

# 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

罗雨, 谢春, 张华, 谭瑛, 葛启迪

贵州医科大学公共卫生学院/环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.18805

## 摘要:

**[背景]** 氟可通过饮水、空气、食物等介质进入人体, 过量氟进入人体除了造成骨相损害, 还可通过血脑屏障在脑组织中蓄积, 造成大脑神经系统损害, 引起神经元联系减少及突触功能异常, 导致学习记忆能力的损伤等。

**[目的]** 探讨慢性氟染毒致子二代大鼠海马结构变化及其对大鼠空间学习记忆能力的影响。

**[方法]** 将16只健康清洁级SD妊娠大鼠按体重随机分为4组, 每组4只, 分别为对照(饮用水)组和60、120、240 mg/L 氟化钠暴露组, 采取自由饮水方式暴露。母鼠从妊娠第0天至子一代大鼠出生第21天(postnatal day 21, PND21)暴露; 子一代大鼠延续同组浓度从PND22暴露至PND90, 随机选取6只大鼠(雌:雄=2:1)合笼, 持续暴露至子二代大鼠PND21; 从每组中随机选取8只子二代大鼠(雌:雄=1:1), 自PND22至PND60按照同组氟化钠浓度继续进行暴露。Morris水迷宫及黑白箱实验检测子二代大鼠空间学习记忆能力; 子二代大鼠处死前收集24h尿液, 测定脑、尿中的氟水平。暴露结束处死后, 光镜和电镜下观察海马组织病理变化。

**[结果]** 与对照组比较, 中、高暴露组子二代大鼠第8周体重较轻, 各浓度氟化钠暴露组子二代大鼠脑氟和尿氟水平分别为(14.23±1.86)、(18.15±1.98)、(28.74±2.19) μg/g, (11.36±0.91)、(15.30±0.26)、(18.67±2.01) μg/L, 较对照组(7.06±0.79) μg/g、(1.89±0.23) μg/L高, 差异均有统计学意义( $P<0.01$ )。水迷宫结果显示, 与对照组相比, 在训练第2、3天, 中氟组和高氟组子二代大鼠逃避潜伏期延长, 而训练第4天, 各浓度氟化钠暴露组逃避潜伏期均延长, 差异均有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); 中氟组和高氟组子二代大鼠首次达台时间延长及穿越平台次数减少( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。黑白箱实验中, 中氟组与高氟组黑箱停留时间[(157.25±33.17)、(209.38±10.98) s]和黑箱停留时间百分比[(52.42±11.06)%、(69.79±3.67)%]均高于对照组( $P<0.01$ ), 高氟组穿箱次数较对照组降低( $P<0.01$ )。HE染色光镜观察结果显示, 各暴露组海马神经细胞出现核固缩、结构模糊、染色加深等病理改变; 电镜结果显示, 各暴露组海马神经细胞出现线粒体肿胀, 高尔基体、内质网出现不同程度扩张。

**[结论]** 持续氟暴露可损伤子二代大鼠海马神经元结构且降低其空间学习记忆能力。

**关键词:** 氟; 子二代大鼠; 海马; 学习记忆; 慢性中毒

**Effects of chronic fluoride exposure on hippocampal structure and spatial learning and memory of F2 rats** LUO Yu, XIE Chun, ZHANG Hua, TAN Ying, GE Qi-di (Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education/School of Public Health, Guizhou Medical University, Guiyang, Guizhou 550025, China)

## Abstract:

**[Background]** Fluorine can enter human body through drinking water, air, food, and other media. Excessive fluorine not only causes bone damage, but also passes through blood-brain barrier and accumulates in brain tissues, causing nervous system injury, and consequently presenting decreased neuronal connections, abnormal synaptic function, and impaired spatial learning and memory, ect.

**[Objective]** This experiment is designed to explore the effects of chronic fluoride exposure on hippocampal structure and spatial learning and memory in F2 rats.

**[Methods]** Sixteen clean SD pregnant rats were randomly divided into four groups, with four rats

## 基金项目

国家自然科学基金(81560519); 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

罗雨(1996—), 女, 硕士生;  
E-mail: 2247085815@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

2018-12-03

## 录用日期

2019-05-29

## 文章编号

2095-9982(2019)08-0767-06

## 中图分类号

R994.6

## 文献标志码

A

## ►引用

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.

