

氟化钠亚慢性染毒致大鼠肺毒性机制的初步研究

黄大敏¹, 曾维德¹, 罗雪清², 庞雅琴¹, 郭蕊¹

摘要 目的 研究不同染毒剂量的氟化钠亚慢性染毒与大鼠肺组织病理学改变之间的关系,探讨氟化钠致大鼠肺组织损伤的效应及相关机制。方法 32只Wistar健康雄性大鼠随机分为对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组,每组8只,分别给予0、12、24、48 mg/(kg·d)氟化钠水溶液灌胃,实验周期16周。记录各组大鼠氟牙症发生情况、体质量变化,计算各组大鼠肺系数,采用苏木精-伊红(HE)染色观察肺组织病理学变化,采用酶联免疫吸附实验(ELISA)测定血清超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量,采用TUNEL染色法评估肺脏细胞凋亡水平,并通过免疫组化检测肺组织天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白表达水平。结果 染毒结束后,低、中、高剂量组大鼠上、下颌切牙呈不同程度的氟牙症改变;高剂量组大鼠体质量增加量低于其余3组($P < 0.05$);高剂量组大鼠肺系数及血清中MDA含量均高于对照组($P < 0.05$);低、中、高剂量组大鼠均出现

不同程度的肺间质炎症浸润及肺泡形态学改变;与对照组相比,低、中、高组大鼠的肺组织细胞凋亡率和Caspase-3蛋白表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 氟化钠亚慢性染毒可使大鼠肺组织出现损伤效应,其机制可能与氧化应激诱导的细胞凋亡有关。

关键词 氟化钠;肺脏;氧化损伤;凋亡

中图分类号 R 114

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)04-0660-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.023

氟是一种人体必需微量元素,但长期过量的氟摄入则会引发慢性氟中毒,可导致骨组织产生较为严重的损害效应,同时还会造成呼吸系统、神经系统和心血管系统等方面的损害^[1-3]。电解铝生产过程中会产生大量的无机含氟烟气,可导致生产一线的工人氟暴露。长期吸入低浓度的无机氟化合物可引起中毒性肺损伤^[4]。目前,对氟的毒性研究主要采用给予大鼠自由饮用含氟化物溶液的方式建立氟中毒模型,但由于大鼠存在摄食喜好偏差,导致实际摄入氟化物的剂量与剂量分组不符的现象。为有效研究氟暴露对机体呼吸系统的损害效应,该课题组按照体质量对大鼠进行氟化钠溶液灌胃的方式建立氟中毒模型,对不同染毒剂量与大鼠肺组织病理学改变之间的关系进行研究,探讨氟化钠致大鼠肺组织损伤的效应及相关机制。

2023-02-18 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81960595);广西自然科学基金(编号:2021GXNSFAA196068);广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(编号:2021KY0543);广西壮族自治区第五批自治区本级财政科技计划项目(编号:2019JJD140011)

作者单位:右江民族医学院¹ 公共卫生与管理学院卫生学教研室、
² 临床医学院超声科,百色 533000

作者简介:黄大敏,男,硕士,讲师;

郭蕊,女,博士,教授,硕士生导师,责任作者,E-mail:
763889360@qq.com

Methods Twenty 6-week-old male SD rats were randomly divided into NS group and MIA group. The rat model of TMJOA was established by injection monosodium iodoacetate (MIA) into the upper cavity of temporomandibular joint (TMJ). The changes of pain threshold in the TMJ region of rats after MIA injection were detected by Von Frey. The changes of condyle structure were observed by Hematoxylin-eosin (HE) and Safranin O-fast green stains. Histopathological changes of trigeminal ganglion (TG) were observed by HE stains. The expression and distribution of TG NLRP3 protein were detected by immunohistochemistry. Western blot was used to detect the protein levels of NLRP3 and interleukin (IL)-1 β in TG. The mRNA levels of *NLRP3*, apoptosis-associated speck-like protein (ASC), cysteinyl aspartate specific proteinase (Caspase-1), *IL-1 β* and *IL-18* in TG were detected by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). **Results** Compared to saline group, the pain threshold of experimental TMJ osteoarthritis rats decreased ($P < 0.05$). TMJ and TG showed obvious pathological changes. The protein and mRNA levels of NLRP3 expressed in the tissues of rats in the TMJOA group increased ($P < 0.05$).

Conclusion NLRP3 inflammasome may be involved in the regulation of hyperalgesia in TMJOA rats.

