

β -Catenin、CyclinD1、c-myc、Dvl-1在氟化钠诱导心肌细胞中的表达

朱世玲^{1,2}, 张强^{1,2*}, 杨瑞^{1,2}, 赵亚倩^{1,2}, 沈洪婷², 王明君², 张金梅², 姜泓²,
李亚楠², 陈勋², 陈萍², 鲁青²

¹青海大学医学部公共卫生系, 青海 西宁

²青海省地方病预防控制所地方病预防控制科, 青海 西宁

收稿日期: 2024年10月21日; 录用日期: 2024年11月15日; 发布日期: 2024年11月22日

摘要

目的: 氟化钠(NaF)染毒人心肌细胞(AC16), 实时荧光定量PCR (qRT-PCR)法检测Wnt/ β -catenin信号通路中 β -连环蛋白(β -catenin)、细胞周期蛋白(CyclinD1)、myc癌基因(c-myc)、蓬乱蛋白1 (Dvl-1) mRNA的表达情况, 为氟中毒所致心肌损伤机制提供理论依据。方法: 体外培养AC16细胞, 设置不同浓度梯度NaF进行染毒, 将其分为0 umol/L NaF组(对照组)、680 umol/L NaF组、1360 umol/L NaF组、2720 umol/L NaF组, 染毒24 h后置于倒置荧光显微镜下观察其细胞形态, CCK-8法检测细胞存活率; qRT-PCR检测染毒24 h细胞中Wnt/ β -catenin信号通路 β -catenin、CyclinD1、c-myc、Dvl-1 mRNA的表达水平。结果: AC16细胞成功造模后CCK-8结果显示, 不同浓度NaF染毒AC16细胞24小时, 对照组细胞存活率为100% \pm 0.08%, 染毒组细胞存活率分别为83.66% \pm 0.06%、42.75% \pm 0.07%、31.75% \pm 0.02%。经单因素的方差分析得出(F = 168.97, P < 0.0001), 染毒组细胞存活率均低于对照组(P < 0.0001); qRT-PCR结果显示, Wnt信号通路中关键性分子mRNA均有不同程度的表达, 对照组、680 umol/L NaF组、1360 umol/L NaF组、2720 umol/L NaF组中 β -catenin表达量分别为(1.00 \pm 0.73, 1.02 \pm 0.23, 5.48 \pm 0.72, 2.94 \pm 0.10)、c-myc (1.00 \pm 0.78, 1.96 \pm 0.94, 3.34 \pm 0.75, 3.83 \pm 0.25)、CyclinD1 (1.00 \pm 0.95, 0.98 \pm 0.24, 12.36 \pm 0.97, 1.05 \pm 0.13)以及Dvl-1 (1.00 \pm 0.64, 1.51 \pm 0.24, 37.54 \pm 0.33, 18.96 \pm 0.26)。对照组、低、中剂量组随染毒浓度升高, Wnt/ β -catenin信号通路 β -catenin、CyclinD1、c-myc、Dvl-1 mRNA表达升高, 高剂量组反而降低; 经单因素方差分析可得, β -catenin (F = 8.16, P = 0.008); c-myc (F = 4.34, P = 0.043); CyclinD1 (F = 6.48, P = 0.016); Dvl-1 (F = 41.90, P < 0.001); 经两组间t检验, 与对照组相比, 低剂量组差异均无统计学意义(t = 1.741, t = 1.866, t = 1.108, t = 3.708, P > 0.05), 中、高剂量组差异有统计学意义(P < 0.05); 中剂量组与低、高剂量组差异有统计学意义(P < 0.05)。结论: AC16细胞经染氟后成功造模, 不同NaF浓度可干扰心肌细胞存活率; 低、中剂量的氟可能通过Wnt/ β -catenin信号通路导致心肌细胞的损伤, β -catenin、CyclinD1、c-myc、Dvl-1 mRNA表达升高, 高剂量氟 β -catenin、CyclinD1、c-myc、Dvl-1 mRNA表达反而降低, 可能由于Wnt信号通路过度激活反而降低了对心肌细胞的损伤。

关键词

氟中毒, AC16细胞, 细胞凋亡, qRT-PCR, CCK-8

*通讯作者。

文章引用: 朱世玲, 张强, 杨瑞, 赵亚倩, 沈洪婷, 王明君, 张金梅, 姜泓, 李亚楠, 陈勋, 陈萍, 鲁青. β -Catenin、CyclinD1、c-myc、Dvl-1 在氟化钠诱导心肌细胞中的表达[J]. 临床医学进展, 2024, 14(11): 1235-1244.

DOI: 10.12677/acm.2024.14113007

Expression of β -Catenin, CyclinD1, c-myc, and Dvl-1 in Cardiomyocytes Following Induction by Sodium Fluoride

Shiling Zhu^{1,2}, Qiang Zhang^{1,2*}, Rui Yang^{1,2}, Yaqian Zhao^{1,2}, Hongting Shen², Mingjun Wang², Jinmei Zhang², Hong Jiang², Yanan Li², Xun Chen², Ping Chen², Qing Lu²

¹Department of Public Health, Qinghai University Health Science Center, Xining Qinghai

²Department of Endemic Disease Prevention and Control, Qinghai Provincial Institute of Endemic Disease Prevention and Control, Xining Qinghai

