

燃煤型氟中毒大鼠学习能力及脑组织 B-raf 活化的变化*

冉龙艳¹, 桂传枝², 吴昌学^{3,4}, 何江⁵, 黄昕¹, 官志忠^{3,4**}

(1. 贵州电力职工医院 病理科, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵州省肿瘤医院 病理科 贵州 贵阳 550004; 3. 贵州医科大学 贵州省医学分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州医科大学 地方病与少数民族性疾病教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 5. 贵州医科大学 公共卫生学院, 贵州 贵阳 550004;)

[摘要] 目的: 研究燃煤型氟中毒大鼠学习记忆能力的变化以及氟中毒与 B-raf 活性等关系。方法: 制作氟中毒大鼠模型, 以氟斑牙的发生以及脑组织中氟离子浓度评价造模情况, Morris 水迷宫空间探索实验检测大鼠学习能力, Western Blot 方法检测大鼠脑组织匀浆中 B-raf 蛋白表达, Realtime PCR 法检测大鼠脑组织 B-raf 活化情况。结果: 氟中毒大鼠造模成功, 染氟组大鼠逃避潜伏时间均比对照组长, 且与染氟剂量相关, 提示燃煤型氟中毒大鼠学习能力降低; 染氟组大鼠脑组织磷酸化 B-raf 蛋白和 B-raf mRNA 水平均高于对照组 ($P < 0.05$), 与染氟剂量正相关 ($r = 0.993, 0.996$), 提示染氟组大鼠脑组织 B-raf 信号通路活化。结论: 燃煤染氟饲料可引起慢性氟中毒大鼠学习能力减退, 其机制可能与氟中毒大鼠脑组织 B-raf 信号转导通路的激活, B-raf mRNA 表达水平及该蛋白激活磷酸化水平升高有关。

[关键词] 神经系统; 氟中毒; 牙; 学习

[中图分类号] R361.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2017)04-0400-04

DOI: 10.19367/j.cnki.1000-2707.2017.04.006

Changes of Learning Ability and B-raf Activation in Brain Tissue of Rats with Fluorosis Caused by Coal Burning

RAN Longyan¹, GUI Chuanzhi², WU Changxue^{3,4}, HE Jiang⁵, HUANG xin¹, GUAN Zhizhong^{3,4}

(1. Department of Pathology, Guizhou Power Staff Hospital, Guiyang 550002, Guizhou, China; 2. Department of Pathology, Guizhou Tumour Hospital, Guiyang 550000, Guizhou, China; 3. The Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. The Key Laboratory of Endemic and Ethnic Disease, Guizhou Medical University, Ministry of Education of P. R. China, Guiyang 550004, Guizhou, China; 5. College of Public Hygiene, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] Objective: To investigate the change of learning and memory ability of rats with coal-burning fluorosis and the relationship between fluorosis and activity of B-raf. **Methods:** Coal-burning fluorosis rat model was established, and the occurrence of dental fluorosis and the fluoride concentration in rats' brain tissue were adopted to evaluate the model. Morris water maze spatial exploration experiment was adopted to test the learning ability of rats. Western blot was used to detect the expression of B-raf protein in rat brain homogenate, and the activity of B-Raf was detected by Realtime PCR. **Results:** The coal-burning fluorosis rat model was established. Compared with control group, the escape latency of the rats in fluorosis group was significantly longer and correlated with the dose of fluoride, indicating that the learning ability of the rats with fluorosis was reduced. The phosphorylated B-raf protein and B-raf mRNA levels in the brain of rats in the fluorosis group were higher than those in control group ($P <$

* [基金项目] 国家自然科学基金(81460482)

** 通信作者 E-mail: zhizhongguan@yahoo.com

网络出版时间: 2017-04-19 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20170419.1515.016.html>

0.05), which was positively correlated with the dose of fluoride ($r=0.993$, $r=0.996$). The results suggested that the B-raf signal pathway in the brain of the rats in fluorosis group was activated. **Conclusions:** Coal-burning pollution feed can cause chronic fluorosis to rats and rats' learning disability, whose mechanism may be related to activation of rat brain's B-Raf signal transduction pathway, elevated expression levels of B-raf mRNA and phosphorylated B-raf protein.

