

氟、砷染毒对大鼠破骨细胞骨吸收能力的影响及其机制

杨德山, 洪峰

摘要:

[目的] 研究氟砷联合染毒对大鼠破骨细胞骨吸收能力的影响及其机制。

[方法] 54只清洁级SD大鼠随机分为9组, 每组6只, 雌雄各半。根据预实验及文献确定染毒剂量, 用NaF和NaAsO₂分别对实验动物予以灌胃染毒, 各染毒组毒物剂量及缩写分别为: 对照组(F₀As₀)、低氟组(5 mg/kg, F₅)、高氟组(20 mg/kg, F₂₀)、低砷组(2.5 mg/kg, As_{2.5})、高砷组(10 mg/kg, As₁₀)、低氟低砷组(5 mg/kg+2.5 mg/kg, F₅As_{2.5})、低氟高砷组(5 mg/kg+10 mg/kg, F₅As₁₀)、高氟低砷组(20 mg/kg+2.5 mg/kg, F₂₀As_{2.5})、高氟高砷组(20 mg/kg+10 mg/kg, F₂₀As₁₀)。酶联免疫吸附法(ELISA法)测定大鼠血清中抗酒石酸酸性磷酸酶5b(TRACP-5b)、I型胶原吡啶交联终肽(ICTP)含量及大鼠右侧股骨组织匀浆上清液中骨保护素(OPG)、前列腺素E₂(PGE₂)、1, 25-二羟基维生素D₃[1, 25(OH)₂D₃]含量。

[结果] 大鼠血清中ICTP、TRACP-5b蛋白表达水平在高氟组均较对照组升高(F₀As₀: 1.352±0.025, 2.942±0.078; F₂₀: 1.427±0.026, 3.202±0.142; 均P<0.05), 而单独染砷组与对照组的差异均无统计学意义(P>0.05)。对于氟砷联合染毒组, 染氟剂量在20 mg/kg时, ICTP、TRACP-5b蛋白含量在高氟高砷组较高氟低砷组明显降低(F₂₀As_{2.5}: 1.442±0.034, 3.280±0.095; F₂₀As₁₀: 1.345±0.042, 3.053±0.084; 均P<0.05)。氟砷的偏相关分析及交互作用结果显示TRACP-5b、ICTP蛋白含量的改变与氟浓度呈正相关(偏相关系数: 0.663, 0.392; 均P<0.05), 氟起到主效应作用(F=24.560, 8.188; 均P<0.05)。大鼠骨组织OPG、PGE₂、1, 25(OH)₂D₃表达水平在高氟组均较对照组升高(F₀As₀: 12.278±0.220, 1.352±0.025, 9.582±0.363; F₂₀: 14.087±0.797, 1.427±0.026, 11.915±0.931; 均P<0.05)。对于氟砷联合染毒组, 染氟剂量为2.5 mg/kg时, 低氟高砷组的PGE₂较低氟低砷组低(F₅As_{2.5}: 1.442±0.034; F₅As₁₀: 1.345±0.080; P<0.05); 染氟剂量为20 mg/kg时, 高氟高砷组1, 25(OH)₂D₃较高氟低砷组低(F₂₀As_{2.5}: 12.082±0.860; F₂₀As₁₀: 10.567±0.695; 均P<0.05)。氟砷的偏相关分析及交互作用结果显示OPG、PGE₂、1, 25(OH)₂D₃含量改变与氟呈正相关(偏相关系数: 0.804, 0.487, 0.748; 均P<0.05), 氟起到主效应作用(F=47.100, 9.031, 3.114; 均P<0.05); 砷对OPG、PGE₂、1, 25(OH)₂D₃的直接影响不明显(P>0.05)。

[结论] 砷能抑制氟暴露对大鼠破骨细胞骨吸收功能的促进作用, 氟砷之间的交互作用主要表现为拮抗作用。PGE₂、1, 25(OH)₂D₃可能是氟砷对破骨细胞骨吸收功能进行调控的重要因子。

