

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20220110001

任洪玥, 杨进, 刘霞, 等. 二氧化硫体内衍生物通过 ROS/JNK/AP-1 通路诱导大鼠切牙成釉器细胞 AE2 蛋白表达上调[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(6): 256-265

Ren H Y, Yang J, Liu X, et al. Internal derivatives of sulfur dioxide induced up-regulation of AE2 protein expression of rat enamel organ through ROS/JNK/AP-1 pathway [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(6): 256-265 (in Chinese)

二氧化硫体内衍生物通过 ROS/JNK/AP-1 通路诱导大鼠切牙成釉器细胞 AE2 蛋白表达上调

任洪玥^{1,2}, 杨进^{1,2}, 刘霞^{1,2}, 姚杰^{1,2}, 林昌虎¹, 涂成龙^{1,2,3,*}

1. 贵州医科大学公共卫生与健康学院, 贵阳 550025
2. 贵州医科大学环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵阳 550025
3. 贵州医科大学毒性检测中心, 贵阳 550025

收稿日期: 2022-01-10 录用日期: 2022-02-21

摘要: 探究二氧化硫体内衍生物混合液(亚硫酸钠与亚硫酸氢钠物质的量比为 3:1)对雄性大鼠切牙组织抗氧化防御系统及切牙成釉器细胞丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号转导通路关键蛋白与阴离子交换蛋白 2(anion exchanger 2, AE2)表达的影响。30 只雄性 Wistar 大鼠按体质量随机分为高(100 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、中(50 mg·kg⁻¹·d⁻¹)、低(25 mg·kg⁻¹·d⁻¹)二氧化硫衍生物混合液染毒组、高剂量二氧化硫衍生物混合液+N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)染毒组及生理盐水对照组(0.9% 氯化钠注射液)。各组均以 2 mL·kg⁻¹ 每日行腹腔注射一次, 高剂量+NAC 组每次腹腔注射前 30 min 予 200 mg·kg⁻¹ NAC 水溶液灌胃再施予高剂量组相同染毒操作, 连续 4 周。取大鼠下颌骨切牙组织进行超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)活性、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)及丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量、活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)水平测定。剥离包绕切牙根部的下颌骨分离成釉器细胞, 以 Western blot 法检测成釉器细胞 MAPKs 信号通路关键蛋白及 AE2 蛋白表达情况。结果显示, 低剂量染毒组与对照组比较, 大鼠切牙组织多类抗氧化指标及过氧化产物含量的改变均不具统计学意义。中、高剂量染毒组较对照组大鼠切牙组织 SOD 活性、GSH-Px 活性及 GSH 含量下降、MDA、ROS 水平升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。Western blot 结果显示, 随二氧化硫衍生物剂量升高, 各组大鼠成釉器细胞 p-p38 MAPK/p38 MAPK 及 p-ERK/ERK 水平较对照组未见明显变化, 而中、高剂量组 p-JNK/JNK 水平明显升高, AP-1 蛋白发生核转位分布, AE2 蛋白表达明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 而 ROS 抑制剂 NAC 能使高剂量下 AP-1 蛋白核转位情况得到改善, 并能在一定程度上逆转高剂量二氧化硫衍生物暴露下引起的 p-JNK/JNK 水平升高及 AE2 蛋白表达上调。以上结果提示, 二氧化硫体内衍生物混合液可造成大鼠切牙组织氧化应激水平升高并通过 ROS/JNK/AP-1 通路诱导切牙成釉器细胞 AE2 表达上调, 具有干扰成釉器细胞成釉功能的潜在毒性。

关键词: 二氧化硫体内衍生物; 成釉器细胞; 氧化应激; 丝裂原活化蛋白激酶; 激活蛋白-1; 阴离子交换蛋白 2

文章编号: 1673-5897(2022)6-256-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Internal Derivatives of Sulfur Dioxide Induced Up-regulation of AE2 Protein Expression of Rat Enamel Organ through ROS/JNK/AP-1 Pathway

Ren Hongyue^{1,2}, Yang Jin^{1,2}, Liu Xia^{1,2}, Yao Jie^{1,2}, Lin Changhu¹, Tu Chenglong^{1,2,3,*}

1. School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China
2. Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guizhou Medical University,

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41967051, 42167059)

第一作者: 任洪玥(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境毒理学, E-mail: rhy45@163.com

* 通信作者 (Corresponding author), E-mail: chenglongtu@163.com

Guiyang 550025, China

3. Toxicity Testing Center of Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China

Received 10 January 2022 accepted 21 February 2022

Abstract: To investigate the effects of sulfur dioxide derivative mixture (molar ratio of sodium sulfite to sodium bisulfite is 3:1) on antioxidant defense system and expression of key proteins in mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway and anion exchanger protein 2 (AE2) in enamel organ of incisors of male rats. Thirty male Wistar rats were randomly divided into high ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), medium ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), low ($25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) sulfur dioxide derivative mixture group, high-dose sulfur dioxide derivative mixture+N-acetylcysteine (NAC) group and normal saline control group (0.9% sodium chloride injection). Each group received intraperitoneal injection every day with a volume of $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ for four weeks. The high-dose +NAC group was given $200 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ NAC solution 30 min before each intraperitoneal injection. The activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px), contents of reduced glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA), and levels of reactive oxygen species (ROS) of incisors tissue were determined by assay kit. The enamel organ was separated from the root of the incisor, and the expression of key proteins in mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway and AE2 of enamel organ was determined by Western blot. The results showed that compared with the control group, there was no statistical significance in the changes of antioxidant indexes and content of peroxide products in the incisor tissue of rats in the low-dose group, while SOD activity, GSH-Px activity and GSH content in the incisor tissue of rats in the medium-dose group and the high-dose group were decreased and level of MDA and ROS were increased. The difference was statistically significant ($P < 0.05$). As for the protein expression, Western blot results showed that with the increase of sulfur dioxide derivative dose, the levels of p-p38 MAPK/p38 MAPK and p-ERK/ERK did not change significantly in each group compared with the control group, while the levels of p-JNK/JNK in medium and high-dose groups increased significantly and expression of AE2 protein increased with nuclear translocation distribution of AP-1 protein occurred ($P < 0.05$). NAC, a ROS inhibitor can improve the nuclear translocation of AP-1 protein and partly reverse the elevated p-JNK/JNK level and the up-regulation of AE2 protein expression induced by exposure to high dose of sulfur dioxide derivatives. These results suggest that mixture of sulfur dioxide derivatives can increase the oxidative stress level and induce the up-regulation of AE2 expression of enamel organ of rat incisors through ROS/JNK/AP-1 pathway, which has the potential toxicity of interfering with the amelogenesis function of ameloblasts.

