

罗琴, 李月勤, 滕蔓, 等. PI3K-Akt 信号通路在氟化钠诱导小鼠肾脏细胞凋亡中的作用 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (8): 82-93.

LUO Q, LI Y Q, TENG M, et al. Role of PI3K-Akt signaling pathway in apoptosis of mouse kidney cells induced by sodium fluoride [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (8): 82-93.

PI3K-Akt 信号通路在氟化钠诱导小鼠肾脏细胞凋亡中的作用

罗琴^{1,2}, 李月勤², 滕蔓¹, 罗俊^{1*}

(1. 河南省农业科学院动物疫病防控研究所, 河南 郑州 450002;

2. 河南牧业经济学院动物医药学院, 河南 郑州 450046)

摘要: 为探究磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)-蛋白激酶 B (Akt) 信号通路在氟化钠 (NaF) 诱导小鼠肾脏细胞凋亡中的作用与机制, 本研究选用 4 周龄 ICR 小鼠, 通过连续 42 d 灌胃染氟以建立不同剂量 NaF 诱导的肾脏损伤模型; 试验的第 21 和 42 天, 分别采集肾脏样本, 首先进行组织病理学观察, 再采用流式细胞术检测不同剂量 NaF 对肾脏细胞凋亡率的影响, 并通过末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (TUNEL) 法观测凋亡细胞的数量及分布特征, 最后利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析 PI3K-Akt 信号通路及其下游细胞凋亡相关因子的基因表达水平, 并采用蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测该通路中关键凋亡相关因子的蛋白表达水平。结果: 12、24 和 48 mg/kg NaF 处理组小鼠肾脏均出现不同程度的病理变化, 如肾小管上皮细胞颗粒变性、空泡变性、坏死以及透明管型形成等, 证实 NaF 诱导的肾脏损伤模型建立成功。当 NaF 浓度达 12 mg/kg 以上时, 与对照组相比, 肾脏细胞凋亡率和凋亡细胞数量显著升高 ($P<0.05$), 并呈剂量和时间依赖性; 同时, PI3K-Akt 信号通路主要因子 PI3K、Akt、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、p70 核糖体蛋白 S6 激酶 (p70S6K) 及其下游抗凋亡因子 B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)、B 细胞淋巴瘤-超大亚型 (Bcl-xL) 的 mRNA 相对表达水平显著下调 ($P<0.05$), 而促凋亡因子半胱天冬酶 (caspase)-9、caspase-3、叉头框蛋白 O3a (FoxO3a)、Bcl-2 相互作用介导细胞死亡因子 (Bim)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 和 Bcl-2 相关死亡启动子 (Bad) 的 mRNA 相对表达水平显著上调 ($P<0.05$); Western blot 结果进一步显示, PI3K 与磷酸化-蛋白激酶 B (p-Akt, Ser473) 的蛋白相对表达水平极显著降低 ($P<0.01$), 而其下游的剪切型-半胱天冬酶 (C-caspase)-9 和 C-caspase-3 的蛋白相对表达水平则极显著升高 ($P<0.01$)。上述研究结果表明, 过量 NaF 可能通过抑制 PI3K-Akt 信号通路, 打破细胞凋亡的调控平衡从而诱导肾脏细胞凋亡, 最终导致肾脏组织结构的损伤。本研究初步揭示了 NaF 通过抑制 PI3K-Akt 信号通路诱导肾脏细胞凋亡的分子机制, 为进一步阐明氟的肾毒性机制提供了新的科学依据, 同时也为未来开发靶向该通路的肾脏保护策略奠定了理论基础。

关键词: 氟化钠; 肾脏; 凋亡; PI3K-Akt 信号通路

中图分类号: S852.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2026)08-0082-12

Role of PI3K-Akt signaling pathway in apoptosis of mouse kidney cells induced by sodium fluoride

LUO Qin^{1,2}, LI Yueqin², TENG Man¹, LUO Jun^{1*}

(1. Institute for Animal Health, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China;

2. College of Veterinary Medicine, Henan University of Animal Husbandry and Economy, Zhengzhou 450046, China)

Abstract: To investigate the role and mechanism of phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) - protein kinase B (Akt) signaling pathway in sodium fluoride (NaF) -induced apoptosis of mouse kidney cells, 4-week-old ICR mice were used to establish the model of NaF-induced renal injury by intragastric administration of fluoride for 42 days. On the 21st and 42nd days of the experiment, kidney samples were collected for histopathological observation. Flow cytometry was used to detect the effect of different doses of NaF on the apoptosis rate of kidney cells. The terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) method was used to observe the number and distribution characteristics of apoptotic cells. Finally, reverse transcription real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) was used to analyze

收稿日期: 2025-08-06; 修回日期: 2026-06-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32102631); 河南省高等学校重点科研项目 (23A230015); 河南省重点研发与推广专项 (252102110034); 河南省自然科学基金 (252300423045)

第一作者: 罗琴, 女, 博士后, 副教授

* 通信作者: 罗俊, 研究员, 主要从事动物病毒学研究, E-mail: luojun593@aliyun.com。

the gene expression levels of the PI3K-Akt pathway and its downstream apoptosis related factors, and Western blot was used to detect the protein expression level of key apoptosis related factors in this pathway. The results showed that different degrees of pathological changes, such as granular degeneration, vacuolar degeneration, necrosis of renal tubular epithelial cells and formation of clear tubular casts were observed in the 12, 24 and 48 mg/kg NaF treated groups, which confirmed that the model of renal injury induced by NaF was successfully established. When NaF dose ≥ 12 mg/kg, the apoptosis rate and the number of apoptotic cells in kidney increased significantly, compared with the control group ($P < 0.05$), and they showed dose and time dependence. At the same time, the PI3K-Akt signaling pathway major factors PI3K, Akt, mammalian target of rapamycin (mTOR), p70 ribosomal protein S6 kinase (p70S6K) and their downstream anti-apoptotic factors B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), B-cell lymphoma-xL (Bcl-xL) mRNA relative expression levels were significantly down-regulated ($P < 0.05$), while the mRNA relative expression levels of pro-apoptotic factors caspase-9, caspase-3, forkhead box O3a (FoxO3a), Bcl-2-interacting mediator of cell death (Bim), Bcl-2-associated X protein (Bax) and Bcl-2-associated death promoter (Bad) were significantly up-regulated ($P < 0.05$). The Western blot analysis showed that the protein relative expression levels of PI3K and phosphorylated-Akt (p-Akt, Ser473) were significantly decreased ($P < 0.01$), while the protein relative expression levels of cleaved-caspase-9 (C-caspase-9) and cleaved-caspase-9 (C-caspase-3) were significantly increased ($P < 0.01$). These results suggested that excessive NaF might induce apoptosis of renal cells by inhibiting the PI3K-Akt signaling pathway, breaking the regulatory balance of apoptosis, thereby inducing apoptosis of kidney cells, resulting in damage to renal tissue structure. This study revealed the molecular mechanism of apoptosis induced by NaF through inhibition of the PI3K-Akt signaling pathway, which provided a new scientific basis for further elucidating the nephrotoxic mechanism of fluoride, and also laid a theoretical foundation for developing renal protection strategies targeting this pathway in the future.