## ►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18805

## Funding

This study was funded.

## Correspondence to

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

## Ethics approval

Obtained

## Competing interests

None declared

## Received

2018-12-03

## Accepted

2019-05-29

## ► To cite

LUO Yu, XIE Chun, ZHANG Hua, et al. Effects of chronic fluoride exposure on hippocampal structure and spatial learning and memory of F2 rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(8): 767-772.

## ► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18805

in each group: control (drinking water) and 60, 120, and 240 mg/L NaF groups. The pregnant rats were treated with NaF through drinking water from gestational day 0 to postnatal day 21 (PND21) of F1 rats. The F1 rats were treated with corresponding concentrations from PND22 to PND90, and six F1 rats (female: male=2:1) were randomly caged and followed the same protocol until PND21 of F2 rats. Eight F2 rats (female: male=1:1) were randomly selected from each group and treated with corresponding concentrations from PND22 to PND60. The spatial learning and memory ability of the F2 rats was tested by Morris water maze and light-dark box experiment. The levels of fluorine in the F2 rat brain and 24-h urine samples were measured. The hippocampal pathological changes were observed by HE staining and electron microscopy after the designed exposure.

**[Results]** Compared with the control group, the weights of the F2 rats of the 120 and 240 mg/L NaF treatment groups after eight weeks were decreased. Compared with the control group [(7.06±0.79) μg/g, (1.89±0.23) μg/L], the brain fluorine [(14.23±1.86), (18.15±1.98), (28.74±2.19) μg/g] and urinary fluorine levels [(11.36±0.91), (15.30±0.26), (18.67±2.01) μg/L] of the NaF treated F2 rats were increased ( $P<0.01$ ). In the Morris water maze test, compared with the control group, the escape latencies in the 120 and 240 mg/L NaF treated F2 rats on the second day and third day and in all NaF treated F2 rats on the fourth day were increased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ); the time to reach the original platform was prolonged while the frequency of platform crossings were decreased in the 120 and 240 mg/L NaF treated F2 rats ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). In the light-dark box experiment, the time in the dark box [(157.25±33.17), (209.38±10.98) s] and the percentage of time in the dark box [(52.42±11.06)%, (69.79±3.67)%] of the 120 and 240 mg/L NaF treated F2 rats were higher than those of the control group ( $P<0.01$ ), while the number of transitions of the 240 mg/L NaF treated F2 rats was reduced ( $P<0.01$ ). According to the optical microscopy observation with HE staining, compared with the control group, the NaF treated groups showed hippocampal neurons with nuclear pyknosis, hyperchromasia nucleus, and loss of structure. The electron microscopy observation showed mitochondrial swelling, as well as Golgi and endoplasmic reticulum expansion in hippocampal neurons of the NaF treated groups.

**[Conclusion]** Continuous fluorine exposure can damage the hippocampal neuron structure and reduce spatial learning and memory of F2 rats.

**Keywords:** fluorine; F2 rats; hippocampus; learning and memory; chronic intoxication

氟是人体所需微量元素之一, 摄入过量的氟会造成人体多个系统损害<sup>[1]</sup>。氟化学性质极其活泼, 与多种元素反应形成氟化物, 使其更易通过饮水、空气、食物等介质进入人体<sup>[2-3]</sup>而造成伤害, 氟进入大脑后, 在脑组织中蓄积, 造成神经系统的损害, 导致学习记忆能力损伤<sup>[4-5]</sup>。流行病学研究发现, 氟摄入量与儿童智商呈反比, 长期暴露于氟水平超标的环境中, 会引起儿童大脑损伤、智力下降<sup>[6]</sup>。