Keywords: sulfur dioxide derivatives; enamel organ; oxidative stress; mitogen activated protein kinase; activator protein-1; anion exchanger 2

成釉器细胞包括内釉上皮细胞、星网状细胞、中间层细胞、外釉上皮细胞及成釉细胞,它们在功能上相互诱导、相互协同,在牙齿发育过程中发挥分泌基质、促进无机离子沉积、诱导晶体成核与矿化等作用,是形成牙体主要硬组织结构——牙釉质的关键细胞群^[1]。釉质晶体的成核与生长是一个受到釉质基质 pH 影响的过程,离不开成釉器细胞对胞内外酸碱状态的精密调控,涉及多种离子转运体。其中,溶质载体家族 4(solute carrier 4, SLC4)的阴离子交换体 2(anion exchanger 2, AE2)位于成釉细胞外侧基底膜,可交换 Cl^- 与 HCO_3^- 以调控釉质基质与成釉细胞内的酸碱状态,在釉质矿化过程中发挥重要作用^[2-3]。

干扰上述牙源性细胞生理功能及成釉过程的各种因素,都有可能影响牙齿的正常发育,产生不良后果。目前认为,牙胚发育过程中持续过量地氟摄入是导致釉质发育障碍引起氟斑牙发生的根本原因,但具体发病机制尚不完全清楚^[4]。自由基学说提出,高生物活性的氟化物对成釉细胞抗氧化防御系统的破坏是导致“氟斑牙”呈现釉基质蛋白滞留与釉质矿化不全的关键机制之一^[5-8]。而值得注意的是,在我国西南部“燃煤型氟斑牙”病区环境中常合并高硫煤系分布,敞炉燃煤致居室内空气污染易出现超国家限量浓度的 SO_2 与含氟烟气并存的情况。早前有相关研究就该现象进行了动物实验研究,发

现相较于二者单独染毒,同时接触大剂量氟化物与SO₂烟气时大鼠氟斑牙患病程度更严重,提示SO₂对氟致氟斑牙的过程可能起到加强作用^[9];再有,SO₂与氟化物共同暴露时将雄性大鼠肾及睾丸组织产生更严重的损伤^[10-11],更加说明SO₂的存在将使氟化物产生更复杂的毒性效应。但以上研究均未就SO₂在“氟硫联合”过程中发挥毒作用所涉及的可能机制进行讨论。而除了对呼吸系统造成损害外,SO₂还可影响多脏器的生理功能,是一种具有多种毒作用的全身性毒物。SO₂经呼吸道吸收入血后在血液微碱性的环境中即转变为其衍生物——亚硫酸盐和亚硫酸氢盐(物质的量比约为3:1),以其衍生物的形式随血液循环至全身,对体内组织细胞产生毒作用^[12]。降低体内抗氧化物质水平、削弱体内抗氧化防御系统是SO₂发挥毒作用的关键环节^[13]。因此,本研究以氧化应激为切入点,探讨SO₂体内衍生物对大鼠切牙组织抗氧化防御系统及成釉器细胞丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)信号转导通路关键蛋白与AE2蛋白表达的影响,探究其对牙齿发育相关生理过程的潜在毒性及可能机制,为后续深入“氟硫联合”过程中SO₂毒作用的毒理学研究提供实验资料。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 实验动物分组及处理

本研究采用SPF级雄性4周龄Wistar大鼠,体重100~120 g,购于长沙市天勤生物技术有限公司,动物许可证编号:SCXK(湘)2019-0013。适应性饲养1周后按体质量随机分5组,即高、中、低二氧化硫衍生物混合液染毒组、生理盐水对照组、高剂量二氧化硫衍生物混合液+抗氧化剂N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)拮抗组,染毒剂量分别为100 mg·kg⁻¹·d⁻¹(1/10LD₅₀)、50 mg·kg⁻¹·d⁻¹(1/20LD₅₀)和25 mg·kg⁻¹·d⁻¹(1/40LD₅₀),对照组予0.9%氯化钠注射液,高剂量+NAC组每次腹腔注射前30 min予200 mg·kg⁻¹ NAC水溶液灌胃,后与高剂量染毒组进行相同操作,各染毒组均于每日上午9:00行腹腔注射一次,给药容积为2 mL·kg⁻¹,连续4周。饲养期间动物自由饮水、摄食,环境温度为(22±2)℃,光照明暗各12 h,相对湿度为(50±10)%。末次给药后禁食24 h,取相应生物样本进行实验。

1.2 主要试剂

亚硫酸钠(Na₂SO₃)、亚硫酸氢钠(NaHSO₃)分析

纯,购自美国Sigma公司,N-乙酰半胱氨酸购自美国Sigma公司,超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、还原型谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)检测试剂盒购自南京建成生物有限公司,大鼠活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)Elisa测定试剂盒购自上海莱生物科技有限公司,AE2兔抗大鼠多克隆抗体购自美国Invitrogen公司,p38 MAPK兔抗大鼠单克隆抗体、p-p38 MAPK兔抗大鼠单克隆抗体、SAPK/JNK兔抗大鼠多克隆抗体、p-SAPK/JNK兔抗大鼠单克隆抗体、ERK1/2兔抗大鼠多克隆抗体、p-ERK1/2兔抗大鼠多克隆抗体购自美国Cell Signaling Technology公司,Histone H3兔抗大鼠单克隆抗体购自美国Santa Cruz公司,辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG二抗购自北京爱必信生物技术有限公司。

二氧化硫体内衍生物混合液的制备。取适量亚硫酸钠与亚硫酸氢钠,以3:1的物质的量比溶于0.9%生理盐水,每日新鲜配制。

1.3 大鼠切牙组织氧化应激相关指标测定

完整分离大鼠双侧下颌骨及切牙组织,取其中一侧用纱布仔细去除包绕的肌肉及结缔组织后置液氮中研磨成骨粉,并于组织破碎仪中进一步粉碎。取适量骨粉按1:9的质量体积比加入预冷的0.9%生理盐水制成10%组织匀浆,蛋白含量的测定采用BCA法。按不同测定指标的样品前处理要求离心后取上清液,依试剂盒说明书检测切牙组织中MDA、GSH水平及SOD、GSH-Px活性。

