

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2017.09.008

## 氟对人成骨细胞和小鼠骨组织 caspase14 表达影响\*

李 甜 郭 琼 廖礼彬 李 艳 张亚楼<sup>△</sup>

(新疆医科大学基础医学院组织胚胎学教研室 新疆 乌鲁木齐 830011)

**摘要** 目的:初步探讨氟对人成骨细胞 saos-2 和小鼠骨组织中 caspase14 表达的影响。方法:体外建立人成骨细胞染氟模型,以不加入氟入培养基者为空白对照,实验组培养基内分别含氟化钠 5、10、20、40 mg/L。以氟化钠加入饮水中,建立小鼠染氟模型。应用 Western blot 法检测不同剂量氟(0、5、10、20、40 mg/L)对成骨细胞 saos-2 中 caspase14 的表达,再用免疫组织化学检测不同染氟剂量(0、50、100、150 mg/L)染氟小鼠骨骼上 caspase14 的表达情况。结果:Caspase14 在成骨细胞 saos-2 中各实验组表达明显上调(均  $P < 0.01$ ),5 mg/L 组表达最高。染氟小鼠模型骨组织中亦有表达,染氟组表达均高于对照组(均  $P < 0.05$ ),且有逐渐增高趋势。结论:Caspase14 在染氟成骨细胞和骨组织中的高表达参与了氟诱导细胞凋亡的过程。

**关键词:** 氟;成骨细胞 saos-2;骨组织

**中图分类号:** Q95-3;R114;R68 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2017)09-1631-04

## Effect of Fluoride on the Expression of Caspase14 in Human Osteoblasts and Bone Tissue in Mice\*

LI Tian, GUO Qiong, LIAO Li-bin, LI Yan, ZHANG Ya-lou<sup>△</sup>

(Department of Histology and Embryology, Preclinical college, XinJiang Medical University, Urumqi, Xinjiang, 830011, China)

**ABSTRACT Objective:** To study the effect of fluoride on the expression of caspase14 in human osteoblasts Saos-2 cells and bone tissues in mice. **Methods:** The model was established using human osteoblasts exposed to fluoride in vitro, by adding fluorine into the culture medium as blank control, and the culture medium of the experimental group contained sodium fluoride respectively 5, 10, 20 and 40 mg/L. By adding sodium fluoride into drinking water, the fluoride model of mice was established. Using Western blot method, the effect of different doses of fluoride (0, 5, 10, 20, 40 mg/L) on the expression of caspase14 in human osteoblasts Saos-2 cells was detected. Then the immunohistochemistry was used to detect the effect of different doses of fluoride (0, 50, 100 and 150 mg/L) on the caspase14 expression in mouse skeletal tissues. **Results:** The expression of caspase14 in the experimental group of Saos-2 cells was up-regulated(all  $P < 0.01$ ), and it was highest in the 5 mg/L group. Caspase14 were also expressed in bone tissues of fluorosis-treated mice model, and the expression of caspase14 in fluoride group of different dose was higher than that of control group with a gradual increase trend (all  $P < 0.05$ ). **Conclusions:** The high expression of caspase14 in osteoblasts and bone tissues is involved in the process of apoptosis induced by fluoride.

**Key words:** Fluoride; Osteoblasts Saos-2 cells; Bone tissues

**Chinese Library Classification(CLC):** Q95-3; R114; R68 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2017)09-1631-04

### 前言

Caspase-14 是 caspase 家族成员之一,是一种较新发现的蛋白<sup>[1,2]</sup>。近年来发现 Caspase-14 在多种组织器官中有表达,并且与疾病的发生有一定关系<sup>[3,4]</sup>。慢性氟中毒是一种地方病,它的基本病症是氟斑牙和氟骨症<sup>[5]</sup>。慢性氟中毒中存在成骨细胞的凋亡。目前还没有关于 caspase14 在慢性氟中毒表达及其意义的报道。前期研究发现 Caspase-14 在染氟成骨细胞表达增高<sup>[6]</sup>,本研究通过应用 Western blot 法检测不同剂量氟对成骨细胞 saos-2 中 caspase14 的表达情况,再用免疫组织化学检测不同

