

氟对甲状腺细胞凋亡的影响及其机制研究

曾强 崔玉山 张磊 符刚 侯常春 赵亮 王爱国 刘洪亮

【摘要】 目的 探讨氟对人正常甲状腺细胞 Nthy-ori 3-1 的毒性作用及机制。**方法** 分别用 0(对照)、0.1、1.0、3.0 mmol/L 的 NaF 作用于体外培养的 Nthy-ori 3-1 细胞 24 h 后,采用噻唑蓝染色法、乳酸脱氢酶(LDH)比色法检测存活率和 LDH 漏出率,采用流式细胞术检测活性氧(ROS)水平、细胞周期构成比及凋亡率。**结果** 以对照组细胞存活率为 100%,1.0、3.0 mmol/L NaF 组细胞存活率分别为(76.64±9.13)%、(64.04±6.32)%,与对照组存活率的差异有统计学意义(P 值均 <0.01)。3.0 mmol/L NaF 组 LDH 漏出率及 ROS 水平分别为(48.66±7.15)%、(29 993.50±1786.86),较对照组[分别为(35.24±3.02)%、(13 021.33±1067.55)]升高(P 值均 <0.01)。1.0 mmol/L NaF 组细胞 G_0/G_1 期、S 期细胞百分比分别为(40.76±5.65)%、(54.05±4.59)%,与对照组[分别为(60.09±1.76)%、(32.59±2.43)%]相比,差异有统计学意义(P 值均 <0.01)。3.0 mmol/L NaF 组细胞凋亡率为(20.09±3.22)%,高于对照组[(9.64±3.44)%], $P<0.01$ 。**结论** 试验浓度的氟能降低甲状腺细胞存活率,增加 LDH 漏出率和 ROS 产生,并使细胞发生 S 期阻滞及诱导细胞凋亡。

【关键词】 氟化物; 甲状腺; 细胞凋亡; 氧化性应激; 细胞周期

Studies of fluoride on the thyroid cell apoptosis and mechanism ZENG Qiang*, CUI Yu-shan, ZHANG Lei, FU Gang, HOU Chang-chun, ZHAO Liang, WANG Ai-guo, LIU Hong-liang. *Tianjin Center for Disease Control and Prevention, Tianjin 300011, China
Corresponding author: LIU Hong-liang, Email: liuhongliang@cctj.gov.cn

【Abstract】 Objective To explore the toxic effect of fluoride on the human thyroid cells (Nthy-ori 3-1) and its mechanism. **Methods** Nthy-ori 3-1 cells were exposed to 0.0, 0.1, 1.0, 3.0 mmol/L of sodium fluoride (NaF) *in vitro*. After 24 hours incubation, 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and lactate dehydrogenase (LDH) assay were used to measure cell viability and the LDH leakage rate. Reactive oxygen species (ROS) level, constituent ratio of the cell cycle, and apoptosis rate were measured by flow cytometry. **Results** Comparing to viability of control group (set as 100.00%), the cell viability of the 1.0, 3.0 mmol/L fluoride-treated groups (76.64±9.13)%, (64.04±6.32)% were significantly decreased (all P values <0.01). LDH leakage rate and ROS level of the 3.0 mmol/L fluoride-treated group ((48.66±7.15)%, (29 993.50±1786.86) FI) were significantly increased (all P values <0.01) compared to control group ((35.24±3.02)%, (13 021.33±1067.55) FI). The G_0/G_1 phase cells of the 1.0 mmol/L fluoride-treated group ((40.76±5.65)%) were lower than control group (60.09±1.76)% ($P<0.01$), yet the percentage of cells in S phase ((54.05±4.59)%) were higher than the control group (32.59±2.43)% ($P<0.01$). Comparing to control group ((9.64±3.44)%), the percentage of apoptosis cells increased in the 3.0 mmol/L fluoride-treated group ((20.09±3.22)%) ($P<0.01$). **Conclusion** To Nthy-ori 3-1 cells, fluoride under experimental concentrations decreases cell viability, improve the LDH leakage rate, and ROS level. It blocks the cells in S phase and induce cell apoptosis.

