

饮水型 SD 大鼠氟斑牙模型的研制

李长城, 刘晓利, 刘克俭, 崔彩岩, 刘芸, 余立凯, 黄安斌

(华中科技大学同济医学院, 湖北 武汉 430030)

摘要: 目的 建立饮水型大鼠氟斑牙模型, 为深入研究氟性骨损伤发病机制提供科学依据。方法 采用饮水加氟的方法复制大鼠氟斑牙模型, 染氟剂量采用日测体重然后按体重 (mg/kg) 给予及尿氟、血氟监测的方法进行, 尿氟、血氟采用微量氟法测定, 血清中碱性磷酸酶 (ALP) 采用全自动生化分析仪测定, 氟斑牙采用数码相机拍照, 按照氟斑牙观测标准进行诊断及分度。结果 90 d 末, 高、中剂量组大鼠均出现明显氟斑牙, 尿氟、血氟及血 ALP 含量与对照组相比均明显升高 ($P < 0.05$)。染氟剂量与尿氟水平显著相关 ($r = 0.924, P = 0.038$); 染氟剂量与血氟水平呈显著相关 ($r = 0.948, P = 0.026$); 高、中剂量组大鼠氟负荷水平明显高于对照组; 氟斑牙发生率与染氟剂量呈正相关 ($r = 0.983, P = 0.017$)。结论 染氟剂量与氟斑牙的发生存在明显的剂量-反应关系: 16 mg/kg 和 32 mg/kg 的染氟剂量, 14 d 即可发生 I 度氟斑牙, 35 d 即可发生典型氟斑牙。

关键词: 氟; 氟斑牙; 大鼠模型; 饮水型

中图分类号: R781.12 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2012)02-0094-04

Establishment of animal model of dental fluorosis by drinking in SD rat

LI Chang-cheng, LIU Xiao-li, LIU Ke-jian, CUI Cai-yan, LIU Yun, YU Li-kai, HUANG An-bin

(Department of Occupational and Environmental Health, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

Abstract: Objective To establish a rat model of dental fluorosis by drinking thereby provide a scientific basis for researching the pathogenesis of dental fluorosis. **Methods** The animal model of dental fluorosis was made by adding fluoride in drinking water for rats, the dose was adjusted with the daily body weight (mg/kg), the urine and blood fluoride were monitored everyday by micro determination of fluoride; meanwhile, the serum ALP was also detected by automatic biochemical analyzer. At last, the dental fluorosis was documented by photographing with digital camera and diagnosis was made according to the dental fluorosis criteria. **Results** The results showed that all the rats exposed to middle and high doses of fluorine developed significant dental fluorosis 90 days later after exposure, the urinary fluoride, blood fluoride and serum ALP also increased compared with those of control group ($P < 0.05$). The urine fluoride and blood fluoride were all markedly associated with exposure levels ($r = 0.924, P = 0.038$ and $r = 0.948, P = 0.026$, respectively); and the incidence of dental fluorosis was well positively correlated with fluoride dose ($r = 0.983, P = 0.017$). **Conclusion** The results suggested that there is an evident dose-response relationship between dental fluorosis incidence and fluorine exposure dose: given 16 mg/kg of fluorine may induce I degree of dental fluorosis in 14 d and 32 mg/kg of fluorine may induce typical dental fluorosis in 35 d in rats.

Key words: fluorine; dental fluorosis; rat model; by drinking

氟是机体必需的微量元素, 其对机体的作用表现为双向性^[1]。氟斑牙是氟性骨损伤最早期可见的病变, 氟斑牙模型的建立对氟性骨损伤机制的研究及地氟区的划分等均有重要意义。以往大鼠氟斑牙模型的建立多采用自由饮用不同浓度含氟水的方式, 但构建氟斑牙模型所用染氟剂量及时间不尽相同^[2-4]。由于模型复制过程中大鼠饮水剂量的不易操控性, 使理论染氟剂量与实际染氟剂量间误差较大, 导致氟斑牙的发生与饮水氟剂量的反应关系存在严重分歧, 剂量的不确定性为后续氟性骨损伤机制和防治的研究带来一