1.4 切牙组织ROS水平测定

骨粉的制备同1.3,取适量骨粉按1:9的质量体积比加入预冷的PBS(0.01 mol·L⁻¹, pH=7.4),冰上充分研磨混匀制成切牙组织匀浆液,5 000×g,离心10 min,取上清液按照试剂盒说明书测定切牙组织ROS水平。

1.5 Western blot法测定大鼠成釉器细胞MAPKs/AP-1信号通路相关蛋白及AE2蛋白表达水平

取前述待用的另一侧大鼠切牙组织,参考Houari等^[14]的处理方法,仔细拨开包绕切牙根部的下颌骨,分离出成釉细胞组织,用含PMSF的RIPA裂解液4℃匀浆,冰上裂解15 min提取总蛋白,用BCA试剂盒进行蛋白定量,分子量为30~160 kD与12~60 kD的蛋白分别选用8%或12% SDS-PAGE分离胶进行电泳分离,转膜后5%脱脂牛奶室

温封闭 1 h, 磷酸化蛋白用 5% BSA 封闭液封闭 1 h, 分别加入适量 AE2 抗体(1:1 000)、p38 MAPK 抗体(1:1 000)、p-p38 MAPK 抗体(1:1 000)、SAPK/JNK 抗体(1:1 000)、p-SAPK/JNK 抗体(1:1 000)、ERK1/2 抗体(1:1 000)、p-ERK1/2 抗体(1:1 000)及 β -actin 抗体(1:2 000) 4 °C 摇床孵育过夜, TBST 洗膜 10 min 共 3 次, 1:4 000 倍稀释二抗室温孵育 2 h, TBST 洗膜 10 min 共 3 次, ECL 显色液显影, 凝胶成像系统扫描并检测蛋白条带密度。

1.6 统计学分析

数据用均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。统计学分析采用 SPSS 22.0 软件进行, 多组间统计量的比较先进行方差齐性检验和单因素方差分析(one way-ANOVA)。组间两两比较方差齐时用 Bonferroni 法, 方差不齐时用 Dunnett' s-t 检验, 均采用双侧检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果 (Results)

2.1 二氧化硫体内衍生物混合液对大鼠切牙组织抗氧化防御系统的影响

与对照组比较, 中、高剂量组大鼠切牙组织 SOD、GSH-Px 活性和 GSH 水平下降, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); MDA、ROS 水平升高($P < 0.05$)。

与高剂量组比较, 高剂量+NAC 组 SOD 和 GSH-Px 活性升高, GSH 水平上升, MDA、ROS 含量下降, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 如表 1 所示。

2.2 二氧化硫体内衍生物对大鼠成釉器细胞 MAPKs/AP-1 信号通路相关蛋白表达的影响

如图 1 所示, 低、中、高剂量组及高剂量+NAC 组大鼠成釉器细胞 p-p38 MAPK/p38 MAPK 及 p-ERK/ERK 改变较对照组均无显著差异。而低剂量组大鼠成釉器细胞 JNK 磷酸化水平改变较对照组无显著差异, 中、高剂量组磷酸化 JNK/JNK 水平较对照组升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 且经趋势性检验, JNK 磷酸化水平升高趋势表现出二氧化硫衍生物染毒剂量依赖性($F = 158.58, P < 0.05$)。与高剂量组比较, 高剂量+NAC 组磷酸化 JNK/JNK 水平显著降低($P < 0.05$), 差异有统计学意义。

如图 2 所示, 与对照组比较, 中、高剂量组大鼠成釉器细胞胞浆中 c-Fos、c-Jun 蛋白水平较对照组明显下降($P < 0.05$), 核内 c-Fos、c-Jun 蛋白水平明显上升($P < 0.05$), 提示高剂量组 AP-1 蛋白发生核转位。而高剂量+NAC 组 AP-1 蛋白核转位较高剂量组显著减少($P < 0.05$), 差异有统计学意义。低剂量组较对照组核内 c-Fos 蛋白水平升高, 但总体 AP-1 蛋白核浆分布改变无明显差异。

表 1 二氧化硫体内衍生物对大鼠切牙组织抗氧化防御系统相关指标的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 1 Effects of sulfur dioxide derivatives on indexes of antioxidant defense system of rat incisor tissue ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别 Groups	SOD 活性 (U·mg ⁻¹) SOD activity (U·mg ⁻¹)	GSH-Px 活性 (U·mg ⁻¹) GSH-Px activity (U·mg ⁻¹)	GSH 水平 (μ mol·g ⁻¹) Level of GSH (μ mol·g ⁻¹)	MDA 水平 (nmol·mg ⁻¹) Level of MDA (nmol·mg ⁻¹)	ROS 水平 (U·mL ⁻¹) Level of ROS (U·mL ⁻¹)
对照 Control	150.21 \pm 11.15	128.93 \pm 6.64	49.47 \pm 4.34	3.49 \pm 0.91	29.31 \pm 2.26
低剂量(25 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹) Low-dose (25 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	133.76 \pm 11.91	126.31 \pm 6.53	48.74 \pm 3.99	3.06 \pm 0.99	29.47 \pm 2.37
中剂量(50 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹) Medium-dose (50 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	92.18 \pm 11.83 ^a	86.89 \pm 5.01 ^a	35.57 \pm 4.27 ^a	10.18 \pm 0.92 ^a	38.91 \pm 2.32 ^a
高剂量(100 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹) High-dose (100 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	62.78 \pm 8.90 ^a	65.99 \pm 4.86 ^a	18.56 \pm 3.63 ^a	17.25 \pm 1.18 ^a	50.48 \pm 2.94 ^a
高剂量(100 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹) +NAC (200 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹) High-dose (100 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹) +NAC (200 mg·kg ⁻¹ ·d ⁻¹)	161.48 \pm 19.46 ^b	133.25 \pm 8.71 ^b	46.67 \pm 5.55 ^b	3.38 \pm 1.13 ^b	31.46 \pm 4.19 ^b

注: SOD 表示超氧化物歧化酶, GSH-Px 表示谷胱甘肽过氧化物酶, GSH 表示还原型谷胱甘肽, MDA 表示丙二醛, ROS 表示活性氧簇; NAC 表示 N-乙酰半胱氨酸; ^a 与对照组比较, $P < 0.05$; ^b 与高剂量组(100 mg·kg⁻¹)比较, $P < 0.05$ 。

Note: SOD stands for superoxide dismutase; GSH-Px stands for glutathione peroxidase; GSH stands for reduced glutathione; MDA stands for malondialdehyde; ROS stands for reactive oxygen species; NAC stands for N-acetylcysteine; ^a $P < 0.05$ vs control group; ^b $P < 0.05$ vs high-dose group (100 mg·kg⁻¹).

