

# 慢性氟中毒大鼠学习记忆能力与血清、海马及皮质脑组织中 PGC-1 $\alpha$ 水平的相关性\*

刘仙红<sup>1,2,3</sup>, 陈丹<sup>4</sup>, 曾晓晓<sup>1,2,3</sup>, 董阳婷<sup>1,2,3,4</sup>, 邓婕<sup>1,2,3</sup>, 齐晓岚<sup>1,2,3</sup>,  
吴昌学<sup>1,2,3</sup>, 李毅<sup>1,2,3</sup>, 宋辉<sup>1,2,3</sup>, 官志忠<sup>1,2,3,4\*\*</sup>

(1. 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; 2. 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; 3. 贵州医科大学 分子生物学重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州医科大学附院 病理科, 贵州 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的: 研究慢性氟中毒大鼠脑组织中过氧化物酶体增殖激活受体  $\gamma$  辅激活因子 (PGC-1 $\alpha$ ) 水平, 探讨 PGC-1 $\alpha$  与学习记忆能力的关系。方法: SD 大鼠 60 只, 随机分为对照组 (饮水含氟量 < 0.5 mg/L)、低氟组 (饮水含氟量为 5.0 mg/L)、高氟组 (饮水含氟量为 50.0 mg/L), 染氟时间分别为 3 个月及 6 个月; 分别于染氟 3 月及 6 月时, 用 Morris 水迷宫测定大鼠学习记忆能力, 采用氟离子选择电极法测定大鼠血清氟含量, 用蛋白印记方法检测大鼠海马及皮质组织中 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达水平, 分析大鼠海马及皮质 PGC-1 $\alpha$  蛋白水平与血清氟含量及空间学习记忆能力的相关性。结果: 染氟大鼠逃避潜伏期较对照组显著延长、穿越平台次数及逗留平台象限时间明显缩短, 以染氟 6 月组大鼠更明显 ( $P < 0.05$ ); 血清氟含量随着染氟浓度的增高及染氟时间的延长而升高, 高氟组大鼠血氟含量显著高于对照组, 以染氟 6 月组大鼠尤为明显 ( $P < 0.05$ ); 染氟大鼠海马区和皮质区的 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达水平随着染氟浓度的增加和染氟时间的延长而逐渐下降, 染氟 6 月组大鼠海马及皮质 PGC-1 $\alpha$  蛋白与血氟含量呈负相关 ( $r = -0.574, -0.516, P < 0.05$ )、与大鼠逗留平台象限时间呈正相关 ( $r = 0.76, 0.60, P < 0.05$ )、与逃避潜伏期呈负相关 ( $r = -0.542, -0.58, P < 0.05$ )。结论: 慢性氟中毒大鼠大脑组织 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达水平降低, 可能是氟中毒大鼠空间学习记忆能力降低的机制之一。

**[关键词]** 氟中毒; 过氧化物酶体增殖激活受体  $\gamma$  辅激活因子; 学习记忆能力; 脑组织; 大鼠, Sprague-Dawley

**[中图分类号]** R34 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2018)10-1154-05

**DOI:** 10.19367/j.cnki.1000-2707.2018.10.007

## Correlation Study on the PGC-1 $\alpha$ Level in Cortex Tissue and Hippocampus, Serum with Learning and Memory in the Brain of Rats with Chronic Fluorosis

LIU Xianhong<sup>1,2,3</sup>, CHEN Dan<sup>4</sup>, ZENG Xiaoxiao<sup>1,2,3</sup>, DONG Yangting<sup>1,2,3,4</sup>, DENG Jie<sup>1,2,3</sup>, QI Xiaolan<sup>1,2,3</sup>,  
WU Changxue<sup>1,2,3</sup>, LI Yi<sup>1,2,3</sup>, SONG Hui<sup>1,2,3</sup>, GUAN Zhizhong<sup>1,2,3,4</sup>

(1. Key Laboratory of Endemic and Ethnic Group Disease of Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 2. Key Laboratory of Molecular Biology of Guizhou Province, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Key Laboratory of Molecular Biology, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. Department of Pathophysiology, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract] Objective:** To investigate the changes of peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$  co-activator (PGC-1 $\alpha$ ) in the brain of rats with chronic fluorosis and to explore the role of PGC-1 $\alpha$  in the

\* [基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81760571); 贵州省创新计划资助项目 [黔教合协同创新中心 (2014)06, 黔科通 (2016)161]; 贵阳市联合基金资助项目 [筑科合同 (2017)30-3 号]