Received: Oct. 21st, 2024; accepted: Nov. 15th, 2024; published: Nov. 22nd, 2024

Abstract

Objective: Sodium fluoride (NaF) infected human cardiomyocytes (AC16); Real-time quantitative fluorescent PCR (qRT-PCR) was used to detect the expression of β -catenin (β -catenin), CyclinD1, myc oncogene (c-myc) and Dvl-1 mRNA in Wnt/ β -Catenin signaling pathway, to provide a theoretical basis for the mechanism of myocardial injury caused by fluorosis. **Methods:** AC16 cells were cultured *in vitro* and exposed with different concentration gradients of NaF. They were divided into 0 umol/LNaF group (control group), 680 umol/LNaF group, 1360 umol/LNaF group and 2720 umol/LNaF group. 24 h after exposure, the cell morphology was observed under inverted fluorescence microscope, and the cell survival rate was detected by CCK-8 method. The expression levels of Wnt/ β -catenin signaling pathways β -catenin, CyclinD1, c-myc, Dvl-1 mRNA were detected by qRT-PCR in 24 h infected cells. **Results:** After AC16 cells were successfully modeled, CCK-8 results showed that the survival rate of AC16 cells in the control group was 100% \pm 0.08% after 24 hours of exposure to NaF. The survival rates of the infected group were 83.66% \pm 0.06%, 42.75% \pm 0.07% and 31.75% \pm 0.02%, respectively, according to one-way analysis of variance ($F = 168.97$, $P < 0.0001$). The survival rates of the infected group were lower than those of the control group ($P < 0.0001$). The results of qRT-PCR showed that the mRNA of key molecules in the Wnt signaling pathway was expressed in different degrees. The expression levels of β -catenin in control group, 680 umol/LNaF group, 1360 umol/LNaF group and 2720 umol/LNaF group were (1.00 ± 0.73 , 1.02 ± 0.23 , 5.48 ± 0.72 and 2.94 ± 0.10 , respectively), c-myc (1.00 ± 0.78 , 1.96 ± 0.94 , 3.34 ± 0.75 , 3.83 ± 0.25), CyclinD1 (1.00 ± 0.95 , 0.98 ± 0.24 , 12.36 ± 0.97 , 1.05 ± 0.13), Dvl-1 (1.00 ± 0.64 , 1.51 ± 0.24 , 37.54 ± 0.33 , 18.96 ± 0.26); control group, low dose group and medium dose group increased with the concentration of exposure. The expression of β -catenin, CyclinD1, c-myc, Dvl-1 mRNA in Wnt/ β -catenin signaling pathway increased; The high dose group decreased; By one-way ANOVA, β -catenin ($F = 8.16$, $P = 0.008$) was obtained. c-myc ($F = 4.34$, $P = 0.043$); CyclinD1 ($F = 6.48$, $P = 0.016$); Dvl-1 ($F = 41.90$, $P < 0.001$); After t test between the two groups, compared with the control group, there was no statistical significance in the low-dose group ($t = 1.741$, $t = 1.866$, $t = 1.108$, $t = 3.708$, $P > 0.05$), and there was statistical significance in the medium-dose and high-dose groups ($P < 0.05$). There was significant difference between medium dose group and low and high dose group ($P < 0.05$). **Conclusion:** AC16 cells were successfully modelled after fluoride staining, and the survival rate of cardiomyocytes could be affected by different concentrations of NaF. Low and medium doses of fluoride may cause myocardial cell injury through Wnt/ β -catenin signaling pathway, and increase mRNA expression of β -catenin, CyclinD1, c-myc and DVL-1. The mRNA expressions of fluoro- β -catenin, CyclinD1, c-myc and DVL-1 were decreased at high doses, which may be due to the over-activation of Wnt signaling pathway, but the damage to cardiomyocytes was reduced.

Keywords

Fluorosis, AC16 Cells, Apoptosis, qRT-PCR, CCK-8

Copyright © 2024 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

氟作为一种重要的微量元素，其普遍分布于自然环境中，对骨骼、牙齿及非骨相组织的影响尤为显著[1]。氟化物的适量摄入可以有效预防龋齿，而且通过服用氟保护剂，还能够显著改善儿童的龋齿[2]状况，降低其龋齿发病机率，从而达到预防龋齿的目的，但如果氟的摄取量超出了安全范围，就会导致慢性氟中毒，从而对患者的日常生活质量造成严重影响。

Wnt 信号通路的异常调控机制已证实与多种疾病的发病机制密切相关，包括心血管系统疾病、骨关节病变以及肝脏疾病等领域[3]-[6]。该通路的标志是 β -catenin 在细胞质中的累积，并转移至细胞核内， β -catenin 是一个定位于胞浆的可溶性蛋白，其在细胞质中的浓度决定了 Wnt 信号通路的开放或关闭[7]，游离的 β -catenin 可进入细胞核，调节下游靶基因的表达，在正常细胞中通常没有 Wnt 信号， β -catenin 的表达维持在低水平，且多以 cadherin-actin 复合体形式存在于胞膜[8]。Dvl-1 可调节细胞增殖，接受上游分子信号，并抑制 β -catenin 的降解[9] [10]。c-myc 与 CyclinD1 均为下游 Wnt 信号靶基因，调控细胞生长，c-myc 是一种原癌基因，其在干细胞自我更新调控以及肿瘤的发生发展中扮演者重要的角色。CyclinD1 是一种细胞周期蛋白，促进细胞增殖，在细胞周期中被首先合成，其复合物 CyclinD1-CDK4 复合物在核膜上积累，然后转运至细胞核，在核膜、细胞核、细胞质中均有存在[11] [12]。近年来 Wnt/ β -catenin 信号通路研究非常广泛，而氟致心肌损伤该通路的研究较少，因此本研究通过体外培养 AC16，氟化钠染毒造模，观察其对人心肌细胞 Wnt 信号通路 β -catenin、CyclinD1、c-myc、Dvl-1 mRNA 的表达水平，为后期研究过量氟致心肌损伤作用提供理论基础。