Keywords: sodium fluoride; kidney; apoptosis; PI3K-Akt pathway

氟是机体必需的微量元素之一, 在自然界中常以化合物形式广泛存在^[1]。适宜剂量下, 氟可促进骨骼的正常发育和矿化, 并对动物的生长繁殖、造血功能及免疫系统具有积极调控作用。然而, 过量摄入可引发人和动物氟中毒^[2]。地方性氟中毒(地氟病)是全球流行范围最广、危害较为严重的地方性疾病之一^[3]。中国是地氟病的重度流行国家, 其高发病率与特殊的地质背景、传统生活方式及社会经济因素密切相关^[4-7]。值得注意的是, 近年来工农业污染及饲料中违规添加未脱氟磷酸氢钙等因素, 导致动物氟中毒问题日益严重且难以根治^[8]。由于氟中毒具有蓄积性特征, 其病程进展缓慢且缺乏典型急性症状, 致使养殖场和农户往往难以将畜禽采食量下降、生长迟缓及繁殖障碍等临床表现与氟中毒相关联, 最终造成重大经济损失并潜在威胁人类健康。然而, 氟的毒性机制迄今尚未完全阐明。

作为氟的主要排泄和蓄积器官, 肾脏在氟中毒进程中扮演着双重角色, 既是氟毒性的关键靶器官之一, 也是反映环境氟污染程度的重要生物标志之一^[9-11]。在畜禽养殖中, 阐明氟的肾毒性及其机制具有特殊价值, 一方面可指导饲料配方优化和水源净化技术改进, 有效降低养殖动物氟蓄积风险; 另一方面通过早期识别肾脏损伤指标, 为建立动物氟中毒预警体系提供科学依据。这些措施不仅能提高养殖经济效益, 更能从源头上阻断氟通过食物链向人类传递的风险, 对保障畜产品安全和公共卫生健康具有重要意义。值得注意的是, 尽管国内外研究已证实细胞凋亡参与氟中毒的发病进程, 但关于氟诱导肾脏细胞凋亡

的系统研究仍缺乏, 其分子机制尚待深入探索^[12-13]。磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) -蛋白激酶 B (Akt) 信号通路是真核细胞中高度保守的核心信号转导系统。该通路作为细胞信号调控的关键枢纽, 能够响应生长因子、细胞因子以及环境应激等多种刺激信号, 通过多级信号转导和级联放大效应, 精确调控细胞增殖、存活与调亡等基本生命进程^[14-15]。现有研究证实, PI3K-Akt 信号通路参与调控氟诱导的骨骼肌 C2C12 细胞和大鼠脑组织细胞调亡^[16-17], 然而其在氟诱导肾脏细胞调亡中的作用仍有待阐明。

因此, 为探讨 PI3K-Akt 信号通路在氟化钠 (NaF) 诱导肾脏细胞调亡中的调控作用, 本研究以 ICR 小鼠为研究对象, 通过给予不同剂量 NaF 先建立肾脏损伤模型, 并经组织病理学观察评估肾脏组织结构变化以确认模型建立成功, 随后采用流式细胞术定量检测肾脏细胞调亡率, 并结合末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记 (TUNEL) 法分析调亡细胞的数量及分布特征, 最后利用实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 定量分析 PI3K-Akt 信号通路主要因子及其下游调亡相关因子的基因表达水平, 并采用蛋白质免疫印迹法 (Western blot) 检测该通路中关键调亡相关因子的蛋白表达水平, 进而系统评估不同剂量 NaF 对肾脏细胞调亡的影响及其剂量-效应规律, 以揭示 PI3K-Akt 信号通路的分子调控机制。研究成果将为阐明氟暴露的肾毒性机制提供新的试验依据, 并为未来开发靶向该通路的肾脏保护策略奠定初步的理论基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

NaF, 购自成都市科隆化学品有限公司; Annexin V-PE/7-AAD 流式凋亡检测试剂盒, 购自美国 BD 公司; TUNEL 凋亡检测试剂盒, 购自德国 Merck 公司; RNAiso Plus、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 和 PrimeScript[™] RT 试剂盒, 均购自日本 TaKaRa 公司; 剪切型-半胱天冬酶 (C-caspase)-9 抗体 (9509T), 购自美国 CST 公司; 4% 多聚甲醛, 二喹啉甲酸 (BCA) 蛋白定量检测试剂盒 (G2026-200T), ECL[™] 化学发光底物, 一部法聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 彩色凝胶超快速配制试剂盒 (12%) (G2178-50T), 磷酸化蛋白酶抑制剂 (G2007-1ML), PI3K 抗体 (GB11525-100), 磷酸化 Akt (p-Akt, Ser473) 抗体 (GB150002-100), C-caspase 3 抗体 (GB115733-50), β -actin 抗体 (GB11001-100) 以及辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的免疫组化专用二抗 (G1213-100UL) 均购自武汉塞维尔生物科技有限公司。流式细胞仪, 购自美国 BD 公司; 石蜡切片机, 购自德国 LEICA 公司; 光学显微镜, 购自日本 Olympus 公司; 荧光定量 PCR 仪和化学发光成像系统, 均购自美国 Bio-Rad 公司; 高速冷冻离心机, 购自美国 Thermo 公司。

1.2 实验动物及分组

4 周龄健康 ICR 小鼠共计 136 只, 购自成都达硕生物科技有限公司, 体重为 (20 $\pm$ 2) g。小鼠饲养于 12 h 光照/12 h 黑暗、(22 $\pm$ 2)℃、湿度为 50%~60% 的环境中, 自由饮水和采食, 鼠笼定时通风及清理, 试验前适应性饲养 7 d。随后, 将 136 只小鼠均分为 4 组, 每组 34 只, 通过灌胃途径给予不同剂量 NaF: 0 mg/kg (对照组, 等体积生理盐水), 12 mg/kg, 24 mg/kg 和 48 mg/kg。剂量选择基于此前预试验确定的 NaF 半数致死量 (LD₅₀) 239.88 mg/kg, 灌胃体积为每 100 g 体重 1 mL, 每日 1 次, 连续 6 周。

1.3 临床观察

试验期间, 每天观察并记录小鼠的临床表现。于试验的第 1、7、14、21、28、35 和 42 天对每组小鼠进行空腹称重, 并作好记录以及时调整灌胃量。

1.4 组织病理学观察

分别于试验的第 21 和 42 天, 在每组随机选取 8 只小鼠, 颈椎脱位处死后取出两侧肾脏, 固定于 4% 多聚甲醛中, 右侧肾脏用于 TUNEL 分析, 左侧肾脏经脱水、透明、浸蜡、包埋制成石蜡切片, 进一步经 HE 染色、封片、烘干, 最后在光学显微镜下观察、记录并拍摄肾脏组织结构变化。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡率

分别于试验的第 21 和 42 天, 在每组随机选取 8 只小鼠, 颈椎脱位处死后取出两侧肾脏。右侧肾脏保存在液氮中, 用于 RT-qPCR 和 Western blot 分析。左侧肾脏于冰浴下机械匀浆, 尼龙纱布过滤, 600 r/min 离心 5 min 后弃上清液, PBS 洗涤 2 次, 调整细胞浓度至 1 $\times$ 10⁶个/mL。取 100 μ L 细胞悬液至流式管中, 加入 5 μ L Annexin V-PE 和 5 μ L 的 7-AAD 染色液, 轻轻混匀, 室温避光染色 10 min, 加入 400 μ L 结合缓冲液混匀, 流式细胞仪检测, Cell Quest 软件分析凋亡细胞所占百分率。

1.6 TUNEL 法检测细胞凋亡数量和分布

将固定于 4% 多聚甲醛的右肾 (1.4 中) 依次经脱水、透明、浸蜡和包埋处理, 制成常规石蜡组织切片。切片首先进行二甲苯脱蜡和梯度酒精脱水处理, PBS 清洗 5 min, 室温下滴加蛋白酶 K 溶液孵育 15 min, 蒸馏水漂洗 4 次; 随后浸入 3% 过氧化氢溶液中室温反应 5 min, PBS 洗涤 2 次后, 分别滴加末端脱氧核苷酸转移酶 (TdT) 缓冲液和反应液, 37℃ 湿盒中孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次; 接着滴加终止缓冲液室温反应 30 min, 弃去终止液后加入封闭缓冲液, 湿盒中继续室温孵育 30 min, 再次 PBS 洗涤 3 次; 滴加新鲜配制 0.05% DAB 显色液室温反应 3~10 min, 蒸馏水终止显色; 苏木素复染 2 min, 蒸馏水冲洗; 最后经脱水、透明、封片、烘干处理, 于光学显微镜下观察 (凋亡细胞表现为细胞核被染为棕黄色) 并拍照, 使用 Image-Pro Plus 5.1 软件进行定量分析。

1.7 PI3K-Akt 信号通路中凋亡相关因子 mRNA 相对表达水平的检测

将保存于液氮中的右肾 (1.5 中) 取出, 研磨成粉末, 均分成 2 份, 保存于液氮中。取一份使用 RNAiso Plus 提取总 RNA, 利用 PrimeScript[™] RT 试剂盒制备 cDNA, 使用 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II 试剂配置反应体系, 随后置于荧光定量 PCR 仪中进行 RT-qPCR 扩增。用于基因扩增的特异性引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成, 引物序列及大小详见表 1。以 β -actin 作为内参基因, 通过 RT-qPCR 法检测 PI3K、Akt、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR)、p70 核糖体蛋白 S6 激酶 (p70S6K)、半胱天冬酶 (caspase)-9、caspase-3、叉头框蛋白 O3a (FoxO3a)、B 细胞淋巴瘤-2 (Bcl-2)、B 细胞淋巴瘤-超大亚型 (Bcl-xL)、Bcl-2 相互作用介导细胞死亡因子 (Bim)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、Bcl-2 相关死亡启动子 (Bad) 的 mRNA 相对表达水平。

