

分 类 号: \_\_\_\_\_

学号: M201075040

学校代码: 10487

密级: \_\_\_\_\_

华中科技大学  
硕士学位论文

**COMT 基因多态性、血浆蛋白组学与高氟**

**地区儿童智力关系的研究**

学位申请人: 张小非

学科专业: 公共卫生

指导教师: 王爱国 教授

答辩日期: 2012 年 05 月

**A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the  
Requirements for the Degree of Master**

**Studies of relationships between the polymorphism of  
COMT gene and plasma proteomic profiling and  
children's intelligence in high fluoride areas**

**M. D. Candidate: Xiaofei Zhang**  
**Major : Public Health**  
**Supervisor : Prof. Aiguo Wang**

**Huazhong University of Science & Technology**  
**Wuhan 430030, P. R. China**  
**May, 2012**

## 独创性声明

本人郑重声明，本学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果的总结。尽我所知，除文中已经标明引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本人完全意识到本人将承担本声明引起的一切法律后果。

学位论文作者签名：  
日期： 年 月 日

## 学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权华中科技大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密口，在\_\_\_\_年解密后适用本授权书。

本论文属于

不保密口。

(请在以上方框内打“√”)

学位论文作者签名：

日期：2012年5月16日

指导教师签名：

日期：2012年5月16日

## 目 录

缩略词 .....	1
摘要 .....	2
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>5</b>
前 言 .....	9
第一部分 饮水高氟对儿童智力的影响 .....	11
材料与方法 .....	11
结 果 .....	19
讨 论 .....	21
第二部分 COMT 基因多态性与儿童智力的关系 .....	23
材料与方法 .....	23
结 果 .....	26
讨 论 .....	28
第三部分 高氟暴露儿童血浆蛋白组学研究 .....	29
材料与方法 .....	29
结 果 .....	42
讨 论 .....	44
小 结 .....	46
参考文献 .....	47
综述 .....	52
综述参考文献 .....	58
附 录 .....	63
致 谢 .....	64

# 华中科技大学硕士学位论文

## 缩略词

(List of Abbreviation)

英文简称	中文名
IQ	智力水平
COMT	儿茶酚氧位甲基移位酶
MAO-B	单胺氧化酶-B
T3	三碘甲状腺原氨酸
T4	四碘甲状腺原氨酸
TSH	促甲状腺激素
PCR	聚合酶链反应
RFLP	限制性片段长度多态性
TISAB	总离子强度缓冲液
CRT-RC	中国农村联合版瑞文测试
WPPSI	韦克斯勒学前儿童和小学生智力量表
Forward primer	正向引物
Reverse primer	负向引物
NlaIII	NlaIII限制性内切酶
Hardy-Weinberg	哈迪-温伯格平衡定律

# 华中科技大学硕士学位论文

## COMT 基因多态性、血浆蛋白组学与高氟地区 儿童智力关系的研究

研究生：张小非

导师：王爱国 教授

### 摘要

氟在环境中广泛存在，人体的暴露途径主要是通过接触食物、水及含氟的牙膏等产品。另外，工业污染和燃煤污染也已成为中国地区氟暴露的主要来源。长期摄入过量氟可引起严重的公共卫生问题即氟中毒（fluorosis）。氟中毒在全球均有发生，且影响达数百万人。氟除对牙齿和骨骼产生毒性效应外，还具有神经毒性。Roholm 等发现氟对小鼠中枢神经系统具有毒性作用，使其脊髓神经纤维和小脑的外颗粒层细胞显著减少，神经元凋亡明显增加。而且，氟可导致胎鼠神经元密度和未分化神经元数目发生改变。有研究报道，氟对大鼠行为产生不良效应的严重程度与血清及大脑特定区域中氟离子浓度直接相关。人群流行病学调查表明，生活在氟中毒地区儿童的学习记忆能力和智力水平明显低于生活在正常地区的儿童。

某一地区饮水中氟含量在一定时间内是长期不变的。氟一旦被吸收进入血液，容易分布全身。在儿童，大约 80-90% 氟被保留在体内，其余主要经肾脏排出体外，即氟在 24 h 内由尿排出摄氟量的 50-92%。故血清氟浓度和尿氟浓度在一定程度上可作为人体内氟蓄积水平的参考指标。本次调查中，我们利用中国农村联合瑞文测验（CRT-RC）测试儿童智力水平（IQ），氟离子选择电极法测定饮用水、儿童血清和尿液中氟浓度，并探讨血清氟和尿氟浓度与儿童 IQ 之间的关系。

额叶前皮质的多巴胺能调节个体的认知过程、学习记忆能力和控制执行能力。儿茶酚氧甲基移位酶（COMT）是影响多巴胺能神经递质代谢的关键酶，可调节额叶前皮质内至少 60% 的多巴胺的降解。故个体 COMT 的活性变化可影响机体多巴胺的代

# 华中科技大学硕士学位论文

谢过程，从而影响个体的认知、学习过程。COMT 基因在第 158 个密码子存在一个 G/A 突变，使其编码的氨基酸由缬氨酸 (val) 变成蛋氨酸 (met)，同时该酶也变成不耐热的低活性形式。Egan 等研究发现 COMT 基因多态性与儿童认知能力之间具有相关性，但 COMT 基因多态性与氟中毒地区儿童认知能力的关系目前尚未见报道。

有研究显示，甲状腺激素水平可作为检测儿童智力低下的敏感指标。蛋白质作为生命功能的直接执行者，它比基因更能直接的反映生理过程及其变化。因此，我们利用蛋白质组学方法研究氟中毒发生发展过程中某些蛋白或多肽水平的变化，寻找差异表达蛋白，为寻找氟中毒儿童早期生物标志物提供一定依据。

## 第一部分 饮水高氟对儿童智力的影响

目的：探讨高氟地区儿童血清氟、尿氟和甲状腺激素水平与儿童智力水平的关系。

方法：收集儿童饮用水样、尿样和血液样本。利用氟离子选择电极法，放射免疫检测试剂盒和中国农村联合版瑞文测试 (CRT-RC) 测定饮水氟、儿童尿氟及血清氟浓度、血清甲状腺激素及儿童智力水平。

结果：高氟组和对照组儿童之间的饮水氟、尿氟、血清氟浓度、血清 TSH 水平和 IQ 得分均存在显著性差异 ( $P < 0.05$ )。Spearman 分析显示尿氟、血清氟浓度与儿童 IQ 得分之间存在负相关关系 ( $r_s = -0.206, P < 0.01; r_s = -0.187, P < 0.05$ )。

结论：长期摄入过量氟可影响儿童智力水平。

## 第二部分 COMT 基因多态性与儿童智力的关系

目的：探讨 COMT<sup>val158met</sup> 多态性与儿童智力水平的关系。

方法：利用限制性片段长度多态性聚合酶链反应 (PCR-RFLP) 辨别 COMT 基因多态性与儿童智力水平之间的关系。

结果：携带 val/val 基因型儿童的 IQ 得分明显高于携带 met/val、met/met 基因型儿童的水平 ( $P < 0.001$ )。

结论：val/val 的基因型表达可能对儿童的智力发展有保护作用。

# 华中科技大学硕士学位论文

---

## 第三部分 高氟暴露儿童血浆蛋白组学研究

目的：检测高氟暴露儿童血浆蛋白表达谱的改变以及相关蛋白的鉴定。

方法：高氟组 10 名儿童，对照组 10 名儿童。利用 2-DE 和 Autoflex speed™ MALDI-TOF-TOF 技术对两组儿童血浆蛋白进行分离鉴定。

结果：与对照组相比，在高氟组发现 7 个表达不同的蛋白点，经质谱共鉴定出 5 种表达上调的蛋白，包括补体 C1s 亚单位前体、 $\alpha$ -1-B 糖蛋白、血红素结合蛋白、载脂蛋白 E 前体以及免疫球蛋白轻链变异区域。

结论：氟中毒儿童血浆蛋白表达谱发生改变，为寻找氟中毒儿童的早期生物标志物提供了一定基础。

关键词：氟；儿童智力水平；COMT 基因多态性；血浆蛋白组；PCR-RFLP；2-DE；MALDI-TOF-TOF-MS

**华中科技大学硕士学位论文**  
**Studies of relationships between the polymorphism of COMT**  
**gene and plasma proteomic profiling and children's intelligence**  
**in high fluoride areas**

Master Candidate: Xiaofei Zhang

Tutor: Professor Aiguo Wang

**Abstract**

Fluorine (F) widely exists in environment with a significant increase in body burden accumulation in recent years. Internal exposure to F due to diet including food, water, fluoride-containing dental products like toothpaste and fluoride supplements, is extensively researched. Additionally, industrial pollution and coal burning have also been reported to be major sources of internal F exposure, especially in China.

It is known that excessive fluoride intake over a long period of time may result in a serious public health problem called fluorosis. In addition to well-known effects of fluorosis on skeleton and teeth, the neurotoxicity of F was also confirmed. Roholm et al found that exposure to fluoride can cause bad effects on the central nervous system in rats, generate significant reduction in myelinated nerve fibers, external granular layer in cerebellum, and increase neuronal apoptosis. In addition, alterations in the density of neurons and in the number of undifferentiated neurons were observed in the brains of fetuses therapeutically aborted in an area characterized by endemic fluorosis. It has been indicated that the severity of the adverse effects of fluoride on the behavior of rats is directly correlated to the concentrations of this ion in plasma and in specific regions of the brain. A growing number of epidemiological studies reported that the levels of mental work capacity and the Intelligence Quotient (IQ) for children who were born and raised in the areas with endemic fluorosis were found to be lower than normals.

F concentration in drinking water is long-term stable in years in a certain region. Once absorbed into the blood, fluoride readily distributes throughout the body, with the

# 华中科技大学硕士学位论文

greatest amount retained in calcium-rich areas such as bone and teeth (dentine and enamel). In infants, about 80-90% of the absorbed fluoride is retained; the other is excreted primarily via the urine. Therefore, urine F and serum F concentrations as the internal exposure index can systematically reflect the burden of F exposure in drinking water. In this study, we measured children's intelligence quotient (IQ) using Combined Raven's Test for Rural China (CRT-RC) and determined fluorine concentrations of serum and urine employing fluouin ion selective electrode, and investigated the correlations between the urine F and serum F concentrations and the children's IQ.

Studies suggested that the neurotransmitter dopamine plays an important role in human cognition. Computational modeling studies indicated that dysfunction in dopamine systems accounts for abnormal cognitive control in the prefrontal cortex. Catechol O-methyltransferase (COMT) is the major mammalian enzyme involved in the metabolic degradation of released dopamine and accounts for more than 60% of the metabolic degradation of dopamine in the frontal cortex. It is therefore plausible that genetic factors that affect COMT function may significantly influence cognition through affecting dopaminergic function. The COMT gene contains a functional polymorphism that codes for a substitution of methionine (*met*) for valine (*val*) at codon 158. The *met* allele is thermolabile and has one-fourth the enzymatic activity of the *val* allele. Egan and his colleagues found that there was a relationship between the COMT *val158met* polymorphism and cognitive function. However, the relationship between the COMT *val158met* polymorphism and cognitive function of children in fluoride area has not been reported.

At present, the study of biomarkers of children with mental retardation is rarely. Studies have shown that thyroid hormone levels can be used as a sensitive indicator of detection of mental retardation. As direct executor of life function, proteins can directly reflect the physiological process relative to genes. Therefore, we can make use of the proteomics approach to study changes of certain protein or peptide level in the development process of fluorosis to find the abnormal expressed proteins, so as to provide certain basis for identifying the biological markers of fluorosis children.

# 华中科技大学硕士学位论文

## Part I Drinking water of high F on children's IQ

**Objective:** To investigate the relationships among the children's serum F, urine F, thyroid hormone levels and children's IQ in the high fluoride areas.

**Methods:** we collected the samples of the drinking water, urine and blood and measured the F concentrations, the levels of thyroid hormone and children's IQ using F ion selective electrode, radioimmunoassay kit (RIA) and the CRT-RC.

**Results:** The concentrations of urine F and serum F, TSH values and IQ scores were significant different in children in the high fluoride group compared to those in the control group ( $P < 0.05$ ). Spearman rank correlation analysis showed negative correlations between urine F, serum F concentrations and children's IQ scores ( $r_s = -0.206, P < 0.01; r_s = -0.187, P < 0.05$ ).

**Conclusions:** The long-term intake of excessive fluoride can affect children's IQ.

## Part II The relationship between COMT gene polymorphism and children's IQ

**Objective:** To explore the relationship between COMTva1158met polymorphism and children's IQ.

**Methods:** Polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) methods were used to discern the relationship between the functional polymorphism of COMT and children's IQ.

**Results:** Children with the high-activity val/val genotype showed significantly higher IQ scores on CRT-RC Test than those with low-activity genotype.

**Conclusions:** The val/val genotype may have a protect effect on cognitive performance in children.

## Part III Proteomic analysis of plasma in children chronically exposed to fluoride

**Objective:** This study was to investigate the differences in plasma proteomic profiling between children of high F exposure and controls.

**Methods:** 10 children of high fluoride exposure and 10 children of normals were selected, respectively. Plasma proteomic profiling was analyzed by formatrix assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-TOF MS)

# 华中科技大学硕士学位论文

---

technology.

**Results:** At the high F group, we found 7 differentially expressed protein spots and five proteins were successfully identified, which were found to be upregulated.

**Conclusions:** The alterations of the plasma protein expression patterns provide certain basis for seeking sensitive effect markers of fluorosis children.

