

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.37.023 [http://www.crter.org]

张亚楼, 赵阳, 唐莉, 吴起清, 白生宾, 钟近洁. 氟暴露患者外周血中MCM3的表达及肝肾功能变化[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(37):6682-6688.

氟暴露患者外周血中MCM3的表达及肝肾功能变化**☆

张亚楼¹, 赵阳², 唐莉³, 吴起清¹, 白生宾¹, 钟近洁¹(¹新疆医科大学基础医学院组织与胚胎学教研室, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011; ²新疆医科大学第一附属医院, ³烧伤整形科, ³传染病中心, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011)

文章亮点:

- 1 以流行病学调查检测 MCM3 基因在轻度氟暴露者外周血中的表达情况。
- 2 将肝肾功能测定与荧光定量 PCR 方法结合用于评估氟暴露人群现场血标本。
- 3 文章首次认为 MCM 家族基因可能表达于氟暴露者的外周血中, 探讨了该分子在轻度氟暴露患者外周血单个核细胞中的表达情况, 为该分子的诊断意义做出初步探索。

关键词:

组织构建; 组织构建临床实践; 氟; MCM3 基因; 定量反转录聚合酶链反应; 肝功能; 肾功能; 国家自然科学基金

主题词:

氟; 基因; 地方病; 反转录聚合酶链反应

基金资助:

国家自然科学基金资助(30860249, 81102084)*

摘要

背景: 前期研究发现 MCM3 与氟中毒相关, 但其在氟中毒早期暴露者中的表达情况尚不清楚。

目的: 分析氟暴露患者及对照人群外周血中 MCM3 mRNA 的表达量。

方法: 选取饮水型氟中毒轻度患者(暴露组)、对照人群(非暴露组)各 11 例, 采用 SYBRGreen1 嵌合荧光法实时定量 PCR 检测外周血单个核细胞中 MCM3 mRNA 的表达, 同时测定两组肝肾功能指标。

结果与结论: 暴露组及非暴露组 MCM3 mRNA 表达量分别为 $0.573\ 60 \pm 0.102\ 59$ 、 $0.550\ 0 \pm 0.171\ 81$, 两组差异无显著性意义($P > 0.05$)。所测的肝肾功能指标在两组中差异无显著性意义。结果显示轻度氟暴露对患者外周血单个核细胞中 MCM3 mRNA 表达无显著影响。氟对暴露者肝、肾功能的影响需要选取更多的指标综合分析。

Expression of minichromosome maintenance 3 from the peripheral blood of fluorosis patients and the liver and renal function

Zhang Ya-lou¹, Zhao Yang², Tang Li³, Wu Qi-qing¹, Bai Sheng-bin¹, Zhong Jin-jie¹ (¹Department of Histology and Embryology, Basic Medical Institute, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China; ²Department of Burns and Plastic Surgery, ³Infectious Disease Centre, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, Xinjiang Uygur Autonomous Region, China)

Abstract

BACKGROUND: Previous studies have shown that minichromosome maintenance 3 is related with fluorosis, but the expression of minichromosome maintenance 3 in fluorosis patients is not clear yet.

OBJECTIVE: To analyze the mRNA expression level of minichromosome maintenance 3 in peripheral blood from patients exposed to fluoride and normal controls.

METHODS: Eleven patients with mild fluorosis by drinking water (exposure group) and 11 cases of control (non-exposure group) were selected for research. SYBRGreen1 real-time quantitative PCR was used to determine the mRNA expression of minichromosome maintenance 3 in peripheral blood mononuclear cells, and the liver and renal function indicators were detected.

RESULTS AND CONCLUSION: mRNA expressions of minichromosome maintenance 3 in the exposure group and non-exposure group were $(0.573\ 60 \pm 0.102\ 59)$ and $(0.550\ 0 \pm 0.171\ 81)$, respectively, and there was no significant difference between two groups ($P > 0.05$). There were no significant differences in the liver and renal function indicators between two groups. The results indicate that mild fluorosis has no significant effect on mRNA expression of minichromosome maintenance 3 in the peripheral blood mononuclear cells. More indicators are needed to compressively analyze the effect of fluoride on the liver and renal functions.

Subject headings: fluorine; genes; endemic diseases; reverse transcriptase polymerase chain reaction

Funding: National Natural Science Foundation of China, No. 30860249*, 81102084*

张亚楼☆, 男, 1976年生, 重庆市人, 汉族, 2010年新疆医科大学毕业, 博士, 副教授, 主要从事分子生物学诊断技术研究。
zhangyalou12@yahoo.com.cn

并列第一作者: 赵阳, 男, 1974年生, 新疆维吾尔自治区哈密市人, 汉族, 南方医科大学在读博士, 副主任医师, 主要从事细胞信号转导异常与疾病研究。
gorgezy@163.com

通讯作者: 钟近洁, 教授, 新疆医科大学基础医学院组织与胚胎学教研室, 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市 830011
zhongjinjie@gmail.com

中图分类号: R318
文献标识码: B
文章编号: 2095-4344
(2013)37-06682-07

收稿日期: 2013-03-07
修回日期: 2013-04-28
(201303088/M·C)

Zhang Ya-lou☆, M.D.,
Associate professor,
Department of Histology and
Embryology, Basic Medical
Institute, Xinjiang Medical
University, Urumqi 830011,
Xinjiang Uygur Autonomous
Region, China
zhangyalou12@yahoo.com.cn

Zhao Yang☆, Studying for
doctorate, Associate chief
physician, Department of Burns
and Plastic Surgery, the First
Affiliated Hospital of Xinjiang
Medical University, Urumqi
830011, Xinjiang Uygur
Autonomous Region, China
gorgezy@163.com

Zhang Ya-lou and Zhao Yang
contributed equally to this
study.