剂量氟中毒小鼠骨骼上的免疫组织化学染色结果。我们希望能够从细胞和动物体内模型两个层面进行蛋白水平的验证,探讨 caspase14 在成骨细胞凋亡中所起的作用。

### 1 材料与方法

#### 1.1 细胞来源

人成骨细胞株(Saos-2)购于上海中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,采用 DMEM 培养基(含 100 mL/L 小牛血清,2 mol/L 谷氨酰胺),在 37 °C、5 % CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养。每 3 天传代一次,取对数生长期用于染氟实验。

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81460481);新疆维吾尔自治区医学联合基金项目(2014211C018)

作者简介:李甜(1981-),博士研究生,副教授,研究方向:氟骨病与骨组织工程,E-mail:292629092@qq.com

△ 通讯作者:张亚楼,电话:0991-4362395,E-mail:49669129@qq.com

(收稿日期:2016-08-18 接受日期:2016-09-10)

## 1.2 主要试剂和仪器

氟化钠 (NaF, 上海生工生物工程技术有限公司) DMEM 培养基(life 公司)、 $\beta$ -actin、caspase14 抗体(santa cruse 公司)、DAB 显色试剂盒(武汉博士德)。

## 1.3 细胞培养

将成骨细胞置于 DMEM 培养基中,在 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度培养箱中培养。每 3 天传代 1 次。实验时,将对数生长期的成骨细胞置于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液中。细胞浓度为  $2 \times 10^5/L$ 。按每孔 1  $\mu L$  接种于 6 孔板中,于 37℃、体积分数 5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度条件下培养 24 h。按染氟剂量将成骨细胞分为 0 (对照组)、5.0、10.0、20.0、40.0 mg/L 组,每组 3 份平行样。染氟时,培养 24 h 后收集细胞。

## 1.4 Western blot 法检测 caspase-14 表达

体外培养的成骨细胞,收集体外培养的细胞( $1 \times 10^6$  个),RIPA 缓冲液裂解后得到全细胞蛋白,加入缓冲液后,煮沸 5 min。SDS-PAGE 后,湿转法将蛋白质转移至 PVDF 膜上;50 g/L 脱脂奶粉封闭,加入 caspase-14 抗体(0.4  $\mu g/mL$ ),4℃过夜。PBS 缓冲液洗去未结合的抗体,加入 HRP 标记兔抗山羊抗体(0.05  $\mu g/mL$ )室温摇床孵育 1 h 后,采用化学发光检测试剂盒显色,GE 图像分析系统成像。 $\beta$ -actin 为内参照进行半定量分析,以 caspase-14 和  $\beta$ -actin 灰度的比值作为 caspase-14 相对表达量。

## 1.5 动物分组

近交系 C57 雄性小鼠 40 只,小鼠适应性喂养 1 周后随机分为对照组、50 mg/L、100 mg/L、150 mg/L 四组,每组各 10 只。分别以剪毛的方式标记。各组均给予普通饲料。慢性氟中毒模型的建立:50 mg/L、100 mg/L、150 mg/L 组分别按相应的剂量饮用氟化钠蒸馏水,对照组饮用超纯水。氟斑牙出现,慢性氟中毒模型的建立成功。