[**Key words**] nervous system; fluorosis, dental; learning and memory ability

长期摄入高氟可以造成氟离子透过血-脑屏障在脑组织中蓄积,对神经系统产生毒性,影响脑的生理功能,包括智力发育与学习记忆能力^[1]。近年来研究报道地方性氟中毒病区儿童智商明显降低,且与摄氟剂量有关^[2]。贵州省燃煤污染型氟中毒病区居全国第二位^[3],本课题前期研究结果表明燃煤型氟中毒大鼠 ERK 蛋白活化,提示氟离子可能通过 MAPK 信号通路影响大脑功能^[4-5]。B-raf 基因编码一种丝/苏氨酸特异性激酶,是 RAS/RAF/MEK/ERK/MAPK 通路重要的转导因子,参与调控细胞内多种生物学事件,如细胞生长、分化和凋亡等。本研究采用燃煤型地方性氟中毒重病区的燃煤烘烤的玉米饲养大鼠,制作燃煤型氟中毒的大鼠模型,检测模型大鼠学习记忆能力变化以及与 B-raf 表达的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与分组 Sprague-Dawley 大鼠(清洁级)24只,雌雄各半,体质量100~120g,按性别和体重随机分为3组,每组8只。对照组常规饲料饲喂,饲料含氟量6.20mg/kg;低剂量染氟组大鼠给予饲料含氟量为11.30mg/kg,高剂量染氟组大鼠给予饲料含氟量为104.20mg/kg。高、低剂量染氟组饲料由贵州省毕节地区燃煤型氟中毒病区燃煤烘烤的玉米配制。各组大鼠自由饮用自来水(含氟量低于0.50mg/L)。各组大鼠喂养6个月时进行下列实验。

1.1.2 器材和主要试剂 Morris 水迷宫行为分析系统(购自中科院药物研究所),电泳及转印系统(Bio-rad 公司),兔抗 phospho-B-raf 抗体及抗兔 IgG(Cell Signal),ECL-plus 发光试剂(Amersham),B-raf mRNA 上游引物 5'-CCTCATTACCTGGCTCACTCACT-3',下游引物 5'-ATCAGGAATCTCCCAATCATCACT-3',(Invitrogen),总 RNA 提取试剂盒及 c-DNA 合成试剂盒(Promega)。

1.2 方法

1.2.1 氟中毒动物模型检测指标 检测氟斑牙形成情况(三度法):I度(轻度)为切牙表面黄白相间,白奎条纹清晰;II度(中度)为牙表面无光泽,呈粉笔样白斑;III度(重度)为牙表面出现小沟、裂纹或部分脱落,牙齿呈锯齿状缺损。脑氟含量测定:股动脉放血处死大鼠,剥离脑组织,玻璃研磨器将组织匀浆,4℃过夜后2500r/min离心15min,氟离子选择电极法检测脑组织中氟离子含量,经过校正计算得出每克脑中氟化物的含量。

1.2.2 大鼠学习能力检测 Morris 水迷宫法定位航行实验,采集第1~6d“逃避潜伏期(Escape-latency)”数据。定位航行实验:在IV象限放置平台,测试共进行6d,每天分别按IV、III、II、I象限弧度中点将大鼠放入水中,每次限定时间60s,平台时间2s。如大鼠60s未找到平台,将登台时间记录为60s,以4次所用总时间的平均值作为观察指标。逃避潜伏期时间短说明学习能力强。

1.2.3 磷酸化 B-raf 蛋白水平检测 取大鼠左侧大脑顶叶及额叶组织约50mg,加入蛋白酶抑制剂,使用蛋白提取液制备脑组织匀浆,14000r/min4℃离心40min,使用考马司亮兰法测定蛋白含量,上样量为50μg。蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后湿转法转移到PVDF膜上。phospho-B-raf一抗(1:500)4℃孵育过夜,辣根过氧化物酶抗兔 IgG二抗室温孵育2h。ECL-plus 反应后用胶片显影,图像分析仪分析条带灰度,以对照样本为100%计算实验组蛋白相对含量。采用β-actin作为内参照物。

1.2.4 B-raf mRNA 表达水平检测 Real-time PCR SYBY-GREEN 法检测实验大鼠脑组织中 B-raf 的 mRNA 表达量。TRIZOL 提取脑组织总 RNA,采用逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测脑组织中 B-raf mRNA 水平,Applied Biosystems SDS14.0 软件进行荧光采集并分析 $\Delta\Delta Ct$ 值及 RQ(relative quantity)值, $RQ=2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。以β-actin为内对照,计算 B-Raf mRNA 和对照组的相对水平。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学分析,统计方法采用单因素方差分析,进一步进行组间多重比较。

2 结果

2.1 氟斑牙发病率

喂养 6 个月时,正常对照组无氟斑牙发生,低剂量染氟组大鼠染氟检出中度氟斑牙,无重度氟斑牙发生。高剂量染氟组大鼠均出现中、重度的氟斑牙(表 1),提示随着染氟剂量的增加,其氟斑牙的病变程度加重。

