

## 慢性氟中毒大鼠学习记忆损害与 AKT 激酶表达\*

苏艳丽<sup>1</sup>, 刘明海<sup>2</sup>, 吴昌学<sup>3</sup>, 官志忠<sup>3,4</sup>, 刘艳洁<sup>4\*\*</sup>

(1. 贵阳护理职业学院 检验系, 贵州 贵阳 550081; 2. 贵阳花溪区人民医院 神经科, 贵州 贵阳 550025; 3. 贵阳医学院 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵阳医学院 病理学教研室, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 观察实验性慢性氟中毒大鼠脑组织中 AKT 激酶(AKT)表达及其学习记忆能力损害,探讨氟中毒大鼠脑组织中 AKT 蛋白表达水平与其学习记忆能力降低的关系。方法: SD 大鼠 72 只,随机分为对照组、低剂量染氟组、高剂量染氟组,每组 24 只,雌雄各半,实验期 6 个月;观察氟中毒表现, Morris 水迷宫检测实验大鼠学习记忆能力;分别用蛋白印迹(Western-blot)和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测大鼠脑组织中 AKT 蛋白与 AKT mRNA 的表达。结果: 经 6 个月饲养,低剂量及高剂量染氟组大鼠出现不同程度慢性氟中毒表现; Morris 水迷宫实验中定向航行实验结果显示,高剂量染氟大鼠找台时间较对照组延长,空间探索实验显示氟中毒大鼠平台区停留时间较对照组减少( $P < 0.05$ );与正常对照组相比,高剂量及低剂量染氟组大鼠脑组织中 AKT 蛋白表达量增加( $P < 0.05$ ),但脑组织中 AKT mRNA 表达水平与对照组相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论: 慢性氟中毒可导致大鼠学习记忆能力的降低,其机制可能与大鼠脑组织中 AKT 蛋白表达量增加有关。

**[关键词]** 氟化物中毒; AKT 激酶; 脑; 迷宫学习; 记忆; 大鼠, Sprague-Dawley

**[中图分类号]** R599.9; R34-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2014)03-0294-04

### Learning and Memory Impairment of Experimental Rats with Chronic Fluorosis and Expression of AKT Kinase in Rat Brains

SU Yanli<sup>1</sup>, LIU Minghai<sup>2</sup>, WU Changxue<sup>3</sup>, GUAN Zhizhong<sup>3,4</sup>, LIU Yanjie<sup>4</sup>

(1. Department of Laboratory Science, Guiyang Nursing Vocational College, Guiyang 550081, Guizhou, China; 2. Department of Neurology, People's Hospital of Huaxi District, Guiyang 550025, Guizhou, China; 3. Key Laboratory of Medical Molecular Biology of Guizhou Province, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. Teaching Division of Pathology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the impairment of learning and memory of experimental rats with chronic fluorosis and expression of AKT kinase in rats' brain tissues, to explore the correlation between protein expression level of AKT kinase and reduced learning capacity. **Methods:** The 72 SD rats were grouped into three, 24 each, with equal distribution of genders, fed with different concentrations of fluoride (NaF) for six months to establish rat models with fluorosis. The spatial learning and memorizing ability were tested by Morris water maze test; the protein levels of AKT and expression AKT mRNA were detected by Western-blotting and by RT-PCR respectively. **Results:** The reduced spatial learning and memory were detected in rats with chronic fluorosis in different levels; the group treated with high concentrations of fluoride require more time to find destination in Morris water maze test group, and stayed less time on platform zone in space exploration test as compared to control group ( $P < 0.05$ ); increases in the expression of the protein levels of AKT were observed from both groups; comparison between expression level of AKT mRNA and control group are without statistical significance ( $P > 0.05$ ). **Conclusions:** There is correlation between increased expression of AKT kinase

\*[基金项目] 国家自然科学基金(81260417); 科技部国际合作重大项目(2013BA105B03); 贵州省科技厅贵阳医学院联合基金[黔科合 LG(2012)006 号]

\*\* 通信作者 E-mail: 553013022@qq.com

网络出版时间: 2014-06-22 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/52.5012.R.20140622.2359.003.html>

and damage of learning and memory in rat brain with experimental chronic fluorosis.  
[ **Key words** ] fluoride poisoning; AKT kinase; brain; maze learnings; memory; rats, Sprague-Dawley

