

基础研究

慢性氟中毒大鼠胸髓神经细胞凋亡的研究

申庆丰,徐天同,夏英鹏,田 融,张学利,江 汉

(天津市人民医院脊柱外科 300121)

【摘要】目的:探讨慢性氟中毒大鼠胸髓神经细胞的凋亡及其发生机制。**方法:**60 只 Wistar 大鼠饲养 1 周后随机分为 2 组,每组 30 只,实验组饮氟化水(氟化钠 200mg/L),对照组饮蒸馏水,每组分别于 4 周、8 周、12 周时用不锈钢代谢笼收集 24h 尿液并取血测定血、尿氟含量;实验组在分组后和处死前行脊柱 CT 检查;12 周时将两组大鼠全部处死,取胸段脊髓约 5mm 长,连续横切片,片厚 5 μ m,行苏木素-伊红(HE)染色、脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)对凋亡细胞进行标记、免疫组化检测半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的表达。**结果:**饲养 12 周后对照组大鼠门齿呈瓷白色半透明,实验组大鼠门齿全部出现斑釉;各时间点实验组大鼠血、尿氟含量与对照组大鼠比较明显升高,差异有显著性($P<0.01$);实验组大鼠 12 周时胸椎 CT 未见椎管狭窄,无脊髓受压;实验组大鼠 12 周时胸髓 HE 染色显示神经细胞空泡变性和固缩改变;TUNEL 染色可见神经细胞凋亡明显,阳性细胞数为 3.17 ± 0.23 个/10 个高倍视野,对照组偶见阳性细胞,阳性细胞数为 0.14 ± 0.02 个/10 个高倍视野,两组比较有显著性差异($P<0.01$);对照组偶有 Caspase-3 表达,其阳性细胞数为 0.13 ± 0.01 个/10 个高倍视野,实验组 Caspase-3 阳性细胞数为 2.67 ± 0.37 个/10 个高倍视野,两组有显著性差异($P<0.01$)。**结论:**慢性氟中毒大鼠的胸髓神经细胞凋亡明显,Caspase-3 的参与和过度表达可能是慢性氟中毒时胸髓神经细胞发生凋亡的原因之一。

【关键词】氟中毒;胸髓;神经细胞;凋亡;大鼠

中图分类号:R595.9,R681.5 文献标识码:A 文章编号:1004-406X(2008)-07-0542-04

Studies on the apoptosis of neurocyts in thoracic cord in rats with chronic fluorosis / SHEN Qingfeng, XU Tiantong, XIA Yingpeng, et al // Chinese Journal of Spine and Spinal Cord, 2008, 18(7): 542~545

【Abstract】 Objective: To study the expression of neurocyte apoptosis of thoracic spinal cord in rats with chronic fluorosis and discuss the related mechanism. **Method:** 60 Wistar rats were divided randomly into two groups after a week feeding, 30 rats in study group fed by high dose of NaF water (NaF 200mg/L), others in control group fed by pure water. The serum and urine fluoride were detected at the fourth, eighth and twelfth week. At both the beginning and the twelfth week of the study, all thoracic spine were examined by CT scan. The rats of both groups were sacrificed at the twelfth week. 5mm long thoracic spinal cord were harvested from the sacrificed rats. Cytologic changes of neurocytes in thoracic spinal cord after chronic fluorosis were analysed by HE staining, apoptosis was marked by a terminal deoxyribo-nucleotide transferase-mediated UTP-biotin nick end labeling (TUNEL) and expression of Caspase-3 was determined by immunohistochemistry through 5 μ m thick slices. **Result:** Dental fluorosis was found in all rats in study group but never detected in control group, the serum and urine fluoride of study group were significant higher than that of control group at each time of the test ($P<0.01$), CT scan at the twelfth week did not show spinal canal stenosis and compression of spinal cord. Apoptosis of neurocytes was detected significantly in gray matter of thoracic spinal cord in study group compared with those in control group by TUNEL test (3.17 ± 0.23 positive cell/10hp VS 0.14 ± 0.02 positive cell/10hp, $P<0.01$). Caspase-3 staining results also showed overexpression in the rats of study group (2.67 ± 0.37 positive cell/10hp VS 0.13 ± 0.01 positive cell/10hp, $P<0.01$). HE staining presented vacuolar degeneration and pyknosis of neurocytes at the twelfth week. **Conclusion:** There is a tendency to develop the apoptosis of neurocytes of thoracic spinal cord in rats with chronic fluorosis. Caspase-3 probably plays an important role in the mechanism of the apoptosis induced by excessive fluorine.