定影响。为明确饮水型大鼠染氟剂量与相关反应的关系, 我们通过日测体重然后按体重给予染氟剂量并监测饮水量的方法对大鼠进行染氟, 记录氟斑牙的发生时间及各时间段进展情况, 进而揭示 SD 大鼠氟斑牙发生与染氟剂量的确切反应关系, 为深入研究氟性骨损伤发病机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

健康成年 SPF 级 SD 大鼠 64 只, 雌雄各半, 体重 (174.39 ± 26.16) g, 购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 许可证号 SY2008-0046。自由饮水、进食, 室温 (20.0 ± 2.5) °C 适应性饲养 1 周。随机分为低剂量组 (1.6 mg/kg NaF)、中剂量组 (16 mg/kg NaF)、高剂量组 (32 mg/kg NaF) 和对照组 (0 mg/kg NaF)。每组 16

收稿日期: 2011-11-02; 修回日期: 2011-12-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81072255)

作者简介: 李长城 (1984-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 职业卫生与环境卫生。

通讯作者: 刘克俭, 教授, E-mail: lkj484@sohu.com。

只，雌雄各半，分笼饲养。NaF 液用蒸馏水配制，动物均采用全价营养颗粒饲料喂养（含 F⁻ < 2.0 mg/kg）。

1.2 方法

1.2.1 染毒方法 每日（8:30—9:00 Am）测定大鼠体重及饮水量变化情况，据体重按低剂量组（1.6 mg/kg NaF）、中剂量组（16 mg/kg NaF）、高剂量组（32 mg/kg NaF）标准计算各组 NaF 需要量，然后用电子天平称取相应量的 NaF 并溶于适量的蒸馏水中，每天给予相应的 NaF 溶液直至饮完为止，再以蒸馏水代替饮水。为保证染毒量的完全摄入要求所配制 NaF 溶液约为饮水量一半，若饮用时间超过 24 h，则第二天配制 NaF 溶液量相应减少。

1.2.2 检测方法 分别于第 7、14、21、35、90 天对大鼠下切牙进行数码相机唇面正位拍照记录，观察并记录下切牙颜色变化。同时收集大鼠尿液，采用微电极法进行尿氟测定。于第 0、35、90 天进行血液采集，以 2 500 r/min 离心，离心半径为 8 cm，分离血清，-80 °C 冻存，实验结束后统一测定，采用微电极法测定血氟，全自动生化分析仪测定 ALP。

1.2.3 大鼠下切牙数码照片氟斑牙观测标准 ①正常，大鼠下切牙釉质呈半透明，橘黄或棕黄色，色泽度好；② I 度，1 级：下切牙表面出现微小规律的棕白相间横纹，光滑性和光泽度无改变；2 级：下切牙表面棕白相间的横纹明显，有少许色素沉着，光滑性和色泽度轻微下降，透明度下降；③ II 度，3 级：下切牙表面白色横纹变宽甚至不规则，色泽度和光滑度改变明显，色素沉着明显；4 级：下切牙表面棕色横纹部分色素沉着加深，白色带融合呈蜡白色，光泽度消失；5 级：下切牙表面大部分棕色横纹消失，大部分牙面呈白粉笔样，可见牙齿缺损和牙髓外露。

1.3 统计学处理

在 Excel 上建立数据库，所有数据的统计描述使

用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，用 SPSS18.0 统计软件进行统计分析，多组间比较采用方差分析，组间比较采用 *q* 检验，两变量相关采用 pearson 进行分析，*P* < 0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 动物生长状况

在为期 90 d 的实验过程中，各组大鼠均无患病及死亡发生，各组大鼠食欲良好。10 周后，高、中剂量组大鼠活动反应能力较对照组有轻微下降。实验结束时行大鼠解剖，各组大鼠心、肝、脾、肺、肾等器官未发现异常。随染氟时间延长，实验组大鼠体重增长较对照组缓慢，但同一染毒期间实验组与对照组大鼠体重之间差别无统计学意义 (*P* > 0.05)。各组大鼠饮水量随着染毒时间的延长逐渐增加，10 周后增加速度变慢，同一时间断面实验组与对照组大鼠饮水量间差别无统计学意义 (*P* > 0.05)。

