

燃煤型氟中毒大鼠钙磷代谢变化

Changes of calcium and phosphorus metabolisms in coal-burning fluorosis rats

张震, 韦艳, 杨军, 张华

ZHANG Zhen, WEI Yan, YANG Jun, ZHANG Hua

(贵阳医学院公共卫生学院环境卫生学教研室, 贵州 贵阳 550004)

摘要: 将断乳 4 周的 SD 大鼠 160 只随机分为对照组、低氟组、中氟组、高氟组, 食用病区煤烘玉米, 复制燃煤型氟中毒动物模型。分别于染毒后 30、90、180 d 分批处死动物, 检测血清钙、磷水平。结果显示: (1) 随着染毒时间增加, 各实验组骨氟、尿氟、股骨病理学积分逐渐增加 ($P < 0.05$), 且实验不同阶段各实验组与对照组比较, $P < 0.05$ 。(2) 血清钙: 30 d 时, 高氟组与中氟组低于对照组 ($P < 0.01$); 90 d 时, 高氟组低于对照组 ($P < 0.01$); 180 d 时, 各实验组均低于对照组 ($P < 0.05$)。(3) 血清磷: 180 d 时, 高氟组高于对照组 ($P < 0.05$)。提示摄氟早期即出现血清 Ca 降低, 可将血清 Ca 作为早发现早诊断的辅助诊断指标, 血清磷在氟中毒中的诊断价值尚需进一步研究。

关键词: 燃煤型氟中毒; 血清; 钙; 磷

中图分类号: R135.1; O613.41 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2012)05-0363-03

适量的氟能维持机体正常的钙磷代谢, 但过量氟对机体有损害作用, 可造成钙、磷等元素代谢异常, 可引起骨量增多或减少, 可导致不同程度的骨硬化、疏松、软化, 严重的如氟骨症者还可见异位钙化骨化。血清钙磷的变化可在一定程度上反映氟中毒时骨代谢的状况, 本研究拟复制燃煤型氟中毒动物模型, 并在不同染毒剂量与时间条件下检测动物血清钙、磷水平, 探讨血清钙、磷水平对氟中毒的早期诊断价值。

1 材料与方

1.1 主要试剂与仪器

血清钙、血清无机磷试剂盒 (南京建成科技有限公司), MQX200 型超级酶标仪 (美国 BIO-TEK 公司), PHS-3C 型雷磁 pH 计型 pH 计、PF-1-01 型氟离子电极 (上海精密科学仪器有限公司), 4-10 型箱式电阻炉 (上海路达实验有限公司), BX51 型 OLYMPUS 光学显微镜 (上海赖氏电子科技有限公司)。

1.2 动物模型复制

选择断乳 28 d 的 SD 大鼠 160 只 (第三军医大学大坪医院实验动物中心提供), 实验前于动物房适应 1 周, 根据实验

目的, 按照体重均衡随机化原则分为 4 组 (对照组、低氟组、中氟组、高氟组), 每组 40 只, 组内雌雄各半, 分笼饲养, 每笼饲养 5 只, 自由饮水、进食。对照组食用正常饲料, 染毒组食用病区拌泥煤烘玉米, 复制燃煤型氟中毒大鼠模型, 各组饲料配方及饲料含氟量见表 1。实验期间大鼠自由进食和饮水, 每周观察大鼠生长发育状况。分别于染毒 30、90 和 180 d 以股动脉放血法各处死一批动物, 观察骨组织病理切片, 检测骨氟、尿氟、血清 Ca、血清 P 离子。

表 1 实验动物分组及饲料配方

组别	n	体重 ($\bar{x} \pm s$, g)	饲料配方	饲料含氟量 (mg/kg)
对照组	40	105.62 $\pm$ 9.98	正常饲料	6.30
低氟组	40	105.65 $\pm$ 10.73	饲料含 17.5% 病区玉米	9.56
中氟组	40	105.80 $\pm$ 10.43	饲料含 35% 病区玉米	15.89
高氟组	40	105.98 $\pm$ 10.24	饲料含 70% 病区玉米	23.00