\*\* 通信作者 E-mail: 1457658298@qq.com

网络出版时间: 2018-10-10 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/52.1164.R.20181010.2224.002.html>

pathogenesis of chronic fluorosis and its relationship with learning and memory. **Methods:** 60 Sprague Dawley (SD) rats were divided randomly into control group (fluoride content of drinking water  $<0.5$  mg/L), low fluoride group (fluoride content of drinking water is 5.0 mg/L), high fluoride group (fluoride content of drinking water is 50.0 mg/L), treated for 3 and 6 months. The learning and memory ability were determined by Morris water maze test in 3 and 6 months; the fluoride content in serum was detected by Fluoride-ion selective electrode; the protein expression level of PGC-1 $\alpha$  in brain tissue was detected by Western blotting; the correlation between PGC-1 $\alpha$  protein expression and serum fluoride content and spatial learning and memory indices were also analyzed. **Result:** The escape latency of rats was significantly longer than that of the control group, the total number of space explorations was significantly reduced, and the time of the quadrant stayed platform was shortened significantly in rats treated for 6 months ( $P < 0.05$ ). The blood fluoride content increased with the increase of fluoride concentration and the time of fluoride exposure, and its content in the high fluoride group was significantly higher than that in the control group, especially in the 6-month fluorine-exposure group ( $P < 0.05$ ). The expression of PGC-1 $\alpha$  protein in the hippocampus and cortex of rats treated with fluorine were gradually decreased with the increase of the fluoride concentration and the time of fluoride exposure. The results of correlation analysis showed that there was a negative correlation between PGC-1 $\alpha$  protein in rats brain and blood fluoride content ( $r = -0.574, -0.516, P < 0.05$ ), and a positive correlation between the expression of PGC-1 $\alpha$  protein in rats and resting platform quadrant ( $r = 0.76, 0.60, P < 0.05$ ) and escape latency was negatively correlated ( $r = -0.542, -0.58, P < 0.05$ ). **Conclusion:** The decreased expression of PGC-1 $\alpha$  protein in brain tissue may be one of the factors influencing the spatial learning and memory ability with chronic fluorosis.

[**Key words**] fluorosis; peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator; learning and memory ability; brain tissue; rats, Sprague-Dawley

研究证实,慢性氟中毒(endemic fluorosis)可以引起中枢神经系统病理改变,氟能透过血脑屏障,在脑组织蓄积,引起脑组织形态结构的改变,造成中枢神经系统的损伤<sup>[1-2]</sup>。过氧化物酶体增殖激活受体  $\gamma$  辅激活因子 1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ ) 是新近发现的在抗氧化应激系统中起关键作用的转录调节因子,它广泛表达于中枢神经系统,其在许多影响认知功能的中枢神经系统疾病的发生发展中扮演着重要角色<sup>[3-4]</sup>。对亨廷顿病(Huntington disease, HD)的研究中发现,HD 患者脑中 PGC-1 $\alpha$  mRNA 表达减少;进一步动物实验证实,亨廷顿蛋白能够抑制 PGC-1 $\alpha$  的表达,从而导致线粒体功能障碍和神经退行性变,而过度表达 PGC-1 $\alpha$  则可拯救 HD 中受损的神经细胞<sup>[5]</sup>。本研究拟通过复制不同浓度氟和不同处理时间的慢性氟中毒大鼠模型,检测 PGC-1 $\alpha$  蛋白在大鼠脑组织中的表达水平,分析其与大鼠学习记忆能力的关系,探讨其对慢性氟中毒神经功能损伤的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及分组

SD 大鼠 60 只,体质量 100 ~ 120 g,适应喂养 1 周后,随机分为对照组(饮水含氟量  $<0.5$  mg/L)、低氟组(饮水含氟量  $<5.0$  mg/L)、高氟组(饮水含氟量  $<50.0$  mg/L)、染氟期为 3 个月和 6 个月,每组 10 只,雌雄各半。各组均饲以贵州医科大学实验动物中心配制的标准营养动物饲料(含氟量  $<1.0$  mg/kg)。

### 1.2 主要仪器与试剂

DNS-2 型 Morris 水迷宫(中国医学科学院药物研究所)、Beckman 21R 型冷冻离心机(美国 Beckman 公司)、Bio-rad 电泳仪(美国 AB 公司)。兔抗 PGC-1 $\alpha$  抗体(美国 GenTex 公司)、化学发光试剂(ECL, Amersham 公司)、氟化钠(NaF, 重庆川江化学试剂厂)、蛋白印迹(Western blotting) Maker(美国 Thermo 公司)。

