

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.13.003

p53、p21 在氟中毒雌鼠卵巢早衰中的表达变化*

刘洋¹,李艳菊²,王宁³,刘振华⁴,杨华¹,刘燕青¹,王飞清^{1△}

(1. 贵阳中医学院第一附属医院检验科, 贵阳 550001; 2. 贵州医科大学附属医院血液科, 贵阳 550004;
3. 贵州省骨科医院药剂科, 贵阳 550002; 4. 贵州省人民医院肝胆外科, 贵阳 550002)

[摘要] **目的** 探讨 p53、p21 在燃煤型氟中毒雌鼠卵巢早衰中的表达变化。**方法** 选用断乳 24 只清洁级 SD 雌鼠建立动物模型(模型组), 于染氟 90 d 将雌鼠处死。观察雌鼠染氟期间牙齿的变化, 观察卵巢颗粒细胞改变检测雌鼠尿氟、骨氟水平和卵巢组织衰老基因 p53 和 p21 表达情况。**结果** 模型组氟斑牙、尿氟和骨氟水平明显升高。模型组中, 低氟组卵巢组织颗粒细胞未见早衰, 但随染氟剂量的增加, 卵巢组织颗粒细胞呈现轻度、中度、重度性水肿的趋势, 细胞形态损伤模糊, 且闭锁的卵泡明显增加, 黄体退化严重, 成熟卵泡显著减少, 卵巢功能呈现逐渐早衰的迹象。随染氟剂量增加, 各染氟组衰老基因 p53 和 p21 表达逐渐增加, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 燃煤型氟中毒致卵巢早衰与基因 p53 和 p21 的表达明显相关。

[关键词] 氟化物中毒; 卵巢功能早衰; p53; p21

[中图分类号] R994.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)13-1712-04

The expression changes of p53 and p21 in female rats of premature ovarian failure in fluorosis*

LIU Yang¹, LI Yanju², WANG Ning³, LIU Zhenhua⁴, YANG Hua¹, LIU Yanqing¹, WANG Feiqing^{1△}

(1. Department of Clinical Laboratory, the First Affiliated Hospital of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang, Guizhou 550001, China; 2. Department of Hematology, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550004, China; 3. Department of pharmacy, Guizhou Orthopedics Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China;
4. Department of Hepatobiliary Surgery, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang, Guizhou 550002, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression changes of p53 and p21 in premature ovarian failure in female rats exposed to coal burning fluorosis. **Methods** Ablactation 24 SD female rats were chosen to establish animal model (the model group), in fluorine 90 days were put to death. Observed the changes of the teeth of the female rats during fluorine exposure and ovarian granulosa cell premature aging change, detected fluorine contents of urine and bone, and expression of the ovarian granular cell gene p53 and p21. **Results** In the model group, fluorine spot tooth, the fluorine contents of urine and bone increased significantly. In the model group, there was no premature aging of ovarian granulosa cells in the low fluorine group, but with the increase of dye fluorine metering, ovarian granulosa cells became mild, moderate to severe progressive edema trends, cells morphological damaged fuzzy, and atresia follicles increased significantly, corpus luteum degraded, mature follicle significantly reduced, and the ovarian function gradually signs of premature aging presented. With the increase of dye fluoride measurement, the expression of aging gene p53 and p21 in each group gradually increased, compared with the control group, there was statistically significant difference ($P < 0.05$). **Conclusion** Premature ovarian failure caused by coal-burning fluorosis was significantly related to the expression of genes p53 and p21.

[Key words] fluoride poisoning; ovarian failure, premature; p53; p21

研究显示, 过量氟可导致机体氧化应激产物大量蓄积进一步损伤子宫、卵巢等生殖脏器^[1-2]。当前, 氟中毒对雌性机体损伤和防治是科研人员的难题, 本课题

前期研究发现燃煤型氟中毒可影响雌鼠动情周期、性激素分泌、损伤卵巢超微结构^[3-5]。实验报道, p53 和 p21 在失重致雌鼠卵巢衰老中呈现高表达^[6]。

* 基金项目: 贵州省科技厅项目(黔科合 LH 字[2017]7127、7128 号); 贵阳中医学院基金项目([2017]14 号)。 作者简介: 刘洋(1978-), 副主任技师, 博士, 主要从事干细胞、肿瘤、地方病防治研究。 △ 通信作者, E-mail: wfq8806@163.com。