2. 材料与方法

2.1. 细胞和主要试剂

2.1.1. 细胞株

AC16 人心肌细胞(购买于上海富衡生物科技有限公司)。

2.1.2. 主要试剂

氟化钠(NaF; 分析纯, 天津市大茂化学试剂厂); AC16 完全培养基(上海富衡生物科技有限公司); 0.25%胰蛋白酶消化液(武汉塞维尔生物科技有限公司); CCK-8 试剂(武汉塞维尔生物科技有限公司); 高糖 DMEM 培养基(武汉塞维尔生物科技有限公司); 细胞冻存液(江苏凯基生物技术有限公司); 巴氏吸管(西安恩典生物有限公司); 动植物 RNA 提取试剂盒(北京全式金生物有限公司); 逆转录试剂盒(北京全式金生物有限公司); 实时荧光定量试剂盒(北京全式金生物有限公司)。

2.1.3. 主要仪器

全自动酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司); 倒置荧光显微镜(舜宇光学科技集团有限公司); CO₂ 培养箱(美国赛默飞世尔科技公司); 培养瓶(美国 Corning 公司); 96 孔板(美国 Corning 公司); 超净工作台(北京

东联哈尔滨仪器制造有限公司); 恒温水浴锅(杭州庚雨仪器有限公司); 低温冰箱(美国赛默飞世尔科技公司); 电子天平(天津西纳智能科技有限公司); 离心机(湖南湘仪实验室仪器有限公司); 实时荧光定量 PCR 仪(美国赛默飞世尔科技公司)。

2.2. 细胞培养与造模

2.2.1. 细胞传代

AC16 人心肌细胞培养于 AC16 DMEM 完全培养基中, 置于 37°C、5% CO₂ 无菌恒温细胞培养箱中培养, 每日对细胞形态及贴壁状况进行观察, 待 AC16 贴壁细胞汇合度达到 90% 时, 将 AC16 进行传代。1 × PBS 洗涤细胞 2 次, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化液 1 mL, 置于 37°C、5% 的 CO₂ 恒温培养箱中消化 2 min, 置于倒置荧光显微镜中观察其细胞状态, 待观察到细胞变圆变亮时, 加入 4~5 mL AC16 DMEM 完全培养基终止消化, 无菌巴氏吸管轻轻吹打细胞, 将其转移至 15 mL 无菌无酶离心管中, 1000 rpm, 离心 5 min, 吸去上清液, 加入 2 mL AC16 DMEM 完全培养基制成单细胞悬液, 均匀分装至两个新的 T25 培养瓶中, 补足 AC16 DMEM 完全培养基至 5 mL, 混匀进行第二代培养, 并以此类推。

2.2.2. NaF 染毒细胞造模

称取 NaF 溶于高糖 DMEM 培养基中, 配制成 10 mmol/L 的母液, 用滤头过滤。取 AC16 完全培养基配置成不同浓度 NaF 溶液。分别为对照组、680 μmol/L NaF 组、1360 μmol/L NaF 组、2720 μmol/L NaF 组。

2.2.3. 细胞形态观察

取出染毒 24 h 后的 AC16 人心肌细胞, 置于倒置荧光显微镜下观察细胞形态。

2.2.4. CCK-8 孵育及细胞存活率测定

取生长态势良好, 汇合度为 90% AC16 细胞胰酶消化后, 1000 rpm, 离心 5 min, 细胞沉淀用完全培养基制成 5 × 10⁴/mL 的单细胞悬液接种于 96 孔板中, 每孔吸取 100 μl 单细胞悬液, 即每孔中接种 5 × 10³ 个细胞, 放置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 贴壁后, 弃去原培养液, 分别加入含有不同浓度 680 μmol/L、1360 μmol/L、2720 μmol/L 的 NaF 配置成的完全培养基 100 μl, 并设置空白对照组, 每个浓度设 3 个复孔。培养 24 h 后, 各孔加入 10 μl 混合好的 CCK-8 试剂(CCK-8 试剂: DMEM = 1:10)置于 37°C, 5% CO₂ 培养箱中避光培养 45 min, 放置于全自动酶标仪上, 于 450 nm 波长处测定吸光度(A)值, 实验重复 3 次, 计算细胞毒性活力。细胞毒性活力(%) = (染毒组 A 值 - 空白组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白组 A 值) × 100%。

2.2.5. qRT-PCR 法检测 mRNA 的表达情况

收集染毒 24 h 的细胞, 采用全式金柱提法提取细胞总 RNA, 用酶标仪测定 RNA 的纯度, 确保 A260/A280 在 1.8~2.0 之间, 以保证 RNA 的质量; 逆转录试剂盒将 RNA 逆转为 cDNA, 进行 qRT-PCR 检测。结果按照 2^{-ΔΔCt} 计算基因相对表达水平, 以 GAPDH 为内参基因, 引物由北京六合华大基因科技有限公司合成, 引物序列详见表 1。

Table 1. Real-time primer sequences

表 1. 实时荧光定量引物序列

基因	上游	下游
Dvl-1	GAGGGTGCTCACTCGGATG	GTGCCTGTCTCGTTGTCCA
β-catenin	CCTATGCAGGGGTGGTCAAC	CGACCTGGAAAACGCCATCA

续表

c-myc	GGATTCTCTGCTCTCCTC	CTTGTTCCCTCCTCAGATC
CyclinD1	GTGAAGGCGCTATTTGGCG	TGGTTGCTCATAATCACTGCC
GAPDH	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT	GGCTGTTGTCATACTTCTCATCG

2.3. 统计学分析

所有实验重复 3 次以上, 结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 Graphpad primer 9.5.1 软件进行统计分析并作图, 两组之间的比较用 t 检验; 多组间比较采用方差齐性检验(normality and lognormality test)和单因素方差分析(One-Way ANOVA), 进一步进行组间两两比较, 若方差齐时, 采用一般的方差分析; 若方差不齐时, 需校正, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

