

# 孕哺期至成年前持续氟染毒对子鼠空间学习记忆和海马病理改变及 miR-204、miR-34b-5P 表达的影响

李阳<sup>a</sup>, 谢春<sup>a</sup>, 张玥<sup>b</sup>, 张华<sup>a</sup>

贵州医科大学 a. 公共卫生学院, 环境污染与疾病监控教育部重点实验室 b. 基础医学院药理学教研室, 贵州 贵阳 550025

## 摘要:

**[背景]** 过量氟可蓄积于脑组织并导致神经系统损伤。微小 RNA (miRNA) 可通过调控相关蛋白表达, 影响学习记忆功能发挥。

**[目的]** 探讨孕哺期至成年前氟暴露对子鼠空间学习记忆和海马中 miR-204、miR-34b-5P 表达的影响。

**[方法]** 16 只清洁级健康 SD 孕鼠随机分为 4 组, 每组 4 只, 自由饮水染毒, 各组饮水中氟化钠质量浓度 (后称浓度) 分别为 0、60、120、240 mg·L<sup>-1</sup>。母鼠从妊娠第 0 天~子鼠出生的第 21 天 (PND21) 染毒; 各组随机选 8 只子鼠 (雌雄各 4 只, 同一窝别雌雄比为 1:1) 在 PND22~PND90 进行染毒。采用 Morris 水迷宫实验检测空间学习记忆能力。子鼠处死前收集 24 h 尿液, 心脏采血后处死, 测定尿、脑及血清氟, 光镜观察海马组织病理变化; 分离海马组织保存于 -80°C, 实时荧光定量 PCR 检测海马组织中 miR-204、miR-34b-5P 表达水平。

**[结果]** 除出生第 6 周低氟组外, 各染毒组大鼠体重均低于对照组 ( $P < 0.05$ )。Morris 水迷宫显示: 第 2、3、4 天子鼠逃避潜伏期与氟化钠的染毒浓度呈正相关 ( $r=0.443$ 、 $0.519$ 、 $0.840$ ; 均  $P < 0.05$ ); 子鼠首次到达平台时间及穿越平台次数分别与氟化钠染毒浓度呈正相关与负相关 ( $r=0.828$ 、 $-0.599$ ; 均  $P < 0.001$ )。60、120、240 mg·L<sup>-1</sup> 染毒组尿氟浓度分别为 (13.08±1.60)、(14.49±1.17)、(25.92±2.38) mg·L<sup>-1</sup>, 较对照组 [(3.89±0.52) mg·L<sup>-1</sup>] 升高 ( $P < 0.001$ ); 各染毒组脑氟水平分别 (8.20±0.68)、(16.03±0.84)、(25.39±0.62) μg·g<sup>-1</sup>, 较对照组 (1.28±0.11) μg·g<sup>-1</sup> 升高 ( $P < 0.001$ ); 各染毒组血清氟浓度分别为 (0.04±0.00)、(0.06±0.01)、(0.16±0.12) mg·L<sup>-1</sup>, 较对照组 [(0.02±0.00) mg·L<sup>-1</sup>] 升高 ( $P < 0.001$ ); 染毒组子鼠尿、脑及血清氟水平均与氟化钠浓度呈正相关 ( $r=0.948$ 、 $0.996$ 、 $0.914$ ; 均  $P < 0.001$ )。HE 染色结果显示: 与对照组比较, 染毒组出现海马神经元体积形态缩小, 胞质颜色红染, 细胞核固缩, 染色加深, 结构模糊和核仁消失等病理改变。中、高氟组中 miR-204 与各染毒组中 miR-34b-5P 表达水平均较对照组增高 ( $P < 0.001$ ), miR-204 与 miR-34b-5P 的表达水平均与氟暴露浓度呈正相关 ( $r=0.984$ 、 $0.980$ ; 均  $P < 0.001$ )。

**[结论]** 持续氟暴露可损害子鼠的学习记忆能力, 可能与海马组织中的 miR-204 与 miR-34b-5P 表达水平升高有关。

**关键词:** 氟; 海马; 学习记忆; 微小 RNA; miR-204; miR-34b-5P

**Effects of continuous fluoride exposure from pregnancy to adulthood on spatial learning and memory, hippocampal pathological changes, and expressions of miR-204 and miR-34b-5P in offspring rats** Li Yang<sup>a</sup>, XIE Chun<sup>a</sup>, ZHANG Yue<sup>b</sup>, ZHANG Hua<sup>a</sup> (a.School of Public Health, the Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education b.Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

## Abstract:

**[Background]** Excessive fluoride can accumulate in brain tissues, causing nervous system damage. MicroRNA (miRNA) can affect the ability of learning and memory by regulating the expressions of related proteins.

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.20269

## 基金项目

国家自然科学基金项目 (81860563); 贵州省科技支撑计划 (黔科合支撑 [2018]2753); 贵州省区域内一流学科建设项目—公共卫生与预防医学 (黔教科研发 2017 [85] 号)

## 作者简介

李阳 (1995—), 女, 硕士生;  
E-mail: 1404681983@qq.com

## 通信作者

谢春, E-mail: xiechun36@163.com

## 伦理审批

已获取

利益冲突 无申报

收稿日期 2020-05-31

录用日期 2020-08-04

文章编号 2095-9982(2020)12-1175-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

## ► 引用

李阳, 谢春, 张玥, 等. 孕哺期至成年前持续氟染毒对子鼠空间学习记忆和海马病理改变及 miR-204、miR-34b-5P 表达的影响 [J]. 环境与职业医学, 2020, 37 (12): 1175-1181.

## ► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.20269

## Funding

This study was funded.

## Correspondence to

XIE Chun, E-mail: xiechun36@163.com

**Ethics approval** Obtained

**Competing interests** None declared

**Received** 2020-05-31

**Accepted** 2020-08-04

## ► To cite

Li Yang, XIE Chun, ZHANG Yue, et al. Effects of continuous fluoride exposure from pregnancy to adulthood on spatial learning and memory, hippocampal pathological changes, and expressions of miR-204 and miR-34b-5P in offspring rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(12): 1175-1181.

## ► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.20269

**[Objective]** This experiment explores the effects of fluoride exposure from pregnancy to adulthood on spatial learning and memory of offspring and the expressions of miR-204 and miR-34b-5P in the hippocampus.

**[Methods]** Sixteen pregnant SD rats were randomly divided into four groups and exposed to NaF via drinking water at 0, 60, 120, and 240 mg·L<sup>-1</sup>, respectively, with four rats in each group. The pregnant rats were treated from pregnant day 0 to postnatal day 21 (PND21) of the offspring rats. From PND22 to PND90 (adulthood), 8 offspring rats (4 males and 4 females, and litter sex ratio was 1:1) from each group were treated with the same concentrations of NaF as the dams through the same procedure. The offspring rats were tested in the Morris water maze. Before death, 24 h urine was collected, and blood was collected by heart puncture. Urinary, brain, and serum fluoride concentrations were determined; the pathological changes of hippocampus were observed under a light microscope; the separated hippocampus were stored at -80°C and tested for miR-204 and miR-34b-5P expression levels by real-time PCR.

**[Results]** Compared with the control group, the body weight of each exposure group was significantly reduced ( $P < 0.05$ ), except the low fluoride exposure group at postnatal week 6. The Morris water maze results showed that on the second, third, and fourth days of training, the escape latency was positively correlated with fluoride exposure concentration ( $r = 0.443, 0.519, 0.840; P < 0.05$ ); the first arriving time and the number of crossing the platform were positively and negatively correlated with fluoride exposure concentration respectively ( $r = 0.828, -0.599; P < 0.001$ ). The urinary fluoride concentrations of the 60, 120, and 240 mg·L<sup>-1</sup> exposure groups were (13.08±1.60), (14.49±1.17), and (25.92±2.38) mg·L<sup>-1</sup>, respectively, significantly higher than that of the control group [(3.89±0.52) mg·L<sup>-1</sup>] ( $P < 0.001$ ). The brain fluoride concentration of each exposure group was (8.20±0.68), (16.03±0.84), and (25.39±0.62) μg·g<sup>-1</sup>, respectively, significantly increased compared with the control group [(1.28±0.11) μg·g<sup>-1</sup>] ( $P < 0.001$ ). The serum fluoride concentration of each exposure group was (0.04±0.00), (0.06±0.01), and (0.16±0.12) mg·L<sup>-1</sup>, respectively, significantly higher than that of the control group [(0.02±0.00) mg·L<sup>-1</sup>] ( $P < 0.001$ ). The urinary, brain, and serum fluoride levels of the progeny rats in the exposure groups were positively correlated with NaF exposure concentration ( $r = 0.948, 0.996, 0.914; P < 0.001$ ). Compared with the control group, there were pathological changes in the hippocampal neurons, such as shrinkage of hippocampal neurons, red staining of cytoplasm, pyknosis of nuclei, hyperchromasia, blurred structure, and disappearance of nucleoli in the exposure group. Compared with the control group, the expression levels of miR-204 in the medium fluoride group and the high fluoride group and the expression levels of miR-34b-5P in each exposure group were increased ( $P < 0.001$ ). The expression levels of miR-204 and miR-34b-5P were positively correlated with fluoride exposure concentration ( $r = 0.984, 0.980; P < 0.001$ ).

**[Conclusion]** Continuous exposure to fluoride from pregnancy to adulthood may impair the ability of learning and memory in pups, which may be related to increasing expressions of miR-204 and miR-34b-5P in the hippocampus.

