

2.7 组织病理学检查

组织病理学检查发现,中、高剂量组肾脏病变主要表现为肾小管细胞肿胀和间质充血水肿,脑病变主要表现为轻度或中度神经元水肿、胶质细胞增生、胶质淤血水肿和炎细胞浸润病变。对照组肾脏和脑组织未见明显病理改变。

3 讨论

本实验室前期实验显示,TADB 大鼠经口 $LD_{50} > 5000$ mg/kg,与文献一致^[1],其急性毒性属微毒物质。本研究结果显示,对照组和实验组在染毒后的体重无明显差异。染毒后各组大鼠未出现明显行为和体征改变,提示 TADB 无明显蓄积作用。脏器系数是反映某一脏器受损的指标,是寻找毒作用靶器官的重要线索之一。本次研究发现,肝脏系数随染毒剂量的增高而降低,而子宫脏器系数随染毒剂量的增高而增高。生化检测结果显示,各组间 AST、BUN、GLU、LDH、 K^+ 、离子钙、总钙、pH、LYM (%)、EOS (%)、BAS (%)、NEU、

BAS、PLT、MPV、PCT、PDW、ALY (%) 和 TT 指标差异显著,且存在一定剂量依赖关系。组织病理学检查发现,TADB 可引起肾和脑组织病变。上述结果提示 TADB 可对大鼠的肝脏、肾脏、脑和血液造成损害。

TADB 作为一种新型化合物,本次研究为综合评价其毒理学效应提供了数据支持。毒理学研究是一个逐步深入的过程,对 TADB 毒性效应及其机制还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Nielsen A T, Chan M L, Kraeutle C K, et al. Polynitropolyazacaged explosives, Part 7, NWC TP7200 [R]. China Lake: Navel Weapons Center, 1989.
- [2] Robidoux P Y, Sunahara G, Spear P, et al. Effects of dietary administration of CL-20 on Japanese quail *Coturnix coturnix japonica* [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2005, 49: 215-222.

过量氟对大鼠骨损伤的影响及硒和维生素 E 干预效果研究

Effect of excessive fluoride on bone damage in experimental rats and antagonistic effect of selenium and vitamin E

李洪波¹, 魏云鹏¹, 吴志伟¹, 王旭²

(1. 沈阳市第九人民医院, 辽宁 沈阳 110024; 2. 辽宁中医药大学, 辽宁 沈阳 110847)

摘要: 选取 60 只 5~6 周龄的雄性 Wistar 大鼠,随机分为 5 组:对照组、染氟组、维生素 E (VitE) 干预组、硒干预组、VitE + 硒联合干预组。灌胃 12 周后测量各组大鼠血清氟、尿氟含量及血清总碱性磷酸酶 (ALP) 活性,并测量胫骨长度、横径和重量及骨密度 (BMD)。与对照组比较,染氟组大鼠血清氟、尿氟含量和血清 ALT 活性显著增高;全身骨骼和胫骨 BMD 降低;胫骨长度、横径减小,重量减轻。与染氟组比较,单独给予 VitE 干预,大鼠血清氟、尿氟含量和血清 ALT 活性下降。单独硒干预组、VitE + 硒联合干预组大鼠血清氟、尿氟含量和血清 ALP 活性下降;全身骨骼和胫骨 BMD 增高;胫骨长度增长、重量增加。与 VitE 和硒单独干预组相比,VitE + 硒联合干预组上述测定指标改善更为明显。提示 VitE + 硒联合干预对过量氟所致骨损伤有一定的保护作用。

关键词: 氟; 骨损伤; 硒; 维生素 E

中图分类号: R599.9 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2014)06-0433-03

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2014.06.014

过量氟摄入可危害牙齿和骨骼,引起骨骼代谢性和病理学改变,最终导致氟骨症。目前对氟中毒的防治尚无特效药物和措施,因此探寻有效的拮抗物质和保护措施已成为当前研究的热点。研究表明,硒和 VitE 对氟骨症的骨损伤有一定的保护作用^[1,2],本研究旨在探讨硒和 VitE 对氟中毒骨损伤的干预效果,探索防治工业性氟病的有效方法。

