· 实验研究 ·

燃煤型氟中毒对大鼠骨骼组织形态计量学影响*

张秀慧[1]，秦祥慧[2]，秦鸣[3]，喻茂娟[3]

摘　要：目的　探讨燃煤型氟中毒对大鼠骨组织形态计量学影响。**方法**　建立低蛋白低钙条件下燃煤型氟中毒大鼠模型；测定大鼠 24 h 尿氟、骨氟，根据氟斑牙判断损伤程度；采用 X 线骨密度仪测定大鼠股骨及胫骨骨密度；扫描电子显微镜下观察大鼠股骨松质骨超微结构的形态学改变，观察大鼠胫骨上端骨形态静态计量学参数改变。**结果**　染氟组大鼠 100% 发生氟斑牙；染氟组大鼠骨氟含量[(199.90 ± 106.84) mg/kg]与骨密度(0.205 3 g/cm^2)明显高于对照组[分别为(30.06 ± 6.11) mg/kg、0.185 4 g/cm^2]，差异有统计学意义(P < 0.05)；形态计量学结果显示，染氟组大鼠胫骨上端骨小梁面积[(67 612.02 ± 1 662.23) mm^2]、骨小梁周长[(7 655.44 ± 918.05) mm]、骨小梁个数[(38.25 ± 4.99)个/mm]均明显高于对照组[分别为(50 951.43 ± 9 046.88) mm^2、(5 172.42 ± 789.70) mm、(27.75 ± 4.19)个/mm](P < 0.05)。**结论**　单纯低蛋白低钙条件下，过量氟暴露可导致大鼠骨形态计量学出现以骨软化为主的病理改变。

关键词：燃煤型氟中毒；骨组织；骨形态计量学；超微结构

中图分类号：R 994.6　**文献标志码：**A　**文章编号：**1001-0580(2015)01-0070-04　DOI：10.11847/zgggws2015-31-01-21

Morphological changes of bone in progress of coal-burning fluorosis of rat

ZHANG Xiu-hui*, QIN Xiang-hui, QIN Ming, et al(*Department of Preventive Medicine, Medical School, Chifeng College, Chifeng, Inner Mongolia Autonomous Region 024200, China)

Abstract: Objective　To explore morphological changes of bone in the progress of coal-burning fluorosis in rats. **Methods**　Rat coal burning fluorosis model was established under low-protein and low calcium; the contents of 24-hour urinary fluoride, bone fluoride, dental fluorosis were determined to judge the degree of the injury; bone mineral density of femur and tibia was determined using X-ray absorptiometry; morphological changes of femur cancellous bone ultrastructure was observed with scanning electron microscope and morphogenetic changes of the tibia bone were detected with static measurement parameters. **Results**　All rats in fluoride groups had dental fluorosis. Bone fluoride content(199.90 ± 106.84 mg/kg) and bone mineral density(0.205 3 g/cm^2) of fluoride groups were significantly higher than those of control group(30.06 ± 6.11 mg/kg and 0.185 4 g/cm^2), with statistically significant differences(P < 0.05 for all). Morphometry showed that trabecular area of upper tibia of the rats in fluoride groups(67 612.02 ± 1 662.23 mm^2), trabecular bone perimeter(7 655.44 ± 918.05 mm), and the number of trabecular bone(38.25 ± 4.99/mm) were significantly higher than those of the rats in control group(50 951.43 ± 9 046.88 mm^2, 5 172.42 ± 789.70 mm, and 27.75 ± 4.19/mm; P < 0.05 for all). **Conclusion**　Under low-protein and low calcium condition, excessive fluoride exposure can lead to pathological changes of bone, especially the changes of osteomalacia in rats based on histomorphometric study.