**Keywords:** fluoride; hippocampus; learning and memory; miRNA; miR-204; miR-34b-5P

氟是自然界广泛存在的非金属元素,也是人体所需的微量元素之一,可通过饮用水<sup>[1]</sup>、燃煤烘烤的食物<sup>[2]</sup>等多种途径进入人体;长期过量摄入会引起全身慢性中毒性疾病,即地方性氟中毒,简称地氟病<sup>[3]</sup>。其临床表现以骨相损害(主要表现为氟斑牙、氟骨症)为主,还包括非骨相损害(神经系统<sup>[4]</sup>、泌尿系统<sup>[5]</sup>、心血管系统<sup>[6]</sup>及生殖系统<sup>[7]</sup>等损伤)。流行病学调查发现,儿童长期饮用高氟水可出现智力下降、发育迟缓,且氟的摄入量与学习记忆功能损伤程度呈正相关<sup>[4, 8]</sup>。动物实验证实,过量的氟可通过胎盘、血脑屏障,引起脑组织结构和功能损伤<sup>[9]</sup>,导致学习记忆功能受损<sup>[10]</sup>。

微小RNA (microRNA, miRNA) 是一类介导基因沉默的内源性非编码小分子RNA,调控转录后的基因表达,在神经系统发育、分化及功能行使中起重要作用<sup>[11-13]</sup>。miRNA异常表达会影响海马神经元的可塑性以及空间学习记忆功能<sup>[14-15]</sup>。miR-204可通过调控酪氨酸激酶受体B (tyrosine kinase receptor B, TrkB) 的表达改善癫痫时脑源性神经营养因子 (brain derived neurotrophic factor, BDNF) -TrkB受抑制状态<sup>[16-17]</sup>, miR-34b-5P参与海马神经元功能与数量的维持<sup>[14, 18-19]</sup>。海

马是负责学习记忆功能的重要脑部结构,海马细胞损伤可对学习记忆产生明显影响。因此探讨海马组织中miR-204和miR-34b-5P的差异表达对研究学习记忆功能损害机制有重要意义。目前未见miR-204、miR-34b-5P在持续氟染毒对子鼠学习记忆影响中的作用研究,故本研究通过模拟氟病区孕哺期至子代成年前慢性氟暴露情况,建立亲代孕哺期至子代成年前慢性氟暴露模型,观察子鼠空间学习记忆能力及脑海马组织结构的病理学变化,检测尿、脑及血清中氟含量和子鼠脑海马体中miR-204、miR-34b-5P mRNA表达水平,为进一步研究慢性氟染毒致子鼠学习记忆损伤提供机制线索。

## 1 对象与方法

### 1.1 试剂与仪器

氟化钠 (NaF, 分析纯; SIGMA-ALDRICH公司, 美国), Trizol, RT-PCR kit (贵阳沃尔森生物技术有限公司, 中国), miR-204、miR-34b-5P和U6的引物 (广州锐博生物科技有限公司, 中国), SYBR Green PCR Master Mix试剂盒 (贵阳沃尔森生物技术有限公司, 中国)。Morris水迷宫游泳池 (中国医学科学院药物研究所制备, 中国), 多功能酶标仪 (Multiskan GO ;

Thermo Scientific, 美国), 实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad, 美国), 倒置显微镜 (尼康公司, 日本), CSB-F-Z 型春花牌复合氟电极 (上海仪电科学仪器股份有限公司, 中国)。

### 1.2 动物分组与染毒

健康清洁级 SD 孕鼠 16 只, 体重 220~250 g, 由贵州医科大学动物实验中心提供。动物房合格证号: SCXK (黔) 2012-0011; 动物合格证号: SCXK (军) 2012-0011。实验经贵州医科大学伦理委员会批准 (编号: 1603184)。实验期间, 大鼠自由摄食及饮水, 于动物实验中心饲养。饲养条件: 室温 (26.5±2) °C, 相对湿度 (60±2) %, 昼夜交替时间为 12 h<sup>[20-21]</sup>。按体重随机分为对照、低氟、中氟和高氟组, 每组 4 只孕鼠, 自由饮水方式染毒。NaF 的大鼠急性经口毒性半数致死量 (LD<sub>50</sub>) 为 147.5 mg·kg<sup>-1</sup><sup>[22]</sup>, 人与动物之间安全系数为 100, 按照毒理学设计原则, 结合相关文献及课题组前期实验<sup>[23]</sup>, 各组饮水中 NaF 的质量浓度 (后称浓度) 分别设置为 0、60、120、240 mg·L<sup>-1</sup>。母鼠染毒时间为受孕第 0 天~子鼠出生后第 21 天 (PND21)。每组随机选取 8 只子鼠 (4 雌 4 雄, 同一窝别雌雄比为 1:1), PND22~PND90 延续同组剂量染毒, PND91 麻醉后心尖取血处死。

### 1.3 检测指标及方法

**1.3.1 子鼠体重测量** 自子鼠出生后至 PND90, 每两周称一次体重。

**1.3.2 空间学习记忆能力检测** 子鼠处死前通过 Morris 水迷宫实验测定子鼠空间学习记忆能力。定位航行实验: 先固定平台于某一象限内, 子鼠面向池壁, 将其从 4 个象限分别放入水中, 记录逃避潜伏期, 即子鼠找到平台所耗时间, 以 60s 为界限, 60s 内未找到, 则记为 60s; 60s 内找到平台, 则让子鼠站立 20s, 此训练持续 4 d。空间搜索实验: 第 5 天平台被撤出, 任选一象限, 子鼠面壁入水, 在没有平台的情况下, 使其按记忆寻找训练时的平台位置, 记录其首次穿越平台的耗时及穿越次数。