学习记忆行为是大脑的高级功能, 这一行为的主要功能区域为海马体, 海马神经元细胞在学习记忆功能发挥方面起着重要的调控作用<sup>[7]</sup>。研究发现, 海马神经元细胞异常变化与阿尔茨海默病等神经疾病的发生相关<sup>[8]</sup>。本研究考虑氟病区世居儿童学习记忆能力损伤, 建立亲代孕哺期至子二代大鼠成年前持续氟暴露动物模型, 通过 Morris 水迷宫与黑白箱实验检测大鼠神经行为改变, 观察子二代大鼠空间学习记忆能力及焦虑行为变化, 检测大鼠尿、脑中氟水平, 并通过光镜和电镜进一步观察海马结构变化, 为探讨氟暴露对学习记忆损害机制提供线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

氟化钠 (NaF, 分析纯, 中国贵州鼎国生物科技有限公司), 戊二醛 (分析纯)、四氧化钨 (分析纯, 美国 Tedpella 公司)。

Morris 水迷宫装置、黑白箱、黑白箱视频分析软件 (中国医学科学院药物研究所), ContrAA 700 连续光源原子吸收光谱仪 (德国耶拿), 微波消解仪 (ETHOSA, 中国上海新仪微波化学科技有限公司), H-7650 透射式电子显微镜 (日本日立), 倒置显微镜 (日本尼康), LKB-V/NOVA 超薄切片机 (瑞典 LKB)。

### 1.2 动物分组与暴露

选择清洁级健康 SD 妊娠大鼠 16 只, 体重为 220~250 g, 随机分为 4 组, 每组 4 只, 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动物伦理委员会批准, 编号: 1603184。实验期间, 大鼠自由摄食及饮水, 于贵州医科大学动物实验中心饲养。饲养条件: 室温 (26.5±2.0) °C、相对湿度 (60±2) %, 昼夜交替周期为 12 h。

根据课题组前期研究结果<sup>[9]</sup>, 确定该实验氟化钠暴露组质量浓度分别为 60、120、240 mg/L, 对照组为 0 mg/L, 采用自由饮水方式暴露。母鼠从妊娠第 0 天至子一代大鼠出生第 21 天 (postnatal day 21, PND21) 暴露; 子一代大鼠延续同组剂量从 PND22 暴露至 PND90 后, 随机数字法每组选取 6 只大鼠 (雌: 雄=2:1) 合笼, 持续暴露至子二代大鼠 PND21; 从每组中以完全随机法选取 8 只子二代大鼠 (雌雄各半), 自 PND22 至 PND60 按照同组浓度持续进行暴露。

### 1.3 检测指标与方法

**1.3.1 子二代大鼠体重** 每隔1周称量1次子二代大鼠体重,时间为出生至出生后第8周。

**1.3.2 Morris水迷宫实验** 子二代大鼠培养至PND60,处死前,通过Morris水迷宫测试子二代大鼠的学习记忆能力。(1)定位航行实验:测试前,将平台固定于某一象限,测试时子二代大鼠面向池壁,分别从四个象限中点入水,记录每只子二代大鼠找到平台所用时间(即逃避潜伏期),若找到平台,让其在平台上站立20s;超过60s仍未找到平台,逃避潜伏期记为60s<sup>[10-11]</sup>。训练连续进行4d。(2)空间探索实验:测试第5天,撤除平台,子二代大鼠任意选择一象限面向池壁入水,让大鼠在没有平台的情况下寻找记忆中的平台,记录子二代大鼠首次穿越平台的时间及穿越平台的次数。

**1.3.3 黑白箱实验** 处死前,通过黑白箱实验测试二代子鼠学习记忆能力及焦虑水平。实验前将大鼠单独装笼,置于安静环境中1h。开始前,开启并设置图像采集软件,取走黑白箱隔板使大鼠可在黑白箱之间自由穿过。将二代子鼠放入黑白箱中央开始计时和摄像,观察5min,每只大鼠依次实验。记录二代子鼠黑箱停留时间及穿箱次数。

**1.3.4 尿氟和脑氟** 二代子鼠处死前收集24h尿液,再将大鼠以异氟烷麻醉,心脏采血处死后迅速分离脑组织,冰上分离海马用10%甲醛固定,剩下部分于-80℃保存,脑组织经微波消解,定容。石墨炉原子吸收光谱法测定尿中和脑中的氟水平。尿氟的检出限为0.25 μg/L,回收率为96.2%~101.4%,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为1.9%~3.0%。脑氟的检出限0.25 μg/g,回收率为98.2%~104.2%,RSD为1.9%~2.6%。