**Key words:** fluorine; children's IQ; COMT gene polymorphism; plasma proteomic; PCR-RFLP; 2-DE; MALDI-TOF-TOF-MS

# 华中科技大学硕士学位论文

## 前言

地方性氟中毒是由于长期暴露于高氟引起的<sup>[1-2]</sup>,其主要临床特点是氟斑牙和氟骨症，并在世界各地均有发生<sup>[3]</sup>。据 2000 年的统计数据，我国地氟病病区人口约 1.12 亿，其中氟斑牙患者 4060 万人，氟骨症患者 260 万人<sup>[4]</sup>，是世界上受氟危害最严重的国家之一<sup>[5]</sup>。我国目前主要的地方性氟中毒病区有饮水型、生活燃煤污染型和砖茶型病区，此外还有少数工业污染型及食用井盐引起的氟中毒病区<sup>[6-7]</sup>。

氟中毒除能导致骨骼损害外，过量氟还可通过血脑屏障进入脑组织，引起神经元功能紊乱和突触损伤，影响脑细胞的正常生理功能。动物研究显示<sup>[8-9]</sup>，饮水中氟含量过高可降低大鼠的学习记忆功能。人群流行病学调查表明<sup>[10-12]</sup>，儿童智力降低与饮高氟水有关，地氟病区儿童的学习、记忆能力及 IQ 得分明显低于正常地区儿童。

目前，相关研究成果表明<sup>[13-14]</sup>，儿童智力除受氟等环境因素影响外，还受遗传因素的影响。神经递质多巴胺对人类的认知功能起重要作用。动物实验显示<sup>[15-16]</sup>，额叶前皮质内神经递质的低速运输与认知功能障碍有关，且多巴胺能药理活性的增强可以改善依赖于额叶前皮质的特殊认知区域。COMT 是多巴胺的主要抑制酶，能分解额叶前皮质 60% 的多巴胺<sup>[17]</sup>。故影响 COMT 活性的因素可通过影响多巴胺的功能而影响个体的认知功能。COMT 基因在第 158 个密码子处具有多态性，使编码的氨基酸由缬氨酸 (val) 变成蛋氨酸 (met)<sup>[18]</sup>。met 不耐热且活性仅是 val 的四分之一。近来 Egan 及其同事报道携带低活性 met 的儿童在威斯康星卡片分类测验中认知表现好于携带 val 的儿童<sup>[19-20]</sup>。Zhang 等的研究结果与此相反<sup>[21]</sup>，他认为携带高活性 val/val 基因型儿童的 IQ 得分高于携带 met/met 基因型的儿童。他们的研究结果均说明，COMT 基因多态性与个体的认知功能之间有重要的关系，但仍需要进行进一步的研究。

到目前为止，人们对于氟暴露导致儿童智力降低的标志物的研究主要集中在甲状腺激素上，而对蛋白标志物的研究却很少。氟暴露引起蛋白表达改变的研究有助于鉴定新的暴露标志物，且能为氟毒性的分子机制提供新的见解。从这个意义上说，蛋白质组学是一个强大的分析方法，因为它允许同时研究大量蛋白。据我们所知，目前仅有两篇文献采用蛋白质组学方法研究氟暴露的相关问题<sup>[22-23]</sup>。Claudia AN 等对染氟小

## 华中科技大学硕士学位论文

鼠的肾脏进行蛋白质组分析, 鉴定出 6 种可能与新陈代谢、解毒等作用有关的蛋白质。Jian LU 等分析出 20 种表达不同的蛋白, 经鉴定其中 8 种已知蛋白包括二硫化物异构酶 ER-60、4SNc-Tudor 结构蛋白、SMC-3 蛋白、细胞周期蛋白 D1、有丝分裂原激活蛋白激酶 10 和 3 种未知蛋白, 这些蛋白被认为与细胞凋亡和氟中毒引起的其他毒性效应有关。虽然蛋白质组学在氟中毒动物实验方面取得了一些成绩, 但这一研究在氟中毒人群中尚未见报道。

因此, 本研究拟通过测定高氟和对照地区饮用水中氟含量及儿童血液、尿液中氟含量和血清甲状腺激素水平, 分析其与儿童 IQ 的关系, 并分析 COMTval158met 多态性与儿童智力水平的关系; 以及利用蛋白质组学方法检测血浆蛋白表达谱的变化, 以期寻找氟中毒儿童早期的生物标志物。

# 华中科技大学硕士学位论文

## 第一部分 饮水高氟对儿童智力的影响

临床及实验研究报道，氟可通过血脑屏障在脑组织内蓄积，引起大脑形态和功能改变，从而影响个体的智力发育<sup>[24]</sup>。高氟暴露与儿童智力降低有关<sup>[25-29]</sup>。目前，人们认为血清促甲状腺激素（TSH）水平可作为检测儿童智力水平的敏感指标。因此，本研究拟通过测定高氟组和对照组儿童IQ得分、血清、尿氟浓度及血清三碘甲状腺原氨酸（T<sub>3</sub>）、四碘甲状腺原氨酸（T<sub>4</sub>）、TSH水平，分析儿童IQ得分与血清、尿氟浓度及血清T<sub>3</sub>、T<sub>4</sub>、TSH水平的关系。

## 材料与方法

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 主要仪器

电热三用水箱：北京市医疗器械厂

低速大容量离心机DL-5型：上海安亭科学仪器厂

PXD-12型数字式离子计：上海恒磁电子科技有限公司

氟离子选择电极：上海恒磁电子科技有限公司

甘汞电极：上海恒磁电子科技有限公司

微量载样盐桥：上海恒磁电子科技有限公司

γ计数器：上海上立检测仪器厂

#### 1.2 主要试剂

氯化钾：广东西陇化工厂

氟化钠：天津市化学试剂厂

氯化钠：天津市化学试剂厂

柠檬酸三钠：天津市化学试剂厂

冰醋酸：天津市化学试剂厂

氢氧化钠：天津市化学试剂厂

T<sub>3</sub>放射免疫检测试剂盒：北方研究所

# 华中科技大学硕士学位论文

---

T<sub>4</sub> 放射免疫检测试剂盒：北方研究所

TSH 放射免疫检测试剂盒：北方研究所

## 2 主要方法

### 2.1 研究对象

天津市是我国比较有代表性的地氟病地区<sup>[30]</sup>。按照社会、自然经济因素、教育标准和地质环境等匹配的要求，随机选择饮水氟浓度低于 1.0 mg/L 地区的五年级 68 名儿童为对照组，饮水氟浓度高于 1.0 mg/L 地区的五年级 55 名儿童为高氟组，共 123 名儿童。在儿童父母或监护人提供书面知情同意书之后对其进行 IQ 测试，并采集其饮用水样和血、尿生物样本。

### 2.2 样本的采集

收集儿童家中饮用水样 10 ml 于干净的聚乙烯塑料瓶中，且 1 周之内进行分析；抽取儿童空腹静脉血 2 ml 于无抗凝剂的真空采血管中，静置 30 min 后，3000 r/min 离心 10 min。将血清转移到 EP 管中，-4℃保存，1 周内分析。在早饭前 6:00 AM-8:00 AM 期间收集儿童尿样于干净的塑料瓶中，1 周之内进行分析。

### 2.3 IQ 测试

采用《中国联合型瑞文测验图册》对儿童进行智力测验，农村儿童智力常模（CRT-C<sub>2</sub>）判定儿童智商。

《中国联合型瑞文测验》农村儿童智力常模（CRT-C<sub>2</sub>），是由天津医科大学内分泌研究所的王栋教授带领科技组在瑞文测验的基础上修订而成。瑞文测验是一种简便易行而且经济实用的智力测验，不受调查对象文化、民族及语言的限制，用时短，可用于团体测验，深受调查工作者的欢迎。

儿童测验在相对安静的教室进行，由测试人员向其讲清注意事项后，儿童在 40 min 内，独立完成图册上的作业，根据农村儿童智力常模换算出学生智商。智商是一个规模得分，可根据年龄调整。根据 CRT-RC 指导手册将一个正常的模式划分为七个类别的 IQ 等级：智力低下（IQ<69）、边缘（IQ 70-79）、中下（IQ 80-89）、中等（IQ 90-109）、中上（IQ 110-119）、优秀（IQ 120-129）、非常优秀（IQ > 130）<sup>[31]</sup>。

---

# 华中科技大学硕士学位论文

## 2.4 主要试剂的配制

### 2.4.1 NaF 标准储备液的配制:

准确称取在 120℃下烘干 1 h 的 NaF 2.2101 g, 加去离子水溶解, 定容至 1000 ml, 此标准液 F<sup>-</sup>含量为 1000 mg/L, 4℃保存备用。

### 2.4.2 NaF 标准工作液的配制:

准备量取 NaF 标准储备液 10.0 ml 用去离子水稀释定容至 1000 ml, 此标准液 F<sup>-</sup>含量为 10 mg/L, 4℃保存备用。

### 2.4.3 总离子强度缓冲液 (TISAB) 的配制:

取 114 ml 冰醋酸, 116 g 氯化钠, 58.8 g 柠檬酸三钠, 用去离子水溶解稀释混匀后, 用 10 mol/L NaOH 调节 pH 至 5.2-5.7, 定容至 1000 ml。

### 2.4.4 加标 TISAB 的配制:

准确量取 20.0 ml NaF 标准工作液, 用 TISAB 稀释定容至 1000 ml, 此缓冲液 F<sup>-</sup>含量为 0.2 mg/L。

### 2.4.5 KCL 饱和溶液的配制:

取适量 KCL, 用去离子水溶解, 并使之呈有结晶析出的过饱和状态, 4℃保存备用。

## 2.5 方法

### 2.5.1 饮水氟浓度的测定<sup>[32]</sup>

#### (1) 电极安装:

将氟离子电极和甘汞电极安装在电极夹上, 氟离子电极接离子活度计的电极插口, 甘汞电极接 mV 端子。

#### (2) 标准工作曲线的绘制:

准确配制氟浓度分别为 0.00, 0.20, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00, 10.00 mg/L 的系列溶液。分别吸取 5 ml 浓度为 0.00, 0.20, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00, 10.00 mg/L 的氟化钠标准溶液于烧杯中, 加入 5 ml TISAB, 混匀。插入甘汞和电极氟离子选择电极, 放于电磁搅拌器上, 在搅拌器下读取点位置 E (每分钟电位值改变小于 0.5 mV)。

#### (3) 水氟测定:

# 华中科技大学硕士学位论文

准确量取 5 ml 水样于烧杯中，再加入 5 ml TISAB，混匀，按上法测定电位值。

## (4) 结果计算：

水氟含量 =  $10^{[\frac{E-a}{b}]}$ ，式中 a 为直线回归方程的截距，b 为直线回归方程的斜率。

### 2.5.2 尿氟的测定<sup>[32]</sup>

#### (1) 电极安装：

将氟离子电极和甘汞电极安装在电极夹上，氟离子电极接离子活度计的电极插口，甘汞电极接 mV 端子。

#### (2) 标准工作曲线的绘制：

准确配制氟浓度分别为 0.00, 0.20, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00, 10.00 mg/L 的系列溶液。分别吸取 5 ml 浓度为 0.00, 0.20, 0.50, 1.00, 2.00, 5.00, 10.00 mg/L 的氟化钠标准溶液于烧杯中，加入 5 ml TISAB，混匀。插入甘汞和电极氟离子选择电极，放于电磁搅拌器上，在搅拌器下读取点位置 E（每分钟电位值改变小于 0.5 mV）。

#### (3) 尿氟测定：

准确量取 5 ml 尿样于烧杯中，再加入 5 ml TISAB，混匀，按上法测定电位值。

#### (4) 结果计算：

尿氟含量 =  $10^{[\frac{E-a}{b}]}$ ，式中 a 为直线回归方程的截距，b 为直线回归方程的斜率。

### 2.5.3 血清氟的测定<sup>[33]</sup>

#### (1) 电极安装：

将盐桥（内冲液为饱和 KCl 溶液）的载样平台朝上与氟离子电极对接，使两个晶膜面微微相碰，甘汞电极向下插于盐桥的另一端内充液中。内充液面高于载样平台表面 1-4 mm，其他仪连接与测尿氟时相同。

#### (2) 标准工作曲线的绘制：

准确配制氟浓度分别为 0.00, 0.20, 0.40, 1.00, 2.00, 4.00 mg/L 的系列溶液。测定时分别以 1:1 的比例稀释混匀。用微量加样器吸取 10 μl 待测样液，加于盐桥的载样平台上，轻轻放下氟离子电极使之微微接触样液。当 30 s 内电位值变化小于 1 mV 时视为平衡点，读取电位值。每份样品如此重复 4 次，以最后 1 次测定值为准。每次测定前用滤纸将电极和载样平台表面擦干净。由低浓度到高浓度依次测出其电位值。

# 华中科技大学硕士学位论文

---

## (3) 加标本底值的测定:

取 30  $\mu\text{l}$  去离子水与 30  $\mu\text{l}$  加标 TISAB 混匀, 同上法测定其电位值, 记为  $E_0$ 。

## (4) 血样测定:

取 30  $\mu\text{l}$  血清与 30  $\mu\text{l}$  加标 TISAB 混匀, 同上法测定其电位值, 记为  $E$ 。测定不同样品前, 电极和盐桥载样平台表面应冲洗并用滤纸擦干净。每测 10 个样本, 加测一质控标准样。

## (5) 结果计算:

血清氟含量 =  $10^{\frac{E-a}{b}} - 10^{\frac{E_0-a}{b}}$ , 公式中  $a$  为直线回归方程的截距,  $b$  为直线回归方程的斜率。

## 2.5.4 血清 $T_3$ 值的测定

### (1) 试剂准备、使用方法和保存

#### ① $T_3$ 标准品:

冻干品, 使用前将标准分别准确地加入蒸馏水溶解, 其中 0 标准品用 1.0 ml 蒸馏水溶解, 其它标准品用 0.5 ml 蒸馏水溶解。溶解 15 min 后摇匀方可使用。溶解后其浓度分别为 0, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 ng/ml。标准复溶后 2-8°C 保存可稳定 42 天。

