· 实验研究 ·

铅对大鼠骨组织代谢影响*

郭李萌,冯翠萍,云少君,何兴帅,吴艳丽,褚东阳,张文芳

摘 要:目的 探讨铅中毒对大鼠机体骨代谢影响及机制。**方法** 选取 21 日龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 40 只,适应性喂养 7 d 后,随机分为 4 组:对照组(去离子水)、低、中、高剂量铅组(0.1%、0.2%、0.3% 醋酸铅水);饲养 60 d 后,称重;取大鼠后肢股骨,ICP 法测定股骨中 Pb、Ca 含量;采用常规苏木素 - 伊红染色法(HE)对大鼠骨组织形态进行观察;应用荧光定量 RT-PCR 法测定大鼠骨骼中过氧化物酶体增长因子活化受体 γ(PPAR-γ)、Wnt2、转录因子 1(Tcf-1)、和 β-catenin 基因表达量。**结果** 与对照组比较,随着染铅剂量增加,低、中、高剂量铅组大鼠骨骼铅含量[分别为(0.221 5 ± 0.033 0)、(0.335 3 ± 0.040 7)、(0.399 2 ± 0.030 9) mg/g]均升高,而骨钙含量[分别为(21.719 4 ± 1.120 8)、(21.559 5 ± 1.094 0)、(21.421 7 ± 0.700 2) mg/g]均下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$);与对照组比较,低、中剂量铅组大鼠骨小梁相对变薄、变细,高剂量铅组大鼠股骨骨小梁稀疏、变细、变薄或断裂,骨髓腔相对扩大;与对照组比较,高剂量铅组大鼠骨骼中 PPAR-γ、Wnt2、Tcf-1 及 β-catenin mRNA 表达量[分别为(0.821 3 ± 0.0202)、(0.852 6 ± 0.030 8)、(0.874 3 ± 0.077 2)、(0.874 5 ± 0.055 3)]均下降,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 铅对大鼠骨组织中钙的吸收具有抑制作用,对骨组织结构具有损伤作用,其机制可能与下调骨骼中 PPAR-γ、Wnt2、Tcf-1 及 β-catenin 基因表达有关。

关键词: 铅中毒;Pb;Ca;组织形态;过氧化物酶体增长因子活化受体 γ(PPAR-γ);Wnt2;转录因子 1(Tcf-1);β-catenin
中图分类号: TS 201.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-0580(2017)04-0592-04 DOI:10.11847/zgggws2017-33-04-19

Effects of lead on bone tissue metabolism in rat

GUO Li-meng, FENG Cui-ping, YUN Shao-jun, et al (*College of Food Science and Engineering, Shanxi Agricultural University, Taigu, Shanxi Province* 030801, China)

Abstract: Objective To explore the effects of excessive lead (Pb) on bone metabolism, and its mechanism. **Methods** Forty specific pathogen free (SPF) male Sprague-Dawley (SD) rats aged 21 days with adaptive feeding of 7 days were randomly divided into 4 groups: a normal control group (with distilled water), low, medium, and high Pb group (with water containing 0.1%, 0.2%, and 0.3% CH_3COO_2 lead). By the end of 60 days' treatment, the rats were weighed; the contents of Pb, calcium (Ca) in bone tissues were determined with inductively coupled plasma (ICP) method. The rat bone morphology was examined via conventional hematoxylin-eosin staining. The expression levels of wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family member 2 (Wnt2), transcription factor 1 (Tcf-1), peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR-γ) and β-catenin gene were determined with real-time reverse transcriptase PCR (RT-PCR). **Results** Compared with those of the normal control group, the bone lead concentration in lead overload groups increased (0.221 5 ± 0.033 0, 0.335 3 ± 0.040 7, and 0.399 2 ± 0.030 9 mg/g), while the calcium content decreased (21.719 4 ± 1.120 8, 21.559 5 ± 1.094 0, and 21.421 7 ± 0.700 2 mg/g) significantly with the increment of lead exposure (all $P < 0.05$). Compared with the normal control group, the low and medium lead exposure group showed attenuated trabecular of femur and the high lead exposure group showed decreased, attenuated, and broken trabecular of femur and expanded bone marrow cavity. Compared with those of the normal control group, the expression level of PPAR-γ (0.821 3 ± 0.020 2), Wnt2 (0.852 6 ± 0.030 8), Tcf-1 (0.8743 ± 0.077 2), and β-catenin gene (0.874 5 ± 0.055 3) in the high lead exposure group decreased significantly (all $P < 0.05$). **Conclusion** Lead could inhibit the absorption of Ca in bone tissue and could damage bone structure in rats and the mechanism of the effect may be related to down-regulations of ppar-γ, Wnt2, Tcf-1, and β-catenin associated gene expression in bone tissue.