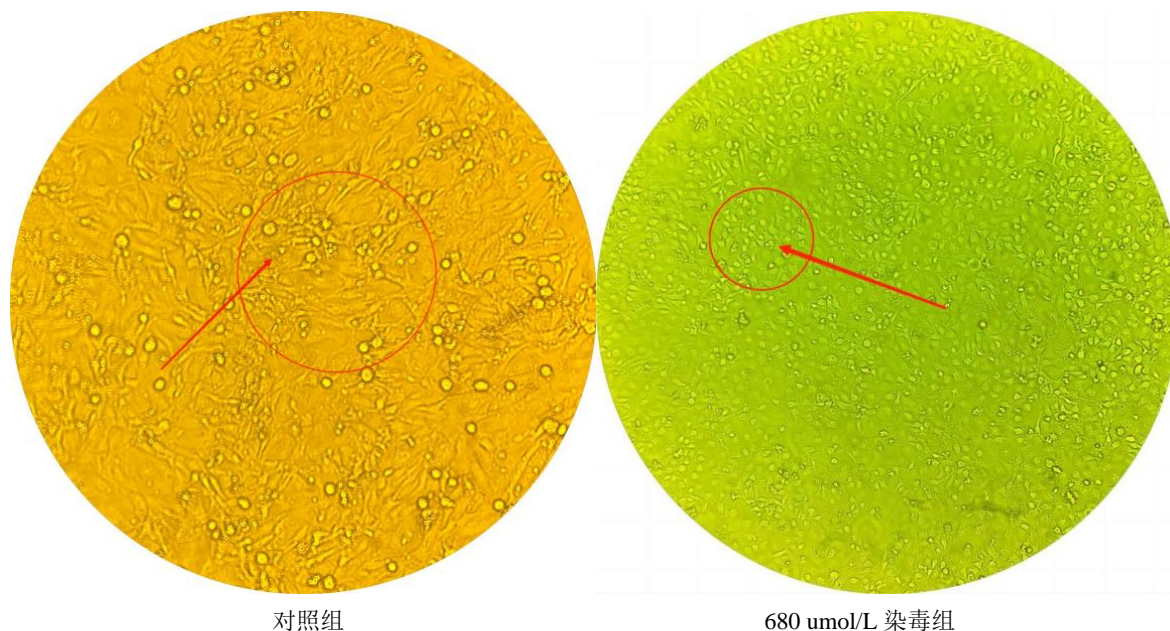
2.4. 质量控制

实验时购买的试剂确保为品质优良的试剂; 实验前确保 AC16 人心肌细胞均处于对数生长期, 有良好的细胞活性; 细胞培养过程中, 保持实验室干净、整洁; 超净工作台正常运行, 避免细胞污染; 实验过程中严格按照试剂盒说明书及实验室操作规范进行操作, 将随机误差降低; 每个实验至少做 3 个平行样品, 每个实验均重复做 3 次。

3. 结果

3.1. AC16 细胞形态及凋亡情况

NaF 染毒处理 AC16 人心肌细胞 24 h 后, 对照组人心肌细胞形态整呈长梭形, 具有完整细胞膜和细胞质, 生长状况良好且生长密度高; 680 $\mu\text{mol/L}$ NaF 染毒组在镜下可见大量呈圆形, 细胞质固缩的死亡细胞, 其中活细胞的形态也逐渐由梭形变成不规则形, 且细胞体积变小; 1360 $\mu\text{mol/L}$ NaF 组、2720 $\mu\text{mol/L}$ NaF 组亦出现相同情况, 2720 $\mu\text{mol/L}$ NaF 组细胞体积较 680 $\mu\text{mol/L}$ NaF 组细胞体积更小, 生长密度减少, 显微镜下出现少部分死细胞, 见图 1。



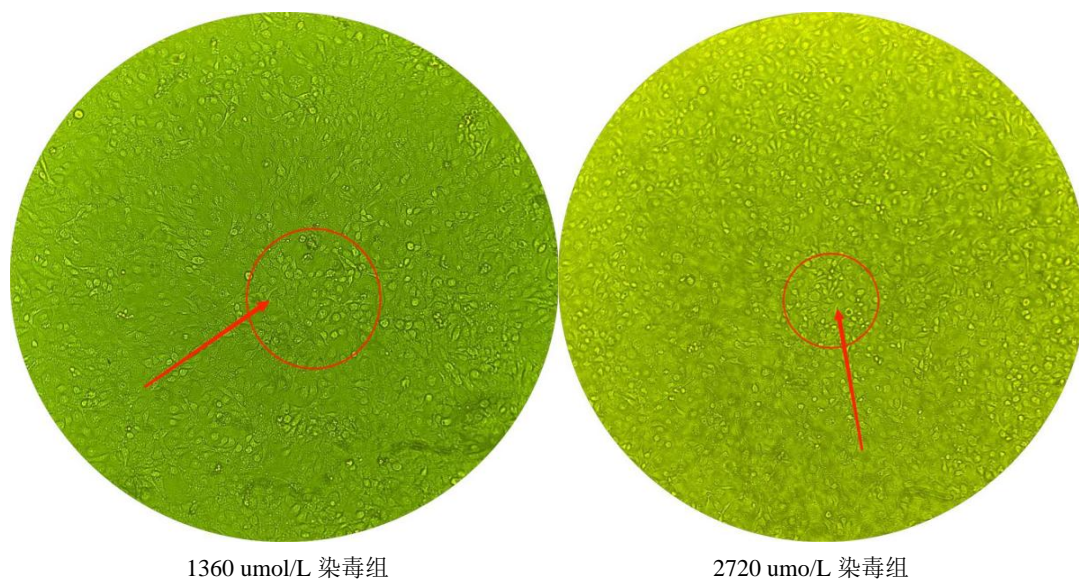
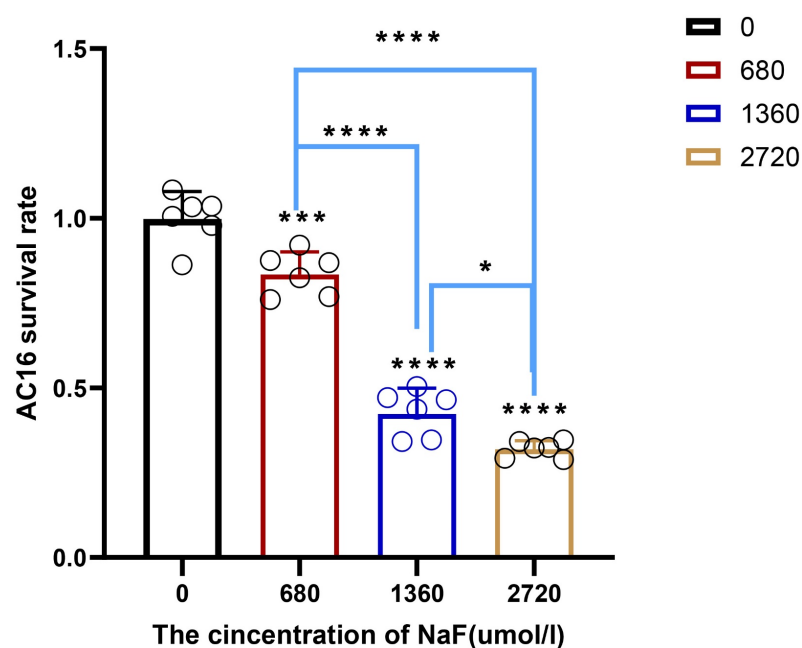