关键词: 氟; 砷; 骨; 联合作用; 破骨细胞

引用: 杨德山, 洪峰. 氟、砷染毒对大鼠破骨细胞骨吸收能力的影响及其机制[J]. 环境与职业医学, 2018, 35(4): 297-302. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2018.17694

Effects of fluoride and arsenic exposure on bone absorptive capacity of osteoclasts in rats and related mechanism YANG De-shan, HONG Feng (Key Laboratory of Environment Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China). Address correspondence to HONG Feng, E-mail: hongfeng-73@163.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract:

[Objective] To explore the toxicity and mechanism of combined exposure to fluoride and arsenic on bone absorptive capacity of osteoclasts in rats.

[Methods] A total of 54 SD rats of clean grade were randomly divided into 9 groups, with 6 rats in each group (half males and

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: 81472927)

[作者简介] 杨德山(1987—), 男, 硕士生; 研究方向: 毒物联合作用机制及防治; E-mail: 403292089@qq.com

[通信作者] 洪峰, E-mail: hongfeng-73@163.com

[作者单位] 贵州医科大学公共卫生学院, 环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025

half females). Based on a pilot experiment and literature review, the animals were treated with NaF and NaAsO₂ by intragastric administration: control group (F₀As₀), low fluoride group (5 mg/kg, F₅), high fluoride group (20 mg/kg, F₂₀), low arsenic group (2.5 mg/kg, As_{2.5}), high arsenic group (10 mg/kg, As₁₀), low fluoride and low arsenic group (5 mg/kg+2.5 mg/kg, F₅As_{2.5}), low fluoride and high arsenic group (5 mg/kg+10 mg/kg, F₅As₁₀), high fluoride and low arsenic group (20 mg/kg+2.5 mg/kg, F₂₀As_{2.5}), and high fluoride and high arsenic group (20 mg/kg+10 mg/kg, F₂₀As₁₀). The levels of tartrateresistant acid phosphatase 5b (TRACP-5b) and pyridinoline cross linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen (ICTP) in rat serum, as well as the levels of osteoprotegerin (OPG), prostaglandin (PGE₂), and 1, 25-dihydroxy vitamin D3 [1, 25(OH)₂D₃] in homogenate supernatant of right femur tissue samples were determined by ELISA.

[Results] The expression levels of ICTP and TRACP-5b in the high fluoride group were higher than those in the control group (F₀As₀: 1.352 ± 0.025, 2.942 ± 0.078; F₂₀: 1.427 ± 0.026, 3.202 ± 0.142; *P* < 0.05), while there was no significant difference between any individual arsenic exposure group and the control group (*P* > 0.05). The expression levels of ICTP and TRACP-5b in the high fluoride and high arsenic group were lower than those in the high fluoride and low arsenic group (F₂₀As_{2.5}: 1.442 ± 0.034, 3.280 ± 0.095; F₂₀As₁₀: 1.345 ± 0.042, 3.053 ± 0.084; *P* < 0.05). The results of partial correlation analysis and interaction analysis showed that the expression levels of TRACP-5b and ICTP were positively correlated with fluoride concentration (partial correlation coefficient: 0.663, 0.392; *P* < 0.05), and fluoride showed the main effect (*F* = 24.560, 8.188; *P* < 0.05). The expression levels of OPG, PGE₂, and 1, 25(OH)₂D₃ in the groups treated with high doses of fluoride were significantly higher than those in the control group (F₀As₀: 12.278 ± 0.220, 1.352 ± 0.025, 9.582 ± 0.363; F₂₀: 14.087 ± 0.797, 1.427 ± 0.026, 11.915 ± 0.931; *P* < 0.05). The expression level of PGE₂ in the low fluoride and high arsenic group was lower than that in the low fluoride and low arsenic group (F₅As_{2.5}: 1.442 ± 0.034; F₅As₁₀: 1.345 ± 0.080; *P* < 0.05). The expression level of 1, 25(OH)₂D₃ in the high fluoride and high arsenic group was lower than that in the high fluoride and low arsenic group (F₂₀As_{2.5}: 12.082 ± 0.860; F₂₀As₁₀: 10.567 ± 0.695; *P* < 0.05). The results of partial correlation analysis and interaction analysis showed that the expression levels of OPG, PGE₂, and 1, 25(OH)₂D₃ were positively correlated with fluoride concentration (partial correlation coefficient: 0.804, 0.487, 0.748; *P* < 0.05), and fluoride showed as the main effect (*F* = 47.100, 9.031, 3.114; *P* < 0.05); the direct toxic effects of arsenic on OPG, PGE₂, and 1, 25(OH)₂D₃ were minor (*P* > 0.05).