【Key words】 Fluorides; Thyroid gland; Apoptosis; Oxidative stress; Cell cycle

DOI:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2012.03.009

基金项目:国家自然科学基金(30972555);天津市医药卫生 2010 年度科技攻关项目(10KG215)

作者单位:300011 天津市疾病预防控制中心环境与健康所(曾强、张磊、符刚、侯常春、赵亮、刘洪亮);天津医科大学公共卫生学院流行病与卫生统计学系(崔玉山、刘洪亮);华中科技大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生系(王爱国)

通信作者:刘洪亮,Email:liuhongliang@cctj.gov.cn

地方性氟中毒是一种严重危害人类健康的生物地球化学性疾病。高剂量氟对骨相组织和非骨相组织均可产生有害的影响^[1-2]。近年来大量实验发现,高剂量氟可通过改变甲状腺组织结构,引发甲状腺激素分泌紊乱而影响甲状腺的功能^[3],即甲状腺可能是氟毒性作用的靶器官。氟对靶器官的毒性作用可能与其所诱导的细胞凋亡有关^[4-5],笔者以体外培

养的永生化人正常甲状腺细胞(Nthy-ori 3-1 细胞)为模型,以 0.1~3.0 mmol/L NaF 对 Nthy-ori 3-1 细胞染毒,检测其存活率、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)漏出率、活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平、细胞周期及细胞凋亡率,探讨氟对人甲状腺细胞毒性作用及其机制。

材料与方 法

1. 主要仪器与试剂:680 型酶标仪(美国 Bio-Rad 公司)、LSR II 型 FACS 流式细胞仪(美国 Beeton Dickinson 公司)、MCO-15AC 型 CO₂ 培养箱(日本 Sanyo 公司)、胎牛血清(美国 Gibco 公司)、RPMI 1640 培养基(美国 Hyclone 公司)、噻唑蓝(MTT,美国 Biomol 公司)、碘化丙啶(美国 Sigma 公司)、曲拉通-100(美国 Fisher 公司)、ROS 检测试剂盒(江苏碧云天生物技术研究所)、NaF(优级纯,中国医药集团上海化学试剂公司)。

2. 细胞培养及染毒:SV40 大 T 抗原永生化人正常甲状腺细胞系(Nthy ori 3-1)购自英国 HPACC 细胞中心。用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基于含 5% CO₂ 的细胞培养箱(培养温度 37 °C)中进行培养。利用 MTT 实验得到适宜的染毒浓度 0(对照)、0.1、1.0、3.0 mmol/L 后,分别用上述浓度的 NaF 溶液对细胞进行染毒,进行后续实验。

3. MTT 试验检测细胞存活率:将 Nthy ori 3-1 细胞按 1.2 × 10⁴ 个/孔种植于 96 孔板培养 24 h 后染毒。染毒 24 h 后,重新加入 200 μl 培养液及 20 μl MTT 溶液(5 mg/ml),37 °C 培养箱中避光孵育 4 h,弃去培养液,每孔加入 150 μl DMSO 后振荡 10 min,用酶标仪在 490 nm 处测吸光度值(A 值),按下式计算细胞存活率:细胞存活率 = (A_{染毒} - A_{空白}) / (A_{对照} - A_{空白}) × 100%

4. LDH 漏出率检测:参照文献[6-7]的方法进行检测。染毒 24 h 后,收集各组培养液,702.5 × g 离心 10 min,用酶标仪在 440 nm 处检测 A 值。同时收集各组细胞,离心后以等体积含 1% 曲拉通-100 的 PBS 重悬,室温振荡 30 min,702.5 × g 离心 10 min,吸取上清检测 A 值。按下式计算 LDH 漏出率:LDH 漏出率 = (A_{上清} - A_{上清空白}) / (A_{上清} - A_{上清空白} + A_{细胞} - A_{细胞空白}) × 100%