Figure 1. Cell morphology in different NaF groups
图 1. 不同 NaF 组细胞形态

3.2. CCK-8 检测结果

不同浓度 NaF 染毒 AC16 细胞 24 小时后, 对照组存活率分别为(100 ± 0.08)%, 氟染毒组细胞存活率较对照组逐渐降低, 680 umol/LNaF 组存活率为(83.66 ± 0.06)%、1360 umol/LNaF 组存活率(42.75 ± 0.07)%、2720 umol/L NaF 组存活率(31.75 ± 0.02)%, 经单因素的方差分析, 得出(F = 168.97, P < 0.001)差异有显著性, 见表 2。经 Graphpad Prism 9.5.1 分析后, 细胞存活率变化见图 2。



注: *: P < 0.05, **: P < 0.001; ****: P < 0.0001。

Figure 2. Effect of different concentrations of NaF on cell viability ($\bar{x} \pm s$, n = 4)

图 2. 不同浓度 NaF 对细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, n = 4)

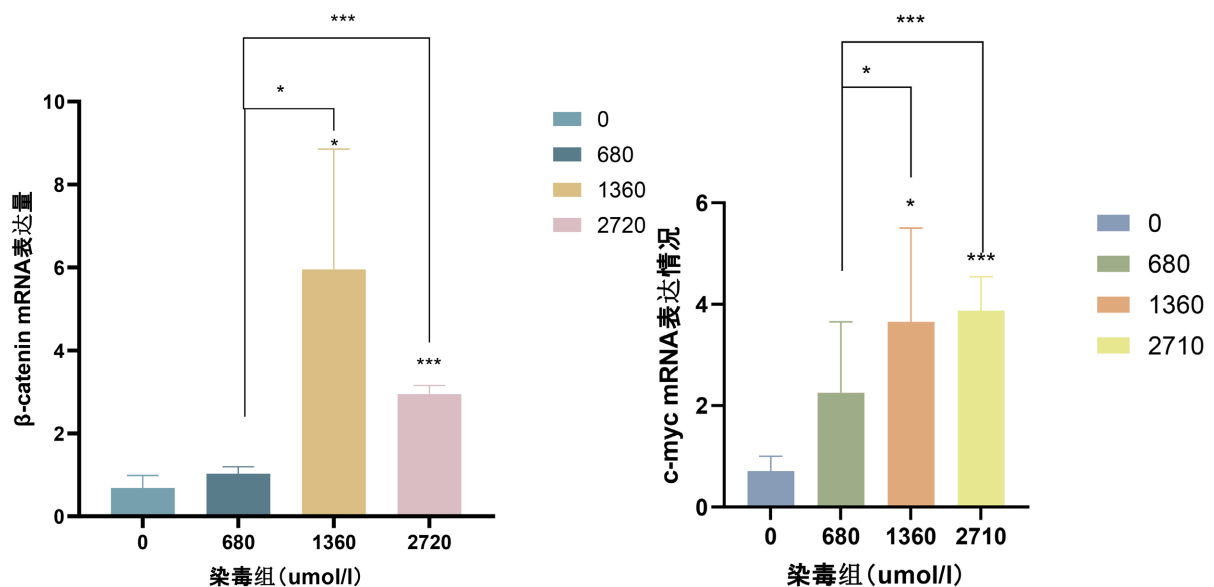
Table 2. Effect of different concentrations on the viability of AC16 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)
表 2. 不同浓度对 AC16 细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

NaF 浓度(umol/L)	细胞存活率(%)
0	100 ± 0.08
680	83.66 ± 0.06 ^a
1360	42.75 ± 0.07 ^{ab}
2720	31.75 ± 0.02 ^{abc}
F 值	168.97
P 值	<0.001

注: ^a与对照组相比, $P < 0.05$; ^b与 680 umol/LNaF 组相比, $P < 0.05$; ^c与 1360 umol/LNaF 组相比, $P < 0.05$ 。