Key words NLRP3 inflammasome; temporomandibular joint osteoarthritis; hyperalgesia; trigeminal ganglion

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器 氯化钠(GR,天津科密欧公司); TUNEL 染色试剂盒(货号: G002-4)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD) 试剂盒(货号: A001-4)、丙二醛(Malondialdehyde, MDA) 试剂盒(货号: A003-4) 均购自南京建成生物工程研究所; 苏木精-伊红(HE) 染色试剂盒(货号: C0105, 上海碧云天公司); 天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3) 单克隆抗体及免疫组化试剂盒(货号: A00334-4, 武汉博士德公司)。组织切片机、生物组织包埋机、组织脱水机、生物组织摊烤片机、全自动染色机(德国 Leica 公司); 光学显微镜(日本奥林巴斯公司); 酶标仪(美国 BioTeK 公司)。

1.2 实验动物与分组 选取 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 32 只, 体质量 300 ~ 350 g, 购自长沙市天勤生物技术有限公司, 合格证号: SCXK [湘] 2019-0014。动物饲养于 SPF 级动物房, 饲养室温度为 20 ~ 26 °C, 湿度 45% ~ 55%, 昼夜明暗交替时间 12 h/12 h, 饲养期间大鼠自由饮水、摄食。大鼠适应性饲养 1 周后, 按照随机数字表法随机分为对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组共 4 组, 每组 8 只。4 组大鼠分别予剂量为 0、12、24、48 mg/(kg·d) 氯化钠溶液灌胃, 每周连续灌胃 6 d, 停灌 1 d, 持续灌胃 16 周。染毒期间每日称量各组大鼠体质量及观察大鼠活动、行为和精神状态等。本实验已通过右江民族医学院实验动物伦理委员会审查(编号: 2020051801)。

1.3 样品收集与前处理 于末次染毒后禁食 12 h, 按照 1 000 mg/kg 体质量给予 20.0% 的乌拉坦腹腔注射 2 ml 麻醉大鼠, 采用腹主动脉穿刺取血法取全血 4 °C 条件下 3 000 r/min 离心 15 min, 取上层血清, -20 °C 保存待测。颈椎脱臼处死大鼠, 分离大鼠胸腔, 将大鼠全肺取出, 剔除气管、支气管等结缔组织后, 用 4 °C 的生理盐水冲洗, 滤纸吸干, 并称量, 以公式“肺系数 = 肺湿重(g) / 体质量(kg) × 100%”计算肺系数。

1.4 大鼠肺组织 HE 染色及观察 于大鼠左肺上叶同一部位取部分肺组织置于 10% 甲醛溶液中固定 24 h, 常规脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色, 普通光镜下观察肺组织病理学形态。

1.5 大鼠血清中 SOD 及 MDA 含量检测 取大鼠血清, 按照酶联免疫吸附实验(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒说明书操作, 检测大鼠血清中 SOD 及 MDA 含量。

1.6 大鼠肺组织细胞凋亡检测 将大鼠肺组织蜡块切片, 置于二甲苯中脱蜡 2 次, 5 min/次; 再置于无水乙醇中浸泡 5 min, 95% 乙醇中浸泡 5 min, 70% 乙醇中浸泡 5 min; 然后用 0.5% Triton X-100 处理(室温) 5 min 后, 加入配置好的 TUNEL 标记液, 37 °C 避光孵育 60 min, 加入 DAPI 染色液, 孵育 5 min; 最后用抗荧光淬灭封片液封片, 待干后用激光共聚焦显微镜, 调至 ×200 倍镜下观察肺脏细胞凋亡情况并拍照, 采用 Image J 软件计算肺脏细胞凋亡阳性率。肺脏细胞凋亡阳性率 = 凋亡肺脏细胞数 / 肺脏总细胞数 × 100%。

1.7 大鼠肺组织 Caspase-3 免疫组织化学观察 将大鼠肺组织蜡块切片, 微波抗原修复, 再用 H₂O₂ 封闭内源性过氧化物酶活性, 依次滴加一抗(兔抗) Caspase-3 和二抗孵育, 再加 HRP 酶标记的链霉卵白素孵育, DAB 显色和苏木精复染, Caspase-3 蛋白免疫反应以胞质内出现棕黄色颗粒为阳性。采用 Fromowitz 综合计分法^[5] 评定 Caspase-3 蛋白表达情况, 结果判定: ① 阴性无着色, 计 0 分; ② 弱阳性淡黄色, 计 1 分; ③ 中阳性棕黄色, 计 2 分; ④ 强阳性棕褐色计 3 分。再分别分析计算出测量区域内弱、中、强阳性面积, 以及测量区域组织面积。以公式“阳性面积比 = 阳性面积 / 组织面积”计算肺脏 Caspase-3 蛋白表达阳性面积比。