**1.3.5 光镜观察海马结构变化** 固定好的海马组织经脱水、二甲苯透明、浸蜡和包埋,石蜡切片机制成4 μm厚的石蜡切片;75℃烘烤1h后HE染色,光学显微镜下观察并拍照保存。

**1.3.6 透射电镜观察海马结构变化** 将海马组织切成大小约1 mm<sup>3</sup>的组织块,于2.5%的戊二醛中固定后,再置于1%锇酸固定液中固定,乙醇、丙酮梯度脱水后,环氧树脂812浸透包埋,采用超薄切片机切片,再经醋酸铀、柠檬酸铅染色,最后透射电镜观察并拍照保存。

### 1.4 统计学分析

实验数据均采用 $\bar{x}\pm s$ 进行描述,SPSS 18.0软件

进行统计处理。体重和逃避潜伏期采用重复测量方差分析,多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),组间两两比较采用LSD-*t*法,变量间分析采用双变量相关性分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 子二代大鼠体重

至暴露结束,各组二代子鼠饮水、摄食无明显差异,活动状态良好。与对照组相比,第4周高氟组体重升高( $P<0.05$ );第8周中、高暴露组体重较对照组均降低( $P<0.01$ )。见表1。

表1 持续氟暴露对二代子鼠体重的影响( $n=8, \bar{x}\pm s, g$ )

组别	0周	2周	4周	6周	8周
对照	7.75±0.87	22.00±0.76	45.63±1.19	101.63±1.06	154.25±1.39
60mg/L NaF	7.63±0.92	21.13±0.84	44.38±1.41	98.88±1.36	158.38±2.20
120mg/L NaF	7.38±0.74	21.63±0.52	44.63±0.52	97.88±1.55	148.63±2.82**
240mg/L NaF	7.25±0.46	21.50±0.54	47.25±0.71*	98.75±2.12	145.25±3.27**
<i>F</i>	0.697	2.288	13.089	1.183	42.174
<i>P</i>	0.562	0.100	<b>0.000</b>	0.334	<b>0.000</b>

[注]与对照组比较,\*: $P<0.05$ ;\*\*: $P<0.01$ 。

### 2.2 脑氟和尿氟

由表2可见,与对照组大鼠相比,各暴露组脑氟与尿氟水平均升高( $P<0.01$ );各组二代子鼠脑氟、尿氟水平与NaF暴露浓度均呈正相关,相关系数 $r$ 分别为0.974、0.903,均 $P<0.01$ 。

表2 持续氟暴露对二代子鼠脑氟、尿氟水平的影响( $n=8, \bar{x}\pm s$ )

组别	脑氟(μg/g)	尿氟(μg/L)
对照	7.06±0.79	1.89±0.23
60mg/L NaF	14.23±1.86**	11.36±0.91**
120mg/L NaF	18.15±1.98**	15.30±0.26**
240mg/L NaF	28.74±2.19**	18.67±2.01**
<i>F</i>	204.191	337.083
<i>P</i>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>
<i>r</i>	0.974	0.903
<i>P</i>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>

[注]\*\*:与对照组比较, $P<0.01$ 。

### 2.3 定位航行实验结果

持续氟暴露二代子鼠定位航行实验结果显示,与对照组相比,在训练第2、3天,中氟组和高氟组二代子鼠逃避潜伏期延长( $P<0.05, P<0.01$ );训练第4天,各暴露组二代子鼠逃避潜伏期均延长( $P<0.01$ ),二代子鼠第2天、第3天和第4天逃避潜伏期与NaF暴露浓度呈正相关,相关系数 $r$ 分别为0.586、0.481、0.848,均 $P<0.01$ 。见表3。

表3 持续氟暴露对二代子鼠逃避潜伏期的影响 ( $n=8, \bar{x}\pm s, s$ )