2.2 大鼠尿氟、血氟及血 ALP 水平的变化

实验结果显示，染氟 7 d 后，各组大鼠尿氟水平经方差分析，差异均有统计学意义 (*P* < 0.01)。染氟第 7 天，高、中剂量组尿氟水平即明显升高，与对照组比较，差异均有统计学意义 (*P* < 0.01)，之后尿氟持续升高并维持在较高水平；低剂量组尿氟水平在第 7 天时升高，且呈持续升高趋势，与对照组相比差异有统计学意义 (*P* < 0.01)，实验结束时，低剂量组尿氟与对照组尿氟水平差异无统计学意义 (*P* > 0.05，表 1)。经方差分析，各组大鼠血氟和血清中 ALP 水平在第 35 天和第 90 天差异均有统计学意义 (*P* < 0.01)。高、中、低剂量组大鼠第 35 天血氟及血 ALP 水平显著高于对照组 (*P* < 0.05)，血氟水平随染毒剂量的增加均呈升高趋势，高、中剂量组血 ALP 水平高于对照组，差异有统计学意义 (*P* < 0.05)，见表 2。

表 1 各组大鼠尿氟变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	mg/L					
	第 0 天	第 7 天	第 14 天	第 28 天	第 35 天	第 90 天
高剂量组	0.61 ± 0.16	8.48 ± 1.19 ^a	18.53 ± 2.72 ^a	18.17 ± 1.39 ^a	17.24 ± 1.36 ^a	25.13 ± 6.52 ^a
中剂量组	0.76 ± 0.23	6.38 ± 0.53 ^a	17.61 ± 3.05 ^a	17.63 ± 1.26 ^a	16.00 ± 3.19 ^a	20.16 ± 1.51 ^a
低剂量组	0.62 ± 0.15	2.03 ± 0.16 ^b	3.80 ± 1.03 ^b	4.15 ± 0.18 ^b	4.27 ± 0.22 ^b	5.66 ± 1.24
对照组	0.67 ± 0.20	1.09 ± 0.35	1.95 ± 0.21	2.04 ± 0.27	2.16 ± 0.37	3.93 ± 2.40

注：经 *q* 检验，同一时间与对照组比较，a *P* < 0.01，b *P* < 0.05。

表 2 各组大鼠血氟及 ALP 水平变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	血氟 (mg/L)			血 ALP (U/L)		
	第 0 天	第 35 天	第 90 天	第 0 天	第 35 天	第 90 天
高剂量组	0.055 ± 0.04	0.251 ± 0.05 ^a	0.294 ± 0.07 ^a	413.76 ± 48.43	216.43 ± 34.43 ^a	91.50 ± 28.94 ^a
中剂量组	0.069 ± 0.04	0.217 ± 0.07 ^a	0.218 ± 0.06 ^a	413.76 ± 48.43	218.02 ± 42.81 ^a	85.73 ± 21.87 ^a
低剂量组	0.071 ± 0.05	0.131 ± 0.03 ^b	0.143 ± 0.07	413.76 ± 48.43	177.31 ± 48.03 ^b	62.04 ± 20.26
对照组	0.066 ± 0.03	0.086 ± 0.08	0.131 ± 0.06	413.76 ± 48.43	160.55 ± 41.33	59.16 ± 19.15

注：经 *q* 检验，同一时间与对照组相比，a *P* < 0.01，b *P* < 0.05。

2.3 大鼠氟斑牙发生及下切牙牙釉质颜色变化情况

实验期间, 对照组无氟斑牙发生。高、中剂量组第 14 天开始出现 I 度氟斑牙; 第 14~28 天氟斑牙发生率高且进展迅速, 由 I 度向 II 度进展; 第 35 天时均出现明显氟斑牙; 第 14~21 天以 I 度氟斑牙为主, 牙表面出现棕白相间的细小横纹, 色泽改变轻微; 第