**1.3.3 尿、脑及血清氟的检测** 子鼠于处死前收集 24 h 尿液, 异氟烷麻醉后, 心脏采血处死, 迅速分离出脑组织于 -80°C 保存, 脑组织经微波消解, 定容。收集全血, 于室温放置 20 min, 低温离心取上清, 分装, -80°C 保存备用。选择电极法检测尿、脑和血清中氟含量。尿氟检出限为 0.18 mg·L<sup>-1</sup>, 其回收率及相对标准偏差分别为 97.85%~104.85%、0.8%~2.6%。脑氟的检出限

为 0.36 μg·g<sup>-1</sup>, 回收率为 95.2%~103.2%, 相对标准偏差为 1.4%~2.1%。血清氟的检出限为 0.012 mg·L<sup>-1</sup>, 回收率为 96.5%~101.5%, 相对标准偏差为 1.2%~2.5%。

**1.3.4 光镜观察海马病理改变** 大鼠处死后, 冰上分离海马组织。将 10% 福尔马林溶液固定好的海马包埋, 制成石蜡切片 (厚度: 4 μm); 60°C 烘烤 12 h, 后进行 HE 染色, 光学显微镜镜下观察后拍照保存。

**1.3.5 海马中 miR-204 与 miR-34b-5P 表达的测定** 称取海马组织约 30 mg, 采用 Trizol 法提取总 RNA, 并进行定量和纯度的鉴定。提出的总 RNA 按照 PrimeScript™ RT reagent Kit 逆转录成 cDNA, 用于后续 RT-PCR 扩增, 所用试剂盒为: SYBR Green PCR Master Mix。反应体系为 10 μL: SYBR Green 5 μL, 正向、反向引物各 0.5 μL, cDNA 1 μL 和 DEPC 水 3 μL。每个样品重复 3 次<sup>[20]</sup>。miR-204、miR-34b-5P 扩增程序为: 95°C 3 min; 95°C 30 s、56°C 30 s、72°C 60 s, 40 个循环; 延伸 72°C 3 min。基因相对表达水平以 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算。以 U6 作为内参, miR-204、miR-34b-5P 和内参引物均由广州锐博生物科技有限公司设计与合成。

### 1.4 统计学分析

实验数据均采用均数 ± 标准差来表示。采用 SPSS 25.0 进行数据统计及分析, 重复测量方差分析用于体重和逃避潜伏期数据处理, 单因素方差分析用于其余各指标的均数比较, 双变量相关性分析用于变量间相关性分析。检验水准 α=0.05。

## 2 结果

### 2.1 子鼠体重结果

子鼠体重如图 1 所示, 大鼠体重随着染毒时间的延长而逐渐增加。除出生第 6 周低氟组外, 各染毒组大鼠体重均低于对照组 (P<0.05)。

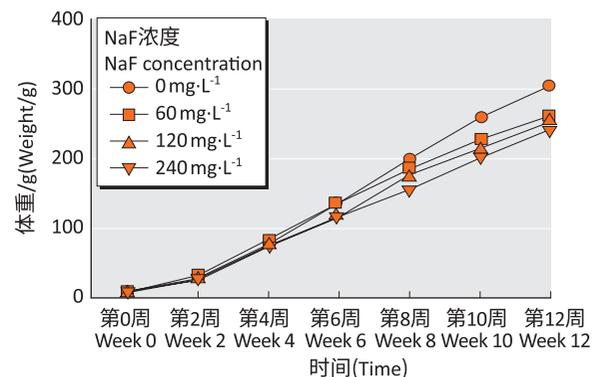


图 1 持续氟暴露对子鼠体重的影响 (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )  
Figure 1 Effect of continuous fluoride exposure on the weight of offspring rats (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

## 2.2 Morris水迷宫实验结果

**2.2.1 定位航行实验** 与对照组比较：训练第2天，高氟组逃避潜伏期延长 ( $P<0.05$ )；第4天，中、高氟组的逃避潜伏期均延长 ( $P<0.001$ )。第2、3、4天子鼠逃避潜伏期与NaF的染毒浓度呈正相关，相关系数 $r$ 分别为0.443、0.519、0.840， $P$ 值均小于0.05。见表2。

**2.2.2 空间探索实验** 与对照组比较：高氟暴露组首次到达平台时间增加 ( $P<0.001$ )；中氟组、高氟组穿越平台次数均减少 ( $P<0.05$ )。子鼠首次到达平台时间与NaF染毒浓度分别呈正相关 ( $r=0.828$ ,  $P<0.001$ )，NaF染毒浓度与子鼠穿越平台次数呈负相关 ( $r=-0.599$ ,  $P<0.001$ )。如表2所示。

表2 持续氟暴露对一二代子鼠逃避潜伏期及空间探索影响 ( $n=8$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Effects of continuous fluoride exposure on the escape latency and space exploration of offspring rats ( $n=8$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