#### ② $^{125}\text{I}-T_3$ :

液体, 直接使用, 加样前摇匀。

#### ③ 羊抗- $T_3$ 抗体:

冻干品, 使用前用蒸馏水溶解。

#### ④ $T_3$ 驴抗羊免疫分离剂:

液体, 直接使用, 但加样前必须摇匀。

#### ⑤ $T_3$ 质控血清:

冻干品, 使用前每瓶准确地加入 0.5 ml 蒸馏水溶解。

### (2) 测定步骤

取适量的圆底聚苯乙烯试管, 并按 NSB,  $S_0-S_5$  和待测样品管编号, 按下表 1-1 加样。

# 华中科技大学硕士学位论文

表 1-1 血清 T<sub>3</sub> 测定步骤

管别/试剂	总 T 管	NSB 管	S <sub>0</sub> 管	S <sub>1-5</sub> 管	质控或样品管
T <sub>3</sub> 标准品	—	50	50	—	—
T <sub>3</sub> 标准品 S <sub>1-5</sub>	—	—	—	50	—
质控血清或待测样品	—	—	—	—	50
<sup>125</sup> I-T <sub>3</sub>	200	200	200	200	200
蒸馏水	—	100	—	—	—
羊抗-T <sub>3</sub> 抗体	—	—	100	100	100
	充分摇匀, 37°C 水浴 1 h				
T <sub>3</sub> 驴抗羊免疫分离剂	—	500	500	500	500
充分摇匀, 室温放置 15 min, 3500 r/min 离心 15 min, 吸弃上清液, 在 $\gamma$ 计数器上测定个沉淀管的放射性计数。					

(3) 联机处理数据

## 2.5.5 血清 T<sub>4</sub> 值的测定

(1) 试剂准备、使用方法和保存

① T<sub>4</sub> 标准品:

冻干品, 使用前将标准分别准确地加入蒸馏水溶解, 其中 0 标准品用 1.0 ml 蒸馏水溶解, 其它标准品用 0.5 ml 蒸馏水溶解。溶解 15 min 后摇匀方可使用。溶解后其浓度分别为 0, 20, 40, 80, 160, 320 ng/ml。标准复溶后 2-8°C 保存可稳定 42 天。

② <sup>125</sup>I-T<sub>4</sub>:

液体, 直接使用, 加样前摇匀。

③ 羊抗-T<sub>4</sub> 抗体:

冻干品, 使用前用蒸馏水溶解。

④ T<sub>4</sub> 驴抗羊免疫分离剂:

液体, 直接使用, 加样前须摇匀。

⑤ T<sub>4</sub> 质控血清:

# 华中科技大学硕士学位论文

冻干品，使用前每瓶准确地加入 0.5 ml 蒸馏水溶解。

## (2) 测定步骤

取圆底聚苯乙烯试管若干，用记号笔编号 NSB, S<sub>0</sub>-S<sub>5</sub> 和待测样品管，然后用微量加样器按下表 1-2 加样。

表 1-2 血清 T<sub>4</sub> 测定步骤

管别/试剂	总 T 管	NSB 管	S <sub>0</sub> 管	S <sub>1-5</sub> 管	质控或样品管
T <sub>4</sub> 标准品	—	50	50	—	—
T <sub>4</sub> 标准品 S <sub>1-5</sub>	—	—	—	50	—
质控血清或待测样品	—	—	—	—	50
<sup>125</sup> I-T <sub>4</sub>	200	200	200	200	200
蒸馏水	—	100	—	—	—
羊抗-T <sub>3</sub> 抗体	—	—	100	100	100
充分摇匀，37℃水浴 45 min					
T <sub>4</sub> 驴抗羊免疫分离剂	—	500	500	500	500
充分摇匀，室温放置 15 min, 3500 r/min 离心 15 min, 吸弃上清液，在 $\gamma$ 计数器上测定个沉淀管的放射性计数。					

## (3) 联机处理数据

### 2.5.6 血清 TSH 值的测定

#### (1) 试剂准备、使用方法和保存

##### ① TSH 标准品：

冻干品，使用前准确地加入 1.0 ml 蒸馏水，充分溶解后摇匀使用。溶解后其浓度分别为 0, 1, 3, 9, 27, 81 ng/ml。标准复溶后 2-8℃保存可稳定 42 天。

##### ② <sup>125</sup>I-TSH：

冻干品，用缓冲液溶解。

##### ③ 兔抗-TSH 抗体：

冻干品，用缓冲液溶解。

# 华中科技大学硕士学位论文

④ 驴抗兔免疫分离剂：

液体，加样前须摇匀。

⑤ TSH 质控血清：

冻干品，使用前每瓶准确地加入 0.5 ml 蒸馏水溶解。

## (2) 测定步骤

取圆底聚苯乙烯试管若干，用记号笔编号 NSB, S<sub>0</sub>-S<sub>5</sub> 和待测样品管，然后用微量加样器按下表 1-3 加样。

表 1-3 血清 TSH 测定步骤

管别/试剂	总 T 管	NSB 管	标准管	样品管	质控血清
TSH 缓冲液	—	300	—	—	—
TSH 标准品	—	—	200	—	—
样品或血清	—	—	—	200	200
兔抗-TSH	—	—	100	100	100
摇匀，2-8℃过夜或 37℃水浴 2.5 h					
<sup>125</sup> I-TSH	100	100	100	100	100
摇匀，37℃水浴 2 h					
驴抗兔	—	500	500	500	500
摇匀，室温置 20-30 min, 3500 r/min 离心 15 min, 弃上清, $\gamma$ 计数器上测定放射性计数。					

## (3) 联机处理数据

### 2.6 数据处理

采用 SPSS 11.5 软件包进行统计学分析，组间比较采用 t 检验，两变量间的关系采用直线相关分析。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

# 华中科技大学硕士学位论文

---

## 结 果

### 1 高氟组与对照组儿童的 IQ 得分

对照组与高氟组儿童的平均年龄分别为 11.3 岁, 11.6 岁, 两组年龄之间无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。两组儿童的 IQ 得分有统计学差异 ( $P < 0.001$ ) (见表 1-4)。就性别而言, 的女童 IQ 得分在高氟组和对照组之间有统计学差异 ( $P < 0.001$ ), 而男童 IQ 得分无差异 ( $P > 0.05$ ) (见表 1-5)。两组所有儿童 IQ 得分在性别之间均无统计学差异 (如表 1-6)。在对照组, 47.1% 儿童的 IQ 得分主要分布在优秀以上 ( $IQ \geq 120$ ), 而在高氟组仅有 21.8%。对照组儿童的 IQ 得分分布在 110-119 之间 (29%), 而高氟组儿童 IQ 得分主要分布在 90-109 之间 (40%)。在高氟组有 9.1% 的儿童智力表现为中下 ( $IQ \leq 89$ ), 而在对照组却仅有 2.9% (见图 1-1)。

表 1-4 对照组和高氟组儿童的 IQ 得分

组别	人数	IQ 值 ( $\bar{x} \pm s$ )
对照组	68	117.75 $\pm$ 12.744
高氟组	55	108.69 $\pm$ 13.514 **

注: 与对照组相比, \*\* $P < 0.001$

表 1-5 对照组和高氟组内不同性别儿童 IQ 得分

组别	IQ 得分 ( $\bar{x} \pm s$ )	
	male	female
对照组	115.69 $\pm$ 14.573	119.28 $\pm$ 11.145
高氟组	111.63 $\pm$ 10.547	105.86 $\pm$ 15.529 **

注: 与对照组相比, \*\* $P < 0.001$

表 1-6 不同性别儿童 IQ 得分

组别	人数	IQ 得分 ( $\bar{x} \pm s$ )
male	56	113.73 $\pm$ 12.841
female	67	113.67 $\pm$ 14.652

# 华中科技大学硕士学位论文

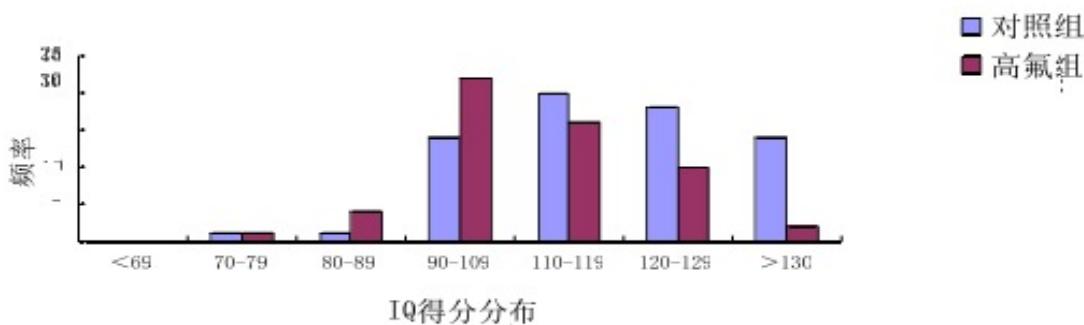


图 1-1 对照组和高氟组儿童 IQ 得分分布

## 2 高氟组和对照组饮水氟、儿童尿氟及血清氟含量

高氟组的饮水氟浓度为  $1.40 \pm 1.30 \text{ mg/L}$ ，对照组的饮水氟浓度为  $0.63 \pm 0.07 \text{ mg/L}$ ，两者之间有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。

尿氟浓度 ( $2.19 \pm 0.93 \text{ mg/L}$  VS  $0.80 \pm 0.29 \text{ mg/L}$ )、血清氟浓度 ( $0.20 \pm 0.09 \text{ mg/L}$  VS  $0.04 \pm 0.04 \text{ mg/L}$ ) 在高氟组儿童明显高于对照组儿童 ( $P < 0.001$ ) (见表 1-7)。

表 1-7 对照组与高氟组饮水氟、尿氟、血清氟含量 ( $\bar{x} \pm s, \text{mg/L}$ )

组别	人数	水氟	尿氟	血清氟
对照组	68	$0.63 \pm 0.07$	$0.80 \pm 0.29$	$0.04 \pm 0.04$
高氟组	55	$1.40 \pm 1.30^*$	$2.19 \pm 0.93^{**}$	$0.20 \pm 0.09^{**}$

注：与对照组相比， $^*P < 0.05$ ， $^{**}P < 0.001$ 。

## 3 高氟组和对照组儿童血清 $T_3$ 、 $T_4$ 、TSH 水平

高氟组与对照组之间儿童血清 TSH 水平 ( $3.7 \pm 2.12 \text{ ng/ml}$  VS  $2.67 \pm 0.67 \text{ ng/ml}$ ) 有统计学差异，而血清  $T_3$  水平 ( $2.22 \pm 0.37 \text{ ng/ml}$  VS  $2.15 \pm 0.43 \text{ ng/ml}$ )、血清  $T_4$  水平 ( $85.7 \pm 17.11 \text{ ng/ml}$  VS  $90.8 \pm 11.92 \text{ ng/ml}$ ) 无差异 (见表 1-8)。

# 华中科技大学硕士学位论文

表 1-8 对照组与高氟组  $T_3$  值、 $T_4$  值、TSH 值 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/ml)

组别	$T_3$ 值	$T_4$ 值	TSH 值
对照组	$2.15 \pm 0.43$	$90.8 \pm 11.92$	$2.67 \pm 0.67$
高氟组	$2.22 \pm 0.37$	$85.7 \pm 17.11$	$3.7 \pm 2.12^*$

注：与对照组相比， $^*P < 0.05$

## 4 相关分析

Spearman 等级相关分析显示水氟与尿氟、血清氟之间存在正相关关系 ( $r_s=0.372$ ,  $P < 0.05$ ;  $r_s=0.2378$ ,  $P < 0.05$ )，尿氟、血清氟浓度与儿童 IQ 得分之间存在显著的负相关关系 ( $r_s= -0.155$ ,  $P < 0.05$ ;  $r_s= -0.154$ ,  $P < 0.05$ )。

## 讨 论

一系列研究表明，高氟暴露可对儿童产生神经毒效应。在 PubMed 数据库中 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) 对氟和智力进行搜索显示，这种相关性研究仅在中国地区进行，西方国家很少。

本研究发现，生活在高氟地区的儿童 IQ 得分明显低于正常地区的儿童，这与 Trivedi MH 等的发现一致<sup>[34]</sup>。对这两个地区的横向研究数据综合分析表明，血清氟浓度、尿氟浓度与儿童 IQ 得分相关。随着儿童血清氟、尿氟浓度升高，儿童的 IQ 得分降低。虽然有研究认为，甲状腺激素可作为儿童 IQ 水平的指标，但在我们的研究中，高氟组和对照组儿童之间的血清  $T_3$ 、 $T_4$  水平无统计学差异。血清 TSH 水平虽有统计学差异，但两组儿童的血清 TSH 水平均在正常值水平内，这可能是由于高氟抑制甲状腺的过氧化物酶及甲状腺激素和合成与分泌等环节，机体通过负反馈调节作用促进下丘脑促甲状腺激素释放激素 (TRH) 分泌，从而使 TSH 分泌增加。氟可穿过血脑屏障，对婴儿和儿童的神经系统功能产生影响<sup>[35-37]</sup>。Guan 及其他研究发现母亲摄入过量氟可使胎儿神经系统受到损害<sup>[38-39]</sup>。Wang 等<sup>[40]</sup>对 4-7 岁儿童进行 WPPSI (韦克斯勒学前儿童和小学生智力量表) 测试结果表明高氟摄入主要与行为表现 IQ 有关而不是与言语 IQ 有关。CRT-RC 测验是测试观察能力和逻辑思考能力的而不是语言能

## 华中科技大学硕士学位论文

力<sup>[41-42]</sup>。我们的研究结果表明，血清氟浓度对儿童行为表现的 IQ 有影响，但不能提供关于言语的 IQ 的信息，这与 Wang 和 Guo 等的研究一致<sup>[40, 43]</sup>。

总之，我们发现在饮水型氟中毒地区，血清氟浓度、尿氟浓度与儿童 IQ 得分之间存在负相关关系。然而仍需要在不同的人口进行进一步的研究，以确定在不依赖于家庭收入和父母教育水平的条件下，儿童 IQ 得分与氟摄入之间是否存在关系。另外，需要进一步扩大样本量确认我们的研究结果。