28 天至实验结束, 以 II 度氟斑牙为主, 大鼠下切牙色泽度差, 表面棕、白色带增宽, 横纹不规则甚至消失, 呈白粉笔样, 并可见牙齿缺损。实验结束时, 低剂量组出现 1 例 I 度 I 级氟斑牙; 高、中剂量组所有大鼠均出现 II 度氟斑牙, 见表 3。

表 3 不同时间段各组大鼠氟斑牙发生率情况

%

组别	14 d		21 d		28 d		35 d		42 d	
	I 度	II 度								
高剂量组	81.3	6.3	12.5	62.5	6.3	25.0	0	6.3	0	0
中剂量组	62.5	0	25.0	50.0	12.5	31.3	0	12.5	0	6.3
低剂量组	0	0	0	0	0	0	0	0	6.3	0
对照组	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

2.4 染氟剂量与血氟、尿氟及血 ALP 水平的关系

高剂量组血氟水平高于中剂量组, 两者均明显高于低剂量组和对照组, 血氟水平与染氟剂量呈明显正相关 ($r=0.948, P=0.026$); 高、中剂量组尿氟水平较低剂量组高, 其水平的高低与染氟剂量呈明显正相关 ($r=0.924, P=0.038$); 高、中剂量组血 ALP 水平较低剂量组高, 血 ALP 水平的变化与染氟剂量之间存在明显正相关 ($r=0.872, P=0.064$)。

2.5 氟斑牙发生率与染氟剂量的关系

中剂量组大鼠随染氟时间的延长, 氟斑牙发生率升高, 且向 II 度氟斑牙方向发展, 与染氟时间呈明显正相关 ($r=0.964, P=0.008$), 高剂量组氟斑牙发生率进展较中剂量组快速, 与染氟时间也呈高度相关 ($r=0.941, P=0.017$); 氟斑牙发生率与染氟剂量呈明显正相关 ($r=0.983, P=0.017$), 高、中剂量组相比, 染氟剂量越高, 氟斑牙的发生时间越早, 发生率越高, 进展速度越快程度越重, 见图 1。

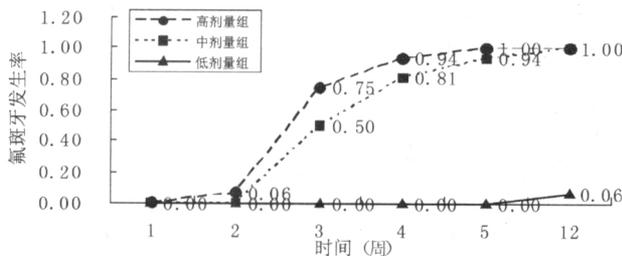


图 1 氟斑牙发生率与染氟剂量的关系

3 讨论

氟斑牙动物模型的建立多采用饮水加氟法, 在为期 90 d 的实验中, 高 (32 mg/kg)、中 (16 mg/kg)、低 (1.6 mg/kg) 剂量组与对照组大鼠的饮水量无差别, 说明 NaF 溶液无色无味对大鼠饮水量影响较小, 利用饮水染氟的方法切实可行。我们在传统饮水染氟的基础上, 通过日给日测法来进行染氟, 克服动物

连续饮用不同浓度 NaF 溶液而出现染氟剂量不准确的问题。按体重计算染毒剂量, 并配制明显少于其饮水量的 NaF 溶液, 以确保每天染氟剂量的完全摄入, 在 90 d 的实验中, 每天给予的 NaF 溶液并无剩余现象, 说明每天给予的染氟剂量摄入完全, 给予剂量准确; 同时按体重给予染毒剂量, 保证了机体氟暴露剂量的稳定。实验结果表明, 通过监控体重及饮水量, 并同时检测尿氟和血氟水平, 来构建饮水型 SD 大鼠氟斑牙模型, 染氟效果好, 模型准确可靠。在实验过程中, 我们发现高剂量组大鼠毛色及活动反应度较对照组差, 实验后期高、中剂量组与对照组大鼠相比体重有所下降, 但各组大鼠体重差异很小, 3 个月内一定剂量范围染氟尚不能引起机体严重的体重变化, 与吴起清等^[3]研究结果不一致。

