

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.33.003

过量氟引起成骨细胞内质网应激信号通路的基因差异表达^{*}

张亚楼¹, 孙小娜², 冯树梅¹, 李 甜¹, 廖礼彬¹, 白生宾¹, 钟近洁^{1△}

(1. 新疆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室, 乌鲁木齐 830011;

2. 新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心放射卫生科, 乌鲁木齐 830001)

摘 要:目的 观察人成骨细胞在过量氟作用下未折叠蛋白反应(UPR)信号通路的差异基因表达,探索在氟中毒条件下成骨细胞内质网应激的作用。方法 体外培养人成骨细胞染氟模型,用不同浓度的氟干预 24 h 后 MTS 法检测细胞存活率和流式细胞仪检测细胞凋亡百分率,用 UPR 信号通路 PCR Array 芯片检测通路中相关基因表达的情况,并用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测蛋白表达。结果 在氟化钠浓度为 0、5、10、20、40、80 mg/L 时,细胞存活率分别为(100.678 5±2.830 3)%、(105.393 4±2.538 4)%、(106.125 7±2.048 3)%、(77.977 3±2.544 3)% (与对照组比较 $P<0.05$)、(30.237 7±0.632 7)% (与对照组比较 $P<0.05$)。流式细胞仪检测,凋亡率分别为 5 mg/L 组 4.8%,10 mg/L 组 13.8%,20 mg/L 组 37.0%,40 mg/L 组 58.9%,80 mg/L 组 63.2% ($P<0.05$)。PCR 芯片检测发现 1 个基因表达下调,14 个基因表达上调。Western blot 结果显示,BIP、ATF4、CHOP、IRE1 均呈现出不同程度的随氟剂量增加蛋白表达逐渐上调。XBP1 在 NaF 5~20 mg/L 表达逐渐增强,在 40 与 80 mg/L 时表达减弱。结论 氟化钠可以通过 PERK 和 IRE1 途径引起成骨细胞内质网应激,并且可以引起成骨细胞凋亡。

关键词:成骨细胞;未折叠蛋白反应;PCR 芯片

中图分类号:R123

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)33-4425-03

Genes differentially expression of endoplasmic reticulum stress signaling pathway caused by excess fluoride in osteoblasts^{*}

Zhang Yalou¹, Sun Xiaona², Feng Shumei¹, Li Tian¹, Liao Libin¹, Bai Shengbin¹, Zhong Jinjie^{1△}

(1. Department of histology and embryology of Preclinical Institute, Xinjiang Medical University, Urumqi,

Xinjiang 830011, China; 2. Department of Radiation Disease Protection and Radiation Hygiene,

Xinjiang Uyghur Autonomous Region Center for Disease Control and Prevention, Urumqi, Xinjiang 830001, China)

Abstract: Objective To observe gene different expression of unfolded protein response signaling pathway in human osteoblasts under the excessive fluoride, and explore the role of endoplasmic reticulum stress in fluorosis. **Methods** Human osteoblasts were cultured with fluoride, intervening for 24 h. Cell viability and apoptosis were inspected by MTS assay and flow cytometer respectively. The UPR signaling pathway was examined by real time PCR array, and protein expressions were detected by Western blot. **Results** The cell survival rates were (100.678 5±2.830 3)%, (105.393 4±2.538 4)%, (106.125 7±2.048 3)%, (77.977 3±2.544 3)% ($P<0.05$), (30.237 7±0.632 73)% ($P<0.05$) treated with sodium fluoride at the concentration 0, 5, 10, 20, 40, 80 mg/L respectively. Apoptosis rate inspected by flow cytometer was 4.8% in 5 mg/L group, 13.8% in 10 mg/L group, 37.0% in 20 mg/L group, 58.9% in 40 mg/L group, 63.2% in 80 mg/L group ($P<0.05$). Only 1 gene was down regulated and 14 genes were up regulated. Western blot analysis showed BIP, ATF4, CHOP and IRE1 both showed their protein expression gradually up regulated with fluorine dose. XBP1 expression gradually increased in NaF 5—20 mg/L, and its expression decreased at 40 and 80 mg/L. **Conclusion** Sodium fluoride can cause osteoblasts endoplasmic reticulum stress pathway through PTEN and IRE1 pathway, and at high concentrations can cause apoptosis of osteoblast.