# 华中科技大学硕士学位论文

## 第二部分 COMT 基因多态性与儿童智力的关系

神经递质多巴胺被认为与人类的认知功能有关，而 COMT 对多巴胺的代谢性降解起重要作用，故个体 COMT 活性的变化，可影响到机体内多巴胺的代谢过程，进而影响到个体的认知功能<sup>[44]</sup>。COMT 基因在第 158 个密码子存在一个 G → A 突变，使编码的氨基酸由缬氨酸（val）变成蛋氨酸（met），同时 COMT 变成不耐热的低活性形式<sup>[45]</sup>，即存在 val/val、met/val、met/met 三种基因型。本文拟通过 PCR-RFLP 方法分析 COMT 基因型与儿童智力水平的关系。

## 材料与方法

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 主要仪器

TX400Z型电热蒸汽压力消毒锅：上海三申医疗器械有限公司

低速大容量离心机DL-5型：上海安亭科学仪器厂

5804R低温高速离心机：德国Eppendorf公司

电热三用水箱：北京市医疗器械厂

PTC-200 PCR 仪：美国MJ Research公司

水平电桥式电泳槽：北京六一仪器厂

DYY-III7型电泳仪：北京六一仪器厂

Biometra TI 1 BDA 凝胶成像系统：德国Biometra公司

#### 1.2 主要试剂

全血DNA基因组提取试剂盒：北京天根生物科技有限公司

无水乙醇（分析纯）：上海试剂二厂

三羟甲基氨基甲烷（Tris-Base）：美国Amresco公司

乙二胺四乙酸二钠（分析纯）：上海试剂二厂

### 2 主要方法

#### 2.1 研究对象

# 华中科技大学硕士学位论文

采集儿童的空腹静脉血 1 ml 于 EDTA 抗凝的真空采血管中，充分震荡混匀，-80 °C 冻存。

## 2.2 主要试剂的配制

### 2.2.1 DEPC 水的配制

取 100 μl DEPC 溶解于 99.9 ml 三蒸水中，充分混匀，待充分溶解后高压蒸汽灭菌，4 °C 保存备用。

### 2.2.2 引物的配制

引物母液：将引物管低速离心，保证粉末至于管底，轻柔打开 Ep 管盖子，加入适量 DEPC 水，使母液终浓度为 100 pmol/μl。

引物工作液：将引物母液稀释 10 倍即得到引物工作液，工作浓度 10 pmol/μl。

### 2.2.3 10×TBE 电泳缓冲液

精确称量 Tris Base 121 g、硼酸 51.35 g、EDTA-Na<sub>2</sub> 3.72 g，800 ml 三蒸水溶解，定容至 1000 ml，室温保存。使用时稀释至 0.5×，作为 DNA 电泳缓冲液。

## 2.3 PCR 路线

### 2.3.1 按照天根 DNA 的提取试剂盒说明书进行

- (1) 取 200 μl 全血于 1.5 ml 离心管中。
- (2) 加入 20 μl 蛋白酶 K 溶液，混匀。
- (3) 加 200 μl 缓冲液 GB，充分颠倒混匀，56 °C 放置 10 min，期间颠倒混匀数次。
- (4) 加 200 μl 无水乙醇，充分颠倒混匀，此时可能会出现絮状沉淀。
- (5) 将上一步所得溶液和沉淀都加入一个吸附柱 CB3 中（吸附柱 CB3 放入收集管中），12000 rpm 离心 30 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CB3 放入收集管中。
- (6) 向吸附柱 CB3 中加入 500 μl 缓冲液 GD，12000 rpm 离心 30 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CB3 放入收集管中。
- (7) 向吸附柱 CB3 中加入 700 μl 漂洗液 PW，12000 rpm 离心 30 s，倒掉收集管中的废液，将吸附柱 CB3 放入收集管中。
- (8) 向吸附柱 CB3 中加入 500 μl 漂洗液 PW，12000 rpm 离心 30 s，倒掉收集管中的废液。

# 华中科技大学硕士学位论文

(9) 将吸附柱 CB 3 放回收集管中, 12000 rpm 离心 2 min, 倒掉废液。将吸附柱 CB 3 置于室温放置数分钟, 以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

(10) 将吸附柱 CB 3 放于 1.5 ml 离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加 60 μl 洗脱缓冲液 TB, 室温放置 5 min, 12000 rpm 离心 2 min, 将溶液收集到离心管中。

(11) 将离心得到的溶液再加入吸附柱 CB 3 中, 室温放置 2 min, 12000 rpm 离心 2 min, 将溶液收集到离心管中。

(12) 将得到的 DNA 进行分装, -20℃ 冰箱保存备用。

## 2.3.2 PCR 扩增

(1) 根据 PCR mix 说明书配制反应体系 (如表 2-1)

表 2-1 PCR mix 反应体系

试剂	用量 (μl)
PCR mix	10
Forward primer	1
Reverse primer	1
DNA	2
Free water	Up to 20

(2) 轻柔混匀, 稍加离心, 置于 PCR 仪中, PCR 反应条件: 预变性, 94℃, 90 s, 然后进行 40 个循环: 94℃, 30 s; 60℃, 30 s; 72℃, 30 s, 之后 72℃, 30 s, 4℃ 终止。

(3) PCR 引物由上海生工生物工程有限公司设计并合成, 其引物信息见下表 2-2。

表 2-2 PCR 引物信息

Gene name	Primer sequence	Product length
COMT	F 5'-GCCCGCCTGCTGTCACC-3' R 5'-CTGAGGGGCCTGGTGTAGTG-3'	218bp

(4) PCR 产物立刻进行酶切反应, 或-20℃ 保存备用。

# 华中科技大学硕士学位论文

## 2.4 酶切反应

2.4.1 按照 fermenta 公司酶切试剂操作说明在冰上配制酶切反应体系(如表 2-3)

表 2-3 酶切体系

成分	用量 ( $\mu$ l)
PCR 产物	10
Loading buffer	2
Free water	7
NlaIII 内切酶	1

2.4.2 轻柔混匀，稍加离心，置于 37℃ 恒温水浴箱中，孵育 6 h。

2.4.3 酶切结束后于每个 PCR 管中加入 5  $\mu$ l 的 6×Loading buffer。

2.4.4 在电压为 150 V，电流 100 mA 条件下，用 4.5% 琼脂糖凝胶电泳 30 min 后，置凝胶电泳成像系统下观察结果，并分析基因型。

2.4.5 COMT 等位基因 A (met) 的酶切片段为 114bp, 70bp, 54bp；等位基因 G (val) 的酶切片段为 96bp, 70bp, 54bp, 18bp。COMT 三种基因型的酶切片段分别为：val/val (GG) 基因型 (96 bp, 70 bp, 54 bp, 18 bp)、met/met (AA) 基因型 (114 bp, 70 bp, 54 bp) 和 met/val 基因型 (GA) (114 bp, 96 bp, 70 bp, 54 bp, 18 bp)。

## 结 果

高氟组和对照组儿童的等位基因和基因型频率分布见表 2-4。基因型分布在高氟组和对照组均符合 Hardy-Weinberg 平衡定律(对照组： $\chi^2=0.163$ ,  $P > 0.05$ ；高氟组： $\chi^2=0.444$ ,  $P > 0.05$ )，说明我们抽取的样本对该人群具有代表性。在两组儿童中，等位基因 met 频率高于等位基因 val 频率，在对照组 met/met 基因型最多，其次是 met/val 基因型和 val/val 基因型，而在高氟组，则分别是 met/val、met/met、val/val。将 met/val 与 val/val 两种基因型的数据综合分析，COMT 基因型在对照组和高氟组儿童中无统计学差异 ( $\chi^2=2.385$ ,  $P > 0.05$ )，等位基因频率之间亦无统计学差异 ( $\chi^2=1.905$ ,  $P > 0.05$ )。基因型之间的方差比较结果显示：对照组中 val/val 基因型个体的智力水平明显高于 met/val、met/met 基因型个体智力水平 ( $P < 0.001$ )；高氟组中 val/val 基因型

## 华中科技大学硕士学位论文

个体智力水平高于 met/met 基因型个体智力水平 ( $P < 0.05$ )；将所有数据综合分析结果显示，val/val 基因型个体智力水平明显高于 met/val、met/met 基因型个体智力水平 ( $P < 0.001$ ) (见表 2-5)，说明 COMT 基因多态性与儿童智力水平有关，高活性 val/val 基因型可能对儿童智力发展有保护作用。

表 2-4 对照组和高氟组儿童的基因型和等位基因频率分布

组别	基因型分布 <sup>a</sup> (%)			等位基因频率 <sup>b</sup> (%)	
	met/met	met/val	val/val	met	val
对照组	45.8	41.7	12.5	66.7	33.3
高氟组	23.8	57.1	19.0	52.4	47.6

注：<sup>a</sup> $\chi^2 = 2.385, P > 0.05$ ；<sup>b</sup> $\chi^2 = 1.905, P > 0.05$

表 2-5 COMT 三种基因型 IQ 均值

基因型	IQ 值		
	对照组	高氟组	Total
met/met	107.18 <sup>**</sup>	98.80 <sup>*</sup>	104.56 <sup>**</sup>
met/val	107.80 <sup>**</sup>	101.58	104.41 <sup>**</sup>
val/val	123	109	115

注：与 val/val 基因型相比，<sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.001$ 。

表 2-6 COMT 等位基因频率和基因型频率

COMT	Mela	Female	Total
等位基因			
met	0.53	0.64	0.6
val	0.47	0.36	0.4
基因型	0.25	0.41	0.36
met/met	0.56	0.45	0.49
met/val	0.19	0.14	0.15
val/val	0.25	0.41	0.36

# 华中科技大学硕士学位论文

---

## 讨 论

在高氟组和对照组的儿童中, COMT 等位基因 met 和 val 的频率分别为 0.6 和 0.4, 在不同性别中无统计学差异 ( $\chi^2=4.0, P > 0.05$ ) ; 其中三种基因型频率分别为 met/met 0.49、met/val 0.15、val/val 0.36, 在性别方面也无差异 ( $\chi^2=4.0, P > 0.05$ ) (如表 2-6) ; 对 COMT 基因频率进行 Hardy-Weinberg 平衡检验, 结果显示 COMT 基因频率分布符合 Hardy-Weinberg 平衡 ( $\chi^2=0.015, P > 0.05$ ), 说明我们抽取的样本人群具有代表性。

我们还对两组人群的 COMT 基因多态性结构与地域之间的关系进行了研究, 比较了对照组和高氟组两组人群的 COMT 基因多态性结构结果, 经卡方检验, 两组的 COMT 等位基因 ( $\chi^2=1.905, P > 0.05$ ) 及其基因型 ( $\chi^2=2.385, P > 0.05$ ) 结构相吻合, 无显著性差异, 即在对照组和高氟组两组人群中, COMT 基因多态性结构无差异。

按 COMT 不同基因型可将儿童分为 met/met、met/val、val/val 三组, 因为已有报道 COMT 等位基因属于共显性遗传, 所以不同基因型的 COMT 在机体内的活性是有区别的, 在此我们通过研究不同 COMT 基因型儿童的智力差异, 探索儿童智力与 COMT 基因型之间的关系 (如表 2-5)。三种不同基因型的儿童, 用单因素方差分析 (ANOVA) 检验, met/met、met/val、val/val 的 COMT 基因型儿童的智力测验成绩有统计学差异, 高活性的 val/val 基因型儿童的智力水平明显高于 met/met、met/val 基因型的儿童智力水平, 说明高活性的 val/val 基因型对儿童智力发展有保护作用, 这与 Zhang 等的研究结果一致<sup>[21]</sup>。

# 华中科技大学硕士学位论文

## 第三部分 高氟暴露儿童血浆蛋白组学研究

地方型氟中毒是我国最为严重的公共卫生问题之一，其流行特征已基本明确，但其具体的发病机制还不十分清楚。由于地理特征和生活习惯以及经济状况的原因，针对外环境的降氟措施还不能彻底落实，这就要求我们从氟中毒的发病机制入手制定相应的防治措施控制氟中毒的发生并减轻其病情。这给蛋白质组学的研究提供了广阔的应用空间。因此，本文拟通过蛋白质组学方法研究氟中毒发生发展过程中某些蛋白或多肽水平的变化，寻找差异表达蛋白，确定与氟中毒相关的蛋白质，寻找氟中毒儿童的早期生物标志物。