表 1 用不同含氟剂量饲料饲养 6 个月时大鼠氟斑牙发生情况

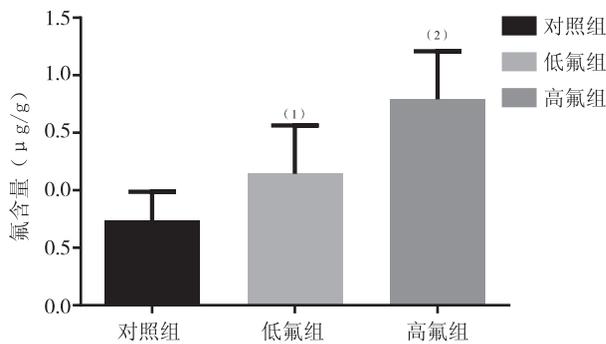
Tab.1 The occurrence of dental fluorosis in rats after 6 months feeding with different fluoride dose feed

组别	正常	轻度	中度	重度	合计
正常对照组	8	0	0	0	8
低氟组	0	6	2	0	8 ⁽¹⁾
高氟组	0	0	4	4	8 ⁽¹⁾

⁽¹⁾与正常对照组比较, $P < 0.01$

2.2 大鼠脑组织匀浆中氟含量

染氟组大鼠脑组织匀浆中氟含量明显高于对照组,高氟组为 $(1.79 \pm 0.04) \mu\text{g/g}$,低氟组为 $(1.14 \pm 0.04) \mu\text{g/g}$,对照组为 $(0.52 \pm 0.05) \mu\text{g/g}$,各组间比较,差异有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1。



⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.01$; ⁽²⁾与低氟组比较, $P < 0.01$

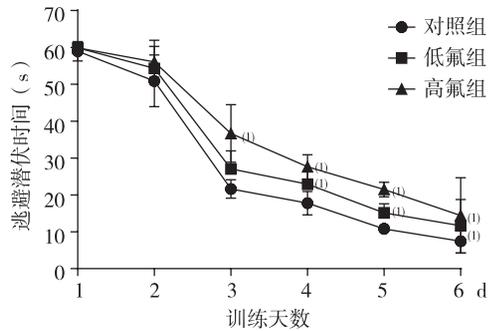
图 1 各组大鼠脑组织匀浆中氟含量

Fig.1 Fluoride content in brain homogenate of rats in each group

2.3 逃避潜伏期

随定向航行实验天数的增加,各实验组大鼠找到平台时间(逃避潜伏期)逐渐缩短,但染氟组大鼠

逃避潜伏期均长于对照组,且随着染氟剂量增加,逃避潜伏时间延长,从训练第 3 天开始,染氟组与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 2。



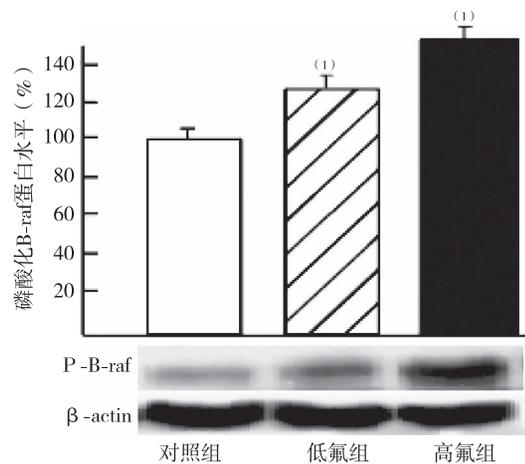
⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.05$

图 2 各组大鼠空间探索实验结果

Fig.2 Results of space exploration experiments

2.4 大鼠脑组织磷酸化 B-raf 蛋白水平

染氟组大鼠脑组织磷酸化 B-raf 蛋白表达量均较正常组增加,差异有统计学意义($P < 0.05$);高剂量染氟组磷酸化蛋白水平高于低剂量染氟组($P < 0.05$),见图 3;相关性分析表明 B-raf 蛋白的活化程度(phospho-B-raf 表达量)与第 6 天逃避潜伏时间正相关,相关系数 $r = 0.993$ 。



⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.05$

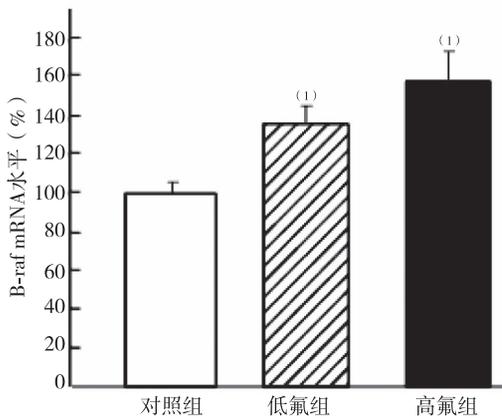
图 3 各组大鼠脑组织中 B-raf 蛋白水平 (Western-blot)

Fig.3 The level of B-raf protein in brain tissue of rats in each group (Western-blot)