Key words: coal-burning fluorosis; bone tissue; bone histomorphometry; ultrastructure

地方性氟中毒(endemic fluorosis)，又称地方性氟病，是一种全球流行的地方病，中国被称为世界上最大的多发地带，全国有病区县 1 226 个，受威胁人口超过 2 亿人[1]。国内外大多为天然高氟水引起的饮水型氟中毒，而贵州省以燃煤污染型氟中毒为主，全省共有 37 个地氟病病区县(市、区)，其中有 15 个重病县(市、区)，主要分布在西北、中部及南部的部分地区，在贫穷村庄，因氟中毒致畸致残者比例较高[2-4]。现场流行病学调查发现，氟骨症导致的畸形已危害到一定数量青少年的健康，骨骼病理改变除与氟摄入量直接有关外，还与患者年龄，性别、营养状况及个体差异等有关。尽管地方性氟中毒的病因已查明，但其发病机制尚未得到彻底阐明。本研究应用骨组织形态计量学方法，探讨燃煤型氟中毒对大鼠骨损害病理特点，比较氟中毒和低钙低蛋白对机体骨组织的影响，推测氟中毒骨组织改变的发病机制，结果报告如下。

1　材料与方法

1.1　主要试剂与仪器　氟化钠(分析纯，上海市第一化工厂)，氟离子选择电极、甘汞电极(上海人和科学仪器有限公司)，Hologic QDR24500A 型双能 X 线骨密度仪(美国 Hologic 公司)，HM360 重型切片机(德国 Zeiss 公司)，OLYM-PUS 光学显微镜、

* **基金项目：**国家自然科学基金(30460122)

作者单位：1. 赤峰学院医学院预防医学教研室，内蒙古 赤峰 024200；2. 郑州市管城区卫生监督所；3. 贵阳医学院

作者简介：张秀慧(1974 -)，女，内蒙古赤峰人，讲师，硕士，研究方向：流行病、营养与卫生统计。

通讯作者：喻茂娟，E-mail：maojuanyu@gmc.edu.cn

数字出版日期：2014 - 4 - 8 14：18

数字出版网址：http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20140408.1418.047.html

Meta Morph/DP10/BX4 型显微图像分析系统(日本 OLYMPUS 公司),扫描电子显微镜(北京日立公司)。

1.2　*动物分组与处理*　断乳 2 周 SD 大鼠 120 只(贵阳医学院实验动物部),许可证号:SCXK(黔)2012 - 0001,体重(91.1 ± 10) g,适应性喂养 1 周后,按体重随机分为 4 组(对照组、染氟组、染氟低蛋白低钙组、单纯低蛋白低钙组),每组 30 只,雌雄各半。除对照组食用正常饲料外,其他各组均食用不同配方饲料,对照组(饲料氟 5.2 mg/kg、蛋白质 18%),染氟组(饲料氟 106 mg/kg、蛋白质 18%),染氟低蛋白低钙组(饲料氟 106 mg/kg、蛋白质 8.2%、钙 0.1%),单纯低蛋白低钙(饲料氟 4.6 mg/kg、蛋白质 8.2%、钙 0.1%)。动物室相对湿度 50% ~60%,每周观察大鼠生长发育状况及牙齿变化情况。各组均饮用自来水,自来水中氟含量 0.692 2 mg/L,染毒期间大鼠自由进食、饮水。

1.3　*标本采集与处理*　大鼠出现明显氟斑牙时处死大鼠(染氟 24 周),尿样采集:处死大鼠前,将各组大鼠单只放入代谢笼中,收集 24 h 尿样,并记录尿样体积。尿样保存于 -20 ℃冰箱中待测。四肢骨采集:处死大鼠后,分离四肢骨,剔除肌肉和结缔组织。一侧胫骨立即投入 4% 多聚甲醛固定液中,用于硬组织切片及形态计量学检测,其他骨于 -80 ℃保存备用,用于测定骨氟,骨密度及骨组织的电镜观察。

1.4　*指标与方法*

1.4.1　大鼠体内尿氟与骨氟含量测定　尿氟采用氟离子选择电极法测定;骨氟含量采用高温灰化 - 氟离子选择电极法测定,将大鼠前肢骨用蒸馏水洗净,于 105 ℃烤至恒重,粉碎。称取 0.500 g 骨粉于坩埚中,加入 0.4% 乙酸镁固定 2 h,80 ℃蒸干,600 ℃灰化 6 h,加三滴溴甲酚绿指示剂,用 2% NaOH 调节 pH 值至淡黄,定容至 50 mL,取 2 mL,加去离子水 8 mL,离子强度调节缓冲溶液 10 mL 于 50 mL 烧杯中,置入氟电极和甘汞电极,待电位平衡后,读取电位值,根据标准曲线计算样品骨氟含量。