1 材料与方法

收稿日期: 2014-09-10; 修回日期: 2014-10-15

作者简介: 李洪波 (1978—),男,主治医师。

1.1 仪器设备及试剂

氟化钠 (北京化工厂出品),亚硒酸钠 (上海市中港化工贸易有限公司),VitE (上海皓生生物公司),ALP ELISA 检测试剂盒 (上海研晶生物技术有限公司),骨密度仪 (美国 Hologic 公司),氟离子选择电极 (上海精益医学仪器厂),甘汞电极 (江苏姜堰市华扬水准仪器厂),电子天平 (北京赛多利斯公司)。

1.2 实验动物及分组

60 只体重 100~140 g (平均 120 g) 清洁级雄性 Wistar 大鼠,5~6 周龄,购自辽宁中医药大学实验动物中心 (动物合格证号:辽实动 2008-0018)。将大鼠随机分为 5 组,每组 12 只,第 1 组为阴性对照组,3 ml 4% 乙醇溶剂灌胃;第 2 组为染氟组,含 100 mg/L F^- 的 3 ml 4% 乙醇溶剂灌胃^[3];第 3 组为 VitE 干预组,用含 100 mg/L F^- 和 50 mg/kg VitE 的 3 ml 4% 乙醇溶剂灌胃^[4];第 4 组为硒干预组,用含 100 mg/L F^- 和 2.0 mg/kg 亚硒酸钠 ($NaSeO_3$) 的 3 ml 4% 乙醇溶剂灌胃^[5];第 5 组为 VitE + 硒干预组,该组大鼠用含 100 mg/L F^- 、VitE 和 $NaSeO_3$ 的 3 ml 4% 乙醇溶剂联合灌胃给药。各组大鼠均自由摄食水,于每日上午固定时间灌胃给药 1 次,实验共进行 12 周。

1.3 动物取材

用代谢笼收集大鼠 24 h 尿液,后将尿液放至 4℃ 冰箱待测尿氟。采用摘眼球取血法采集血液 3~5 ml,静置 20 min,2 500 r/min 离心 5 min,分离血清于 1.0 ml EP 管中,分组进行标记后于 -80℃ 超低温冰箱中冻存待测。10% 乌拉坦腹腔麻醉后断头处死大鼠,取胫骨,仔细去除附着的肌肉和结缔组织备用。

1.4 血清氟和尿氟含量的测定

以氟离子选择电极法测定血清和尿中氟含量。准确吸取 0.4 ml 血清或尿液置于 10 ml 比色管中, 再加入 10 ml 总离子强度调节缓冲溶液 (TISAB), 用蒸馏水补充到刻度。将上述溶液倾入塑料杯中, 插入氟电极, 饱和甘汞电极, 放搅拌子于电磁搅拌器上, 待电位平衡后, 仪器自动打印出样品浓度。

1.5 ALP 含量测定

按照 ELISA 试剂盒说明书, 逐一稀释标准品, 建立标准曲线。每孔加入标准品或待测样品, 覆盖盖板, 置摇床室温孵育 3 h。洗板后每孔加入第一抗体工作液 100 μ l, 轻轻震荡混匀, 室温孵育 60 min; 洗板后每孔加酶标抗体工作液 100 μ l, 室温孵育 30 min; 洗板后每孔加 100 μ l 底物工作液, 覆盖, 避光, 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。取出酶标板, 每孔加 100 μ l 终止溶液, 轻轻混匀。空白孔调零, 酶联仪在 450 nm 波长读取光密度 (OD 值), 根据曲线方程, 求出血清中 ALP 的浓度。

1.6 胫骨长度、横径和重量的测量

用游标卡尺进行胫骨长度和中段横径测量。胫骨烘干后, 电子分析天平测量胫骨的重量。

1.7 骨密度的测定

大鼠处死前以 10% 乌拉坦腹腔麻醉, 采用骨密度仪扫描测定大鼠骨骼密度。大鼠处死后, 取右侧胫骨, 去除附着的肌肉和结缔组织, 置装有蒸馏水的有机玻璃盒支架上, 固定位置, 以全长的交界处为测量点, 应用骨密度仪作骨横截扫描, 测定胫骨的骨密度。

1.8 统计学分析

所有数据用 SPSS 13.0 软件进行分析, 组间均数比较采用方差分析, 多重比较采用 LSD 法, 测定结果以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清氟和尿氟含量以及 ALP 活性的测定