【Key words】Fluorosis; Spinal cord; Neurocyte; Apoptosis; Rat

【Author's address】Department of Spine Surgery, Tianjin Medical Union Centre, Tianjin, 300121, China

氟是人体必需的微量元素,但过量的氟会对机体多系统、多器官产生毒性作用。有关研究证实慢性氟中毒可引起脑神经细胞凋亡^[1],但对脊髓神经细胞的作用鲜有报道。本实验对慢性氟中毒大鼠胸髓神经细胞进行观察,旨在了解其是否存在凋亡,并对其机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 动物分组与处理

天津医科大学实验动物部提供的封闭群 1 月龄 Wistar 大鼠 60 只,雌雄各半,体重 100~120g。饲养 1 周后随机分为 2 组,每组 30 只。实验组大鼠饮氟化水(氟化钠浓度 200mg/L),对照组大鼠饮蒸馏水,统一饲以动物中心提供的全营养固体饲料自由饮食,每笼 2 只,观察 12 周。分别于 4 周、8 周、12 周时不用锈钢代谢笼收集 24h 尿液并从股动脉取血测定血、尿氟含量。实验组动物在分组后和处死前分别行脊柱 CT 检查观察椎管是否狭窄。

1.2 取材及切片准备

两组动物饲养 12 周后用水合氯醛腹腔注射麻醉,打开胸腔自左心室插入静脉套管至升主动脉,快速应用冰生理盐水行心脏灌注,切开右心房,待流出的液体清亮后,换用 4%多聚甲醛缓冲液约 100ml 心脏灌注固定 30min,然后自背部切开椎管后壁,10min 内快速暴露脊髓,取胸段 T1~T7 脊髓约 5mm 长,用 4%多聚甲醛缓冲液固定过夜。脱水,石蜡包埋,连续横断面切片,片厚 5 μ m,每组每只动物取切片 9 张。

1.3 脊髓组织学检查

每组每只动物取 3 张切片行苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下对比观察对照组和实验组脊髓神经细胞的形态学改变。

1.4 凋亡细胞的检测

采用德国 Boehringer-Mannheim 公司 In Situ Cell Death Detection 试剂盒,每组每只动物取 3 张切片,按试剂说明书所指示的脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记法(TUNEL)对凋亡细胞进行标记。石蜡切片常规脱蜡,蛋白酶 K 消化,加样反应显色等步骤严格按试剂盒说明书

进行,反应结束后,常规甲基绿复染,封片镜检照相。光学显微镜下观察阳性标记的细胞数,阳性标记的凋亡细胞核呈棕褐色,阴性者细胞核呈蓝色。

1.5 半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)的检测

每组每只动物取 3 张切片,二甲苯脱蜡 10min $\times$ 2 次,梯度浓度乙醇(100%,95%,80%,70%)各 5min 脱水,蒸馏水洗 5min $\times$ 2 次;新鲜配制的 3% H₂O₂ 溶液封闭内源性过氧化物酶活性,室温放置 15min,蒸馏水洗 3min $\times$ 3 次;将切片放入 0.01M 枸橼酸钠抗原修复液内微波抗原修复 10min,冷却至室温后取出切片。加正常山羊血清封闭液,加入兔抗鼠 Caspase-3 P20 亚单位一抗,4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜,加生物素标记二抗,加标记过氧化物酶的链霉素-亲和素复合物,二氨基联苯胺(DAB)显色,中性树脂封片保存;镜下观察每张切片的阳性细胞数。

