

The Interaction between Fluoride and Arsenic on the Activity and Morphology of Human Osteoblast

Lei Wang¹, Wuxun Peng^{2*}, Xiang Gong^{2,3}, Jian Wang⁴, Yi Zhang⁵, Shuai Wang¹

¹Statistics Department in Health Information Center of Guizhou Province, Guiyang Guizhou

²Emergency Department of Orthopedics in Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang Guizhou

³Burn Department in Third Hospital of Wuhan City and Wuhan University Yongren Hospital, Wuhan Hubei

⁴School of Mechanical and Electric Engineering in Weifang Vocational College, Weifang Shandong

⁵Zaochunyu Primary school of Kuiwen District, Weifang Shandong

Email: misswanglei@163.com, *595388939@qq.com

Received: Dec. 17th, 2017; accepted: Jan. 2nd, 2018; published: Jan. 8th, 2018

Abstract

Objective: By observing the effect of fluorine and arsenic's combination on activity of human osteoblast *in vitro*, we defined the role they played in bone, and whether they influence bone metabolism or not. **Method:** Culture human osteoblast *in vitro*. When the concentration of fluorine reached 10 mg/L, 1 mg/L, 0.1 mg/L and 0 mg/L respectively, the concentration of arsenic reached 1 mg/L, 0.1 mg/L, 0.01 mg/L and 0 mg/L, they mutually interact on human osteoblasts, and then we observe the change of cell morphology. **Result:** When arsenic concentration of 1 mg/L related with various concentration of fluorine mutual acted, all cells died; when arsenic concentration of 0.1 mg/L part of cells died, at the same time cell morphology was complete, the nucleus was visible, and there were some cell debris around. When arsenic concentration of 0.01 mg/L, 0 mg/L mutually acted with fluorine concentration of 10mg/L in human osteoblast, a few of cells died and a cellular debris can be seen in the microscope. For the osteoblast of other joint groups, the nucleus is complete without obvious cells fragments, and all cells outline is clear. **Conclusion:** The joint action of fluorine and arsenic could arouse a certain degree of increase in toxicity of osteoblast.

Keywords

Fluorine, Arsenic, Human Osteoblast, Cell Activity, Cell Morphology

氟、砷联合对人成骨细胞活性及形态的交互作用

王 蕾¹, 彭吾训^{2*}, 龚 翔^{2,3}, 王 健⁴, 张 祎⁵, 王 帅¹

¹贵州省卫生信息中心统计科, 贵州 贵阳

*通讯作者。

²贵州医科大学附属医院急诊创伤骨科, 贵州 贵阳

³武汉市第三医院暨武汉大学同仁医院烧伤科, 湖北 武汉

⁴潍坊职业学院机电工程学院, 山东 潍坊

⁵奎文区早春园小学, 山东 潍坊

Email: misswanglei@163.com, *595388939@qq.com

收稿日期: 2017年12月17日; 录用日期: 2018年1月2日; 发布日期: 2018年1月8日

摘要

目的: 观察氟、砷联合作用对体外培养人成骨细胞活性的影响, 从而探讨氟、砷对骨的作用, 砷是否对氟骨病有一定的影响。**方法:** 体外培养人成骨细胞, 氟对人成骨细胞的作用终浓度分别为10 mg/L、1 mg/L、0.1 mg/L、0 mg/L, 砷对人成骨细胞的作用终浓度分别为1 mg/L、0.1 mg/L、0.01 mg/L、0 mg/L, 相互交叉作用于人成骨细胞, 观察细胞形态变化。**结果:** 砷浓度为1 mg/L与各浓度氟联合作用时, 各组细胞全部死亡。砷浓度为0.1 mg/L与各浓度氟联合作用于人成骨细胞, 可见部分细胞死亡, 细胞形态较完整, 可见细胞核, 周围少量细胞碎片。砷浓度为0.01 mg/L、砷浓度为0 mg/L与氟浓度为10 mg/L联合作用于人成骨细胞时, 显微镜内可见少量细胞死亡及少许细胞碎片。其余联合实验组镜下可见较多人成骨细胞, 轮廓清晰, 细胞核完整, 未见明显细胞碎片。**结论:** 氟砷联合作用时, 对人成骨细胞毒性一定程度的增加。

关键词

氟, 砷, 人成骨细胞, 细胞活性, 细胞形态

Copyright © 2018 by authors and Hans Publishers Inc.