3.3. NaF 染毒后 β -Catenin, c-myc, CyclinD1, Dvl-1 mRNA 表达情况

NaF 染毒 AC16 细胞 24 h 后, 染毒组与对照组相比 β -catenin、c-myc、CyclinD1、Dvl-1 mRNA 表达水平增加, 对照组、680 umol/LNaF 组、1360 umol/LNaF 组、2720 umol/LNaF 组中 β -catenin 表达量分别为(1.00 ± 0.73 , 1.02 ± 0.23 , 5.48 ± 0.72 , 2.94 ± 0.10)、c-myc (1.00 ± 0.78 , 1.96 ± 0.94 , 3.34 ± 0.75 , 3.83 ± 0.25)、CyclinD1 (1.00 ± 0.95 , 0.98 ± 0.24 , 12.36 ± 0.97 , 1.05 ± 0.13)以及 Dvl-1 (1.00 ± 0.64 , 1.51 ± 0.24 , 37.54 ± 0.33 , 18.96 ± 0.26); 经单因素方差分析可得, β -catenin ($F = 8.16$, $P = 0.008$); c-myc ($F = 4.34$, $P = 0.043$); CyclinD1 ($F = 6.48$, $P = 0.016$); Dvl-1 ($F = 41.90$, $P < 0.001$)经 t 检验显示, 与对照组相比, β -catenin 低剂量组为($t = 1.74$, $P > 0.05$)、 β -catenin 中剂量组为($t = 3.13$, $P < 0.05$)、 β -catenin 高剂量组为($t = 10.64$, $P < 0.05$); c-myc 低剂量组为($t = 1.87$, $P > 0.05$)、c-myc 中剂量组为($t = 3.13$, $P < 0.05$)、c-myc 高剂量组为($t = 10.64$, $P < 0.05$); CyclinD1 低剂量组为($t = 1.02$, $P > 0.05$)、CyclinD1 中剂量组为($t = 3.13$, $P < 0.05$)、CyclinD1 高剂量组为($t = 10.64$, $P < 0.05$); Dvl-1 低剂量组为($t = 3.71$, $P < 0.05$)、Dvl-1 中剂量组为($t = 3.13$, $P < 0.05$)、Dvl-1 高剂量组为($t = 10.64$, $P < 0.05$)。随 NaF 浓度的增加, 细胞中 β -catenin、cyclinD1、Dvl-1、c-myc mRNA 呈现先升后降的趋势, 2720 umol/LNaF 组中反而呈现降低趋势, 见表 3。经 Graphpad Prism 9.5.1 分析后, β -catenin、CyclinD1、Dvl-1、c-myc mRNA 表达变化见图 3。



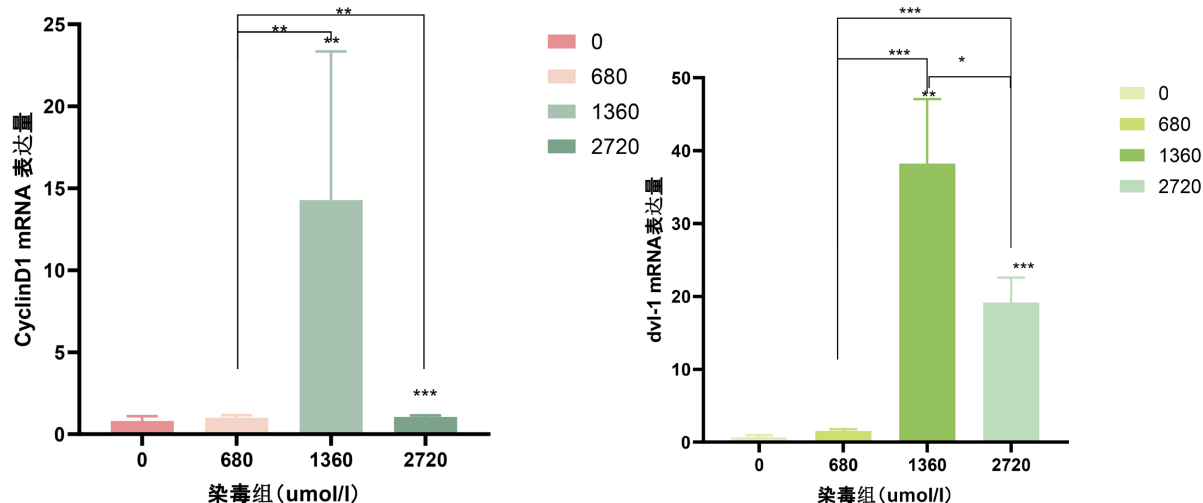


Figure 3. Effects of different concentrations of NaF on the mRNA expression of β -catenin, c-myc, CyclinD1 and Dvl-1 in cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

图 3. 不同浓度 NaF 对细胞中 β -catenin、c-myc、CyclinD1、Dvl-1 mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3. mRNA expression of β -catenin, c-myc, CyclinD1 and Dvl-1 in AC16 cells after NaF contamination ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

表 3. NaF 染毒后 AC16 细胞中 β -catenin、c-myc、CyclinD1、Dvl-1 mRNA 表达情况($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

NaF 浓度(umol/L)	β -catenin	c-myc	cyclinD1	Dvl-1
0	1.00 \pm 0.733	1.00 \pm 0.776	1.00 \pm 0.949	1.00 \pm 0.636
680	1.02 \pm 0.23	1.96 \pm 0.94	0.98 \pm 0.24	1.51 \pm 0.24 ^a
1360	5.48 \pm 0.72 ^{ab}	3.34 \pm 0.75 ^{ab}	12.36 \pm 0.966 ^{ab}	37.54 \pm 0.33 ^{ab}
2720	2.94 \pm 0.10 ^{ab}	3.83 \pm 0.25 ^{ab}	1.05 \pm 0.13 ^{ab}	18.96 \pm 0.26 ^{abc}
F 值	8.16	4.34	6.48	41.90
P 值	0.008	0.043	0.016	<0.001

注: ^a与对照组相比, $P < 0.05$; ^b与 680 umol/LNaF 组相比, $P < 0.05$; ^c与 1360 umol/LNaF 组相比, $P < 0.05$ 。