组别	第1天	第2天	第3天	第4天
对照	51.34±4.28	43.83±5.35	26.39±7.78	12.25±2.11
60 mg/L NaF	51.37±2.54	47.39±5.53	30.17±4.19	17.80±1.28**
120 mg/L NaF	51.41±4.46	49.96±4.28*	36.43±6.06**	18.69±2.41**
240 mg/L NaF	51.26±4.33	52.75±3.10**	35.89±7.50**	22.79±2.24**
<i>F</i>	0.002	5.299	4.329	35.642
<i>P</i>	1.000	<b>0.005</b>	<b>0.013</b>	<b>0.000</b>
<i>r</i>	-0.009	0.586	0.481	0.848
<i>P</i>	0.963	<b>0.000</b>	<b>0.005</b>	<b>0.000</b>

[注] 与对照组比较, \* :  $P < 0.05$  ; \*\* :  $P < 0.01$ 。

## 2.4 空间探索实验结果

持续氟暴露二代子鼠空间探索实验结果显示, 与对照组比较, 中氟组和高氟组二代子鼠首次达台时间延长 ( $P < 0.01$ ), 二代子鼠首次达台时间与 NaF 暴露浓度呈正相关 ( $r=0.804, P < 0.01$ ); 中氟组与高氟组二代子鼠穿越平台次数较对照组减少 ( $P < 0.05, P < 0.01$ ), 二代子鼠穿越平台次数与 NaF 暴露浓度呈负相关 ( $r=-0.647, P < 0.01$ )。见表 4。

表4 持续氟暴露对二代子鼠空间探索实验结果 ( $n=8, \bar{x}\pm s$ )

组别	首次达台时间 (s)	穿越平台次数 (次)
对照	7.43±1.50	4.63±1.19
60 mg/L NaF	8.45±1.28	3.75±0.89
120 mg/L NaF	13.06±2.74**	3.25±1.17*
240 mg/L NaF	14.94±2.51**	1.88±1.64**
<i>F</i>	23.594	6.773
<i>P</i>	<b>0.000</b>	<b>0.001</b>
<i>r</i>	0.804	-0.647
<i>P</i>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>

[注] 与对照组比较, \* :  $P < 0.05$  ; \*\* :  $P < 0.01$ 。

## 2.5 黑白箱实验结果

持续氟暴露对二代子鼠黑白箱实验结果显示, 中氟组与高氟组二代子鼠黑箱停留时间较对照组延长 ( $P < 0.01$ ), 各组二代子鼠黑箱停留时间与 NaF 暴露浓度呈正相关 ( $r=0.827, P < 0.01$ ); 与对照组相比, 中氟组与高氟组二代子鼠黑箱停留时间百分比增加 ( $P < 0.01$ ), 各组黑箱停留时间百分比与 NaF 暴露浓度呈正相关 ( $r=0.827, P < 0.01$ ); 高氟组穿越次数较对照组减少至 ( $8.38\pm 1.06$ ) 次, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.01$ ), 二代子鼠穿箱次数与 NaF 暴露浓度呈负相关 ( $r=-0.625, P < 0.01$ )。见表 5。

## 2.6 光镜下海马病理改变

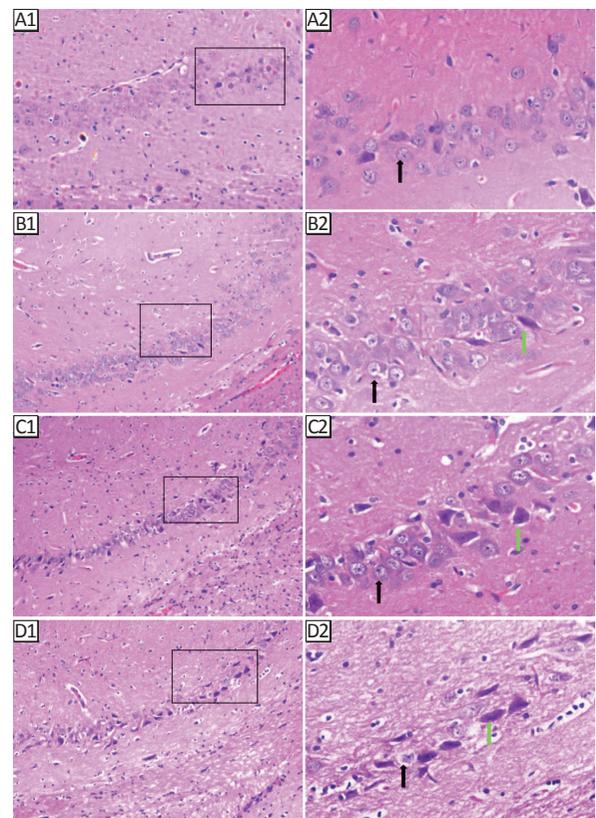
HE 染色结果显示, 对照组子二代大鼠海马结构清晰, 神经元大小一致, 排列紧密, 细胞核规则、染色淡、核仁可见; 低氟组海马区神经元出现胞浆染色

