砖茶型氟铝联合应用对大鼠牙齿和骨代谢生化指标的影响

孙中蕾 白 静 陈 瑶 刘庆斌

摘 要 目的 观察砖茶型氟铝联合中毒对大鼠牙齿和骨代谢相关血清学指标的影响,以定量评估氟和铝对牙齿和骨代谢的损伤作用。**方法** 5 周龄 SPF 级 Wistar 大鼠 70 只,随机分为 7 组,正常对照组,氟组,铝组,氟铝组,高剂量高氟高铝砖茶组,低剂量高氟高铝砖茶组,低氟低铝砖茶组。定期观察大鼠牙齿状态,使用酶联免疫吸附实验检测大鼠血清 PTH、OT、CT 水平,并且进行血清 Ca、P、ALP 的检测。**结果** 氟组、氟铝组、高剂量高氟高铝砖茶组均出现不同程度的氟斑牙;铝组除个别出现牙釉质光泽度消失外未见氟斑牙表现;低氟低铝砖茶组仅出现一例轻度氟斑牙。氟组、氟铝组、高剂量高氟高铝砖茶组的血清 PTH、OT 都高于对照组 ($P<0.01$),且氟组最高;而铝组 PTH,OT,ALP 均较对照组降低($P<0.01$);氟铝组和所有砖茶组的血清 Ca 水平都低于对照组($P<0.01$),且低剂量高氟高铝砖茶组最低;氟组,氟铝组和高剂量高氟高铝砖茶组血清 CT 均比对照组低($P<0.01$),以氟铝组最低,但铝组则呈显著性升高($P<0.01$)。**结论** 本次研究的剂量条件下单氟对牙齿的损伤作用较明显,氟铝联合作用时表现为拮抗作用,且 OT、PTH、CT 和 ALP 能间接的反应骨骼的损伤情况。

关键词 砖茶 氟铝联合 牙齿 骨代谢

中图分类号 R363.1 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2015.11.031

Nocuous Effects of Fluoride and Aluminum in the Brick Tea on the Teeth and Bone Metabolism in Rats. *Sun Zhonglei, Bai Jing, Chen Yao, et al. Department of Pathophysiology, Inner Mongolia Medical University, Inner Mongdia 010110, China*

Abstract Objective To quantitatively evaluate the nocuous effects of fluoride and aluminum in the brick tea on the teeth and bone metabolism in a rat model. **Methods** Five – weeks old Wistar rats with both gender were randomly devided into 7 groups ($n=10$ in each group): i.e., the normal control, fluoride, aluminum, fluorine plus aluminum, high – dose fluoride – aluminum brick tea, low – dose fluoride – aluminum brick tea, and low fluoride and low aluminum brick tea group. Fluoride and aluminum were chronically administrated via regular chaw for 12 months. Then teeth injury was observed and serum parathyroid hormone (PTH), osteocalcin (OT), calcitonin (CT), alkaline phosphatase (ALP), calcium, and phosphorus were measured by ELISA. **Results** The teeth of normal rats were brown in color, smooth and shiny. Different degrees of dental fluorosis were found in groups of fluoride, fluoride plus aluminum and high – dose fluoride – aluminum brick tea. No dental fluorosis was found in the aluminum group; only one mild dental fluorosis was found in the low fluoride and low aluminum brick tea group. Serum PTH and OT in groups of fluoride, fluoride plus aluminum and high – dose fluoride – aluminum brick tea group were significantly higher ($P<0.01$) than the control group, and the highest was in the fluoride group. Serum PTH, OT and ALP in the aluminum group was lower than the control group ($P<0.01$); serum calcium in the fluorine plus aluminum group and the brick tea group was lower than the control group ($P<0.01$); serum CT in the fluorine group, the fluorine and aluminum group and the high – dose fluoride – aluminum brick tea group was lower than the control group ($P<0.01$), and CT was the highest in the fluorine and aluminum group, but CT level was decreased in the aluminum group. **Conclusion** Fluoride is the most potent in inducing teeth injury; aluminum might have a antagonistic effect on fluoride – induced teeth injury. Serum biomarkers of bone metabolism also indicate bone injury, and OT, PTH, CT and ALP are relatively more sensitive in indicating bone injury induced by fluoride and aluminum which were enriched in the brick tea.