Key words: osteoblast; unfolded protein response; PCR array

氟中毒是一种慢性全身性疾病,可致氟斑牙和氟骨症。地方性氟中毒是我国流行最为广泛、病情最为严重的重点地方病之一^[1]。目前,氟中毒机制仍不清楚。研究表明染氟成骨细胞存在内质网应激^[2-3]。但是对于内质网应激信号通路在染氟成骨细胞中的表达,未见报道。本研究用氟化钠(NaF)干预体外培养的人成骨肉瘤细胞 Saos-2,应用荧光定量 PCR Array 技术和蛋白免疫印迹法(Western blot)观察对成骨细胞中未折叠蛋白反应(unfolded protein response, UPR)信号通路的差异基

因蛋白表达,为揭示过量氟暴露下成骨细胞内质网应激的发生特点和开发相应的药物保护剂提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料 NaF,分析纯(上海生工);人成骨肉瘤细胞 Saos-2 购于上海细胞库;Annexin V 凋亡检测试剂盒(Invitrogen);MTS 细胞增殖分析试剂盒(Promega);RNeasy Plus Mini Kit;RT2 First Strand Kit (Qiagen);RT2 SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen);PCR 芯片(PAHS-089ZA-2)购于 Qiagen 公

司;实验中所用一抗 BIP、XBP1、ATF4、IRE1、CHOP、EIF2S1、 β -actin 均购自 Abcam 公司,羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)二抗、羊抗鼠 HRP 二抗购自武汉博士德。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Saos-2 在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基于 37℃、5% CO₂ 培养箱进行贴壁培养,每 2~3 天根据细胞生长的密度和培养液酸碱度的变化更换培养液,当细胞汇合达到 80% 进行传代培养。

1.2.2 细胞增殖 Saos-2 细胞生长处于对数生长期时,胰酶消化成单细胞悬液。细胞计数后以 2×10^4 细胞接种于 96 孔板,37℃、5% CO₂ 培养。NaF 用培养液配制,浓度分别为 5、10、20、40、80 mg/L,同时设立空白对照(对照组)。染氟时间为 24 h。每孔 100 μ L 培养基加入 20 μ L MTS,酶标仪检测吸光度值,检测波长 490 nm。每种处理剂量设置 5 个复孔。

1.2.3 凋亡细胞的流式细胞仪检测 将 Saos-2 细胞接种于 25 cm² 的培养瓶中,待细胞长至镜下细胞融合度为 80% 时,加入 NaF(0、5、10、20、40、80 mg/L)作用 24 h 后,再加入 0.25% 胰酶消化细胞,制成单细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^6 个/mL,用 Annexin V 和 PI 双染色在流式细胞仪上进行早期细胞凋亡的检测。

1.2.4 PCR 芯片检测 将 NaF(0、10 mg/L)干预 Saos-2 细胞 24 h 后,提取 RNA。NANODROP 分光光度计测定其浓度,琼脂糖凝胶电泳测定其 RNA 完整性。取 400 ng RNA 前转录合成 cDNA,采用 Qiagen 公司 RT2 Profiler PCR Array 进行荧光定量检测,将 cDNA 模板适当稀释后加入到实时荧光定量 PCR(RT-PCR)反应混合液中,然后在含有基因特异性引物的 96 孔板各孔中加入等量反应液,于 RT-PCR 仪(Eppendorf Mastercycler ep realplex 2)上进行 RT-PCR 反应。计算每张 PCR 芯片中的每个基因的 Ct 值。每种处理组,重复用 PCR 芯片测定 3 次。采用 $\Delta\Delta$ Ct 方法比较相应基因的表达量变化。表达量差异在 2 倍以上者为差异有意义基因。