Key words: lead-poisoning; lead; calcium; bone histomorphology; peroxisome proliferator-activated receptor γ; wingless-type mouse mammary tumor virus integration site family member 2; transcription factor 1; β-catenin

铅(lead, Pb)是常见的工业污染物之一,可在人体和动物组织中蓄积,在人体内不易降解,分布极为广泛[1],极低的浓度便可对人体产生毒害。国内外研究表明,Pb 能够干扰人体神经、骨骼、免疫等多组织器官的正常代谢和功能运转[2]。铅在人体最主要的靶器官是骨骼,它进入机体后,最终 95% 均蓄

* **基金项目:** 生态畜牧与环境兽医学山西省重点实验室开放基金(KF2013 - 01);山西农业大学引进人才博士科研启动费(2013YJ30);山西农业大学科技创新基金(20132 - 02);山西省自然科学基金(2010011043 - 1)
作者单位: 山西农业大学食品科学与工程学院,山西 太谷 030801
作者简介: 郭李萌(1991 -),女,山西晋城人,硕士在读,研究方向:食品营养与安全。
通讯作者: 云少君,E-mail:yunshaojun@163.com
数字出版日期: 2016 - 8 - 10 14:02
数字出版网址: http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20160810.1402.002.html

积在骨骼中,半衰期长达 5 ~ 20 年[3],与骨骼发育畸形、骨质疏松、骨关节炎等密切相关[4]。研究表明骨代谢就是成骨细胞形成新骨和破骨细胞吸收旧骨的过程[5]。Wingless protein(Wnt)信号通路是目前骨骼系统相关疾病发病机制和骨代谢研究的新热点,Wnt/β-catenin 信号通路在骨重建过程中起重要作用,与成骨细胞分化、增殖和骨形成密切相关,并通过不同途径影响破骨细胞及骨细胞功能[6];Wnt2 属于分泌型蛋白家族成员,它通过自分泌或旁分泌作用,与位于细胞膜上的受体蛋白相结合[7],Wnt 蛋白在成骨细胞中可通过经典信号通路调节成骨细胞的增殖和分化[8],参与骨发生过程的调节。转录因子 1(transcription factor 1, Tcf-1)是 Wnt 信号通路核内转录因子,在 Wnt 信号调控转录过程中起着分子开关作用,它与 β-catenin 结合后在核内共同调控靶基因,调节成骨细胞的活性和功能[9]。过氧化物酶体增长因子活化受体 γ(peroxisome proliferator-activated receptor γ, PPAR-γ)是细胞核受体 PPAR 家族成员中之一,是重要的成脂分化转录因子,可调节骨髓间充质干细胞直接抑制前成骨细胞分化基因还可抑制 Wnt 信号通路,在机体生长发育及代谢方面有着十分重要的作用[10]。β-catenin 是一种胞质内的糖蛋白,作为 Wnt 经典信号通路的起始蛋白和关键分子,直接参与调节成骨细胞形成和骨骼发育[11]。目前铅对骨代谢的影响主要着重于研究通过影响维生素 D,钙磷代谢而导致的骨发育异常、骨钙化障碍[12],对于 Wnt 信号通路中 Wnt2、Tcf-1、PPAR-γ 基因研究较少。因此,本研究通过观察染铅大鼠骨骼中铅、钙元素和骨组织形态及骨骼中 PPAR-γ、Wnt2、Tcf-1 和 β-catenin 的基因表达变化,旨在探讨铅对骨代谢的影响及其机制,为预防和改善铅中毒提供科学依据。结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　*实验动物*　21 日龄雄性 Sprague - Dawley(SD)大鼠,购于北京维通利华实验动物技术有限责任公司,生产许可证号码为:SCXK(京)2012 - 0001。自然昼夜,节律光照,温度(20 ± 5)℃,相对湿度为 40% ~ 60%。基础饲料喂养,自由饮食、饮水。

