限于动物研究,由于动物和人体的调节

机制差别较大,关于氟化钠的生殖毒性研究还需要更充分的人群调查资料以及更细致的人类细胞和分子水平的研究。在今后的实验中,除了单方面探讨氟化钠的毒理学效应以及调控机制以外,还需要研究相应的补救措施,才能更好地应用研究结果,提高氟中毒地区的生育率。

参考文献:

[1] Nielsen F H. Micronutrients in parenteral nutrition: boron, silicon, and fluoride[J]. Gastroenterology, 2009, 137(5 Suppl): S55-S60.

[2] Eppig J J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals[J]. Reproduction, 2001, 122(6): 829-838.

[3] Soni M G, Kachole M S, Pawar S S. Alterations in drug metabolising enzymes and lipid peroxidation in different rat tissues by fluoride[J]. Toxicol Lett, 1984, 21(2): 167-172.

[4] Zhou Y, Qiu Y, He J, *et al*. The toxicity mechanism of sodium fluoride on fertility in female rats[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 62: 566-572.

[5] Geng Y, Qiu Y, Liu X, *et al*. Sodium fluoride activates ERK and JNK *via* induction of oxidative stress to promote apoptosis and impairs ovarian function in rats[J]. J Hazard Mater, 2014, 272: 75-82.

[6] Freni S C. Exposure to high fluoride concentrations in drinking water is associated with decreased birth rates[J]. J Toxicol Environ Health, 1994, 42(1): 109-121.

[7] Sun Z, Niu R, Wang B, *et al*. Fluoride-induced apoptosis and gene expression profiling in mice sperm *in vivo*[J]. Arch Toxicol, 2011, 85(11): 1441-1452.

[8] Dimcevici-Poesina N, Balalau C, Barca M, *et al*. Testicular histopathological changes following sodium fluoride administration in mice[J]. Rom J Morphol Embryol, 2013, 54(4): 1019-1024.

[9] Wang J, Zhang H, Xu F, *et al*. The antagonism of aluminum against fluoride-induced oxidative stress and c-Fos overexpression in rat testes[J]. Toxicol Mech Methods, 2014, 24(2): 136-141.

[10] Kumar N, Sood S, Arora B, *et al*. To Study the Effect of Vitamin D and E on Sodium-Fluoride-induced Toxicity in Reproductive functions of Male Rabbits[J]. Toxicol Int, 2012, 19(2): 182-187.

[11] Kumar N, Sood S, Arora B, *et al*. Effect of duration of fluoride exposure on the reproductive system in male rabbits[J]. J Hum Reprod Sci, 2010, 3(3): 148-152.

[12] Collins T F, Sprando R L, Black T N, *et al*. Developmental toxicity of sodium fluoride measured during multiple generations[J]. Food Chem Toxicol, 2001, 39(8): 867-876.

[13] 后加祥, 杨跃进, 巩飚, 等. 饮水氟暴露对女性内分泌激素的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2013, 47(2): 142-146.

[14] 刘丹, 石修权. 氟的生殖毒性研究进展[J]. 中国预防医学杂志, 2014, 15(3): 282-284.

[15] Zhou Y, Zhang H, He J, *et al*. Effects of sodium fluoride on reproductive function in female rats[J]. Food Chem Toxicol, 2013, 56: 297-303.

[16] Salzano S, Checconi P, Hanschmann E M, *et al*. Linkage of inflammation and oxidative stress *via* release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(33): 12157-12162.

[17] 黄志斐, 张喆, 马胜伟, 等. BDE209胁迫对翡翠贻贝(Perna viridis)SOD、MDA和GSH的影响[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(6): 1053-1059.

[18] Karube H, Nishitai G, Inageda K, *et al*. NaF activates MAPKs and induces apoptosis in odontoblast-like cells[J]. J Dent Res, 2009, 88(5): 461-465.

(**收稿**:2014-12-25;**修回**:2015-01-29)

(编辑 吴培红)