氟离子可以通过血脑屏障在脑组织中蓄积并造成中枢神经系统损害,临床上已经发现慢性氟中毒病人表现有记忆力减退等中枢神经系统功能障碍症状;在地方性氟中毒病区流行病学调查中发现,儿童智力降低与体内氟含量有关,氟中毒对大脑的学习记忆功能有明显的影响<sup>[1]</sup>。PI3K/AKT 信号通路参与细胞增殖、分化、凋亡和葡萄糖转运等多种细胞功能的调节,能通过多种方式发挥抑制细胞凋亡作用,从而使该通路的激活成为维持细胞存活的重要条件<sup>[2-3]</sup>。本课题组以往研究发现,随着大鼠染氟时间延长,大鼠脑组织中细胞凋亡率增加,同时大鼠学习记忆能力也出现受损表现<sup>[4]</sup>。为进一步探究慢性氟中毒对所致学习记忆能力损害与凋亡及相关信号通路改变是否存在关系,本研究检测染氟大鼠学习记忆改变及 PI3K/AKT 信号通路激酶的表达,以探讨慢性氟中毒致脑功能损害发生机制。

1 材料与方法

**1.1 仪器和试剂** Morris 水迷宫实验设备(中科院药物研究所),Bio-rad 电泳及转印系统,兔抗 AKT、phospho-AKT 抗体及抗兔 IgG(美国 Cell Signal 公司),ECL-plus 发光试剂(瑞典 Amersham 公司),AKT mRNA 引物(美国 Genery 公司),总 RNA 提取试剂盒及 c-DNA 合成试剂盒(美国 Promega 公司)。  
**1.2 实验大鼠分组及处理** SD(Sprague-Dawley)大鼠 72 只(贵阳医学院动物实验中心提供),体重 100~120 g,随机分为对照组、低剂量染氟组、高剂量染氟组,每组 24 只,雌雄各半,饲以标准营养动物饲料(实验中心配制,含氟量低于 0.6 mg/kg),自由饮自来水(含氟量低于 0.5 mg/L)。对照组大鼠常规饲养,低剂量染氟组在常规饲养基础上,自来水中加入氟(NaF)5 mg/L;高剂量染氟组在常规饲养基础上,自来水中加入氟(NaF)50 mg/L;6 个月后,Morris 水迷宫检测实验大鼠学习记忆能力;水迷宫实验结束后处死大鼠,取大鼠脑组织分别用蛋白印迹(Western-blot)和逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测大鼠脑组织中 AKT 蛋白与 AKT mRNA 的表达。

**1.3 氟中毒大鼠模型鉴定** 观察大鼠体重、毛色、氟斑牙程度,确定造模是否成功。氟斑牙分级标准为 I 度,黄白相间,白垩型条纹清晰;II 度,牙齿表面呈无光泽的粉笔样白色斑点货斑块;III 度,牙齿表面出现小沟,裂纹或部分脱落,牙齿呈锯齿状或者严重缺损。  
**1.4 大鼠学习记忆能力** 采用 Morris 水迷宫系统自动采集和处理定向航行实验及空间探索实验图像及数据。定向航行实验持续 6 d,观察大鼠从不同象限入水到登上平台时间(逃避潜伏期)及航行轨迹等;第 7 天进行空间探索实验,记录大鼠第 1 次到达平台所在位置所用时间。根据水迷宫实验结果对大鼠的学习记忆能力进行评价。  
**1.5 AKT 蛋白表达** Western-blot 方法检测 phospho-AKT 与总 AKT 蛋白水平。将 100 mg 脑组织加入含蛋白酶抑制剂的蛋白提取液制备组织匀浆,4℃下 14 000 g 离心 40 min,取一定匀浆液测定蛋白含量;10%聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,再用转膜装置将胶上的蛋白转到 PVDF 膜上。先分别用 AKT 抗体(1:1 000)和 phospho-AKT 抗体(1:500)与转蛋白膜孵育 4℃过夜,再与辣根过氧化物酶联结的抗兔 IgG 室温孵育 2 h。将膜与 ECL-plus 试剂反应 5 min,用显影胶片曝光,冲洗胶片后用图像分析仪处理,以对照组样本为百分之百计算,用抗 β-肌动蛋白抗体与同一张膜反应,结果作为内参照物。  
**1.6 AKT mRNA 表达** 按照总 RNA 提取试剂盒说明书提取细胞 RNA,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法测定 mRNA 水平。用 AKT mRNA 印迹信号与 β-肌动蛋白(β-actin)的印迹信号做比较,AKT mRNA 表达引物序列见表 1。