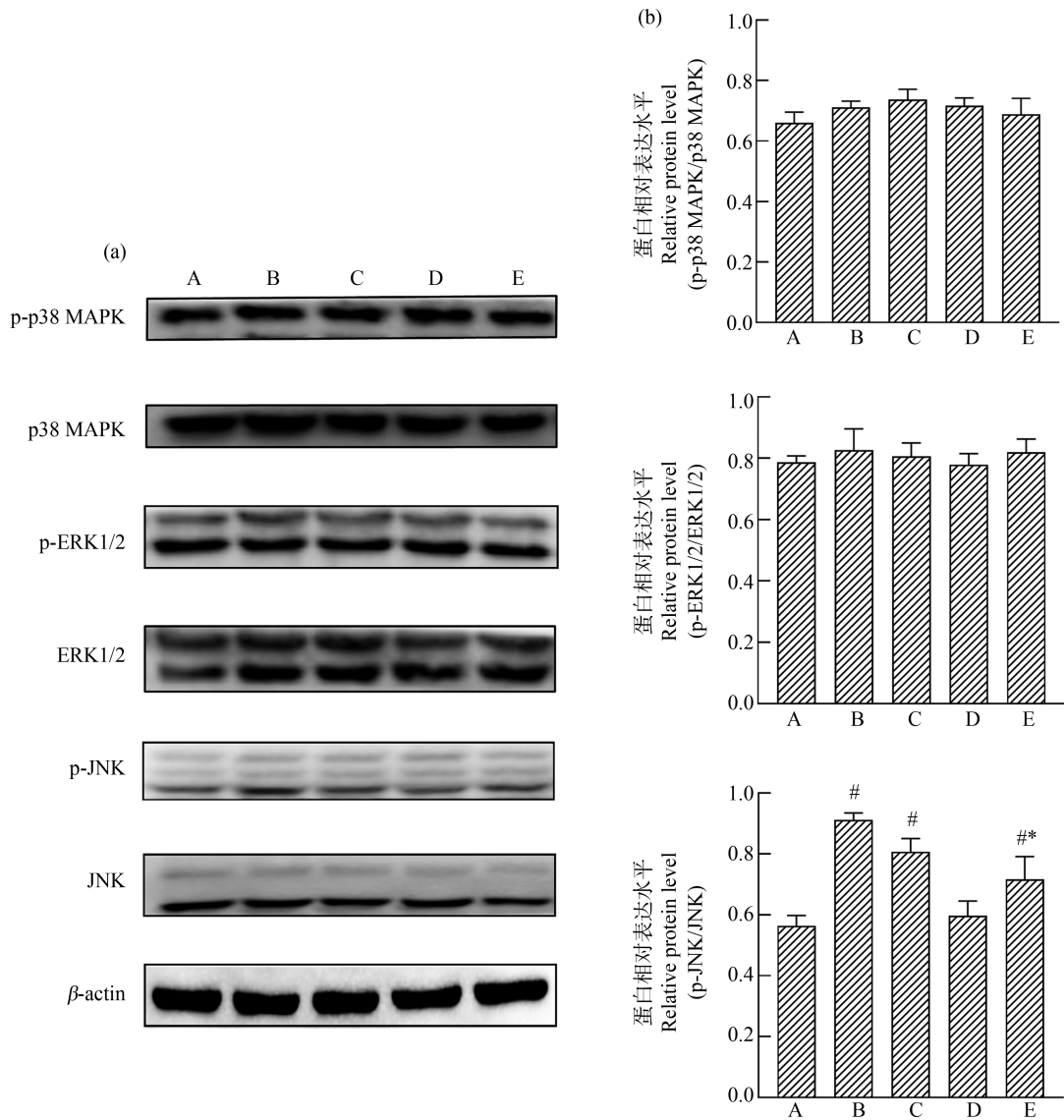


图1 二氧化硫体内衍生物对大鼠切牙成釉器细胞 MAPKs 信号通路关键蛋白表达的影响

注:(a)MAPKs 信号通路关键蛋白免疫印迹条带;(b)成釉器细胞 MAPKs 信号通路关键蛋白相对表达水平;A 对照组, B 高剂量组, C 中剂量组, D 低剂量组, E 高剂量+NAC 组;与对照组比较, # $P<0.05$;与高剂量组比较, * $P<0.05$; $n=3$ 。

Fig. 1 Effects of sulfur dioxide derivatives on expression of key proteins in MAPKs signaling pathway of rat incisor enamel organ cells

Note: (a) Immunoblotting bands of key proteins in MAPKs signaling pathway; (b) Relative expression of key proteins in MAPKs signaling pathway; A means control group, B means high-dose group, C means medium-dose group, D means low-dose group, and E means high dose+NAC group; # $P<0.05$ vs control group; * $P<0.05$ vs high-dose group; $n=3$.