## 1.6 免疫组织化学检测

近交系 C57 雄性各组小鼠股骨用 4%PFA (多聚甲醛)固定一天后用 10%EDTA 脱钙一个月,后常规石蜡包埋切片。常规脱水、透明、浸蜡、包埋。切片机将骨组织切成 5  $\mu m$  厚的连续切片,常规烤片、脱蜡至水,按 S-P (链霉菌抗生素蛋白过氧化酶)法进行检测 caspase-14 在骨组织的表达。步骤:(1)4%多聚甲醛固定标本 24 h,脱水,石蜡包埋,4  $\mu m$  连续切片,梯度乙醇脱蜡至水。(2)10 mmol/L 柠檬酸缓冲液(pH 6.0)微波修复抗原 5 min,室温冷却,PBS 漂洗。(3)滴加 1% BSA,室温封闭 2 h,弃封闭液,滴加兔抗鼠单克隆 CASP14(1:100)抗体,另用正常兔 IgG 代替一抗作为阴性对照。用 5%BSA 稀释 2 000 倍,4℃冰箱过夜,或者 37℃气浴箱孵育 2 h;(4)PBS 冲洗 3 min $\times$  3 次;(5)滴加兔生物素二抗工作液(IgG/Bio),室温孵育 15 min;(6)PBS 冲洗 3 min $\times$  3 次;(7)滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液(S-A/HRP)室温孵育 15 min;(8)PBS 冲洗 3 min $\times$  3 次;(9)DAB 显色,在显微镜下观察有棕黄色物质出现时即可停止显色,自来水冲洗 3 min,蒸馏水冲洗 1 min;(10)苏木素复染,脱水、透明、封片;(11)光镜下观察棕黄色颗粒为阳性结果。

## 1.7 统计学分析

实验结果数据采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分析,统计描述采用  $\bar{x} \pm s$  表示,统计推断采用方差分析,检验水准  $P=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 caspase14 在成骨细胞 saos-2 和 4 种不同染氟剂量的成骨细胞 saos-2 的表达

正常的人骨肉瘤 saos-2 细胞中 caspase14 有低表达。在染氟剂量组 (5、10、20、40 mg/L) 较正常组骨肉瘤 saos-2 细胞内 caspase14 表达均有明显增高 (均  $P<0.01$ )。染氟剂量组 5 mg/L caspase14 表达较染氟剂量组 (10、20、40 mg/L) 表达最强。管家基因  $\beta$ -actin 在各实验组中的表达基本一致,没有明显变化。见图 1、2。

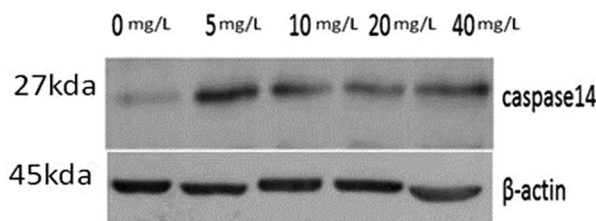


图 1 不同染氟剂量处理的成骨细胞 saos-2 中 caspase-14 的表达

Fig.1 The expression of Caspase-14 in osteoblast saos-2 cells treated with fluorine

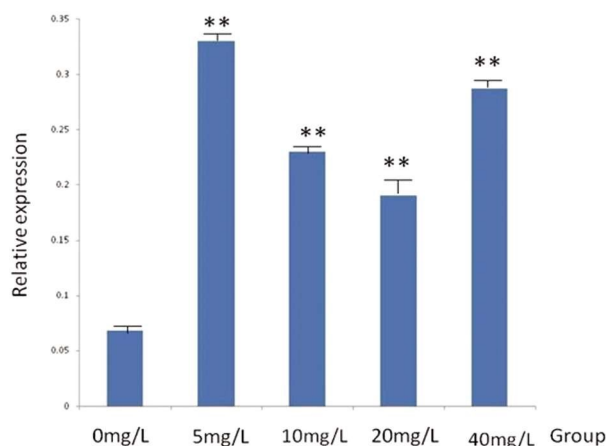


图 2 不同染氟剂量处理的成骨细胞 saos-2 中 caspase-14 的相对表达量

Fig.2 The relative expression of Caspase-14 in osteoblast saos-2 cells treated with fluorine

Note: \*\* $P<0.01$ , compared with control group (0 mg/L).