表 1 RT-qPCR 反应中相关基因的引物序列

靶基因	登录号	引物序列 (5'→3')	片段长度/bp
caspase-9	NM_015733	F: GAGGTGAAGAACGACCTGAC	103
		R: AGAGGATGACCACCACAAAG	
caspase-3	NM_009810	F: ACATGGGAGCAAGTCAGTGG	149
		R: CGTCCACATCCGTACCAGAG	
Bim	NM_207680	F: CCTTCTGATGTAAGTTCTGAGTGTG	113
		R: CCTTGGCGTTCTGTCTGTAG	
Bax	NM_007527	F: ATGCGTCCACCAAGAAGC	163
		R: CAGTTGAAGTTGCCATCAGC	
Bad	NM_007522	F: AGAGTATGTTCCAGATCCCAG	276
		R: GTCCTCGAAAAGGGCTAAGC	
Bcl-2	NM_009741	F: AGCCTGAGAGCAACCCAAT	159
		R: AGCGACGAGAGAAGTCATCC	
Bcl-xL	NM_009743	F: TGTGGATCTCTACGGGAACA	117
		R: AAGAGTGAGCCCAGCAGAAC	
PI3K	NM_008839	F: TGGGTACTGCGTGGCAACCTTT	212
		R: TGGTGTACTCTTTGTGCTCCCT	
Akt	NM_009652	F: TCCTCAAGAACGATGGCACC	203
		R: CTCCTCAGGCGTTTCACAT	
mTOR	NM_020009	F: CAGACTGGCTCTTGCTCATAA	155
		R: GCTGGAAGGCGTCAATC	
p70S6K	NM_028259	F: CAGGAGCAAATACTGGAAGA	138
		R: GGTCCACAATGAAAGGGTGT	
FoxO3a	NM_019740	F: TACCGTGTTTGGACCTTCGT	111
		R: GTCTGGTTGCCGTAGTGTGA	
β-actin	NM_007393	F: GCTGTGCTATGTTGCTCTAG	117
		R: CGCTCGTTGCCAATAGTG	

1.8 PI3K-Akt 信号通路中关键凋亡相关因子蛋白表达水平的检测

取 1.5 中液氮保存的肾脏粉末，加入含有 1 mmol/L 苯甲基磺酰氟（PMSF）及蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液进行冰上裂解，离心后取上清液，使用 BCA 蛋白质定量试剂盒测定蛋白浓度。取等量蛋白质样品进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE），并使用预染蛋白分子量标准物作为参照。电泳结束后，将蛋白质转移至硝酸纤维素膜上。用含 5%脱脂牛奶的 PBST 溶液室温封闭 2 h。随后，将膜与相应的一抗于 4 ℃孵育过夜。所用一抗及其稀释比例如下：PI3K（1：1 000）、p-Akt（Ser473）（1：1 000）、C-caspase 9（1：800）、C-caspase 3（1：800）及β-actin（1：1 000）。次日，用 PBST 洗涤膜后，与 HRP 标记的免疫组化专用二抗于室温孵育 1 h。经 PBST 充分洗涤后，使用 ECL™化学发光底物在化学发光成像系统上进行显影检测。最后，采用 ImageJ 2 软件对目标条带的灰度值进行定量分析，以

β-actin 作为内参。

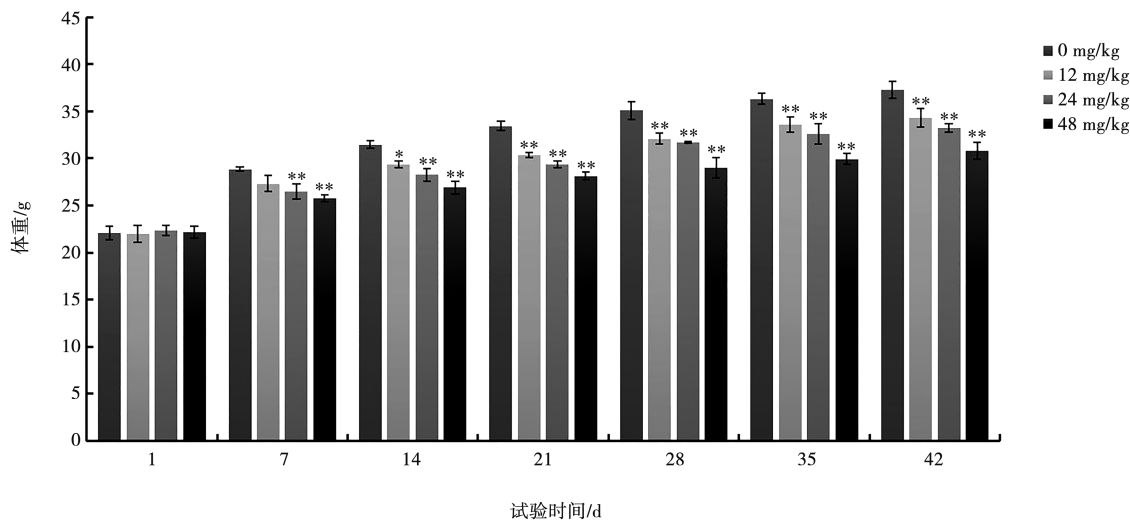
1.9 数据统计与分析

采用 IBM SPSS Statistics 21.0 对试验数据进行单因素方差分析（One-way ANOVA），使用 Dunnett 检验进行多重比较，分析各 NaF 处理组与对照组之间的差异。 $P<0.05$ 视为差异显著， $P<0.01$ 视为差异极显著。数据以“平均值±标准差”表示。

2 结果与分析

2.1 小鼠体重增长情况

为探究不同剂量 NaF 对小鼠肾脏细胞凋亡的影响，首先通过连续 42 d 灌胃染氟以建立肾脏损伤模型。结果如图 1 所示，试验期间，各组小鼠体重虽均保持增长，但与对照组相比，从试验的第 7 天起，NaF 处理组呈现剂量依赖性的生长抑制（ $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ），表现为随染毒剂量增加，体重增幅逐步降低。



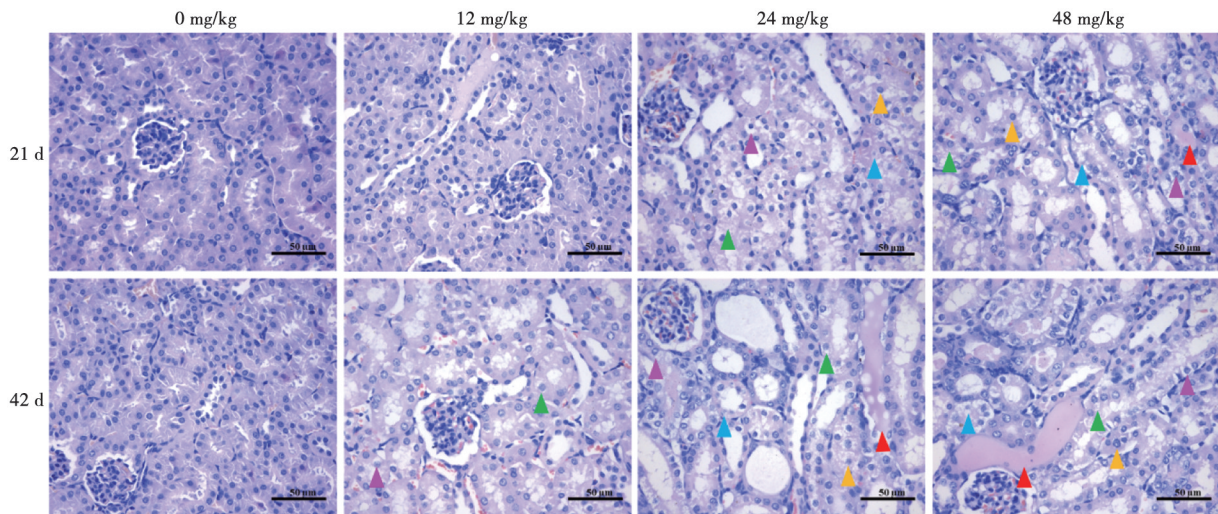
与对照组比, * 表示 $P<0.05$, ** 表示 $P<0.01$ 。下同。