染氟实验第 7 天, 高、中、低剂量组的尿氟水平便显著高于对照组, 说明在机体短间接氟后, 尿氟即开始升高^[5], 因此尿氟可以作为机体接氟指标来反映机体接氟量的大小。高、中剂量组在各个时期的尿氟水平差别不大, 但高剂量组的血氟水平明显高于中剂量组, 表明氟暴露剂量越高, 越易导致高氟负荷现象, 所以高剂量组较中剂量组氟斑牙发生时间短, 进展迅速且程度严重。血氟水平在染氟第 35 天和第 90 天时, 高、中剂量组明显高于对照组, 血氟水平与氟暴露水平一致, 血氟随饮水氟含量的增加而升高, 因此血氟可作为机体内氟负荷的重要指标^[6], 准确反映机体的氟内暴露量。在染氟第 35 天, 高、中剂量组大鼠血清中 ALP 即明显高于对照组, 血清中 ALP 活性反映骨代谢活跃程度^[7], 提示高、中剂量组大鼠在氟作用下开始产生骨性损伤, 且损伤程度与染氟剂量紧密相关^[8], 所以血清中 ALP 可视为氟产生损伤效应的指标。

(下转第 115 页)

2008, 36: 1297-1303.

- [51] Mishra J, Dent C, Tarabishi R, *et al.* Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery [J]. *Lancet*, 2005, 365: 1231-1238.
- [52] Bachorzewska-Gajewska H, Malyszko J, Sitniewska E, *et al.* Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) correlations with cystatin C, serum creatinine and eGFR in patients with normal serum creatinine undergoing coronary angiography [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2007, 22: 295-296.
- [53] Mishra J, Ma Q, Kelly C, *et al.* Kidney NGAL is a novel early marker of acute injury following transplantation [J]. *Pediatr Nephrol (Berlin, Germany)*, 2006, 21: 856-863.
- [54] Coca SG, Yalavarthy R, Concato J, *et al.* Biomarkers for the diagnosis and risk stratification of acute kidney injury: a systematic review [J]. *Kidney Int*, 2008, 73: 1008-1016.
- [55] Parikh C R, Jani A, Melnikov V Y, *et al.* Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis [J]. *Am J Kidney Dis*, 2004, 43: 405-414.
- [56] Parikh C R, Abraham E, Ancukiewicz M, *et al.* Urine IL-18 is an early diagnostic marker for acute kidney injury and predicts mortality in the intensive care unit [J]. *J Am Soc Nephrol*, 2005, 16: 3046-3052.
- [57] Huang Y, Sullivan Pepe M, Feng Z. Evaluating the predictiveness of a continuous marker [J]. *Biometrics*, 2007, 63: 1181-1188.
- [58] Han W K, Bailly V, Abichandani R, *et al.* Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury [J]. *Kidney Int*, 2002, 62: 237-244.
- [59] Shlipak M G, Katz R, Sarnak M J, *et al.* Cystatin C and prognosis for cardiovascular and kidney outcomes in elderly persons without chronic kidney disease [J]. *Ann Intern Med*, 2006, 145: 237-246.
- [60] Muramatsu Y, Tsujie M, Kohda Y, *et al.* Early detection of cysteine rich protein 61 (CYR61, CCN1) in urine following renal ischemic reperfusion injury [J]. *Kidney Int*, 2002, 62: 1601-1610.
- [61] du Cheyron D, Daubin C, Poggioli, J, *et al.* Urinary measurement of Na⁺/H⁺ exchange isoform 3 (NHE3) protein as new marker of tubular injury in critically ill patients with ARF [J]. *Am J Kidney Dis*, 2003, 42: 497-506.
- [62] Westhuyzen J, Endre Z H, Reece G, *et al.* Measurement of tubular enzyuria facilitates early detection of acute renal impairment in the intensive care unit [J]. *Nephro Dial Transplant*, 2003, 18: 543-551.
- [63] Vishal S Vaidya, Michael A Ferguson, Joseph V Bonventre. Biomarkers of acute kidney injury [J]. *J Appl Toxicol*, 2011, 31 (4): 366-377.
- [64] Lisowska-Myjak B. Serum and urinary biomarkers of acute kidney injury [J]. *Blood Purif*, 2010, 29 (4): 357-365.
- [65] Soni S S, Ronco C, Katz N, *et al.* Early diagnosis of acute kidney injury: The promise of novel biomarkers [J]. *Blood Purif*, 2009, 28 (3): 165-174.
- [66] Haufe S E, Riedmuller K, Haberkorn U. Nuclear medicine procedures for the diagnosis of acute and chronic renal failure [J]. *Nephron Clin Pract*, 2006, 103 (2): c77-84.
- [67] Sharfuddin A A, Sandoval R M, Molitoris B A. Imaging techniques in acute kidney injury [J]. *Nephron Clin Pract*, 2008, 109 (4): c198-204.
- [68] Ashworth S L, Tanner G A. Fluorescent labeling of renal cells in vivo [J]. *Nephron Physiol*, 2006, 103 (2): 91-96.
- [69] Ishii T, Ishii M. Intravital two-photon imaging: a versatile tool for dissecting the immune system [J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70 (Suppl 1): 113-115.