NaF 浓度 / (mg·L <sup>-1</sup> ) NaF concentration / (mg·L <sup>-1</sup> )	逃避潜伏期 (Escape latency) / d				首次达台时间 / s The time of first arriving platform / s	穿越平台次数 The number of passing platforms
	第1天 (Day 1)	第2天 (Day 2)	第3天 (Day 3)	第4天 (Day 4)		
0	52.82±4.14	45.33±5.25	26.01±6.56	11.25±3.29	8.24±1.82	4.13±1.25
60	52.27±2.68	47.84±4.31	30.42±2.71	14.42±1.90	8.82±1.03	3.13±0.84
120	52.84±3.96	45.93±5.17	33.93±4.29	16.94±1.42**	11.51±1.61	2.63±1.30*
240	53.19±4.63	52.88±3.48*	33.77±6.01	21.17±2.77**	15.32±2.22**	1.75±1.39*
<i>F</i>	0.08	4.43	4.21	23.23	27.99	5.36
<i>P</i>	0.973	<b>0.011</b>	<b>0.014</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.005</b>
<i>r</i> <sup>#</sup>	0.050	0.443	0.519	0.840	0.828	-0.599
<i>P</i>	0.784	<b>0.011</b>	<b>0.002</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>

[注] 与对照组比较，\*： $P<0.05$ ；\*\*： $P<0.001$ 。#：与NaF的相关性。

[Note] Compared with the control group, \*： $P<0.05$ ；\*\*： $P<0.001$ 。#：Correlation with NaF.

## 2.3 尿、脑及血清氟

与对照组比较，各染毒组子鼠的尿、脑、血清氟浓度均升高，差异有统计学意义 ( $P<0.001$ )；且各组子鼠尿、脑、血清氟水平均与NaF浓度呈正相关 ( $P<0.001$ )，相关系数 $r$ 分别为：0.948、0.996与0.914。见表3。

表3 持续氟暴露对子鼠尿、脑及血清氟的影响 ( $n=8$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

Table 3 Effects of continuous fluoride exposure on fluoride concentrations in urine, brain, and serum of offspring rats ( $n=8$ ,  $\bar{x}\pm s$ )

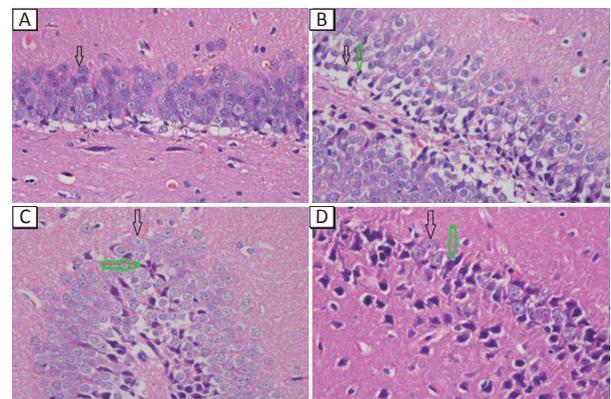
NaF 浓度 / (mg·L <sup>-1</sup> ) NaF concentration / (mg·L <sup>-1</sup> )	尿氟浓度 / (mg·L <sup>-1</sup> ) Urinary fluoride concentration / (mg·L <sup>-1</sup> )	脑氟水平 / (μg·g <sup>-1</sup> ) Brain fluoride concentration / (μg·g <sup>-1</sup> )	血清氟浓度 / (mg·L <sup>-1</sup> ) Serum fluoride concentration / (mg·L <sup>-1</sup> )
0	3.89±0.52	1.28±0.11	0.02±0.00
60	13.08±1.60**	8.20±0.68**	0.04±0.00**
120	14.49±1.17**	16.03±0.84**	0.06±0.01**
240	25.92±2.38**	25.39±0.62**	0.16±0.12**
<i>F</i>	265.02	2187.60	568.45
<i>P</i>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>
<i>r</i> <sup>#</sup>	0.948	0.996	0.914
<i>P</i>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>

[注] \*\*：与对照组比较， $P<0.001$ 。#：与NaF的相关性。

[Note] \*\*：Compared with the control group,  $P<0.001$ 。#：Correlation with NaF.

## 2.4 海马组织病理结果

如图2所示，对照组子鼠脑海马组织层次较为清晰，神经元大小均一，且紧密、均匀排列、细胞核形态规则，染色淡，核仁可见。低氟暴露组见少数海马神经元体积缩小，胞质红染，细胞核发生固缩，染色



[注] A：对照组；B：低氟组；C：中氟组；D：高氟组。黑色箭头：正常结构，绿色箭头：病理改变。对照组脑海马组织层次较为清晰，神经元大小均一，紧密、均匀排列、细胞核形态规则，染色淡，核仁可见。低氟暴露组见少数海马神经元体积缩小，胞质红染，细胞核发生固缩，染色变深，结构模糊，核仁消失；中、高氟组海马神经元出现与低氟组相似变化，细胞形态改变更明显。

[Note] A: Control; B: Low fluoride group; C: Middle fluoride group; D: High fluoride group. The black arrow indicates normal structure, and the green arrow indicates pathological changes. The brain hippocampus in the control group is clear, neurons are uniform in size, tightly and evenly arranged, nuclei are regular in shape and lightly stained, and nucleoli are visible. In the low-fluoride exposure group, a small number of hippocampal neurons are reduced in size, along with red staining of cytoplasm, pyknosis of nuclei, hyperchromasia, blurred structure, and disappearance of nucleoli. The medium and high fluoride groups show similar changes in hippocampal neurons to the low fluoride group, and the changes in cell morphology are more obvious.