图 1 不同剂量 NaF 处理后小鼠的体重增长情况

2.2 肾脏组织病理学变化

为评估 NaF 诱导肾脏损伤模型的构建情况,通过组织病理学观察各组小鼠肾脏结构变化,结果如图 2 所示。12 mg/kg 组小鼠的肾小管上皮细胞在试验第 42 天出现轻度颗粒变性和空泡变性; 24 和 48 mg/kg

组小鼠肾脏在试验第 21 和 42 天呈现更加明显的组织病理学损伤,表现为肾小管上皮细胞的颗粒变性、空泡变性、坏死、脱落,以及透明管型形成;对照组则未见上述病理改变。



绿色三角指示细胞颗粒变性,玫红色三角指示细胞空泡变性,蓝色三角指示细胞坏死,黄色三角指示细胞脱落,红色三角指示肾小管透明管形成。标尺=50 μm 。

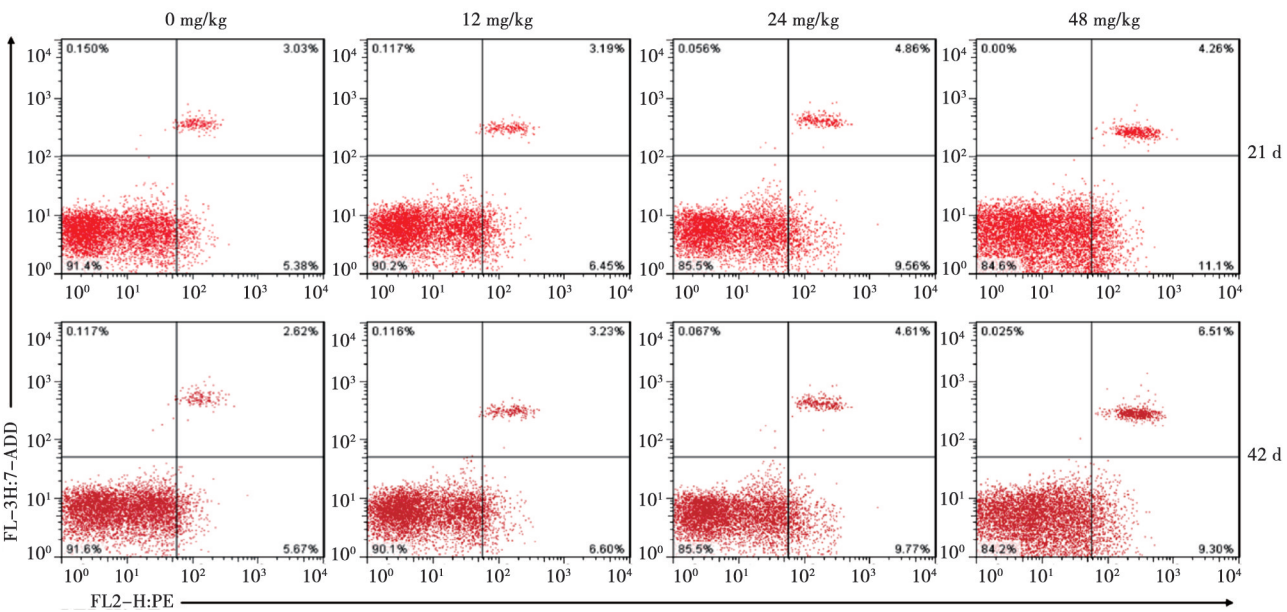
图 2 不同剂量 NaF 处理后小鼠肾脏病理组织学变化

2.3 NaF 对小鼠肾脏细胞凋亡率和凋亡细胞数量的影响

为探究不同剂量 NaF 对小鼠肾脏细胞凋亡的影响,首先采用流式细胞术定量分析肾脏细胞凋亡率,若肾脏细胞凋亡率明显增加,则进一步运用 TUNEL 技术观察凋亡细胞的数量及分布特征。不同 NaF 处

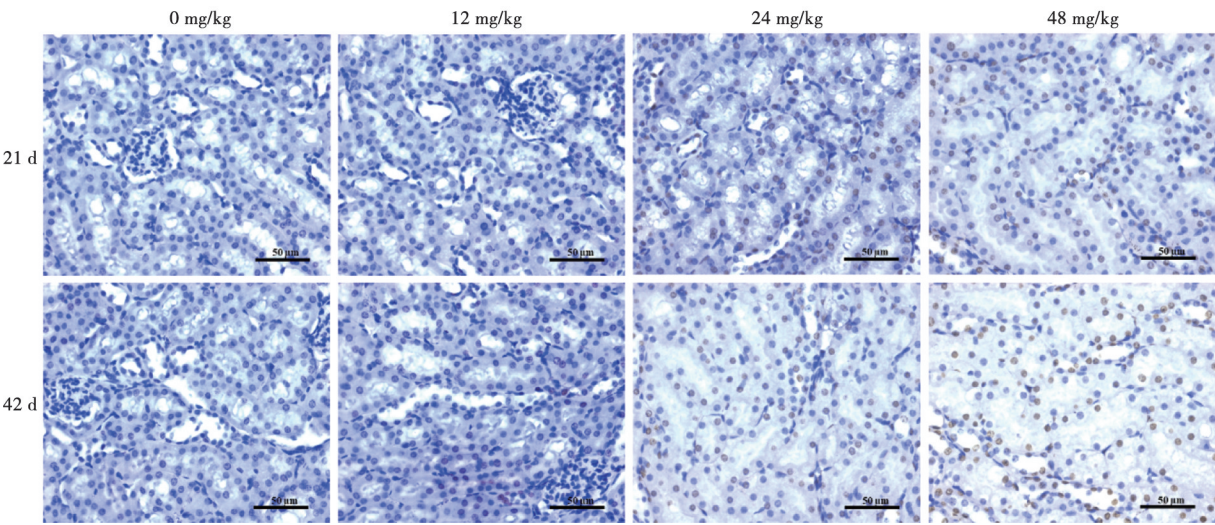
理组小鼠肾脏细胞凋亡流式象限以及凋亡细胞 TUNEL 染色分别见图 3 和 4。统计学结果如图 5 所示,与对照组比较,12 mg/kg 组小鼠肾脏细胞凋亡率 ($P<0.05$) 和凋亡细胞数量 ($P<0.01$) 在试验第 42 天显著或极显著升高; 24 和 48 mg/kg 组小鼠肾脏细胞凋亡率和凋亡细胞数量在试验第 21 和 42 天均极

显著升高 ($P<0.01$), 且发生凋亡的细胞主要为肾小管上皮细胞。



象限图左上表示坏死的细胞, 左下表示正常细胞, 右上表示晚期凋亡细胞, 右下表示早期凋亡细胞。

图 3 不同剂量 NaF 处理后小鼠肾脏细胞凋亡流式象限图



核被染为棕黄色的细胞即为凋亡细胞。标尺 = 50 μm。

图 4 不同剂量 NaF 处理后小鼠肾脏凋亡细胞 TUNEL 法染色

2.4 NaF 对 PI3K-Akt 信号通路中关键因子 mRNA 相对表达水平的影响

为阐明 PI3K-Akt 信号通路在 NaF 诱导小鼠肾脏细胞凋亡中的可能调控作用, 利用 RT-qPCR 方法首先检测 PI3K-Akt 信号通路关键因子的基因表达水平, 结果如图 6 所示。与对照组相比, PI3K mRNA 相对表达水平, 12 mg/kg 组在试验第 21 和 42 天显著降低 ($P<0.05$), 24 和 48 mg/kg 组同期极显著降低 ($P<0.01$); Akt mRNA 相对表达水平, 24 mg/kg 组

在试验第 42 天以及 48 mg/kg 组在试验第 21 和 42 天均显著降低 ($P<0.05$); mTOR mRNA 相对表达水平, 24 mg/kg 组在试验第 21 天显著降低 ($P<0.05$), 在试验第 42 天极显著降低 ($P<0.01$), 而 48 mg/kg 组在试验第 21 和 42 天均极显著降低 ($P<0.01$); p70S6K mRNA 相对表达水平, 24 mg/kg 组在试验第 21 和 42 天显著降低 ($P<0.05$), 48 mg/kg 组同期极显著降低 ($P<0.01$)。

