燃煤型氟中毒对仔鼠生长和神经行为发育的影响*

扈 丽[1,2**]，王正蓉[3]，喻茂娟[1,2***]
(1. 贵州医科大学 流行病学教研室，贵州 贵阳 550025；2. 贵州医科大学 环境污染与疾病监控教育部重点实验室，贵州 贵阳 550025；3. 贵州医科大学 医学检验学院，贵州 贵阳 550025)

［摘 要］**目的**：观察母鼠燃煤型氟中毒对仔代鼠生长及神经行为发育的影响。**方法**：断乳两周的清洁级 SD 大鼠(48 只雌鼠 32 只，雄鼠 16)，按体质量将雌鼠随机分为对照组、低氟组、中氟组、高氟组 4 组，其中高、中、低氟组饲料含氟量分别 106.0、47.8 和 24.4 mg/kg；染氟组雌鼠以燃煤型氟中毒重病区原煤烘烤的当地玉米为主要成分的加工饲料连续饲喂 3 个月，对照组和雄鼠喂饲正常饲料，3 个月后按雌雄 2∶1合笼交配，妊娠后继续染毒直至仔鼠断乳；于出生后多个时间点观察各组仔鼠体重、头体长和尾长、张耳、长毛、上下门齿及睁眼发育指标达标时间，观察平面翻正及悬崖回避的神经行为的发生时间。**结果**：与对照组和低氟组比较，高氟组仔鼠出生后第 21 天(PND21)体重降低 ($P<0.05$)，且 PND21 和 PND26 仔鼠头体长较短($P<0.05$)；与对照组比较，高氟组 PND21 和 PND26 仔鼠尾长较短($P<0.05$)；与低氟组相比，高氟组 PND26 仔鼠尾长较短($P<0.05$)；与对照组相比，各染氟组仔鼠张耳、全身白毛、上下门齿萌出和睁眼等生理发育指标比较差异无统计学意义($P>0.05$)；与对照组相比，高氟组仔鼠出现平面翻正反射时间明显延迟($P<0.05$)，各染氟组完成悬崖回避的时间差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论**：母鼠染氟可影响仔鼠的生长发育，且对其神经行为反射功能有一定的损害。

［关键词］大鼠，Sprague-Dawley；雌鼠；仔鼠；氟中毒，燃煤型；生长发育；神经发育
［中图分类号］R599.9 ［文献标识码］A ［文章编号］1000-2707(2018)07-0757-05
DOI：10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.07.004

Effects of Coal Fluoride Exposure on Growth and Neurobehavioral Development in Offspring

HU Li[1,2], WANG Zhengrong[3], YU Maojuan[1,2]
(*1. Department of Epidemiology, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 2. Education Ministry Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China; 3. School of Medical Examination, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China*)

［**Abstract**］**Objective**: To observe the effects of coal-burning fluorosis on growth and neurobehavioral development of offspring in pregnant rats. **Methods**: Forty-eight SD rats (32 females and 16 males) weaned for two weeks were randomly divided into groups of control (C), low-fluorine (L), medium-fluorine (M) and high-fluorine (H) according to body weight. There were 8 female rats in each group. All female rats in fluorine-exposed groups were fed with local corn roasted by raw coal of the coal-burning endemic fluorosis area for 3 months. The fluoride contents in food for females of groups H, M, and L were 106.0 mg/kg, 47.8 mg/kg and 24.4 mg/kg, respectively; All of male rats, and female rats in group C were fed with normal diet. After 3 months, females and males were put in same cage at a ratio of 2∶1, and mated. Fluoride feed was continued after female pregnancy until offsprings were weaned;

*［基金项目］贵州省科技计划项目［黔科合 LH 字(2014)7127 号］
**贵州医科大学 2016 级硕士研究生
***通信作者 E-mail：maojuanyu@gmc.edu.cn
网络出版时间：2018-07-18 网络出版地址：http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20180718.1503.019.html