1.8 统计学处理 用 SPSS 23.0 软件进行数据分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, Leven 检验方差齐性, $P < 0.05$ 时, 组间比较采用 Dunnett's T3 法; 反之采用 LSD 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物基本情况 与对照组比较, 实验后期高剂量组大鼠活动强度减弱、精神萎靡, 皮肤毛发凌乱、光泽暗淡, 差异明显; 其余各组活动、精神、毛发光泽等方面无明显差异。染毒结束时, 对照组牙釉质表面光滑, 均匀透亮的棕黄色外观; 低剂量组牙釉质表面失去光泽, 黄色条纹部分轮廓消失, 或全部消失呈白垩色; 中、高剂量组牙釉质表面失去光泽, 黄色条纹轮廓全部消失呈白垩色, 其中高剂量组上、切牙出现缺损改变。见图 1。

2.2 氯化钠对大鼠体质量和肺系数的影响 在染毒前, 各组大鼠体质量差异无统计学意义; 染毒结束后, 对照组、低剂量组和中剂量组大鼠体质量比较差异无统计学意义, 但高剂量组大鼠的体质量与对照

组、低、中剂量组大鼠体质量比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在氟化钠对大鼠肺系数影响研究中, 对照组、低剂量组和中剂量组大鼠肺系数比较差异无统计学意义, 但高剂量组大鼠的肺系数与对照组、低、中剂量组大鼠比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1。

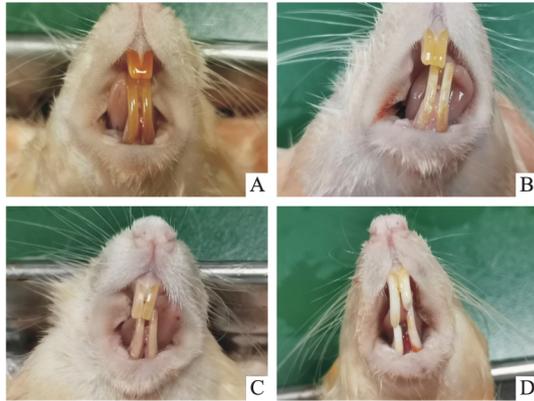


图 1 各组大鼠上、下颌切牙牙釉质改变情况
A: 对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组

2.3 大鼠肺组织 HE 染色结果 对照组大鼠肺组织无明显病变, 管腔内外未见明显炎症细胞浸润, 肺泡组织结构清晰, 肺泡间隔无增厚且无异常浸润及增生; 低剂量组大鼠肺泡间隔增厚且有炎症细胞浸润及增生; 中剂量组大鼠肺泡间隔增厚, 且有炎症细胞浸润, 肺泡壁变薄, 部分肺泡扩张或融合形成肺大泡; 高剂量组大鼠肺泡间隔增厚且有大量炎症细胞浸润及增生, 部分肺泡扩张或融合形成肺大疱。见图 2。

2.4 氟化钠对大鼠血清氧化应激指标的影响 各组大鼠血清中 SOD 含量比较差异无统计学意义; 对照组、低剂量组和中剂量组大鼠血清中 MDA 含量比较差异无统计学意义, 但高剂量组大鼠血清中 MDA 含量与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

2.5 大鼠肺组织细胞 TUNEL 染色结果 TUNEL

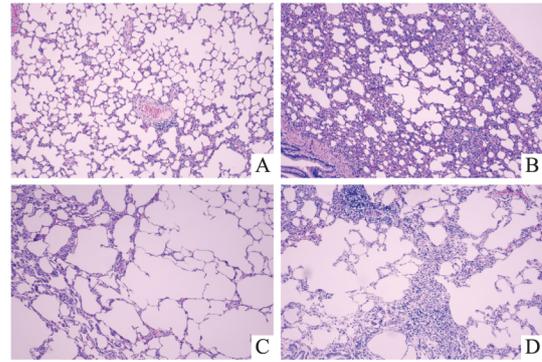


图 2 各组大鼠肺组织病理学改变情况 $\times 100$
A: 对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组