由表 1 可见, 与阴性对照组相比, 染氟大鼠血清氟及尿氟含量明显增高, 血清 ALP 活性呈上升趋势, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与染氟组相比, VitE 干预组、硒干预组、VitE + 硒联合干预组大鼠的血清氟和尿氟含量有所下降, ALP 活性明显降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与 VitE 和硒单独干预组相比, VitE + 硒联合干预组大鼠血清氟和尿氟含量以及 ALP 活性下降明显, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 1 各实验组大鼠血清氟和尿氟含量以及 ALP 活性比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	血清氟 (mg/L)	尿氟 (mg/L)	ALP (ng/ml)
阴性对照组	0.026 $\pm$ 0.002	3.10 $\pm$ 0.21	1.02 $\pm$ 0.12
染氟组	0.089 $\pm$ 0.007**	18.22 $\pm$ 1.36**	1.69 $\pm$ 0.13**
VitE 干预组	0.068 $\pm$ 0.003 [#]	13.87 $\pm$ 1.02 [#]	1.38 $\pm$ 0.09 [#]
硒干预组	0.054 $\pm$ 0.003 [#]	10.90 $\pm$ 2.01 [#]	1.27 $\pm$ 0.14 [#]
VitE + 硒干预组	0.036 $\pm$ 0.002 ^{##} Δ	6.33 $\pm$ 0.73 ^{##} Δ	1.03 $\pm$ 0.10 ^{##} Δ

注: 与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$; 与染氟组比较, [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$; 与 VitE、硒单独干预组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

2.2 胫骨长度、横径和重量的测量

表 2 显示, 与阴性对照组相比, 过量氟可使大鼠胫骨的长度和横径缩短, 胫骨重量减轻, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。染氟组大鼠给予 VitE 治疗后并不会减轻这种影响。而单独硒干预后, 大鼠胫骨长度和重量显著高于染氟组 ($P < 0.05$), 但对胫骨中段横径无明显改变。与 VitE、硒单独干预组比较, VitE + 硒联合干预可使胫骨长度和胫骨重量有所增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

表 2 各实验组大鼠胫骨长度、横径和重量的比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	胫骨长度 (mm)	胫骨中段横径 (mm)	胫骨重量 (g)
阴性对照组	41.83 $\pm$ 1.42	2.69 $\pm$ 0.18	0.36 $\pm$ 0.03
染氟组	34.08 $\pm$ 1.23*	2.24 $\pm$ 0.12*	0.29 $\pm$ 0.02*
VitE 干预组	35.15 $\pm$ 1.79	2.31 $\pm$ 0.16	0.29 $\pm$ 0.04
硒干预组	38.75 $\pm$ 1.15 [#]	2.46 $\pm$ 0.19	0.33 $\pm$ 0.02 [#]
VitE + 硒干预组	42.06 $\pm$ 2.02 ^{##} Δ	2.45 $\pm$ 0.22	0.36 $\pm$ 0.02 ^{##} Δ

注: 与阴性对照组比较, * $P < 0.05$; 与染氟组比较, [#] $P < 0.05$; 与 VitE、硒单独干预组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

2.3 全身骨骼和胫骨 BMD 测定

与对照组比较, 染氟组大鼠全身骨骼和胫骨 BMD 明显降低 ($P < 0.05$)。与染氟组相比, 单独硒干预及 VitE + 硒联合干预组全身骨骼和胫骨 BMD 显著增加 ($P < 0.05$); 与 VitE、硒单独干预组比较, VitE + 硒联合干预使全身骨骼和胫骨 BMD 增加更明显 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 各实验组大鼠全身骨骼和胫骨 BMD 比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 12$)

组别	全身骨骼 BMD	胫骨 BMD
阴性对照组	0.156 $\pm$ 0.008	0.098 $\pm$ 0.006
染氟组	0.132 $\pm$ 0.007*	0.072 $\pm$ 0.005*
VitE 干预组	0.146 $\pm$ 0.009	0.082 $\pm$ 0.007
硒干预组	0.155 $\pm$ 0.006 [#]	0.095 $\pm$ 0.007 [#]
VitE + 硒干预组	0.192 $\pm$ 0.008 ^{##} Δ	0.121 $\pm$ 0.008 ^{##} Δ