[Conclusion] Arsenic can inhibit the auxo-action of fluorine on the bone absorption of osteoclasts in rats, and the fluorine-arsenic interaction is mainly antagonistic. PGE₂ and 1, 25(OH)₂D₃ may be important factors in the regulation of osteoclast bone absorption function.

Keywords: fluoride; arsenic; bone; combined effect; osteoclast

Citation: YANG De-shan, HONG Feng. Effects of fluoride and arsenic exposure on bone absorptive capacity of osteoclasts in rats and related mechanism[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2018, 35(4): 297-302. DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2018.17694

骨骼的生长与发育是依赖成骨细胞(osteoblast, OB)的骨重建功能和破骨细胞(osteoclast, OC)的骨吸收功能来维持的,当骨重建与骨吸收之间的动态平衡在外源因素的干扰下发生破坏,就会引发骨代谢的紊乱,最终导致骨骼发生病理性变化。

特殊的地质环境使贵州部分地区环境中蓄积了大量的氟和砷,由氟砷联合作用导致的一系列疾病称为“氟砷综合征”,氟砷中毒能够引起人体多个组织器官的病理性变化,其中骨骼是氟砷联合中毒的重要靶器官之一,本课题组前期实验研究结果^[1]表明,氟砷联合作用能够改变大鼠骨组织基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)、核转录因子-κβ受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor-κβ ligand, RANKL)蛋白含量;而MMP-9、RANKL蛋白含量的改变提示了大鼠骨组织OC骨吸收功能可能发生了变化^[2-3]。因此,本研究拟通过对大鼠进行

氟、砷及氟砷联合染毒,对实验大鼠OC骨吸收能力相关指标如抗酒石酸性磷酸酶5b(tartrateresistant acid phosphatase 5b, TRACP-5b)、I型胶原吡啶交联终肽(pyridinoline cross linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen, ICTP)、骨保护素(osteoprotegerin, OPG)、前列腺素E2(prostaglandin E2, PGE₂)、1, 25二羟基维生素D3[1, 25-Dihydroxy vitamin D3, 1, 25(OH)₂D₃]进行检测,通过观察TRACP-5b、ICTP及OPG、PGE₂、1, 25(OH)₂D₃含量的变化探讨氟、砷及氟砷联合对大鼠OC骨吸收能力的毒性影响及其机制。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

超净工作台(越平科学仪器有限公司,中国),纯水仪(Nikon,日本),高速低温离心机(Sigma,美国),超级酶联免疫检测仪(Thermo,美国),氟化钠(NaF)、

亚砷酸钠(NaAsO_2 , 山东西亚试剂公司, 中国), 大鼠 ICTP ELISA 试剂盒、大鼠 TRACP-5b ELISA 试剂盒、大鼠 OPG ELISA 试剂盒、大鼠 PGE_2 ELISA 试剂盒、大鼠 1, 25(OH) $_2\text{D}_3$ ELISA 试剂盒(上海江莱生物公司, 中国)。