1.2　*主要试剂与仪器*　Trizol(美国 Invitrogen 公司),SYBR® Premix Ex Taq™ Ⅱ 试剂盒和 DNA Marker(大连宝生物公司),醋酸铅(天津金汇太亚化学试剂有限公司)。Optima5300DV 型 ICP 发射光谱仪(美国 PE 公司),BX 51 型生物显微镜(日本 Olympus 公司),RM2265 型切片机(德国 LEICA 公司),HY - BM1160 生物组织包埋机(金华惠友仪器生物有限公司),Mx3000P 荧光定量 PCR 仪(美国 Stratagene 公司),Eppendorf AG 核酸蛋白测定仪(德国 Eppendorf 公司),DYY-Ⅲ7B 型电泳仪(北京市六一仪器厂),BIO-RAD 凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司)。

1.3　*分组与处理*　大鼠随机分为 4 组:对照组、低、中、高剂量铅组,每组 10 只;对照组大鼠饮去离子水;低、中、高剂量铅组大鼠饮水中分别含有 0.1%、0.2%、0.3% 醋酸铅;饲养 60 d 后,过夜禁食 12 h,称重后,用乙醚将大鼠麻醉处死,取后肢股骨,剔净周围肌肉组织,一部分经固定、脱水、包埋、切片、苏木素 - 伊红染色(hematoxylin-eosin staining, HE),光镜观察组织形态。另一部分组织迅速存于液氮中,然后在 - 80 ℃冰箱中保存,待用。

1.4　*骨骼中 Pb、Ca 含量测定*　取股骨,加入 8 mL 硝酸和 2 mL 高氯酸(高氯酸:硝酸 = 1:4, V:V)静置过夜后于电炉上进行湿法消化,同时作对照管;消化至白色颗粒后用双蒸水定容至 25 mL,用电感耦合等离子发射光谱仪测定骨组织中 Pb、Ca 含量。

1.5　*Wnt 信号通路因子 mRNA 表达检测*　采用荧光定量 reverse transcriptase-PCR(RT-PCR)法,按 Trizol 试剂盒方法提取股骨组织中总 RNA,采用琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白测定仪对 RNA 进行检测。

1.5.1　*引物设计与合成*　应用 Primer 5.0 软件设计引物,由上海生工生物工程有限公司合成,β-actin 上游引物:5′-TACCCAGGCATTGCTGACAG-3′,下游:5′-AGCCACCAATCCACACAGAG-3′,片段长度 104 bp;PPAR-γ 上游引物:5′-AGGAGCAGAGCAAAGAGGTG-3′,下游:5′-CACAGCAAACTCAAACTTAGGC-3′,片段长度 107 bp;Wnt2 上游引物:5′-CAACTTGACTTCCCGAGGCA-3′,下游:5′-GTAGGAGTTGTCCAGTCGGC-3′,片段长度 171 bp;Tcf-1 上游引物:5′-GGCTTACGAGAGGCAGAAGA-3′,下游:5′-TTACTGGGAGAGAGGGTGGTT-3′,片段长度 198 bp;β-catenin 上游引物:5′-ACACAACCTTTCCCACCATC-3′,下游:5′-GCTTTCCTGATTGCCGTAAG-3′,片段长度 154 bp。