注: 与阴性对照组比较, * $P < 0.05$; 与染氟组比较, [#] $P < 0.05$; 与 VitE、硒单独干预组比较, $\Delta P < 0.05$ 。

3 讨论

氟中毒的骨骼病变复杂多样, 其主要的改变包括骨硬化、骨质疏松、骨软化和骨周软组织骨化等, 其中以骨软化和骨质疏松病变更为多见和严重^[9]。本研究发现, 给大鼠摄入 100 mg/L F⁻ 蒸馏水后, 染氟组大鼠血清中 ALP 活性显著增高、全身骨骼和胫骨 BMD 降低, 呈现骨质疏松特征^[9], 并对骨组织产生一定的损伤。

Rocha 等人的研究结果表明^[9], 骨创伤与修复过程中硒参与了代谢变化。一定浓度范围内的硒可拮抗高氟, 延缓和降低氟骨症的发生, 并对骨具有一定的保护作用^[1,3]。本研究结果表明, 单独给予一定浓度的硒干预后, 大鼠血清氟、尿氟含量和血清 ALP 活性下降, BMD 增高, 胫骨长度和重量增加。表明一定浓度的硒可改善骨质疏松, 降低血尿中的氟含量, 从而保护过量的氟所致骨损伤。此作用可能是由于硒干预后可使尿氟排泄增加, 氟在骨中浓度降低, 减轻了对骨的损害。另外, 硒本身是一种自由基清除剂, 可以直接清除自

由基和脂质过氧化自由基,从而起到保护骨组织的作用。

Blaszczayk 等人的研究表明^[5],对氟中毒的大鼠补充 VitE 可减少骨和牙齿中氟的含量。本实验结果提示, VitE 虽然能够降低氟中毒大鼠血清氟、尿氟含量以及血清 ALP 活性,但对全身骨骼和胫骨 BMD 并无显著影响。

将硒和 VitE 联合作用于染氟大鼠后发现,联合用药对骨损伤的各指标均有明显变化,表明硒和 VitE 对氟中毒大鼠骨损伤具有协同保护作用。硒除了具有抗氧化、促进蛋白质合成等作用外,它还可调节 VitE 的吸收与利用。同样, VitE 也能减少机体对硒的需要量,防止硒在机体内的损失和保持其活性形式^[6]。对于硒和 VitE 联合作用的分子生物学机制将是未来深入研究的方向。

参考文献:

- [1] 边建朝,咸树梅,叶平,等. 硒对氟致机体损伤的保护作用及其机理研究 [J]. 地方病通报, 2004, 19 (4): 19-41.
- [2] Blaszczayk I, Birkner E, Gutowska I, et al. Influence of methionine and vitamin E on fluoride concentration in bones and teeth of rats exposed to sodium fluoride in drinking water [J]. Biol Trace Elem Res,

2012, 146 (3): 335-339.

- [3] 刘秉慈,许增禄,缪庆,等. 实验性氟中毒骨组织中 II 型胶原蛋白表达及结构的改变 [J]. 中华预防医学杂志, 2003, 37 (4): 243-245.
- [4] 林少凯,张秀慧,秦祥慧,等. 大豆、硒、螺旋藻对氟铝联合中毒大鼠骨损伤干预效果 [J]. 现代预防医学, 2014, 41 (14): 2588-2590.
- [5] Ebesunun M O, Umahoin K O, Alonge T O, et al. Plasma homocysteine, B vitamins and bone mineral density in osteoporosis: a possible risk for bone fracture [J]. Afr J Med Sci, 2014, 43 (1): 41-47.
- [6] Rocha A S, Ramos-Perez F M, Bóscolo F N, et al. Effect of sodium selenite on bone repair in tibiae of irradiated rats [J]. Braz Dent J, 2009, 20 (3): 186-190.
- [7] 高彦辉,付松波,徐春蓓,等. 大豆、硒对饮茶型氟中毒大鼠抗氟能力的影响和骨保护作用 [J]. 中国地方病学杂志, 2005, 24 (1): 11-13.
- [8] 刘玉娥. 硒与维生素 E 的协同作用 [J]. 内蒙古地方病防治研究, 1994, 19 (3): 114-115.