1.2 动物的分组与染毒

取8周龄、清洁级SD大鼠54只, 体重为(109.71 ± 10.52)g[许可证号: SCXK(渝)2007-0003], 按析因设计方法将SD大鼠随机分成9组, 每组6只, 雌雄各半。分别以NaF(5、20 mg/kg, 按体重计, 后同)和NaAsO₂(2.5、10 mg/kg) 进行单独或联合染毒。9个实验组命名(缩写) 为: 对照组(F_0As_0)、低氟组(F_5)、高氟组(F_{20})、低砷组($\text{As}_{2.5}$)、高砷组(As_{10})、低氟低砷组($\text{F}_5\text{As}_{2.5}$)、低氟高砷组(F_5As_{10})、高氟低砷组($\text{F}_{20}\text{As}_{2.5}$)、高氟高砷组($\text{F}_{20}\text{As}_{10}$)。NaF 和 NaAsO₂用去离子水溶解, 按上述分组, 分别予以灌胃。动物自由摄取饲料、自由饮水, 自动控制昼夜循环(12/12h), 室温(22 ± 1)℃。每周染毒5d, 连续灌胃染毒26周。每周称重一次, 调节并维持给药量; 每周调换笼位一次。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 血清中 TRACP-5b、ICTP 蛋白含量的检测 ELISA 法检测血清中 TRACP-5b 和 ICTP 含量。

1.3.2 骨组织中 OPG、 PGE_2 、1, 25(OH) $_2\text{D}_3$ 含量的检测 称取0.3g 右侧股骨组织, 加入少量液氮, 在研钵中迅速将骨组织碾碎至粉末状; 将骨组织粉末转入2mL Eppendorf管中, 加入1.2mL PBS缓冲液(pH=7.4), 充分振荡混匀, 2000×g、4℃, 离心20min。仔细收集上清液。获取骨髓匀浆上清液后采用ELISA法检测骨骼中 OPG、 PGE_2 、1, 25(OH) $_2\text{D}_3$ 含量。

1.4 统计学分析

Excel 建立数据库, SPSS 17.0 统计软件录入数据并对实验数据进行正态性检验、方差齐性检验、单因素方差分析、偏相关分析、交互作用分析。实验结果均以均数 ± 标准差表示, 经检验, 数据符合正态分布; 对数据进行方差齐性检验, 方差齐时,

组间两两比较采用LSD检验, 方差不齐时, 采用 Tamhane's T2法比较; 采用析因设计方差分析判断有无交互作用, 并分析两者交互作用类型; 以氟砷互为控制变量进行氟砷与各指标的偏相关分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 各染毒组大鼠血清中 ICTP、TRACP-5b 蛋白含量的变化

染氟组 ICTP、TRACP-5b 蛋白含量在高氟组均高于对照组($P<0.05$); 与低氟组相比, 高氟组 TRACP-5b 含量高于低氟组, 差异有统计学意义($P<0.05$)。染砷组 ICTP、TRACP-5b 蛋白含量随着染砷剂量的增加, 其变化均不明显($P>0.05$)。与低氟低砷组相比, 低氟高砷组的 ICTP、TRACP-5b 蛋白含量变化不明显($P>0.05$); 与高氟低砷组相比, 高氟高砷组的 ICTP、TRACP-5b 蛋白含量明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。与低氟低砷相比, 高氟低砷组的 TRACP-5b 蛋白含量明显升高, 差异有统计学意义($P<0.05$); 与低氟高砷组相比, 高氟高砷组的 ICTP 蛋白含量明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