染色结果显示 随着氟化钠染毒浓度升高, 各组大鼠肺组织细胞凋亡阳性率逐渐升高。见图 3。对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组肺组织的阳性细胞比例分别为 $(0.53 \pm 0.05) \%$ 、 $(1.05 \pm 0.14) \%$ 、 $(1.52 \pm 0.13) \%$ 、 $(4.45 \pm 0.28) \%$ ($F = 416.658, P < 0.05$)。与对照组相比, 低、中、高剂量组大鼠肺组织细胞凋亡阳性率升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。且中、高剂量组较低剂量组, 以及高剂量组较中剂量组大鼠肺组织细胞凋亡阳性率升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.6 大鼠肺组织 Caspase-3 表达水平 肺组织中 Caspase-3 蛋白阳性表达呈棕色或棕黄色。见图 4。对照组、低剂量组、中剂量组和高剂量组肺组织的 Caspase-3 蛋白阳性面积比分别为 $(19.18 \pm 1.48) \%$ 、 $(27.14 \pm 2.01) \%$ 、 $(25.59 \pm 0.28) \%$ 、 $(35.25 \pm 0.74) \%$ ($F = 76.671, P < 0.05$)。低、中、高剂量组较对照组且高剂量组较中剂量组大鼠肺组织 Caspase-3 蛋白阳性表达的平均吸光度值升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

本研究结果显示, 染毒结束后, 与对照组相比, 低、中、高 3 个剂量组大鼠切牙均呈不同程度的氟斑

表 1 各组大鼠体质量和肺系数的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别	染毒前体质量 (g)	染毒后体质量 (g)	体质量增加量 (g)	肺系数 (g/kg)
对照	337.88 ± 23.07	423.13 ± 36.94*	85.25 ± 21.20*	4.83 ± 1.32*
低剂量	316.00 ± 23.35	395.25 ± 33.04*	77.50 ± 31.39*	5.06 ± 1.03*
中剂量	324.88 ± 19.22	392.96 ± 30.45*	68.08 ± 31.62*	4.61 ± 0.64*
高剂量	317.25 ± 28.42	351.48 ± 31.00	34.23 ± 36.93	8.39 ± 1.80
F 值	1.433	6.423	4.375	3.425
P 值	0.254	<0.05	<0.05	<0.05

与高剂量组比较: * $P < 0.05$

表2 各组大鼠血清 SOD、MDA 含量的比较($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别	SOD(U/ml)	MDA(nmol/ml)
对照	706.82 ± 126.15	7.60 ± 1.00
低剂量	717.94 ± 149.69	8.06 ± 1.31
中剂量	821.84 ± 79.53	8.51 ± 0.93
高剂量	771.62 ± 57.56	10.19 ± 1.41*
F 值	1.680	5.358
P 值	0.199	<0.05