1.6 统计学分析

由 2 名非本实验组并且熟悉凋亡细胞形态的实验人员对所有免疫组化染色和 TUNEL 标记的切片计数,每张切片数 10 个高倍视野中的阳性细胞数。所有数据用均数 $\pm$ 标准差表示,用 SPSS 11.5 统计软件进行方差分析和 *t* 检验, $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

饲养 12 周时,对照组大鼠门齿呈瓷白色半透明,实验组大鼠门齿全部出现黄色斑釉(图 1、2,后插页 III)。各时间点实验组大鼠血、尿氟含量与对照组比较明显升高,差异有显著性($P<0.01$,表 1),说明实验组动物处在慢性氟中毒状态。12 周时复查胸椎 CT 显示实验组大鼠椎管无变化,未见椎管狭窄和脊髓受压(图 3、4,后插页 III)。

HE 染色对照组大鼠脊髓神经细胞形态及分布未见异常。实验组脊髓神经细胞发生空泡变性或固缩改变,空泡变性细胞胞浆内出现多少不一的空泡,空泡多时细胞边缘不规则;固缩改变细胞体积变小,呈不规则形,胞浆染色加深,核染色也加深、模糊(图 5、6,后插页 III)。

TUNEL 标记的阳性细胞胞核呈棕褐色。对照组偶见阳性细胞;实验组可见部分细胞呈棕褐色,

表 1 不同时间点两组大鼠尿氟及血清氟含量 ($\bar{x}\pm s, n=30$)

	尿氟含量 (mmol/L)			血氟含量 (μmol/L)		
	4周	8周	12周	4周	8周	12周
对照组	0.17±0.01	0.17±0.01	0.17±0.01	5.64±1.33	5.67±1.58	5.62±1.46
实验组	1.57±0.12 ^①	1.69±0.14 ^①	1.76±0.11 ^①	38.45±5.31 ^①	42.86±6.02 ^①	47.19±6.72 ^①

注:①与对照组比较 $P<0.01$

并有核固缩及核周空泡形成,主要在灰质神经细胞中出现。实验组 TUNEL 阳性细胞数明显多于对照组 ($P<0.01$) (图 7、8,后插页Ⅲ,表 2)。

Caspase-3 表达的阳性细胞胞浆呈棕黄色。对照组偶见阳性细胞。实验组可见部分细胞胞浆呈棕黄色,亦有核固缩及核周空泡形成,主要在灰质神经细胞及胶质细胞中表达。实验组 Caspase-3 表达阳性细胞数明显多于对照组 ($P<0.01$) (图 9、10,后插页Ⅲ,表 2)。

表 2 12 周时两组大鼠胸髓中 TUNEL 及 Caspase-3 阳性细胞数 ($\bar{x}\pm s, n=90$, 个/10 个高倍视野)

	实验组	对照组
TUNEL 阳性细胞数	3.17±0.23 ^①	0.14±0.02
Caspase-3 阳性细胞数	2.67±0.37 ^①	0.13±0.01

注:①与对照组比较 $P<0.01$

3 讨论

3.1 原发性氟中毒脊髓病与细胞凋亡

在临床上经常可以遇到氟中毒致脊髓损害的病例,但是至今具体机制不详^[2]。一般认为是由于氟中毒致椎管狭窄压迫脊髓造成。有关氟中毒引起的脊髓原发性损害已陆续有报道。罗达人等^[3]提出氟中毒原发性脊髓病的看法,陈湛音等^[4]通过动物实验发现氟中毒时脊髓神经细胞发生固缩改变。我们在临床也发现一些氟骨症病例,脊髓受压并不严重,但临床症状相当严重;亦有一些病例在椎管减压后,减压相当充分,但症状却无明显缓解^[5]。由此我们考虑氟中毒本身可能对脊髓造成了损害。目前已有关于氟中毒引起神经细胞凋亡的报道,如吕晓红等应用动物实验证实慢性氟中毒可致大鼠海马神经细胞凋亡,并对其机制进行了初步探讨^[1]。但目前绝大多数研究都集中在脑神经细胞的改变。由于脊髓与脑同属中枢神经系统,我们考虑是否脊髓神经细胞凋亡也是氟中毒原发性脊髓病的成因之一。