1.3 尿氟和骨氟测定

尿氟: 处死动物前收集 12 h 尿。取尿液 1.0 ml 于聚乙烯塑料杯中, 加入 10.0 ml TISAB 缓冲液和 9.0 ml 去离子水混匀, 氟离子选择电极法测定。骨氟: 取 SD 大鼠左下肢股骨, 剔去肌肉、结缔组织, 80 °C 烘干, 250 °C 炭化, 600 °C 灰化, 冷却后称取 0.1 g 于 20 ml 比色管中, 用 1vHCl 溶解, 2% NaOH 调节 pH 值至 5.25 (淡蓝色), 去离子水定容至 20.0 ml, 然后取 2.0 ml 加入聚乙烯塑料杯中, 加 10.0 ml TISAB 缓冲液和 8.0 ml 去离子水混匀, 氟离子选择电极法测定。

1.4 骨病理组织切片观察

将剔除肌肉、结缔组织的右下肢股骨放入 4% 甲醛固定液中, 充分固定 7 d, EDTA-2Na 脱钙液常温脱钙 21 d。流水冲洗 12 h, 石蜡包埋, 制作 2 μ m 石蜡切片。HE 染色, 光镜观察。分别对大鼠关节面软骨、骨小梁及骨皮质进行病理学观察。HE 染色片病理分级计分标准: (1) 关节面软骨: 分别从退变、坏死、缺损、纵行裂隙、软骨细胞柱病变、炎细胞浸润和纤维组织增生进行观察; (2) 骨小梁及骨皮质: 分别从退变、坏死、炎细胞浸润、纤维组织增生、成骨细胞增生活跃、成骨细胞减少静止、破骨细胞增多、破骨细胞减少、骨质生成增多和骨质生成减少进行观察; (3) 骨髓组织: 分别从变性、坏死、炎细胞浸润和纤维组织增生进行观察。每个指标按阴性 (-) 计 0 分、轻度 (+) 计 1 分、中度 (++) 计 2 分、重度 (+++) 计 3 分, 把所观察的内容得分相加, 分别计算出关节面软骨、骨小梁及骨皮质总分。

1.5 血清钙、磷测定

收稿日期: 2012-11-08; 修回日期: 2013-01-05

基金项目: 科技部国际合作项目 (2010DFB30530); 贵州省科学技术基金 (黔科合 J 字 [2010] 2268 号)

作者简介: 张震 (1981—), 男, 讲师, 从事地方病防治研究。

通讯作者: 张华, 教授, huazhang202@126.com。

血清钙采用甲基百里香酚蓝 (MTB) 比色法, 血清磷采用孔雀绿直接显色法测定, 严格按试剂盒说明书操作。

1.6 统计分析

资料录入采用 Excel, SPSS13.0 统计软件分析处理, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 氟斑牙分度结果用率表示, 统计分析采用秩和检验; 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计分析采用单因素方差分析。

2 结果

2.1 尿氟、骨氟检测

结果显示, 随着染毒时间增加, 各实验组尿氟、骨氟逐渐增加 ($P < 0.05$)。实验不同阶段与对照组比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 并呈随染氟剂量增加而增加的趋势 ($P < 0.05$)。尿氟、骨氟测定结果见表 2、3。

表 2 尿氟测定结果 ($\bar{x} \pm s$) $\mu\text{g/ml}$

组别	30 d		90 d		180 d	
	例数	尿氟	例数	尿氟	例数	尿氟
对照组	6	2.83 $\pm$ 0.40	14	3.71 $\pm$ 0.49	9	3.17 $\pm$ 0.51
低氟组	6	5.19 $\pm$ 0.41 ^a	12	5.40 $\pm$ 0.37 ^a	8	8.32 $\pm$ 0.60 ^a
中氟组	6	8.62 $\pm$ 0.36 ^{ab}	13	7.46 $\pm$ 1.10 ^{ab}	8	11.04 $\pm$ 1.32 ^{ab}
高氟组	8	10.32 $\pm$ 1.23 ^{abd}	13	12.53 $\pm$ 0.69 ^{abd}	6	15.28 $\pm$ 1.30 ^{abd}

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与低氟组比较, ^b $P < 0.01$; 与中氟组比较, ^d $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ 。