2.3 二氧化硫体内衍生物对大鼠成釉器细胞 AE2 蛋白表达水平的影响

如图3所示,中、高剂量组 AE2 蛋白表达较对照组升高,差异有统计学意义($P<0.05$),且经趋势性检验,升高趋势表现出二氧化硫衍生物染毒剂量依赖性($F=530.167, P<0.05$)。与高剂量组比较,高剂量+NAC 组 AE2 蛋白表达水平显著降低($P<0.05$),差异有统计学意义。

3 讨论 (Discussion)

机体内抗氧化防御系统主要由抗氧化酶类和抗氧化剂构成,它们之间相互协同、相互代偿共同发挥维持机体氧化与抗氧化动态平衡的作用。体内氧化与抗氧化之间的平衡状态被打破可诱导产生各种自由基引起组织氧化损伤,导致细胞功能异常甚至凋亡,从而对多种脏器造成损害^[15]。已有多项研究表明,二氧化硫及其衍生物可引起大、小鼠脑、肺、心、

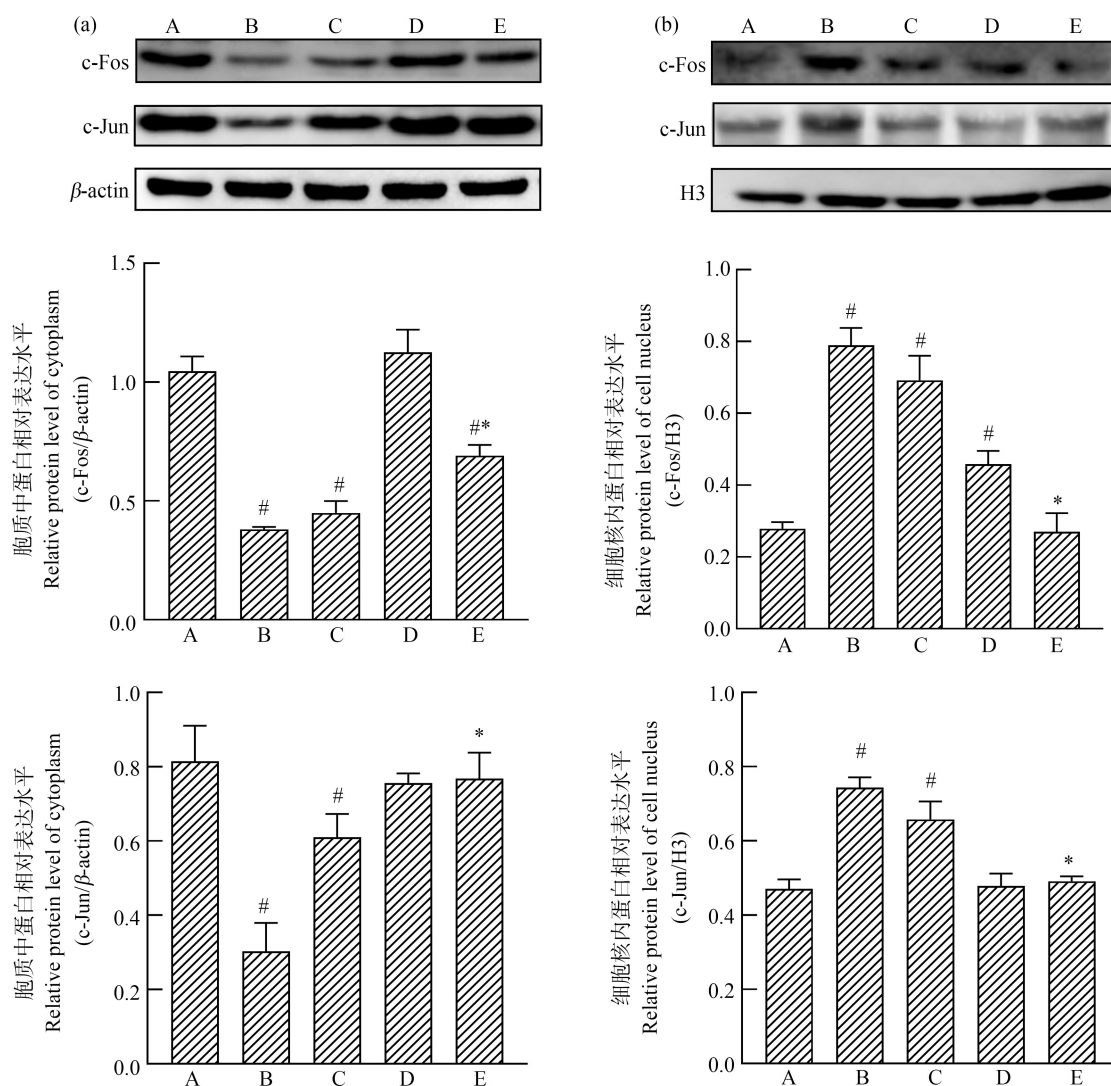


图 2 二氧化硫体内衍生物对大鼠切牙成釉器细胞胞质及胞核中 c-Fos 与 c-Jun 蛋白表达的影响

注:(a)胞质中 c-Fos 与 c-Jun 蛋白相对表达水平;(b)胞核中 c-Fos 与 c-Jun 蛋白相对表达水平;A 对照组,B 高剂量组,C 中剂量组,D 低剂量组,E 高剂量+NAC 组;与对照组比较,# $P < 0.05$;与高剂量组比较,* $P < 0.05$; $n = 3$ 。

Fig. 2 Effects of sulfur dioxide derivatives on expression of c-Fos and c-Jun protein in cytoplasm and nucleus of rat incisor enamel organ cells

Note: (a) Relative expression of c-Fos and c-Jun protein in cytoplasm; (b) Relative expression of c-Fos and c-Jun protein in nucleus; A means control group, B means high-dose group, C means medium-dose group, D means low-dose group, and E means high dose+NAC group; # $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs high-dose group; $n = 3$.

肝、脾、肾、胃、肠和睾丸等组织抗氧化物质含量减少,SOD、GSH-Px 和过氧化氢酶(catalase, CAT)等抗氧化酶活性改变,脂质过氧化产物含量增加^[16-19]。可见,降低体内抗氧化物质水平、削弱体内抗氧化防御系统是二氧化硫及其衍生物发挥毒作用的关键环节之一。基于此,本研究通过亚急性腹腔注射二氧化硫体内衍生物构建动物染毒模型,观察二氧化硫衍生物对大鼠切牙组织抗氧化防御系统的影响。结果显示,相较于对照组,中、高剂量染毒组大鼠切牙

组织 GSH 含量、SOD 活性和 GSH-Px 活性下降,同时,脂质过氧化产物 MDA、ROS 水平显著上升,而预先给予活性氧抑制剂 NAC 再予高剂量二氧化硫衍生物时,大鼠切牙组织抗氧化防御系统各项指标均较单独施予高剂量二氧化硫衍生物而言有了明显改善,表明二氧化硫体内衍生物可引起切牙组织细胞抗氧化防御系统紊乱,活性氧自由基蓄积,这与其他学者在大鼠心、肝、肺和肾等主要脏器组织中观察到的结果类似。