Corresponding author: Zhong
Jin-jie, Professor, Department
of Histology and Embryology,
Basic Medical Institute, Xinjiang
Medical University, Urumqi
830011, Xinjiang Uygur
Autonomous Region, China
zhongjinjie@gmail.com

Received: 2013-03-07
Accepted: 2013-04-28

Zhang YL, Zhao Y, Tang L, Wu QQ, Bai SB, Zhong JJ. Expression of minichromosome maintenance 3 from the peripheral blood of fluorosis patients and the liver and renal function. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(37): 6682-6688.

0 引言 Introduction

地方性氟中毒(地氟病)对人体损害主要是氟斑牙和氟骨症,同时会对患者的肝肾功能造成损害,该病已经受到中国政府日益关注。虽然近年来对地氟病的研究取得了较大进展,但其发病机制仍未完全清楚,在研发无创及微创早期诊断技术方面仍未获得突破性进展^[1-3]。课题组成员邵红等^[4-5]前期研究从病情程度不同的氟中毒患者和正常对照者外周血淋巴细胞中提取RNA,进行反转录和³³P-探针标记,纯化后与cDNA基因芯片杂交,进行差异表达基因的筛选:与对照组比较,轻度组有32个基因表达上调(Ratio值为2.003 9-4.046 7),有32个基因表达下调(Ratio值为0.091 8-0.501 0);重度组有53个基因表达上调(Ratio值为2.004 0-3.718 0),有20个基因表达下调(Ratio值为0.088 6-0.503 4);重度组与轻度组比较仅有4个基因表达上调(MCM, RAS, COL9A3, TM9SF1, Ratio值为2.363 0-2.704 0),11个基因表达下调(Ratio值为0.334 1-0.495 0)。重度组与轻度组比较仅有4个基因上调(Ratio值为2.363 0-2.704 0);11个基因下调(Ratio值为0.334 1-0.495 0);同时 Ras-related GTP-binding protein 和 transmembrane 9 superfamily member 1基因在轻度组和重度组与对照组比较时均呈现出上调(Ratio值为2.046 2-2.993 6),有14个基因表达均出现下调(Ratio值为0.091 8-0.503 4)。重度组与对照组比较有2个基因(MCM3和COL9A3)上调(Ratio值为3.102 6-3.334 2)。微小染色体维系蛋白3(minichromosome maintenance 3, MCM3)基因是其中表达量高,最具有代表性的数个较有价值的候选基因之一。随后,又在小鼠原代培养成骨细胞染氟实验中用Real-time PCR检测各组(0, 5, 10, 20, 40 mg/L)MCM3 mRNA表达,5, 10, 20 mg/L组表达量高于对照组和40 mg/L组,以5 mg/L组表达量最高,随着剂量增加,基因表达量降低^[6]。张亚楼等^[7]体外实验培养人成骨肉瘤细胞(Saos-2),建立染氟模型,氟培养24 h后收集细胞,实时荧光定量PCR测定成骨细胞

MCM3 mRNA的表达,在10 mg/L氟化钠组时表达最高。以上研究结果均提示该基因与地氟病关系密切。同时也产生过量氟能否引起血细胞中尤其是有细胞核的粒细胞MCM3高表达这一科学问题。目前关于MCM家族成员在治疗和预后中的生物标志意义已有报道^[8],而对该基因在氟中毒人群中的诊断价值尚未见验证,这次研究拟探索该基因成为氟中毒患者早期诊断标志物的可能性。

在动物实验中已经证实过量氟对肝肾功能的影响^[9-11],但在暴露人群中尚未有定论,文章分析MCM3基因表达的同时也分析了氟暴露对人体肝肾功能的影响。

1 对象和方法 Subjects and methods

设计:整群抽样,1:1配比的病例对照研究。

时间及地点:实验于2008年8月至2009年10月在新疆奎屯地区采样,样本检测在新疆生产建设兵团疾病预防控制中心检验科完成。

对象:在新疆生产建设兵团农7师123团和128团(改水前水氟含量3.4-17.0 mg/L,曾经为氟中毒疾病高发区)选择氟暴露组人群。氟中毒诊断根据X射线拍片结合本人居住年限、自觉症状和临床体征,按2009年卫生部下发《饮水型地方性氟中毒监测方案(试行)》进行诊断。从自愿参与调查的人群中选择出11名轻度氟暴露者作为暴露组,男女不限,中位年龄(53.45±14.58)岁。

