

不同浓度氟对山羊成骨细胞周期和凋亡的影响

钟代彬^{1,2}, 冯丽芳¹, 曲伟杰¹, 苏敬良¹, 韩博^{1*}

(1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100094; 2. 北京奶牛中心种公牛站, 北京 102100)

摘要: 为了探讨氟化物对反刍动物成骨细胞的细胞周期和凋亡的影响, 本研究以初生山羊股骨骨膜为材料分离成骨细胞, 接种于含 15% FBS 的 DMEM 培养液, 于 37°C、5% CO₂ 的培养箱中培养。通过形态观察 (Hoechst33342/PI 双重染色)、DNA ladder 电泳、透射电镜、流式细胞仪等方法检测氟对成骨细胞的调控作用。结果表明, 高氟 (1.0 × 10⁻³ 及 2.5 × 10⁻³ mol/L) 使成骨细胞 G₀/G₁ 期减少, S 期细胞增多, 抑制成骨细胞周期由合成 DNA 的 S 期向 G₂M 期转化, 使细胞停滞在 S 期。1.0 × 10⁻⁵ ~ 2.5 × 10⁻³ mol/L 氟可使 DNA 断裂, 诱导成骨细胞凋亡, 其中 1.0 × 10⁻⁴ mol/L 氟所致早期和晚期凋亡率最高, 分别为 3.33% 和 2.92%。本试验证实氟可诱导成骨细胞凋亡。

关键词: 氟化钠; 成骨细胞; 细胞周期; 细胞凋亡; 山羊

中图分类号: S856.9

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2007)09-0977-06

The Influence of Fluoride on Cell Cycle and Apoptosis of Cultured Caprine Osteoblasts

ZHONG Dai-bin^{1,2}, FENG Li-fang¹, QU Wei-jie¹, SU Jing-liang¹, HAN Bo^{1*}

(1. College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Breeding Bull Station of Beijing Dairy Cattle Center, Beijing 102100, China)

Abstract: In order to determine whether fluoride would induce apoptotic cell death, our research group monitored DNA fragmentation and the cellular morphology with Hoechst33342/PI double staining, DNA ladder and transmission electron microscope (TEM). The level of apoptosis was analyzed with a fluorescence-activated cell sorter (FACS) by the Annexin-V-FITC and the propidium iodine (PI) double staining method. Cell-cycle analysis was also examined with FACS using PI staining. The experimental results were as follows: Ultrastructural features of osteoblasts in control group exhibited clear nuclear envelope, large nucleolus, even karyoplasms, abundant endoplasmic reticulum and mitochondria. When fluoride was more than 1.0 × 10⁻⁴ mol/L, cellular membrane disintegration, cytoplasm condensation, chromatin compaction or fragmentation, endoplasmic reticulum (ER) expansion, nucleus shrinkage or periphery were observed. Fluoride at 1.0 × 10⁻⁵ - 2.5 × 10⁻³ mol/L induced apoptosis with DNA fragmentation. FACS cell-cycle analysis demonstrated that fluoride caused potent G₀/G₁ arrest. Few cells could be found either in the S phases or the G₂/M, thus inhibiting the transformation from S phase into G₂/M phase under high levels of fluoride. The highest apoptosis rate of earlier and later stages were induced by 1.0 × 10⁻⁴ mol/L fluoride (3.33% and 2.92% respectively). In conclusion, the results revealed that fluoride can induce apoptosis in osteoblast.

Key words: sodium fluoride; cell; osteoblast; cycle; apoptosis; goat

氟是人体和动物必需的微量元素之一, 少量的氟有助于骨骼和牙齿的钙化。但氟在自然环境中分

布不均而形成自然高氟地区。过量氟可导致慢性氟中毒,使人和动物(反刍动物对氟敏感性最高)出现氟斑牙和氟骨症,且引发心血管、中枢神经、消化、内分泌、视觉器官、皮肤等多系统的全身性疾病。研究发现,氟化物具有细胞毒性,可诱导兔、小鼠、大鼠等动物的成骨细胞凋亡^[1~3]。但由于存在种属差异,过量氟是否导致反刍动物成骨细胞凋亡的报道却很少。本研究拟通过体外培养的反刍动物成骨细胞染不同剂量的氟,探讨氟化物对离体培养的成骨细胞的细胞周期及凋亡的调控作用。