1.2.5 蛋白表达检测 采用 Western blot 法。提取各组细胞总蛋白,蛋白质定量试剂盒(BCA)法测定蛋白浓度。取 30 μ g 蛋白质,与 5 \times 上样缓冲液混合,100℃变性 10 min。各种一抗以 1:1 000 稀释。加入 ECL 化学发光试剂,反应 5 min,X 线片曝光后,显影,定影,以管家基因 β -actin 作为内参照。

1.3 统计学处理 采用 SPSS12.0 统计软件分析数据,细胞增殖及凋亡结果采用单因素方差(组间比较采用 LSD 法)分析,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞增殖结果 NaF(剂量分别为 5、10、20、40、80 mg/L) 对人成骨细胞 Saos-2 作用 24 h 后,细胞存活率分别为 $(100.6785 \pm 2.8303)\%$ 、 $(105.3934 \pm 2.5384)\%$ 、 $(106.1257 \pm 2.0484)\%$ 、 $(77.9773 \pm 2.5442)\%$ 、 $(30.2377 \pm 0.6327)\%$ 。与对照组比较,40、80 mg/L 组的细胞存活率差异有统计学意义($P<0.05$),见图 1。

2.2 流式细胞仪检测凋亡结果 NaF 可以促进 Saos-2 细胞凋亡,在 5、10、20、40、80 mg/L 浓度下 Saos-2 细胞凋亡率分别为 4.8%、13.8%、37.0%、58.9%、63.2% ($P<0.05$),呈现出剂量依赖性,其浓度越高,促凋亡作用越强,见图 2。

2.3 PCR 芯片检测结果 PCR 芯片检测显示在总共 84 个检测基因中表达下调的有 FBXO6 基因,表达上调的有 BIP、XBP1、ATF4、PERK、IRE1 α 、IRE1 β 、ERO1LB、JNK3、PDIA3、USP14、HSPA1L、HSPH1、HTRA4、UGCG1 等 14 个基因,图 3。