1.4.2　氟斑牙检查与分度　每周定时检查大鼠氟斑牙病情,定期拍摄典型氟斑牙彩色照片,计算每组大鼠氟斑牙发生率。大鼠氟斑牙分度方法,正常:釉质呈棕黄色半透明、光滑、有光泽;轻度:釉质变白或出现棕白相间条纹,光滑性和光泽度改变不明显;中度:釉质表面粗糙、无光泽,可见棕色色素沉着、浅表凹坑状缺损;重度:一颗以上切齿明显磨损、变短,甚至缺失。

1.4.3　骨密度测量　取同侧分离开的大鼠股骨及胫骨,采用骨密度仪及小动物专用软件测量骨密度。

1.4.4　四环素双标记骨组织形态计量学检测　处死大鼠前 10、5 d,于皮下注射盐酸四环素溶液 1 mL(2 mg/mL),取离体大鼠胫骨于新鲜配制的 4% 多聚甲醛固定 24 h,梯度酒精脱水,不脱钙塑料包埋,切片(4 μm),Goldner 三色法染色,封片,光镜、荧光显微镜观察分析,指标包括静态学参数:骨小梁面积(mm^2)、骨小梁周长(mm)、骨小梁数目(个/mm)。

1.4.5　大鼠股骨松质骨电镜观察　取同侧大鼠股骨股骨头侧(约 1 cm)用手术刀沿正中作矢状剖开,暴露骨髓腔,生理盐水冲洗,4% 戊二醛溶液固定 24 h,预冷磷酸盐缓冲液冲洗,四氧化锇浸泡 1 h,乙醇逐级脱水,叔丁醇中冷冻后抽真空,定向粘附在金属载物台上,真空喷金镀膜,在日立 S-3400N 型扫描电子显微镜下观察大鼠股骨松质骨超微结构的形态学改变。

1.5　*统计分析*　应用 SPSS 17.0 统计软件对实验数据进行分析,进行 Levene 方差齐性检验、单因素方差分析比较组间差异、方差齐采用最小显著差异法或 q 检验法进行两两比较;方差不齐采用 Tamhane T2 或 Dunnet T3 法进行两两比较,检验水准 $\alpha = 0.05$。

2　结　果

2.1　*大鼠一般状态及氟斑牙发生情况*　实验期间,大鼠一般状态良好,各组大鼠进食量较对照组减少,染氟组大鼠生长较为缓慢,染氟 1 个月左右,染氟低蛋白低钙组大鼠开始出现轻度氟斑牙,釉质表面出现黄白相间条纹,至实验期末,染氟组大鼠均呈现程度不同的氟斑牙表现,染氟低蛋白低钙组大鼠均呈现中重度氟斑牙,重度氟斑牙发生率为 72.73%。

2.2　*氟对大鼠骨氟和尿氟水平影响(表 1)*　与对照组比较,染氟组、染氟低蛋白低钙组大鼠骨氟与尿氟含量均明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1　各组大鼠骨氟及尿氟水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	骨氟(mg/kg)	n	尿氟(mg/L)
对照组	9	30.06 ± 6.11	6	0.69 ± 0.36
染氟组	11	199.90 ± 106.84[a]	5	5.50 ± 0.74[a]
染氟低蛋白低钙组	11	334.29 ± 50.88[a]	6	11.24 ± 1.82[ab]
单纯低蛋白低钙组	9	24.76 ± 4.84	6	0.68 ± 0.12

注:与对照组比较,a $P < 0.05$;与染氟组比较,b $P < 0.05$。

2.3　*氟对大鼠骨密度影响*　对照组、染氟组、染氟低蛋白低钙组、单纯低蛋白低钙组大鼠骨密度分别为 0.185 4、0.205 3、0.152 5、0.167 4 g/cm^2;与对照组比较,染氟组大鼠骨密度明显升高,染氟低蛋白低钙组、单纯低蛋白低钙组大鼠骨密度降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