采用1:1配比的病例对照研究方法(病区和非病区调查对象具有同性别、年龄相差不超过5岁、相近的生活饮食习惯,均为汉族)。在非病区新疆生产建设兵团农七师131团选择11名健康者作为非暴露组,中位年龄(57.86±12.12)岁。非暴露组为生活在非氟中毒病区10年以上。对于近期患有感冒、发热、感染者予以排除。

以往调查中发现的重度患者和中度患者,基本已经病逝或迁移至内地居住,故这次调查中未能收集到中、重度暴露者的血样。所有志愿者均当面签署了书面知情同意

书。

测定暴露组和非暴露组外周血MCM3基因的表达及肝肾功能所用主要试剂和仪器:

试剂及仪器	来源
RNAprotect® Cell reagent, RNeasy kit, First Strand 试剂盒	QIAGEN
SYBR®Premix Ex Taq™	TAKARA
高速离心机	上海安亭
TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice	TaKaRa Code: TP600
NANODROP 紫外分光光度计	Thermo scientific, 美国
可见紫外凝胶扫描分析系统	BIO-RAD, 美国

方法:

血样的采集与保存:

外周血单个核细胞分离: 外周静脉采血后, 按照人淋巴细胞分离液说明书进行离心, 分离细胞。离心后将白膜层细胞小心吸出, 2 500 r/min, 离心10 min后获得细胞团块。

保存单个核细胞: 在沉淀的细胞团上加入10倍体积的RNAprotect® Cell reagent液体保护剂, 用加样器吹打混匀后立即将样品于冰箱-18 °C冷冻保存。运输过程中用冰袋、冰排覆盖样本, 4 h内到达实验室并将样品置于-80 °C超低温冰箱内贮存。

总RNA提取: 分别取各组细胞, 加入RNA提取液, 按照说明书提取细胞总RNA, 用试剂盒提取RNA后, 在波长260, 280 nm时, 紫外可见分光光度计测定吸光度值(A)。当 A_{260}/A_{280} 比值在1.8-2.1时, 表明没有污染。在1%的琼脂糖胶上观察28 s和18 s的亮度比值约为2:1。取总RNA 1 µg, 反转录合成cDNA, 置于-70 °C冰箱。

荧光定量PCR扩增: 取cDNA 2 µL, 与SYBR®GREEN I 染料反应, real-time RT-PCR仪上进行定量分析。反应体系: 总反应体积25 µL, 内含cDNA 2 µL, 上、下游引物(20 pmol/L)各0.5 µL, SYBR®Premix Ex Taq™ 12.5 µL(2×), dH₂O 9.5 µL。反转录后定量扩增MCM3基因。管家基因采用actin, 管家基因和MCM3基因的引物序列及扩增片段大小和Tm值详见表1。以HL60RNA(500 ng)反转录获得的cDNA作为标准品, 用EASYDilution分别按10倍梯度稀释(10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 倍)和作为模板, 分别制作管家基因(Actin)和目的基因(MCM3)的标准曲线。每个样品设2孔, 每次扩增均设对照。将反转录所得样品cDNA分别在管家基因、目的基因标准曲线上定量, 并进行相对表达量分析。用样品的相对拷贝数与GAPDH相对拷贝数的比值表示基因表达结果。扩增完毕后, 进行熔解曲线分析, 检测产物的特异性。

计算相对表达量: 以目的基因扩增片段灰度/ β -actin

基因扩增片段灰度比值, 为该样品待测基因mRNA水平。

表1 β -actin 基因和 MCM3 基因 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences of β -actin and minichromosome maintenance 3

基因名称	引物名称	引物序列	Tm 值 (°C)	长度 (bp)
Actin(NM- 001101)	Actin -F	5'- TGG CAC CCA GCA CAA TGA A -3'	68.1	186
	Actin -R	5'- CTA AGT CAT AGT CCG CCT AGAAGC A -3'	69.2	
MCM3(NM-002388)	MCM3 -F	5'- TGG GGT GAG GAA AGA GGA GA -3'	62.09	89
	MCM3 -R	5'- ATG GGA AGT AGG GCG GAT G -3'	62.15	

肝功、肾功测定: 抽取暴露组和非暴露组的清晨空腹外周静脉血 5 mL, 将采集的静脉血3 000 r/min离心 5 min后, 吸取血清分装于Ep管中, -80 °C保存, HITACHI7170A全自动生化分析仪上测定总胆红素、直接胆红素、间接胆红素、谷丙转氨酶、谷草转氨酶、碱性磷酸酶、谷氨酰转氨酶、尿素、肌酐、尿酸水平。

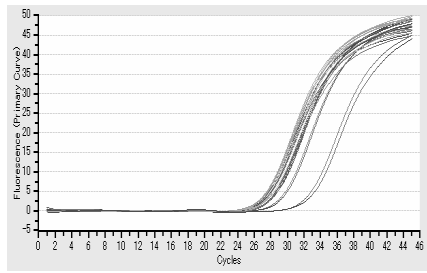
统计学分析: 在计算机上用SPSS 12.0统计软件对数据进行统计分析, 计量资料方差齐时采用t 检验分析, 方差不齐时采用秩和检验。