### 2.2 Caspase14 在不同染氟剂量小鼠模型骨组织中的表达

免疫组织化学显示,Caspase14 在对照组骨组织中的表达呈阴性。见图 3A。在实验组小鼠模型染氟剂量 50 mg/L 组骨组织中,caspase-14 主要表达于骨细胞细胞质中,个别骨细胞的细胞质中分布少量棕黄色的颗粒。见图 3B。在实验组小鼠模型染氟剂量 100 mg/L 组骨组织中 caspase-14 主要表达于细胞质中,部分软骨细胞细胞质中分布棕黄色的颗粒。见图 3C。在实验组小鼠模型染氟剂量 150 mg/L 组骨组织中,免疫组织化学显示 caspase-14 主要表达于细胞质中,部分软骨细胞细胞质中分布棕黄色的颗粒,颗粒染色深。见图 3D。

## 3 讨论

Caspase 是半胱氨酸天门冬氨酸蛋白酶,都具有特异性天冬氨酸酶切位点,又称作 Caspase 蛋白酶家族<sup>[7]</sup>。研究认为Cas-

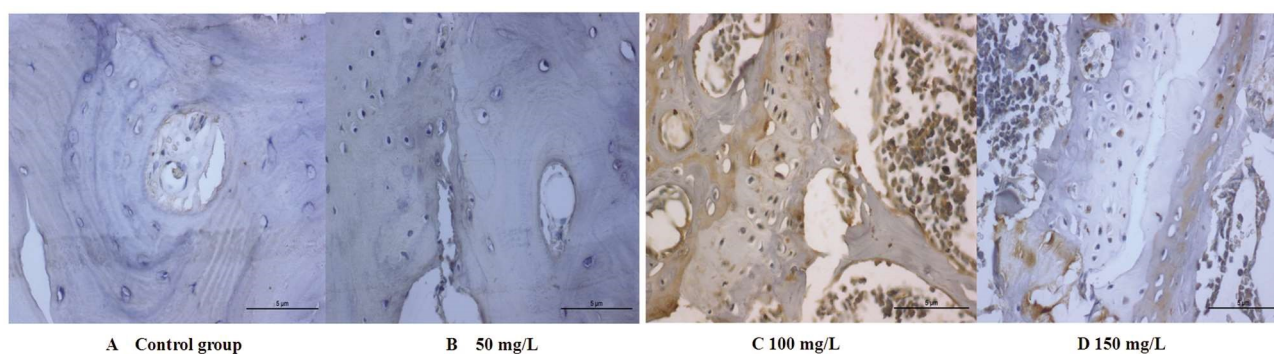


图3 caspase14在染氟小鼠模型骨组织中的表达(400×)

Fig. 3 The expression of caspase14 in bone tissues of fluorine-treated mouse model (400×)

Note: A: Control group; B: 50mg/L; C: 100 mg/L; D:150 mg/L.

pase 家族蛋白主要与炎症、细胞凋亡有关,还与细胞增殖和分化有关<sup>[8]</sup>。目前,已经发现至少有 14 种 Caspase。Caspase-14 是 Caspase 家族的一员,是较新发现的一种蛋白。Caspase-14 与 Caspase 家族其它成员相比,具有它独特的特点。它只存在于哺乳动物<sup>[9]</sup>。Caspase-14 分布极具皮肤特异性,主要分布在表皮的角质层和颗粒层,毛囊、皮脂腺<sup>[10,11]</sup>。在皮肤外的组织,Caspase-14 可见于大脑脉络丛,人胎盘组织的滋养层<sup>[12]</sup>。Caspase-14 除了具有分布特异性外,它过度表达时不能自我分解为大亚基和小亚基,而且过度表达时不引起细胞凋亡。目前,人们已经发现,caspase-14 功能不同于其它典型的半胱氨酸酶家族成员<sup>[14]</sup>。研究认为,Caspase-14 是参与皮肤屏障的重要因子,主要功能是参与表皮细胞的分化及皮肤屏障的形成<sup>[13,14]</sup>。近年学者研究发现,Caspase-14 在肿瘤组织中有表达,在单层上皮细胞来源的肿瘤(胃、乳腺、膀胱和前列腺等)中可有广泛表达<sup>[15-18]</sup>。Caspase-14 还能够抑制神经胶质细胞乙酰化和胎盘细胞分化<sup>[19]</sup>,对糖尿病病人的视网膜上皮细胞具有一定的影响<sup>[4]</sup>。