图2 持续氟暴露子鼠海马组织HE染色结果 (x400)

Figure 2 Hematoxylin-eosin stained hippocampus of offspring rats after continuous fluoride exposure (x400)

变深, 结构模糊, 核仁消失, 病变神经元主要分布于海马1区 (hippocampus 1, CA1)、CA2。中、高氟组海马神经元出现与低氟组相似的变化, 但随染氟程度增加, 细胞形态改变更明显, 受累细胞数量增多, 可见于海马各分区。

### 2.5 miR-204及miR-34b-5P表达水平

与对照组比较, 中、高氟染毒组 miR-204 及各染毒组 miR-34b-5P 表达均升高 ( $P < 0.001$ )。二者相对表达量均与 NaF 的暴露浓度呈正相关 ( $r = 0.984$ ,  $r = 0.980$ , 均  $P < 0.001$ )。见表 4。

表 4 子鼠海马组织中 miR-204, miR-34b-5P 的表达量 ( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

Table 4 Expression levels of miR-204 and miR-34b-5P in the hippocampus of offspring rats ( $n = 8, \bar{x} \pm s$ )

NaF 浓度 / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) NaF concentration / ( $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )	miR-204	miR-34b-5P
0	1.00±0.10	1.00±0.07
60	1.43±0.27	1.79±0.02**
120	2.24±0.23**	2.31±0.12**
240	2.86±0.36**	3.61±0.05**
F	489.96	1482.27
P	<0.001	<0.001
r <sup>#</sup>	0.984	0.980
P	<0.001	<0.001

[注] \*\*: 与对照组比较,  $P < 0.001$ 。#: 与 NaF 的相关性。

[Note] \*\*: Compared with the control group,  $P < 0.001$ . #: Correlation with NaF.

### 3 讨论

体重增长是反映健康状况的一个重要指标。本研究中, 随 NaF 染毒浓度升高和染毒时间延长, 与对照组比较, 染毒组增长速度逐渐变缓, 提示氟暴露抑制了子鼠体重的增长。尿、血、脑氟水平是反映子鼠氟蓄积及评价氟接触的客观指标。本研究结果显示, 染毒组子鼠尿、血清及脑氟含量均高于对照, 且与 NaF 暴露量呈正相关, 提示氟进入体内后, 虽可经尿液排出, 仍可蓄积在血液和大脑中, 这与氟可穿透血脑屏障有关 [24]。

海马是大脑参与学习记忆的重要结构, 故空间记忆的形成依赖于海马结构的完整 [25]。本研究发现染毒组子鼠出现海马神经元数量减少、体积缩小, 细胞核固缩, 结构模糊, 核仁消失等病理改变, 提示氟蓄积于脑后, 可损害海马神经元结构。

Morris 水迷宫实验是常用于评价动物空间学习记忆能力的方法。测试内容主要包括定位航行试验和空间探索试验, 前者用于测量大鼠对水迷宫学习和记忆

的获取能力, 后者用于测量大鼠学会寻找平台后, 对平台空间位置记忆的保持能力。本研究发现, 与对照组比较: 训练第 4 天, 中、高氟组逃避潜伏期均延长; 高氟暴露组子鼠首次到达平台时间延长, 穿越平台次数明显减少, 提示持续过量氟暴露可损害子鼠的空间学习记忆能力。

miRNA 在脑组织中含量和种类均十分丰富。在脑发育、神经元分化、突触形成中发挥重要作用 [26-27]。阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 患者病变脑区可检测到 miRNA 异常表达 [28]。因此 miRNA 可作为早期标记物用于检测和评估认知功能障碍。miRNA 可直接调控细胞通路大多数基因的转录后表达 [29], 通常通过与 mRNA 的 3'-非翻译区域结合后对其进行降解, 阻断翻译和表达 [30-31]。已有部分实验证明氟化物暴露可以影响脑组织中 miRNA 正常表达。Daiwile 等 [32] 研究发现, 亚致死浓度 (8、20  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的 NaF 可诱导非编码 RNA 表达谱的改变。此外, 当大鼠暴露氟化物全氟辛酸磺酸盐后, 其脑组织中多个与突触传递相关的 miRNA 出现明显差异表达 [33]。本课题组前期高通量测序研究也发现: 亲代孕哺期至子代成年前氟暴露致子鼠海马中 miR-34b-5P 等多个 miRNA 异常表达, miRNA 可能参与氟暴露致子鼠学习记忆损伤 [16]。miR-204 与 miR-34b-5P 失调参与包括 AD 在内的多种神经退行性疾病的发生 [34]。miR-204 高表达能降低海马神经元中突触可塑性相关因子 N-甲基-D-天冬氨酸受体数量; 降低 TrkB 表达 [35]。在脊髓神经系统损伤致学习记忆损伤研究中发现 miR-34b-5P 的上调可抑制环磷酸腺苷反应元件结合蛋白的表达 [36]; 在 AD 小鼠模型中, 抑制 miR-34 后, 参与突触囊泡融合并释放神经递质的蛋白质——突触小泡膜蛋白 2 水平恢复, 记忆缺陷减弱, 进一步说明 miR-34 在维持学习记忆功能方面的作用 [37], 此外, miR-34b-5P 可通过介导 Bcl-2 蛋白表达促进海马星形胶质细胞凋亡 [19]。而神经细胞数量和功能的正常是维持突触可塑性的基本保障。本研究结果: 孕哺期至成年前持续氟暴露可致子鼠海马中 miR-204、miR-34b-5P 高表达, 结合 Morris 水迷宫实验结果推测: miR-204、miR-34b-5P 的高表达可能直接或间接影响子鼠空间学习记忆能力, 具体机制值得进一步探讨。