2.2 各染毒组大鼠骨组织中 OPG、 PGE_2 、1, 25(OH) $_2\text{D}_3$ 含量的变化

高氟组 OPG、1, 25(OH) $_2\text{D}_3$ 含量高于低氟组, 差异有统计学意义($P<0.05$); 染砷组各指标变化不明显, 高砷组和低砷组组间差异均无统计学意义($P>0.05$)。与低氟低砷组相比, 低氟高砷组的 OPG、1, 25(OH) $_2\text{D}_3$ 含量变化不明显($P>0.05$), 但 PGE_2 蛋白含量降低, 差异有统计学意义($P<0.05$); 与高氟低砷组相比, 高氟高砷组的 1, 25(OH) $_2\text{D}_3$ 含量明显降低, 差异有统计学意义($P<0.05$)。与低氟低砷组相比, 高氟低砷组的 OPG、1, 25(OH) $_2\text{D}_3$ 含量增加, 差异有统计学意义($P<0.05$); 与低氟高砷组相比, 高氟高砷组的 OPG、 PGE_2 含量增加, 差异有统计学意义($P<0.05$)。见表1。

表1 各染毒组 ICTP、TRACP-5b、OPG、 PGE_2 、1, 25(OH) $_2\text{D}_3$ 含量的变化($n=6, \bar{x} \pm s, \text{ng/L}$)

Table 1 Changes of ICTP, TRACP-5b, OPG, PGE_2 , and 1, 25(OH) $_2\text{D}_3$ levels in each group

组别 Group	I 型胶原吡啶交联终肽 ICTP	抗酒石酸性磷酸酶 5b TRACP-5b	骨保护素 OPG	前列腺素 E2 PGE_2	1, 25 二羟基维生素 D3 1, 25(OH) $_2\text{D}_3$
对照组 (F_0As_0)	1.352 ± 0.025	2.942 ± 0.078	12.278 ± 0.220	1.352 ± 0.025	9.582 ± 0.363
低氟组 (5mg/kg, F_5)	1.392 ± 0.028	3.048 ± 0.092^a	12.918 ± 0.685	1.392 ± 0.058	10.415 ± 0.609^a
高氟组 (20mg/kg, F_{20})	1.427 ± 0.026^a	3.202 ± 0.142^{ab}	14.087 ± 0.797^{ab}	1.427 ± 0.026^a	11.915 ± 0.931^{ab}
低砷组 (2.5mg/kg, $\text{As}_{2.5}$)	1.363 ± 0.027	2.965 ± 0.115	12.366 ± 0.465	1.363 ± 0.027	9.695 ± 0.566^{bc}

续表 1

组别 Group	I 型胶原吡啶交联终肽 ICTP	抗酒石酸性磷酸酶 5b TRACP-5b	骨保护素 OPG	前列腺素 E2 PGE ₂	1, 25 二羟基维生素 D3 1, 25(OH) ₂ D ₃
高砷组 (10mg/kg, As ₁₀)	1.382 ± 0.045	2.953 ± 0.095	12.448 ± 0.298	1.382 ± 0.045	9.537 ± 0.732
低氟低砷组 (5mg/kg+2.5mg/kg, F ₅ As _{2.5})	1.408 ± 0.041 ^{ad}	3.043 ± 0.098	13.013 ± 0.391 ^a	1.442 ± 0.034 ^{ad}	10.422 ± 0.602 ^{ad}
低氟高砷组 (5mg/kg+10mg/kg, F ₅ As ₁₀)	1.425 ± 0.038 ^{ae}	3.098 ± 0.085 ^{ae}	13.124 ± 0.383 ^{ae}	1.345 ± 0.080 ^f	11.005 ± 0.792 ^{ae}
高氟低砷组 (20mg/kg+2.5mg/kg, F ₂₀ As _{2.5})	1.442 ± 0.034 ^{ad}	3.280 ± 0.095 ^{adfg}	14.268 ± 0.847 ^{adfg}	1.425 ± 0.038 ^{adfg}	12.082 ± 0.860 ^{adfg}
高氟高砷组 (20mg/kg+10mg/kg, F ₂₀ As ₁₀)	1.345 ± 0.042 ^{gh}	3.053 ± 0.084 ^{ch}	14.365 ± 0.811 ^{ag}	1.408 ± 0.041 ^{ag}	10.567 ± 0.695 ^{cegh}