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

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



Open Access

1. 引言

地方性氟中毒可损伤全身各个系统及器官。慢性氟中毒引起的以骨骼损害尤为严重, 称之为氟骨症。近年来, 有研究发现氟中毒病区大都存在氟砷联合中毒, 其患者出现氟骨症、骨质疏松加重现象[1] [2]。因此, 同时考虑氟和砷对骨骼的影响, 以及砷在氟骨症中的作用, 对于阐明氟骨症、骨质疏松等骨骼疾病非常重要。本研究通过细胞实验对成骨细胞在氟砷联合中毒的作用机制做初步探讨。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

2.1.1. 细胞株

SV40 转染人成骨细胞 hFOB1.19 (中国医学科学院上海细胞库)。

2.1.2. 药品和主要试剂

氟化钠(NaF, 天津科密欧化学试剂有限公司); 亚砷酸钠(NaAsO₂, 国药化学试剂有限公司); 碳酸氢钠(NaHCO₃, 上海虹光化工厂); 甲醇(上海振兴化工一厂); DMEM/F12 培养基、胎牛血清(Gibco 公司, USA); G418、青链霉素混合液、姬姆萨染液、谷氨酰胺、胰蛋白酶、二甲基亚砷、四甲基嘧啶(北京

索莱宝科技有限公司)。

2.1.3. 器材

RT-6000 酶标分析仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司); TS-8 型转移振荡器(其林贝尔仪器制造有限公司); SW-CJ-IFD 型洁净工作台(上海博迅实业有限公司医疗设备厂); TG-16W 台式高速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司); 8MCO-15AC 二氧化碳培养箱(日本 SANYO 公司); TE2000-U 倒置荧光显微镜(日本 Nikon 公司); AB104-N 型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器)。

2.2. 实验方法

2.2.1. SV40 转染人成骨细胞的培养

SV40 转染人成骨细胞 hFOB1.19 用含 10% 胎牛血清和青、链霉素 100 U/mL 的 D-MEM/F-12 培养基中, 置 33.5°C、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱培养, 取对数生长期细胞用于实验。

2.2.2. 人成骨细胞 96 孔板模型的建立

调整 hFOB1.19 细胞浓度为 1.0×10^5 个/mL, 96 孔培养板上每孔接种 1.0×10^4 个细胞, 置 33.5°C、5% CO₂ 的饱和湿度培养箱培养 24 小时。用 D-MEM/F-12 完全培养基调整氟浓度为 20 mg/L、2 mg/L、0.2 mg/L, 调整砷浓度分别为 2 mg/L、0.2 mg/L、0.02 mg/L。

弃去 96 孔板中培养基, 分别以各浓度氟、砷离子工作液各 100 μ L 交叉加入细胞孔内, 每联合组各加 3 个副孔。加氟或砷后, 各孔内氟对人成骨细胞的作用终浓度分别为 10 mg/L、1 mg/L、0.1 mg/L、0 mg/L, 砷对人成骨细胞的作用终浓度分别为 1 mg/L、0.1 mg/L、0.01 mg/L、0 mg/L, 相互交叉作用。详见表 1。

分别在作用 24 h、48 h、72 h 后每孔加入 MTT 工作液各 10 μ l (5 mg/mL), 继续培养 4 h 后, 弃去各孔内上清, 加入 DMSO 200 μ L/孔后在振荡器上震荡 10 min, 酶标仪上测 OD 值, 并计算细胞抑制率(%)。实验重复 3 次。

$$\text{细胞抑制率} = \frac{\text{对照孔平均OD} - \text{实验孔平均OD}}{\text{对照孔平均OD}} \times 100\%$$