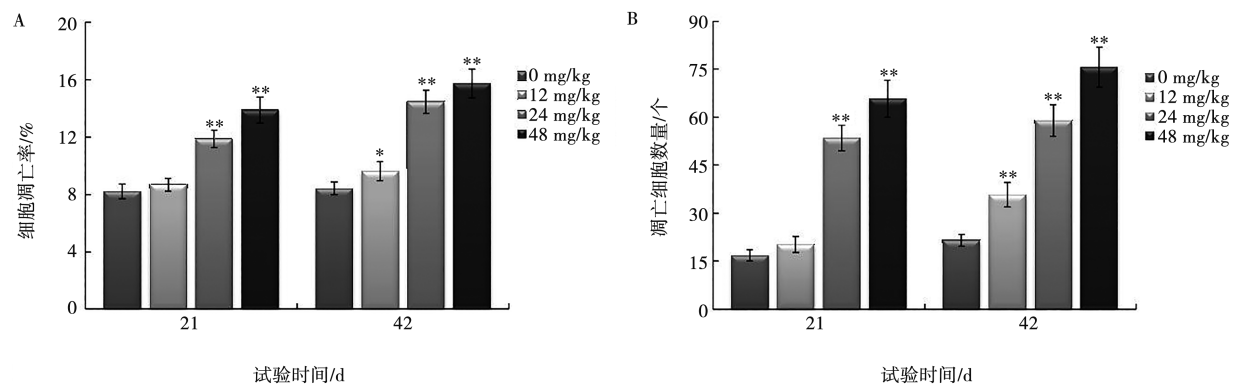


图 5 不同剂量 NaF 处理后小鼠肾脏细胞凋亡率 (A) 和凋亡细胞数量 (B) 的变化

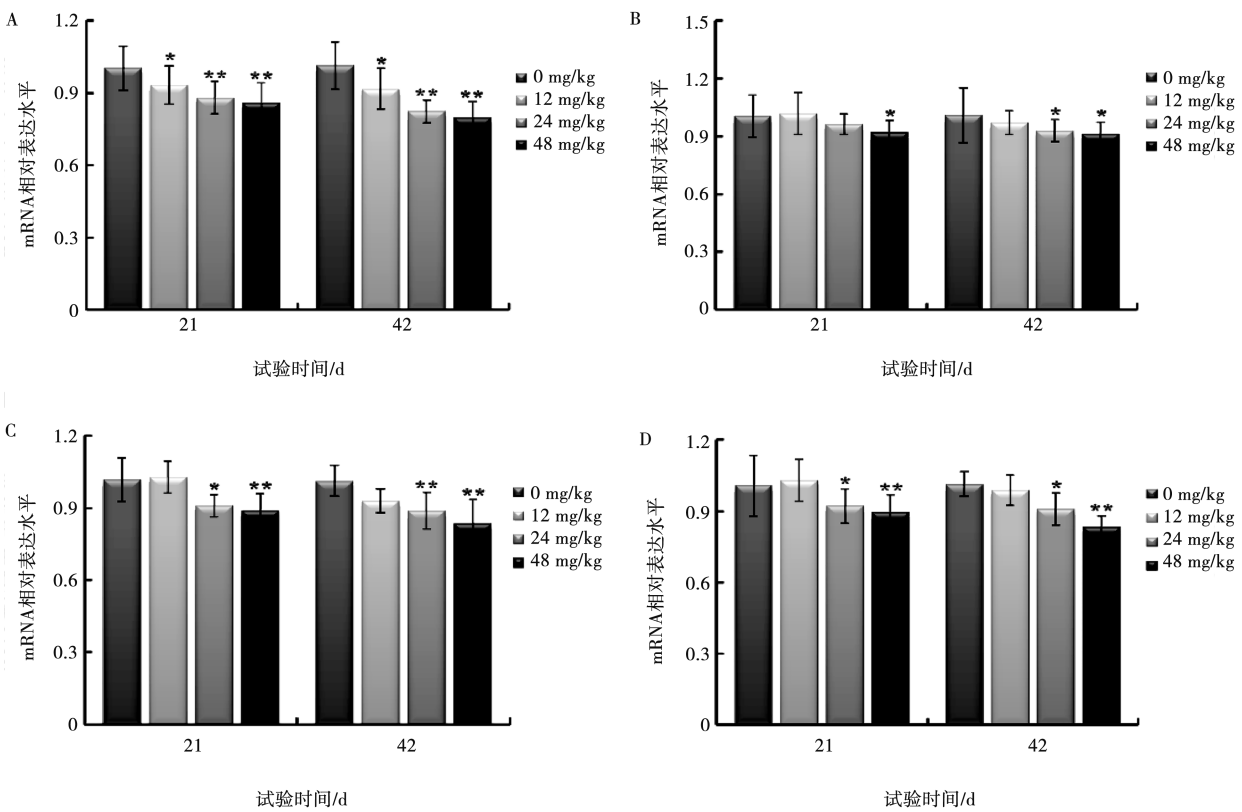


图 6 不同剂量 NaF 处理后小鼠肾脏 PI3K (A)、Akt (B)、mTOR (C) 和 p70S6K (D) 的 mRNA 相对表达水平

2.5 NaF 对 PI3K-Akt 信号通路中促凋亡因子 mRNA 相对表达水平的影响

为明确 NaF 经 PI3K-Akt 信号通路诱导小鼠肾脏细胞凋亡的具体机制,进一步利用 RT-qPCR 分析该通路下游抗凋亡相关因子的基因表达水平,结果如图 7 所示。与对照组相比, caspase-9 mRNA 相对表达水平, 48 mg/kg 组在试验第 21 天显著升高 ($P<0.05$), 在试验第 42 天极显著升高 ($P<0.01$); caspase-3 mRNA 相对表达水平, 24 mg/kg 组在试验第 42 天以及 48 mg/kg 组在试验第 21 和 42 天均显著升高 ($P<0.05$); FoxO3a mRNA 相对表达水平, 12 mg/kg 组在试验第 42 天显著升高 ($P<0.05$), 24

mg/kg 组在试验第 21 天 ($P<0.05$) 和第 42 天 ($P<0.01$) 显著或极显著升高, 48 mg/kg 组在试验第 21 和 42 天均极显著升高 ($P<0.01$); Bim mRNA 相对表达水平, 12 mg/kg 组在试验第 42 天极显著升高 ($P<0.01$), 24 和 48 mg/kg 组在试验第 21 和 42 天均极显著升高 ($P<0.01$); Bax mRNA 相对表达水平, 24 mg/kg 组在试验第 21 天 ($P<0.05$) 和第 42 天 ($P<0.01$) 显著或极显著升高, 48 mg/kg 组在试验第 21 和 42 天均极显著升高 ($P<0.01$); Bad mRNA 相对表达水平, 12 mg/kg 组在试验第 42 天显著升高 ($P<0.05$), 24 和 48 mg/kg 组在试验第 21 和 42 天均极显著升高 ($P<0.01$)。