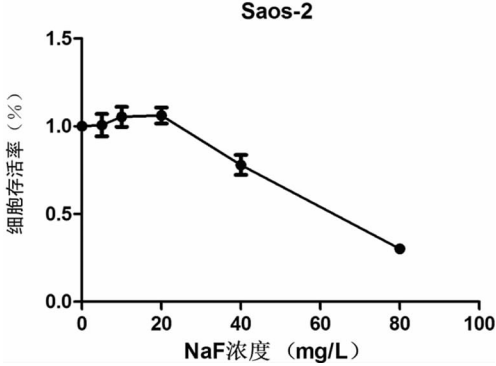


图 1 不同浓度 NaF 对人成骨肉瘤细胞 Saos-2 的增殖抑制作用

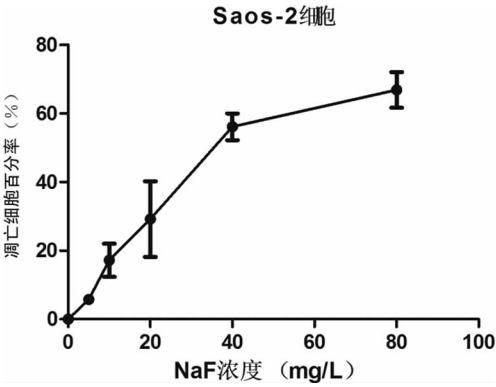


图 2 不同浓度 NaF 对人成骨肉瘤细胞 Saos-2 的凋亡作用

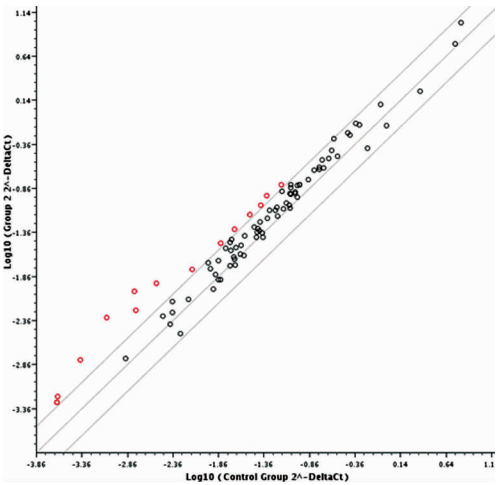


图 3 PCR 芯片 (PAHS-089ZA-2) 检测确定有 15 个差异表达基因

2.3 Western blot 检测结果 0、5、10、20、40、80 mg/L NaF 作用 Saos-2 细胞 24 h 后抽提细胞总蛋白进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),分别行 EIF2S α 、ATF4、IRE1、GRP78、XBP1 和 CHOP 蛋白检测结果。BIP 表达随 NaF 剂量增高而增强;CHOP 在 40 与 80 mg/L 时表达,且逐渐增强;XBP1 在 5~10 mg/L 时,表达随 NaF 剂量逐渐增强,

在 40 与 80 mg/L 时表达减弱;ATF4 表达明显随 NaF 剂量增高而增强;IRE1 也随 NaF 干预剂量增高而表达增强,但不如 ATF4 明显;EIF2 α 表达在各剂量组中基本保持不变,见图 4。

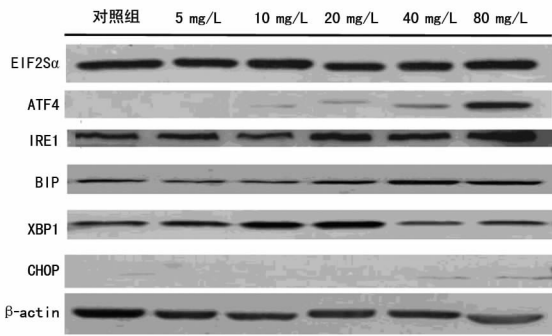


图 4 不同浓度 NaF 作用于人成骨细胞 24 h 的蛋白表达

3 讨 论

当细胞内未折叠蛋白质或错误折叠的蛋白质聚集在内质网内,即可引发内质网应激,从而进一步产生内质网应激反应,表现为 UPR,以恢复或维持内质网的功能^[4-5]。持续的内质网应激,如不能恢复,会导致细胞凋亡^[6-7]。氟可以造成成骨细胞的内质网应激并引起 UPR,并调节成骨细胞的分化和成熟^[8]。引起内质网应激的途径可能是氟离子引起的过氧化反应、内质网钙代谢紊乱或者氟离子的直接化学作用^[9-11]。

RT-PCR Array 是目前较为简单实用的检测基因表达的方法,能够一次性检测 84 个与 UPR 相关的基因在 mRNA 水平上的表达,结果无需再进行实时荧光定量检测。在本研究中,下调的基因 *FBXO6*,与诱导内质网相关性降解(ER-associated degradation,ERAD)有关。在表达上调的 14 个基因中,属于未折叠蛋白结合的基因有:*UGCG1*、*ERO1B*;属于内质网蛋白质折叠的质量控制的基因有:*GANC*;属于翻译调节的基因有:*EIF2A*;属于 ERAD 的基因有:*HTRA4*;属于泛素化有关的基因为 *USP14*;属于转录因子的有:*ATF4*、*XBP1*、*IRE1 α* 、*IRE1 β* ;属于凋亡相关基因的有:*JNK3*、*PERK*;属于热休克蛋白的基因有:*HSPA1L*、*HSPH1*、*BIP*;属于蛋白质二硫键异构酶的基因有:*PDIA3*。