## 材料与方法

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 主要仪器

超净工作台：江苏苏州净化设备有限公司

超声仪：宁波新芝生物科技股份有限公司

分光光度计：上海光谱仪器有限公司

冷冻离心机：珠海黑马医学仪器有限公司

电泳槽：美国 GE 公司

等电聚焦仪：美国 GE 公司

真空干燥机：上海一恒科学仪器有限公司

扫描仪：中国 UMAX 公司

干胶条（24cm, pH4-7）：美国 BIORAD 公司

#### 1.2 主要试剂

碳酸氢铵：美国 Sigma 公司

血清去高分度蛋白试剂盒：美国 Sigma 公司

胎牛血清标准品（BSA 浓度为 5ug/ $\mu$ l）：美国 Sigma 公司

N,N'-亚甲基双丙烯酰胺（N,N'-methylenebisacrylamide）：美国 Sigma 公司

## 华中科技大学硕士学位论文

---

尿素 (Urea) : 英国 Amersham 公司

硫脲 (Thiourea) : 英国 Amersham 公司

过硫酸铵 (AP) : 英国 Amersham 公司

碘乙酰胺 (IAA) : 英国 Amersham 公司

NN,N'-四甲基乙二胺 (TEMED) : 英国 Amersham 公司

胰酶: 美国 Amresco 公司

Tris-base: 美国 Amresco 公司

三氟乙酸 (TFA) : 美国 Amresco 公司

甘氨酸 (Glycine) : 美国 Amresco 公司

二硫苏糖醇 (DTT) : 美国 Amresco 公司

丙烯胺 (Acylamide) : 美国 Amresco 公司

SDS (Promega, 公司) : 美国 Amresco 公司

蔗糖 (Sucrose) : 上海生工生物技术有限公司

Tris: 上海生工生物技术有限公司

EDTA: 上海生工生物技术有限公司

氯化钾: 上海生工生物技术有限公司

丙酮 (Acetone) : 上海生工生物技术有限公司

乙酸铵 (Ammonium acetate) : 上海生工生物技术有限公司

HCl: 广州化学试剂厂

75%乙醇: 广州化学试剂厂

甲醇: 天津大茂化学试剂厂

磷酸: 天津大茂化学试剂厂

冰醋酸: 天津大茂化学试剂厂

水饱和正丁醇: 天津大茂化学试剂厂

G250: 加拿大 Bio Basic Inc 公司

乙腈 (CAN) : 美国 GE 公司

覆盖油 (cover oil) : 美国 GE 公司

---

# 华中科技大学硕士学位论文

IPG Buffer (pH4-7)：美国 GE 公司

Bromophenol blue：加拿大 Bio Basic Inc 公司

Milli Q 水，HCCA（基质）美国 ABI 公司

普通琼脂糖：西班牙 Biowest 公司

## 1.3 主要试剂的配制

### 1.3.1 100 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 的配制：

称取 0.08 g NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>，溶于 10 ml 水中。

### 1.3.2 考染脱色液 50% 甲醇的配制：

量取 5 ml 甲醇，5 ml 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>，两者充分混合。

### 1.3.3 覆盖液的配制（如表 3-1）

表 3-1 覆盖液

成分	最终浓度
ACN	10%
NH <sub>4</sub> HCO <sub>3</sub>	50mM
Double distilled water	To 500 ml

### 1.3.4 样本重溶液的配制（如表 3-2）

表 3-2 样本重溶液

成分	最终浓度
ACN	30%
TFA	0.1%
Double distilled water	To 500 ml

### 1.3.5 rehydration buffer stock(RB)的配制（表 3-3）

表 3-3 rehydration buffer stock(RB)

成分	最终浓度
Urea	7M
Thiourea	2M
CHAPs	4%(W/V)
Double distilled water	To 250 ml

注：-80℃ 保存

# 华中科技大学硕士学位论文

## 1.3.6 Bradford 的配制（表 3-4）

表 3-4 Bradford

成分	最终浓度
甲醇	23.75 ml
磷酸	50 ml
G250	50 mg
Double distilled water	To 500 ml

## 1.3.7 溴酚蓝溶液的配制（表 3-5）

表 3-5 Bromophenol blue solution

成分	最终浓度
Bromophenol blue	1%
Tris-base	50 mM
Double distilled water	To 250 ml

注：室温保存

## 1.3.8 30%T, 2.6%C 丙烯酰胺单体储液的配制（表 3-6）

表 3-6 30%T, 2.6%C Monomer stock solution

成分	最终浓度
Acylamide	30%
N,N'-methylenebisacrylamide	0.8%
Double distilled water	To 250 ml

注：0.2 μm 膜过滤，4℃避光保存。

## 1.3.9 4×凝胶缓冲液的配制（表 3-7）

表 3-7 4× Resolving gel buffer

成分	最终浓度
Tris-base	1.5 M
HCl	To pH 8.8
Double distilled water	To 500 ml

注：0.2 μm 膜过滤，4℃保存。

# 华中科技大学硕士学位论文

## 1.3.10 10% SDS 溶液的配制（表 3-8）

表 3-8 10%SDS 溶液

成分	最终浓度
SDS	10%
Double distilled water	To 250 ml

注：0.2 μm 膜过滤，室温保存。

## 1.3.11 10× SDS 电泳液储液的配制（表 3-9）

表 3-9 10× SDS electrophoresis buffer

成分	最终浓度
SDS	1%
Tris-base	250 mM
Glycine	1.92 M
Double distilled water	To 500 ml

## 1.3.12 SDS 平衡液的配制（表 3-10）

表 3-10 SDS equilibration buffer

成分	最终浓度
Tris-HCl(pH 8.8)	50 mM
Urea	6 M
Glycerol	30% (v/v)
SDS	2% (w/v)
Bromophenol blue	0.002% (w/v)
Double distilled water	To 250 ml

注：-20℃保存

## 1.3.13 固定液的配制（表 3-11）

# 华中科技大学硕士学位论文

表 3-11 固定液

成分	用量
乙醇	100 ml
冰醋酸	25 ml
无水乙酸钠	0.17 g
蒸馏水	至 250 ml

1.3.14 考马斯亮蓝染料的配制（表 3-12）

表 3-12 考马斯亮蓝染料

成分	用量
G-250	0.3 g
硫酸铵	25 g
磷酸	25 ml
甲醇	50 ml
蒸馏水	至 250 ml

## 2 2-DE 步骤

### 2.1 样本的制备

2.1.1 分别从对照组和高氟组中随机抽取 10 名儿童的空腹静脉血 2 ml 于含 EDTA 抗凝剂的真空采血管中，静置一段时间后，4℃ 条件下 2000 r/min 离心 10 min。

2.1.2 分离出血浆，将对照组和高氟组的样本分别混合，以减少组内差异。

### 2.2 去除高丰度蛋白

2.2.1 吸取 400 μl 树脂匀浆于 2.0 ml 带滤柱离心管中，10000 r/min 离心 10 min，去掉保存液。

2.2.2 加入 400 μl 平衡液，10000 r/min 离心 10 min，洗涤树脂，重复操作一次。

2.2.3 缓慢滴加 80 μl 血浆样本于树脂上，吸附 10 min，10000 r/min 离心 10 min。

2.2.4 将收集到的样本再次滴加至树脂，再吸附 10 min，10000 r/min 离心 10 min。

# 华中科技大学硕士学位论文

---

2.2.5 再加入 100  $\mu\text{l}$  平衡液洗涤树脂，10000 r/min 离心 10 min。

2.2.6 合并滤液，加入 4 倍体积丙酮，-20℃沉淀过夜。

2.2.7 将沉淀得到的蛋白 4℃，12000 r/min 离心 20 min。

2.2.8 去掉上清，晾干，-80℃保存备用。

## 2.3 一向等电聚焦

### 2.3.1 蛋白质团块溶解

(1) 吸取 200  $\mu\text{l}$  RB 于干燥后的蛋白质团块中，反复吹打直至蛋白质充分分散。

(2) 超声助溶，80W，0.8 s 开，0.8 s 关，超声 4 次后放于冰上冷却，重复 1 次。

(3) 超声后 4℃，12000 r/min 离心 20 min。

(4) 吸出上清液，转移至新的 EP 管中。

### 2.3.2 蛋白质定量

(1) 取 2-3  $\mu\text{l}$  样品，双复管测定。

(2) 每支管加入 1 ml Bradford 染液进行染色，③涡旋振荡 20 s，充分混匀。

(3) 测定吸光值。测定时，两个样品之间的操作间隔为 20 s 左右。

(4) 定量分两次进行，第一次为初步定量，计算得到各样品的浓度后，将所有样品浓度尽量调至比较接近，再进行第二次定量。

(5) 为了保证准确性，要求每次定量结束后立刻制作定量的标准曲线。

### 2.3.3 上样

根据标准曲线确定适宜的上样量，银染（用于分析）蛋白质样本的上样量为 100  $\mu\text{g}$ ，考染（用于质谱分析）蛋白质的上样量为 1200  $\mu\text{g}$ 。上样液包括：蛋白质样本、1%二硫苏糖醇 (DTT)、1% 固体梯度胶条缓冲液 (IPG Buffer)、1×溴酚蓝 (BPB)、加再水化液 (RB) 至 460  $\mu\text{l}$ 。

### 2.3.4 干胶条泡胀

(1) 取出水化盘，调节水平。

(2) 取出干胶条，放于室温下 10min。

(3) 吸取样品上清液小心、均匀加到水化盘的槽底，约 22 cm。

## 华中科技大学硕士学位论文

- 
- (4) 取出胶条，支持膜面向实验人员，从酸性端轻轻撕下覆盖膜，胶面朝下，酸性端朝上，放入水化盘的槽中，过程中尽量不要产生气泡。
  - (5) 吸取 1.2 ml 覆盖油加于支持膜上，用于保湿。
  - (6) 让胶条在室温为下泡胀过夜。
  - (7) 记录下胶条的号码。

### 2.3.5 等电聚焦

- (1) 打开电源预冷，取出电极板。
- (2) 在等电聚焦盘的每条泳道中加入 6 ml 覆盖油。
- (3) 取出胶条并吸干覆盖油，胶面朝上放入等电聚焦盘中。
- (4) 用 75  $\mu$ l Milli Q 水将已剪好的纸垫片进行润湿。
- (5) 将纸垫片放在胶面的两端，纸垫片的边缘要与胶面的边缘对齐。
- (6) 装上电极板，运行程序。
- (7) 设计等电聚焦的电泳程序（表 3-13）

表 3-13 等电聚焦程序

步骤	电压 (V)	时间 (h)
S1	300	0.5
S2	700	0.5
S3	1500	1.5
S4	9000	3
S5	9000	4

### 2.3.6 胶条的保存

跑完等电聚结束后，取出胶条并吸干胶条上面的覆盖油，将胶条的胶面向上放入平衡管中，-20℃保存。

## 2.4 二向 SDS-PAGE

### 2.4.1 安装灌胶器

- (1) 在灌胶器中装入黑色橡胶软垫，正中压紧。

# 华中科技大学硕士学位论文

- 
- (2) 将玻璃板合紧，使之在桌面站立。
  - (3) 放入厚塑料垫板，然后放玻璃板，再放厚塑料垫板，直至全部放完。
  - (4) 将薄塑料垫板放入灌胶器中，直至全部装满。
  - (5) 将去离子水倒满灌胶器槽，装上海绵条，压紧、压平，装上板，夹子，直立水平放置灌胶器，备用。

## 2.4.2 制胶

- (1) 12.5% SDS-PAGE 凝胶的配制（表 3-14）

表 3-14 12.5% SDS-PAGE 凝胶配方（6 张胶量）

成分	用量
Monomer solution	175.14 ml
4×resolving gel buffer	105 ml
10% SDS	4.2 ml
Double distilled water	133.56 ml
10% ammonium persulfate	2100 $\mu$ l
TEMED	138.6 $\mu$ l
Total volume	420 ml

- (2) 按照配方表配置好胶液，AP 和 TEMED 一样一边搅拌一边缓慢加入，避免局部浓度过高而发生凝结。灌胶时使胶液沿着灌胶口斜面的厚塑料垫板流下，动作均匀，灌至液面到玻璃板两边隔条下 4mm 为止。迅速在胶面加入水饱和正丁醇压平液面，加入时使枪头贴着玻璃长板缓慢划动均匀加入，每张胶加入 4mL 正丁醇，凝固过夜。

2.4.3 拆玻璃板，清洗干净表面的碎胶，用去离子水涮洗一次，注意不要冲到胶面。用去离子水冲洗六次后置于架子上，将一些去离子水放于胶面上便于保湿。

2.4.4 将电泳槽循环水管和冷却机的水管相连，在电泳仪水箱中加入 4 L 去离子水，插上电泳槽循环泵的插头，等空气排尽后，用量筒量取 450 ml 10×电泳液，加入 50 ml 去离子水，缓缓倒入电泳槽中，配成 1×的下槽液。插上冷却机的插头，打开冷却机开始预冷。量取 240 ml 的 10×电泳液，加水至 1.2 L 配置 2×上槽液，搅拌均匀后备用。

---

## 华中科技大学硕士学位论文

2.4.5 取出胶条复温，用 10 ml 左右去离子水洗掉胶条表面的覆盖油。将 8 ml 平衡液加入平衡管中，进行平衡，先加 DTT 平衡 15 min，倒掉后马上加入 IAA 平衡 15 min（注意 IAA 平衡时要避光）。

2.4.6 用上槽液配制 0.8% 的低熔点琼脂糖 40ml，1.5% 的普通琼脂糖 80 ml，备用。

2.4.7 倒掉玻璃板胶面上的液体（残留的液体用滤纸片吸干），用低熔琼脂糖封住整个胶面。自平衡管中快速取出胶条，在上槽液的中稍微涮洗一下，然后放入玻璃板中，酸性端在左，把胶条用尺子压到二向胶胶面处，下端与二向胶胶面紧密接触（注意不要让胶条下端困住气泡）。

2.4.8 将胶条依次放好，将玻璃板倾斜着放入下槽中，避免玻璃板下端产生气泡。

2.4.9 装上槽，将普通琼脂糖加入槽与玻璃板的缝隙处以封住缝隙，防止垂直方向上漏电。

2.4.10 将上槽液轻轻地加入至上槽的最大刻度处。

2.4.11 配制成下槽液：将上槽液稀释一倍。

2.4.12 在下槽中加入下槽液至上下槽液面相平，盖上盖子，接上电极，开始电泳。（二向电泳的程序为：S1 2 W/gel 45 min，S2 17 W/gel 直到溴酚蓝跑到底，约 4.5 h）