5. ROS 水平的检测:将细胞种植于 6 孔板中,染毒 24 h 后,按照试剂盒说明书,收集细胞上清液及细胞于离心管,离心弃上清,加 1 ml PBS 缓冲液重悬,离心后弃上清,将细胞重悬于 250 μl 10 μmol/L

的双氯荧光素酶(DCFH-DA)稀释液中,37 °C 温箱内孵育 20 min。每隔 3~5 min 颠倒混匀 1 次,使探针和细胞充分接触。用 PBS 缓冲液洗涤细胞 3 次,以充分去除残留探针。流式细胞仪检测荧光强度(激发波长 488 nm,发射波长 525 nm)并分析 ROS 水平。

6. 细胞周期及凋亡率的检测:将 Nthy ori 3-1 细胞按 2.0 × 10⁵ 个/孔种植于 6 孔板中,培养 24 h 后染毒。染毒 24 h 后,收获细胞,取约 10⁶ 个细胞,加入 -20 °C 预冷的 75% 乙醇于 4 °C 固定过夜。加 PBS 洗涤后,702.5 × g 离心 5 min,弃上清。将细胞重悬于 100 μl PC 缓冲液(1.611% Na₂HPO₄ · 12H₂O,0.074% 柠檬酸钠,pH = 7.8),室温放置,每隔 5 min 混匀 1 次,30 min 后以 PBS 洗涤,离心,并将细胞重悬于 300 μl 含有 50 μg/ml 核糖核酸酶 A 的 PBS 中,37 °C 水浴 30 min,再加入 10 × 碘化丙啶(500 μg/ml,含 1% 曲拉通-100)33.3 μl,使碘化丙啶终浓度为 50 μg/ml,4 °C 避光 30 min 后使用流式细胞仪检测,激发波长为 488 nm,用 ModFitLT 软件分析细胞周期,用 CellQuest 软件分析细胞凋亡率。

7. 统计学方法:实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 15.0 统计软件进行统计学分析。多组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析。组间两两比较采用 Student-Newman-Keuls 检验。以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 不同浓度 NaF 对 Nthy-ori 3-1 细胞存活率的影响:由表 1 可见,与对照组及 0.1 mmol/L NaF 染毒组比较,1.0、3.0 mmol/L NaF 组细胞存活率下降,而 0.1 mmol/L NaF 组与对照组的细胞存活率差异无统计学意义,3.0 mmol/L NaF 染毒组细胞存活率低于 1.0 mmol/L NaF 染毒组。

2. 不同浓度 NaF 对 Nthy-ori 3-1 细胞 LDH 漏出率和 ROS 水平的影响:由表 1 可见,与对照组、0.1、1.0 mmol/L NaF 组比较,3.0 mmol/L NaF 染毒组细胞 LDH 漏出率明显升高,其余各组之间差异无统计学意义。3.0 mmol/L NaF 染毒组细胞 ROS 水平明显升高,与其他各组的差异均具有统计学意义。其余各组之间 ROS 水平差异无统计学意义。

3. 不同浓度 NaF 对 Nthy-ori 3-1 细胞周期和凋亡的影响:不同浓度 NaF 对 Nthy-ori 3-1 细胞周期的影响见表 2,可知 1.0 mmol/L NaF 组细胞周期与其他各组相比,G₀/G₁期细胞比例下降,S期细胞比例

表 1 不同浓度 NaF 对 Nthy-ori 3-1 细胞的毒性作用

NaF 浓度 (mmol/L)	细胞存活率 (% , n=8)	LDH 漏出率 (% , n=4)	ROS 水平 (n=3)
0.0	100.00 ± 0.00 ^a	35.24 ± 3.02 ^e	13 021.33 ± 1 067.55 ⁱ
0.1	99.42 ± 6.43 ^b	34.07 ± 4.09 ^f	12 335.67 ± 1 271.21 ^j
1.0	76.64 ± 9.13 ^c	36.76 ± 2.87 ^g	12 163.50 ± 3 892.62 ^k
3.0	64.04 ± 6.32 ^d	48.66 ± 7.15 ^h	29 993.50 ± 1 786.86 ^l
F 值	58.042	8.541	40.908
P 值	<0.01	0.003	<0.01