2.2.3. 氟、砷联合对人成骨细胞细胞形态的影响

弃去上清, 灭菌 PBS 清洗 2 遍后, 每孔加入 200 μ l 的 PBS 浸润细胞, 置显微镜下观察细胞形态并拍照。弃去 PBS 后加入甲醇 10 μ L/孔, 静置 1~2 min 后甲醇自然挥发后加入配置好的姬姆萨工作液 200 μ L/孔, 静置染色 12 min 后弃去染液, 用双蒸水反复清洗 4~5 次, 置显微镜下观察细胞形态并拍照。

2.2.4. 统计方法

采用 SPSS 16.0 建立数据库, 定量实验数据均以($\bar{x} \pm s$)表示, 进行方差分析和 t 检验。

3. 结果

3.1. 氟、砷及其联合作用对人成骨细胞活性的影响

氟、砷及其联合作用于人成骨细胞 24 h 后, 仅砷 1 mg/L 氟 10 mg/L 联合作用孔 OD 相对于对照孔明显下降, 其他剂量的氟、砷单独或联合在作用 24 h 后对细胞没有明显的杀伤作用。

氟、砷及其联合作用于人成骨细胞 48 h 后, 砷 1 mg/L 及其联合氟 10、1、0.1 mg/L 时, OD 值明显低于对照孔, 其他剂量的氟、砷单独或联合在作用 48 h 后对细胞没有明显的杀伤作用。

氟、砷及其联合作用于人成骨细胞 72 h 后, 砷 1 mg/L 及其联合氟 10、1、0.1 mg/L 时, OD 值明显低于对照孔, 同时砷 1 mg/L 氟 10 mg/L 组的 OD 也明显低于对照孔。结果见表 2 和表 3。

Table 1. Groups of fluorine and arsenic on HOB**表 1.** 氟、砷联合对人成骨细胞作用的分组

组别	NaF(mg/L, F ⁻)	NaAsO ₂ (mg/L, As ⁵⁺)
高氟高砷	10	1
高氟中砷	10	0.1
高氟低砷	10	0.01
高氟	10	0
中氟高砷	1	1
中氟中砷	1	0.1
中氟低砷	1	0.01
中氟	1	0
低氟高砷	0.1	1
低氟中砷	0.1	0.1
低氟低砷	0.1	0.01
低氟	0.1	0
高砷	0	1
中砷	0	0.1
低砷	0	0.01
对照	0	0

Table 2. The OD value of HOB on fluorine and arsenic ($\bar{x} \pm s$)**表 2.** 氟、砷联合对人成骨细胞作用的 OD 值($\bar{x} \pm s$)

组别	NaF(mg/L, F ⁻)	NaAsO ₂ (mg/L, As ⁵⁺)	24 h OD 值	48 h OD 值	72 h OD 值
高氟高砷	10	1	0.248 ± 0.005 ^{***}	0.189 ± 0.012 ^{***}	0.193 ± 0.037 ^{***}
高氟中砷	10	0.1	0.270 ± 0.017	0.253 ± 0.021	0.200 ± 0.030 ^{***△△}
高氟低砷	10	0.01	0.267 ± 0.011	0.259 ± 0.015	0.279 ± 0.031
高氟	10	0	0.262 ± 0.024	0.255 ± 0.029	0.234 ± 0.018 ^{△△}
中氟高砷	1	1	0.286 ± 0.036	0.204 ± 0.020 ^{***}	0.213 ± 0.035 ^{***}
中氟中砷	1	0.1	0.280 ± 0.009	0.274 ± 0.024	0.296 ± 0.038
中氟低砷	1	0.01	0.283 ± 0.026	0.267 ± 0.018	0.334 ± 0.039
中氟	1	0	0.267 ± 0.015	0.277 ± 0.029	0.293 ± 0.023 [△]
低氟高砷	0.1	1	0.269 ± 0.027	0.193 ± 0.017 ^{***}	0.179 ± 0.032 ^{***}
低氟中砷	0.1	0.1	0.278 ± 0.009	0.259 ± 0.018	0.283 ± 0.032
低氟低砷	0.1	0.01	0.274 ± 0.019	0.270 ± 0.022	0.324 ± 0.043
低氟	0.1	0	0.313 ± 0.059	0.255 ± 0.057	0.292 ± 0.021 [△]
高砷	0	1	0.231 ± 0.023 [#]	0.200 ± 0.021 ^{***}	0.197 ± 0.013 ^{***}
中砷	0	0.1	0.265 ± 0.020	0.258 ± 0.020	0.292 ± 0.021
低砷	0	0.01	0.259 ± 0.026	0.269 ± 0.028	0.298 ± 0.019
对照	0	0	0.286 ± 0.019	0.283 ± 0.013	0.342 ± 0.023