(上接第 96 页)

本实验血氟、尿氟及血清中 ALP 测定结果表明, 氟暴露量与机体存在明显的剂量-反应关系^[9], 机体氟负荷可准确反映染氟剂量的大小。因此, 可以通过监测大鼠机体氟负荷来监控摄氟量。

实验第 35 天, 高、中剂量组氟斑牙发生率即明显高于低剂量组和对照组, 说明摄氟超过一定剂量即可引起 SD 大鼠氟斑牙的发生^[10], 氟斑牙发生率和发生时间与氟暴露剂量紧密相关, 且氟斑牙的发生率与氟暴露水平一致性明显^[11]。低剂量组在实验结束时有 1 例发生 I 度氟斑牙, 可能是由于个体敏感差异造成, 低剂量组长时间染氟也可引起敏感个体氟斑牙发生。

参考文献:

- [1] Gazzano E, Bergandi L, Riganti C, *et al.* Fluoride effects: the two faces of Janus [J]. *Current Medicinal Chemistry*, 2010, 17: 2431-2441.
- [2] 陶洪, 王琳, 侯铁舟, 等. 氟对小鼠釉原蛋白基因表达的影响 [J]. *西安交通大学学报 (医学版)*, 2010, 31 (6): 756-759.
- [3] 吴起清, 钟近洁, 白生宾, 等. 饮水型大鼠氟中毒动物模型的建立 [J]. *中国高等医学教育*, 2009, 1 (3): 160-161.
- [4] 邓转云, 黄瑞哲, 郭永利. 诱导大鼠下切牙氟斑牙模型所需饮水氟浓度及时间的筛选 [J]. *实验动物学*, 2008, 25 (4): 16-15.
- [5] Everett E T, McHenry M A K, Reynolds N, *et al.* Dental fluorosis: Variability among different inbred mouse strains [J]. *Journal of Dental Research*, 2002, 81 (11): 794-798.
- [6] 刘连, 徐园园, 许洁, 等. 氟对大鼠自由基、氧化应激及超微结构影响 [J]. *中国公共卫生*, 2009, 25 (9): 1114-1116.
- [7] Song Yu-e, Tan Hao, Liu Ke-jian, *et al.* Effect of fluoride exposure on bone metabolism indicators ALP, BALP, and BGP [J]. *Environ Health Prev Med*, 2011, 16: 158-163.
- [8] 刘克俭, 孙志浩, 张裕曾, 等. 职业性氟接触人群氟性骨损伤致病风险关联分析 [J]. *工业卫生与职业病*, 2010, 36 (3): 159-162.
- [9] 李永华, 王五一, 侯少范. 我国地方性氟中毒病区环境氟的安全阈值 [J]. *环境科学*, 2002, 23 (4): 118-162.
- [10] 蹇曾山, 陈思强. 氟中毒患病率与氟摄入量的关系 [J]. *公共卫生与预防医学*, 2006, 17 (5): 82-83.
- [11] 李广生, 井玲. 关注氟化物的剂量-效应问题 [J]. *中国地方病杂志*, 2004, 23 (2): 100-101.