氟中毒是否通过激活衰老基因 p53 和 p21 的表达,促进卵巢过早衰老,影响雌性生殖功能的相关机制研究还未得到科研人员的关注。本课题组设计以 SD 雌鼠为研究对象,解析燃煤型氟中毒致雌鼠卵巢早衰影响因素,并为今后病区雌性生殖功能的防治工作起到重要意义,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料 由贵州医科大学动物实验中心提供 90~100 g 清洁级 SD 大鼠 24 只,许可证号:SCXK(黔)2012-0001。实时定量荧光 PCR(RT-PCR)由大连宝生物公司提供;引物序列 primer3 设计由上海英俊公司合成;PF-1 型氟离子选择性电极由上海精密科学仪器有限公司生产;Olympus BX51 双目光学显微镜由奥林巴斯光学工业株式会社生产。

1.2 方法

1.2.1 动物模型构建 适应性喂养 1 周,分为对照组、低氟组(25 mg/kg)、中氟组(50 mg/kg)、高氟组(100 mg/kg),每组 6 只,每周调整鼠笼的位置,力求各组雌鼠的实验条件一致。各组自由饮水,自由食用不同配方的原煤加拌泥煤烘烤的玉米饲料,于染氟 90 d 处死。

1.2.2 氟斑牙发生情况 每周观察各组大鼠牙齿变化情况,并判定大鼠牙齿的损伤程度并记录。处死大鼠前对各大鼠的牙齿进行拍照。具体氟斑牙分度参考国家标准分为正常、轻度、中度、重度^[7]。

1.2.3 尿氟和骨氟 采用氟离子选择电极法测定氟水平,具体参见既往实验^[4]。

1.2.4 光镜观察卵巢组织形态学变化 处死动物后,迅速取下一侧卵巢,经 10% 甲醛溶液固定 3 d 后,常规取材、脱水、石蜡包埋、切片、苏木精-伊红(HE)染色,光镜 200 倍镜下观察卵巢组织结构有无形态学改变。

1.2.5 RT-PCR 测定卵巢中 p53、p21 mRNA 表达 采用 Trizol 法提取雌鼠卵巢组织总 RNA,根据试剂盒说明书具体方法进一步采用 RT-PCR 进行基因片段扩增并定量。各 PCR 反应管中所加模板 RNA 的量约为 1 μg。p53、p21 PCR 扩增条件为:RT-PCR 95 °C 5 s,59 °C 20 s,72 °C 20 s,40 个循环。Melt curve

95 °C 5 s,65 °C 5 s,60 个循环。结果通过 RT-PCR 仪记录的 Ct 值对起始模板相对定量分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,方差齐时采用最小显著差法,方差不齐时采用 Dunnett'T3 法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氟斑牙发生情况 对照组均无氟斑牙出现,各染氟组随染氟剂量的升高,均出现不同程度的氟斑牙,数量分为(正常、轻度、中度、重度):低氟组(2、4、0、0)、中氟组(0、3、3、0)、高氟组(0、0、2、4),且氟斑牙症状呈逐渐加重趋势,见图 1。

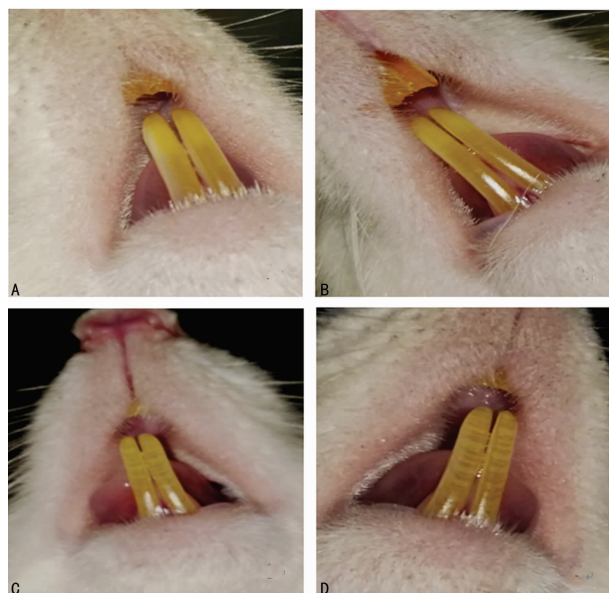


图 1 各组氟斑牙发生情况

2.2 尿氟和骨氟情况 含氟量饲料摄入增加,尿氟水平逐渐升高,中氟组和高氟组与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$)。各染氟组组间比较,尿氟水平逐渐升高,高氟组与各组比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。含氟量饲料摄入增加,骨氟水平逐渐升高,各染氟组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$),各染氟组组间比较差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。