注: LDH 为乳酸脱氢酶, ROS 为活性氧; ^e 与 ^a 比较, $q = 10.009$, $P < 0.01$; ^c 与 ^b 比较, $q = 8.165$, $P < 0.01$; ^d 与 ^a 比较, $q = 16.643$, $P < 0.01$; ^d 与 ^b 比较, $q = 13.368$, $P < 0.01$; ^d 与 ^c 比较, $q = 5.400$, $P < 0.01$; ^h 与 ^e 比较, $q = 5.815$, $P < 0.01$; ^h 与 ^f 比较, $q = 6.326$, $P < 0.01$; ^h 与 ^g 比较, $q = 5.159$, $P < 0.01$; ^l 与 ⁱ 比较, $q = 14.742$, $P < 0.01$; ^l 与 ^j 比较, $q = 13.719$, $P < 0.01$; ^l 与 ^k 比较, $q = 13.853$, $P < 0.01$

增多。不同浓度 NaF 对 Nthy-ori 3-1 细胞凋亡的影响见表 2, 可知 3.0 mmol/L NaF 组与其他各组相比, 细胞凋亡率上升。

讨 论

流行病学调查发现氟化物可对机体甲状腺产生影响, 在多种动物实验中也证实了这一结论^[3,8]。笔者发现, 随着 NaF 浓度的增加, 甲状腺细胞存活率下降, LDH 漏出率升高, 证实一定剂量氟能造成人甲状腺细胞的损伤。有研究发现, 氟能诱导成骨细胞等多种细胞发生凋亡^[9], 提示氟诱导的细胞凋亡可能是其细胞毒性的重要原因之一。笔者发现, 高氟能够引起人甲状腺细胞发生凋亡, 说明氟对人甲状腺的损伤与氟诱导的细胞凋亡密切相关。

ROS 是需氧生物利用氧气代谢的过程中产生的一类具有氧化能力的分子、离子和自由基^[10]。细胞 ROS 升高, 可以作为氧化应激信号而诱导细胞凋亡信号通路的激活^[11]。已有实验证明, 氟可导致幼猪甲状腺细胞发生氧化应激^[12], 但氟能否引起人甲状腺细胞内 ROS 升高尚未见报道。笔者发现, 高剂

量氟能够明显引起人甲状腺细胞中 ROS 水平的升高, 说明氟能够诱导人甲状腺细胞发生氧化应激并进一步诱导细胞凋亡。

Zhang 等^[2]在研究氟对鼠原代海马神经细胞的作用时发现, 氟能够诱导细胞发生 S 期阻滞。刘开泰等^[13]在研究氟对长骨细胞作用时也发现氟能阻滞细胞于 S 期, 从而使分裂期细胞减少。当细胞发生 S 期阻滞时, 一方面修复损伤的 DNA, 另一方面如损伤不能修复则诱导细胞发生凋亡, 以降低基因组的不稳定性, 减少细胞突变及癌变^[14-15]。笔者发现 1.0 mmol/L NaF 能诱导人甲状腺细胞发生 S 期阻滞, 而 3.0 mmol/L NaF 虽然没有引起细胞 S 期阻滞, 但能诱导细胞发生凋亡, 推测 1.0 mmol/L NaF 溶液引起的 DNA 损伤较轻, 细胞阻滞在 S 期进行修复, 而 3.0 mmol/L NaF 溶液引起的 DNA 损伤较重, 部分细胞已经无法修复而发生了凋亡。

综上所述, 氟可引起人甲状腺细胞损伤, 造成细胞存活率下降, LDH 漏出率上升。氟的甲状腺细胞毒性与细胞凋亡有关, 低浓度氟可导致细胞周期的 S 期阻滞, 高浓度的氟可通过 ROS 的产生引起氧化应激并激活凋亡通路, 从而诱导细胞凋亡。氟诱导细胞凋亡的具体机制复杂, 需进一步探讨。