1 材料与方 法

1.1 试验动物

初生山羊羔,购自北京顺义某羊场。

1.2 主要仪器

CO₂培养箱(Revco)、6孔培养板(Costar)、倒置相差显微镜(Nikon)、流式细胞仪(BECSscan)、荧光显微镜(Olympus)、紫外透射分析仪(北京智源通生物技术研究 所)、紫外成像仪(Alpha Imager 2000, Alpha Innotech Corporation)。

1.3 主要试剂

DMEM培养基(Gibico)、L-谷氨酰胺(Sigma)、标准胎牛血清(FBS, Australia)、青链霉素(Hyclone)、氟化钠(NaF, 分析纯,北京化工厂)、胰蛋白酶(Sigma)、II型胶原酶(Gibico)、DNA提取试剂盒(Omega)、琼脂糖(Spanish)、碘化丙锭(PI, Sigma)、HO33342(HO, Sigma)。

1.4 细胞培养

无菌取新生羔羊股骨,剔除肌肉和筋腱组织;刮取骨膜于平皿,用DMEM基础培养液洗涤2次;于烧杯内将骨膜剪成1~2 mm³碎片。加入0.1%胶原酶和0.25%胰蛋白酶37℃振荡消化10 min,用PBS洗涤后加入少量含1%青链霉素、1%谷氨酰胺、15%FBS的DMEM培养液,将组织块接种于培养瓶,在37℃、5%CO₂饱和湿度培养箱中翻转培养4 h,再进行常规培养。细胞汇合后作传代培养,按文献[4]操作。

1.5 试验设计

设置不添加氟的对照组及5个含不同浓度氟的试验组(2.5×10⁻³、1.0×10⁻³、5.0×10⁻⁴、1.0×10⁻⁴、1.0×10⁻⁵ mol/L NaF),每组3个重复孔。

1.6 细胞周期测定

传代细胞贴壁生长后,换无血清培养基继续培

养24 h, PBS洗涤2次,换为含不同浓度NaF的培养液。继续培养48 h,弃培养液, PBS洗涤后用0.25%胰蛋白酶消化,收集各组细胞以1 000 r/min离心, PBS(pH 7.2)洗涤2次,用血细胞计数仪计数并调节细胞密度到10⁶/mL。取各组细胞100 μL加入试管,每管加3 mL冷乙醇(4℃),混匀,4℃冰箱过夜。第2天离心细胞(1 500 r/min, 10 min)去上清液(乙醇)后, PBS再洗涤2遍,去上清。每管加入500 μL PBS。再加入含100 U/mL RNase、10 μg/mL Triton X-100和50 μg/mL PI的染液50 μL,室温避光30 min。离心(1 500 r/min 10 min)去上清。每管加入500 μL PBS,混匀。

细胞筛过滤细胞后用流式细胞仪进行检测,用三色分析法,采取FSvSS设门,确定细胞群,先测定对照管,确定二倍体峰位置后,依次测定样品。用PHOENIX MultiCycle分析软件分析细胞周期。

1.7 氟诱导细胞凋亡的分析

1.7.1 Hoechst33342/PI双重染色 细胞贴壁生长后,换为含不同浓度NaF的培养液,继续培养48 h,0.25%胰蛋白酶消化,收集细胞,1 000 r/min离心并收集各组细胞, PBS洗涤离心,200 μL PBS重悬细胞,用PI和Hoechst33342进行双重染色10 min,荧光显微镜下观察细胞。

1.7.2 DNA ladder电泳 于细胞半汇合时换为含不同浓度NaF的培养液,继续培养48 h。0.25%胰蛋白酶消化细胞, PBS洗涤2次后用200 μL冷PBS(4℃)悬浮,制备成单细胞悬液。按照DNA提取试剂盒说明书提取DNA。

采用含EB的1.5%琼脂糖凝胶进行电泳。取5 μL DNA与1 μL溴酚蓝缓冲液混合,加样于凝胶点样孔,样品在点样孔沉淀3 min,进行电泳,电压5.0 V/cm。电泳结束后关闭电源,于紫外透射分析仪观察,并用紫外成像仪进行凝胶成像分析。

1.7.3 透射电镜观察(TEM) 细胞贴壁生长后,加入不同浓度NaF的溶液,继续培养48 h。PBS洗涤培养板后,用细胞铲将细胞刮下后转移到离心管,经离心、固定、脱水后,用618⁺环氧树脂包埋, LKB 8800 III型超薄切片 机切片,切片经醋酸铀、枸橼酸铅染色,透射电镜观察。