2.4.13 当 BPB 跑出二向胶以后可停止电泳。

### 2.5 染色

2.5.1 结束电泳，取出上、下槽。

2.5.2 将玻璃板翘起，洗净。

2.5.3 根据胶条的号码选择对应的染色盘（染色盘需先标好号码，并先加入 250 ml 固定液）。

2.5.4 翘开玻璃板，取下胶条，拨走胶面的琼脂糖，在胶面的酸性端切一个小角。

2.5.5 用去离子水冲洗玻璃板下表面和胶面，冲洗胶下，使胶稍微脱离玻璃板。

2.5.6 将玻璃板反扣到盛有固定液的染色盘上，让胶靠重力自己落入染色盘中。

2.5.7 将染色盘置于水平摇床上振动，室温固定 2 h 以上。

2.5.8 将固定液倒掉，用 250 ml 蒸馏水漂洗 10 min，重复 4 次。

2.5.9 倒掉蒸馏水。

# 华中科技大学硕士学位论文

---

2.5.10 在染色盘中加入染色液，染色 6 h 以上。

2.5.11 倒掉染色液，用 250 ml 蒸馏水漂洗 1 min，重复两次。

## 2.6 图像分析

2.6.1 擦干净扫描仪，在玻璃上放置一张干净的玻璃板。

2.6.2 将凝胶转移到扫描仪上，将有切角的一端置于左下角，以便使每张胶扫描的方向相同，扫描模式定为 256 灰阶透视扫描，分辨率为 150 dpi。

2.6.3 用保鲜膜将扫描完的凝胶包好，置于 4℃ 保存。

2.6.4 用 ImageMaster 2D platinum 5.0(GE) 分析软件对图像进行分析。

## 2.7 质谱

### 2.7.1 挖点

(1) 标记相应数量的 1 ml EP 管备用。

(2) 将针用 75% 乙醇润湿的棉花擦净备用。

(3) 将胶自 4℃ 冰箱中拿出，根据打印图挖出相应的点（挖点时用针在相应点的边缘划一圈，将胶粒挑到 EP 管中。每挖出一个点就将把针头在 MilliQ 水中涮洗一下，接着挖下一个点）。

(4) 将挖完点后的胶包好置于 4℃ 保存。

(5) 将挖出的点放入超净工作台中准备处理，将对应点的编号输入电脑。

### 2.7.2 酶切

(1) 水洗

用 MilliQ 水清洗每个 EP 管两次，将胶粒用枪头切成  $1\text{mm}^3$  大小的颗粒。

(2) 脱色

将  $120 \mu\text{l}$  50% 甲醇加入每个 EP 管，在 37℃ 条件下摇床震荡 30 min（此时绝大多数斑点可以脱至无色，少数为脱尽颜色的斑点再加入  $120 \mu\text{l}$  50% 甲醇，直至脱完色为止）。

### 2.7.3 脱水

将  $100 \mu\text{l}$  ACN 加入 EP 管，震荡约 2 min，在吸出 ACN 前可先吹打一下。

### 2.7.4 吸胀

---

# 华中科技大学硕士学位论文

加入 50  $\mu\text{l}$  100 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  于 EP 管中，吸出完全吸胀后的胶粒，将所有 EP 管中加入 100  $\mu\text{l}$  50% CAN，在从头开始吸出。

## 2.7.5 脱水

加入 110  $\mu\text{l}$  CAN 于 EP 管中，震荡 2 min，观察一下胶粒的情况，若胶粒不是太大，大部分胶粒都能够干燥。如果胶粒太大而无法彻底干燥（此时胶粒会变白，但仍没有变硬），可再加入 60  $\mu\text{l}$  ACN，震荡 2 min。

## 2.7.6 吸胰酶

自冰箱中取出胰酶后，应立马放入冰中保温，将 1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  胰酶储液用预冷的覆盖液稀释至 20  $\text{ng}/\mu\text{l}$ 。在每管的干胶粒上迅速加入 4-8  $\mu\text{l}$  的稀释胰酶溶液（具体视胶粒大小而定）。将加入胰酶的 EP 管插入冰中泡胀 30 min，吸出多余的胰酶（此时需要尽量将胰酶吸干净，尽量减少胰酶自切峰带来的干扰）。

## 2.7.7 酶切

加入 10  $\mu\text{l}$  覆盖液于 EP 管中，转移至 EP 管盒中，置于 37°C 培养箱中酶切 12-16 h。

## 2.7.8 肽段抽提

(1) 配制抽提液

(2) 标记相应数量的 0.2 ml EP 管备用。

(3) 将酶切完的胶粒用超声清洗机超声处理 15 min（超声处理有助于肽段从胶粒中溶解至覆盖液里）。

(4) 吸出覆盖液至相对应的 0.2 ml EP 管中。

(5) 在 EP 管中加入 60  $\mu\text{l}$  抽提液，震荡 10 min，对胶粒进行脱水，将抽提液吸出至相对应的 0.2 ml EP 管中。

(6) 将 EP 管进行真空干燥至液体完全挥发。

(7) 将 EP 管盖好，-20°C 保存。

## 2.7.9 点靶

(1) 配制样本重溶液。

(2) 配制基质：5 mg/ml 的 HCCA（溶于含 0.1% TFA 的 50% CAN 中）

(3) 加 1.5  $\mu\text{l}$  的重溶液于管中，震荡 1 min。

# 华中科技大学硕士学位论文

---

- (4) 吸取管底的重溶液涮洗管壁，使管壁上的肽段充分溶解。
- (5) 反复吹打 6-7 次管底的重溶液。
- (6) 换新枪头，在钢靶的小孔内点 0.8  $\mu\text{l}$ （点样时枪头不能碰到钢靶，先悬空将液滴挤出，悬挂在枪头尖，再轻轻沾到小孔内）。
- (7) 将钢靶置于干净的处，使之风干。
- (8) 待小孔内液滴彻底干燥后，在相同的小孔内点上剩下的重溶液，反复操作，直到点完。
- (9) 最后一次点样后，当液滴挥发到原体积的 1/3 左右时，加入 0.5  $\mu\text{l}$  基质在样品上，等到完全干燥后即可送入质谱仪检测。

## 2.8 质谱检测

### 2.8.1 质谱分析：

利用德国布鲁克 (Bruker Dalton) Auto flex speed<sup>TM</sup> MALDI-TOF-TOF 质谱仪进行分析。UV 波长为 355 nm，重复速率为 200 Hz，加速电压为 20000 V，最优质量分辨率为 1500 Da。扫描质量范围为 700-3200 Da，收集信号，胰酶自切峰为内标校正质谱仪。所有实验样品的质谱图均以用默认模式获得。

### 2.8.2 数据库检索：

利用软件 flexAnalysis (Bruker Dalton) 过滤基线峰、识别信号峰。利用 BioTools (Bruker Dalton) 软件搜索 NCBI 数据库，寻找匹配的相关蛋白质，同时查询其功能，来明确鉴定的蛋白质为何种蛋白质。

### 2.8.3 查询条件：

- (1) 肽质量范围：800-4000 Da;
  - (2) 表观 PI 与表观 Mr 的误差范围：无限制；
  - (3) 一级质谱质量误差范围：50 ppm;
  - (4) 二级质谱质量误差范围：0.5 Da;
  - (5) 酶解片段不完全（遗漏酶切位点）：1 个；
  - (6) 物种来源: humon;
  - (7) 电荷：+1;
-

# 华中科技大学硕士学位论文

- (8) 同位素峰: monoisotopic;
- (9) 固定修饰: 半胱氨酸碘乙酰胺化;
- (10) 可变修饰: 蛋氨酸氧化。

## 结 果

用双向凝胶电泳 (2-DE) 分别对对照组和高氟组儿童的血浆蛋白样本进行电泳分离, 每组独立重复三次实验。用考尔马斯亮蓝染色法对蛋白斑点进行可视化处理, 并用 ImageMaster 2 D platinum 5.0 软件进行强度定量分析。在得到的所有蛋白点中, 仅对折叠变化 $\geq 2$  和 t 检验  $P < 0.05$  的蛋白进行更进一步的分析研究。

图 3-1 表示的是高氟组与对照组的 2-DE 凝胶图像。高氟组与对照组比较, 共检测到 7 个表达不同的蛋白点。定量强度分析和 Autoflex speed™ MALDI-TOF-TOF 质谱仪鉴定结果显示在高氟组有 6 个蛋白点表达上调。利用 BioTools 软件在 NCBI 数据库共鉴定出 5 种蛋白 (见表 6), 分别为补体 C1s 亚单位前体、 $\alpha$ -1-B 糖蛋白、血红素结合蛋白、载脂蛋白 E 前体以及免疫球蛋白轻链变异区域。

表 3-15 质谱分析鉴定的不同表达蛋白

编号	名称	登录名	得分	分子量	等电点	匹配率 (%)
B 2	补体 C1s 亚单体	gi 4502495	125	78174	4.86	9
B 3, B 4	$\alpha$ -1-B 糖蛋白	gi 69990	180	52479	5.65	19
B 5	血红素结合蛋白	gi 13529281	251	29068	6.45	37
B 6	载脂蛋白 E 前体	gi 4557325	303	36246	5.65	29
B 7	免疫球蛋白 轻链可变区	gi 18025688	100	12420	5.11	25

# 华中科技大学硕士学位论文

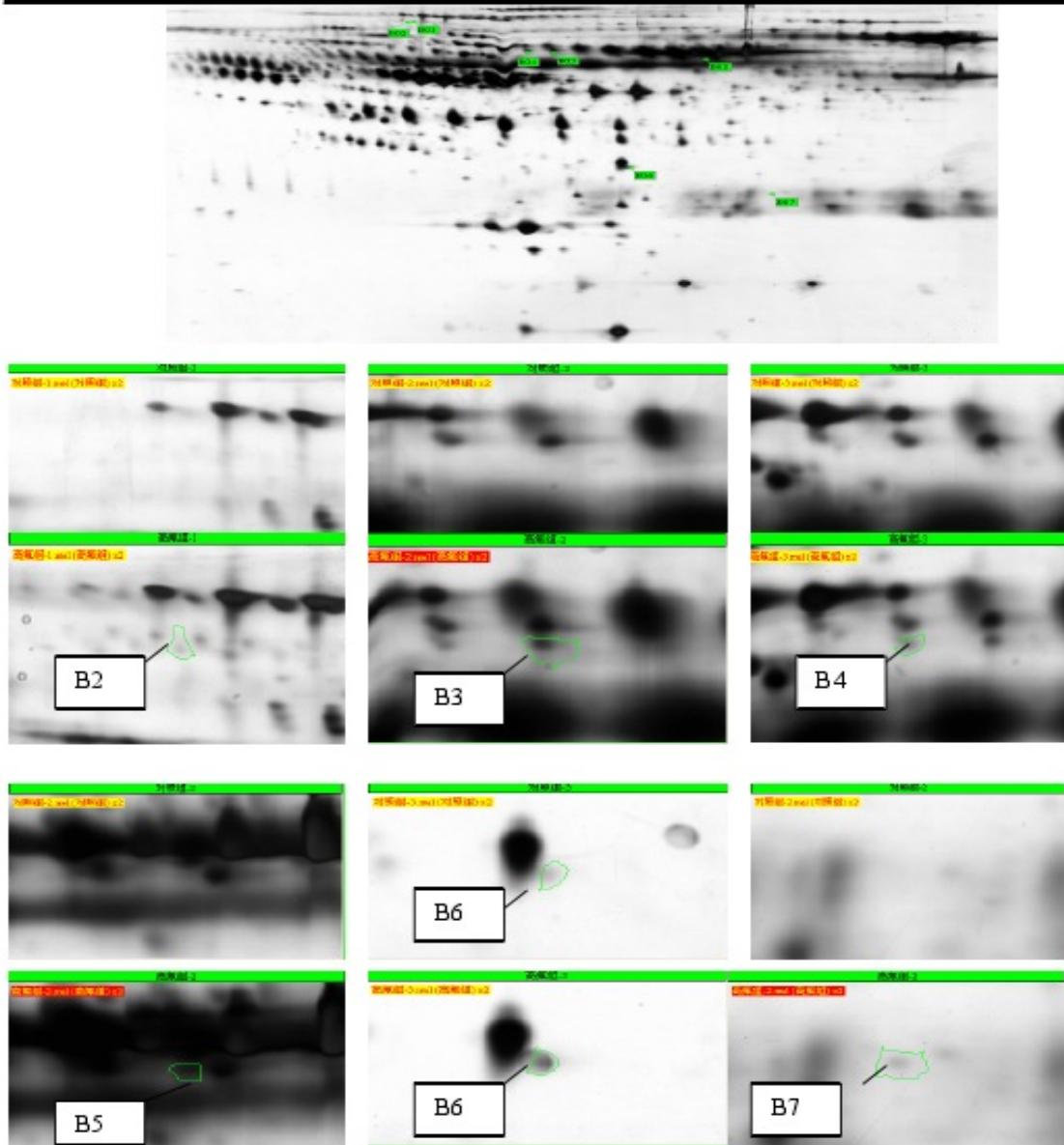


图 3 血浆蛋白 2-DE 图谱

注：等电聚焦使用的是 24 cm 固化胶条，pH 是 4.7，随后是在 12.5%SDS-PAGE 上分离，在高氟组发现 7 个表达不同的蛋白点。使用图像分析软件 ImageMaster 2D platinum 5.0 和强度定量分析和 t 检验显示高氟组和对照组比较时发现 6 个表达差异的蛋白。