2 结果 Results

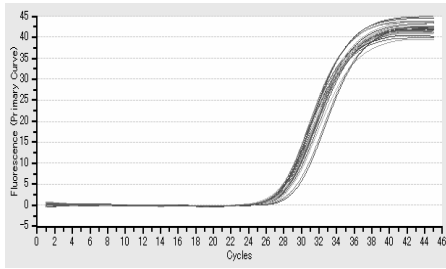
2.1 目的基因MCM3扩增曲线和熔解曲线 目的基因MCM3扩增曲线和熔解曲线见图1。

Real-Time PCR检测结果显示, 以HL60 RNA (500 mg/L)反转录的cDNA作为标准品。从外周血淋巴细胞提取的RNA 中可以扩增出管家基因 β -actin 和目的基因MCM3, 得到标准曲线的方程分别为 $Y = -3.339 * \text{LOG}(X) + 30.49$, 相关系数 $R^2 = 0.998$, 扩增效率(Eff)=99.3%; $Y = -3.387 * \text{LOG}(X) + 37.92$, 相关系数 $R^2 = 0.999$, 扩增效率(Eff)=97.4%。管家基因 β -actin与目的基因MCM3的相关系数 R^2 均大于0.99, 标准曲线显示线性关系良好。扩增效率较好: 管家基因 β -actin与目的基因MCM3的扩增效率(E)均在0.9-1.1范围之内。

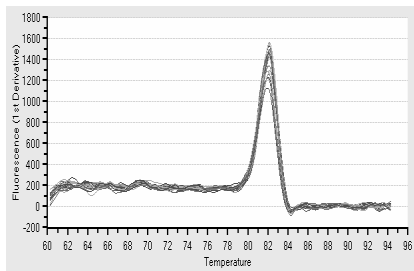
熔解曲线峰形单一, 说明反应特异性好。阴性对照反应未检测出目的片段荧光信号, 或者扩增循环数在35次以上, 表明反应体系无污染。



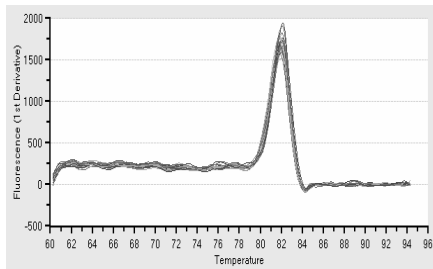
A: 目的基因 MCM3 暴露组样品扩增曲线图



B: 目的基因 MCM3 非暴露组样品扩增曲线图



C: 目的基因 MCM3 暴露组样品熔解曲线图



D: 目的基因 MCM3 非暴露组样品熔解曲线图

注: 在实时荧光定量 PCR 完成后, 自动生成荧光强度曲线, 该荧光强度曲线反映各样本不同循环时的荧光强度。内参照基因和目的基因扩增曲线光滑, 表明扩增结果可靠。熔解曲线未见杂峰, 提示目的基因序列扩增特异性好, 测定结果可信。

图 1 内参照和目的基因扩增曲线和熔解曲线

Figure 1 Amplification curve and melting curve of target gene

3149#样品中表达量最低, 仅0.03; 在非暴露组3028#样品中表达量最高, 表达量为0.94, 在非暴露组3025#样品中表达量最低, 为0.32; 具体结果见表2, 3。

表 2 暴露组 11 个样品 MCM3 基因相对表达量

Table 2 Relative expression of minichromosome maintenance 3 in the 11 samples of the exposure group

样品	管家基因 Actin		目的基因 MCM3		
	定量结果	相对值	定量结果	校正后比值	相对表达量
3013#	2 135	1.00	1 085	0.51	1.00
3069#	1 527	0.71	838	0.55	1.08
3077#	1 037	0.49	564	0.54	1.07
3086#	1 191	0.56	817	0.69	1.34
3087#	2 820	1.32	1 020	0.36	0.71
3136#	772	0.36	461	0.60	1.17
3138#	1 392	0.65	1 010	0.73	1.42
3139#	1 239	0.58	613	0.49	0.97
3144#	1 224	0.57	806	0.66	1.29
3146#	394	0.18	227	0.58	1.13
3149#	901	0.42	23	0.03	0.05

注: 该基因在暴露组 3138#样品中表达量最高, 表达量为 0.73, 在暴露组 3149#样品中表达量最低, 仅 0.03。

表 3 非暴露组 11 个样品 MCM3 基因相对表达量

Table 3 Relative expression of minichromosome maintenance 3 in the 11 samples of the non-exposure group

样品	管家基因 Actin		目的基因 MCM3		
	定量结果	相对值	定量结果	校正后比值	相对表达量
3025#	2 328	1.00	736	0.32	1.00
3028#	886	0.38	837	0.94	2.95
3040#	107	0.05	39	0.36	1.14
3310#	1 227	0.53	638	0.52	1.62
3312#	230	0.10	142	0.62	1.93
3318#	1 326	0.57	900	0.68	2.12
3320#	1 131	0.49	549	0.49	1.52
3322#	672	0.29	283	0.42	1.32
3326#	610	0.26	354	0.58	1.81
3327#	1 225	0.53	595	0.49	1.52
3333#	1 105	0.47	699	0.63	1.98