4. 讨论

研究发现, 氟对心肌系统损伤有较为严重的影响[13]。氟可干扰三羧酸循环的正常运行, 而人体中心肌消耗能量大, 而 ATP 储存少, 从而导致心脏收缩功能减弱。吴起清[14]的研究表明, 氟中毒大鼠的 Q-T 间期明显缩短, 大鼠心电图异常。姜海英[15]等人发现氟中毒会导致大鼠心肌组织产生明显的病变, 正常的心肌组织中, 心肌纤维排列整齐; 在轻微氟中毒的心肌组织中, 心肌组织间隙的宽度稍有增加, 并且伴随轻度的血管扩张; 中度氟中毒的心肌组织中, 心肌组织间隙的宽度则明显增加, 肌肉排列开始出现异常, 组织间隙血管扩张明显; 严重氟中毒的心肌组织中, 心肌组织的间隙宽度显著增加, 甚至一些心肌纤维会出现溶解、凝固的现象。通过对日本某地区村庄中居民心电图的研究发现, 当氟化物的水平介于 0.5~6.2 mg/L 之间时会导致心肌损伤加重, 并且其与牙釉质的斑驳缺损之间存在直接关系[16]。

活性氧增加可以导致心脏疾病的风险增加[17] [18]。细胞层面研究显示, 氟化物可以诱导大鼠 H9C2 细胞活性氧产生增多。并可能激活 JNK 信号通路诱导心肌细胞损伤, 对心肌组织产生严重损害[19]。谢佳鑫[20]等人通过基因转录和蛋白组学分析表明, 长期氟暴露诱导心肌收缩信号通路相关基因差异性表达, 参与发生心脏疾病的通路中的 Acta2 和 Tnni3 以及调节细胞内外离子平衡的 RyR2 和 ATP1a1 等蛋白可能是氟致心肌收缩障碍的关键蛋白。长期氟化物暴露后, 心肌中的 IL-17、MMP-9 和 Caspase-3 显著升

高, 氟化物似乎诱发了心脏组织的炎症, 以及组织钙的增加, 慢性氟化物暴露后, 心肌纤维受到严重损害, 包括变薄、变形和新血管生成[21]。高剂量的氟化物会扰乱与 caspase-8 介导的细胞凋亡有关的心肌纤维的排列[22]。流行病学调查发现, 氟化物流行地区普通人群血压升高的风险增加[23]。本研究表明, NaF 侵染人心肌细胞 24 h, 人心肌细胞由梭形变成不规则形, 且细胞体积变小, 少量细胞出现死亡。说明 NaF 对细胞产生毒性, 导致了心肌细胞的死亡。

Wnt/ β -catenin 信号通路是一条经典的 Wnt 信号通路, 是细胞传导中的关键途径之一, 参与调控体内多种细胞的增殖、分化、极化、迁移及凋亡的过程[24]。Wnt 信号通路在心脏损伤中亦发挥着重要的作用, SHEN 等[25]则证实, Wnt3a 预处理可减少老年小鼠急性心梗模型中梗死面积、增强其心功能, 增加老年缺血缺氧模型心肌细胞活力; β -catenin 的激活参与压力超负荷介导的心脏肥大和纤维化, WANG 等[26]研究发现, LRP6 (低密度脂蛋白受体相关蛋白 6)过表达显著抑制了 β -catenin 的活化, 上调组织蛋白酶 D 促进 Wnt5a 和 Wnt11 的降解, 改善心脏纤维化, 防止压力负荷下心脏不良重塑。人心肌细胞(AC16)是研究心肌发育良好的细胞模型, 本研究表明, NaF 侵染 AC16 后, Wnt/ β -catenin 信号通路中 β -catenin、CyclinD1、Dvl-1、c-myc 等关键分子 mRNA 随 NaF 浓度的升高呈现出先升后降的趋势, Wnt/ β -catenin 被激活后, 低、中浓度氟可能通过该通路诱导心肌细胞的损伤, 而高浓度氟则可能由于该通路的过度激活而受到抑制。这与何欢[27]等人在 NaF 对成骨细胞 MC3T3-E1 的分化及 Wnt 信号转导通路的影响的研究中, 亦出现高剂量 NaF 下调 β -catenin、Lrp5 蛋白表达水平, 进而抑制 Wnt 通路信号转导通路, 影响细胞分化的结论相似; 也与陈锡山[28]在 Wnt 经典信号通路在慢性氟中毒大鼠骨骼损伤中作用机制的研究中发现, 高氟组 Wnt3a 蛋白质和 β -catenin 蛋白表达高于低氟组表达, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 抑制了 Wnt 经典信号通路研究结果相似。因此, 基于本研究的结果, 下一步将考虑高浓度氟是如何对该通路的过度激活而受到抑制成为研究重点。

作者贡献声明

朱世玲: 实施研究, 撰写论文; 张强: 论文修改与指导、经费支持; 杨瑞、赵亚倩: 资料整理, 开题指导; 沈洪婷: 实验指导, 数据分析。

基金项目

第二次青藏高原综合科学考察研究阶段性成果, 项目编号: 2019QZKK0607。

参考文献

- [1] 赵亚倩. 氟骨症患者 SDF-1/CXCR4 下游信号分子及炎症因子的筛选鉴定[D]: [硕士学位论文]. 西宁: 青海大学, 2023.
- [2] 孙琴. 氟保护剂对小儿龋齿的预防保健效果观察[J]. 全科口腔医学电子杂志, 2018, 5(22): 22-26.
- [3] 刘晓宇. Wnt 对 Connexin43 表达及其功能的影响[D]: [博士学位论文]. 上海: 复旦大学, 2007.
- [4] 王启明. Wnt/ β -catenin 信号通路在胚胎发育和肿瘤发生中的作用及其机制的初步研究[D]: [博士学位论文]. 成都: 四川大学, 2006.
- [5] 庄立岩. Wnt-Frizzled 信号传导通路在肾细胞中表达和调节的研究[D]: [博士学位论文]. 北京: 北京大学, 1999.
- [6] 王超华. Wnt/ β -catenin 信号通路与骨关节炎发病机制的实验研究[D]: [硕士学位论文]. 天津: 天津医科大学, 2011.
- [7] 王焕. 重组人肠三叶因子对肠上皮细胞增殖移行能力的影响及其机制研究[D]: [硕士学位论文]. 蚌埠: 蚌埠医学院, 2013.
- [8] 凌锐. Wnt/Lin28 信号通过下调 microRNA-let-7a 表达促进食管鳞癌转移发生的机制研究[D]: [硕士学位论文]. 镇江: 江苏大学, 2019.