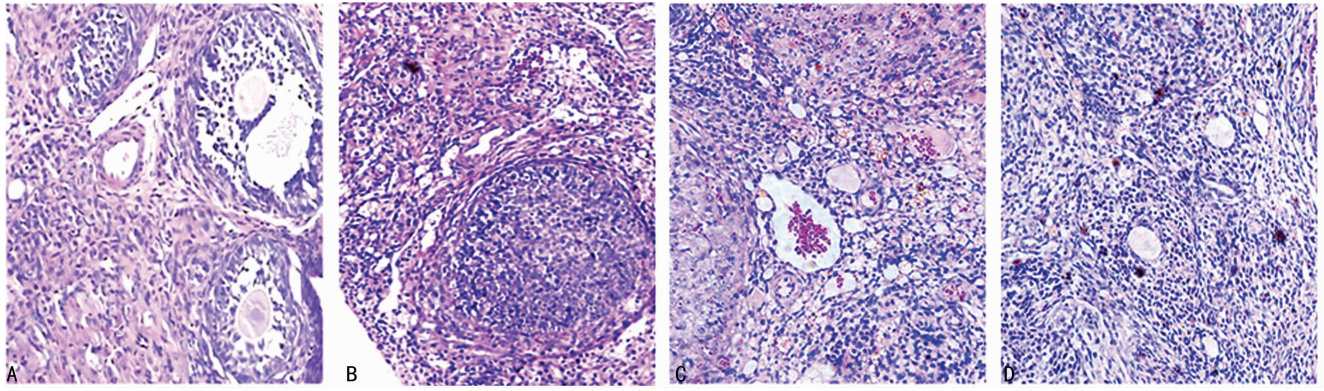
表 1 尿氟和骨氟水平比较($\bar{x} \pm s$)

项目	对照组	低氟组	中氟组	高氟组
尿氟(mg/L)	0.762±0.106	1.999±0.944	5.033±1.487 ^a	12.583±1.706 ^{abc}
骨氟(mg/kg)	15.756±3.002	39.464±6.575 ^a	109.130±9.350 ^{ab}	146.331±13.591 ^{abc}

^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与低氟组比较;^c: $P < 0.05$,与中氟组比较

2.3 各组雌鼠卵巢 HE 染色形态 各组雌鼠卵巢外观色泽鲜红,光镜下对照组卵巢组织结构形态正常,

可见不同发育阶段的卵泡,颗粒细胞排列整齐。各染氟组卵巢间质正常,未见间质出血、水肿、间质纤维增



A: 对照组; B: 低氟组; C: 中氟组; D: 重氟组

图 2 各组卵巢形态情况(×200)

生、组织变性坏死、炎性细胞浸润等组织形态异常。低氟组卵巢组织未见早衰,但染氟组随染氟剂量的增加,卵巢组织颗粒细胞水肿趋势加重,组织细胞形态损伤模糊,且闭锁的卵泡明显增加,黄体退化严重,成熟卵泡显著减少,卵巢呈现早衰迹象,见图 2。

2.4 各组雌鼠卵巢组织 p53 和 p21 表达结果 与对照组比较,低氟组 p21 增高,但差异无统计学意义($P>0.05$),其他各染氟组 p53 和 p21 比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);各染氟组组间比较,差异均有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

表 2 各组 p53 和 p21 表达($\bar{x}\pm s$)

项目	对照组	低氟组	中氟组	高氟组
p53	0.702±0.070	0.885±0.092 ^a	1.191±0.142 ^{ab}	2.118±0.469 ^{abc}
p21	2.555±0.551	3.453±0.911	5.982±0.595 ^{ab}	9.097±0.906 ^{abc}