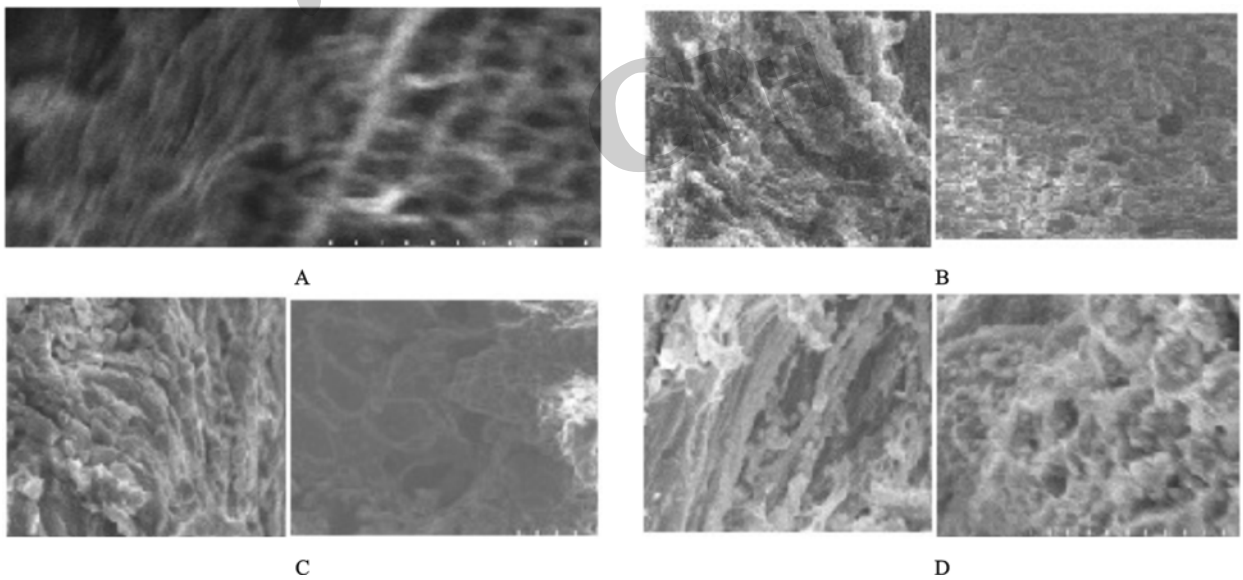
2.4　氟对大鼠股骨形态计量静态学参数影响(表 2)　与对照组比较,染氟组大鼠骨小梁面积、骨小梁周长、骨小梁数目均明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$);与对照组比较,染氟低蛋白低钙组大鼠骨小梁面积减少、骨小梁数目明显增加,单纯低蛋白低钙组大鼠骨小梁数目明显增加($P<0.05$)。

表 2　各组大鼠骨形态计量静态学参数比较($\bar{x}\pm s, n=4$)

组别	骨小梁面积(mm^2)	骨小梁周长(Mm)	骨小梁数目(个/Mm)
对照组	50 951.43 ± 9 046.88	5 172.42 ± 789.70	27.75 ± 4.19
染氟组	67 612.02 ± 1 662.23[a]	7 655.44 ± 918.05[a]	38.25 ± 4.99[a]
染氟低蛋白低钙组	34 076.00 ± 3 506.74[a]	3 502.28 ± 666.86	40.60 ± 7.40[a]
单纯低蛋白低钙组	45 073.69 ± 3 743.97	6 306.41 ± 503.57	40.50 ± 1.91[a]

注:与对照组比较,a $P<0.05$。

2.5　氟对大鼠股骨松质骨超微结构影响(图 1)　扫描电镜显示,对照组大鼠股骨松质骨的骨量丰富,纵横走向的骨小梁呈立体网状结构,骨小梁数目适中,表面光滑,厚度均匀,间距适度,胶原纤维走向清晰,排列紧密,整齐有序,呈规则的束状结构(图 1A);染氟组大鼠松质骨的骨量增加较明显,骨小梁表面粗糙不平,融合面积较多,胶原纤维排列紊乱,结构模糊不清并出现断裂,呈蓬松样改变(图 1B);染氟低蛋白低钙组大鼠股骨胶原纤维明显增粗,走向紊乱,并出现断裂且板状化,骨小梁大量融合成片,表面粗糙,骨吸收孔不明显(图 1C);单纯低蛋白低钙组胶原纤维大部分走向尚一致,部分出现紊乱,有胶原纤维融合现象,胶原纤维中间有较大的空洞存在,骨小梁结构不清,可见胶原的游离断端出现,整体呈枯枝样改变(图 1D)。