综上所述, 慢性持续氟暴露可以损害子鼠的空间学习记忆能力; 子鼠海马中 miR-204、miR-34b-5P 的表达升高可能是空间学习记忆能力降低的机制之一。

## 参考文献

- [1] 赵丽军, 裴俊瑞, 张微, 等. 中国 2013 年度饮水型地方性氟中毒监测 [J]. 中华流行病学杂志, 2016, 37 (6) : 816-820.
- [2] 张碧云, 祝淑珍, 周素华, 等. 鄂西山区燃煤污染型氟中毒重点病区防治效果 [J]. 公共卫生与预防医学, 2018, 29 (3) : 62-64.
- [3] RAZDAN P, PATTHI B, KUMAR JK, et al. Effect of fluoride concentration in drinking water on intelligence quotient of 12-14-year-old children in Mathura district : a cross-sectional study [J]. J Int Soc Prev Community Dent, 2017, 7 (5) : 252-258.
- [4] 孙天水, 席淑华. 高氟对中枢神经系统损伤机制的研究进展 [J]. 环境与健康杂志, 2016, 33 (4) : 368-371.
- [5] 吴秋云, 许爱芹, 杨向东, 等. 钙拮抗氟对大鼠睾丸组织的氧化损伤作用 [J]. 环境与职业医学, 2014, 31 (1) : 52-54.
- [6] 周进, 王飞清, 刘咏梅, 等. 低蛋白条件下燃煤型氟中毒对雌鼠生殖功能的影响 [J]. 现代预防医学, 2019, 46 (12) : 2139-2143.
- [7] 陈一庆, 熊传龙, 余波, 等. 饮水氟超标临界地区儿童氟斑牙与膳食营养因素关系的研究 [J]. 环境与健康杂志, 2018, 35 (1) : 51-53.
- [8] 金庭旭, 王忠宏, 韦艳, 等. 燃煤型氟中毒病区 8~12 岁儿童智力水平调查 [J]. 环境与健康杂志, 2017, 34 (3) : 229-231.
- [9] ZHENG X, SUN Y, KE L, et al. Molecular mechanism of brain impairment caused by drinking-acquired fluorosis and selenium intervention [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2016, 43 : 134-139.
- [10] 魏娜, 董阳婷, 王娅, 等. 慢性氟中毒对大鼠仔代神经系统发育的影响及维生素 E 的拮抗作用 [J]. 中华地方病学杂志, 2014, 33 (2) : 125-128.
- [11] 崔玉山, 钟琦, 李文凤, 等. 氟暴露对子代大鼠甲状腺激素水平改变及智力损伤的影响 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2017, 35 (12) : 888-892.
- [12] SMITH KN, STARMER J, MILLER SC, et al. Long noncoding RNA Moderates MicroRNA activity to maintain self-renewal in embryonic stem cells [J]. Stem Cell Rep, 2017, 9 (1) : 108-121.
- [13] SAAB BJ, MANSUY IM. Neuroepigenetics of memory formation and impairment : the role of microRNAs [J]. Neuropharmacology, 2014, 80 : 61-69.
- [14] 李欢, 张红梅. MicroRNA 在中枢神经系统中的作用 [J]. 毒理学杂志, 2019, 33 (4) : 335-339.
- [15] WANG J, ZHANG Y, GUO Z, et al. Effects of perinatal fluoride exposure on the expressions of miR-124 and miR-132 in hippocampus of mouse pups [J]. Chemosphere, 2018, 197 : 117-122.
- [16] GE QD, XIE C, ZHANG H, et al. Differential expression of miRNAs in the hippocampi of offspring rats exposed to fluorine combined with aluminum during the embryonic stage and into adulthood [J]. Biol Trace Elem Res, 2019, 189 (2) : 463-477.
- [17] GE QD, TAN Y, LUO Y, et al. MiR-132, miR-204 and BDNF-TrkB signaling pathway may be involved in spatial learning and memory impairment of the offspring rats caused by fluorine and aluminum exposure during the embryonic stage and into adulthood [J]. Environ Toxicol Pharmacol, 2018, 63 : 60-68.
- [18] LIU L, LIU L, SHI J, et al. MicroRNA-34b mediates hippocampal astrocyte apoptosis in a rat model of recurrent seizures [J]. BMC Neurosci, 2016, 17 (1) : 56.
- [19] 桂传枝, 冉龙艳, 官志忠. 燃煤污染型氟中毒大鼠脑组织 NOS 活性及 NO 含量改变 [J]. 中国公共卫生, 2017, 33 (1) : 107-109.
- [20] 葛启迪, 张华, 谢春, 等. 孕哺期至成年前铝暴露对子鼠空间学习记忆能力和海马 miR-132 转录的影响 [J]. 环境与职业医学, 2018, 35 (08) : 761-766.
- [21] 罗雨, 谢春, 张华, 等. 慢性氟染毒对子二代大鼠海马结构和空间学习记忆的影响 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (8) : 767-772.
- [22] 王杰, 陆丹, 郑泽爱, 等. 氯化钠的毒性研究 [J]. 卫生研究, 1995, 24 (S1) : 39.
- [23] ZIELHUIS RL, 丁俊清. 安全系数在制订职业性接触容许浓度时的应用问题 [J]. 国外医学 (卫生学分册), 1982 (3) : 134-137.
- [24] 谢春, 杨小雪, 吴宇, 等. 氟铝联合暴露对仔鼠空间学习记忆及氨基酸类神经递质的影响 [J]. 环境卫生学杂志, 2015, 5 (4) : 321-327.
- [25] GOSCHORSKA M, BARANOWSKA-BOSIACKA I, GUTOWSKA I, et al. Potential role of fluoride in the Etiopathogenesis of Alzheimer's disease [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19 (12) : 3965.