1.7.4 磷脂酰丝氨酸外翻分析(Annexin V)联合PI法 细胞以10⁵/mL接种于25 mL培养瓶,于含15%胎牛血清的DMEM培养液中培养。细胞贴壁生长后,换为含不同浓度NaF的培养液。继续培养

48 h 后,用 0.25%胰蛋白酶消化并离心收集各组细胞。用预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次;1×Binding Buffer 重新悬浮细胞至 1×10^6 /mL;取 100 μ L 细胞至 5 mL 管;加入 5 μ L Annexin-V-FITC 和 10 μ L PI 混匀;于室温避光孵育 15 min;每管加入 400 μ L 1×Binding Buffer,1 h 内用流式细胞仪检测荧光强度。

1.8 数据处理

试验结果以平均值±标准差表示,运用 SPSS 12.0 软件进行分析。

2 结果

2.1 细胞周期测定

由表 1 可知,与对照组相比,NaF 浓度为 1.0×10^{-4} 及 5.0×10^{-4} mol/L 时 G_2/M 期细胞增加 ($P < 0.05$); 1.0×10^{-3} 及 2.5×10^{-3} mol/L 时, G_0/G_1 期细胞减少,并使 S 期细胞增加,其中 2.5×10^{-3} mol/L 氟使 G_0/G_1 期细胞显著减少 ($P < 0.01$)。结果表明高浓度氟使成骨细胞 G_0/G_1 期减少,S 期细

表 1 氟作用 48 h 的细胞周期分布 (n=3)

Table 1 The effects of fluoride on cell cycle at 48h in cultured goat osteoblasts (n=3)

NaF/(mol/L)	细胞周期分布/% The distribution of cell cycle/%			
	G_0/G_1 期 G_0/G_1 phase	S 期 S phase	G_2/M 期 G_2/M phase	
0	86.23±1.79	8.80±0.44	5.00±1.30	
1.0×10^{-5}	87.80±3.03	6.63±4.25	5.57±2.94	
1.0×10^{-4}	82.67±2.37	8.50±3.57	8.80±1.57*	
5.0×10^{-4}	78.83±6.12	11.27±5.43	9.90±1.71*	
1.0×10^{-3}	80.00±3.12*	15.73±5.49	4.27±2.82	
2.5×10^{-3}	80.20±0.85**	16.40±2.95*	3.40±2.11	

与对照组相比, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

Compared with the control group, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$

胞增多,抑制细胞周期由 DNA 合成的 S 期向 G_2/M 期转化,使细胞停滞在 S 期。

2.2 细胞凋亡分析

2.2.1 Hoechst33342/PI 双重染色 成骨细胞经 HO 和 PI 双重染色后,早期凋亡细胞呈亮蓝色团块状,凋亡晚期和坏死细胞为红色,但凋亡晚期细胞核浓缩为几个大的团块,而坏死细胞核呈均质红色。试验结果表明, 2.5×10^{-3} mol/L 组红色细胞较多,细胞处于凋亡晚期,有些发生坏死。 1.0×10^{-3} mol/L 氟使较多细胞发生凋亡,也有部分细胞发生死亡(图 1)。 $1.0 \times 10^{-5} \sim 5 \times 10^{-4}$ mol/L 氟均可不同程度引起成骨细胞凋亡及坏死。对照组大多数细胞呈均质蓝色(图 2)。

2.2.2 DNA 梯形带电泳 细胞凋亡时,DNA 内源性核酸内切酶将核小体切割成 180~200 bp 整数倍的单核苷酸片段,通过 DNA 琼脂糖凝胶电泳,凋亡细胞的 DNA 呈现特有的梯形带。试验结果表明,成骨细胞染氟 48 h 后, 2.5×10^{-3} 及 1.0×10^{-3} mol/L 氟浓度下可出现明显的梯形带; 5.0×10^{-4} 及 1.0×10^{-4} mol/L 氟浓度下可见断裂的梯形条带; 1.0×10^{-5} mol/L 组梯形带不明显(图 3)。