注: 与 0 浓度氟 0 浓度砷组相比, *P < 0.05, **P < 0.01; 与同浓度氟 0 浓度砷组相比, #P < 0.05, ##P < 0.01; 与 0 浓度砷同浓度氟组相比, △P < 0.05, △△P < 0.01。

Table 3. The inhibitory effect of fluorine and arsenic on HOB**表 3.** 氟、砷联合作用对人成骨细胞的抑制率

组别	NaF(mg/L, F ⁻)	NaAsO ₂ (mg/L, As ⁵⁺)	24 h 抑制率	48 h 抑制率	72 h 抑制率
高氟高砷	10	1	13.29%	33.22%	43.57%
高氟中砷	10	0.1	5.59%	10.60%	41.52%
高氟低砷	10	0.01	6.64%	8.48%	18.42%
高氟	10	0	8.39%	9.89%	31.58%
中氟高砷	1	1	0.00%	27.92%	37.72%
中氟中砷	1	0.1	2.10%	3.18%	13.45%
中氟低砷	1	0.01	1.05%	5.65%	2.34%
中氟	1	0	6.64%	2.12%	14.33%
低氟高砷	0.1	1	5.94%	31.80%	47.66%
低氟中砷	0.1	0.1	2.80%	8.48%	17.25%
低氟低砷	0.1	0.01	4.20%	4.59%	5.26%
低氟	0.1	0	-9.44%	9.89%	14.62%
高砷	0	1	19.23%	29.33%	42.40%
中砷	0	0.1	7.34%	8.83%	14.62%
低砷	0	0.01	9.44%	4.95%	12.87%
对照	0	0	-	-	-