注:A:对照组;B:染氟组;C:染氟低蛋白低钙组;D:单纯低蛋白低钙组。

图 1　各组大鼠股骨胶原纤维及骨小梁变化(扫描电镜)

3　讨　论

氟能使成骨细胞明显活跃,增强碱性磷酸酶活性,破骨细胞表现为溶酶体数量减少并伴有溶酶体酶的合成减少[5]。本研究结果显示,染氟组大鼠发生了骨硬化为主的氟中毒骨组织改变,随着染氟时间延长,骨组织改变逐渐加重,骨形态计量静态学参数显示骨量增加,表现为骨小梁面积、骨小梁周长、骨小梁数目增加;电镜下染氟组大鼠股骨松质骨的骨量增加较明显,骨小梁表面粗糙不平,骨吸收陷窝多数明显缩小、变浅,甚至消失。胶原纤维排列杂乱无序,结构模糊不清,出现板结硬化样改变。这与秦治刚等[6]的实验结果一致。

骨软化(osteomalasia)指骨骼内因含有未钙化的骨样组织(osteoid)而变软,主要表现为新形成的骨基质不能及时正常钙化。在临床上骨软化,只能依靠骨组织学来诊断,其中以不脱钙骨组织形态计量学方法最优,通过四环素标记方法,可以了解骨基质形成和矿化情况,用类骨质的观测反映未矿化骨数量是诊断骨质软化的特征性指标[7]。本研究结果显示,染氟低蛋白低钙组大鼠类骨质表面较对照组增加显著,提示发生了骨软化为主的氟中毒骨组

织改变;电镜下染氟低蛋白低钙组大鼠股骨胶原纤维极度紊乱,板状化,较对照组增粗,骨小梁可见明显裂缝,骨吸收孔增大。邱明才等[8]研究发现,氟刺激成骨细胞使其活性增加,类骨质形成增多,但氟中毒时血钙降低,使骨细胞矿化不良,提示可能是发生骨软化的原因。

中国地氟病病区居民多属于低收入人群,普遍处于营养不良和膳食低钙状态,营养缺乏是氟骨症骨骼畸形的重要因素,增加钙和蛋白质等营养成分的摄入是预防氟骨症骨骼畸形的有效措施[9-12]。本研究结果表明,染毒 3 个月时染氟低蛋白低钙组大鼠出现骨软化,而染氟组出现硬化为主的氟中毒骨组织改变,这与许多文献报道相一致。

参考文献

[1] 黎昌健. 蒙衍强. 蒋才武. 地氟病在中国大陆的流行状况[J]. 实用预防医学,2008,15(14):1295-1298.
[2] 孙殿军,孙矗富,张兆军,等. 贵州省地方性氟中毒防治情况的考察报告[J]. 中国地方病学杂志,2003,22(2):168-169.
[3] 李达圣,安冬,何平. 贵州省燃煤型地方性氟中毒流行现状调查分析[J]. 中国地方病学杂志,2005,24(6):651-654.
[4] 刘家仁,王尚彦. 贵州两部燃煤污染型地方性氟中毒病区氟源探讨以织金县荷里活花村为例[J]. 贵州地质,2005,84(3):192-195.
[5] 房思思,张丽萍,刘璐. 氟的生物学作用——氟对骨的作用[J]. 微量元素与健康研究,2011,28(4):62-64.
[6] 秦治刚,杨小玉,刘乃杰. 氟中毒大鼠骨组织形态计量学指标测量[J]. 中国地方病防治杂志,2011,26(1):52-53.
[7] 廖二元. 代谢性骨病学[M]. 北京:人民卫生出版社,2003:474-479.
[8] 邱明才,陈光源,孟云,等. 燃煤污染型氟中毒家猪骨形态计量学研究[J]. 中华医学杂志,1999,69(12):677.
[9] 李广生. 营养因素对地氟病的影响;地氟病发病机制研究的基本总结[M]. 北京:科学出版社,2004:46-64,182-194.
[10] 于光前,孙殿军. 地方性氟中毒的病情与防治[J]. 中国公共卫生,2000,16(10):938-939.
[11] 张华,蔡黔华,方世杰,等. 贵州少年儿童氟骨症流行因素调查[J]. 中国地方病学杂志,1997,16(1):1-4.
[12] 臧增元,王建国,周长春,等. 氟骨症患者骨骼变形与营养关系的研究[J]. 中国地方病学杂志,2002,21(5):377-379.