从芯片检测结果,发现过量氟引起了成骨肉瘤细胞 Saos-2 未折叠蛋白信号通路中多种基因有意义表达,进一步用 Western blot 发现 BIP、CHOP、XBP1、ATF4 等蛋白表达随剂量逐渐增高,ATF4、XBP1 分别属于内质网应激 3 条通路中的两条:PERK 和 IRE-1,说明这两条通路均参与了氟对成骨细胞的作用。本研究中尚未发现第 3 条通路 ATF6 路径在染氟过程中的变化。尤其是 PTEN 途径,ATF4 的蛋白表达呈现出典型的剂量反应关系。XBP1 在 NaF 5~20 mg/L 表达逐渐增强,与此时成骨细胞内质网应激状态增强有关。而在内质网应激较强状态时,40、80 mg/L 的表达减少,XBP1s 蛋白表达受到抑制,可能是 UPR 受阻,进入诱导细胞凋亡^[12]。而此时染氟成骨已经不能处理 UPR,成骨细胞逐渐转向凋亡,这与流式细胞仪反映出的结果相符。CHOP 的表达与凋亡密切相关,在

芯片的检测结果中虽然没有发现其高表达,但是据已有的研究和本次实验发现,在 NaF 20、40 mg/L 时表达明显增高,也与流式细胞仪的凋亡百分率结果相符合。

综上所述,氟所激活的 UPR 信号通路与成骨细胞的生长和增殖密切相关。尤其是氟中毒条件下成骨细胞内质网应激与细胞凋亡存在一定的关系,本研究仅涉及少数凋亡相关基因,与凋亡信号通路尚未联合研究,并且其发生的先后顺序仍需要进一步研究。

参考文献:

- [1] 孙殿军,高彦辉.我国地方性氟中毒防治研究进展与展望[J].中华地方病学杂志,2013,32(2):119-120.
- [2] 徐辉,赵志涛,井玲,等.氟中毒大鼠骨组织中内质网应激实验研究[J].中国地方病学杂志,2009,28(1):36-40.
- [3] 张亚楼,刘开泰.氟化钠诱导成骨细胞内质网应激特征[J].环境与健康杂志,2010,27(3):221-223.
- [4] 张叶,蒋旭超,赵小武,等.甲基汞急性暴露诱导大鼠内质网应激的脑区特异性及时间效应特征研究[J].卫生研究,2010,39(3):271-274.
- [5] 赵雅宁,李建民,刘乐,等.内质网应激相关分子 GRP78 在高血压加重全脑缺血大鼠神经损伤中的作用[J].南方医科大学学报,2012,32(11):1675-1679.
- [6] 何顺华,祁婷婷,张青,等.白藜芦醇诱导 HL-60 细胞凋亡的磷酸化蛋白质组研究[J].国际检验医学杂志,2013,34(11):1348-1350.
- [7] 许小涛,陶泽璋,宋启斌,等.PTEN-P13K/AKT 信号传导途径对胃癌细胞株 MKN28 凋亡的影响[J].中华消化外科杂志,2012,11(4):377-381.
- [8] Zhou YL,Shi HY,Li XN,et al. Role of endoplasmic reticulum stress in aberrant activation of fluoride-treated osteoblasts[J]. Biol Trace Elem Res,2013,154(3):448-456.
- [9] Xu H,Zhou YL,Zhang XY,et al. Activation of PERK signaling through fluoride-mediated endoplasmic reticulum stress in OS732 cells[J]. Toxicology,2010,277(1/3):1-5.
- [10] 徐志霞,徐八一,夏涛,等.细胞内钙离子和活性氧在氟化钠致人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞损伤中的关系[J].中国地方病学杂志,2009,28(2):126-129.
- [11] 楼迪栋,潘际刚,张凯林,等.慢性氟中毒对大鼠神经细胞线粒体融合基因表达与线粒体形态的影响[J].中华预防医学杂志,2013,47(2):170-174.
- [12] Sommerweiss D,Gorski T,Richter S,et al. Oleate rescues INS-1E β -cells from palmitate-induced apoptosis by preventing activation of the unfolded protein response[J]. Biochem Biophys Res Commun,2013,441(4):770-776.