加深、细胞核固缩、结构模糊等病理变化; 随着氟暴露水平升高, 子二代大鼠海马区细胞受损程度加重, 病变神经元增多。见图 1。

表5 持续氟暴露二代子鼠黑白箱实验结果 ( $n=8, \bar{x}\pm s$ )

组别	黑箱停留时间 (s)	穿箱次数 (次)	黑箱停留时间百分比 (%)
对照	126.38±17.19	12.50±2.20	42.14±5.73
60 mg/L NaF	139.75±21.02	11.25±1.75	46.58±7.01
120 mg/L NaF	157.25±33.17**	11.13±2.42	52.42±11.06**
240 mg/L NaF	209.38±10.98**	8.38±1.06**	69.79±3.67**
<i>F</i>	21.636	6.502	21.639
<i>P</i>	<b>0.000</b>	<b>0.002</b>	<b>0.000</b>
<i>r</i>	0.827	-0.625	0.827
<i>P</i>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>	<b>0.000</b>

[注] 与对照组比较, \* :  $P < 0.05$  ; \*\* :  $P < 0.01$ 。



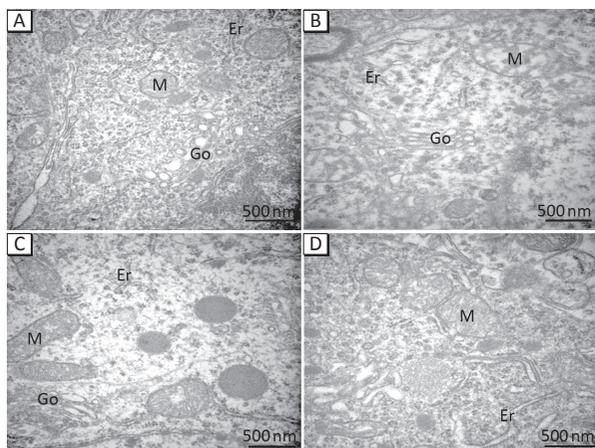
[注] A : 对照组; B : 60 mg/L NaF 组; C : 120 mg/L NaF 组; D : 240 mg/L NaF 组。1 :  $\times 100$  ; 2 :  $\times 400$ 。黑色箭头指示正常结构, 绿色箭头指示病理变化, 包括胞浆染色加深、结构模糊。

图1 持续氟暴露子二代大鼠海马病理结果 (HE)

## 2.7 透射电镜下海马组织变化

由图 2 可见, 对照组海马神经元细胞器结构清晰, 线粒体呈圆形、高尔基复合体发达、内质网堆叠排列, 突触结构 (突触前膜、突触间隙、突触后膜) 及突触细胞器结构清晰。与对照组比较, 低氟组海马细胞中线粒体轻度肿胀, 部分线粒体嵴消失成空泡样, 高尔基

复合体及粗面内质网未见明显变化,但突触结构轻度肿胀;中氟组海马细胞核形态略不规则,线粒体轻度肿胀,高尔基复合体扁平囊扩张,内质网未见明显变化;高氟组海马神经元细胞体积较大,细胞核形态略不规则,线粒体肿胀,内质网轻度扩张。



[注] A: 对照组; B: 60 mg/L NaF 组; C: 120 mg/L NaF 组; D: 240 mg/L NaF 组。Er: 内质网, 高氟组轻度扩张; M: 线粒体, 低氟、中氟组轻度肿胀, 高氟组肿胀; Go: 高尔基复合体, 中氟组扁平囊扩张。