表 1 AKT 基因引物序列  
Tab. 1 Primer sequences of AKT gene

基因	引物序列(5'→3')	片段长度(bp)
AKT	上游-TCTACGGTCCGAGATTGTGTC	115
	下游-ATGTGCCCCGTCTTGTCCTCA	
β-actin	上游-GCCATCCTGCGTCTGACCTG	590
	下游-CATTGCGGTGCA CGATGGAG	

**1.7 统计学处理** 数据以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 15.0 统计软件分析,多组间比较,定向航行实验采用重复测量方差分析,其余采用单因

素方差分析,组间两两比较时,对于方差齐的情况采用 LSD 法,方差不齐的情况采用 Tamhane 法,相关性分析 spearman 法, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠氟中毒表现 染氟组大鼠均有不同程度氟斑牙形成,且 3 组大鼠两两比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),染氟组大鼠体重降低,毛色灰暗,表明大鼠发生慢性氟中毒,见表 2。

表 2 3 组大鼠氟斑牙发生情况  
Tab. 2 The occurrence of dental fluorosis in the three groups

分组	n	氟斑牙(n)		
		I 度	II 度	III 度
对照组	24	0	0	0
低剂量	24	6	18	0
高剂量	24	0	12	12

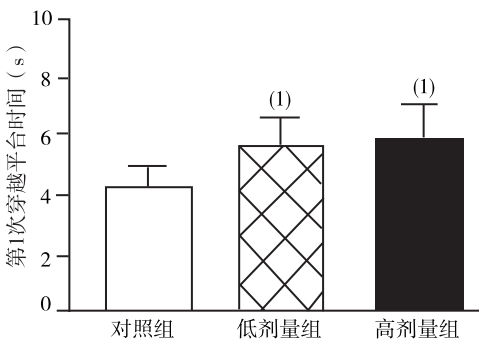
2.2 大鼠学习记忆能力 定向航行实验:低剂量染氟组、高剂量染氟组大鼠平均逃避潜伏期长于对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),高剂量染氟组大鼠平均逃避潜伏期长于低剂量染氟组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明模型大鼠定向航行能力降低,高剂量染氟组降低最为明显,见表 3。空间探索实验发现,染氟组大鼠穿越平台时间长于照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 1。

2.3 大鼠脑组织 phospho-AKT、总 AKT 蛋白及 AKT mRNA 表达 染氟组大鼠脑组织 phospho-AKT 蛋白表达量均较正常对照组增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),而低剂量染氟组和高剂量染氟组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ );染氟组大鼠脑组织总 AKT 蛋白表达量与对照组比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 2。对照组、染氟组大鼠脑组织中 AKT mRNA 表达水平各组间比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),见图 3。

表 3 3 组大鼠定向航行实验逃避潜伏期比较( $\bar{x} \pm s$ )  
Tab. 3 Comparison of escape latency of rats among the three groups in navigation test

分组	逃避潜伏期(s)					
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天	第 6 天
对照组	53.8 ± 14.2	39.3 ± 6.9	19.1 ± 9.1	8.9 ± 6.0	8.3 ± 3.4	4.8 ± 2.7
低剂量组	59.9 ± 0.16 <sup>(1)</sup>	46.0 ± 8.0 <sup>(1)</sup>	24.0 ± 2.7 <sup>(1)</sup>	13.8 ± 5.7 <sup>(1)</sup>	8.9 ± 5.3 <sup>(1)</sup>	7.4 ± 4.1 <sup>(1)</sup>
高剂量组	60 ± 17.4 <sup>(1)</sup>	36.9 ± 16.8 <sup>(2)(3)</sup>	37.7 ± 12.9 <sup>(2)(3)</sup>	16.5 ± 7.8 <sup>(2)(3)</sup>	19.7 ± 7.6 <sup>(2)(3)</sup>	12.2 ± 5.7 <sup>(2)(3)</sup>