1.5.2　*荧光定量 RT-PCR*　反应体系为 10.0 μL:SYBRPremix Ex TaqTM Ⅱ(2 ×)5.0 μL, forward primer(10 μmol/L)1.0 μL, reverse primer(10 μmol/L)1.0 μL, cDNA 1.0 μL; dH2O(灭菌双蒸水)2.0 μL;反应条件:95 ℃ 5 min;95 ℃ 5 s;60 ℃ 30 s,50 个循环;95 ℃ 15 s,60 ℃ 1 min,95℃ 15 s;反应结束后,计算 threshold cycle(Ct)值;然后取样品 cDNA 1 μL 为模板,按 2 倍浓度梯度稀释,进行荧光定量 PCR 反应。结果用 MXPro-MX3000P 软件(Stratagene 公司)自动进行数据分析,绘制标准曲线。以 β-actin 为看家基因,计算待测基因相对表达量。

1.6　统计分析　计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析，组间比较进行方差齐性检验后选用单因素方差分析，再用最小显著差法进行均数间的两两比较，以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2　结　果

2.1　染铅对大鼠体重影响（图 1）　结果显示，低、中、高剂量铅组大鼠体重分别在染铅第 35、25、10 d 明显低于对照组，差异有统计学意义（$P < 0.05$）。

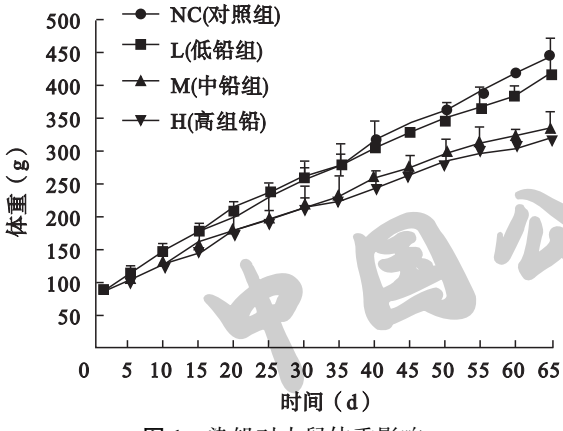


图 1　染铅对大鼠体重影响

2.2　染铅对大鼠骨骼中 Pb 与 Ca 含量影响（表 1）　与对照组比较，各剂量染铅组大鼠骨骼中铅含量均明显升高，而骨骼中钙含量均明显下降，差异均有统计学意义（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。

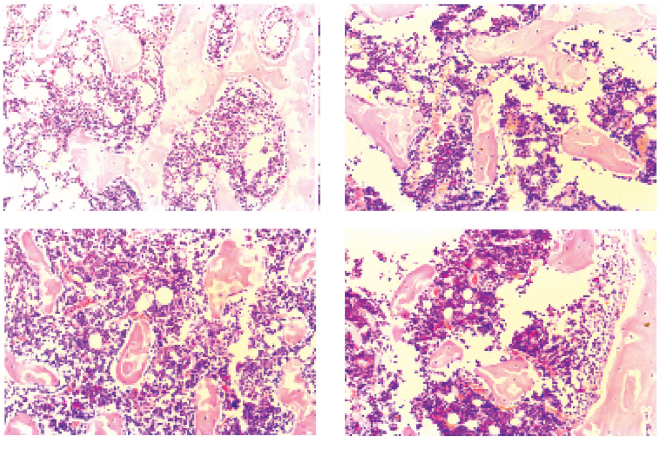
表 1　染铅对大鼠骨骼中 Pb 与 Ca 含量影响（mg/g，$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

组别（%）	Pb	Ca
对照组	0.003 3 ± 0.000 6	23.712 0 ± 0.879 3
染铅组 0.1	0.221 5 ± 0.033 0[a]	21.719 4 ± 1.120 8[a]
0.2	0.335 3 ± 0.040 7[a]	21.559 5 ± 1.094 0[a]
0.3	0.399 2 ± 0.030 9[a]	21.421 7 ± 0.700 2[a]