图2 持续氟暴露子二代大鼠海马电镜观察结果

### 3 讨论

氟可通过血脑屏障,在脑中蓄积从而对神经系统造成伤害,影响大脑多种生理功能的发挥,包括学习记忆功能<sup>[12]</sup>。亲代至二代子鼠持续氟暴露,研究持续氟暴露对学习记忆功能的影响。本研究中,随着NaF浓度的升高,暴露时间的延长,子二代大鼠体重增长缓慢,提示持续氟暴露会影响生长发育。尿氟、脑氟可综合评价机体摄入氟、吸收氟、排泄氟的情况,有效反映个体对氟的负荷情况以及环境中氟的暴露水平。在本研究中,低、中、高氟暴露组子二代大鼠尿氟、脑氟水平均高于对照组,且尿氟、脑氟水平与NaF暴露浓度呈正相关,提示氟摄入后,虽可通过尿液排出,但仍有大量氟通过血脑屏障在脑内蓄积。大鼠脑中氟含量的增加会影响其神经元正常活动,损伤正常神经细胞结构,导致中枢神经功能障碍,进而影响大脑学习记忆能力<sup>[13-14]</sup>。

学习记忆是大脑的高级功能,行为变化可反映中枢神经系统受影响情况<sup>[15]</sup>。Morris水迷宫实验广泛应用于评价啮齿动物空间学习记忆能力,定位航行实验通过训练二代子鼠寻找平台来检测二代子鼠学习能力。结果显示,随着暴露水平升高,子二代大鼠逃避潜伏期较对照组延长,到训练第4天,低、中、高氟染

毒组二代子鼠逃避潜伏期均高于对照组,相关分析发现二代子鼠逃避潜伏期与NaF暴露浓度呈正相关,提示持续氟暴露可致二代子鼠学习能力下降。空间探索实验则通过二代子鼠寻找平台的时间来说明空间记忆能力情况。由空间探索实验结果可知,随着暴露水平升高,子二代大鼠首次达台时间延长,穿越平台次数减少,提示持续氟暴露损害大鼠空间记忆能力。

以一种行为学实验来评估学习记忆功能变化不够全面,本研究采用黑白箱实验来评价大鼠的焦虑水平,其主要利用老鼠喜黑厌光以及爱探究的特点来进行评定。焦虑可能引起不同程度学习记忆障碍<sup>[11]</sup>,影响记忆量甚至导致记忆偏向<sup>[16]</sup>。黑白箱实验结果显示,随着暴露水平升高,二代子鼠在黑箱停留时间延长,穿箱次数减少,高氟组二代子鼠黑箱停留时间增加,穿箱次数减少,此结果提示随着暴露水平升高,二代子鼠焦虑程度加重,可能影响二代子鼠的学习记忆能力。

海马是大脑进行学习记忆神经系统活动的重要结构,海马的损伤会直接影响大脑的学习记忆能力,造成认知功能障碍<sup>[17]</sup>,研究海马区变化对于认知学习记忆能力的退化、海马相关疾病的产生具有重要意义。为了更直观说明持续氟暴露对子二代大鼠脑功能的影响,本实验通过HE染色和透射电镜观察海马组织结构变化。HE染色结果显示,各浓度氟化钠暴露组海马神经元细胞出现大小不一、排列紊乱,胞浆染色加深、细胞核固缩、结构模糊等病理变化。提示一定剂量的氟蓄积于脑组织,引起大鼠神经系统病理学改变和脑组织损伤,对海马神经细胞造成一定损害。电镜观察结果发现,各浓度暴露组海马神经元细胞核、核仁及细胞器的超微结构均发生异常改变,高氟组可观察到线粒体肿胀。细胞器变化以线粒体肿胀为主要表现,线粒体是有氧呼吸的主要场所,为细胞活动提供能量,线粒体肿胀影响神经元细胞正常能量代谢,进而影响到海马神经功能的发挥<sup>[18]</sup>。同时,海马神经细胞突触的超微结构也发生了一定改变,推断持续氟暴露可损伤子二代大鼠海马神经元和突触,继续观察细胞结构变化,发现海马和其神经细胞突触的损伤程度随着染氟剂量的增加而加重。突触在神经系统发育与认知的过程发挥重要作用,突触的损伤影响突触可塑性,海马和其神经细胞突触可塑性是学习记忆的基础<sup>[19]</sup>,两者的损伤会直接影响大鼠的空间学习记忆能力,这些组织结构的变化提示氟中毒可能影