本实验通过饮用高氟水造成慢性氟中毒大鼠

模型,实验组大鼠饮用高氟水 4 周、8 周、12 周时血、尿氟含量均明显高于对照组,差异有显著性;12 周时形成了氟斑牙,表明实验模型的建立成功。CT 检查显示实验组在饮高氟水 12 周后未见椎管狭窄、脊髓受压。对实验组大鼠胸髓行 HE 染色显示神经细胞有受损表现,行 TUNEL 标记实验组阳性细胞数较对照组显著增多,说明实验组脊髓神经细胞凋亡较对照组明显增多;行 Caspase-3 免疫组化染色,实验组阳性细胞数比对照组显著增多。由于细胞凋亡主要由 Caspase 家族成员介导的蛋白酶级联反应完成,其中 Caspase-3 起着关键作用,Caspase-3 属于胱氨酸-天冬氨酸蛋白酶家族,Caspase-3 为关键的执行分子,Caspase-3 高表达可以诱导细胞凋亡,进一步说明实验组细胞凋亡较对照组明显增多,CT 检查已经排除了由于氟中毒致椎管狭窄造成脊髓受压引起脊髓损伤,说明慢性氟中毒本身可以引起脊髓神经细胞的凋亡。

3.2 脊髓神经细胞凋亡的机制

细胞凋亡是一种由基因调控的细胞自主有序性死亡。许多实验已经表明慢性氟中毒可以引起多种组织细胞的凋亡发生,其中也包括神经系统。有关氟化物诱导细胞凋亡的机制不是十分清楚,目前的研究结果认为与 G 蛋白和活性氧(ROS)有关。Lowth 等^[6]研究发现,氟诱导的大鼠 B 胰岛细胞凋亡是氟使 G 蛋白依赖的信号转导通路持续活化,促进细胞内环腺嘌呤核苷酸(cAMP)含量升高的结果。氟化物可通过激活 Gi 或 Go 蛋白而导致酪氨酸蛋白激酶的激活^[7],再通过有丝分裂激活蛋白激酶 (mitogen activated protein kinases, ras-MAPK)途径将信号转导到核内引起蛋白激酶家族成员胞外信号调节激酶 (ERK)、C-Jun N 末端激酶 (JNK) 和丝裂原激活蛋白酶 p38 等的表达,从而参与细胞增生、分化和凋亡过程。Park 等在研究蛋白激酶 C(PKC)活化诱导胃癌上皮细胞凋亡的下游机制时发现,PKC 抑制剂 Go6983 几乎完全抑制了 Caspase-3 的活化和细胞凋亡^[8]。氟

是化学性质极活泼的元素,机体摄入过量氟以后,氟可直接干扰神经细胞的氧代谢并导致氧自由基显著增多,使抗氧化酶的活性降低,氧自由基增多、脂质过氧化水平增高^[9],氧化应激可以导致和介导细胞凋亡^[10-12],各种不同的抗氧化剂可以阻止细胞凋亡的发生。如 NO 和 H₂O₂ 生成增加,可以诱导大量的细胞凋亡,而此现象可被抗氧化剂维生素 C 所逆转。抗氧化剂谷胱甘肽、N-乙酰半胱氨酸可以保护氟化钠处理的细胞免于发生凋亡^[12]。ROS 可损伤线粒体,使线粒体跨膜电位降低、细胞色素 C 释放进入胞浆,进而在 ATP 存在的条件下细胞色素 C 协助凋亡蛋白酶激活因子(Apaf21) 激活 Caspase-9 引起级联反应,导致 Caspase-3 激活而引起染色体断裂。Anuradha 等^[13]在研究氟化物诱导 HL60 细胞凋亡的机制时发现, 分子量为 32kDa 的 Pro-caspase-3 裂解为 17kDa 的亚单位,116kDa 的无活性多聚二磷酸腺苷(ADP2)核糖聚合酶(PARP)裂解为 89kDa 的有活性的 PARP,说明氟化物可激活 Caspase-3, Caspase-3 再进一步裂解 PARP,由此导致 DNA 断裂和细胞最终凋亡。吕晓红等^[14]发现白细胞介素-1 β 转化酶(ICE 样蛋白酶)在正常脑组织中有表达,当发生慢性氟中毒时 ICE 样蛋白酶的表达水平明显升高,提示 ICE 样蛋白酶参与了慢性氟中毒对脑组织的损害过程,ICE 样蛋白酶的过表达可能是导致神经细胞发生凋亡的主要原因之一。ICE 样蛋白酶也称为 Caspase,被认为是细胞凋亡过程中最重要的蛋白酶。本实验结果显示,在慢性氟中毒大鼠胸髓神经细胞中 Caspase-3 表达明显增多,说明氟化物诱导 Caspase-3 表达可能是引起慢性氟中毒大鼠脊髓神经细胞凋亡的机制之一。