^a: $P<0.05$, 与对照组比较; ^b: $P<0.05$, 与低氟组比较; ^c: $P<0.05$, 与中氟组比较

3 讨论

围绕燃煤型氟中毒这种地域性强、病区广、危害高、防治难的地方病一直是贵州省医疗领域长期重点攻关课题^[8-9]。卵泡是卵巢的主要功能单位,卵巢实质内有许多不同发育时期的卵泡,且呈月周期变化^[10]。GUNEY 等^[1]报道氟中毒可引发女性生殖系统功能的改变,对其性成熟、受孕及生殖器官的老化均有影响。流行病学调查显示高氟区女性月经初潮年龄较正常女性明显延迟,最长可相差 2~3 年。本实验 HE 染色结果发现,随染氟剂量的增加,卵巢组织颗粒细胞呈现轻度、中度、重度水肿的趋势,细胞形态损伤模糊,且闭锁的卵泡明显增加,黄体退化严重,成熟卵泡显著减少,导致卵巢储备下降并呈现早衰的迹象。

随着对地氟病损伤分子机制的不断深入研究,近年来氟中毒对女性卵巢生殖系统的影响逐渐引起重视。研究表明 p53 和 p21 表达情况受不同途径刺激有关,增加 p53 表达上调 p21 表达,这与细胞分裂周

期、衰老和凋亡密切相关^[11-13]。在 p53 的下游基因中,p21 是 p53 执行激活细胞衰老的下游靶基因已为共识^[14]。本课题组前期研究发现,p53 和 p21 基因可调控骨髓间充质干细胞和心肌细胞衰老的作用^[15-16]。LIU 等^[17]发现 p53 和 p21 表达增高促进卵巢颗粒细胞凋亡在雷公藤致卵巢早衰中起主导作用。本实验结果显示,随着染氟剂量增加,卵巢组织中 p53 和 p21 表达逐渐增高,提示燃煤型氟中毒可促进卵巢组织 p53 和 p21 表达。研究证实氟中毒对机体损伤主要是氧化应激产物的蓄积,由此推测燃煤型氟中毒导致雌鼠卵巢早衰可能是通过机体氧化应激产物蓄积,从而激活 p53 表达,进一步激活下游 p21 表达,促进卵泡闭锁,加速卵巢衰老,这与光镜卵巢 HE 染色结果相一致。

综上所述,燃煤型氟中毒可明显损伤卵巢组织,促进卵泡闭锁,且卵巢组织中衰老基因 p53 和 p21 表达增高,导致卵巢早衰,影响卵巢储备能力,因此控制氟的摄入是防治地氟病对机体损伤的有效方式。本实验还补充氟中毒对雌性生殖系统早衰的空白,对进一步为我国氟中毒灾区女性生殖健康预防提供相关数据,为防治氟中毒有重要意义。

参考文献

- [1] GUNEY M, ORAL B, DEMIRIN H, et al. Protective effects of vitamins C and E against endometrial damage and oxidative stress in fluoride intoxication [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2007, 34(5): 467-474.
- [2] 唐勇, 陈立宝, 王春, 等. 氟化钠亚慢性染毒对雌性小鼠氧化损伤的研究[J]. 中国地方病防治杂志, 2011, 26(6): 403-406.
- [3] 王世君, 夏曙华, 余司文, 等. 煤氟污染的粮食对雌鼠动情周期的影响[J]. 中华地方病学杂志, 2014, 33(2): 138-140.
- [4] 王飞清, 余司文, 夏曙华, 等. 燃煤型氟中毒对雌鼠卵巢生殖功能影响[J]. 中国公共卫生, 2015, 31(1): 76-79.
- [5] 邹文兵, 夏曙华, 徐静峰, 等. 燃煤型氟中毒对雌性大鼠卵