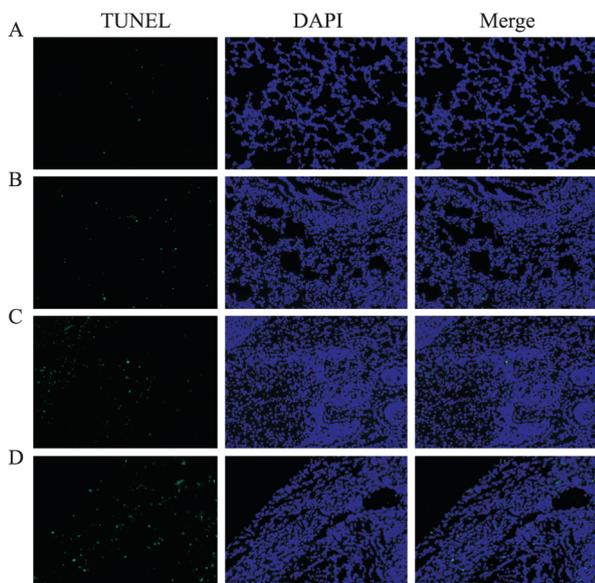
与对照组比较: * $P < 0.05$ 

图3 各组大鼠肺组织细胞 TUNEL 染色结果 ×200

A: 对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组

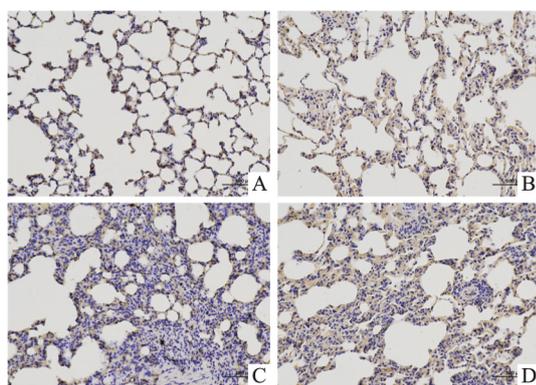


图4 各组大鼠肺组织 Caspase-3 蛋白表达情况 ×200

A: 对照组; B: 低剂量组; C: 中剂量组; D: 高剂量组

牙改变。这说明大鼠氟中毒模型建立成功。体质量增长在一定程度上可以反映染毒对大鼠发育产生影响,脏器系数变化是评价动物染毒后器官改变的重要指标^[6]。本研究结果显示,高剂量组大鼠的体质量增长明显较其他组大鼠缓慢。这可能与高剂量组

大鼠食欲减退有关,说明氟化钠对大鼠体重增加具有消极的影响。在氟化钠亚慢性染毒致大鼠肺毒性机制研究中发现,高剂量组大鼠肺脏脏器系数大于其他3组大鼠肺脏脏器系数($P < 0.05$)。大鼠肺脏 HE 染色实验结果显示,与对照组相比,低、中、高剂量组大鼠肺组织均可见肺间质炎性细胞浸润及肺泡扩张等异常改变,肺脏炎症浸润可使大鼠肺湿重增加,同时高剂量的氟化钠对大鼠体质量增加具有消极的影响,这两方面因素使得高剂量组大鼠的肺系数大于其他3组大鼠的肺系数。

MDA 是脂质过氧化的产物,MDA 可引起膜通透性增加、ATP 活力降低,从而导致组织细胞凋亡、坏死,最终可导致组织损伤和疾病等^[7-8]。本实验探究了氟化钠是否可以通过调控氧化应激损伤和凋亡相关蛋白的激活来诱导大鼠肺脏损伤。研究结果显示,大鼠血清中的 MDA 含量随着氟化钠染毒剂量的增高而增加,说明氟暴露可触发大鼠机体氧化应激反应,这与陈龙等^[9]的研究结果一致。由于细胞线粒体易遭到 ROS 攻击,使得线粒体膜电位发生改变,线粒体形态及功能障碍可引起细胞凋亡,从而导致组织细胞损伤^[10-11]。本研究结果显示,氟化钠可以引起大鼠肺组织细胞凋亡率和 Caspase-3 蛋白表达增加,与对照组相比,低、中、高剂量组大鼠肺组织细胞凋亡率和 Caspase-3 蛋白表达逐渐增高($P < 0.05$),存在一定的剂量-反应关系。由于细胞凋亡被视为是一系列高度调控 Caspase 级联反应事件的结果,在整个细胞凋亡的过程中,Caspase-3 作为凋亡有序级联反应的下游因子,是最为关键的效应型 Caspase^[12-13]。本研究证实氟化钠可通过调节 Caspase-3 蛋白表达水平,促进肺组织细胞凋亡。结合本研究大鼠血清脂质过氧化酶的检测结果,证明 MDA 可作为氟化钠暴露诱导大鼠肺脏损伤效应的敏感性指标。

综上所述,氟化钠诱导大鼠机体过氧化损伤,使大鼠肺组织细胞凋亡数量增加,并能上调凋亡蛋白 Caspase-3 表达水平,从而导致大鼠肺组织病理学异常改变。

本研究的不足之处在于只有大鼠染毒后肺组织的病理学观察,没有对染毒后大鼠肺功能进行测试和其他的肺损伤效应检测。下一步将结合大鼠肺功能损伤测试及对氧化应激与细胞凋亡信号通路之间的关系深入开展氟致肺组织损伤的机制研究。