Body weight, head-body length and tail length, auricle separation, hair growth, growth of upper and lower incisors and eye opening of each group's pup rats were observed at different time points after birth. The neurobehavior such as planar righting reflex and cliff avoidance reflex were observed too. **Results**: On the 21st postnatal day (PND21), The offsprings' body weight of group H was lower than those of groups C and L ($P<0.05$), and the offsprings' head-body lengths on days of PND21 and PND26 in group H were shorter than those of groups C and L ($P<0.05$). The pup rats' tail lengths of group H on PND21 and PND26 were shorter than those of group C ($P<0.05$). The tail length of offspring in group H on PND26 was shorter than that of group L ($P<0.05$). Compared with those of group C, there was no statistical difference in physiological development indexes including auricle separation, hair growth, growth of upper and lower incisors and eye opening of pup rats in fluoride groups ($P>0.05$). The time completing the planar righting reflex of pup rats in group H was significantly longer than those in groups C and L ($P<0.05$). Compared with the control, there was no statistical difference in the time completing the cliff avoidance reflex in each fluorine group ($P>0.05$). **Conclusions**: The fluorine exposure of female rat could influence the growth and development of its offsprings. The effect could damage the nervebehavior reflex function of pups.

[**Key words**] rats, Sprague-Dawley; female mouse; offspring; coal-burning fluoride poisoning; growth; neurobehavioral development

地氟病是由于病区居民长期生活在高氟环境中,通过饮水、空气或食物等途径摄入过量的氟而导致的慢性蓄积性中毒,主要有饮水型、燃煤型和饮茶型。地氟病是一种全身性疾病,除了引起氟斑牙和氟骨症之外,还可造成多种非骨相系统的毒性损伤[1]。近年来,氟中毒造成的脑损伤已引起国际氟研究者们的重视[2-3]。有文献报道,地氟病区儿童存在智力水平和生长发育落后的状况[4-9]。既往研究多采用妊娠期和哺乳期染毒、或亲代雌雄大鼠均染毒,观察对子代鼠的影响;本研究采用燃煤型氟中毒重病区原煤烘烤的当地玉米为主要饲料来饲喂断乳两周的雌鼠,复制青春期、妊娠期及哺乳期氟中毒模型,雄鼠食用正常饲料,观察记录母鼠慢性氟中毒对仔鼠的生长发育以及神经行为发育的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及器材

染氟饲料为贵州省燃煤型氟中毒重病区原煤烘烤的当地玉米为主要成分、添加其他辅料加工饲料,光学显微镜(日本尼康公司)、体重秤、长1 m的软米尺、秒表和粗糙平整木板(30 cm×50 cm)。

1.2 动物分组与染毒

48只断乳两周的清洁级SD大鼠(雌鼠32只,雄鼠16只),体质量100~105 g,由贵州医科大学动物实验中心提供。适应性喂养1周后,将雌鼠体质量从小到大排列,根据随机数字表法分成对照组、低氟组、中氟组、高氟组,每组8只,分笼饲养。对照组和雄鼠饲以正常饲料(实测含氟量5.2 mg/kg,由贵州医科大学实验动物中心配制);各剂量染氟组饲以染氟饲料,低、中、高氟组饲料含氟量分别为24.4、47.8和106.0 mg/kg。各组大鼠均自由饮用自来水(含氟量<0.50 mg/L)。染氟期间,定期观察记录雌鼠氟斑牙发生情况,染氟3个月后,分别收集每只雌鼠24 h尿液,检测尿氟含量,结合氟斑牙损伤情况和尿氟指标判断本研究是否成功建立雌鼠氟中毒模型[10-11]。随后,雌雄大鼠按2∶1合笼交配,次日起对雌鼠进行阴道涂片镜检,发现精子当日记为妊娠0 d。妊娠后继续染毒,直至雌鼠分娩、仔鼠断乳,每组仔鼠随机抽样10只进行生长发育和神经行为发育指标的检测。

1.3 检测指标

1.3.1 生长发育指标 分别于出生后第1天(PND1)、PND6、PND11、PND16和PND21早晨9∶30称量并记录仔鼠体重,于PND6、PND11、PND16、PND21和PND26早晨9∶30记录仔鼠头体长及尾长,观察期间剔除死亡的仔鼠;于PND3开始观察记录仔鼠张耳时间,两侧外耳道完全张开为达标;于PND12开始观察记录仔鼠睁眼时间,覆盖在其双眼上的膜完全消失为达标;于PND4开始观察记录仔鼠上下门齿萌出时间,上下门齿完全露出齿龈