注：与对照组比较，a $P < 0.01$。

2.3　染铅对大鼠骨骼组织形态影响（图 2）　对照组大鼠股骨骨小梁丰富、结构相对紧密、饱满，钙盐沉着均匀（图 1A）；与对照组比较，低、中剂量铅组大鼠骨小梁相对变薄、变细（图 1B、C）；高剂量铅组大鼠股骨骨小梁稀疏、变细、变薄或断裂，骨髓腔相对扩大（图 1D）。

2.4　染铅对大鼠骨骼中 Wnt 通路因子 mRNA 表达影响（表 2）　与对照组比较，高剂量铅组大鼠骨骼中 PPAR-γ、Wnt2、Tcf-1 和 β-catenin mRNA 表达量均下降，差异有统计学意义（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）；与对照组比较，中剂量铅组大鼠骨骼中 β-catenin mRNA 表达量下降，差异有统计学意义（$P < 0.01$）。



注：A：对照组；B、C、D：低、中、高剂量铅组。

图 2　染铅对大鼠骨组织形态影响（HE，×200）

表 2　染铅对大鼠骨骼中 Wnt 通路因子 mRNA 表达影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

组别（%）	PPAR-γ	Wnt2	Tcf-1	β-catenin
对照组	1.000 0 ± 0.018 0	1.000 0 ± 0.034 1	1.000 0 ± 0.073 7	1.000 0 ± 0.035 5
染铅组 0.1	0.983 2 ± 0.009 2	0.998 9 ± 0.022 9	0.995 6 ± 0.076 2	0.995 9 ± 0.035 4
0.2	0.910 9 ± 0.026 5	0.869 4 ± 0.049 6	0.915 2 ± 0.069 5	0.916 6 ± 0.012 1[b]
0.3	0.821 3 ± 0.020 2[b]	0.852 6 ± 0.030 8[b]	0.874 3 ± 0.077 2[a]	0.874 5 ± 0.055 3[b]

注：与对照组比较，a $P < 0.05$，b $P < 0.01$。

中国公共卫生 CPH

3 讨　论

研究表明染铅可改变成骨细胞的形态、增殖速率和生物学标志物等,破坏成骨细胞活性,甚至导致成骨细胞的凋亡;当铅达到一定浓度时,也可改变成骨细胞的增殖功能[13]。当铅在体内蓄积剂量超过一定负荷时人体的自我调节能力被破坏[14],可引起包括钙在内的许多微量元素功能稳态的异常,从而导致多种代谢紊乱。本研究结果表明染铅组大鼠骨骼中 Pb 含量明显高于对照组,而 Ca 含量则明显低于对照组。可能与 Pb、Ca 均为二价离子,具有相似的生理生化性质,Pb 与 Ca 在小肠上皮吸收的过程中,相互间存在竞争拮抗作用,且铅对骨组织高度亲和,导致骨骼中 Ca 水平变化有关。与已有研究结果一致[15]。

胡雪琴等[16]通过动物模型研究发现,铅暴露可导致大鼠股骨骨质密度稀疏,骨小梁数目锐减,使软骨的成骨作用受到干扰。本研究结果表明染铅组大鼠股骨中骨小梁网状结构被破坏,骨髓腔不明显。提示,由于铅与钙的拮抗作用,铅的存在破坏了骨组织中钙磷平衡,磷酸铅代替了钙盐的沉积,导致骨组织的结构受到损伤[17-18]。

Bodine 等[19]研究表明,Wnt 信号通路是参与调节骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化,抑制成骨细胞的程序性死亡的经典通路。当 Wnt 与 Frizzled 蛋白、低密度脂蛋白受体相关蛋白偶联受体 5/6(lipoprotein receptor related protein 5/6,LRP5/6)结合时,β-catenin 次磷酸化作用,通路被激活,利于成骨前体细胞向成骨细胞转化,成骨细胞增殖及分化功能加强,骨合成代谢活跃。PPAR-γ 激活后参与调节细胞的增殖、分化及凋亡。本研究结果显示,高剂量染铅可降低大鼠骨骼中 PPAR-γ、Wnt2、β-catenin 及 Tcf-1 基因 mRNA 表达。提示,铅能够通过 Wnt/β-catenin信号通路影响下游 PPAR-γ 及 Tcf-1 基因表达,抑制成骨细胞增殖、分化及破骨细胞功能,进而影响骨形成及骨的重建。