### 1.3 行为学测定

Morris 水迷宫检测大鼠的学习记忆能力。定位航向实验:测试前于IV象限放置平台,测试共进行5 d,每天分别将大鼠按 I、II、III、IV象限弧度中点放入水中,入水时保持鼠头面向迷宫壁,每次限定时间为60 s、平台时间为2 s,记录大鼠从入水到登上平台时间(逃避潜伏期);如60 s大鼠未找到平台,将逃避潜伏期记录为60 s,以最后1天作为观察指标,逃避潜伏期短表明大鼠学习能力较强。空间探索实验:测试第5天,将平台拆除,将大鼠头面向迷宫壁投入水中60 s,记录大鼠在60 s内寻找平台象限次数;逗留平台象限时间和穿台次数数值高表明大鼠记忆能力较强。

### 1.4 大鼠血清氟含量测定

染氟结束后,心脏采血、离心、取血清,应用氟离子选择电极法检测血清氟含量。

### 1.5 PGC-1 $\alpha$ 蛋白表达水平

蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达水平,处死大鼠后,分别取左脑颞叶及1/2海马组织,加入裂解液、蛋白酶抑制剂匀浆提取蛋白,二喹啉甲酸(BCA)法测蛋白浓度。经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离蛋白、转移胶上蛋白到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上,然后分别用 PGC-1 $\alpha$  抗体(稀释比例1:500)4℃孵育过夜,再与二抗室温孵育1 h。将膜与ECL试剂反应,凝胶成像系统扫描PVDF膜,用Image J软件(美国National Institutes of Health公司)分析条带灰度值(以内参 $\beta$ -actin蛋白条带校正)。

### 1.6 统计学方法

应用SPSS 16.0统计软件进行数据分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,对数据进行单因素方差分析检验,对 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达水平与大鼠学习记忆能力的关系进行 Pearson 相关性分析,检验水准为0.05。

## 2 结果

### 2.1 大鼠一般情况及学习记忆能力

对照组大鼠毛发光滑,饮食活动正常,精神好;染氟组大鼠毛色灰暗,饮食活动减少,精神萎靡。高氟组大鼠逃避潜伏期较对照组显著延长、空间探索总次数显著减少、逗留平台象限时间明显缩短,以染氟6月的大鼠学习记忆能力下降明显,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表1。

### 2.2 血清氟含量

各组大鼠血清氟含量随着染氟浓度的增高、染氟时间的延长而升高,高氟组大鼠血清氟含量显著高于对照组( $P < 0.05$ ),以染氟6月组大鼠血清氟含量升高明显( $P < 0.05$ ),见表2。

### 2.3 大鼠脑组织 PGC-1 $\alpha$ 蛋白表达

染氟3月和染氟6月组大鼠皮质和海马区的 PGC-1 $\alpha$  蛋白随着染氟浓度的增加呈下降趋势,染氟6月的高氟组大鼠脑组织 PGC-1 $\alpha$  蛋白水平较对照组显著降低( $P < 0.05$ ),见图1。

表1 染氟3月、6月时各组大鼠学习与空间记忆能力( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

Tab.1 Results of learning and spatial memory ability of rats in 3 and 6 months of experiment

| 组别   | 逃避潜伏期<br>(s)                       | 穿越平台(次)                           | 逗留平台象限时间<br>(s)                    |
|------|------------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|
| 染氟3月 |                                    |                                   |                                    |
| 对照组  | 6.73 $\pm$ 3.21                    | 4.14 $\pm$ 0.41                   | 18.47 $\pm$ 3.47                   |
| 低氟组  | 7.42 $\pm$ 1.26                    | 4.38 $\pm$ 1.51                   | 18.94 $\pm$ 2.92                   |
| 高氟组  | 18.51 $\pm$ 3.01 <sup>(1)(2)</sup> | 2.43 $\pm$ 1.06 <sup>(1)(2)</sup> | 12.91 $\pm$ 3.25 <sup>(1)(2)</sup> |
| 染氟6月 |                                    |                                   |                                    |
| 对照组  | 6.94 $\pm$ 3.62                    | 4.50 $\pm$ 1.44                   | 19.86 $\pm$ 3.57                   |
| 低氟组  | 15.58 $\pm$ 4.43 <sup>(1)</sup>    | 2.50 $\pm$ 0.76 <sup>(1)</sup>    | 15.02 $\pm$ 1.68 <sup>(1)</sup>    |
| 高氟组  | 28.56 $\pm$ 4.34 <sup>(1)(2)</sup> | 1.27 $\pm$ 1.10 <sup>(1)(2)</sup> | 10.39 $\pm$ 1.80 <sup>(1)(2)</sup> |