Key words Brick tea; F – Al combined toxicosis; Tooth; Mechanism; Bone metabolism

研究认为砖茶具有高氟高铝特征,长期摄入砖茶的人群在摄入高氟的同时还会摄入高铝,从而造成机体损伤[1]。而边疆少数民族因砖茶消食解腻的作用而有长期大量饮用砖茶的习惯,这些地区氟斑牙和氟

作者单位:010110 呼和浩特,内蒙古医科大学病理生理学教研室(孙中蕾、白静、陈瑶);021000 呼伦贝尔市地方病防治研究所(刘庆斌)

骨症的出现引起了人们普遍重视，并且发现饮用砖茶导致的氟中毒可能还与铝有关[2]。大多研究认为氟对骨骼的损伤主要以骨质硬化为主，且常伴有骨质疏松，而铝主要表现为以骨软化为主的铝骨病[3~5]。骨钙素是反应骨转换过程中成骨细胞功能和骨质矿化的特异和敏感指标，降钙素则是在调节破骨细胞的功能上发挥作用，碱性磷酸酶通常用来反应成骨细胞的增殖状况，但不能作为早期的敏感指标，而甲状旁腺激素则具有调节血钙和血磷的双向调节作用。

本实验通过对大鼠氟斑牙状况以及血清甲状旁腺激素、降钙素、骨钙素、碱性磷酸酶以及钙、磷等反应骨代谢的指标进行检测，探讨由长期大量饮用砖茶所导致的机体损伤。

材料与方法

1. 实验动物和给药方法：5 周龄 SPF 级 Wistar 大鼠 70 只，体重 70 ~ 90g，雌雄各半，由内蒙古大学实验动物中心提供，实验动物许可证号 SCXK（蒙）2001 - 0001。全营养饲料均购自内蒙古大学的实验动物中心。实验大鼠均在内蒙古医科大学机能学实验室饲养，温度稳定在 22 ± 1℃，湿度保持在 45% ~ 60% 范围内，自然采光。70 只大鼠给予全营养饲料和自来水喂养 1 周后随机分为 7 组，每组 10 只，雌雄分开饲养：正常对照组，机能学实验室自来水；氟组，含氟 50mg/L 的氟化钠水溶液；铝组，含铝 163mg/L 的三氯化铝水溶液；氟铝组，含氟 50mg/L 且含铝 163mg/L 的混合水溶液；高剂量高氟高铝砖茶组，含氟 50mg/L，铝 163mg/L；低剂量高氟高铝砖茶组，含氟 10mg/L，铝 33mg/L；低氟低铝砖茶组，含氟 2mg/L，铝 1.5mg/L。

2. 试剂盒和仪器：大鼠骨钙素（osteocalcin，OT）、降钙素（calcitonin，CT）、甲状旁腺激素（parathyroid hormone，PTH）的酶联免疫吸附（elisa）试剂盒，均购自 R&D 公司。碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）、钙（calcium，Ca）、磷（phosphorus，P）检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。生物测定所用仪器：TU - 1810 紫外可见光分光光度计，DNP - 9272 电热恒温培养箱，Thermo FRE sco 21 离心机，BioTek ELx800 酶标仪。

3. 牙齿损伤观察和血清学测定：定期观察大鼠牙齿改变，数码相机拍摄记录。实验满 12 个月，真空采血管（不含药）心脏采血处死大鼠，静置 2h 离心取血清，用于检测大鼠血清骨钙素，降钙素，甲状旁腺激素、钙、磷和碱性磷酸酶。整个实验期间除氟铝组大鼠死亡 1 只外，其余均达到实验终点。应用双抗体夹心法测定标本中大鼠血清骨钙素，降钙素和甲状旁腺激素水平。用纯化的大鼠骨钙素，降钙素和甲状旁腺激素抗体包被微孔板，制成固相抗体，往包被单抗的微孔中依次加入骨钙素或降钙素或甲状旁腺激素，再与辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的骨钙素，降钙素和甲状旁腺激素抗体结合，形成抗体 - 抗原 - 酶标抗体复合物，经过彻底洗涤后加底物四甲基联苯胺（tetramethylbenzidine，TMB）显色。TMB 在 HRP 酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的骨钙素，降钙素和甲状旁腺激呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（A 值），通过标准曲线计算样品中大鼠骨钙素降钙素和甲状旁腺激浓度。血清碱性磷酸酶的测定原理：碱性磷酸酶分解磷酸苯二钠，产生游离酚和磷酸，酚在碱性溶液中与 4 - 氨基安替吡啉作用经铁氰化钾氧化生成红色醌衍生物，根据红色深浅可以测定酶活力的高低。血清钙测定原理：血清中钙离子在碱性溶液中与甲基百里香酚蓝结合，生成蓝色络合物，通过比色与同样处理组的钙标准进行比较，可计算出血清中钙的含量。血清磷的测定原理：血清中的无机磷与钼酸作用生成磷钼酸，后者被还原成钼蓝，在 660nm 处有最大吸收峰，通过比色可以计算出无机磷的含量。