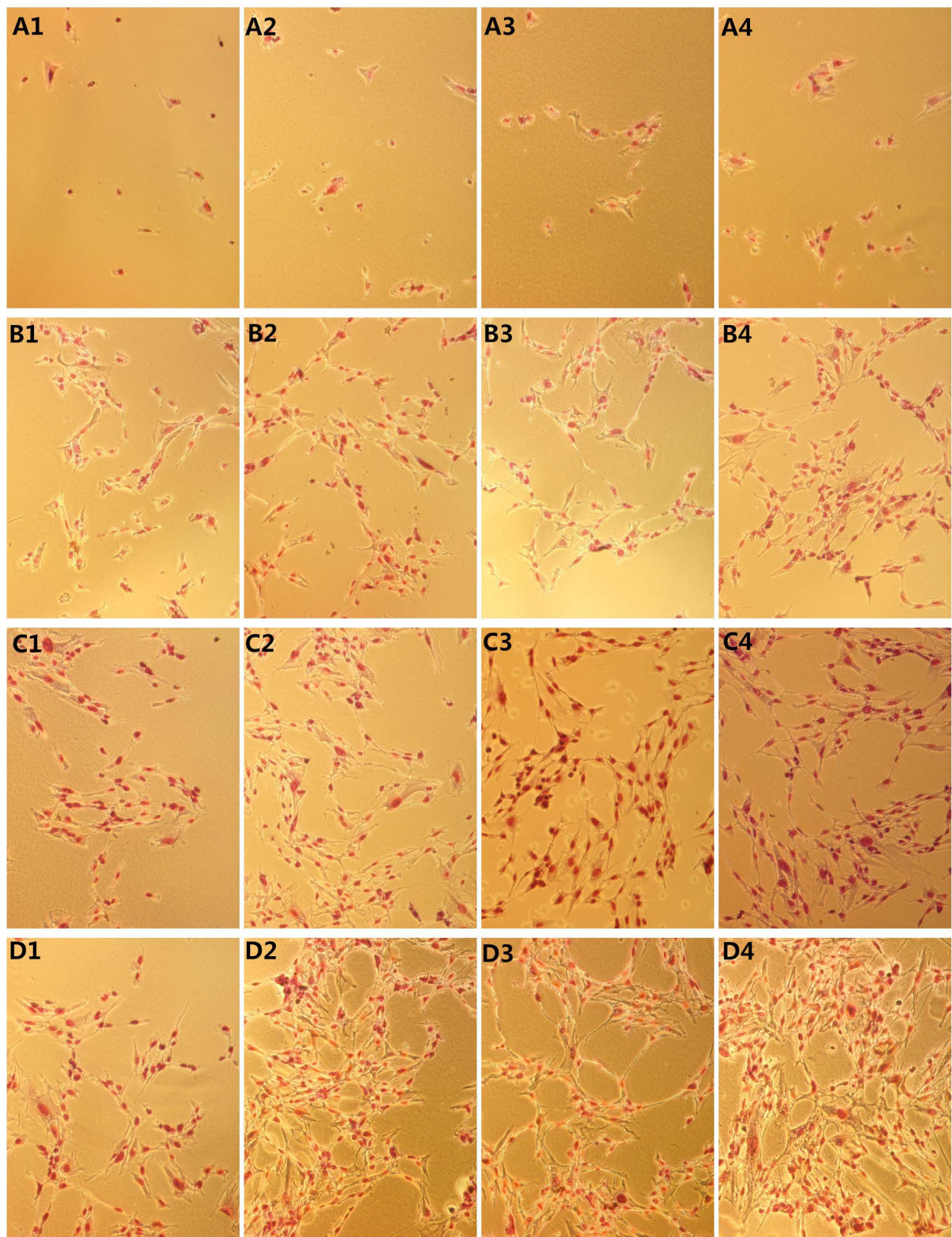
3.2. 氟、砷及其联合作用对人成骨细胞形态的影响

氟砷交叉联合作用于人成骨细胞 48 h 后, 使用姬姆萨染液进行细胞染色。分别使用显微镜进行 10 倍、40 倍放大显示后拍照。图中见, 高砷(砷 1 mg/L)与各浓度氟联合作用时, 各组均未见完整细胞, 见少许细胞碎片。中砷(砷 0.1 mg/L)与各浓度氟联合作用于人成骨细胞, 可见少量散在完整细胞, 细胞核完整, 周围少量细胞碎片。低砷(砷 0.01 mg/L)、无砷与高氟(氟 10 mg/L)联合作用于人成骨细胞时, 显微镜内可见少量散在细胞及少许细胞碎片。余联合实验组镜下可见较多人成骨细胞, 轮廓清晰, 细胞核完整, 未见明显细胞碎片。结果见图 1 和图 2。

4. 讨论

大量研究证实, 适量的氟促进成骨细胞分化, 过量氟却可引起骨骼损害[3] [4]。而尚未有文献报道砷对骨的直接损害, 仅动物实验发现五价砷可蓄积在骨骼中。但是, 氟砷联合中毒病区, 往往存在氟骨症加重现象[5]。有学者报道氟砷暴露水平与 Runt 相关转录因子 2 (Runx2)、尿 I 型胶原交联氨基末端肽 (UNTX)等多种骨代谢指标存在交互作用[6] [7]。然而, 氟砷联合中毒在人群调查、动物实验及细胞实验中结论不完全一致, 砷如何会影响氟骨症尚不十分清楚, 氟、砷的相互作用十分复杂, 又缺乏统一的标准。本研究试图寻找氟、砷联合作用导致成骨细胞损害的作用浓度和时间, 探索砷影响氟骨病发生、发展的有力依据。