综上所述,染铅可使骨骼中 Pb 水平升高,Ca 含量下降;导致骨组织形态结构损伤,其机制可能与下调 Wnt 通路中 PPAR-γ、Wnt2、β-catenin 及 Tcf-1 基因表达,影响骨细胞增殖和分化有关。

参考文献

[1] 陈永前,吕晓云. 长期铅暴露后果的研究进展[J]. 医学综述,2013,19(10):1819-1822.

[2] Iavicoli I, Fontana L, Bergamaschi A. The effects of metals as endocrine disruptors[J]. Toxicology and Environmental Health, 2009(03):206-223.

[3] Hu H, Rabinowitz M, Smith D. Bone lead as a biological marker in epidemiologic studies of chronic toxicity: conceptual paradigms[J]. Environmental Health Perspectives, 1998, 1(106): 1-8.

[4] 刘云忠,毕树雄,卫小春. 铅对骨骼的损伤机制及其生物学标志物[J]. 医学综述,2011,17(1):97-99.

[5] 白金,邹建芳. 铅对骨代谢影响研究进展[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,2010,28(9):699-701.

[6] 周军,何成奇. Wnt/β-catenin 信号通路在骨重建中的作用研究进展[J]. 中国康复医学杂志,2015,30(5):513-515.

[7] 李宝新,李玉坤. Wnt 信号通路对骨调节研究新进展[J]. 国际骨科学杂志,2008,29(03):179-181.

[8] 刘艳玲,李方兵,赵曦. Wnt 信号通路在成骨细胞中的作用:成骨还是破骨[J]. 中国组织工程研究,2014,18(33):5366-5370.

[9] 唐泉,杨冰,孙元明. 经典 Wnt 信号通路对成骨细胞增殖和分化的影响[J]. 天津医药,2012,40(2):187-189.

[10] 裴红霞,魏启幼,蒋谊. Cbfα1、PPARγ 在骨髓间质干细胞定向分化中的作用及对骨质疏松症的影响的研究[J]. 实用预防医学,2006,13(2):244-247.

[11] 陈锡山,于燕妮,易韦,等. 氟对大鼠成骨细胞 W nt3a、β-链蛋白 mRNA 和蛋白表达的影响[J]. 中华地方病学杂志,2013,32(2):140-145.

[12] 裴丹,秦书俭. 铅对骨骼系统的影响[J]. 医学综述,2008,14(17):2671-2674.

[13] 靳翠红,蔡原,刘秋芳. 铅对大鼠成骨细胞形态学的影响[J]. 毒理学杂志,2006,10(3):183-184.

[14] Anderson C, Danylchuk KD. The effect of chronic low level lead intoxication on the haversion remodeling system in dogs[J]. Lad Invest, 1977, 37(5):466-469.

[15] 曾造,赵云强. 微量元素缺乏对儿童健康的影响[J]. 微量元素与健康研究,2007,24:14-16.

[16] 胡雪琴,糜漫天. 铅对幼年大鼠钙的吸收和骨骼生长的影响[J]. 第三军医大学学报,2007,5:2-4.

[17] 陈修文,万昌武,谢春,等. 氟对大鼠骨组织 RBPJ 及相关基因表达影响[J]. 中国公共卫生,2016,32(2):195-198.

[18] 杨青,陈巾宇,杨野仝,等. 肥胖模型大鼠钙代谢和钙营养状态指标的检测及意义[J]. 中国公共卫生,2015,31(1):1-4.

[19] Bodine PVN, Zhao W, Kharode YP, et al. The Wnt antagonist secreted frizzled-related protein-1 is a negative regulator of trabecular bone formation in adult mice[J]. Molecular Endocrinology, 2004, 18(5):1222-1237.

收稿日期: 2016-06-22　　(解学魁编辑　韩仰欢校对)