参 考 文 献

- [1] Sharma R, Tsuchiya M, Bartlett JD. Fluoride induces endoplasmic reticulum stress and inhibits protein synthesis and secretion. *Environ Health Perspect*, 2008, 116(9): 1142-1146.
- [2] Zhang M, Wang A, Xia T, et al. Effects of fluoride on DNA damage, S-phase cell-cycle arrest and the expression of NF-kappaB in primary cultured rat hippocampal neurons. *Toxicol Lett*, 2008, 179(1): 1-5.
- [3] 刘国艳, 柴春彦, 康世良. 氟对鸡甲状腺组织结构的影响. *中国地方病学杂志*, 2001, 20(2): 90-93.
- [4] Zhang M, Wang A, He W, et al. Effects of fluoride on the expression of NCAM, oxidative stress, and apoptosis in primary cultured hippocampal neurons. *Toxicology*, 2007, 236(3): 208-216.
- [5] Wang AG, Xia T, Chu QL, et al. Effects of fluoride on lipid peroxidation, DNA damage and apoptosis in human embryo

表 2 不同浓度 NaF 对 Nthy-ori 3-1 细胞周期及细胞凋亡率的影响 (n=3)

NaF 浓度 (mmol/L)	G ₀ /G ₁ 期 (%)	S 期 (%)	G ₂ /M 期 (%)	细胞凋亡率 (%)
0.0	60.09 ± 1.76 ^a	32.59 ± 2.43 ^e	7.15 ± 1.13	9.64 ± 3.44 ⁱ
0.1	57.43 ± 1.87 ^b	39.15 ± 1.57 ^f	3.41 ± 0.33	10.80 ± 2.41 ^j
1.0	40.76 ± 5.65 ^c	54.05 ± 4.59 ^g	5.20 ± 2.68	11.41 ± 2.44 ^k
3.0	61.02 ± 2.49 ^d	31.76 ± 7.38 ^h	7.22 ± 5.06	20.09 ± 3.22 ^l
F 值	24.223	15.209	1.158	32.180
P 值	<0.01	0.001	0.384	<0.01

注: ^c 与 ^a 比较, $q = 10.014$, $P < 0.01$; ^c 与 ^b 比较, $q = 8.640$, $P < 0.01$; ^c 与 ^d 比较, $q = 10.496$, $P < 0.01$; ^g 与 ^e 比较, $q = 8.110$, $P < 0.01$; ^g 与 ^f 比较, $q = 5.632$, $P < 0.01$; ^g 与 ^h 比较, $q = 8.425$, $P < 0.01$; ^l 与 ⁱ 比较, $q = 12.386$, $P < 0.01$; ^l 与 ^j 比较, $q = 11.011$, $P < 0.01$; ^l 与 ^k 比较, $q = 10.065$, $P < 0.01$