总之,慢性氟中毒大鼠胸髓神经细胞有明显凋亡发生,其可能是氟中毒原发性脊髓病的成因之一。氟化物诱导 Caspase-3 表达可能是引起慢性氟中毒大鼠脊髓神经细胞凋亡的机制之一。

4 参考文献

1. 吕晓红,李广生,孙波.慢性氟中毒大鼠神经细胞凋亡的研究[J].中国地方病学杂志,2000,19(2):96-98.
2. Bartlett JD,Dwyer SE,Beniash E,et al.Fluorosis;a new model-land new insights[J].J Dent Res,2005,84(9):832-836.
3. 罗达人,胡浴桓,谢成忠,等.高氟地区居民神经系统疾病的流行病学调查[J].地方病通报,1988,3(2):64-66.
4. 陈湛音,陆天才,罗达人,等.慢性氟中毒小鼠脊髓病理学改变[J].地方病通报,1992,7(5):39-41.
5. 夏英鹏,徐天同,张黎龙,等.氟骨症颈椎管狭窄症的手术治疗[J].中国地方病学杂志,2005,24(1):85-86.
6. Lowth AC,Williams GT,Scarpell JH,et al.Hetero trimetric G-protein implicated in the regulation of apoptosis in pancreatic beta-ell[J].Exp Cell Res,1996,229(1):69-76.
7. Caverzasio J,Palmer G,Suzuki A,et al. Mechanism of the mitogenic effect of fluoride on osteoblast-like cells:evidences for a G protein-dependent tyrosine phosphorylation process[J].J Bone Miner Res,1997,12(12):1975-1983.
8. Park IC,Park MJ,Rhee CH,et al. Protein kinase C activation by PMA rapidly induces apoptosis through caspase-3/CPP32 and serine protease(s) in a gastric cancer cell line[J].Int J Oncol,2001,18(5):1077-1083.
9. Karaoz E,OncuM,Gulle K,et al. Effect of chronic fluorosis on lipid per-oxidation and histology of kidney tissues in first- and second-generation rats [J].Biol Trace Elem Res,2004,102(1-3):199-208.
10. Gansauge S,Gansauge F,Cause H,et al.The induction of apoptosis in proliferating human fibroblasts by oxygen radicals is associated with a p53 and p21WAF1CIP1 induction[J].FEBS Lett,1997,404(1):6-10.
11. Roberg K,Ollinger K.Oxidative stress causes relocation of the lysosomal enzyme cathepsin D with ensuring apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes[J].Am J Physiol,1998,152(5):1151-1156.
12. Anuradha CD,Kanno S,Hirano S. Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL 260 cells [J].Free Radic Biol Med,2001,31(3):367-373.
13. Anuradha CD,Kanno S,Hirano S. Fluoride induced apoptosis by caspase-3 activation in human leukemia HL-60 cell[J].Arch Toxicol,2000,74(4-5):226-230.
14. 吕晓红,吕晓丽,李广生.慢性氟中毒鼠神经元与细胞凋亡相关基因的研究[J].中国地方病学杂志,2003,22(2):119-121.

(收稿日期:2007-12-06 修回日期:2008-04-09)

(英文编审 郭万首)

(本文编辑 李伟霞)