响大鼠海马神经突触正常功能发挥,影响神经递质传递水平,进而造成学习记忆损伤。

综上,持续氟暴露引起二代子鼠海马组织发生病理改变,损害二代子鼠学习记忆能力,其变化机制有待深入研究。

## 参考文献

- [1] 冯婧,田晓琳,董妮莎,等. 氟致内质网应激性凋亡的研究进展 [J]. 环境与职业医学, 2018, 35 (6) : 566-571.
- [2] KARN S S, NARASIMHACHARYA A V. Physiologic and metabolic benefits of formulated diets and *Mangifera indica* in fluoride toxicity [J]. J Diet Suppl, 2015, 12 (2) : 153-172.
- [3] 徐薇,马宝慧. 氟中毒对心肌组织的影响及相关信号通路变化 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (5) : 506-510.
- [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] 李明艳,佟俊旺,曾洋,等. 妊娠期和哺乳期氟、砷暴露对仔鼠生长发育和神经行为的影响 [J]. 环境与职业医学, 2014, 31 (1) : 44-47.
- [6] 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.
- [7] BOSCH S E, JEHEE J F, FERNÁNDEZ G, et al. Reinstatement of associative memories in early visual cortex is signaled by the hippocampus [J]. J Neurosci, 2014, 34 (22) : 7493-7500.
- [8] 黄鹤鸣,陈实,赵艳杰,等. 神经细胞凋亡与阿尔茨海默病大鼠模型炎症因子相关性研究 [J]. 中国医学工程, 2015, 23 (6) : 28-29.
- [9] GE Q D, 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.
- [10] 李宣珠,宋辉,陈楠,等. 甲醇28d吸入染毒对雄性大鼠神经行为的损害 [J]. 环境与职业医学, 2017, 34 (12) : 1082-1086.
- [11] 曹彬,王丹,吕懿,等. 牛磺酸对苯并[a]芘短期暴露小鼠学习记忆与焦虑样行为的影响 [J]. 毒理学杂志, 2019, 33 (1) : 33-37.
- [12] 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.
- [13] 于秋丽,邵丹丹,汪晓宇,等. 钙对母鼠氟暴露致仔鼠自主性活动和学习记忆的影响 [J]. 毒理学杂志, 2018, 32 (5) : 345-350.
- [14] 吴宇,张华,谢春,等. 妊娠期和哺乳期持续氟铝联合暴露对仔鼠海马环磷酸腺苷-蛋白激酶A-环磷酸腺苷反应元件结合蛋白信号通路的影响 [J]. 环境与健康杂志, 2015, 32 (12) : 1072-1075.
- [15] PARK S Y, JUNG W J, KANG J S, et al. Neuroprotective effects of  $\alpha$ -iso-cubebene against glutamate-induced damage in the HT22 hippocampal neuronal cell line [J]. Int J Mol Med, 2015, 35 (2) : 525-532.
- [16] 张小聪,董云英,周仁来. 认知内容特异性对高考试焦虑者工作记忆容量的影响 [J]. 中国临床心理学杂志, 2016, 24 (6) : 976-979.
- [17] FALKAI P, MALCHOW B, WETZESTEIN K, et al. Decreased oligodendrocyte and neuron number in anterior hippocampal areas and the entire hippocampus in schizophrenia: a stereological postmortem study [J]. Schizophr Bull, 2016, 42 (S1) : S4-S12.
- [18] 刘文俊,许欣竹,穆靖洲,等. 脾气虚大鼠海马神经元线粒体自噬水平及PINK1/Parkin途径的研究 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34 (1) : 341-343.
- [19] OTANI S, BAI J, BLOT K, et al. Dopaminergic modulation of synaptic plasticity in rat prefrontal neurons [J]. Neurosci Bull, 2015, 31 (2) : 183-190.

(英文编辑:汪源;编辑:汪源,宋琪;校对:王晓宇)