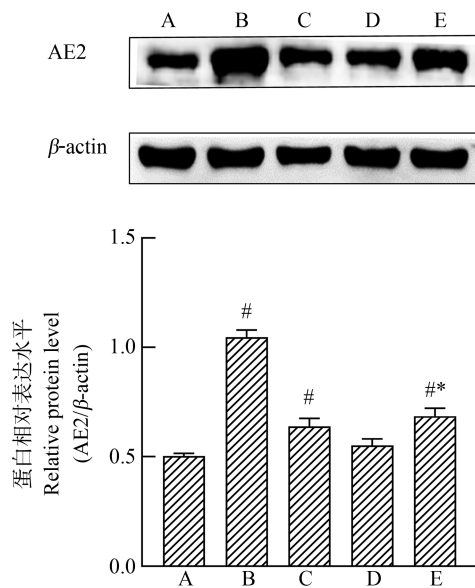


图3 二氧化硫体内衍生物对大鼠切牙成釉器细胞 AE2 蛋白表达的影响

注:A 对照组,B 高剂量组,C 中剂量组,D 低剂量组,E 高剂量+NAC 组;与对照组比较,# $P < 0.05$;与高剂量组比较,* $P < 0.05$; $n = 3$ 。

Fig. 3 Effect of sulfur dioxide derivatives on the expression of AE2 protein in incisor enamel organ of rats

Note: A means control group, B means high-dose group, C means medium-dose group, D means low-dose group, and E means high dose+NAC group; # $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs high-dose group; $n = 3$.

氧化应激导致活性氧簇的大量积累可激活多种信号转导途径,引起下游 NF- κ B、AP-1 等转录因子的活化而介导相关基因的表达改变^[20-22]。广泛存在于组织细胞中的 MAPKs 信号转导途径可被紫外线、炎性细胞因子和 ROS 等胞外刺激激活,参与胞外刺激向细胞内传递的过程,在触发细胞生物化学变化相关靶基因表达的过程中发挥重要作用,主要涉及 3 种激酶的活化:p38 MAPK、ERK1/2 和 JNK。核转录因子 AP-1(activator protein 1, AP-1)是由 c-Jun 和 c-Fos 构成的一类转录激活因子,作为 MAPKs 信号通路的下游分子,在接受自胞外逐渐传递入胞的信号后,即从胞质进入细胞核,与多种基因的 DNA 调节序列相结合,调控相应基因的表达,进而参与细胞炎症反应、分化和凋亡等多种细胞过程。有研究指出,氧化应激可通过诱导核转录因子 AP-1 活化,介导呼吸道上皮细胞 AE2 的表达上调,通过阻断 AE2 的功能可减轻肺缺血/再灌注损伤的程度^[23]。另有研究发现,高糖引起的血管平滑肌内皮细胞凋亡与 AE2 表达上调及其功能激活进而诱导

的线粒体氧化应激相关,AE2 的异常表达上调与功能激活可通过诱导胞内活性氧簇的大量产生,引起细胞凋亡等不良结局的发生^[24-25]。作为膜结合的 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交换蛋白,AE2 主要参与细胞内 pH 值 (pH_i)和离子平衡的调节,在成熟期,成釉细胞表达于基底侧部膜区^[26]。根据 AE2 胞膜定位与功能特性,其交换 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 的作用被认为与成釉细胞内碳酸酐酶及顶端膜质子泵的功能相耦联,是成釉细胞顶端膜周期性的 H^+ 分泌功能得以实现的关键^[26-27]。同时,AE2 还起到向胞外排出 HCO_3^- 中和釉质晶体生长所释放的大量质子以维持胞外釉质基质微环境酸碱平衡稳态的作用^[28]。但 AE2 在排出 HCO_3^- 和泵入 Cl^- 时可使细胞酸化,也能够将胞外的超氧阴离子自由基($\text{O}_2^{\cdot-}$)交换至细胞内^[29]。因此,当 AE2 被异常激活时将会有大量的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 Cl^- 由胞外被转移入胞内,可导致细胞酸化并引发胞内“呼吸爆发”,进而活化活性氧相关信号转导途径引起细胞功能改变或诱导细胞凋亡发生。AE2 的异常表达及活性改变可能是某些疾病状态发生的中间事件^[30-31],在一些肿瘤发生的过程中也观察到 AE2 蛋白高表达与疾病不良预后高度相关^[32-35]。

综合以上论述,细胞活性氧簇的大量产生与 AE2 表达及功能之间应存在某种复杂关系,为此,本研究探讨了在随染毒剂量增加,氧化应激激活且 AE2 蛋白表达升高的状态下,切牙成釉器细胞 MAPKs 信号通路 3 种主要蛋白激酶的活化及 AP-1 蛋白的核浆分布情况,实验结果显示,随着二氧化硫衍生物剂量升高,p-p38 MAPK/p38 MAPK 及 p-ERK/ERK 水平较对照组未见明显变化,而 p-JNK/JNK 明显升高伴随着胞浆内 c-Fos、c-Jun 蛋白水平减少,核内 c-Fos、c-Jun 蛋白上升,提示 AP-1 蛋白发生核转位,ROS 抑制剂能在一定程度上逆转高剂量二氧化硫衍生物暴露下引起的 AE2 蛋白表达上调及 p-JNK/JNK 水平升高,AP-1 蛋白核转位情况亦有所改善。上述结果表明,二氧化硫衍生物可通过激活氧化应激并可能主要由 ROS/JNK/AP-1 信号通路诱导大鼠成釉器细胞 AE2 蛋白表达升高,具有对成釉器细胞的生理状态与功能产生不良影响的潜在毒性,由此推测二氧化硫衍生物具有影响切牙细胞生理功能、干扰牙齿正常形成与发育的潜能。可能涉及以下关键环节:二氧化硫衍生物激活成釉器细胞氧化应激,通过活化 MAPKs/AP-1 等信号通路诱导 AE2 表达上调,使其交换细胞内外离子的功能在

总体上得到增强,而细胞酸化与胞内氧化应激的进一步发展增大了细胞负荷,甚至可能引起细胞凋亡的发生;另外,AE2 表达上调与及功能激活使成釉细胞内外的离子稳态遭到破坏,与成釉细胞 AE2 的 $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ 交换作用高度关联的顶端膜周期性 H^+ 分泌功能可能受到干扰,引起胞外基质酸碱水平改变,进而影响釉质晶体的形成,如图 4 所示。