注: 该基因在非暴露组 3028#样品中表达量最高, 表达量为 0.94, 在非暴露组 3025#样品中表达量最低, 为 0.32。

由于暴露组中3149#值远低于其他数值, 且在现场取血过程由于采血困难, RNA有一定降解, 故将其去除后取平均值与非暴露组比较。暴露组MCM3 mRNA 表达水平(0.573 6±0.102 59) 高于非暴露组人群的水平(0.550 0±0.171 81), 差异无显著性意义(P > 0.05), 见表4。

2.2 MCM3基因表达量分析结果 该基因在暴露组 3138#样品中表达量最高, 表达量为0.73, 在暴露组

表4 MCM3 mRNA 在外周血单个核细胞中的表达

Table 4 Expression of minichromosome maintenance 3 in peripheral blood mononuclear cells ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	MCM3
非暴露组	11	0.550 00±0.17 181
暴露组	11	0.573 60±0.102 59
t		0.392
P(双侧)		0.699

2.3 氟中毒暴露组和非暴露组肝、肾功各指标的检测结果比较 见表5。虽然可以在暴露组中见到总蛋白、球蛋白、谷丙转氨酶、谷草转氨酶超过正常值上限者比非暴露组多。而且这些值多为高于正常值少许, 临床意义较小。经比较在两组间见肝、肾功能差异无显著性意义。

表5 氟中毒暴露组和非暴露组肝、肾功能检测结果

Table 5 Results of liver and renal functions of patients with fluorosis between exposure and non-exposure groups

检测指标	组别	$\bar{x}\pm s$
总胆红素($\mu\text{mol/L}$)	暴露组	13.808 4±2.988 1
	非暴露组	14.440 5±4.566 7
直接胆红素($\mu\text{mol/L}$)	暴露组	4.770 0±1.359 9
	非暴露组	3.858 5±1.716 3
间接胆红素($\mu\text{mol/L}$)	暴露组	11.966 7±1.961 5
	非暴露组	11.427 2±2.473 4
谷丙转氨酶(U/L)	暴露组	36.053 3±32.584 6
	非暴露组	47.030 8±32.037 8
谷草转氨酶(U/L)	暴露组	49.311 1±49.764 4
	非暴露组	51.223 1±41.117 3
碱性磷酸酶(U/L)	暴露组	96.544 4±32.234 6
	非暴露组	79.138 5±28.235 9
谷氨酰转氨酶(U/L)	暴露组	20.966 7±9.299 6
	非暴露组	35.638 5±32.026 7
尿素(mmol/L)	暴露组	6.421 1±1.441 8
	非暴露组	6.064 5±1.152 8
肌酐($\mu\text{mol/L}$)	暴露组	77.211 1±20.791 1
	非暴露组	80.538 5±14.616 7
尿酸($\mu\text{mol/L}$)	暴露组	378.000 0±36.773 0
	非暴露组	349.461 5±79.598 6

P 值均> 0.05。

注: 未能显示出氟对人群肾脏、肝脏功能的损害作用。

在细胞周期领域得到广泛的研究。其中MCMs是DNA自我复制过程所必须的关键蛋白^[12-13]。MCMs主要分布于细胞核内,与未复制的染色质相关^[14-15]。MCM3是MCMs家族中的一员^[16]。MCM2、MCM3、MCM5之间能形成稳定的复合物,时间是G₁期^[17-18]。MCM3有其独特的DNA序列,对于MCM其他成员的聚合具有早期定位的作用^[19]。当MCM3进入细胞核后可以与染色质紧密结合,促使DNA合成的启动,而S期结束后MCM3被磷酸化降解以确保下一轮复制不会重新开始。这样可以在复制后去除一个必须的成分,从而阻止多次复制循环的发生,同时提供一个反馈环,使复制的起始依赖于经历整个细胞分裂过程^[20-22]。正常生长条件下,MCM3与MCM家族其他分子一同参与细胞的生长调节与控制,MCM3的mRNA在正常组织中的细胞中处于较低水平的表达,例如小肠、脾、结肠和甲状腺等^[23-25]。对于生长旺盛状态以及代谢、修复频繁的细胞或组织,尤其是恶性肿瘤中如宫颈癌,结肠癌和甲状腺癌等,MCM3的表达显著增强^[26-29]。长期过量氟是否能引起人体内细胞复制增加从而引起MCM3基因的高表达,及其表达特征均未见报道。

钟近洁等^[6, 30]利用荧光定量PCR和免疫组织化学法发现氟作用于成骨细胞后可以影响MCM3的基因表达,各实验组MCM3阳性细胞数、阳性表达强度、范围,均强于或大于正常非暴露组,其中10 mg/L组阳性表达细胞数最多。定量PCR的结果显示:小鼠组以5 mg/L组表达量最高,是对照组的2.54倍;人细胞组以2.5 mg/L和5 mg/L组最高,是非暴露组的1.21倍,随着染毒剂量的增加,MCM3的mRNA量减少,显示氟对于MCM3在成骨细胞中的表达有促增殖的作用,并认为这种作用可能是氟直接作用于MCM3的结果。但是这次研究中发现患病组中MCM3的mRNA只是轻度增高,与上述结果存在差异,可能与MCM3基因自身保守稳定表达有关。