- hepatocytes. *Biomed Environ Sci*, 2004, 17(2): 217-222.
- [6] 洪庆涛, 宋岳涛, 唐一鹏, 等. 细胞培养液乳酸脱氢酶漏出率的比色测定及其应用. *细胞生物学杂志*, 2004, 26(1): 89-92.
- [7] Yermolaieva O, Leonard AS, Schnizler MK, et al. Extracellular acidosis increases neuronal cell calcium by activating acid-sensing ion channel 1a. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(17): 6752-6757.
- [8] 国秀娟, 单忠艳, 滕卫平. 氟过量与碘氟过量对甲状腺功能和形态影响的实验研究. *中华内科杂志*, 2006, 45(10): 846-847.
- [9] 高晨光, 张爱君. 氟的细胞毒性作用. *中国地方病学杂志*, 2007, 26(4): 471-473.
- [10] 沈立明, 李娜, 兰子尧, 等. 柠檬酸镱诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡作用及蛋白质表达变化研究. *中华预防医学杂志*, 2010, 44(6): 480-484.
- [11] 刘卉, 刘延香. 细胞凋亡与活性氧. *现代肿瘤医学*, 2008, 16(10): 1830-1832.
- [12] Zhan XA, Xu ZR, Li JX, et al. Effects of fluorosis on lipid peroxidation and antioxidant systems in young pigs. *Fluoride*, 2005, 38(2): 157-161.
- [13] 刘开泰, 王国荃, 汪师贞, 等. 氟对体外骨器官培养长骨细胞周期和细胞凋亡的影响. *地方病通报*, 1999, 14(4): 1-3.
- [14] 王燕玲, 张红, 李宁, 等. 碳离子辐照对人肺癌细胞 A549 细胞周期进程的影响. *原子核物理评论*, 2007, 24(1): 72-75.
- [15] 周伟, 黄关麟, 张恒, 等. 甲基叔丁基醚对细胞周期及细胞凋亡的影响. *中华预防医学杂志*, 2000, 34(4): 221-223.

(收稿日期: 2011-11-01)

(本文编辑: 杨文杰 吕相征)

· 文献速览 ·

屏障厚度决定纳米材料的间接损伤作用

Sood A, Salih S, Roh D, et al. Signalling of DNA damage and cytokines across cell barriers exposed to nanoparticles depends on barrier thickness. *Nat Nanotechnol*, 2011, 6(12): 824-833.

随着纳米材料的广泛应用, 人们接触纳米材料的机会大大提高, 有关纳米材料的潜在健康危害也备受关注。虽然生物屏障在抵御纳米材料侵入机体方面发挥了重要的作用, 但英国布里斯托大学 Patrick Case 和同事的前期研究发现, 钴铬纳米材料在不跨越生物屏障(由多层细胞构成)的情况下, 可使位于屏障另一侧的细胞发生 DNA 损伤, 从而引发了人们对纳米材料的间接损伤作用的高度重视。

在此基础上, Patrick Case 及其合作者通过在 transwell 膜上培养人胎盘滋养层细胞(BeWo)和人角膜上皮细胞(HCE-T), 建立各种不同厚度的细胞屏障模型(单层、双层或多层细胞), 再将 transwell 膜置于底部生长有纤维原细胞或胚胎干细胞的孔板内, 在细胞屏障上方加入钴铬纳米材料, 通过观察屏障下方生长的细胞发生 DNA 损伤的情况, 比较研究了细胞屏障厚度对钴铬纳米材料间接损伤作用的影响。结果显示, 当纤维原细胞或胚胎干细胞生长于单层 BeWo 或 HCE-T 细胞屏障下方时, 不发生 DNA 损伤; 而当其生长于双层或多层细胞屏障下方时, 可观察到明显的 DNA 损伤, 间隙

连接蛋白 connexin-43 和三磷酸腺苷(ATP)分子表达, 线粒体自由基和细胞因子释放。采用二氧化钛纳米材料可观察到相同结果。说明纳米颗粒的间接损伤作用取决于生物屏障的厚度, 细胞损伤信号可跨越由双层或多层细胞构成的生物屏障进行传导, 却无法通过单层细胞屏障。

由于人胎盘结构在孕期具有以下发育特点: 与母血直接接触的胎盘绒毛上皮滋养层, 在孕早期主要表现为由合体滋养细胞和细胞滋养细胞组成的双层细胞结构; 而在孕后期, 细胞滋养细胞逐渐减少并消失, 使滋养层成为单层细胞结构。这似乎意味着处于孕早期的胎儿更易受到纳米材料的间接损伤作用, 但由于人胎盘结构相比 BeWo 细胞屏障模型更加复杂, 尚不能将体外实验结果简单地外推至人体。然而, 纳米材料的间接损伤作用及其与生物屏障厚度之间的关系, 值得人们认真考虑和进一步深入研究。

(北京大学医学部公共卫生学院劳动卫生与
环境卫生学系 王云整理)