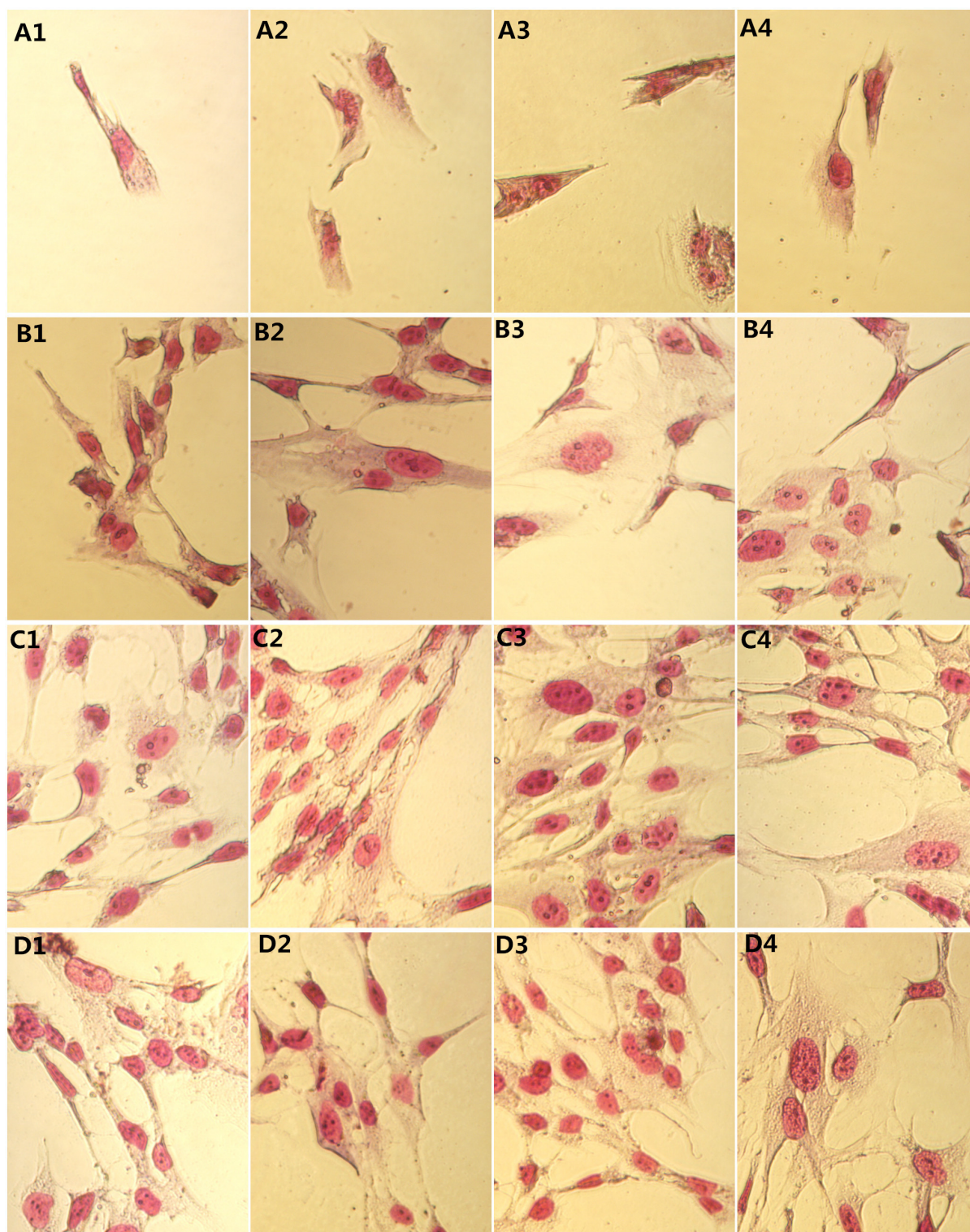
本研究结果表明, 随着氟砷联合作用于人成骨细胞的时间延长, 对细胞杀伤作用增强。作用 24 h 后, 高氟高砷组有统计学变化; 作用 48 h 后, 中氟高砷组、低氟高砷组有统计学变化; 作用 72 h 后, 高氟中砷组有统计学变化。