前期研究发现,在氟化钠作用剂量(5、10、20、40 mg/L)时,成骨细胞的凋亡率是逐渐增高的<sup>[6]</sup>,本研究中 Caspase-14 在成骨细胞 saos-2 中的各实验组表达明显上调,这提示 Caspase-14 可能参与了染氟成骨细胞的凋亡过程。而 Caspase-14 在染氟成骨细胞凋亡中的作用机制目前尚不清楚,可能与以下两方面有关:① Caspase-14 与表皮细胞终末分化,即细胞程序性死亡有关,Caspase-14 表达增加,促进细胞凋亡,可导致骨质疏松发生;② Caspase-14 受其它基因的调控,被动参与凋亡过程。这可能与内质网应激途径或死亡受体途径有关联<sup>[2]</sup>。

我们初步探讨染氟成骨细胞 saos-2 和慢性氟中毒骨组织 caspase14 表达影响。研究发现,caspase14 在染氟成骨细胞 saos-2 和慢性氟中毒骨组织中均有表达。caspase14 在染氟剂量组低剂量 5 mg/L 表达明显高于正常成骨细胞 saos-2 和其它剂量组。caspase14 在染氟小鼠模型的骨组织中亦有表达,但是高剂量组表达更明显,并且有逐渐增高趋势。本研究结果与张颖等<sup>[21]</sup>研究结果相似,均为高氟促进成骨细胞凋亡,但是其关于成骨细胞凋亡研究并未涉及 caspase14。在动物模型各剂量组 caspase14 的表达情况与成骨细胞染氟模型的结果并不完全一致,这种差异可能是由于相比细胞模型,动物模型存在神经内分泌系统的调控以及免疫系统的防御作用,以及氟局部分布浓度不一致等原因造成,而细胞模型则不存在上述影响。

在本实验中通过应用 Western blot 和免疫组织化学检测方法,发现 Caspase14 可能通过诱导染氟成骨细胞凋亡,降低染氟成骨细胞的存活数量,诱导不同染氟剂量小鼠骨组织局部发生骨质疏松,但其诱导细胞凋亡机制可能尚未明了。Caspase-14 在细胞凋亡中的信号通路尚不明确,我们将在后期实验中进一步研究。虽然 Caspase-14 表达在染氟各组线性关系不明显,但根据在染氟成骨细胞和动物模型骨组织中表达显著增加,使其可能作为早期诊断的生物标记物。