- [26] 武海霞, 吴志刚, 刘红彬, 等. Morris水迷宫实验在空间学习记忆研究中的应用 [J]. 神经药理学报, 2014, 4 (5) : 30-35.
- [27] WEI CW, LUO T, ZOU SS, et al. Research progress on the roles of microRNAs in governing synaptic plasticity, learning and memory [J]. Life Sci, 2017, 188 : 118-122.
- [28] GIORGI SILVEIRA R, PERELLÓ FERRÚA C, DO AMARAL CC, et al. MicroRNAs expressed in neuronal differentiation and their associated pathways : systematic review and bioinformatics analysis [J]. Brain Res Bull, 2020, 157 : 140-148.
- [29] HUANG J, ZHAO L, XING L, et al. MicroRNA-204 regulates Runx2 protein expression and mesenchymal progenitor cell differentiation [J]. Stem Cells, 2010, 28 (2) : 357-64.
- [30] LIM LP, LAU NC, GARRETT-ENGELE P, et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs [J]. Nature, 2005, 433 (7027) : 769-773.
- [31] ZHANG Y, WANG Z, GEMEINHART RA. Progress in microRNA delivery [J]. J Control Release, 2013, 172 (3) : 962-974.
- [32] DAIWILE AP, SIVANESAN S, IZZOTTI A, et al. Noncoding RNAs : possible players in the development of fluorosis [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015 : 274852.
- [33] 王法琦, 刘薇, 金一和, 等. 胚胎期及哺乳期全氟辛烷磺酸盐 (PFOS) 暴露对大鼠长时程突触可塑性影响的 miRNA 组学研究 [J]. 生态毒理学报, 2012, 7 (5) : 491-500.
- [34] MOHAMMED CP, RHEE H, PHEE BK, et al. miR-204 downregulates EphB2 in aging mouse hippocampal neurons [J]. Aging Cell, 2016, 15 (2) : 380-388.
- [35] XIANG L, REN Y, LI X, et al. MicroRNA-204 suppresses epileptiform discharges through regulating TrkB-ERK1/2-CREB signaling in cultured hippocampal neurons [J]. Brain Res, 2016, 1639 : 99-107.
- [36] 郑晖, 杨柳英, 张娟, 等. 神经病理性疼痛大鼠脊髓背角 Sirt1 与 miR-34b 表达的变化 [J]. 浙江医学, 2017, 39 (3) : 152-155.
- [37] HU S, WANG H, CHEN K, et al. MicroRNA-34c Downregulation ameliorates amyloid- $\beta$ -induced synaptic failure and memory deficits by targeting VAMP2 [J]. J Alzheimers Dis, 2015, 48 (3) : 673-686.

(英文编辑 : 汪源 ; 责任编辑 : 王晓宇)

· 告知栏 ·

## 《环境与职业医学》入选 2019—2020 年度 CSCD 核心库

2019 年 4 月 29 日, 中国科学院文献情报中心公布了 2019—2020 年度中国科学引文数据库 (Chinese Science Citation Database, CSCD) 1230 种来源期刊名单。CSCD 来源期刊分为核心库和扩展库两部分, 其中核心库 908 种, 扩展库 322 种, 《环境与职业医学》被 CSCD 核心库持续收录!

《环境与职业医学》2015 年首次成为 CSCD (扩展库) 来源期刊, 2017 年进入核心库。近年编辑部在布局数字化业务、拓展传播途径、提升编辑素养、稳定出版质量等方面持续付出不懈努力, 陆续发表了《尘肺病治疗中国专家共识 (2018 年版)》, “PM<sub>2.5</sub> 污染及其健康影响”“环境内分泌干扰物的健康影响”等一系列热点文章和专栏, 建立了布局完善、功能强大的网站及微信公众号, 并于 2019 年度全新改版杂志, 全方位紧跟数字化出版趋势, 实现 CSCD、北大核心、科技核心全部持续收录。

杂志的点滴进步都离不开各位编委、审稿专家、作者和读者的支持和关注, 特此志谢! 衷心希望广大读者和作者一如既往支持本刊工作, 踊跃投稿!