# 华中科技大学硕士学位论文

---

## 讨 论

为了更好的理解氟中毒的分子机制和评估潜在的蛋白标志物，我们利用经典的蛋白质组学方法研究高氟组和对照组儿童的血浆蛋白表达谱的改变。定量强度分析显示，与对照组相比，在高氟组共发现 7 个表达不同的蛋白点。在这 7 个表达不同的点中，经 Autoflex speed™ MALDI-TOF-TOF 质谱和蛋白数据库搜索，共鉴定出 5 种蛋白，其功能如下：1) 补体 C1s：补体 C1s 是一个丝氨酸蛋白酶，可与 C1q, C1r 结合形成 C1，是补体系统经典通路的首要成分。C1s 可被 C1r 激活，活化的 C1s 可激活 C2, C4，同时降解 I 型和 II 型胶原蛋白，激活基质金属蛋白酶 9 (MMP9) 的酶原形式。而活化的 C1s 直接或通过活化 MMP9 在细胞外基质的调节中发挥作用<sup>[46]</sup>。有研究证明，补体系统与认知功能降低的疾病有关，如阿尔茨海默病，帕金森综合症以及亨廷顿氏病等，但其具体作用目前为止还不清楚<sup>[47]</sup>。2) α-1-B 糖蛋白 (AIBG)：AIBG 是一个近似 63 kDa 的血浆糖蛋白，含 4 个葡萄糖寡糖的 474 个氨基酸残基的单肽。它是免疫球蛋白超家族的成员，但它的生物学功能目前为止尚不清楚<sup>[48]</sup>。3) 血红素结合蛋白 (Hpx protein)：血红素结合蛋白可结合血红素；血红素结合蛋白通过与亚铁血红素结合后具有抗氧化功能。本研究中血红素结合蛋白水平上升，意味着血红素结合蛋白可能与氟引起的氧化应激和氧化性损伤有关。有研究证明，血红素结合蛋白可能神经变性疾病中起重要作用<sup>[49]</sup>。4) 载脂蛋白 E 前体：载脂蛋白 E 前体可调节脂蛋白的绑定，具有内化和分解代谢作用，同时，它还可以充当低密度脂蛋白和肝脏组织特殊的载脂蛋白受体的配体。5) 免疫球蛋白轻链可变区：免疫球蛋白轻链可变区是免疫球蛋白超级家族的典型区域，它可调节抗原和效应分子的交互作用<sup>[50]</sup>，这可能与氟暴露引起的炎症效应有关。有人提出，可变区可使抗原诱导 VL-VH 相对倾向的改变，而影响可变区和轻链 CDRs 的定位关系<sup>[51]</sup>。Won-A Joo 等在对苯暴露的工人血浆蛋白研究中鉴定出免疫球蛋白轻链可变区<sup>[52]</sup>。

综上所述，尽管由 MALDI-TOF 和 BioTools 鉴定出的蛋白数量有限，但我们鉴定出的血浆蛋白有助于在蛋白质组水平理解氟中毒及儿童 IQ 水平降低的机制，且鉴定的表达上调的蛋白在氟中毒过程中起重要作用。而且，我们获得的蛋白质组数据可帮

---

# **华中科技大学硕士学位论文**

---

助我们更广泛的理解氟引起的人类和动物发生氟中毒的机制。

# 华中科技大学硕士学位论文

## 小 结

一、长期摄入过量氟可使儿童智力降低，尿氟浓度、血清氟浓度与儿童智力水平呈负相关。血清 TSH 水平与儿童智力之间未见明显的联系。儿童血清  $T_3$ 、 $T_4$  水平在对照组和高氟组无差异。

二、COMT 基因多态性与儿童智力发展有关，高活性的 val/val 基因型可能对儿童智力发展有保护作用。

三、在氟中毒儿童共鉴定出五种与氟中毒有关的表达上调的血浆蛋白。

# 华中科技大学硕士学位论文

## 参考文献

- [1] Susheela, AK. Fluorosis management programme in India. *Sci*, 1999, (77): 1250-1256.
- [2] WHO. Fluorides. Environmental Health Criteria, WHO, Geneva, 2002, (227).
- [3] World Health Organization (WHO), in: K. Bailey, J. Chilton, E. Dahi, M. Lennon, P. Jackson, J. Fawell (Eds.), *Fluoride in Drinking-water*, WHO Press, Switzerland, 2006.
- [4] 孙殿军, 沈雁峰, 赵新华, 等. 中国大陆地方性氟中毒病情动态与现状分析. *中国地方病学杂志*, 2001, (06): 31-35.
- [5] 角田文男. Presi dental Address. 第 20 届国际氟研究会论文集, 1999, 4.
- [6] 孙玉富, 于光前, 付可为, 等. 我国地方性氟中毒应采取的防治策略. *中国地方病学杂志*, 1997, (06): 387-388.
- [7] 曹守仁. 地方性氟中毒防治科研进展与展望. *中国地方病学杂志*, 1996, (03): 167-168.
- [8] Wu CX, Gu XL, Ge YM, et al. Effects of high fluoride and arsenic on brain biochemical indexes and learning-memory in rats. *Fluoride*, 2006, (39): 274-279.
- [9] Mullenix PJ, Denbesten PK, Schunior A, et al. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. *Neurotoxicol Teratol*, 1995, (17): 169-177.
- [10] Li XS, Zhi JL, Gao RO. Effect of fluoride on intelligence in children. *Fluoride*, 1995, (28): 189-92.
- [11] Gui CZ, Ran LY, Li JP, et al. Changes of learning and memory ability and brain nicotinic receptors of rat offspring with coal burning fluorosis. *Neurotoxicol Teratol*, 2010, (32): 536-541.
- [12] Spittle B, Ferguson D, Bouwer C. Intelligence and fluoride exposure in New Zealand children [abstract]. *Fluoride*, 1998, (31): 13.
- [13] Gallardo PD, Garcia FC, Kramp U, et al. IQ heritability estimation: analyzing genetically-informative data with structural equation models. *Psicothema*, 2007, (19): 156-162.
- [14] Silventoinen K, Posthuma D, van Beijsterveldt T, et al. Genetic contributions to the association between height and intelligence: Evidence from Dutch twin data from

## 华中科技大学硕士学位论文

childhood to middle age. *Genes Brain Behav*, 2006, (5): 585-595.

- [15] Jentsch JD, Tran A, Le D, et al. Subchronic phencyclidine administration reduces mesoprefrontal dopamine utilization and impairs prefrontal cortical-dependent cognition in the rat. *Neuropsychopharmacology*, 1997, (17): 92-99.
- [16] Gasparini M, Fabrizio E, Bonifati V, et al. Cognitive improvement during Tolcapone treatment in Parkinson's disease[J]. *J Neural Transm*, 1997, (104): 887-894.
- [17] Karoum F, Chrapusta SJ, Egan MF. 3-Methoxytyramine is the major metabolite of released dopamine in the rat frontal cortex: reassessment of the effects of antipsychotics on the dynamics of dopamine release and metabolism in the frontal cortex, nucleus accumbens, and striatum by a simple two pool model. *J Neurochem*, 1994, (63): 972-979.
- [18] Lachman HM, Papoos DF, Saito T, et al. Szumlanski CL, Weinshilboum RM. Human catechol-O-methyltransferase pharmacogenetics: description of a functional polymorphism and its potential application to neuropsychiatric disorders. *Pharmacogenetics*, 1996, (6): 243-250.
- [19] Egan MF, Goldberg TE, Kolachana BS, et al. Effect of COMT Val108/158 Met genotype on frontal lobe function and risk for schizophrenia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, (98): 6917-6922.
- [20] Tien AY, Spevack TV, Jones DW, et al. Computerized Wisconsin Card Sorting Test: comparison with manual administration. *Kaohsiung J Med Sci*, 1996, (12), 479-485.
- [21] Zhang KJ, Gao XC. Association Between a Functional COMT Polymorphism, Mental Retardation and Cognition in Qinba Area Children. *Acta Genetica Sinica*, 2006, (33): 495-500.
- [22] Kobayashi CA, Leite AL, Silva TL, et al. Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride. *Chem Biol Interact*, 2009, (180): 305-311.
- [23] Lu J, Zheng JZ, Liu HJ, et al. Proteomics Analysis of Liver Samples from Puffer Fish Takifugu rubripes Exposed to Excessive Fluoride: An Insight into Molecular Response to Fluorosis. *J Biochem Mol Toxic*, 2010, (24): 21-28.
- [24] He Han. The effects of fluoride on the fetus. *Chinese Journal of Control of Endemic Diseases*, 1989, (4): 136.

## 华中科技大学硕士学位论文

- [25] Li XS, Zhi JL, Gao RO. Effect of fluoride exposure on intelligence in children. Fluoride, 1995, (28): 189-192.
- [26] Zhao LB, Liang GH, Zhang DN, et al. Effect of a high fluoride water supply on children's intelligence. Fluoride, 1996, (29): 190-192.
- [27] Ren DL, Liu Y, An Q. An investigation of intelligence development of children aged 8-14 years in high fluoride and low iodine areas. Chinese Journal of Control of Endemic Diseases, 1989, (4): 251-254.
- [28] Li Y, Li X, Wei S. Effect of excessive fluoride intake on mental work capacity of children and a preliminary study of its mechanism. Hua His I Ko Ta Hsueh Hsueh Pao, 1994, (25): 188-91.
- [29] 要路明, 周景林, 王秀玲, 等. 高氟区氟斑牙儿童 TSH 与智力水平分析. 预防医学文献信息, 1996, (01): 26-27.
- [30] 黎昌健, 蒙衍强, 蒋才武. 地氟病在中国大陆的流行现状. 实用预防医学, 2008, (04): 1295-1298.
- [31] Wang D, Qian M. Combined Reven's test (CRT) – Chinese revised version (in Chinese). Tianjin: Tianjin Institute of Endocrinology, 1997.
- [32] National Standard of P.R.China. Method for determination of fluoride in drinking water of endemic fluorosis areas. (WS/T 106-1999). 1999. (<http://www.chinaios.com/>).
- [33] National Standard of P.R.China. Determination for fluoride in serum – Ion selective electrode method. (WS/T 212-2001). 2001. (<http://www.chinaios.com/>).
- [34] Trivedi MH, Verma RJ, Chinoy NJ, et al. Effect of high fluoride water on intelligence of school children in India. Fluoride, 2007, (40): 178-183.
- [35] Guan ZZ, Wang YN, Xiao KQ, et al. Influence of chronic fluorosis on membrane lipids in rat brain. Neurotoxicology and Teratology, 1998, (20): 537-542.
- [36] He H, Chen ZS, Liu XM. The influence of fluoride on the human embryo. Chinese Journal of Control of Endemic Diseases, 1989, (4): 136-138.
- [37] Zhang C, Liu JW, Lin B, et al. Effects of fluoride arsenic combination on the oxidative damage of brain of rat's offspring. Journal of Health Toxicology, 2000, (14): 156-158.
- [38] Cui MY, Wang YY. Toxic effects of fluoride on fetus's brain and offspring's IQ. Chinese Journal of Control of Endemic Diseases, 2001, (16): 98-99.

## 华中科技大学硕士学位论文

- 
- [39] WHO. Biological monitoring of chemical exposure in the work-place. 1996, (1).
  - [40] Wang GJ, Yang DL, Jia FG, et al. Research of Intelligence Quotient of 4-7 years old children in district with high level of fluoride. Endemic Diseases Bulletin, 1996, (11): 60-62.
  - [41] Li D, Chen GP. Combined Raven's test (CRT) - Chinese revised version (in Chinese). Shanghai: East China Normal University, 1989.
  - [42] Zhang F, Wang J, Ma XJ, et al. Comparison between WISC-R and Raven's intelligence tests for children fell behind at school achievement. Chinese Journal of Child Health Care, 2007, (15): 45-47.
  - [43] Guo ZY, He YH, Zhu QX. Study on neurobehavioral function of workers occupationally exposed to fluoride. Industrial Health and Occupational Diseases, 2001, (27): 346-348.
  - [44] Sawaguchi T, Goldman-Rakic PS. The role of D1-dopamine receptor in working memory: local injections of dopamine antagonists into the prefrontal cortex of rhesus monkeys performing an oculomotor delayed-response task. J Neurophysiol, 1994, (71): 515-528.
  - [45] Scanlon PD, Raymond FA, Weinshilboum RM. Catechol-O-methyltransferase: thermolabile enzyme in erythrocytes of subjects homozygous for allele for low activity. Science, 1979, (203): 63-65.
  - [46] Stefanis NC, Van Os J, Avramopoulos D, et al. Variation in catechol-o-methyltransferase val158 met genotype associated with schizotypy but not cognition: a population study in 543 young men. Biol Psychiatry, 2004, (56): 510-515.
  - [47] Veerhuis R, Janssen I, De Groot CJ, et al. Cytokines associated with amyloid plaques in Alzheimer's disease brain stimulate human glial and neuronal cell cultures to secrete early complement proteins, but not C1-inhibitor. Exp Neurol, 1999, (160): 289-299.
  - [48] Piyaphanee N, Ma Q, Kremen O, et al. Discovery and initial validation of alpha 1-B glycoprotein fragmentation as a differential urinary biomarker in pediatric steroid-resistant nephrotic syndrome. Proteomics Clinical Applications, 2011, (5): 334-342.
  - [49] Raju VS, Maines MD. Renal ischemia/reperfusion up-regulates heme oxygenase-1
-

## 华中科技大学硕士学位论文

- (HSP32) expression and increases cGMP in rat heart. *J Pharmacol Exp Ther*, 1996, (277): 1814-1822.
- [50] Klimtchuk ES, Gursky O, Patel RS, et al. The critical role of the constant region in thermal stability and aggregation of amyloidogenic immunoglobulin light chain. *Biochemistry*, 2010, (49): 9848-9857.
- [51] Stanfield RL, Takimoto-Kamimura M, Rini JM, et al. Major antigen-induced domain rearrangements in an antibody. *Structure*, 1993, (1): 83-93.
- [52] Joo WA, Sul D, Lee DY, et al. Proteomic analysis of plasma proteins of workers exposed to benzene. *Mutat Res*, 2004, (558): 35-44.