表 3 骨氟结果 ($\bar{x} \pm s$) mg/kg

组别	30 d		90 d		180 d	
	例数	骨氟	例数	骨氟	例数	骨氟
对照组	7	204.38 $\pm$ 1.39	9	311.06 $\pm$ 1.14 ^e	8	862.64 $\pm$ 1.38 ^{ef}
低氟组	6	217.02 $\pm$ 1.30	10	314.19 $\pm$ 1.17 ^e	10	1085.72 $\pm$ 1.28 ^{Aef}
中氟组	6	237.46 $\pm$ 1.49	10	333.62 $\pm$ 1.08 ^E	8	1450.99 $\pm$ 1.26 ^{abef}
高氟组	6	301.87 $\pm$ 1.84	10	350.72 $\pm$ 1.10 ^{ab}	8	2514.93 $\pm$ 1.30 ^{abdef}

注: 与对照组比较, ^A $P < 0.05$, ^a $P < 0.01$; 与低氟组比较, ^b $P < 0.01$; 与中氟组比较, ^d $P < 0.01$ 。与 30 d 比较, ^E $P < 0.05$, ^e $P < 0.01$; 与 90 d 比较, ^f $P < 0.01$ 。

2.2 骨病理组织变化情况

骨病理组织切片结果显示, 随着染毒时间延长及染毒剂量增加, 大鼠股骨关节面软骨逐渐出现了退变、坏死、缺损、纵行裂隙, 软骨细胞柱病变等现象, 表现为软骨面断裂, 细胞数量减少、坏死, 软骨细胞柱排列紊乱, 细胞坏死减少, 空泡蜕变; 骨小梁及骨皮质出现了不同程度的退变、坏死, 表现为骨小梁结构模糊, 骨基质减少、变薄、断裂, 骨细胞结构不清、排列紊乱及数量减少。将病变情况按积分量化后进行统计分析, 结果表明, 随着染毒时间增加, 病理学积分逐渐增加 ($P < 0.05$), 不同阶段各实验组与对照组相比较, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

2.3 血清钙检测结果

血清钙检测结果表明, 30 d 时, 高氟组与中氟组低于对照组 ($P < 0.01$); 90 d 时, 高氟组低于对照组 ($P < 0.01$); 180 d 时, 各实验组均低于对照组 ($P < 0.05$)。见表 4。

2.4 血清磷检测结果

30 d 和 90 d 时, 各组差异无统计学意义; 180 d 时, 高氟组高于对照组 ($P < 0.05$)。见表 5。

表 4 血清钙测定结果 ($\bar{x} \pm s$) mmol/L

组别	例数	30 d	90 d	180 d
对照组	10	3.94 $\pm$ 0.45	3.07 $\pm$ 0.26 ^e	2.74 $\pm$ 0.82 ^{ef}
低氟组	10	3.88 $\pm$ 0.17	2.96 $\pm$ 0.13 ^e	2.60 $\pm$ 0.15 ^{aef}
中氟组	10	3.57 $\pm$ 0.07 ^{ab}	2.87 $\pm$ 0.22 ^e	2.49 $\pm$ 0.10 ^{aef}
高氟组	10	3.40 $\pm$ 0.14 ^{abd}	2.75 $\pm$ 0.25 ^{aBe}	2.34 $\pm$ 0.29 ^{abef}

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与低氟组比较, ^B $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$; 与中氟组比较, ^d $P < 0.01$ 。与 30 d 比较, ^e $P < 0.01$; 与 90 d 比较, ^f $P < 0.01$ 。

表 5 血清磷测定结果 ($\bar{x} \pm s$) mmol/L

组别	例数	30 d	90 d	180 d
对照组	10	2.93 $\pm$ 0.53	2.89 $\pm$ 0.52	3.40 $\pm$ 0.20 ^{ef}
低氟组	10	2.89 $\pm$ 0.62	2.95 $\pm$ 0.56	3.52 $\pm$ 0.21 ^{ef}
中氟组	10	3.18 $\pm$ 0.46	3.12 $\pm$ 0.43	3.46 $\pm$ 0.17 ^F
高氟组	10	3.18 $\pm$ 0.47	3.03 $\pm$ 0.38	3.61 $\pm$ 0.22 ^{aDef}

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.01$; 与中氟组比较, ^D $P < 0.05$ 。与 30 d 比较, ^e $P < 0.01$; 与 90 d 比较, ^F $P < 0.05$, ^f $P < 0.01$ 。

3 讨论

本实验以不同比例病区煤烘玉米为饲料喂饲 SD 大鼠, 结果显示, 随着染毒时间延长, 大鼠骨氟尿氟含量逐渐增加, 具有剂量-效应关系, 且出现了不同程度的氟斑牙和骨骼病理表现, 表明燃煤型氟中毒大鼠模型复制成功。