为达标;于 PND9 开始观察记录仔鼠长毛时间,全身长出白色软毛为达标。

1.3.2 神经行为发育指标　(1)平面翻正反射:PND5 进行测试,测试时将仔鼠腹部朝上,仰卧于粗糙平整的木板上(30 cm×50 cm),扶持 3 s,放手后观察其身体翻正过来四肢复位接触木板的能力;若仔鼠在 2 s 内翻过身且四肢接触木板,重复 3 次,即平面翻正反射阳性。(2)悬崖回避反射:以 PND5 仔鼠为对象,将仔鼠置于实验台边缘,鼻和前趾越过边缘,同时一只手放于实验台下,以防仔鼠掉落摔伤,观察 60 s,仔鼠从实验台边缘退回或转身为悬崖回避反射阳性。

1.4 统计学处理

应用 SPSS 22.0 软件对实验数据进行整理和分析。正态分布计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)描述,符合正态分布且方差齐的数据采用单因素方差分析,两两比较采用 *LSD-t* 法,不满足正态性或方差齐性的计量资料通过变量变换,依然不满足,采用 H 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 仔鼠体质量

各组仔鼠 PND1、PND6、PND11 及 PND16 体质量比较,差异无统计学意义($P>0.05$),但随着时间的推移,各组仔鼠的体质量有逐渐增加的趋势。与对照组和低氟组比较,高氟组仔鼠 PND21 体质量明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1　4 组仔鼠各时间点的体质量($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1　Offspring body weights of different groups at different time points

组别	体质量(g)				
	PND1	PND6	PND11	PND16	PND21
对照组	6.55 ± 0.69	14.09 ± 1.30	24.27 ± 2.37	30.00 ± 3.16	42.55 ± 4.59
低氟组	6.40 ± 0.52	13.67 ± 1.22	23.5 ± 2.30	29.11 ± 2.93	41.67 ± 4.00
中氟组	6.56 ± 0.53	13.22 ± 1.20	23.11 ± 3.33	27.89 ± 3.62	40.44 ± 3.64
高氟组	6.50 ± 0.67	13.00 ± 0.85	21.67 ± 2.67	26.33 ± 3.14	37.45 ± 3.83(1)(2)
F	0.133	1.980	2.106	2.761	3.251
P	0.940	0.134	0.116	0.056	0.033

(1) 与同时点对照组比较,$P<0.05$;(2) 与同时点低氟组比较,$P<0.05$

2.2 仔鼠头体长

各组仔鼠 PND6、PND11 和 PND16 的头体长比较,差异无统计学意义($P>0.05$),但随着时间的推移,各组仔鼠的头体长有逐渐增加的趋势。与对照组和低氟组比较,高氟组仔鼠 PND21 和 PND26 头体长较短,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2　4 组仔鼠各时间点的头体长($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2　Offspring head-body lengths of different groups at different time points

组别	头体长(cm)				
	PND6	PND11	PND16	PND21	PND26
对照组	6.74 ± 0.46	7.64 ± 0.79	8.56 ± 0.50	9.68 ± 0.60	10.78 ± 0.50
低氟组	6.51 ± 0.30	7.24 ± 0.49	8.33 ± 0.42	9.60 ± 0.54	10.60 ± 0.57
中氟组	6.51 ± 0.48	7.13 ± 0.47	8.29 ± 0.33	9.44 ± 0.52	10.42 ± 0.64
高氟组	6.68 ± 0.37	7.26 ± 0.50	8.12 ± 0.29	9.04 ± 0.45(1)(2)	10.06 ± 0.54(1)(2)
F	0.778	1.404	1.319	1.522	2.953
P	0.514	0.258	0.284	0.048	0.046

(1) 与同时点对照组比较,$P<0.05$;(2) 与同时点低氟组比较,$P<0.05$

2.3 仔鼠尾长

各组仔鼠 PND6、PND11 和 PND16 的尾长差异无统计学意义($P>0.05$),随着时间的推移,各组仔鼠的尾长有逐渐增加的趋势。与对照组比较,高氟组仔鼠 PND21 的尾长较短($P<0.05$);和低氟组比较,高氟组仔鼠 PND21 和 PND26 的尾长较短($P<0.05$)。见表 3。

2.4 仔鼠生理发育指标达标时间

4 组仔鼠的生长和生理发育指标达标时间比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 4。

表 3　4 组仔鼠各时间点尾长的测量结果($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3　Offspring tail lengths of different groups at different time points