2.5 氟中毒大鼠脑组织 B-raf mRNA 水平改变

荧光定量 PCR 结果显示,染氟组大鼠脑组织中 B-raf mRNA 表达水平,明显高于对照组。对照组 $RQ = (0.015 \pm 0.002)$,低剂量组 $(0.035 \pm$

0.009),高剂量组(0.053 ± 0.004),差异有统计学意义($P < 0.05$),见图4。相关性分析表明 B-raf mRNA 表达水平与第6天逃避潜伏时间正相关,相关系数 $r = 0.996$ 。



⁽¹⁾与对照组比较, $P < 0.05$

图4 各组大鼠脑组织 B-raf 基因 mRNA 表达水平 (Real time PCR)

Fig.4 Expression of B-raf gene mRNA in brain tissue of rats in each group (Real time PCR)

3 讨论

当发生慢性氟中毒时,氟离子可通过血脑屏障在脑组织中蓄积,从而对脑组织结构及功能产生影响,造成脑损害^[6]。以往的研究发现,氟在脑中的蓄积的主要部位是海马,而海马是中枢神经系统中与学习、记忆和情绪行为功能密切相关的重要脑区,海马突触是神经信号传递的关键结构。慢性氟中毒可以使脑内海马突触微结构参数发生改变,从而影响脑的功能^[7],本研究结果显示,慢性氟中毒大鼠学习记忆能力明显降低。

研究发现,MAPK/ERK 信号通路参与哺乳动物的学习和记忆过程。有研究表明 I 型神经纤维母细胞瘤(NF1)与精神发育迟缓的关系,学习、记忆功能降低与海马 MAPK/ERK 信号通路缺损密切相关^[8]。Raf 激酶是 Ras 的下游信号,通过激活 MEK-ERK 级联通路参与神经系统的形成并学习和记忆功能。在 Raf 的同分异构体中,脑组织中 B-raf 占主导地位。Chen AP 利用 Cre-LoxP 基因打靶系统制作 B-raf 基因敲除小鼠,研究模型鼠学习、记忆能力的变化。研究发现 B-raf 基因敲除小鼠 ERK

活化程度降低,海马相关长时程记忆能力受损。证明 B-raf 是大脑学习记忆功能的重要调控蛋白^[9]。在中枢神经受到损害的过程中,常伴有 MAPK/ERK 信号通路蛋白对损伤刺激的反馈性激活,用 MEK 蛋白激酶的特异性阻滞剂(U0126)阻止该蛋白激酶的激活,可阻滞 ERK1/2 的磷酸化,导致大脑的损害加重,再次证明激活 ERK 信号转导通路的神经保护作用^[11]。本实验从蛋白及 mRNA 水平发现染氟组大鼠 B-raf 蛋白活化,而且其活化水平与染氟剂量强烈正相关。

综上所述,慢性氟中毒可引起大鼠学习记忆能力降低,以及氟中毒动物脑组织 ERK/MAPK 信号转导通路的激活,表现为 B-raf 的磷酸化和该蛋白 mRNA 表达水平升高,其改变可能是对中枢神经系统损伤的一种反馈性保护机制。

4 参考文献

- [1] Choi AL. Developmental fluoride neurotoxicity: a systematic review and meta-analysis [J]. Environ Health Perspect, 2012 (10):1362-1368.
- [2] Valdez-Jiménez L. Effects of the fluoride on the central nervous system [J]. Neurologia, 2011 (5):297-300.
- [3] 高彦辉. 我国地方性氟中毒防治研究前景分析[J]. 中华地方病学杂志,2015(34), 547-548.
- [4] 冉龙艳. 燃煤型氟中毒大鼠智力与脑 ERK1/2 表达关系[J]. 中国公共卫生, 2010(26), 1228-1229.
- [5] 冉龙艳. 燃煤污染型氟中毒大鼠脑组织 ERK/p-90RSK 信号转导通路研究 [J]. 贵州医药, 2013(37) 8-11.
- [6] Geemerts F. Kinetics of fluoride penetration in liver and brain [J]. Fluoride, 1986 (2):108-112.
- [7] Hatnagar M. Neurotoxicity of fluoride; neurodegeneration in hippocampus of female mice [J]. Indian J Exp Biol, 2002 (5):546-554.
- [8] Dash PK. The role of extracellular signal-regulated kinase in cognitive and motor deficits following experimental traumatic brain injury [J]. Neuroscience, 2002,114:755-767.
- [9] Bozon B. MAPK, CREB and zif268 are all required for the consolidation of recognition memory. Philos. Trans. R. Soc. Lond B: Biol. Sci, 2003, 358:805-814.

(2017-01-16 收稿,2017-03-19 修回)

中文编辑:刘平;英文编辑:刘华