#### 参考文献(References)

- [1] 王馨苑,张霖,承尧,等. Caspase-14 在恶性黑色素瘤中的表达及意义 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2014, 30(11): 1180-1183  
Wang Xin-yuan, Zhang Ji, Cheng Yao, et al. Human caspase-14 expression in malignant melanoma and its significance [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2014, 30(11): 1180-1183
- [2] Alibardi L, Tschachler E, Eckhart L. Distribution of caspase-14 in epidermis and hair follicles is evolutionarily conserved among mammal [J]. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2005, 286(2): 962-973
- [3] Lippens S, VandenBroecke C, Van Damme E, et al. Caspase-14 is expressed in the epidermis, the choroid plexus, the retinal pigment epithelium and thymic Hassall's bodies [J]. Cell Death Differ, 2003, 10(2): 257-259
- [4] Denecker G, Hoste E, Glillbert B, et al. Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss [J]. Nat Cell Biol, 2007, 9(6): 666-674
- [5] 官志忠. 关注地方性氟中毒发病机制研究的重要性和热点问题[J]. 中华地方病学杂志, 2014, 33(11): 119-120  
Guan Zhi-zhong. Pay attention to the importance of the mechanism of endemic fluorosis and hot issues [J]. Chin J Cell Mol Immunol, 2014, 30(11): 119-120
- [6] Ya-Lou Zhang, Qin Luo, Qiang Deng, et al. Genes associated with sodium fluoride-induced human osteoblast apoptosis [J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(8): 13171-13178
- [7] Mazumder S, Plesca D, Almasan A. Caspase-3 activation is a critical determinant of genotoxic stress-induced apoptosis [J]. Methods Mol Biol, 2008, 414: 13-21
- [8] Raymond AA, Mechin MC, Nachat R, et al. Nine procaspases are expressed in normal human epidermis, but only caspase-14 is fully processed [J]. Br J Dermatol, 2007, 156(3): 420-427
- [9] Liu Kang-sheng, Lyu Juan, Li Ping, et al. Biological Characteristics of

- Caspase-14 and Its Expression in Neoplastic Diseases in the View of Translational Medicine[J]. *Int Transl Med*, 2016, 4(2): 109-113
- [10] Van de Craen M, Van Loo G, Pyper S, et al. Identification of a new Caspase homologue: Caspase-14[J]. *Cell Death Differ*, 1998, 5: 838-846
- [11] Alibardi L, Tschachler E, Eckhart L. Distribution of Caspase-14 in epidermis and hair follicles is evolutionarily conserved among mammals[J]. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*, 2005, 286: 962-973
- [12] Kam DW, Charles AK, Dharmarajan AM. Caspase-14 expression in the human placenta[J]. *Reprod Biomed Online*, 2005, 11: 236-243
- [13] 张芳芳, 车雅敏, 傅志宜. Filaggrin 和 Caspase-14 在皮肤屏障中的作用[J]. *皮肤性病诊疗学杂志* 2012, 19(2): 114-116
- Zhang Fang-fang, Che Ya-min, Fu Zhi-yi. Filaggrin and Caspase-14 in the role of skin barrier [J]. *Diagn Therdermato-venereol*, 2012, 19(2): 114-116
- [14] 宋秀祖, 相文忠, 许爱娥. Caspase-14 在表皮终末分化及皮肤屏障中的作用[J]. *中国中西医结合皮肤性病学期刊*, 2009, 8(1): 65-67
- Song Xiu-zu, Xiang wen-zhong, Xu ai-e. Caspase 14 terminal differentiation in epidermis and the role of skin barrier [J]. *Chin J Dermatol Venerol Integ Trad W Jan*, 2009, 8(1): 65-67
- [15] HY, Chen CY, Hung MF, et al. Caspase-14 is an antiapoptotic protein targeting apoptosis-inducing factor in lung adenocarcinomas[J]. *Oncol Rep*, 2011, 26(2): 359-369
- [16] Krakewski M, Kim H, Shin E, et al. Tumor-associated alterations in caspase-14 expression in epithelial malignancies[J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(15): 5462-5471
- [17] Lemond J, Stucki-Koch A, Stotzer M, et al. Aberrant expression of caspase-14 in salivary gland carcinomas [J]. *J Oral Pathol Med*, 2015, 44(6): 444-448
- [18] Scharenberg C, Eckardt A, Tiede C, et al. Expression of caspase 14 and filaggrin in oral squamous carcinoma [J]. *Head Neck Pathol*, 2013, 7(4): 327-333
- [19] Yi-Hung Wu, Hsiao-Fan Lo, Sih-Han Chen. Caspase-14 suppresses GCM1 acetylation and inhibits placental cell differentiation [J]. *The FASEB Journal*, 2013, 4: 2818-2828
- [20] 张亚楼, 孙小娜, 冯树梅, 等. 过量氟引起成骨细胞内质网应激信号通路的基因差异表达[J]. *重庆医学*, 2014, 43(33): 4425-4427
- Zhang Ya-lou, Sun Xiao-na, Feng Shu-mei, et al. Genes differentially expression of endoplasmic reticulum stress signaling pathway caused by excess fluoride in osteoblasts [J]. *Chongqing Medicine*, 2014, 43(33): 425-4427
- [21] 张颖, 梁英杰, 郭晓英, 等. 母鼠高氟摄入对仔鼠颅骨成骨细胞的影响[J]. *卫生研究*, 2005, 34(1): 29-32
- Zhang Ying, Liang Ying-jie, Guo Xiao-ying, et al. The effect of high dose fluoride on the rat offspring osteoblasts which ingested by female rats[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2005, 34(1): 29-32