综上,二氧化硫衍生物可激活大鼠切牙组织氧化应激并主要通过 ROS/JNK/AP-1 信号通路诱导成釉器细胞 AE2 蛋白表达上调,具有影响切牙细胞生理功能进而干扰牙齿正常形成与发育的潜能。这提示我们,在氟合并硫高背景地区“燃煤型氟斑牙”的产生可能具有更复杂的影响因素,因此,进一步深入

探讨二氧化硫的这一“潜能”在“燃煤型氟斑牙”的形成过程中所发挥的作用,氧化应激与 AE2 在其中扮演了何种角色及此过程涉及的具体机制等问题将有助于从全新角度推进“燃煤型氟斑牙”患病机制的基础性研究。

通信作者简介:涂成龙(1978—),男,博士,教授,主要研究方向为环境毒理学。

参考文献 (References) :

[1] Lacruz R S, Habelitz S, Wright J T, et al. Dental enamel formation and implications for oral health and disease [J]. *Physiological Reviews*, 2017, 97(3): 939-993

[2] Yin K F, Paine M L. Bicarbonate transport during enamel maturation [J]. *Calcified Tissue International*, 2017, 101(5): 457-464

[3] Bronckers A L J J. Ion transport by ameloblasts during amelogenesis [J]. *Journal of Dental Research*, 2017, 96(3): 243-253

[4] 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(2): 119-120

[5] 彭睿, 李玲, 管晓燕, 等. 氟斑牙发生的分子机制的研究现状[J]. *中华地方病学杂志*, 2016, 35(1): 71-74

Peng R, Li L, Guan X Y, et al. Molecular mechanisms of dental fluorosis [J]. *Chinese Journal of Endemiology*, 2016, 35(1): 71-74 (in Chinese)

[6] 官志忠. 氧化应激在地方性氟中毒分子发病机制中的作用[J]. *中华地方病学杂志*, 2016, 35(2): 79-82

Guan Z Z. Role of oxidative stress in molecular pathogenesis of endemic fluorosis [J]. *Chinese Journal of Endemiology*, 2016, 35(2): 79-82 (in Chinese)

[7] 李薛燕, 黄文丽. 氟中毒致机体损伤及其机制[J]. *国外医学: 医学地理分册*, 2015, 36(3): 186-189

Li X Y, Huang W L. Injuries caused by fluorosis and its mechanisms [J]. *Foreign Medical Sciences: Section of Medgeography*, 2015, 36(3): 186-189 (in Chinese)

[8] 刘盘龙, 周红艳, 王东苗, 等. 氟牙症发病机制的研究进展[J]. *国际口腔医学杂志*, 2013, 40(1): 94-97

Liu P L, Zhou H Y, Wang D M, et al. Research progress on pathogenesis of dental fluorosis [J]. *International Journal of Stomatology*, 2013, 40(1): 94-97 (in Chinese)

[9] 梁超轲, 何兆龙, 曹和赣, 等. 煤烟型氟中毒模拟实验及二氧化硫对氟中毒的影响[J]. *卫生研究*, 1993, 22(3): 148-151, 190

Liang C K, He Z L, Cao H G, et al. Study on the joint effect of fluoride and sulphur dioxide from indoor coal burning on experimental animal through natural inhalation

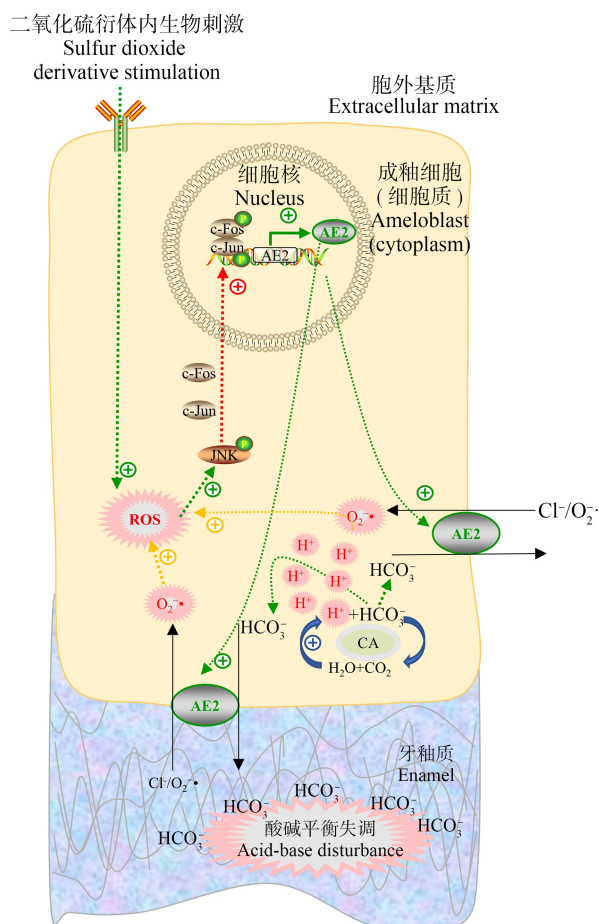


图 4 二氧化硫体内衍生物通过 ROS/JNK/AP-1 通路诱导成釉细胞 AE2 蛋白表达潜在机制示意图

注:CA 表示碳酸酐酶。

Fig. 4 Schematic diagram of the potential mechanism of internal sulfur dioxide derivatives inducing AE2 protein expression in ameloblasts through ROS/JNK/AP-1 pathway

Note: CA stands for carbonic anhydrase.