收稿日期: 2013-11-14　（解学魁编辑　郑新校对）

· 实验研究 ·

慈菇多糖对免疫功能低下小鼠免疫调节作用*

吴小南,杨雪帆,朱萍萍,黄芳

摘　要:目的　探讨慈菇多糖对免疫功能低下小鼠免疫功能影响。**方法**　清洁级 ICR 雌性小鼠 50 只,按体重随机分为 5 组:对照组,模型组,慈菇多糖高、中、低剂量组(300、200、100 mg/kg),连续灌胃慈菇多糖 28 d,对照组和模型组灌胃等量蒸馏水;第 21 d,对照组皮下注射等量生理盐水,其余 4 组小鼠皮下注射氢化可的松25 mg/kg,连续 6 d(制备免疫功能低下模型),观察各组小鼠体重变化、脏器(胸腺、脾脏、肝脏)指数、巨噬细胞吞噬功能等指标。**结果**　与对照组比较,模型组小鼠胸腺、脾和肝指数[分别为(1.255±0.319)、(2.380±0.574)、(40.442±1.882)mg/g]明显降低,巨噬细胞吞噬指数(1.794±0.514)降低($P<0.05$);与模型组比较,低、中、高剂量慈菇多糖组小鼠胸腺指数[分别为(1.848±0.130)、(1.835±0.243)、(1.708±0.441)mg/g]、脾指数[分别为(3.433±0.250)、(3.386±0.577)、(2.602±0.609)mg/g]和肝指数[分别为(45.478±2.683)、(45.423±2.109)、(44.934±2.337)mg/g]均明显升高(均 $P<0.05$),巨噬细胞吞噬指数[分别为(2.274±0.590)、(2.406±0.246)、(2.462±0.444)]升高($P<0.05$)。**结论**　慈菇多糖在一定程度上能够提高小鼠非特异性免疫力。

关键词:慈菇多糖;免疫调节;脏器指数;巨噬细胞吞噬指数
中图分类号:R 994.4　**文献标志码**:A　**文章编号**:1001-0580(2015)01-0073-03　DOI:10.11847/zgggws2015-31-01-22

Immnoregulation effect of *Sagittaria sagittifolia* polysaccharide in immunocompromised mice

WU Xiao-nan, YANG Xue-fan, ZHU Ping-ping, et al (*Department of Nutrition and Food Hygiene, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian Province* 350108, China)

Abstract: Objective　To explore the effects of *Sagittaria sagittifolia* polysaccharide on immunologic function in immunocompromised mice. **Methods**　Fifty ICR female mice were randomly divided into five groups (normal control group, model group, high-[300 mg/kg·d], midium-[200 mg/kg·d], and low-dose [100 mg/kg·d] polysaccharide group) by body weight. *Sagittaria sagittifolia* polysaccharide was administrated intragastrically to the mice by gavage once a day for 28

* **基金项目**: 福建省科技计划项目(2012N0014);福建省医学创新课题(2012-CXB-14)
作者单位: 福建医科大学公共卫生学院营养与食品安全教研室,福建 福州 350108
作者简介: 吴小南(1963-),男,福建南安人,教授,博士,研究方向:营养资源的开发。
数字出版日期:2014-4-8 14:44
数字出版网址:http://www.cnki.net/kcms/detail/21.1234.R.20140408.1444.061.html