4. 统计学方法：实验结果均使用 SPSS 13.0，单因素方差分析进行统计分析，数据以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）描述。由于实验过程中氟铝组大鼠死亡 1 只，故数据统计时除氟铝组 9 只外其余组各 10 只。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结　　果

关于氟铝制剂对大鼠牙齿的影响，正常对照组大鼠下切齿呈棕黄色，光滑而有光泽；氟组，氟铝组，高氟高铝砖茶组均出现不同程度的氟斑牙；铝组除个别出现牙釉质光泽度消失外未见氟斑牙表现；低氟低铝砖茶组仅出现 1 例轻度氟斑牙，牙釉质表面少量细小棕白色横纹（图 1）。氟铝制剂对大鼠骨代谢相关血清学指标的影响，详见表 1 和表 2。

图 1　大鼠氟斑牙严重程度比较

A. 正常大鼠下切牙（棕黄色）；B、C. 出现细小规则的棕白色横纹；D. 不规则棕白相间横纹或斑片状伴缺损；E. 棕色横纹逐渐消失，白垩区面积增大；F. 整个牙面呈白垩粉笔样改变，伴牙缘缺损

表 1 大鼠血清甲状旁腺激素(PTH)、骨钙素(OT)和降钙素(CT)含量 ($\bar{x} \pm s$)

分组	PTH(ng/L)	OT(ng/L)	CT(ng/L)
正常对照组	$5.50 \pm 0.14^{\triangle\triangle}$	$113.21 \pm 3.04^{\triangle}$	$72.71 \pm 10.84^{\triangle\triangle}$
氟组	$9.28 \pm 1.08^{**\triangle\triangle}$	$126.00 \pm 4.49^{**}$	$49.91 \pm 7.74^{**}$
铝组	$4.61 \pm 1.27^{\triangle\triangle}$	$108.27 \pm 9.13^{\triangle\triangle}$	$89.56 \pm 14.56^{**\triangle\triangle}$
氟铝组	$7.52 \pm 1.79^{**}$	$120.23 \pm 3.13^{*}$	$39.52 \pm 6.30^{**}$
高剂量高氟高铝砖茶组	$8.43 \pm 1.16^{**}$	$119.40 \pm 3.85^{*}$	$53.91 \pm 7.29^{**}$
低剂量高氟高铝砖茶组	6.46 ± 0.68	117.35 ± 3.55	$89.53 \pm 11.79^{\triangle\triangle}$
低氟低铝砖茶组	$5.97 \pm 0.48^{\triangle\triangle}$	$113.78 \pm 2.00^{\triangle}$	$60.87 \pm 5.46^{\triangle\triangle}$

与对照组比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与氟铝组相比，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$

血清 PTH 在氟组、氟铝组和高剂量高氟高铝砖茶组与对照组比，均显著高于对照组($P<0.01$)。对照组、铝组、低氟低铝砖茶组与氟铝组比，氟铝组显著高于对照组、铝组、低氟低铝砖茶组($P<0.01$)；氟组与氟铝组比，氟组显著高于氟铝组($P<0.01$)，详见表 1。

1. 血清 OT：氟组、氟铝组和高剂量高氟高铝砖茶组与对照组比，均显著高于对照组($P<0.01$)。对照组、铝组、低氟低铝茶组与氟铝组比，氟铝组显著高于对照组($P<0.05$)、铝组($P<0.01$)、低氟低铝茶组($P<0.05$)。

2. 血清 CT：氟组、氟铝组、高剂量高氟高铝砖茶组与对照组比，对照组显著高于氟组($P<0.01$)，氟铝组($P<0.01$)，高剂量高氟高铝砖茶组($P<0.05$)；铝组与对照组比，铝组显著高于对照组($P<0.01$)。对照组、铝组、低剂量高氟高铝砖茶组、低氟低铝茶组与氟铝组比，均显著高于氟铝组($P<0.01$)。