壬基酚对仔鼠皮质部星形胶质细胞 GFAP 的影响

Effects of nonylphenol on GFAP in cerebral cortex astrocytes of newborn rats

俞捷¹, 汪洋², 杨雪松¹, 李克彬¹, 封校亚¹, 徐卫红¹, 许洁¹

(1. 遵义医学院公共卫生学院, 贵州 遵义 563000; 2. 重庆医科大学公共卫生学院, 重庆 400010)

摘要: 将交配成功的 31 只孕鼠根据妊娠日期分层后随机分为 4 组: 对照组, 壬基酚 (NP) 低、中、高剂量 (25、50、100 mg/kg) 染毒组; NP 暴露时间为受孕第 6 天到出生后 21 d 哺乳期结束。Real Time PCR 和免疫组织化学法检测胶质原纤维酸性蛋白 (GFAP) mRNA 和蛋白的表达, 并分析上述变化与 NP 暴露之间的关系。高剂量组 21 d、60 d 海马 GFAP mRNA 表达增加, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 21 d、60 d 仔鼠皮质部位 GFAP mRNA 表达与 NP 暴露剂量呈正相关 ($r = 0.670$ 、 0.588 , $P < 0.05$), 免疫组化切片可见仔鼠皮质部位星形胶质细胞体肥大, 细胞分支增多, 染色较深, 高剂量组 GFAP 阳性细胞数与 NP 暴露剂量呈正相关 ($r = 0.624$ 、 0.713 , $P < 0.05$); GFAP 光密度与 NP 暴露剂量呈正相关 ($r = 0.733$ 、 0.679 , $P < 0.05$)。各暴露组 21 d 仔鼠海马 GFAP 阳性细胞数低于 60 d ($t = -5.525$, $P < 0.05$)。提示 NP 孕期暴露影响子代大鼠脑组织 GFAP 的表达, 且剂量越高, GFAP 表达越低。

关键词: 壬基酚 (NP); 仔鼠; 胶质原纤维酸性蛋白

中图分类号: R994.6 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2014)06-0435-03

DOI: 10.13631/j.cnki.zgggyx.2014.06.015

壬基酚 (nonylphenol, NP) 是具有雌激素样作用的环境内分泌干扰物, 我国环境中污染严重^[1]。研究表明, NP 对人和动物生长发育有一定的影响^[2,3]。本课题组前期研究发现 NP 可使成年仔鼠学习记忆能力降低, NP 所致神经毒性的机制目前尚不清楚。

胶质原纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP) 是星形胶质细胞的主要成分, 可作为星形胶质细胞的特异性标记物^[4,5]。研究表明, 海马内的星形胶质细胞参与了学习记忆过程^[6-8]。本研究通过建立孕哺期暴露 NP 的仔鼠模型, 观察仔鼠断乳期 (21 d) 及 60 d 时脑组织皮质部神经元细胞 GFAP 的表达, 并判断 NP 暴露剂量与 GFAP 蛋白表达的相关性, 初步探讨 NP 引起认知功能障碍的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物分组及处理 清洁级 SD 大鼠 60 只, 雌雄 (2:1) 同笼交配, 次日晨经阴道涂片检查发现精子者为受孕鼠, 将交配成功的 28 只孕鼠根据妊娠日期分层后随机分为 4 组, 即对照组和 NP 低、中、高 (50、100、200 mg/kg) 剂量染毒组, 每组 6~7 只, NP 暴露时间为受孕第 6 天到出生后 21 天哺乳期结束 (GD6~PND21), 对照组花生油灌胃。

1.1.2 试剂 NP 纯度 99% (东京化成株式会社), Trizol (美国 Invitrogen 公司), RNA 提取试剂盒 (大连宝生物公

收稿日期: 2013-12-16; 修回日期: 2014-01-30
基金项目: 国家自然科学基金 (201381360439); 贵州省教育厅青年基金 (黔教合 KY 字 [2013] 198); 贵州省教育厅大学生创新项目 (201410661011); 贵州省卫生厅基金 (gzwkj20131127); 贵州省科技厅遵义医学院联合基金重点项目 (黔科合 LH 字 [2014] 7543)
作者简介: 俞捷 (1974—), 男, 副教授, 从事环境卫生学研究。
通讯作者: 许洁, 女, 博士, 教授, E-mail: xujie360@sina.com。