中、重度暴露者目前已经很难发现,样本难以获得。基于以上结果,作者认为检测MCM3基因的mRNA表达在一定程度上反应氟中毒患者的患病情况。从在两组人群中的结果显示:尚不能认为该指标能作为氟中毒早期诊断标志分子,尚需探索其他形式的诊断指标。本研究缺乏典型病例,尤其是重度暴露者,今后应采集典型临床样本来深入研究MCM3 mRNA 表达与氟中毒的关系。但是中重度暴露者的研究结果是不能作为早期诊断的理论依据的,其结果与病情的发展和预后相关。

摄入大剂量的氟会对实验动物的肝肾功能产生损害,对此已经多次得到验证^[31-33]。实验动物摄入氟的剂量往往比较大,在现实生活中难以找到如此高剂量的生活饮用水。摄入含过量氟的生活饮用水是否会引起人肝脏损害还存在争论。Michael等^[34]调查饮用高氟水对人体软组织功能的影响时发现,氟可引起蛋白质合成障

3 讨论 Discussion

DNA复制的精确执行依赖大量的蛋白,这些蛋白已

碍,血清谷丙转氨酶和谷草转氨酶活力升高;而印度学者的报道该国氟中毒人群中碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、谷草转氨酶和谷丙转氨酶均升高^[35],当地水氟浓度高达 5.9–24.5 mg/L,中国目前很难见到如此高氟的生活饮用水;但也有相反的报道,如梁超柯等^[36]分析了6个不同饮水氟浓度地区的成人血清中总蛋白、白蛋白、谷草转氨酶、总胆红素等肝功能指标,均未发现显著性改变;即使生活在饮水氟浓度为 1.5–23.0 mg/L(平均 8.87 mg/L)地区的人群,也未观察到肝脏损害^[37]。Xiong 和丁浩敏等^[38–39]观察了饮水型氟中毒对儿童肝脏和肾脏功能的影响,发现仅提高了肝脏中的乳酸脱氢酶活力,而对血清总蛋白和白蛋白浓度,血清丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶活力的差异无显著性意义。本研究在成人中未观察乳酸脱氢酶的变化,观察到其他的结果与丁浩敏在儿童中调查的结果类似。而且Xiong 等^[38]还发现尿N-乙酰-β-氨基葡萄糖苷酶和尿γ-谷氨酰转肽酶在中、重度暴露组中显著增高,并以此反映出肾脏功能受损。N-乙酰-β-D氨基葡萄糖苷酶广泛存在于各种组织器官、体液、血细胞的溶酶体中,是一种高相对分子质量的溶酶体酶中的一种酸性水解酶,近端肾小管上皮细胞中含量特别丰富,尿中升高主要反映肾小管损伤^[40–42]。目前只有白雪涛等^[43]在大鼠氟中毒短期模型(高氟水,含氟50 mg/L)中发现,尿中N-乙酰-β-D氨基葡萄糖苷酶活力显著高于对照组,而且随时间是呈下降趋势的。显示该指标可能对氟中毒肾损害有一定提示意义。γ-谷氨酰转肽酶存在人体许多组织中,以肾脏中含量最高,主要分布在近端肾小管刷状缘与髓攀。尿液γ-谷氨酰转肽酶增高见于:①肾小管损伤,②肾小球病^[44–46]。已经有报道氟可以提高氟中毒大鼠模型中尿γ-谷氨酰转肽酶的活性^[47–48],尚未见氟暴露成年人群流行病学报道。由于实验中未检测上述两指标,而是检测肾脏功能的常规指标,并且检测对象是成人,未能显示出氟对人群肾脏功能的损害作用。而以上2种指标并非诊断肝肾损伤的特异性指标,一般作为辅助诊断的参考用。由于儿童的肾功能尚未发育成熟,排泄解毒能力差,可能过量氟对儿童肾脏损害更明显。氟中毒对肝、肾功能的影响需要更多更全面的指标来进行评价。今后扩大样本后,需要充分检测肝肾特异性指标,以对氟中毒的肝、肾功能损害及机制进一步的研究。

氟中毒的早期诊断,是研究热点,文章探讨了氟对暴露者外周血MCM3基因表达RNA水平及肝肾功能的影响,在所实验的范围内未能发现有特别诊断意义的指标。目前全国高氟地区均进行了改水工程,尤其这次调查的当地居民的饮水卫生有较大的提高,水氟含量往往以轻度超标为主,加之近年来居民生活水平明显提高,膳食搭配合理,营养状态良好,以致一些暴露者的病变有不同程度的康复。对改水后,轻度暴露患者的早

期诊断技术的探索将是今后研究的热点。

致谢: 特别向中国疾病预防控制中心农村改水办和新疆生产建设兵团疾病预防控制中心地方病科的领导和专家表示感谢。

作者贡献: 实验设计为钟近洁,实验实施为张亚楼、赵阳、唐莉、吴起清、白生宾。实验评估为钟近洁,资料收集为唐莉、吴起清、白生宾。张亚楼和赵阳成文,钟近洁审校,张亚楼和赵阳对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 所有志愿者均签署了书面知情同意书。