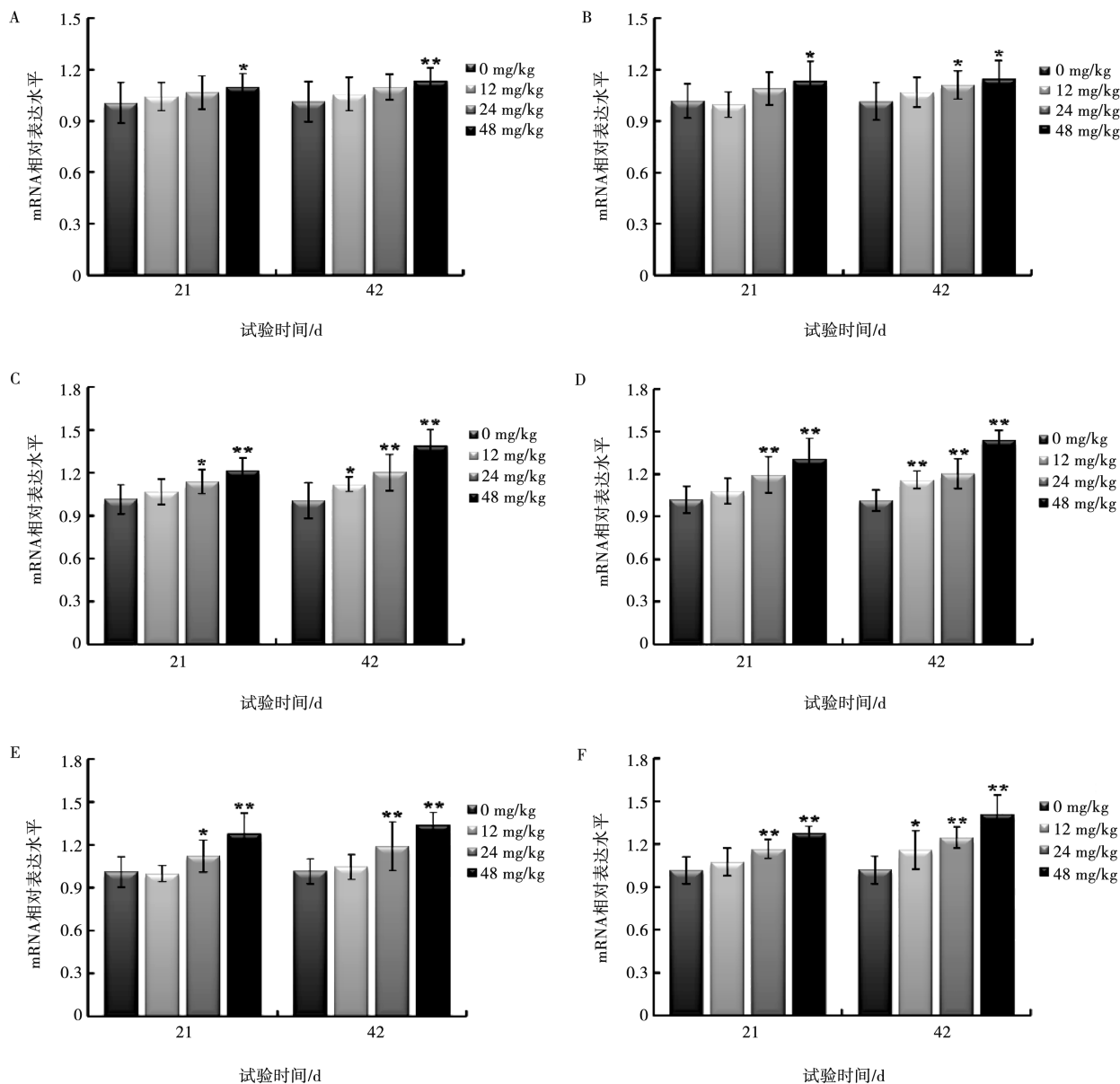


图7 不同剂量 NaF 处理后小鼠肾脏促凋亡因子 caspase-9 (A)、caspase-3 (B)、FoxO3a (C)、Bim (D)、Bax (E)、Bad (F) 的 mRNA 相对表达水平

2.6 NaF 对 PI3K-Akt 信号通路中抗凋亡因子 mRNA 相对表达水平的影响

PI3K-Akt 信号通路的下游抗凋亡相关因子在小鼠肾脏中的基因表达水平如图 8 所示。与对照组相比, Bcl-2 mRNA 相对表达水平, 12 mg/kg 组在试验第 42 天显著降低 ($P<0.05$), 24 和 48 mg/kg 组在试验第 21 和 42 天均极显著降低 ($P<0.01$); Bcl-xL mRNA 相对表达水平, 24 和 48 mg/kg 组在试验第 21 和 42 天均极显著降低 ($P<0.01$)。

2.7 NaF 对 PI3K-Akt 信号通路中关键凋亡相关因子蛋白相对表达水平的影响

PI3K-Akt 信号通路中关键凋亡相关因子在小鼠

肾脏中的蛋白表达水平如图 9 所示。与对照组相比, PI3K 的蛋白相对表达水平, 12、24 和 48 mg/kg 组在试验第 21 和 42 天均极显著降低 ($P<0.01$); p-Akt (Ser473) 的蛋白相对表达水平, 12 mg/kg 组在试验第 21 天极显著降低 ($P<0.01$), 24 和 48 mg/kg 组在试验第 21 和 42 天均极显著降低 ($P<0.01$); C-caspase-9 的蛋白相对表达水平, 12 mg/kg 组在试验第 42 天极显著升高 ($P<0.01$), 24 和 48 mg/kg 组在试验第 21 和 42 天均极显著升高 ($P<0.01$); C-caspase-3 的蛋白相对表达水平, 24 和 48 mg/kg 组在试验第 21 和 42 天均极显著升高 ($P<0.01$)。