注：1(高氟)、2(中氟)、3(低氟)、4(无氟)；A(高砷)、B(中砷)、C(低砷)、D(无砷)。

Figure 1. The morphology effect on HOB of fluorine and arsenic for 48 h ($\times 10$)

图 1. 氟砷联合作用 48 h 对人成骨细胞形态的影响($\times 10$)



注：1(高氟)、2(中氟)、3(低氟)、4(无氟)；A(高砷)、B(中砷)、C(低砷)、D(无砷)。

Figure 2. The morphology effect on HOB of fluorine and arsenic for 48 h ($\times 40$)

图 2. 氟砷联合作用 48 h 对人成骨细胞形态的影响($\times 40$)

本研究的细胞染色图片显示，在氟单独作用下，细胞质和细胞核没有因氟的作用而破坏；在砷单独

作用下, 细胞核和细胞质的完整性随着砷的浓度增加逐渐降低。中浓度的砷与各浓度氟联合作用下, 高氟中砷、中氟中砷对细胞质和细胞核均有一定破坏, 而中砷联合低氟和无氟均未出现明显联合作用。

在一定范围内, 随着氟浓度的增加, 人成骨细胞活性呈现先抑制后无效, 再到抑制的过程。低氟与高氟明显抑制人成骨细胞活性。砷在一定范围内具有成骨细胞毒性。高砷(≥ 1 mg/L)对人成骨细胞的作用是致死性的, 随着砷浓度减低, 其毒性迅速下降, 当接近 0.1 mg/L 时, 无明显细胞毒性。氟砷联合作用十分复杂, 短期氟砷联合对人成骨细胞作用不明显; 中期时砷对人成骨细胞的毒性明显, 适量氟(1 mg/L)对砷的毒性作用有明显的抑制作用; 而长期高氟与中砷可形成毒性的叠加。低氟与中砷又无明显叠加效果。目前对氟、砷对骨影响的研究只是冰山一角, 我们需要更多研究来进一步了解氟砷联合作用对骨的毒性。

基金项目

贵州省科技厅社发攻关项目(NO: 黔科合 SY 字[2012]3125 号); 贵州省卫生厅基金项目(NO: gzwkj 2012-1-023)。

参考文献 (References)

- [1] Jadhav, S.V., Bringas, E., Yadav, G.D., *et al.* (2015) Arsenic and Fluoride Contaminated Groundwaters: A Review of Current Technologies for Contaminants Removal. *Journal of Environmental Management*, **162**, 306-325.
- [2] Zeng, Q.B., Xu, Y.Y., Yu, X., *et al.* (2014) Arsenic May Be Involved in Fluoride-Induced Bone Toxicity through PTH/PKA/AP1 Signaling Pathway. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **37**, 228-233.
- [3] Pan, L.L., Shi, X.G., Liu, S., *et al.* (2014) Fluoride Promotes Osteoblastic Differentiation through Canonical Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Toxicology Letters*, **225**, 34-42.
- [4] Zhang, Y.L., Luo, Q., Deng, Q., *et al.* (2015) Genes Associated with Sodium Fluoride-Induced Human Osteoblast Apoptosis. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, **8**, 13171-13178.
- [5] Hong, F., Zheng, C., Xu, D.G., *et al.* (2013) Chronic Combined Effects of Fluoride and Arsenite on the Runx2 and Downstream Related Factors of Bonemetabolism in Rats. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi*, **47**, 794-798.
- [6] 曾奇兵, 喻仙, 杨莹, 等. 氟砷污染对暴露人群骨代谢交互作用[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(11): 1480-1482.
- [7] 郑冲, 洪峰, 徐德淦, 等. 氟砷共暴露对大鼠骨骼代谢 Runx2 信号通路的影响[J]. 环境与职业医学, 2013, 30(12): 913-920.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2168-5584, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱: hjs@hanspub.org