组别	尾长(cm)				
	PND6	PND11	PND16	PND21	PND26
对照组	3.14 ± 0.27	4.76 ± 0.46	6.18 ± 0.50	8.70 ± 0.56	9.84 ± 0.37
低氟组	3.16 ± 0.34	4.73 ± 0.53	5.84 ± 0.65	8.62 ± 0.60	9.80 ± 0.39
中氟组	3.07 ± 0.32	4.67 ± 0.40	5.87 ± 0.57	8.44 ± 0.55	9.40 ± 0.64
高氟组	3.11 ± 0.19	4.66 ± 0.54	5.70 ± 0.53	8.20 ± 0.21(1)	9.24 ± 0.59(1)(2)
F	0.175	0.100	1.287	1.830	3.242
P	0.913	0.960	0.295	0.029	0.034

(1) 与同时点对照组比较,$P<0.05$;(2) 与同时点低氟组比较,$P<0.05$

表 4　4 组仔鼠生理发育指标达标时间($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4　Time for physiological development in each group

组别	生理发育指标达标时间(d)			
	张耳	全身白毛	上下门齿萌出	睁眼
对照组	4.09 ± 0.70	11.18 ± 1.33	6.64 ± 0.92	14.18 ± 1.32
低氟组	4.11 ± 0.78	11.33 ± 1.32	6.67 ± 0.71	14.22 ± 0.83
中氟组	4.13 ± 0.69	12.00 ± 1.22	6.56 ± 0.53	14.56 ± 1.01
高氟组	4.25 ± 0.75	11.58 ± 1.56	6.58 ± 0.90	14.50 ± 1.08
F	0.109	0.645	0.037	0.305
P	0.954	0.591	0.990	0.822

2.5　仔鼠平面翻正和悬崖回避反射阳性时间

与对照组和低氟组相比,高氟组仔鼠出现平面翻正反射阳性的时间延长,差异有统计学意义($P<0.05$)。各组仔鼠出现悬崖回避反射阳性的时间无明显变化,差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 5。

表 5　4 组仔鼠平面翻正和悬崖回避反射阳性时间($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5　Time for completing planar righting reflex and cliff avoidance reflex of offsprings in each group

组别	神经反射开始出现时间(d)	
	平面翻正反射	悬崖回避反射
对照组	6.2 ± 1.39	7.1 ± 1.45
低氟组	6.5 ± 1.27	7.3 ± 1.49
中氟组	7.3 ± 1.49	7.7 ± 1.34
高氟组	8.0 ± 1.25(1)(2)	7.9 ± 1.37
F	3.589	0.667
P	0.023	0.578

(1) 与对照组比较,$P<0.05$;(2) 与低氟组比较,$P<0.05$

3　讨论

燃煤型地氟病是我国特有的地方病,病区分布广泛,可严重危害病区居民的身体健康,成为我国重要的公共卫生问题之一[12]。有研究显示,高氟病区儿童常出现头痛、失眠及精神萎靡等类神经症症状[13]。动物研究发现,饮水中氟含量增加,实验动物的脑氟含量也会增高[14-15]。提示高氟暴露可导致过量的氟通过血脑屏障蓄积于脑组织,并对神经系统产生一定的毒性作用。神经系统是外源化合物攻击的敏感靶点之一,而神经行为是机体感觉、运动能力的综合体现,应用生长发育水平和神经行为可以有效地反映外源化学物质对神经系统的影响[16]。本研究通过一组生长及生理发育指标,包括体重、头体长、尾长、张耳、全身白毛、上下门齿萌出和睁眼;神经行为反射指标包括平面翻正反射和悬崖回避反射,可反映母鼠燃煤氟中毒对仔鼠生长发育、躯体感觉运动能力及神经运动协调能力的影响。

本研究发现,与对照组相比,各染氟组仔鼠的体重、头体长和尾长除了第 1 次测量没有明显变化之外,随着生长发育的进行,各染氟组仔鼠的上述生长发育指标的增长均慢于对照组,且随着染氟剂量的升高而降低,高氟组仔鼠 PND21 的体重明显比对照组和低氟组降低。与对照组相比,高氟组 PND21 和 PND26 仔鼠头体长和尾长明显缩短,同时,高氟组 PND21 和 PND26 仔鼠头体长比低氟组短,PND26 仔鼠尾长短于低氟组。说明母鼠高氟