与对照组比较,<sup>(1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>(2)</sup> $P < 0.01$ ;<sup>(3)</sup>与低剂量染氟组相比, $P < 0.05$



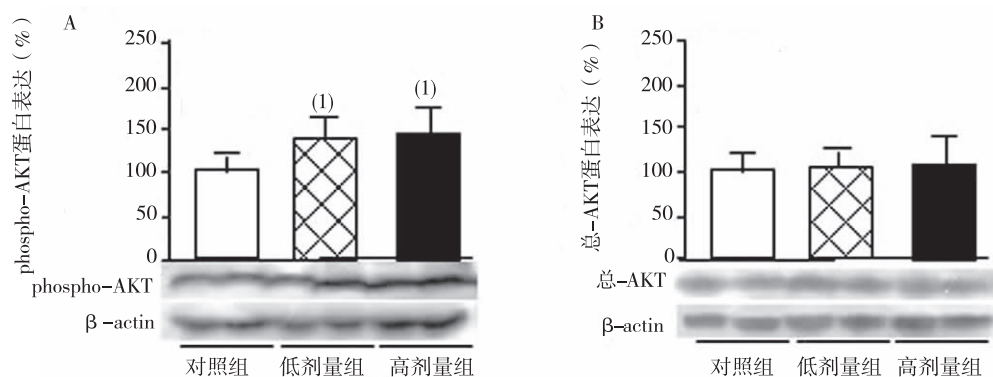
<sup>(1)</sup>与对照组比较, $P < 0.05$

图 1 3 组大鼠空间探索实验第 1 次穿越平台时间  
Fig. 1 The first time passing through platform time of rats in the three groups in spatial probe test

2.4 大鼠脑组织 phospho-AKT 表达与空间探索实验相关性分析 大鼠脑组织中 phospho-AKT 与空间探索实验第 1 次到达平台时间呈显著正相关( $r = 0.47, P < 0.05$ )。

3 讨论

脑是慢性氟中毒时重要的靶器官,长期摄入过多的氟会引起中枢神经系统的损伤。学习记忆是脑的高级神经活动,神经突触是神经信号传递的关键结构,易受年龄、药物、环境等因素影响<sup>[5]</sup>。Bhatnagar 等<sup>[6]</sup>报道,饮用不同剂量氟化钠溶液的小鼠学习能力降低,染毒剂量越大,小鼠学习能力越差。本研究发现,低剂量染氟组和高剂量染氟组大鼠平均逃避潜伏期长于对照组( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ),高剂量染氟组大鼠平均逃避潜伏期长于低剂量染氟组( $P < 0.05$ ),表明氟中毒大鼠学习能力降低,氟中毒程度越重,学习能力降低越明显;且两染氟组大鼠第 1 次穿越平台时间长于对照组,亦表明氟中毒大鼠不仅有学习能力降低,而且还有记忆能力的减退,与高勤等<sup>[7-8]</sup>研究结果相同。



(<sup>1</sup>) 与对照组比较,  $P < 0.05$

图2 3组大鼠脑组织 AKT 蛋白表达

Fig. 2 The expression of AKT protein in brain tissues of rats in the three groups