[注] a: 与对照组相比, $P<0.05$; b: 与低氟组相比, $P<0.05$; c: 与高氟组相比, $P<0.05$; d: 与低砷组相比, $P<0.05$; e: 与高砷组相比, $P<0.05$; f: 与低氟低砷组相比, $P<0.05$; g: 与低氟高砷组相比, $P<0.05$; h: 与高氟低砷组相比, $P<0.05$ 。

[Note] a: Compared with the control group, $P<0.05$; b: Compared with the low fluoride group, $P<0.05$; c: Compared with the high fluoride group, $P<0.05$; d: Compared with the low arsenic group, $P<0.05$; e: Compared with the high arsenic group, $P<0.05$; f: Compared with low fluoride and low arsenic group, $P<0.05$; g: Compared with low fluoride and high arsenic group, $P<0.05$; h: Compared with high fluoride and low arsenic group, $P<0.05$ 。

2.3 氟砷联合染毒对大鼠 TRACP-5b、ICTP、OPG、PGE₂、1, 25(OH)₂D₃ 水平的交互作用

氟对大鼠 TRACP-5b、ICTP、OPG、PGE₂、1, 25(OH)₂D₃ 含量的效应均为主效应($P<0.05$); 而砷的主效应不明显($P>0.05$); 氟砷联合染毒对 TRACP-5b、ICTP 蛋白含量的影响存在交互作用($P<0.05$), 对 OPG、PGE₂、1, 25(OH)₂D₃ 含量交互作用无统计学意义。见表 2。

表 2 氟砷交互作用分析

Table 2 Analysis of the interaction effect of fluoride and arsenic

染毒方式 Exposure type	I 型胶原吡啶交联终肽 ICTP		抗酒石酸性磷酸酶 5b TRACP-5b		骨保护素 OPG		前列腺素 E2 PGE ₂		1, 25 二羟基维生素 D3 1, 25(OH) ₂ D ₃	
	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>	<i>F</i>	<i>P</i>
氟(F)	8.188	0.001	24.560	0.000	47.100	0.000	9.031	0.001	3.114	0.044
砷(As)	2.597	0.086	1.813	0.175	0.059	0.561	1.525	0.229	0.083	0.920
氟+砷(F+As)	3.345	0.018	3.722	0.011	0.020	0.999	0.395	0.811	0.176	0.950

2.4 氟砷与 TRACP-5b、ICTP、OPG、PGE₂、1, 25(OH)₂D₃ 的偏相关分析

氟与 TRACP-5b、ICTP、OPG、PGE₂、1, 25(OH)₂D₃ 的含量均为正相关关系(均 $P<0.05$); 砷与 TRACP-5b、ICTP、OPG、PGE₂、1, 25(OH)₂D₃ 相关性均无统计学意义(均 $P>0.05$)。见表 3。

表 3 氟砷的偏相关分析

Table 3 Partial correlation analysis of fluoride and arsenic

变量 1 Variable 1	变量 2 Variable 2	偏相关系数 Partial correlation coefficient	<i>P</i>	变量 1 Variable 1	变量 2 Variable 2	偏相关系数 Partial correlation coefficient	<i>P</i>
氟(F)	TRACP-5b	0.663	0.000	砷(As)	TRACP-5b	-0.113	0.421
氟(F)	ICTP	0.392	0.004	砷(As)	ICTP	-0.157	0.262
氟(F)	OPG	0.804	0.000	砷(As)	OPG	0.132	0.350
氟(F)	PGE ₂	0.487	0.000	砷(As)	PGE ₂	0.210	0.136
氟(F)	1, 25(OH) ₂ D ₃	0.748	0.000	砷(As)	1, 25(OH) ₂ D ₃	0.192	0.168