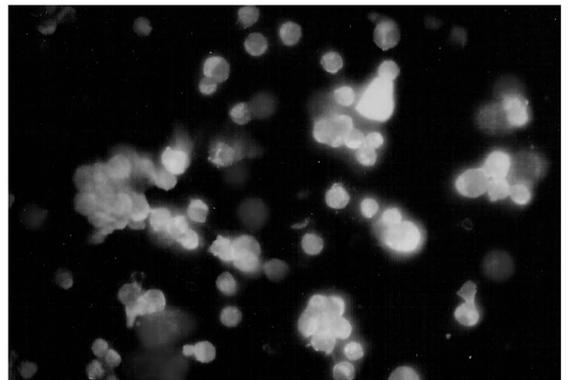


图 1 染氟 1.0×10^{-3} mol/L 成骨细胞,多数细胞呈亮蓝色染色(48 h,×20)

Fig. 1 The majority of cells showing bright blue staining under 1.0×10^{-3} mol/L fluoride (×20)

2.2.3 流式细胞仪检测 细胞凋亡早期的变化之一是,位于正常细胞膜内侧、带负电的磷脂酰丝氨酸(Phosphatidylserine, PS)从膜内侧翻转到膜外侧,即 PS 外化。异硫氰酸荧光素标记的连接素 V (Annexin V) 是一种 Ca^{2+} 依赖性磷脂结合蛋白,可与 PS 结合从而检测出该变化,成为细胞凋亡的早期检测指标。但凋亡早期细胞的细胞膜完整,所以对 PI 拒

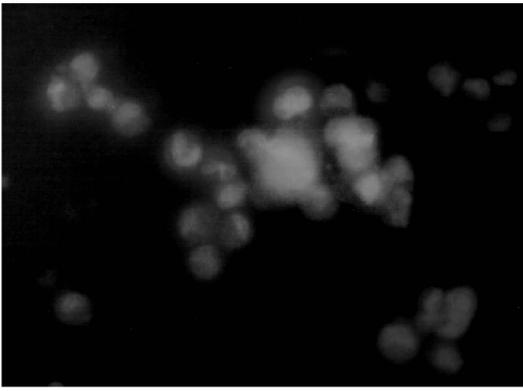
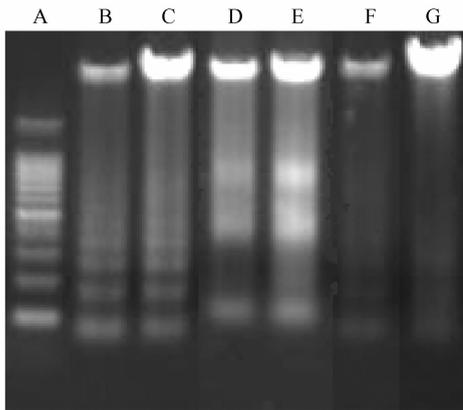


图2 对照组,大多数细胞呈均质蓝色(48 h, ×20)
 Fig. 2 The majority of osteoblasts showing even blue staining (control, 48 h, ×20)



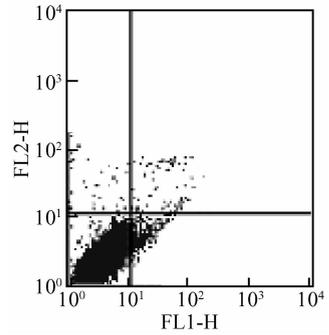
A.Marker; B. 2.5×10^{-3} mol/L; C. 1.0×10^{-3} mol/L;
 D. 5.0×10^{-4} mol/L; E. 1.0×10^{-4} mol/L; F. 1.0×10^{-5} mol/L;
 G. Control

图3 氟诱导成骨细胞凋亡的DNA凝胶电泳梯形带
 Fig. 3 Electrophoretic analysis of DNA extracted from fluoride-induced osteoblasts

染。而坏死细胞或凋亡晚期的继发性坏死细胞可同时被 Annexin V 和 PI 标记,故可区别早期凋亡细胞和坏死细胞。

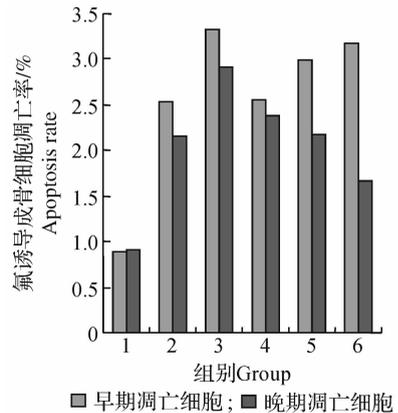
图4为凋亡细胞二维散点图,十字线将细胞分为正常的活细胞(左下区域, Annexin V⁻/PI⁻)、早期凋亡细胞(右下区域, Annexin V⁺/PI⁻)、已死亡细胞(右上区域, Annexin V⁺/PI⁺)。 $1.0 \times 10^{-5} \sim 2.5 \times 10^{-3}$ mol/L 的氟均可诱导成骨细胞凋亡。其中氟为 1.0×10^{-4} mol/L 时,早期和晚期凋亡率最高,分别为 3.33% 和 2.92%(图5)。