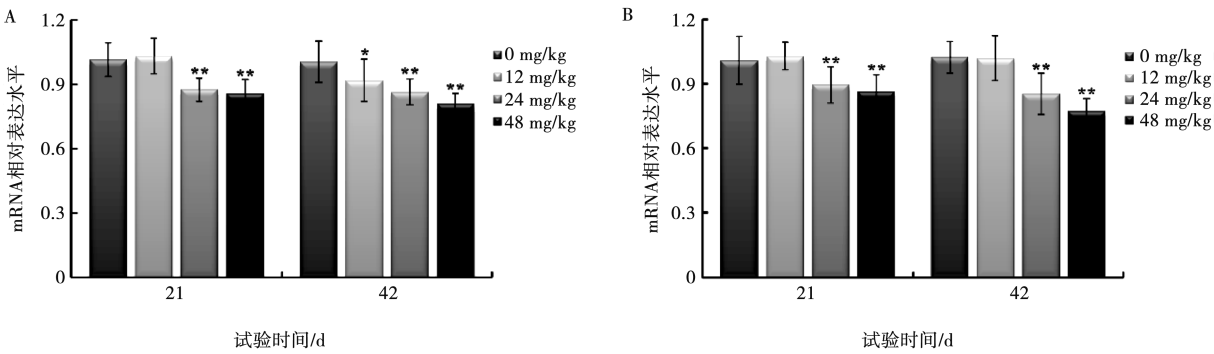


图 8 不同剂量 NaF 处理后小鼠肾脏抗凋亡因子 Bcl-2 (A)、Bcl-xL (B) mRNA 相对表达水平

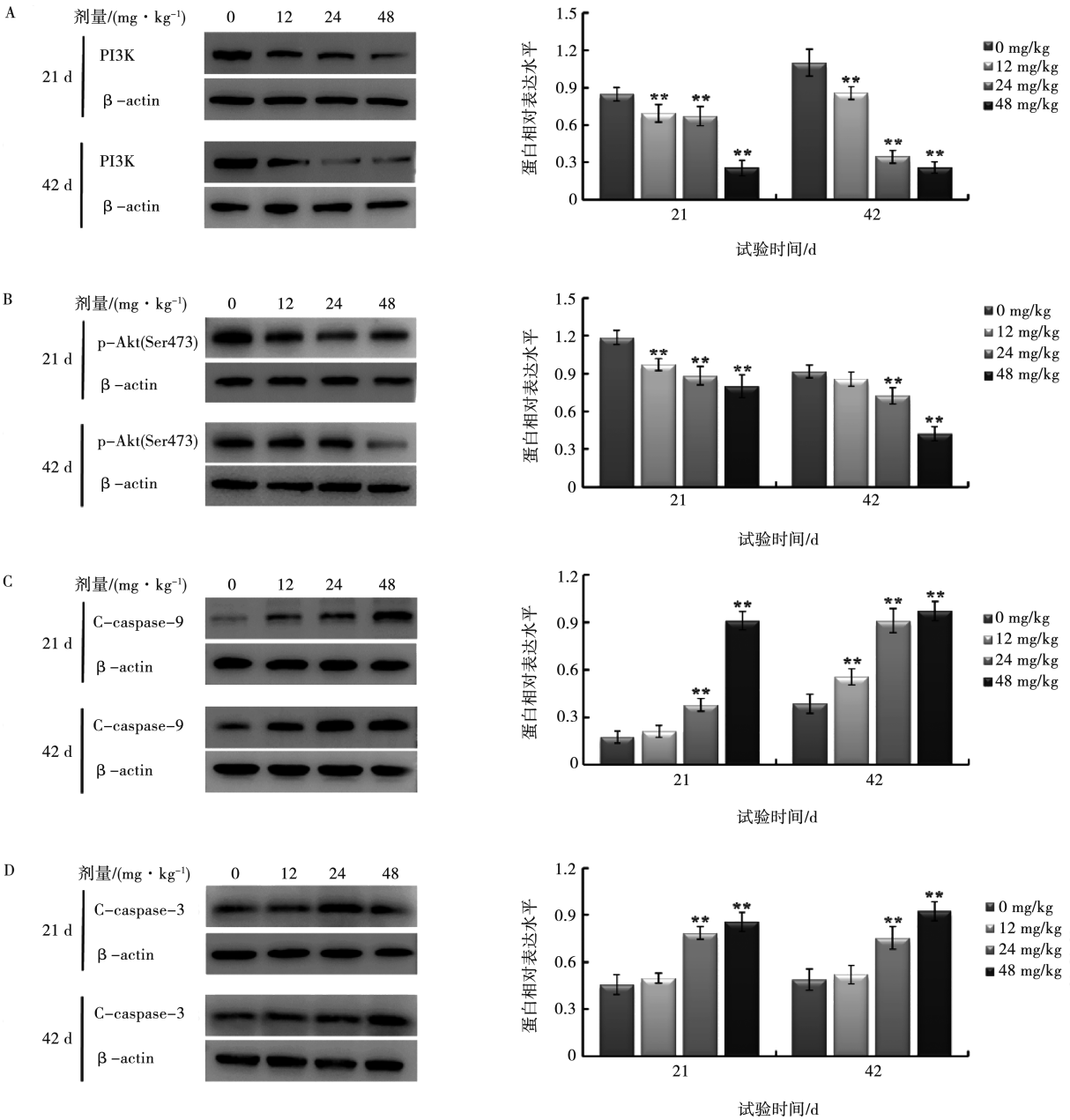


图 9 不同剂量 NaF 处理后小鼠肾脏 PI3K (A)、p-Akt (Ser473) (B)、C-caspase-9 (C) 和 C-caspase-3 (D) 的蛋白相对表达水平

3 讨论

细胞凋亡是由基因调控的程序性细胞死亡过程,在维持组织稳态中发挥关键作用。在畜禽养殖中,环境污染物或饲料中过量微量元素均可干扰这一过程,导致细胞凋亡异常激活并引发组织损伤^[18-20],这不仅直接影响畜禽健康和生产性能,还可能通过肉、蛋、奶等动物源性食品威胁人类健康。氟是机体必需的微量元素,但其在工农业污染和自然高氟区的过量存在可导致毒性效应^[2]。近年研究发现,氟暴露可诱导肾脏细胞凋亡^[21-22],但其具体分子机制尚未完全阐明。因此,本研究通过体内试验系统评估 NaF 对肾脏细胞凋亡的影响,并重点分析 PI3K-Akt 信号通路的动态变化,以揭示氟的肾毒性新机制。研究成果也为畜禽养殖中氟暴露的早期预警和干预提供了理论依据,同时也可对环境氟污染所致人类肾脏疾病的防治策略提供新思路。

本研究通过每日灌胃构建氟致肾脏损伤模型。组织病理学分析显示,NaF 处理组小鼠肾脏出现明显的病理改变,包括肾小管上皮细胞变性、坏死、脱落及透明管型形成,且损伤程度与 NaF 剂量及染氟时间呈明确的剂量与时间依赖性,而对照组未见上述变化,证实本研究中设置的 NaF 剂量可导致肾脏损伤,模型建立成功。鉴于细胞凋亡可能是 NaF 诱导肾损伤的关键机制之一,本研究首先利用流式细胞术定量分析肾脏细胞凋亡情况,发现 NaF 处理组小鼠肾脏细胞凋亡率呈现显著的剂量依赖性升高。为进一步验证这一发现并明确凋亡细胞的类型、数量及空间分布特征,通过 TUNEL 法进行组织学定位分析,结果显示,凋亡信号主要富集于肾小管上皮细胞,且凋亡细胞数量随 NaF 剂量增加而显著增多。值得注意的是,这一变化趋势与流式细胞术检测结果呈现高度一致,再次表明过量 NaF 可诱导肾脏细胞发生凋亡。

为阐明 PI3K-Akt 信号通路在 NaF 诱导肾脏细胞凋亡中的调控作用,本研究首先通过 RT-qPCR 检测通路主要分子表达水平,发现 NaF 处理组小鼠肾脏 PI3K 和 Akt 的 mRNA 相对表达水平以及 PI3K 和 p-Akt (Ser473) 的蛋白相对表达水平均显著降低,提示过量 NaF 可抑制 PI3K-Akt 信号通路的激活,这一发现为深入探究氟的肾毒性机制提供了重要试验依据。作为 PI3K-Akt 通路的核心效应分子,Akt 可通过磷酸化作用调控其下游靶蛋白(如 FoxO3a、caspase 9、Bad、mTOR 等),从而负调控凋亡途径^[23-24]。FoxO3a 作为叉头转录因子家族 O 亚型成员,可调控氧化应激、细胞周期及凋亡相关基因的转录^[25]。研究表明,活化的 Akt 可通过磷酸化 FoxO3a 使其从核

内转位至胞质,进而抑制其转录活性^[26],导致促凋亡基因(如 Bim、Bax)的表达下调^[27-28]。在本研究中,24 和 48 mg/kg 组小鼠肾脏 FoxO3a、Bim、Bax 的 mRNA 相对表达水平显著升高,提示 NaF 可能通过抑制 PI3K-Akt 信号通路,解除对 FoxO3a 的抑制作用,进而上调促凋亡基因表达,最终诱导肾脏细胞凋亡。作为内源性凋亡通路的核心启动者,caspase-9 通过介导凋亡小体的形成并激活下游效应型 caspase (如 caspase-3/7),最终执行细胞凋亡程序^[29]。研究表明,Akt 可通过特异性磷酸化 caspase-9 酶原,有效抑制细胞色素 C (Cyt c) 诱导的 caspase-9 酶原切割活化,从而阻断凋亡信号级联反应^[30]。本研究发现,在 48 mg/kg NaF 处理组的小鼠肾脏中,caspase-9 和 caspase-3 的 mRNA 相对表达水平显著上调。同时,在 24 和 48 mg/kg 组中,具有剪切活性的 C-caspase-9 和 C-caspase-3 的蛋白相对水平也显著升高。这些结果提示,NaF 可能通过抑制 PI3K-Akt 信号通路,解除其对 caspase-9 活化的抑制作用,从而激活了 caspase 依赖性的凋亡途径。

Bad、Bcl-2 和 Bcl-xL 作为 Bcl-2 蛋白家族的核心成员,分别发挥促凋亡和抗凋亡的调控作用。已有研究证实,Akt 介导的 Bad 磷酸化不仅能促进其与 Bcl-xL 或 Bcl-2 解聚,还能使其与 14-3-3 等抗凋亡蛋白结合,从而有效阻断 Bad 的促凋亡功能^[31-32]。本研究结果显示,24 和 48 mg/kg 组小鼠肾脏中 Bad 的 mRNA 相对表达水平显著升高,而 Bcl-2 和 Bcl-xL 的 mRNA 相对表达水平显著降低,提示 NaF 可能通过抑制 Akt 介导的 Bad 磷酸化,促进 Bad/Bcl-2 复合物形成,进而激活线粒体途径的细胞凋亡。mTOR 作为 PI3K-Akt 下游关键的丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶,在调控细胞的存活、生长、增殖和自噬过程中发挥核心作用^[33-34]。值得注意的是,p70S6K 作为 mTOR 的直接下游靶蛋白,不仅参与蛋白质合成调控,还能通过与 Bad 蛋白的相互作用影响细胞凋亡进程。在本研究中,24 和 48 mg/kg 组小鼠肾脏中 mTOR 和 p70S6K 的 mRNA 相对表达水平均显著降低,表明过量的 NaF 可能通过抑制 PI3K-Akt-mTOR 信号通路,阻断 mTOR 复合物对 p70S6K 的激活作用,进而破坏细胞生存与凋亡的平衡,最终导致肾脏细胞凋亡,这与 Caglayan 等^[35]在 Wistar 大鼠肾脏中的研究结果相印证。

4 结论

本研究通过建立 NaF 暴露的 ICR 小鼠模型,系统探讨了 PI3K-Akt 信号通路在氟致肾脏细胞凋亡中的调控作用。结果显示,当 NaF 的剂量超过

12 mg/kg 时,可观察到 PI3K-Akt 信号通路活性受到抑制,并伴随促凋亡因子 mRNA 表达水平显著上调,抗凋亡因子 mRNA 表达水平下调,以及肾脏细胞凋亡率显著增加且组织结构出现损伤。上述结果表明,PI3K-Akt 信号通路的抑制与氟诱导的肾脏细胞凋亡及组织损伤之间存在显著关联。这一发现为揭示氟致肾脏毒性的潜在机制提供了新的试验证据,也为进一步研究该通路在氟诱导肾损伤中的具体作用机制及可能的干预策略提供了方向。