学术术语: 复制起始-细胞若要分裂,必先复制其DNA。这个过程在DNA上的一个特殊位点上开始,称之为“起始位点”,相关的酶作用于这个位点,DNA的双链被分开,复制随即开始。起始位点包含一段可以被复制启动蛋白识别的DNA序列。这些启动蛋白吸引其他的蛋白质把DNA的双链打开并开启复制叉。启动蛋白吸引其他相关蛋白组成了前复制复合物,它可以再起始位点打开DNA链并形成一泡。

作者声明: 文章为原创作品,数据准确,内容不涉及泄密,无一稿两投,无抄袭,无内容剽窃,无作者署名争议,无与他人课题以及专利技术的争执,内容真实,文责自负。

4 参考文献 References

- [1] 赵阳,何铁英,张亚楼.氟影响成骨细胞转化生长因子超家族成员表达的传导通路[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(33):085-6089.
- [2] 王骋,张微,赵丽军,等.2010年全国饮水型地方性氟中毒监测报告[J].中国地方病学杂志,2012,31(4):412-418.
- [3] 张亚楼,孙小娜,张丽,等.氟对成人成骨细胞氧化应激和骨连接素表达的影响[J].新疆医科大学学报,2012,35(12):1627-1631,1637.
- [4] 邵红,刘开泰,姚华,等.氟中毒患者外周血淋巴细胞基因表达水平的研究[J].地方病通报,2005,20(2):1-4.
- [5] 邵红,刘开泰,姚华,等.氟中毒相关基因对患者蛋白质合成的影响[J].微量元素与健康研究,2005,22(4):1-4.
- [6] 钟近洁,许永华,姚华,等.氟对成骨细胞中MCM3基因表达的影响[J].中国地方病学杂志,2007,26(2):89-93.
- [7] 张亚楼,刘开泰,刘继文,等.过量氟暴露对成骨细胞微小染色体维系蛋白3及成骨相关基因表达的影响[J].中国地方病学杂志,2010,29(3):267-272.
- [8] Yousaf J, Hills C, Dixit S, et al. Markers of cell division cycle in glioblastoma: significance in prediction of treatment response and patient prognosis. Br J Neurosurg. 2013. [Epub ahead of print]
- [9] 霍梅俊,王金明,姚冰芬,等.不同水平钙对氟中毒大鼠肾脏功能损伤的影响[J].畜牧兽医学报,2012,43(9):1483-1490.
- [10] 张蕾,杨蜀莹,章子贵.硒对氟中毒致大鼠肝脏损伤的干预作用[J].卫生研究,2012,41(4):627-631.
- [11] 刘燕斐,官志忠.慢性氟中毒性肝损伤及其发病机制[J].中国地方病学杂志,2012,31(5):588-590.
- [12] Aparicio T, Megías D, Méndez J. Visualization of the MCM DNA helicase at replication factories before the onset of DNA synthesis. Chromosoma. 2012;121(5):499-507.