[注] TRACP-5b 为抗酒石酸性磷酸酶 5b; ICTP 为 I 型胶原吡啶交联终肽; OPG 为骨保护素; PGE₂ 为前列腺素 E2; 1, 25(OH)₂D₃ 为 1, 25 二羟基维生素 D3。

[Note] TRACP-5b: tartrateresistant acid phosphatase 5b; ICTP: pyridinoline cross linked carboxyterminal telopeptide of type I collagen; OPG: osteoprotegerin; PGE₂: prostaglandin E2; 1, 25(OH)₂D₃: 1, 25-dihydroxy vitamin D3。

3 讨论

ICTP 是 OC 发生溶骨反应时, 骨基质 I 型胶原蛋白在 MMP 介导下释放的一种交联降解产物^[4], 以完整的免疫源性肽形式进入血液之中, 不会进一步发生降解, 是反映 OC 骨吸收速率的敏感指标。TRACP 是 OC

溶酶体中一种特异性高表达的酶, 血液中的 TRACP-5b 主要由骨组织的 OC 分泌, 因此血液中的 TRACP-5b 蛋白含量可以反映骨组织中 OC 的含量。本研究偏相关分析结果表明, 大鼠血清中 ICTP、TRACP-5b 蛋白含量均与氟呈正相关; 且各染毒组 ICTP、TRACP-5b 蛋

白含量的变化结果表明氟促进OC的分化,增加骨组织中OC的含量,加速OC对骨骼的降解速率。氟砷联合染毒结果显示,氟对ICTP、TRACP-5b蛋白含量均呈主效应作用,砷的主效应作用不明显;氟砷联合染毒对ICTP、TRACP-5b的影响表现出明显的交互作用,在氟砷联合染毒组中,染氟浓度在20 mg/kg时,与高氟低砷组相比,高氟高砷组的ICTP、TRACP-5b均降低,这一结果表明砷虽然并未对大鼠血清中ICTP、TRACP-5b蛋白含量表现出直接的毒性影响,却能通过抑制氟对大鼠血清中ICTP、TRACP-5b蛋白含量的促进作用,间接对大鼠血清中ICTP、TRACP-5b蛋白含量进行调控,因此高氟时氟、砷对ICTP、TRACP-5b的交互作用表现为拮抗作用。

OPG是肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)受体家族中一个缺乏跨膜结构域的受体蛋白,主要分布在骨组织及免疫系统,是OC调控终末因子,其调控机制主要是凭借着高亲和性与核转录因子- κ B受体活化因子(receptor activator of nuclear factor- κ B, RANK)竞争性结合,阻断RANKL与RANK的结合,从而抑制破骨细胞前体(osteoclast precursors, OCPs)向OC的分化^[5]。本研究的偏相关分析结果显示,OPG在骨组织的蛋白含量与染氟浓度呈正相关;各染毒组OPG蛋白含量的变化结果表明OPG蛋白含量的变化与染砷浓度无明显相关性,氟起到主效应作用,氟砷联合作用不明显,提示了氟能促进大鼠骨组织OPG蛋白含量的升高。OPG作为OC的抑制因子,其含量变化通常与OC的含量及骨吸收能力呈负相关,但是在本研究中,从TRACP-5b、ICTP蛋白含量变化来看,大鼠骨组织OC含量及骨吸收能力并没有随着OPG含量的升高而降低。对于这一现象,可结合本课题组前期研究的一些结果来讨论,在本课题组前期研究^[1]中观察到大鼠骨组织RANKL蛋白含量在各染毒组主要表现为升高;RANKL的升高抵消了OPG的升高对OC的抑制作用,这可能是本实验中OC骨吸收能力并没有随着OPG蛋白含量上升的原因之一。在本课题组前期研究中观察到RANKL蛋白含量在高氟浓度下随着染砷剂量的升高而逐渐降低;而在本实验中观察到OPG蛋白含量在高氟浓度下,并未随着染砷浓度的增加而变化,而前期研究发现^[1]OPG/RANKL值在高氟高砷组高于高氟低砷组,这可能是氟、砷在F₂₀As_{2.5}、F₂₀As₁₀组对OC骨吸收能力表现为拮抗作用的机制之一。