Ca、P 主要以无机盐羟磷灰石 $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ 的形式存在于骨骼和牙齿中。通过测定血、尿等体液中 Ca、P 等含量可间接了解骨代谢的情况。目前多数研究表明, 氟中毒会造成血钙降低^[1-3]。原因可能在于以下两方面: 其一, 过量氟进入血液后, 消耗血中大量的 Ca^{2+} , 生成 CaF_2 , 然后进入骨骼中逐渐沉积, 使血 Ca^{2+} 浓度降低; 其二, 随着血 Ca^{2+} 降低, 甲状旁腺激素 (parathyroid hormone, PTH) 等调钙激素刺激破骨吸收, 骨 Ca^{2+} 释放入血的速度 (强度) 低于过量氟促进成骨而使血 Ca^{2+} 入骨的速度 (强度)。本实验发现, 在染毒 30 d 时, 高氟组就出现了血钙降低的现象, 提示血钙在氟中毒中是一个比较敏感的骨代谢指标。而其他与骨代谢有关的生化指标 (如骨形成蛋白 2、I 型胶原交联 N 末端肽等), 多在实验 90 ~ 180 d 时才出现变化。提示血清 Ca 可作为二级预防的监测指标。

关于氟中毒条件下血清磷的改变, 目前的报道不一^[4-7]。本次实验仅在 180 d 时出现了高氟组的血清磷高于对照组, 说明氟中毒时血清磷的变化不像钙那样敏感, 而且影响血清磷水平的因素可能较多, 其具体临床价值尚难确定。

参考文献:

- [1] 李广生, 任立群. 不同钙含量饲养条件下氟中毒对大鼠骨转换的影响 [J]. 中华病理学杂志, 1997, 26 (5): 277-280.
- [2] Grynpas M D, Cheng P T. Fluoride reduced the rate of dissolution of bone [J]. Bone Min, 1988, 5 (1): 1-9.
- [3] 孙景春, 张文博, 徐辉, 等. 投氟不同时间大鼠血清 PTH 水平的变化 [J]. 中国实验诊断学, 2009, 13 (8): 1010-1012.
- [4] 梁君慧, 陈风琴, 成小梅. 氟骨症患者骨密度与血清骨钙素和生化指标的相关分析 [J]. 中国地方病学杂志, 2002, 21

(4): 304-305.

- [5] 王守英, 席景砖, 李福成, 等. 血清化学元素与地方性氟中毒的关系 [J]. 新乡医学院学报, 2005, 22 (3): 198-199.
- [6] 万桂敏, 莫志亚, 刘忠杰, 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.

- [7] 陈应康, 田培燕, 叶劲松, 等. 燃煤性氟骨症患者血清钙、磷及碱性磷酸酶的变化 [J]. 河北北方学院学报, 2008, 25 (4): 27-28.

镧对子代大鼠学习记忆能力、海马神经细胞钙稳态及 ERK 蛋白表达的影响

Effects of lanthanum on learning and memory abilities, calcium homeostasis and ERK expression in hippocampus neurons of offspring rats

庞妍^{1,2}, 杨敬华¹, 刘秋芳¹, 靳翠红¹, 巫生文¹, 刘慧颖¹, 蔡原¹

PANG Yan^{1,2}, YANG Jing-hua¹, LIU Qiu-fang¹, JIN Cui-hong¹, WU Sheng-wen¹, LIU Hui-ying¹, CAI Yuan¹

(1. 中国医科大学公共卫生学院卫生毒理教研室, 辽宁 沈阳 110001; 2. 沈阳市第九人民医院理化实验室, 辽宁 沈阳 110024)