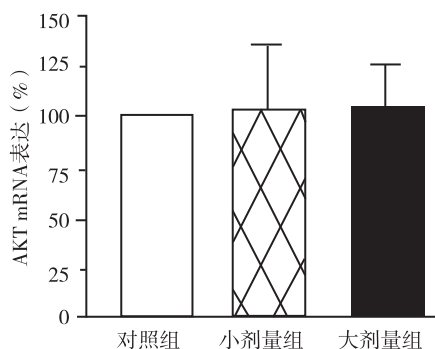


图3 3组大鼠脑组织 AKT mRNA 表达

Fig. 3 The expression of AKT mRNA in brain tissues of rats in the three groups

细胞凋亡与学习记忆有紧密联系,在胆红素脑病和慢性乙醇中毒大鼠脑中海马区神经细胞凋亡蛋白 Caspase-3 表达升高,同时行为学实验也显示大鼠学习记忆能力降低<sup>[9]</sup>。外界各种刺激可通过细胞间及细胞内信息的传递来实现对细胞功能的调节,通过对这些信号分子的检测可以探索刺激对细胞影响的途径<sup>[10]</sup>。PI3K/AKT 信号通路是细胞正常生长和分化所必需的通路,可通过参与凋亡级联反应和调节凋亡基因和抗凋亡基因的转录来抑制细胞凋亡,从而避免损害因素损伤细胞,抑制神经细胞凋亡,保护神经,避免发生损伤<sup>[11-13]</sup>。在老年大鼠海马细胞中神经元凋亡不同伴有 PI3K/AKT 通路表达差异<sup>[14]</sup>。本研究发现,在实验 6 个月染氟大鼠脑组织中 phospho-AKT 蛋白表达水平随染氟浓度升高而增高,转录水平未发现明显改变。对空间探索实验穿越平台时间和 phospho-AKT 蛋白表达灰度值进行相关分析,结果显示 2 者呈正相关( $r = 0.47, P < 0.05$ ),提示氟中毒大鼠

随记忆能力损害的加重,phospho-AKT 蛋白表达升高越明显。这可能与 PI3K/AKT 通路对抗氟损害、延缓、抑制细胞凋亡有关<sup>[14]</sup>。PI3K/AKT 通路在染氟机体神经系统中怎样发挥作用,还有待进一步研究。

## 4 参考文献

- [1] Li XS, Zhi JL, Gao RO. Effect of fluoride exposure on intelligence in children[J]. Fluoride, 1995 (4): 189 - 192.
- [2] Merlot S, Firtel RA. Leading the way: Directional sensing through phosphatidylinositol 3-kinase and other signaling pathways[J]. Cell Sci, 2003 (17): 3471 - 3478.
- [3] Song G, Ouyang, GL, Bao SD. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival[J]. Cell Mol Med, 2005 (1): 59 - 71.
- [4] Liu YJ, Guan ZZ, Gao Q, et al. Increased level of apoptosis in rat brains and SH-SY5Y cells exposed to excessive fluoride-A mechanism connected with activating JNK phosphorylation[J]. Toxicol Lett, 2011 (2-3): 183 - 189.
- [5] 桂传枝, 冉龙艳, 官志忠. 燃煤型氟中毒脑组织神经型尼古丁受体 mRNA 及蛋白表达水平改变[J]. 中国地方病学杂志, 2011 (3): 239 - 242.
- [6] Bhatnagar M, Rao P, Sushma J, et al. Neurotoxicity of fluoride: neurodegeneration in hippocampus of female mice [J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2002 (5): 546 - 554.
- [7] 高勤, 刘艳洁, 吴昌学, 等. 氟对大鼠胆碱酯酶活性和学习记忆功能的影响[J]. 中国地方病学杂志, 2008 (2): 128 - 130.

(下转第 301 页)

the town of Dimitrovgrad ( Bulgaria ) [ J ]. Folia Med ( Plovdiv ) , 2007 ( 1 - 2 ) : 25 - 31.

[ 2 ] Pyagay P, Heroult M, Wang Q, et al. Collagen triple helix repeat containing 1, a novel secreted protein in injured and diseased arteries, inhibits collagen expression and promotes cell migration[ J ]. Circ Res , 2005 ( 2 ) : 261 - 268.

[ 3 ] Kimura H, Kwan KM, Zhang Z, et al. CTHRC1 is a positive regulator of osteoblastic bone formation [ J ]. PLoS ONE , 2008 ( 9 ) : e3174.

[ 4 ] Zipkin I, Mcglure FJ, Leone NC, et al. Fluoride deposition in human bones after prolonged ingestion of fluoride in drinking water[ J ]. Public Health Rep , 1958 ( 8 ) : 732 - 740.

[ 5 ] Durmus T, LeClair RJ, Park KS, et al. Expression analysis of the novel gene collagen triple helix repeat containing-1 ( Cthrc1 ) [ J ]. Gene Expr Patterns , 2006 ( 8 ) : 935 - 940.

[ 6 ] LeClair RJ, Durmus T, Wang Q, et al. Cthrc1 is a novel inhibitor of transforming growth factor- $\beta$  signaling and neointimal lesion formation [ J ]. Circ Res , 2007 ( 100 ) : 826 - 833.

[ 7 ] Durmus T, LeClair RJ, Park KS, et al. Expression analysis of the novel gene collagen triple helix repeat containing-1 ( Cthrc1 ) [ J ]. Gene Expr Patterns , 2006 ( 6 ) : 935 - 940.