1, 25(OH)₂D₃是维生素D的主要活性代谢产物,与维生素D受体结合可以上调RANKL的表达^[6]。PGE₂属于前列腺素家族,研究指出,PGE₂能够影响OC中MMP-9的表达,进而实现对MMPs家族的间接调控^[7]。根据PGE₂、1, 25(OH)₂D₃在各染毒组含量的变化、偏相关分析结果可知,氟与PGE₂、1, 25(OH)₂D₃含量呈正相关关系,与染砷剂量无相关性。而PGE₂、1, 25(OH)₂D₃的升高可能是本课题组前期研究中观察到大鼠骨组织MMP-9、RANKL表达升高的原因之一;氟砷的交互作用结果显示,氟起到主效应作用,砷的主效应作用不明显,氟砷之间存在联合作用。氟砷联合染毒组,染氟浓度在5 mg/kg时,PGE₂随着染砷剂量的增加而明显降低,而1, 25(OH)₂D₃变化不明显;染氟浓度在20 mg/kg时,PGE₂变化不明显,1, 25(OH)₂D₃随着染砷剂量的增加而降低,这一结果提示了砷虽然不能直接影响大鼠骨组织PGE₂、1, 25(OH)₂D₃含量,却可以通过抑制氟的主效应作用,达到调控的目的,氟砷的联合毒性在F₂₀As₁₀组对PGE₂、1, 25(OH)₂D₃主要表现为拮抗作用。

综上所述,在本实验条件下,砷能抑制氟暴露对大鼠OC骨吸收功能的促进作用,氟砷之间主要表现为拮抗作用。砷可以在高氟浓度下协同氟对OPG的促进作用,抑制OC骨吸收能力,这可能是氟砷在高氟浓度下对OC骨吸收能力表现为拮抗作用的机制之一。PGE₂、1, 25(OH)₂D₃可能是氟砷对OC骨吸收功能进行调控的重要因子。

参考文献

- [1] 洪峰, 郑冲, 徐德淦, 等. 慢性氟砷联合暴露对大鼠骨骼Runx2及其下游相关因子的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2013, 47(9): 794-798.
- [2] WUCHERPENNIG AL, LI YP, STETLER-STEVENSON WG, et al. Expression of 92kD type IV collagenase/gelatinase B in human osteoclasts[J]. J Bone Miner Res, 1994, 9(4): 549-556.
- [3] COLNOT C, THOMPSON Z, MICLAU T, et al. Altered fracture repair in the absence of MMP9[J]. Development, 2003, 130(17): 4123-4133.
- [4] COLEMAN R, BROWN J, TERPOS E, et al. Bone markers and their prognostic value in metastatic bone disease: clinical evidence and future directions[J]. Cancer Treat Rev, 2008, 34(7): 629-639.
- [5] GILLET C, SPRUYT D, RIGUTTO S, et al. Oleate abrogates

palmitate-induced lipotoxicity and proinflammatory response in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and osteoblastic cells[J]. *Endocrinology*, 2015, 156(11): 4081-4093.

- [6] LIEBEN L, CARMELIET G. Vitamin D signaling in osteocytes: effects on bone and mineral homeostasis[J].

Bone, 2013, 54(2): 237-243.

- [7] 庞显伦, 杨健, 秦昊. 人工关节炎性介质对滑膜细胞基质金属蛋白酶-9表达的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2016, 33(4): 1052-1054.

(收稿日期: 2017-11-27; 录用日期: 2018-02-24)

(英文编辑: 汪源; 编辑: 陈皎; 校对: 丁瑾瑜)