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

表2 染氟3月及6月时各组大鼠血清氟含量( $\bar{x} \pm s, n = 10$ )

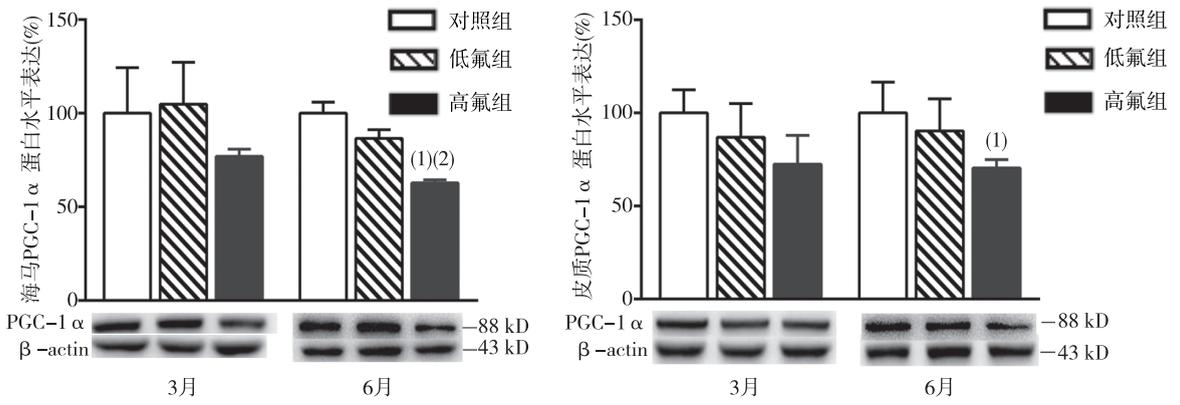
Tab.2 Fluoride contents in serum of the rats in 3 and 6 months of experiment

| 组别  | 大鼠血清氟含量( $\mu\text{g/L}$ )        |                                   |
|-----|-----------------------------------|-----------------------------------|
|     | 3月                                | 6月                                |
| 对照组 | 28.4 $\pm$ 5.61                   | 24.5 $\pm$ 7.93                   |
| 低氟组 | 32.1 $\pm$ 3.63                   | 56.4 $\pm$ 10.92 <sup>(1)</sup>   |
| 高氟组 | 38.6 $\pm$ 4.97 <sup>(1)(2)</sup> | 66.4 $\pm$ 8.98 <sup>(1)(2)</sup> |

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

### 2.4 染氟6月组大鼠血清氟含量、学习记忆能力与海马及皮质 PGC-1 $\alpha$ 蛋白表达水平关系

染氟6月时,大鼠血清氟含量与海马及皮质 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达水平呈负相关关系( $r = -0.574, -0.516, P < 0.05$ ),提示大鼠血清氟含量越高, PGC-1 $\alpha$  蛋白表达水平越低;海马及皮质 PGC-1 $\alpha$  蛋白水平与大鼠逗留平台象限时间(代表空间记忆能力)呈正相关关系( $r = 0.76, 0.60, P < 0.05$ ),与逃避潜伏期(代表学习能力)呈负相关关系( $r = -0.542, -0.58, P < 0.05$ ),提示大鼠 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达水平越高,大鼠空间学习记忆能力越强,见图2。