2.2.4 透射电镜观察 对照组细胞形态结构完整,核膜清晰、完整,核仁大而圆,核质均匀,染色质均匀分布,胞质富含线粒体和分泌小泡,基质密度高,内



左下区域为活细胞(Annexin V⁻/PI⁻);右下区域为早期凋亡细胞(Annexin V⁺/PI⁻);右上区域为已死亡细胞(Annexin V⁺/PI⁺)

图4 氟诱导成骨细胞凋亡的二维散点图
 Fig. 4 Flow cytometric diagrams of fluoride-induced osteoblast apoptosis by Annexin V/PI double staining



1. Control; 2. 1.0×10^{-5} mol/L; 3. 1.0×10^{-4} mol/L;
 4. 5.0×10^{-4} mol/L; 5. 1.0×10^{-3} mol/L; 6. 2.5×10^{-3} mol/L

图5 流式细胞术分析不同浓度氟诱导成骨细胞的凋亡率

Fig. 5 The percentage of osteoblast apoptosis induced by different dosage of fluoride with FACS analysis

质网较多。 1.0×10^{-5} mol/L 组超微结构变化不明显。 1.0×10^{-4} mol/L 组染色质边集,胞核收缩,线粒体轻度肿胀(图6)。 5.0×10^{-4} mol/L 组可见染色质凝聚成团块,线粒体肿胀,颗粒增多,内质网扩张。 1.0×10^{-3} mol/L 组使胞核变形,胞膜不完整,可见细胞碎片;细胞染色质浓缩、边集,脱颗粒;线粒体明显肿胀,嵴断裂或空泡变性;粗面内质网扩张(图7)。 2.5×10^{-3} mol/L 组的细胞部分发生死亡,胞核肿胀。

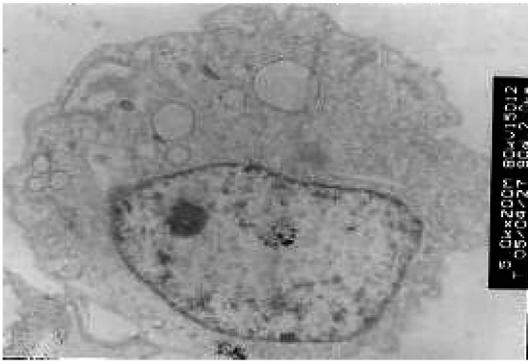


图 6 染氟 1.0×10^{-4} mol/L 成骨细胞的超微结构,染色质固缩、边集($\times 5\ 000$)

Fig. 6 Ultrastructural features of osteoblasts, showing nucleus shrinkage or periphery, and chromatin condensation and marginization induced by 1.0×10^{-4} mol/L fluoride($\times 5\ 000$)



图 7 染氟 1.0×10^{-3} mol/L 成骨细胞的超微结构,胞质浓缩、染色质凝聚、边集($\times 6\ 000$)

Fig. 7 Ultrastructural features of osteoblasts, showing cytoplasm condensation, chromatin aggregation and marginization under 1.0×10^{-3} mol/L fluoride ($\times 6\ 000$)

3 讨论

3.1 氟对细胞周期的影响

细胞周期(Cell cycle)是指细胞从一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂结束的过程。细胞周期反映了细胞的增殖速度。陈燕平等^[1]运用流式细胞术 PI 单染法检测不同浓度氟对兔成骨细胞细胞周期及凋亡的影响,发现 $20\ \mu\text{mol/L}$ 的氟可显著促进 OB 增殖,不引起细胞凋亡,S 期和 G_2/M 期细胞明显增多;高浓度氟(160 、 240 、 $400\ \mu\text{mol/L}$)则抑制 OB 增殖,并引起 OB 凋亡,使 G_2/M 期细胞明显减少。本试验发现,山羊成骨细胞染氟 1.0×10^{-3} 及