- [9] Zhao, H., Ming, T., Tang, S., Ren, S., Yang, H., Liu, M., et al. (2022) Wnt Signaling in Colorectal Cancer: Pathogenic Role and Therapeutic Target. *Molecular Cancer*, **21**, Article No. 144. <https://doi.org/10.1186/s12943-022-01616-7>
- [10] 刘笑蓉, 刘湘丹, 王智, 等. 闹羊花毒素III通过调控 Wnt1/Dvl1/ β -catenin 通路影响成纤维样滑膜细胞增殖凋亡的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2022, 42(10): 1199-1206.
- [11] 骆言, 刘洪, 黎颖, 等. 肾衰灵方作用于 SHH 信号通路对 UUO 大鼠肾间质纤维化的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2020, 22(8): 3016-3022.
- [12] Pecoraro, C., Faggion, B., Balboni, B., Carbone, D., Peters, G.J., Diana, P., et al. (2021) Gsk3 β as a Novel Promising Target to Overcome Chemoresistance in Pancreatic Cancer. *Drug Resistance Updates*, **58**, Article 100779. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2021.100779>
- [13] 王源泉, 朱明恕, 张兴正, 等. 地方性氟中毒轻、重病区人群心缩间期的对比研究[J]. 中国地方病学杂志, 1988(1): 6-8.
- [14] 吴起清. 氟对大鼠心肌细胞的毒性作用及机制研究[D]: [硕士学位论文]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2011.
- [15] 徐薇, 马宝慧. 氟中毒对心肌组织的影响及相关信号通路变化[J]. 环境与职业医学, 2019, 36(5): 506-510.
- [16] 谢佳鑫. 基于转录和蛋白组学联合分析心功能相关通路在氟暴露诱导的心肌损伤中的调控作用[D]: [硕士学位论文]. 太原: 山西医科大学, 2021.
- [17] 邱敏. 压力超负荷心肌肥大大大鼠心肌细胞凋亡、ROS 及 ASK1 表达实验研究[D]: [硕士学位论文]. 重庆: 重庆医科大学, 2006.
- [18] 马佩荣. 沙棘抗氧化活性成分研究及其药渣利用[D]: [硕士学位论文]. 呼和浩特: 内蒙古大学, 2023.
- [19] 羨海英, 马千里, 王金星, 等. 慢性氟中毒对大鼠心脏组织功能及形态学的影响研究[J]. 中国地方病防治杂志, 2017, 32(6): 624-625.
- [20] Okushi, I. (1954) Changes of the Heart Muscle Due to Chronic Fluorosis Part I. Electrocardiogram and Cardiac X-Rays in Inhabitants of High Fluoride Zone. *Shikoku Acta Medica*, **5**, 55-61.
- [21] Davoudi, M., Barjasteh-Askari, F., Sarmadi, M., Ghorbani, M., Yaseri, M., Bazrafshan, E., et al. (2021) Relationship of Fluoride in Drinking Water with Blood Pressure and Essential Hypertension Prevalence: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, **94**, 1137-1146. <https://doi.org/10.1007/s00420-021-01714-x>
- [22] Wang, S., Ning, H., Hua, L., Ren, F., Chen, L., Ma, Z., et al. (2023) Exposure to Fluoride Induces Apoptosis in the Liver, Kidney, and Heart of *Xenopus Laevis* by Regulating the Caspase-8/3 Signaling Pathway. *Acta Histochemica*, **125**, Article 151999. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2023.151999>
- [23] Quadri, J.A., Sarwar, S., Pinky, Kar, P., Singh, S., Mallick, S.R., et al. (2018) Fluoride Induced Tissue Hypercalcemia, IL-17 Mediated Inflammation and Apoptosis Lead to Cardiomyopathy: Ultrastructural and Biochemical Findings. *Toxicology*, **406**, 44-57. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.05.012>
- [24] Liu, M., Liu, S.-W., Wang, L.-J., et al. (2019) Burden of Diabetes, Hyperglycaemia in China from 1990 to 2016: Findings from the 1990 to 2016, Global Burden of Disease Study. *Diabetes & Metabolism*, **45**, 286-293. <https://doi.org/10.1016/j.diabet.2018.08.008>
- [25] Sun, S., Wu, Y., Maimaitijiang, A., Huang, Q. and Chen, Q. (2022) Ferroptotic Cardiomyocyte-Derived Exosomes Promote Cardiac Macrophage M1 Polarization during Myocardial Infarction. *Peer Journal*, **10**, e13717. <https://doi.org/10.7717/peerj.13717>
- [26] Wang, X., Zou, Y., Chen, Z., Li, Y., Pan, L., Wang, Y., et al. (2021) Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein 6 Regulates Cardiomyocyte-Derived Paracrine Signaling to Ameliorate Cardiac Fibrosis. *Theranostics*, **11**, 1249-1268. <https://doi.org/10.7150/thno.48787>
- [27] 何欢, 平静, 姜晨辉. 氟化钠对成骨细胞 MC3T3-E1 分化及 Wnt 信号转导通路的影响[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(4): 355-357.
- [28] 陈锡山. Wnt 经典信号通路在慢性氟中毒大鼠骨骼损伤中作用机制的研究[D]: [硕士学位论文]. 贵阳: 贵阳医学院, 2012.