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

图1 染氟3月及6月时各组大鼠脑组织 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达

Fig. 1 Expression of PGC-1 $\alpha$  protein levels in fluoride rats

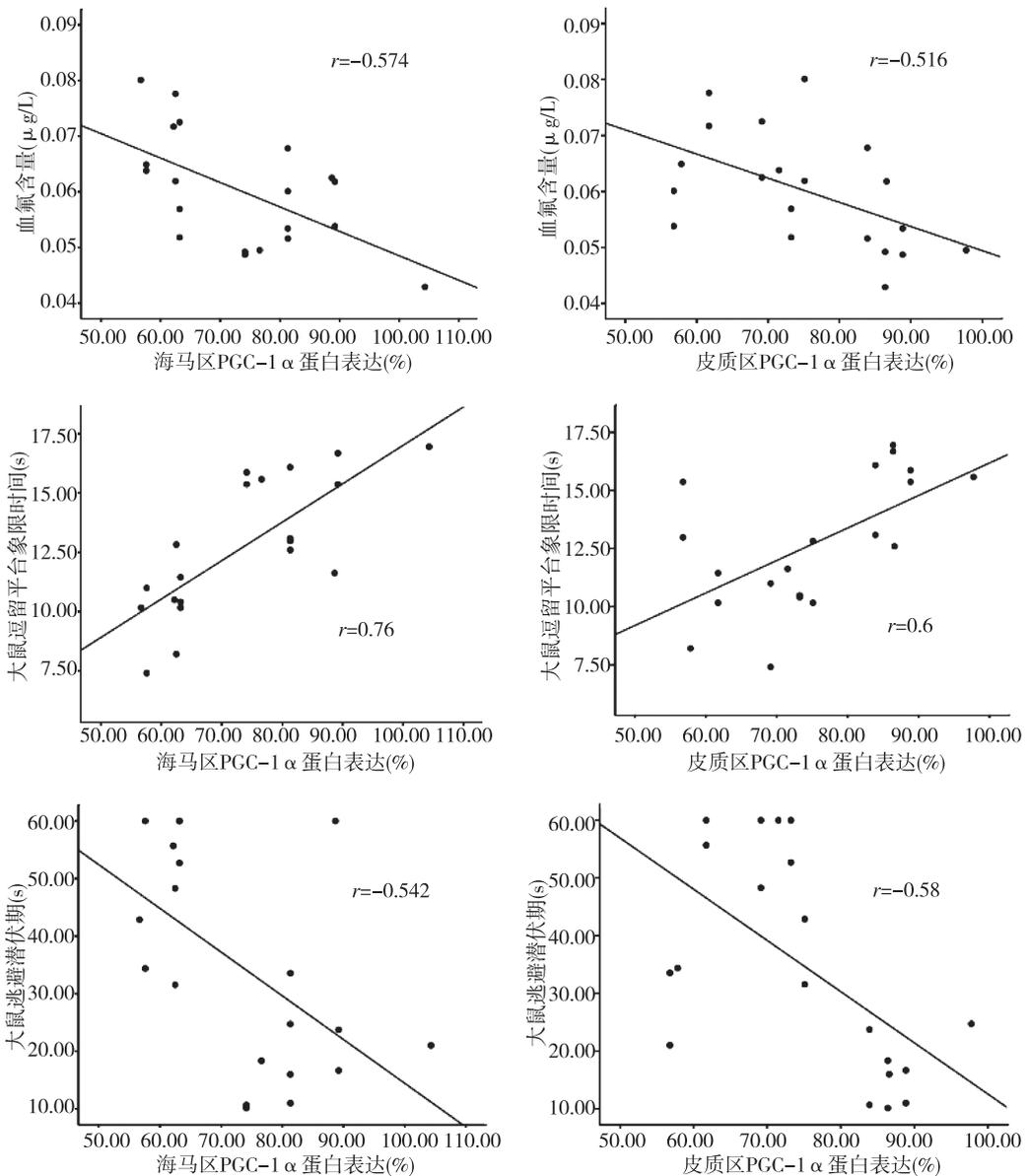


图2 染氟6个月时大鼠血清氟含量、空间学习记忆指标与 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达水平的相关性

Fig. 2 Correlation analysis between serum fluoride and spatial learning and memory indices and PGC-1 $\alpha$  protein expression in rats

### 3 讨论

慢性氟中毒对神经系统的影响一直都是氟中毒研究的热点<sup>[6]</sup>。近年来大量的研究结果证实,机体内过量的氟可通过血脑屏障蓄积于脑的特定重要区域,引起脑组织形态结构和功能的改变,造成中枢神经系统的损伤,影响智力发育与学习记忆能力<sup>[1,7]</sup>。实验研究表明,长期过量的氟摄入可引起动物大脑皮质和皮质下区脱髓鞘改变<sup>[8]</sup>,同时高氟也可导致大脑海马回神经细胞、血脑屏障超微结构、神经纤维显著的损伤<sup>[9]</sup>。临床上肯定了地氟病患者有头痛、头晕、记忆力减退等中枢神经系统功能障碍症状<sup>[10]</sup>;实验性氟中毒动物表现有震颤、紧张、麻痹等神经毒性作用的改变,也肯定了高氟对学习记忆能力的负面作用<sup>[11]</sup>。