- 巢颗粒细胞的影响[J]. 环境与健康杂志, 2014, 31(2): 124-127.
- [6] 贾木天, 宋昕宸, 张怡明, 等. 尾悬吊模拟失重对雌性大鼠生殖功能的影响[J]. 中国病理生理杂志, 2011, 27(4): 769-774.
- [7] 中华人民共和国卫生部. WS-T 氟斑牙诊断标准[S]. 北京: 国家标准出版社, 2011.
- [8] WANG C, GAO Y H, WANG W, et al. A national cross-sectional study on effects of fluoride-safe water supply on the prevalence of fluorosis in China[J]. *BMJ Open*, 2012, 2(5): e001564.
- [9] QIN X H, WANG S Y, YU M J, et al. Child skeletal fluorosis from indoor burning of coal in southwestern china [J]. *J Environ Public Health*, 2009, 19: 969764.
- [10] 陈海燕, 王心如, 徐莉春, 等. 低浓度混苯对女工生殖激素分泌的影响[J]. 中华预防医学杂志, 2001, 35(2): 83-86.
- [11] LEE Y H, BAE Y S. Phospholipase D2 downregulation induces cellular senescence through a reactive Oxygen species-p53-p21(Cip1/WAF1) pathway[J]. *FEBS Lett*, 2014, 588(17): 3251-3258.
- [12] HAWLEY S, BOUDEAU J, REID J L, et al. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade[J]. *J Biol*, 2003, 2(4): 28.
- [13] JONES R G, PLAS D R, KUBEK S, et al. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint[J]. *Mol Cell*, 2005, 18(3): 283-293.
- [14] 蔺昕燕, 贾玉红, 郭连英, 等. p53-p21 通路在动脉血管平滑肌细胞衰老中的作用研究[J]. 大连医科大学学报, 2015, 37(4): 339-344.
- [15] 李艳菊, 丁元廷, 周媛, 等. 同种异体来源骨髓间充质干细胞移植可改善衰老心脏的功能[J]. 中国组织工程研究, 2016, 20(6): 814-819.
- [16] WANG G H, LIU Y, WU X B, et al. Neuroprotective effects of human umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells combined with nimodipine against radiation induced brain injury through inhibition of apoptosis [J]. *Cytotherapy*, 2016, 18(1): 53-64.
- [17] LIU T, ZHANG L A, WANG S W, et al. Tripterygium glycosides induce premature ovarian failure in rats by promoting p53 phosphorylation and activating the serine/threonine kinase 11-p53-p21 signaling pathway[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 10(1): 12-18.
- (收稿日期: 2017-10-14 修回日期: 2017-12-25)
-
- (上接第 1711 页)
- in clinical transplantation; a retrospective single-center analysis of outcomes [J]. *Transplantation*, 2015, 99(9): 1933-1939.
- [3] SUGIMOTO R, TANAKA Y, NODA K, et al. Preservation solution supplemented with biliverdin prevents lung cold ischaemia/reperfusion injury[J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2012, 42(6): 1035-1041.
- [4] ZHOU R H, LONG C, LIU J, et al. Inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger protects the immature rabbit myocardium from ischemia and reperfusion injury[J]. *Pediatr Cardiol*, 2008, 29(1): 113-120.
- [5] ZHANG X Y, CHEN C, ZHANG Y B, et al. Role of Toll-like receptor 3 in lung ischemia-reperfusion injury [J]. *Shock*, 2016, 46(4): 405-411.
- [6] OMASA M, FUKUSE T, TOYOKUNI S, et al. Glycine ameliorates lung reperfusion injury after cold preservation in an ex vivo rat lung model[J]. *Transplantation*, 2003, 75(5): 591-598.
- [7] 张骞, 陈如坤, 林敏, 等. 大鼠肺缺血再灌注损伤中肺泡细胞凋亡的动态观察[J]. 中华医学杂志[J], 2004, 19(84): 1597-1600.
- [8] OHSUMI A, MARSEU K, SLINGER P, et al. Sevoflurane attenuates ischemia-reperfusion injury in a rat lung transplantation model[J]. *Ann Thorac Surg*, 2017, 103(5): 1578-1586.
- [9] DEL SORBO L, COSTAMAGNA A, MURACA G, et al. Intratracheal administration of small interfering RNA targeting Fas reduces lung ischemia-reperfusion injury[J]. *Crit Care Med*, 2016, 44(8): e604-e613.
- [10] ZHANG W, LI Y, GE Z. Cardioprotective effect of crocetin by attenuating apoptosis in isoproterenol induced myocardial infarction rat model [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 93(93): 376-382.
- [11] WU Y, ZHANG M, LIUY R, et al. Oxidative stress-activated NHE1 is involved in high glucose-induced apoptosis in renal tubular epithelial cells[J]. *Yonsei Med J*, 2016, 57(5): 1252-1259.
- [12] 刘馨烛, 李美亭, 周荣华, 等. 卡立泊来德预处理减轻离体大鼠肺热缺血再灌注损伤机理的研究[J]. 生物医学工程杂志, 2010, 27(1): 132-137.
- [13] KWON K Y, CHO C H, KIM S P, et al. Apoptosis induced by preservation and reperfusion in canine lung transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2003, 35(1): 134-137.
- (收稿日期: 2017-10-10 修回日期: 2018-01-12)