摘要: 雌性 Wistar 大鼠随机分为 4 组, 对照组饮用蒸馏水, 3 个染毒组分别饮用不同浓度的氯化镧 (2.5 g/L, 5 g/L, 10 g/L) 水溶液, 从雌鼠受孕起至子鼠断乳后 1 个月连续染镧。采用 Morris 水迷宫检测子代大鼠学习记忆能力, Fura-2/AM 探针法检测海马神经细胞内游离 Ca^{2+} 浓度, Western blot 法检测海马组织 ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白表达水平。结果表明, 随氯化镧染毒剂量的增加, 子代大鼠寻找平台的潜伏期和游泳距离增加 ($P < 0.05$), 在目标象限的停留时间减少 ($P < 0.05$), 神经细胞内游离 Ca^{2+} 水平升高 ($P < 0.05$), p-ERK1/2 蛋白表达水平下降 ($P < 0.05$)。提示氯化镧染毒可以造成子代大鼠学习记忆能力下降, 其原因可能与其导致神经细胞内钙稳态失衡及 p-ERK1/2 蛋白表达水平下降有关。

关键词: 镧; 学习记忆; 水迷宫; 钙离子; ERK

中图分类号: R135.1; O614.331 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2013)05-0365-03

近年来, 稀土元素对中枢神经系统和学习记忆的有害影响已引起人们关注^[1]。镧是稀土元素中轻稀土元素的代表, 化学性质活泼且较易在脑中蓄积, 其对学习记忆的影响已有报道, 但机制尚未完全明确^[2]。本研究通过 Morris 水迷宫试验观察镧对子代大鼠学习记忆的影响, 并从海马神经细胞内钙稳态及细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 蛋白表达水平的角度来探讨镧损害学习记忆的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与染毒方法

60 只清洁级雌性 Wistar 大鼠, 由中国医科大学实验动物

中心提供, 动物证号: SYXK (辽) 2008-0005, 体重 (240 ± 10) g。随机将雌鼠分为对照组, 饮用蒸馏水; 低、中、高剂量染镧组, 饮用浓度分别为 2.5、5、10 g/L LaCl_3 的蒸馏水溶液; 每组 15 只动物。然后将雌雄大鼠按 1:1 合笼, 次日晨发现阴栓者定为受孕, 记为妊娠第 0 d, 以自由饮水方式对各实验组动物进行染镧。子代大鼠在断乳之前经由母体血循环和吮吸母乳染镧, 断乳后则通过自由饮水摄入镧, 至断乳后 1 个月结束。

1.2 观察指标与方法

1.2.1 Morris 水迷宫 定位航行试验训练每天 1 次, 连续 5 d, 1 周后进行检测。检测内容包括定位航行试验和空间探索试验两部分。定位航行试验中, 将子鼠面向池壁放入水中, 检测其寻找平台的逃避潜伏期及游泳距离。定位航行试验结束后, 间隔 10 min 后撤除站台, 进行空间探索试验。观察并记录 60 s 内动物在原站台所在象限的停留时间。将各组动物数据做统计学比较, 判断镧对动物空间学习记忆能力的影响。

1.2.2 细胞内游离 Ca^{2+} 浓度测定 子鼠麻醉处死后立即断头取脑, 在冰浴上快速切取海马组织, 加入 0.25% 胰酶 37 °C 消化, 改良杜氏伊格培养基 (dulbecco's modified eagle's medium, DMEM) [含 10% (V/V) 的小牛血清] 终止消化, 过 200 目筛网, 滤液离心后, 弃上清, 以 D-Hanks 液重悬细胞。经台盼蓝排斥实验检测, 细胞存活率达 95% 以上, 调整细胞浓度至 1×10^6 个/ml。加入 Fura-2/AM, 37 °C 水浴后冷冻离心, 弃上清, 用 D-Hanks 液定容。采用荧光双波长分光光度计测定 Ca^{2+} 荧光强度。测定条件: 激发光光栅 5 nm, 发射光光栅 10 nm, 测定温度维持在 (37 ± 1) °C, 避光。取细胞悬液, 以激发波长 340 nm 和 380 nm, 发射波长 510 nm 进行扫描。加入破膜剂 10% Triton X-100, 测定最大荧光比值 ($R_{\max}$), 待曲线平稳后加入 0.3% EDTA, 测定最小荧光比值 ($R_{\min}$)。由系统定量软件自动求出 Ca^{2+} 浓度。

1.2.3 ERK1/2 和 p-ERK1/2 蛋白含量测定 子鼠麻醉处死

收稿日期: 2012-12-10; 修回日期: 2013-04-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 81072316); 辽宁省教育厅科研项目计划 (No. L2010702)

作者简介: 庞妍 (1984—), 女, 硕士, 研究方向: 金属毒理与神经毒理。

通讯作者: 蔡原, E-mail: cmuycai@163.com。