本实验用含有不同氟浓度的饮用水饲养大鼠3个月和6个月后,可观察到染氟动物有不同程度的血清氟含量增高,且染氟6月的增高程度比染氟3月的明显,表明长期饲大鼠高氟水后导致其体内的氟蓄积。经 Morris 检测大鼠的学习记忆能力结果显示,高剂量染氟组大鼠逃避潜伏期较对照组显著延长、空间探索总次数显著减少、逗留平台象限时间明显缩短,且染氟6月大鼠比染氟3月大鼠明显,这说明氟在大鼠体内蓄积越多,大鼠的学习记忆能力越差,进一步证实过量氟的摄入对大鼠学习记忆能力的负面作用。

PGC-1 $\alpha$  是调节线粒体生物合成及功能的核心因子<sup>[12-13]</sup>,其在脑组织中广泛分布<sup>[14]</sup>,在维持正常脑功能中扮演重要角色。动物实验研究发现,PGC-1 $\alpha$  缺乏的小鼠会表现出包括焦虑不安及活动过度在内的多种行为异常<sup>[15]</sup>。在对帕金森病的研究中,Ebrahim 等<sup>[16]</sup>通过对 PGC-1 $\alpha$  敲除的小鼠模型的研究发现,PGC-1 $\alpha$  蛋白及 mRNA 水平降低会导致细胞内突触蛋白堆积,而细胞内丝状  $\alpha$ -突触蛋白过量堆积则形成路易小体,且这种过表达的  $\alpha$ -突触蛋白能够导致突触变性和神经细胞凋亡<sup>[17]</sup>。在对阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)的研究中,发现 AD 患者大脑中 PGC-1 $\alpha$  mRNA 的水平明显下降,且在已经发生神经元纤维缠结和 A $\beta$  淀粉样蛋白病理改变的 AD 患者中 PGC-1 $\alpha$  的蛋白表达呈阴性,更重要的是重建 Tg2576 神经元的 PGC-1 $\alpha$  表达后可减少高血糖症引起的 A $\beta$  淀粉样蛋白的生成<sup>[18]</sup>。

慢性氟中毒会引起中枢神经系统的功能障碍,对学习记忆能力有负面的作用,但 PGC-1 $\alpha$  是否参与其中,未见有文献报道。因此本实验对 PGC-1 $\alpha$  展开了研究,结果发现,随着染氟浓度的升高,染氟时间的增长,氟在体内蓄积越多,PGC-1 $\alpha$  的蛋白表达水平越低。对 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达与血清氟含量和大鼠的学习记忆能力进行的相关分析,结果显示,慢性氟中毒大鼠 PGC-1 $\alpha$  蛋白与血氟浓度呈负相关关系,与大鼠学习记忆能力呈正相关关系,说明过量的氟在体内积聚,导致 PGC-1 $\alpha$  功能受损,最终引起大鼠中枢神经系统发生功能障碍,大鼠学习记忆能力减弱。

综上所述,慢性氟中毒大鼠脑组织 PGC-1 $\alpha$  蛋白表达水平降低,对大鼠学习记忆能力有一定的负面影响。

### 4 参考文献

- [1] 魏露莎,禹文峰,詹赞琳,等. 凋亡诱导因子在慢性氟中毒大鼠脑组织神经细胞凋亡中的作用[J]. 中华地方病学杂志, 2015, 34(9):655-659.
- [2] 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.
- [3] GUBELLINI P, PICCONI B, DI FILIPPO M, et al. Downstream mechanisms triggered by mitochondrial dysfunction in the basal ganglia: From experimental models to neurodegenerative diseases[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease, 2010, 1802(1):151-161.
- [4] TURNER C, SCHAPIRA A H V. Mitochondrial matters of the brain: the role in Huntington's disease[J]. Journal of Bioenergetics and Biomembranes, 2010, 42(3):193-198.
- [5] JIN J, ALBERTZ J, GUO Z, et al. Neuroprotective effects of PPAR- $\gamma$  agonist rosiglitazone in N171-82Q mouse model of Huntington's disease[J]. Journal of Neurochemistry, 2013, 125(3):410-419.
- [6] 官志忠,高勤,桂传枝,等. 慢性氟中毒脑损伤机制探讨[J]. 中国地方病学杂志, 2011, 30(3):352-354.
- [7] 魏娜. 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, 32(3):347-350.
- [8] 桂传枝,冉龙艳,官志忠. 燃煤型氟中毒仔鼠大脑皮质超微结构改变[J]. 中国公共卫生, 2011, 27(11):393-393.

(下转第 1168 页)