参考文献:

- [1] SINGH G, KUMARI B, SINAM G, et al. Fluoride distribution and contamination in the water, soil and plants continuum and its remedial technologies, an Indian perspective - a review [J]. Environ Pollut, 2018, 239: 95-108.
- [2] SONG G H, GAO J P, WANG C F, et al. Sodium fluoride induces apoptosis in the kidney of rats through caspase-mediated pathways and DNA damage [J]. J Physiol Biochem, 2014, 70 (3): 857-868.
- [3] VITHANAGE M, BHATTACHARYA P. Fluoride in the environment: sources, distribution and defluoridation [J]. Environ Chem Lett, 2015, 13 (2): 131-147.
- [4] 韩颖,张宏民,张永峰,等.大同盆地地下水高砷、氟、碘分布规律与成因分析及质量区划 [J]. 中国地质调查, 2017, 4 (1): 57-68.
- [5] WEN D, ZHANG F, ZHANG E, et al. Arsenic, fluoride and iodine in groundwater of China [J]. J Geochem Explor, 2013, 135: 1-21.
- [6] 李祥志,曹文庚,李英,等.含氟地下水的危害、治理技术现状与进展 [J]. 中国地质, 2024, 51 (2): 457-482.
- [7] 中国疾病预防控制中心地方病控制中心. 中国地方病防治年报 2022 [R]. 北京: 中国疾病预防控制中心, 2022.
- [8] 李海霞,许学慧,刘海云.土壤氟污染与修复方法研究进展 [J]. 中国土壤与肥料, 2023 (12): 261-270.
- [9] ALTINDAĞ F, ÖZDEK U. Ameliorative effects of chitosan on fluoride-induced kidney injury in rats: a stereological and immunohistochemical study [J]. J Mol Histol, 2025, 56 (3): 149.
- [10] 柏才敏,陈涛,龚涛,等.高氟致雏鸡肾脏病理学损伤和相关生化指标改变的研究 [J]. 中国兽医学报, 2010, 30 (4): 505-509.
- [11] SHARMA P, VERMA P K, SOOD S, et al. Impact of chronic sodium fluoride toxicity on antioxidant capacity, biochemical parameters, and histomorphology in cardiac, hepatic, and renal tissues of wistar rats [J]. Biol Trace Elem Res, 2023, 201 (1): 229-241.
- [12] GUO X, WANG L, XUAN J, et al. Fluoride induces spermatocyte apoptosis by IP3R1/MCU-mediated mitochondrial calcium overload through MAMs [J]. J Hazard Mater, 2025, 489: 137514.
- [13] WANG M, LUO K, SHA T, et al. Apoptosis and inflammation involved with fluoride-induced bone injuries [J]. Nutrients, 2024, 16 (15): 2500.
- [14] GLAVIANO A, FOO A S C, LAM H Y. PI3K/AKT/mTOR signaling transduction pathway and targeted therapies in cancer [J]. Mol Cancer, 2023, 22 (1): 138.
- [15] VARIŞLI B, DARENDELİOĞLU E, CAGLAYAN C, et al. Hesperidin attenuates oxidative stress, inflammation, apoptosis, and cardiac dysfunction in sodium fluoride-induced cardiotoxicity in rats [J]. Cardiovasc Toxicol, 2022, 22 (8): 727-735.
- [16] ZHOU B H, TAN P P, JIA L S, et al. PI3K/AKT signaling pathway involvement in fluoride-induced apoptosis in C2C12 cells [J]. Chemosphere, 2018, 199: 297-302.
- [17] YILDIZ M O, ÇELİK H, CAGLAYAN C, et al. Neuromodulatory effects of hesperidin against sodium fluoride-induced neurotoxicity in rats: involvement of neuroinflammation, endoplasmic reticulum stress, apoptosis and autophagy [J]. NeuroToxicology, 2022, 90: 197-204.
- [18] 琚昊.不同硒源拮抗高氟诱导的肉鸡肠上皮细胞凋亡的机制研究 [D]. 杭州: 浙江农林大学, 2022.
- [19] YIN H F, PU J J, SHI H L, et al. Time-course physiological and transcriptomic study reveals cadmium effects on antioxidant, apoptosis, and immunity in the kidney of the freshwater snail *Pomacea canaliculata* [J]. Environ Pollut, 2025, 381: 126601.
- [20] YUAN X, WEN B, HU X, et al. Melatonin mitigates arsenic and fluoride-induced cardiotoxicity in chickens by maintaining mitochondrial homeostasis [J]. Poult Sci, 2025, 104 (8): 105325.
- [21] WANG S, NING H, HUA L, et al. Exposure to fluoride induces apoptosis in the liver, kidney, and heart of *Xenopus laevis* by regulating the Caspase-8/3 signaling pathway [J]. Acta Histochem, 2023, 125 (3): 151999.
- [22] ZHANG X, YAN Q, XIAO Y, et al. Integrating network pharmacology, molecular docking, and animal studies to investigate the protective effect of *Astragalus* polysaccharide on fluoride-induced renal injury in rats [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2025, 294: 118109.
- [23] MANNING B D, TOKER A. AKT/PKB signaling: navigating the network [J]. Cell, 2017, 169 (3): 381-405.
- [24] ZHANG W, YIN K, SHI J, et al. The decrease of selenoprotein K induced by selenium deficiency in diet improves apoptosis and cell progression block in chicken liver via the PTEN/PI3K/AKT pathway [J]. Free Radic Biol Med, 2022, 189: 20-31.
- [25] LIU C, TIAN Q, LI Z, et al. FOXO3a-BAP1 axis regulates neuronal ferroptosis in early brain injury after subarachnoid hemorrhage [J]. Redox Biol, 2025, 82: 103550.
- [26] KORTAM M A, ALAWADY A S, ABDEL HAMID SADIK N, et al. Fenofibrate mitigates testosterone induced benign prostatic hyperplasia via regulation of Akt/FOXO3a pathway and modulation of apoptosis and proliferation in rats [J]. Arch Biochem Biophys, 2022, 723: 109237.
- [27] SUN B, CHEN H, WANG X, et al. Regorafenib induces Bim-mediated intrinsic apoptosis by blocking AKT-mediated FOXO3a nuclear export [J]. Cell Death Discov, 2023, 9 (1): 37.
- [28] ZHANG X, GE J, ZHU X, et al. Effects and mechanism of oxymatrine combined with compound Yinchen Granules on the apoptosis of hepatocytes through the Akt/FoxO3a/bim pathway [J]. Biomed Res Int, 2022, 2022 (1): 8644356.
- [29] RENATUS M, STENNICKE H R, SCOTT F L, et al. Dimer for-

- mation drives the activation of the cell death protease caspase 9 [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98 (25): 14250-14255.
- [30] YUAN J, DENG Y, ZHANG Y, et al. Bmp4 inhibits goose granulosa cell apoptosis via PI3K/AKT/Caspase-9 signaling pathway [J]. Anim Reprod Sci, 2019, 200: 86-95.
- [31] DUAN L, DONG S, HUANG K, et al. Computational analysis of binding free energies, hotspots and the binding mechanism of Bcl-xL/Bcl-2 binding to Bad/Bax [J]. Phys Chem Chem Phys, 2021, 23 (3): 2025-2037.
- [32] GU G, HOU D, JIAO G, et al. Ortho-silicic acid plays a protective role in glucocorticoid-induced osteoporosis via the Akt/bad signal pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. Biol Trace Elem Res, 2023, 201 (2): 843-855.
- [33] VUCICEVIC L, MISIRKIC M, KRISTINA J, et al. Compound C induces protective autophagy in cancer cells through AMPK inhibition-independent blockade of Akt/mTOR pathway [J]. Autophagy, 2011, 7 (1): 40-50.
- [34] PORTA C, FIGLIN R A. Phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signaling pathway and kidney cancer, and the therapeutic potential of phosphatidylinositol-3-kinase/Akt inhibitors [J]. J Urol, 2009, 182 (6): 2569-2577.
- [35] CAGLAYAN C, KANDEMIR F M, DARENDELIOĞLU E, et al. Hesperidin protects liver and kidney against sodium fluoride-induced toxicity through anti-apoptotic and anti-autophagic mechanisms [J]. Life Sci, 2021, 281: 119730.

· 信息 ·