2.5×10^{-3} mol/L 时, G_0/G_1 期细胞减少,其中 2.5×10^{-3} mol/L 氟使 G_0/G_1 期细胞显著减少($P < 0.01$),S 期细胞增加($P < 0.05$)。这与上述报道的氟浓度有所差异,可能与不同动物来源的成骨细胞对氟的耐受性不同有关。

3.2 氟诱导细胞凋亡

细胞凋亡的检测方法很多,常用的测定方法包括光镜及电镜观察细胞形态、DNA 琼脂糖凝胶电泳、磷脂酰丝氨酸外翻分析(Annexin V)联合 PI 法、TUNEL 法、Caspase-3 活性检测、线粒体膜势能的检测等。尽管凋亡的检测方法很多,但采用显微镜和透射电镜的形态观察仍然非常重要,但电镜样品制作过程繁琐且仪器设备昂贵,因而无法大量检测样品;DNA 琼脂糖凝胶电泳广泛用作群体细胞凋亡分析,但无法进行定位;磷脂酰丝氨酸外翻分析(Annexin V)联合 PI 法对早期凋亡细胞的检测比 TUNEL 法灵敏,且快捷、准确,是目前分析细胞凋亡的最理想方法。本试验采用上述多种方法相互结合、相互印证,从而弥补单一方法的不足及缺陷。

研究发现氟不仅调控成骨细胞的增殖、分化和钙化^[5,6],还引起超微结构变化^[7,8],并导致细胞 DNA 损伤,诱导细胞凋亡^[9,10]。谢瑶芸等^[7]通过光镜和电镜观察了氟对小鼠胚胎长骨和成骨细胞的形态结构的影响,发现过量的氟对长骨成骨细胞体外培养生长发育、形态结构有明显的影。刘开泰等^[2]观察了氟对体外培养的小鼠长骨细胞凋亡的影响,发现氟浓度高达 $20\ \mu\text{g/mL}$ 时,使 S 期细胞数增加, G_2/M 期细胞数减少,而 G_0/G_1 期细胞无明显改变,且细胞凋亡率达到 21.20% 。其他研究^[3,11,12]也有相同发现,认为高氟抑制了 DNA 合成,从而使细胞 DNA 含量明显降低。缪庆等^[13]观察了氟对大鼠成骨细胞系 ROB-1 的 DNA 损伤情况,发现 $2.0 \sim 3.0\ \text{mmol/L}$ 氟化钠染毒 $24\ \text{h}$ 可不同程度地诱导细胞 DNA 链断裂。本试验观察到,氟浓度高于 10^{-5} mol/L 使 DNA 发生断裂,诱导成骨细胞凋亡,其中 1.0×10^{-4} mol/L 氟所致早期和晚期凋亡率最高。氟浓度高于 10^{-3} mol/L 使成骨细胞 G_0/G_1 期减少,S 期细胞增多,抑制成骨细胞周期由合成 DNA 的 S 期向 G_2/M 期转化,使细胞停滞在 S 期。这与上述报道的氟可致细胞损伤和凋亡的结论一致,而诱导成骨细胞凋亡的最低氟浓度以及细胞凋亡率差异较大,这可能与动物种类、细胞类型、培养基 pH 及细胞孵育时间等有关。

氟还可诱导其他细胞凋亡。Hirano 等^[14]观察了氟对体外培养的 UMR106 细胞的影响,通过 DNA 梯带琼脂糖电泳和 TUNEL 发现培养基浓度为 5 mmol/L 时可诱导细胞凋亡。Song 等^[15]发现,100~250 ppm 时,细胞活力降低、DNA 和蛋白生物合成能力下降、生长及增殖受到抑制等与氟诱导的细胞凋亡有关,氟引起形态学变化、核小体间 DNA 断裂、亚二倍体细胞增加。NaF 可诱导 HL-60 细胞 DNA 氧化性损伤及凋亡,经 NaF 处理的细胞脂类过氧化物的水平升高。认为氧化应激参与介导了细胞凋亡的过程^[16]。王爱国等^[17]发现 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 NaF 可对人胚肝细胞 DNA 产生明显的损伤作用,损伤率达 44.00%,且随着染氟剂量的升高,人胚肝细胞 DNA 损伤率也有上升的趋势。

Lau 等^[18]认为氟致骨细胞凋亡的机理是抑制成骨细胞酸性磷酸酶的活性。陈璐璐等^[19]发现 NaF 刺激体外培养的成骨细胞原癌基因 *c-fos*、*c-jun* 的蛋白表达,从而影响成骨细胞的增殖和分化,并介导了氟致成骨细胞凋亡。呼亚伟等^[20]观察到加氟可致细胞凋亡,并检测到凋亡基因 p53。本试验观察到氟可致山羊成骨细胞凋亡,且氟浓度增加时凋亡率升高,但氟诱导成骨细胞凋亡的机制尚需进一步研究。

参考文献:

[1] 陈燕平,王长松,刘家骝,等. 不同浓度氟对兔成骨细胞细胞周期及凋亡的影响[J]. 中国临床康复,2004,8(32):7124~7126.