表 2 大鼠血清碱性磷酸酶(ALP)、钙(Ca)、磷(P)浓度

分组	ALP(金氏单位/100ml)	Ca (mmol/L)	P(mmol/L)
正常对照组	12.31 ± 0.52	$1.48 \pm 0.06^{\triangle\triangle}$	2.43 ± 0.03
氟组	$16.22 \pm 1.10^{**\triangle\triangle}$	$1.37 \pm 0.07^{\triangle}$	$1.97 \pm 0.14^{\triangle}$
铝组	$7.82 \pm 1.10^{**\triangle\triangle}$	$1.43 \pm 0.11^{\triangle\triangle}$	$2.12 \pm 0.44^{\triangle\triangle}$
氟铝组	13.80 ± 2.55	$1.23 \pm 0.09^{**}$	2.62 ± 0.42
高剂量高氟高铝砖茶组	$15.74 \pm 1.12^{**}$	$1.17 \pm 0.06^{**}$	$2.16 \pm 0.06^{\triangle}$
低剂量高氟高铝砖茶组	$16.95 \pm 2.81^{**\triangle\triangle}$	$0.75 \pm 0.12^{**\triangle\triangle}$	2.32 ± 0.03
低氟低铝砖茶组	$14.96 \pm 0.77^{*}$	$1.17 \pm 0.25^{**}$	$3.20 \pm 0.58^{*\triangle}$

与对照组比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与氟铝组相比，$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$

3. 血清碱性磷酸酶：氟组、高氟高铝砖茶组和低氟低铝砖茶组与对照组相比，氟组($P<0.01$)、高氟高铝茶组($P<0.01$)、低氟低铝茶组($P<0.05$)均显著高于对照组；铝组与对照组相比，对照组显著高于对铝组($P<0.01$)。氟组、低剂量高氟高铝砖茶组与氟铝组相比，均显著高于氟铝组($P<0.01$)；铝组与氟铝组相比，氟铝组显著高于铝组($P<0.01$)。

4. 血清钙：氟铝组和所有饮茶组与对照组相比，对照组显著高于氟铝组和所有饮茶组($P<0.01$)。对照组、氟组、铝组与氟铝组相比，对照组($P<0.01$)、氟组($P<0.05$)、铝组($P<0.01$)均显著高于氟铝组；低剂量高氟高铝砖茶组与氟铝组相比，氟铝组显著高于低剂量高氟高铝砖茶组($P<0.01$)。

5. 血清磷：低氟低铝砖茶组与对照组相比，低氟低铝砖茶组显著高于对照组($P<0.01$)。氟组、铝组、高剂量高氟高铝砖茶组与氟铝组相比，氟铝组显著高于氟组、铝组、高剂量高氟高铝砖茶组($P<0.01$)；低氟低铝砖茶组与氟铝组相比，显著高于氟铝组($P<0.01$)。

讨 论

氟斑牙是氟中毒最早出现的临床表现之一，研究认为饮用水氟浓度低于 1mg /L 时，对预防龋齿是有益的，但超过 1.5mg/L 时会产生牙齿色斑并且对骨骼也会产生不利影响[6]。本实验发现氟组出现氟斑牙的时间较氟铝组，高剂量高氟高铝砖茶组和低剂量高氟高铝砖茶组早且严重，可能是氟铝之间存在拮抗作用，或是茶中其他元素的干扰作用，但总体来说氟铝组与高剂量高氟高铝砖茶组差异不大，说明饮茶型氟中毒不是氟的单一作用，铝也参与其中。有研究者对小鼠研究发现铝也可蓄积在牙齿，造成斑釉牙，本

次研究铝组牙齿未见明显改变与其结果不符,可能是大鼠与小鼠耐受能力不同,并且其染毒剂量较本研究高[7]。低氟低铝组出现一例轻度氟斑牙可能是大鼠个体差异,也可能是低氟低铝砖茶的浓度还是较高的问题,但毕竟是个别现象,还需继续研究来取得可靠证据。

目前对于氟骨症的研究中除病理学改变,影像学表现和骨组织中氟化物的蓄积外,血液生化检查诸如甲状旁腺激素、骨钙素、降钙素、钙、磷、碱性磷酸酶等在调节骨代谢的过程中也发挥了重要作用[8,9]。并且以往对铝神经系统的研究较多,而饮茶型氟铝联合中毒的提出,再次引起了人们对铝的骨相损伤的重视[10,11]。本实验发现氟组、氟铝组、高剂量高氟高铝砖茶组的血清 PTH、OT 都较对照组显著增高,且氟铝组与高剂量高氟高铝砖茶组差异无统计学意义,支持氟铝联合中毒的说法。而铝组 PTH、OT、ALP 均较对照组降低,Ca、P 与对照组比差异无统计学意义。