参考文献

[1] 杨阳,黄辉,崔留欣,等. α -硫辛酸氧化-内质网应激信

- 号通路对氟中毒大鼠生殖损伤的保护作用[J]. 中华医学杂志 2020 ,100(46):3706-11.
- [2] Song C , Shi D , Chang K , et al. Sodium fluoride activates the extrinsic apoptosis *via* regulating NOX4/ROS-mediated p53/DR5 signaling pathway in lung cells both *in vitro* and *in vivo* [J]. *Free Radic Biol Med* ,2021 ,169:137-48.
- [3] Yan X , Wang L , Yang X , et al. Fluoride induces apoptosis in H9c2 cardiomyocytes *via* the mitochondrial pathway [J]. *Chemosphere* 2017 ,182:159-65.
- [4] 阮艳君 , 严蓉 , 杜勤惠 等. 急性有机氟化合物吸入致中毒性肺水肿事故一起[J]. 中华劳动卫生职业病杂志 2017 ,35(5):394.
- [5] Fromowitz F B , Viola M V , Chao S , et al. Res p21 expression in the progression of breast cancer [J]. *Humpathol* ,1987 ,18(12):1268-75.
- [6] 程雨微 , 王小云 , 查红英 等. 葡萄籽原花青素对糖尿病小鼠心室重构的保护作用[J]. 安徽医科大学学报 2021 ,56(6):925-31.
- [7] Zhan Y , Guo Z , Zheng F , et al. Reactive oxygen species regulate miR-17-5p expression *via* DNA methylation in paraquat-induced nerve cell damage [J]. *Environ Toxicol* ,2020 ,35(12):1364-73.
- [8] Chen X , Chen Y , Chen Y , et al. Protective effect of lutein on oxidative stress damage caused by acute PM_{2.5} exposure in rats [J]. *Ann Palliat Med* 2020 ,9(4):2028-36.
- [9] 陈龙 , 尹娜 , 张美林 等. 氟化钠对仔鼠生长发育和血清氧化应激水平的影响[J]. 中华地方病学杂志 2021 ,40(8):622-6.
- [10] 范兴恩 , 许昌琴 , 曹凯强 等. 烟酰胺核糖对百草枯中毒小鼠肺损伤的保护作用及机制研究[J]. 中华劳动卫生职业病杂志 , 2022 ,40(8):561-7.
- [11] 徐婉 , 张才溢 , 闫微 等. 2-BFI对氟化钠致SH-SY5Y细胞损伤的保护作用[J]. 安徽医科大学学报 2022 ,57(11):1739-44.
- [12] Choudhary G S , Al-Harbi S , Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis [J]. *Methods Mol Biol* 2015 ,1219:1-9.
- [13] 朱瑞 , 金世云 , 郭成晓 等. 吗啡预处理对缺血再灌注损伤后大鼠心脏中Caspase-3表达及细胞凋亡的影响[J]. 安徽医科大学学报. 2021 ,56(7):1022-6.

A preliminary study on the mechanism of lung toxicity of sub-chronic exposure to sodium fluoride in rats

Huang Damin¹ , Zeng Weide¹ , Luo Xueqing² , Pang Yaqin¹ , Guo Rui¹

(¹Dept of Hygiene School of Public Health and Management , ²Dept of Ultrasound , School of Clinical Medicine , Youjiang Medical University for Nationalities , Baise 533000)

Abstract Objective To study the relationship between different doses of subchronic sodium fluoride exposure and lung histopathological changes in rats , and to explore the effect and related mechanism of sodium fluoride induced lung tissue injury in rats. **Methods** Thirty-two Wistar male rats were randomly divided into control , low , medium and high dose groups , each group included 8 rats , intragastric administration of sodium fluoride toxin solution 0 , 12 , 24 , and 48 mg/(kg • d) . The experiment lasted for 16 weeks. The incidence of dental fluorosis and weight in each group of rats was recorded , the lung coefficient was calculated , the pathological changes of lung tissue was observed by HE staining , enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the content of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) levels in rats serum , apoptosis level of lung cells was assessed by TUNEL staining , and the Caspase-3 protein expression levels in lung tissues were determined by immunohistochemistry. **Results** At the end of exposure , the upper and lower incisors of rats in different dose groups showed different degrees of dental fluorosis. The increase in body weight of the rats in the high-dose group was lower than that in the other three groups ($P < 0.05$) . The coefficient of lung organs and the content of MDA in serum of the rats in the high-dose group were higher than those in the control group ($P < 0.05$) . The rats in the low , medium and high dose groups had different degrees of pulmonary interstitial inflammatory infiltration and alveolar morphological changes. Compared with the control group , the lung cell apoptosis rate and Caspase-3 protein expression of the rats in the low , middle and high groups significantly increased , and the differences were statistically significant ($P < 0.05$) . **Conclusion** Subchronic exposure to sodium fluoride can cause the lung tissue damage in rats , and the mechanism may be related to the apoptosis induced by oxidative stress.

Key words sodium fluoride; lung; oxidative damage; apoptosis