[2] 刘开泰,王国荃,汪师贞,等. 氟对体外骨器官培养长骨细胞周期和细胞凋亡的影响[J]. 地方病通报,1999,14(4):1~4.

[3] 张颖,孙贵范,金亚平. 氟化物对大鼠颅骨成骨细胞的细胞周期和细胞凋亡的影响[J]. 卫生研究,2003,32(5):432~433.

[4] 钟代彬,吴培福,曲伟杰,等. 山羊成骨细胞的培养和鉴定[J]. 中国兽医科技,2005,43(5):399~403.

[5] Zhong D B, Sun L T, Wu P F, *et al.* Effects of fluoride on proliferation, differentiation, and apoptosis of cultured caprine (goat) osteoblasts[J]. Fluoride, 2005, 38(3): 230~231.

[6] Chavassieux P, Pastoureau P, Boivin G, *et al.* Fluoride-induced bone changes in lambs during and after exposure to sodium fluoride[J]. Osteoporosis International, 1991, 2(1): 26~33.

[7] 谢瑶芸,刘开泰,马丽英,等. 氟对体外培养长骨及成骨细胞影响的电镜观察[J]. 新疆医科大学学报,2004,27(1):15~17.

[8] 孙立婷,钟代彬,吴培福,等. 氟致体外培养山羊成骨细胞损伤的超微结构观察[J]. 中国地方病学杂志,2006,25(4):382~385.

[9] 张爱君,吴占河. 细胞凋亡与氟中毒[J]. 中国地方病防治杂志,2003,18(1):31~34.

[10] Zhang Y, Sun X, Sun G, *et al.* DNA damage induced by fluoride in rat osteoblasts[J]. Fluoride, 2006, 39(3):191~194.

[11] 刘晓秋,李广生. 氟化物对体外培养乳鼠颅盖骨分离细胞的细胞周期和细胞凋亡的影响[J]. 中国地方病学杂志,2002,21(2):106~108.

[12] 桂传枝,王长松,于燕妮,等. 氟对软骨细胞与成骨细胞凋亡及 H_2O_2 、SOD、NO 的影响[J]. 中国地方病学杂志,2004,23(2):108~112.

[13] 缪庆,刘秉慈,张绪超,等. 大鼠成骨细胞系 ROB-1 的建立及氟对其 DNA 损伤的实验研究[J]. 中国预防医学杂志,2002,3(3):191~194.

[14] Hirano S, Ando M. Apoptosis cell death following exposure to fluoride in rat alveolar macrophage[J]. Arch Toxicol, 1996, 70: 249.

[15] Song J, Lee H, Lee E. Cytotoxicity and apoptosis induction of sodium fluoride in human promyelocytic leukemia (HL-60) cells[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2002, 11: 85~91.

[16] Anuradha C D, Kanno S, Hirano S. Oxidative damage to mitochondria is a preliminary step to caspase-3 activation in fluoride-induced apoptosis in HL-60 cells[J]. Free Radical Biology & Medicine, 2001, 31(3): 367~373.

[17] 王爱国,夏涛,褚启龙,等. 氟对人胚肝细胞 DNA 损伤及凋亡的影响[J]. 中国公共卫生,2004,20(2): 59~64.

[18] Lau K H, Farley J R, Freeman T K, *et al.* Apoptosis mechanism of the mitogenic action of fluoride on bone cells: Inhibition of the activity of an osteoblastic acid phosphatase[J]. Metabolism, 1989, 38: 858~868.

[19] 陈璐璐,童安莉,余达林,等. 氟化钠对乳鼠成骨细胞 *c-fos*、*c-jun* 基因表达及细胞增殖的影响[J]. 中华预防医学杂志,2000,34(6):327~329.

[20] 呼亚伟,崔炳元,张津旗,等. 硒对氟所致细胞凋亡及 p53 基因的影响[J]. 实用预防医学,2003,10(5):676~677.