杨莉萍等[7]研究认为三氯化铝染毒组小鼠血清 OT、Ca 水平下降,PTH、ALP、P 却未见有明显差异,可能是种属和剂量因素的影响作用,但还需要重复试验和改进方法来进一步研究。氟铝组和所有饮茶组的血 Ca 水平都较对照组降低,说明茶中除氟铝元素影响其水平外,可能还有其他成分也参与其中,但氟铝组和高剂量高氟高铝砖茶组一致,低剂量高氟高铝砖茶组降低最明显,可能是在一定浓度或剂量范围内对血钙水平的调节是比较敏感的。氟组、氟铝组和高剂量高氟高铝砖茶组血清 CT 均较对照组降低,以氟铝组降低最明显,这与高氟促进铝的吸收的说法一致[3]。但铝组则呈显著性升高,可能是铝可增强破骨细胞的作用,造成骨质矿化障碍,从而发生铝骨病。血清磷的检测在本次实验中未见有意义的发现,可能是实验过程中出现一些问题需要重复实验分析。

本实验通过对血清生化的检测认为骨钙素、甲状旁腺激素、降钙素和碱性磷酸酶在总体水平上可以反应骨代谢的水平,但存在的不足之处,还需通过加大样本量或是更换种属并且再结合骨组织的病理学表现,综合分析,并找出几个敏感且特异的指标利用免疫组织化学技术标记阳性因子来反映其病理变化。

单氟对牙齿的损伤作用较明显,本次研究的剂量条件下氟铝联合作用时表现为拮抗作用,且大鼠血清中反应骨代谢指标的生化检测,能间接的反应骨骼的损伤情况,以 OT、PTH、CT 和 ALP 变化相对比较明显。

参考文献

1 赵晓宇,李海荣,冯福建,等. 我国主要砖茶中 F AL 等元素含量及影响因素分析[J]. 农业环境科学学报,2007, 26(3): 1040 - 1044

2 赵新华,沈雁峰,王丽华. 我国饮茶型氟中毒流行病学研究概况[J]. 中国公共卫生,2000, 16(7): 653 - 654

3 胡晓缨,廖进民,陈艳. 氟,铝和氟铝联合中毒对骨组织和骨相关调节系统影响的研究现状[J]. 广东医学院学报, 2012, 30(5): 558 - 561

4 郑照霞,梁宝宏,倪凤伟. 国内外地方性氟骨症治疗研究进展[J]. 中国地方病防治杂志,2007, 22(3): 189 - 191

5 刘庆斌,王在军,刘学慧,等. 内蒙古呼伦贝尔市饮茶型与饮水型氟骨症 X 线影像学差异[J]. 中国地方病防治杂志,2007, 22(1): 8 - 10

6 Ene I, Astrid S, Enn K. Exposure to high fluoride drinking water and risk of dental fluorosis in estonia[J]. Int J Environ Res Public Health, 2009, 6(2):710 - 721

7 杨莉萍,王克跃,李红,等. 三氯化铝染毒对小鼠骨骼和牙的影响[J]. 毒理学杂志, 2008, 22(3): 191 - 194

8 莫志鑫,徐燕,袁瑛. 地方性氟中毒骨代谢生化指标的研究[J]. 中国地方病防治杂志,2006, 21(6): 347 - 348

9 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性分析[J]. 中国地方病学杂志,2002, 21(4): 304 - 305

10 李娜,王晓燕,刘春长,等. 基因在染铝小鼠神经细胞凋亡中的作用[J]. 环境与职业医学,2011, 28(3): 137 - 139

11 刘庆斌,王五一,王革,等. 内蒙古呼伦贝尔市饮茶型氟铝联合中毒研究[J]. 中国地方病防治杂志,2008, 23(2): 86 - 89

(收稿日期:2014 - 12 - 13)
(修回日期:2014 - 12 - 29)

关于审稿专家、作者提供银行卡号的启事

由于本单位财务管理规定,今后发放稿费、审稿费要通过银行转账,希望审稿专家和发表论文的作者及时到登录医学研究杂志网页 www. yxyjzz. cn,进入到专家审稿或者作者投稿版块,在个人介绍栏中提供银行卡号、开户行名称、卡主姓名,以及身份证号,以便及时为您发放审稿费及稿费,或者将银行卡信息发到本杂志邮箱 yxyjzz@ imicams. ac. cn。联系电话:010 - 52328679(尹老师)。

《医学研究杂志》编辑部