- [J]. *Journal of Hygiene Research*, 1993, 22(3): 148-151, 190 (in Chinese)
- [10] Gao Y, Liang C, Zhang J H, et al. Combination of fluoride and SO₂ induce DNA damage and morphological alterations in male rat kidney [J]. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 2018, 50(2): 734-744
- [11] Zhang J H, Liang C, Ma J J, et al. Effects of sodium fluoride and sulfur dioxide on oxidative stress and antioxidant defenses in rat testes [J]. *Fluoride*, 2006, 39(3): 185-190
- [12] 孟紫强, 李君灵. 二氧化硫生物学研究进展: 从毒理学到生理学[J]. *生理学报*, 2011, 63(6): 593-600
- Meng Z Q, Li J L. Progress in sulfur dioxide biology: From toxicology to physiology [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2011, 63(6): 593-600 (in Chinese)
- [13] 孟紫强. 氧化应激效应与 SO₂ 全身性毒作用研究[J]. *中国公共卫生*, 2003, 19(12): 1422-1424
- Meng Z Q. Oxidation stress effects of SO₂ and its systemic toxin [J]. *China Public Health*, 2003, 19(12): 1422-1424 (in Chinese)
- [14] Houari S, Babajko S, Liodice S, et al. Micro-dissection of enamel organ from mandibular incisor of rats exposed to environmental toxicants [J]. *Journal of Visualized Experiments*, 2018(133): 57081
- [15] 褚启龙. 氧化应激与细胞凋亡关系的研究进展[J]. *卫生研究*, 2003, 32(3): 276-279
- Chu Q L. Research progress on oxidative stress and apoptosis [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2003, 32(3): 276-279 (in Chinese)
- [16] 武冬梅. 二氧化硫对小鼠不同组织器官的氧化应激、DNA 损伤及细胞因子的影响[D]. 太原: 山西大学, 2004: 41-43
- Wu D M. Effects of sulfur dioxide inhalation on the oxidative stress, DNA damage in tissues and cytokines in serum of mice [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2004: 41-43 (in Chinese)
- [17] 孟紫强, 白巨利. 二氧化硫吸入对小鼠9种脏器谷胱甘肽过氧化物酶活性的影响[J]. *环境与职业医学*, 2003, 20(1): 6-9
- Meng Z Q, Bai J L. Effect of sulfur dioxide inhalation on the activities of glutathione peroxidase in nine organs of mice [J]. *Journal of Labour Medicine*, 2003, 20(1): 6-9 (in Chinese)
- [18] 孟紫强, 耿红, 秦国华, 等. 二氧化硫吸入对小鼠心脏脂质过氧化和抗氧化指标的影响[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2003, 21(6): 448-449
- [19] 孟紫强, 张波, 秦国华. 二氧化硫对小鼠不同组织器官的氧化损伤作用[J]. *环境科学学报*, 2001, 21(6): 768-773
- Meng Z Q, Zhang B, Qin G H. Oxidation damage of sulfur dioxide on various organs of mice [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2001, 21(6): 768-773 (in Chinese)
- [20] Kunsch C, Medford R M. Oxidative stress as a regulator of gene expression in the vasculature [J]. *Circulation Research*, 1999, 85(8): 753-766
- [21] 朱建伟. MAPK/纤调蛋白信号通路在氧化应激介导慢性胰腺炎纤维化中的机制研究[D]. 上海: 中国人民解放军海军军医大学, 2018: 42-46
- Zhu J W. The role of MAPK/fibromodulin pathway in pancreatic fibrosis induced by oxidative stress [D]. Shanghai: Naval Medical University, 2018: 42-46 (in Chinese)
- [22] 李春雷. 理肺汤干预慢性阻塞性肺病通过 MAPK/AP-1 信号通路缓解氧化应激状态机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2017: 45-55
- [23] Turi J L, Jaspers I, Dailey L A, et al. Oxidative stress activates anion exchange protein 2 and AP-1 in airway epithelial cells [J]. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 2002, 283(4): L791-L798
- [24] 饶胜芳. 高糖诱导血管内皮细胞 AE2 表达的动态改变及机制[D]. 南昌: 南昌大学, 2009: 35-43
- Rao S F. Dynamic change and mechanism of anion exchange 2 (AE2) expression induced by high glucose in vascular endothelial cells [D]. Nanchang: Nanchang University, 2009: 35-43 (in Chinese)
- [25] 李丽. 阴离子交换蛋白-2(AE2)在2型糖尿病大鼠血管内皮功能失常中的作用及其机制[D]. 南昌: 南昌大学, 2009: 25-37
- Li L. Effects of anion exchanger-2 on endothelial dysfunction in type 2 diabetic rats and its possible mechanisms [D]. Nanchang: Nanchang University, 2009: 25-37 (in Chinese)
- [26] Bronckers A L J J, Lyaruu D M, Jansen I D C, et al. Localization and function of the anion exchanger Ae2 in developing teeth and orofacial bone in rodents [J]. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 2009, 312B(4): 375-387
- [27] Damkier H H, Josephsen K, Takano Y, et al. Fluctuations in surface pH of maturing rat incisor enamel are a result of cycles of H⁺-secretion by ameloblasts and variations in enamel buffer characteristics [J]. *Bone*, 2014, 60: 227-234
- [28] Lyaruu D M, Bronckers A L J J, Mulder L, et al. The anion exchanger Ae2 is required for enamel maturation in mouse teeth [J]. *Matrix Biology: Journal of the Interna-*

- tional Society for Matrix Biology, 2008, 27(2): 119-127
- [29] Ghio A J, Nozik-Grayck E, Turi J, et al. Superoxide-dependent iron uptake: A new role for anion exchange protein 2 [J]. American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 2003, 29(6): 653-660
- [30] Pan X Y, Chen G Q, Cai L, et al. Anion exchanger 2 mediates the action of arsenic trioxide [J]. British Journal of Haematology, 2006, 134(5): 491-499
- [31] Huang Q R, Li Q, Chen Y H, et al. Involvement of anion exchanger-2 in apoptosis of endothelial cells induced by high glucose through an mPTP-ROS-Caspase-3 dependent pathway [J]. Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death, 2010, 15(6): 693-704
- [32] Wang T, Zhao L, Yang Y, et al. EGR1 is critical for gas-trin-dependent upregulation of anion exchanger 2 in gastric cancer cells [J]. The FEBS Journal, 2013, 280(1): 174-183
- [33] Zhang L J, Lu R, Song Y N, et al. Knockdown of anion exchanger 2 suppressed the growth of ovarian cancer cells via mTOR/p70S6K1 signaling [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 6362
- [34] Wu T T, Hsieh Y H, Wu C C, et al. Overexpression of anion exchanger 2 in human hepatocellular carcinoma [J]. The Chinese Journal of Physiology, 2006, 49(4): 192-198
- [35] Hwang J M, Kao S H, Hsieh Y H, et al. Reduction of anion exchanger 2 expression induces apoptosis of human hepatocellular carcinoma cells [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 2009, 327(1-2): 135-144 ◆