暴露抑制了仔鼠生长发育指标即体重、头体长及尾长的增长。与对照组相比,各染氟组仔鼠的生理发育指标所需要的时间,包括张耳、全身白毛、上下门齿萌出和睁眼均无明显改变,说明氟暴露对仔鼠生理发育指标的影响不明显。本研究结果还显示,高氟组仔鼠完成平面翻正反射的时间比对照组和低氟组明显延迟,与对照组相比,各染氟组完成悬崖回避反射的时间逐渐增加,但没有明显差异,说明母鼠高氟暴露损害了仔鼠的躯体感觉运动及神经运动协调能力。

综上所述,母鼠燃煤氟中毒对仔鼠的生长发育及神经行为发育产生了抑制和损害作用,研究结果与燃煤氟中毒病区儿童流行病学调查结果相一致[8-9]。氟是一种神经毒物,有研究显示,氟中毒大鼠的空间学习记忆能力降低,但其影响机制尚无统一的结论[17]。对于本次研究,母鼠燃煤氟暴露对仔鼠的学习记忆能力有无影响及其影响机制,有待后续深入研究。

4　参考文献

[1] 刘咏妍,禹文峰,官志忠. 慢性氟中毒肝脏形态及功能改变的分子机制[J]. 中华地方病学杂志, 2015,34(2):154－156.

[2] 官志忠. 国际氟研究会议简讯[J]. 中华地方病学杂, 2013,32(6):635.

[3] 孙殿军. 国际氟研究最新进展——第 24 届国际氟研究协会学术会议[J]. 中国地方病学杂志, 2002,21(5):76－78.

[4] DAS K,MONDAL N K. Dental fluorosis and urinary fluoride concentration as a reflection of fluoride exposure and its impact on IQ level and BMI of children of laxmisagar, simlapal block of Bankura district, W B, India[J]. Environ Monit Assess, 2016,188(4):218－232.

[5] ARAVIND A,DHANYA R S,NARAYAN A,et al. Effect of fluoridated water on intelligence in 10－12－year－old school children[J]. J Int Soc Prev Community Dent, 2016,6(3):S237－S245.

[6] RAZDAN P,PATTHI B,KUMAR J K,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.

[7] BASHASH M,THOMAS D,HU H,et al. Prenatal fluoride exposure and cognitive outcomes in children at 4 and 6－12 years of age in Mexico[J]. Environ Health Perspect, 2017,125(9):0970171.

[8] 白爱梅,李跃,范中学,等. 燃煤污染型氟砷中毒病区儿童智力水平和生长发育状况调查分析[J]. 中华地方病学杂志, 2014,33(2):160－163.

[9] 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.

[10] 杨凯,张绍伟,叶小明. 大鼠氟斑牙(含氟牙膏型)动物模型的建立及实验检测[J]. 中华口腔医学研究杂志:电子版, 2017,11(4):204－210.

[11] 王飞清,杨华,夏曙华. 燃煤型氟中毒对雌鼠动物模型的影响[J]. 职业与健康, 2018,34(13):1761－1763.

[12] 安冬. 燃煤污染型地方性氟中毒防治现况及展望[J]. 国外医学:医学地理分册, 2013,34(1):1－3.

[13] SHSRMA J D,DEEPIKA S,PARUL J, et al. Prevalence of neurological manifestations in a human population exposed to fluoride in drinking water[J]. Fluoride, 2009,(4):127－132.

[14] MCPHERSON C A,ZHANG G,GILLIAM R,et al. An evaluation of neurotoxicity following fluoride exposure from gestational through adult ages in long－evans hooded rats[J]. Neurotox Res, 2018,33(1):17－26.

[15] VANI M L,REDDY K P. Effects of fluoride accumulation on some enzymes of brain and gastrocnemius muscle of mice[J]. Fluoride, 2000,33(1):17－26.

[16] 徐一凡. 重组人乳铁蛋白对一代延长试验大鼠免疫功能及神经行为影响的实验研究[D]. 宁夏:宁夏医科大学, 2016.

[17] 冉龙艳,桂传枝,吴昌学,等. 燃煤型氟中毒大鼠学习能力及脑组织 B－raf 活化的变化[J]. 贵州医科大学学报, 2017,42(4):400－403.

(2018-04-09 收稿,2018-06-30 修回)

中文编辑: 文箐颖; 英文编辑: 苏晓庆