(上接第 1670 页)

- [16] Kimura T, Itoh T, Fusazaki T, et al. Low-density lipoprotein cholesterol/high-density lipoprotein cholesterol ratio predicts lipid-rich coronary plaque in patients with coronary artery disease integrated backscatter intravascular ultrasound study [J]. *Circ J*, 2010, 74(7): 1392-1398
- [17] Cullen P, Schulte H, Assmann G. The Munster Heart Study (PRO-CAM) Total Mortality in Middle-Aged Men is increased at low total and LDL cholesterol concentrations in smokers but not in nonsmokers [J]. *Circulation*, 1997, 96(7): 2128-2136
- [18] 杨絮, 张勇刚. 低密度脂蛋白 C、非高密度脂蛋白 C、动脉硬化指数与冠心病严重程度的相关性分析 [J]. *汕头大学医学院学报*, 2016, 29(1): 27-29
- Yang Xu, Zhang Yong-gang. Relationship between Low-density Lipoprotein Cholesterol C, Non-high-density Lipoprotein Cholesterol C, Atherosclerosis Index and the Severity of Coronary Heart Disease [J]. *Journal of Shantou University Medical College*, 2016, 29(1): 27-29
- [19] Eder L, Gladman DD, Ibañez D, et al. The correlation between carotid artery atherosclerosis and clinical heart disease in lupus patients[J]. *Lupus*, 2014, 23(11): 1142-1148
- [20] 蒋鹏, 姜巧珍, 任鸿坤, 等. 最大颈动脉内膜中层厚度及颈动脉斑块对冠心病预测的相关性研究[J]. *临床心血管病杂志*, 2015, 31(5): 532-535
- Jiang Peng, Jiang Qiao-zhen, Ren Hong-kun, et al. Maximum carotid intima-media thickness and carotid plaques for predicting coronary heart disease[J]. *Journal of Clinical Cardiology*, 2015, 31(5): 532-535
- [21] 杨佳, 刘增长. 颈动脉病变与冠状动脉病变关系的探讨[J]. *临床心血管病杂志*, 2016, 32(2): 143-147
- Yang Jia, Liu Zeng-chang. Relationship between carotid artery disease and coronary artery disease [J]. *Journal of Clinical Cardiology*, 2016, 32(2): 143-147
- [22] 褚爱萍, 宋旭光, 史荣辉. 颈动脉超声在检测颈动脉病变与冠心病相关性中的应用价值[J]. *西部医学*, 2014, 26(12): 1699-1701
- Chu Ai-ping, Song Xu-guang, Shi Rong-hui. Application of ultrasonic detection of carotid artery lesions in patients and coronary heart disease[J]. *Med J West China*, 2014, 26(12): 1699-1701
- [23] 吴梓芳, 许军丽. 超声检测对颈动脉粥样硬化与冠心病相关性的研究[J]. *贵阳中医学院学报*, 2013, 35(41): 148-149
- Wu Zi-fang, Xu Jun-li. The correlation between carotid atherosclerosis and coronary artery disease by ultrasonic detection [J]. *Journal of Guiyang College of Traditional Chinese Medicine*, 2013, 35(41): 148-149