( 2014-02-01 收稿, 2014-03-10 修回 )  
中文编辑: 刘 平; 英文编辑: 周 凌

( 上接第 293 页 )

表 3 各组大鼠海马 CA3、CA4 区神经元  
平均灰度值测定

Tab.3 The mean gray values of neurons of hippocampal  
CA3 areas of rats in different groups

组别	n	CA3 区	CA4 区
对照组	12	70.06 $\pm$ 7.77	73.55 $\pm$ 5.94
染氟组	12	14.11 $\pm$ 4.72 <sup>(1)</sup>	13.80 $\pm$ 4.60 <sup>(1)</sup>
染氟 - VE 拮抗组	12	37.56 $\pm$ 8.68 <sup>(1)(2)</sup>	44.54 $\pm$ 8.52 <sup>(1)(2)</sup>

<sup>(1)</sup> 与对照组比较,  $P < 0.01$ ; <sup>(2)</sup> 与染氟组比较,  $P < 0.01$

[ 4 ] 邵千里, 王亚南, 李良文, 等. 慢性氟中毒患者认知功能缺损的初步研究 [ J ]. 中国地方病学杂志 , 2003 ( 4 ) : 336 - 338.

[ 5 ] Calvert GM, Mueller CA, Fajen JM, et al. Health effect-associated with sulfur fluoride and methyl bromide exposure among structural fumigation workers [ J ]. Am J Public Health , 1998 ( 12 ) : 1774 - 1780.

[ 6 ] 李术, 徐世文, 康世良. 氟对软组织的毒性 [ J ]. 黑龙江畜牧兽医 , 2002 ( 10 ) : 24 - 25.

[ 7 ] 孙增荣, 刘凤贞, 杨海贤, 等. 饮高氟水小鼠脑海马回组织超微结构观察 [ J ]. 中国地方病学杂志 , 2000 ( 5 ) : 333 - 334.

[ 8 ] 吕晓红, 李广生, 吕晓丽. 大鼠慢性氟中毒神经细胞病理改变的研究 [ J ]. 中国地方病学杂志 , 2001 ( 6 ) : 424 - 425.

[ 9 ] 郭以河, 赵梅兰, 彭瑞云, 等. 尼氏小体染色方法的改进及其在神经病理学研究中的应用 [ J ]. 实用医技杂志 , 2003 ( 6 ) : 605 - 606.

( 2014-02-08 收稿, 2014-03-09 修回 )  
中文编辑: 吴昌学; 英文编辑: 周 凌

( 上接第 297 页 )

[ 8 ] 魏娜, 官志忠. 慢性氟中毒对神经系统发育的影响 [ J ]. 中华地方病学杂志 , 2013 ( 3 ) : 347 - 350.

[ 9 ] 杨光英, 孔祥英, 吴晓翠. 胆红素脑病与神经细胞凋亡 [ J ]. 医学综述 , 2004 ( 3 ) : 1012 - 1015.

[ 10 ] Cheng S, Niv MY. Molecular dynamics simulations and elastic network analysis of protein kinase B ( Akt/PKB ) inactivation [ J ]. Chem Inf Model , 2010 ( 9 ) : 1602 - 1610.

[ 11 ] 李凡, 张中乐, 马书玲, 等. 慢性乙醇中毒大鼠神经细胞凋亡和学习记忆能力下降的关系 [ J ]. 中国病理生理杂志 , 2008 ( 7 ) : 1441 - 1444.

[ 12 ] 王暖, 耿德勤, 黄红莉, 等. 老年大鼠海马细胞凋亡和神经元信号转导通路的变化与学习记忆的关系 [ J ]. 中华老年医学杂志 , 2013 ( 7 ) : 1573 - 1575.

[ 13 ] Franke TF, Hornik CP, Segev L, et al. Sugimoto C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters [ J ]. Oncogene , 2003 ( 56 ) : 8983 - 8998.

[ 14 ] Brunet A, Datta SR, Greenberg ME. Transcription-dependent and-independent control of neuronal survival by the PI3K-Akt signaling pathway [ J ]. Curr Opin Neurobiol , 2001 ( 3 ) : 297 - 305.

( 2014-03-31 收稿, 2014-04-17 修回 )  
中文编辑: 文箫颖; 英文编辑: 赵 毅