- [13] Ray S, Pollard JW. KLF15 negatively regulates estrogen-induced epithelial cell proliferation by inhibition of DNA replication licensing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109(21):E1334-1343.
- [14] Stoeber K, Tlsty TD, Happerfield L, et al. DNA replication licensing and human cell proliferation. *J Cell Sci*. 2001;114(Pt 11):2027-2041.
- [15] Kohl KP, Jones CD, Sekelsky J. Evolution of an MCM complex in flies that promotes meiotic crossovers by blocking BLM helicase. *Science*. 2012;338(6112):1363-1365.
- [16] Braun KA, Breeden LL. Nascent transcription of MCM2-7 is important for nuclear localization of the minichromosome maintenance complex in G1. *Mol Biol Cell*. 2007;18(4):1447-1456.
- [17] Lei M, Kawasaki Y, Tye BK. Physical interactions among Mcm proteins and effects of Mcm dosage on DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1996;16(9):5081-5090.
- [18] Hubbi ME, Luo W, Baek JH, et al. MCM proteins are negative regulators of hypoxia-inducible factor 1. *Mol Cell*. 2011;42(5):700-712.
- [19] Wiebusch L, Uecker R, Hagemeyer C. Human cytomegalovirus prevents replication licensing by inhibiting MCM loading onto chromatin. *EMBO Rep*. 2003;4(1):42-46.
- [20] Sakwe AM, Nguyen T, Athanasopoulos V, et al. Identification and characterization of a novel component of the human minichromosome maintenance complex. *Mol Cell Biol*. 2007; 27(8):3044-3055.
- [21] Ibarra A, Schwob E, Méndez J. Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(26):8956-8961.
- [22] Li J, Deng M, Wei Q, et al. Phosphorylation of MCM3 protein by cyclin E/cyclin-dependent kinase 2 (Cdk2) regulates its function in cell cycle. *J Biol Chem*. 2011;286(46):39776-39785.
- [23] Lin DI, Aggarwal P, Diehl JA. Phosphorylation of MCM3 on Ser-112 regulates its incorporation into the MCM2-7 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(23):8079-8084.
- [24] Nodin B, Fridberg M, Jonsson L, et al. High MCM3 expression is an independent biomarker of poor prognosis and correlates with reduced RBM3 expression in a prospective cohort of malignant melanoma. *Diagn Pathol*. 2012;7:82.
- [25] 秦乐, 牛建华, 刘仕琪, 等. MCM3与Ki-67在甲状腺、癌、结节性甲状腺肿中的表达及意义[J]. 石河子大学学报:自然科学版, 2012, 30(3):356-360.
- [26] Szelachowska J, Dziegiel P, Tarkowski R, et al. Therapeutic radiation induces different changes in expression profiles of metallothionein (MT) mRNA, MT protein, Ki 67 and minichromosome maintenance protein 3 in human rectal adenocarcinoma. *Anticancer Res*. 2012;32(12):5291-5297.
- [27] Wu C, Zhu J, Zhang X. Integrating gene expression and protein-protein interaction network to prioritize cancer-associated genes. *BMC Bioinformatics*. 2012;13:182.
- [28] Gan N, Du Y, Zhang W, et al. Increase of Mcm3 and Mcm4 expression in cervical squamous cell carcinomas. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2010;31(3):291-294.
- [29] Lee YS, Ha SA, Kim HJ, et al. Minichromosome maintenance protein 3 is a candidate proliferation marker in papillary thyroid carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2010;88(1):138-142.
- [30] 钟近洁, 李良忠, 许永华, 等. 不同剂量染氟后成骨细胞增殖行为的实验研究[J]. 中国地方病学杂志, 2006, 26(4):390-393.
- [31] He YQ, Pan Y, Ying LJ, et al. Differential Expression ESTs Associated with Fluorosis in Rats Liver. *Comp Funct Genomics*. 2012;2012:208390.
- [32] Dabrowska E, Balunowska M, Letko R, et al. Ultrastructural study of the mitochondria in the submandibular gland, the pancreas and the liver of young rats, exposed to NaF in drinking water. *Rocz Akad Med Bialymst*. 2004;49 Suppl 1:180-181.
- [33] 张蕾, 杨蜀莹, 章子贵. 硒对氟中毒致大鼠肝脏损伤的干预作用[J]. 卫生研究, 2012, 41(4):627-631.
- [34] Michael M, Barot VV, Chinoy NJ. Investigations of soft tissue functions in fluorotic individuals of north gujarat. *Fluoride*. 1996; 29: 63-71.
- [35] Shashi A, Bhardwaj M. Study on blood biochemical diagnostic indices for hepatic function biomarkers in endemic skeletal fluorosis. *Biol Trace Elem Res*. 2011;143(2):803-814.
- [36] 梁超轲, 李文华, 张淑兰, 等. 人群不同饮水氟浓度接触与血液生化电解质水平分析[J]. 中国公共卫生, 1999, 15(1): 34-36.
- [37] 万桂敏, 陈志, 莫志亚, 等. 地方性氟中毒患者多项检验指标的测定及分析[J]. 中国地方病学杂志, 2001, 20(2):137-139.
- [38] Xiong X, Liu J, He W, et al. Dose-effect relationship between drinking water fluoride levels and damage to liver and kidney functions in children. *Environ Res*. 2007;103(1):112-116.
- [39] 丁浩敏, 刘俊玲, 夏涛, 等. 饮水氟浓度与儿童肝损害的剂量效应关系[J]. 环境与健康杂志, 2005, 22 (4):243-245.
- [40] 王寅, 童俊容, 何凤, 等. 尿NGAL和N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶对IgA肾病早期诊断的价值研究[J]. 中国卫生检验杂志, 2011, 21(11):2671-2673.
- [41] 凌侠, 王衍晶. N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶在肾病早查中的临床意义[J]. 临床军医杂志, 2011, 39(3):509-510.
- [42] 肖春燕. 尿 mALB 与 NAG 联合检测对糖尿病肾病早期的诊断意义[J]. 临床和实验医学杂志, 2012, 11(2):101-102.
- [43] 白雪涛, 史志长, 吴瑞. 高氟摄入对大鼠骨和牙氟含量及血、尿生化指标的影响[J]. 卫生研究, 1999, 28(6):335-336.
- [44] Panneerselvam L, Subbiah K, Arumugam A, et al. Ferulic acid modulates fluoride-induced oxidative hepatotoxicity in male Wistar rats. *Biol Trace Elem Res*. 2013;151(1):85-91.
- [45] Ralib AM, Pickering JW, Shaw GM, et al. Test characteristics of urinary biomarkers depend on quantitation method in acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol*. 2012;23(2):322-333.
- [46] Blasco V, Wiramus S, Textoris J, et al. Monitoring of plasma creatinine and urinary γ-glutamyl transpeptidase improves detection of acute kidney injury by more than 20%. *Crit Care Med*. 2011;39(1):52-56.
- [47] Yu RA, Xia T, Wang AG, et al. Effects of selenium and zinc on renal oxidative stress and apoptosis induced by fluoride in rats. *Biomed Environ Sci*. 2006;19(6):439-444.
- [48] Santoyo-Sanchez MP, Del Carmen Silva-Lucero M, Arreola-Mendoza L, et al. Effects of acute sodium fluoride exposure on kidney function, water homeostasis, and renal handling of calcium and inorganic phosphate. *Biol Trace Elem Res*. 2013;152(3):367-372.