# 华中科技大学硕士学位论文

## 综述

### 氟对神经系统影响的研究进展

张小非 综述 王爱国教授 审校

**摘要** 氟在环境中广泛存在，长期摄入过量氟可导致氟中毒。氟中毒是一种危害严重的地方病，除对牙齿和骨骼造成损害外，还具有神经毒性，因此氟中毒受到人们的关注并成为当前环境卫生领域研究的一大热点。研究表明在动物大脑发育的关键期暴露于氟化物时，可对大脑造成不可逆的损伤，影响其学习记忆功能。本文基于目前国内外的研究成果，总结了氟的神经毒性作用及相关机制研究进展。

**关键词：** 氟；神经毒性

氟（fluorine, F）在自然界中广泛存在，可通过饮水、食物和空气进入机体。氟被称为“双刃剑”，在低剂量时可以预防龋齿的产生，而长期摄入过量氟会对机体产生毒性效应导致氟中毒。氟中毒是严重影响健康的地方病，在全球均有发生且影响高达数百万人<sup>[1-3]</sup>。氟中毒不仅对骨相系统造成损害，也可对非骨相系统的造成损害。自1937年Rohholm等<sup>[4]</sup>对长期暴露于氟化物的冰晶石工人进行调查时发现氟骨症患者多伴有过度疲劳、记忆能力下降、头晕等神经系统症状后，氟对神经系统的毒性效应引起人们的广泛关注。张晨、郭智勇等<sup>[5-6]</sup>的动物实验结果说明，高氟不仅影响大鼠子代的神经行为发育，还可改变接触工人的神经行为。另外，高氟暴露还与儿童智力水平下降有关<sup>[7-9]</sup>。Franke及其同事报道<sup>[10]</sup>，高氟可引起脊髓的神经组织发生损害。自2000年，在《Fluoride》杂志上发表的文章《氟与智商》中提出，儿童IQ降低与氟暴露存在一定关系后<sup>[11]</sup>，关于氟的神经作用的研究就逐渐增多，但氟中毒对神经系统的毒性作用机制尚不清楚。

#### 1 氟在脑组织内的含量及对脑重量的影响

氟能穿过血脑屏障进入脑组织，正常情况下，脑内的氟可随脑脊液排出脑外，维

# 华中科技大学硕士学位论文

持脑组织内氟的相对平衡<sup>[12]</sup>。而人体长期摄入过量氟，使氟在脑组织中过度蓄积，扰乱脑神经及细胞的正常生理功能，直接损害神经系统功能。刘维群等<sup>[13]</sup>报道，分别用含NaF 200 mg/L水和不含氟离子的水喂养动物，两组动物脑中氟含量差异显著。短期摄入高浓度氟的动物，其子代脑重量变化不明显，而慢性氟中毒动物的子代，脑重量明显下降。吴南屏及其同事<sup>[14]</sup>通过对短期氟暴露和长期氟暴露仓鼠所生仔鼠的实验研究发现，短期氟暴露时仔鼠脑重与对照组无显著性差异，而长期氟暴露的仔鼠脑重量下降显著。随着氟浓度的增加，脑组织中氟含量也逐渐增加<sup>[15]</sup>。Holland及其同事的研究也表明<sup>[16]</sup>，高氟可抑制仔鼠大脑核酸的合成，从而抑制蛋白质的分泌、合成，导致仔鼠脑重降低，直接影响大脑的生长、发育。

## 2 氟对中枢神经系统的影响

### 2.1 氟对脑组织超微结构的影响

脑组织是氟及氟化物的主要蓄积器官。慢性氟中毒动物的大脑皮质以及其下区发生脱髓鞘改变，小脑蒲肯野细胞（Purkinje cell）数目降低，树突稀少等病理改变<sup>[17]</sup>。Heba S等<sup>[18]</sup>发现，与对照组大鼠的相比，高氟组大鼠脑膜、大脑、小脑毛细血管和脉络丛可发生阻塞；大脑皮质、小脑白质及脑室脉络丛出血；海马细胞内发生神经退行性改变；锥体细胞萎缩、坏死；大脑皮层细胞和轴突中的神经纤丝堆积；大脑皮层神经细胞的中央染质溶解、水肿、萎缩、坏死；小脑的蒲肯野细胞坏死、颗粒层细胞水肿性坏死等。

动物实验显示<sup>[19]</sup>，氟中毒小鼠大脑的海马回神经细胞、神经纤维、以及血脑屏障的超微结构受损，主要特征是线粒体变性，突触前膜发生膨大、水肿，突触间隙内的电子密度逐渐增大，突触前活跃区增大，突触前后膜发生融合等。离体实验表明，高氟抑制动物脑组织内神经细胞的生长、功能分化。

海马作为与学习记忆行为相关的脑区，是氟神经毒作用的靶部位<sup>[20-21]</sup>。氟中毒可引起海马突触微结构参数发生改变：突触的界面曲率、突触活动带长度、突触间隙的宽度和突触后密度。这些改变直接扰乱神经信息的传递，最终降低个体的学习记忆能力<sup>[22]</sup>。

### 2.2 氟对神经递质的影响

# 华中科技大学硕士学位论文

有研究报道<sup>[23-25]</sup>，氟在脑内蓄积，除引起脑组织形态学超微结构发生改变外，还可导致神经递质的合成和某些受体数量减少。有资料报道<sup>[26-28]</sup>，高氟可降低胎儿去甲肾上腺素及下丘脑内5-羟色胺水平，增加肾上腺素含量、降低中脑、延髓及海马的5-羟色胺更新率。由于5-羟色胺和去甲肾上腺素在中枢内有相互依赖和相互加强的作用<sup>[29]</sup>。因此，过量氟可使中枢神经系统内的5-羟色胺和去甲肾上腺素等神经递质以及去甲肾上腺素特异性受体α1-受体的含量降低。Polytarchou等<sup>[30]</sup>报道，氟中毒时脑内过氧化物和过氧化氢含量升高，一氧化氮合成酶（NOS）活性增强，一氧化氮（NO）生成增多，影响神经元网络及突触的构建，使神经元功能异常，加重神经系统的生长发育障碍。

乙酰胆碱（Ach）是外周神经节前纤维和副交感神经节后纤维的具有神经传递作用的物质。Byers等<sup>[31]</sup>进行动物染氟实验，结果显示长期接触高氟可抑制大鼠及其子代脑内乙酰胆碱酯酶（Ach E）活性，使Ach在脑内蓄积。最近，研究发现<sup>[32-34]</sup>，氟中毒可改变动物脑中烟碱乙酰胆碱受体（nAChR）的含量，而nAChR在学习和记忆等认知功能中起重要作用且具有神经保护功能。高氟可引起nAChR在蛋白质水平和配体结合减少，影响动物和人的学习记忆功能。

## 2.3 高氟对大脑内酶的影响

有学说认为，氟在脑内过度蓄积，可攻击某些酶的组成元素，导致该酶活性下降。氟还可通过降低脑中与能量代谢有关酶的活性，阻碍途径，扰乱脑内正常的能量代谢<sup>[35]</sup>。

文献报道<sup>[31,35,36-38]</sup>，过量氟进入脑组织后，抑制钠离子-钾离子-三磷酸腺苷酶（Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>ATPase）、乙酰胆碱酯酶（Ach E）、乳酸脱氢酶（LDH）、线粒体内琥珀酸脱氢酶（SDH）等的活性，改变脑组织的结构和功能、扰乱神经元突触间的信息传递，最终影响记忆突触的正常功能，从而影响脑的正常生理功能，改变动物和人的空间学习记忆能力。

## 2.4 高氟对蛋白、DNA、RNA的影响

过量氟可通过不同途径影响脑组织中某些蛋白的合成和分泌，并通过影响肽链的合成而进一步降低蛋白质的合成率。在动物实验中，随着染氟剂量的增大，脑组织中

# 华中科技大学硕士学位论文

总蛋白、碱性蛋白和可溶性蛋白的含量明显降低<sup>[39]</sup>。

有文献报道<sup>[40-41]</sup>,过量氟可改变动物大脑皮质神经髓鞘,脑组织中蛋白含量降低。例如过量氟在脑内蓄积,可使中枢神经系统内的脑髓鞘碱性蛋白(MBP)丢失,造成血清等体液内的MBP含量上升<sup>[42]</sup>。

据动物实验报道<sup>[43]</sup>,高氟可导致海马神经元的DNA、RNA损伤,并使DNA、RNA的合成受到抑制。氟可导致DNA断裂、改变DNA、RNA的结构,导致信息传递发生错误。官志忠等<sup>[44]</sup>对慢性氟中毒大鼠所生仔鼠大脑的DNA、RNA含量及形态进行研究,发现过量氟可通过胎盘屏障转移至仔鼠体内,并在仔鼠脑内蓄积,抑制其DNA、RNA的合成,导致大脑发育迟缓。

## 2.5 高氟对脂质过氧化作用的影响

由于脑是最易发生脂质过氧化的部位,因此是氟中毒时最易受损的靶器官<sup>[45]</sup>。D. Shanthakumari等<sup>[46]</sup>用高氟水喂养大白鼠四个月,发现大白鼠脑中脂质过氧化作用增强,超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、谷胱甘肽巯基转移酶(GST)及谷胱甘肽(GSH)活性升高。其中大脑SOD活性相应升高可能是机体对氟中毒引起的氧化性应激的一种保护措施。高氟可也通过升高脂质过氧化水平,使脑组织细胞受损,扰乱神经系统的生理功能。随着氟中毒可影响机体清除自由基能力的而研究,氧自由基学说逐渐得到人们的重视。氧自由基学说是王志诚教授于1992年首先提出,主要观点是:氟进入机体后,可直接攻击氧,干扰氧的代谢,使氧自由基增多;氟可引起抗氧化酶活性下降,自由基生成过多,从而引起细胞损伤<sup>[47]</sup>。

## 2.6 高氟与其他元素共同暴露对中枢神经系统的影响

氟与其他元素联合作用时可对中枢神经系统产生毒性效应。已有研究证明氟能增强铝的神经毒性作用<sup>[48]</sup>。Varner等<sup>[49]</sup>的动物实验发现,氟化铝更易通过血脑屏障,神经细胞受损严重,大脑形态学发生明显改变。氟化铝可激活G-蛋白,GTP是一种鸟苷酸结合蛋白(GTP binding proteins)。G-蛋白的α亚基在未受刺激的非活化条件下,可与GDP结合。当受外界刺激时,α亚基发生改变,不与GDP结合,转而与G-蛋白结合并活化G-蛋白,激活第二信使从而参与细胞信号传导<sup>[50]</sup>。

氟化铝对G-蛋白的激活类似于GTP,与的α亚基结合,激活G-蛋白,进一步激

# 华中科技大学硕士学位论文

活神经系统中的第二信使偶联受体-通道和G-蛋白偶联受体-通道系统，从而引起一系列的化学反应。同样，也有研究报道高氟、高碘或氟、砷同时暴露时可影响大鼠的大脑发育，并降低儿童智力水平<sup>[51-52]</sup>。

## 3 高氟对学习记忆能力和智商的影响

长期摄入过量氟影响动物和人的学习记忆能力。许晓璐等<sup>[53]</sup>用Y-迷宫测定氟对小鼠学习记忆能力影响的结果显示，随着染氟剂量的增大，小鼠对Y-迷宫的熟悉、学习所用训练次数明显多于无氟组。动物实验研究说明<sup>[54-55]</sup>，氟中毒大鼠的自发性神经活动受到抑制，自我协调能力降低、体重降低，大鼠与其子鼠的学习记忆能力明显下降。这些研究结果均表明，长期摄入过量氟可对动物和人的神经活动产生不良影响，降低学习记忆能力。

近年来，国内外大量流行病学调查发现，长期摄入过量氟可导致儿童的大脑受损、智力下降、学习记忆功能损害及行为障碍等。Xiang等<sup>[56]</sup>测定了文化教育条件和物质生活条件基本相似的江苏省的氟病区和正常地区512例8-13岁儿童智商，结果显示长期摄入过量氟可影响儿童智力的发展，长期生活在氟病区的儿童IQ得分明显低于生活在正常地区儿童，且随着血清氟含量的上升而降低。在高氟地区，儿童智力水平超过110的很少，儿童智力随年龄的增长不发生明显的变化，究其原因可能是由于在幼儿期接触氟而引起的。Calderon等<sup>[57]</sup>的调查结果显示，长期饮用高氟水的墨西哥San Luis Potosi市6-8岁儿童的反应速度及抽象思维能力均降低，学习能力受损。我们的研究结果同样证明，高氟暴露可导致儿童智力水平降低。

综上所述，长期摄入过量氟，可使氟穿过血脑屏障，并在人和动物脑内蓄积，影响脑的正常生理功能，从而对儿童及实验动物的学习和记忆能力产生影响。其机制可能包括：（1）穿过血脑屏障和胎盘屏障在子代的脑内蓄积，破坏脑组织的正常结构；（2）影响脑内神经递质与受体的含量，扰乱信息床底，损伤神经细胞；（3）抑制脑内某些酶的活性，使脑内能量代谢、离子通道、神经递质和第二信使系统失调和紊乱；（4）影响蛋白质、DNA和RNA的合成与代谢；（5）使脑内自由基生成过多，对脑组织造成损伤；（6）与其他元素的联合作用。

氟对人体的作用有正反两方面，且目前氟对与神经系统有害效应的剂量-反应关系

## **华中科技大学硕士学位论文**

---

的人群资料很少，需要进一步的研究。我国是地方性氟中毒最严重的国家之一，氟中毒对神经系统的毒性作用机制进一步的研究可为我国地方性氟中毒的防治提供更有力的理论基础。

# 华中科技大学硕士学位论文

## 综述参考文献

- [1] Susheela, AK. Fluorosis management programme in India. *Curr. Sci.* 1997, (77): 1250-1256.
- [2] WHO. Fluorides. Environmental Health Criteria, WHO, Geneva, 2002, (227).
- [3] World Health Organization (WHO), in: K. Bailey, J. Chilton, E. Dahi, M. Lennon, P. Jackson, J. Fawell(Eds.), *Fluoride in Drinking-water*, WHO Press, Switzerland, 2006.
- [4] Roholm K. Fluoride intoxication: a clinicallyhygienic study with a review of the literature and some experimental investigations. London: HK Lewis, 1937, 138.
- [5] 张晨, 凌冰, 刘继文. 氟-砷联合染毒对大鼠子代神经行为发育的影响. 卫生研究, 1999, (28): 337-338.
- [6] 郭志勇, 何玉华, 朱启晨. 氟接触工人神经行为功能的研究. 工业卫生与职业病, 2001, (27): 346-348.
- [7] Li XS, Zhi JL, Gao RO. Effect of fluoride on intelligence in children. *Fluoride*, 1995, (28): 189-192.
- [8] Gui CZ, Ran LY, Li JP, et al. Changes of learning and memory ability and brain nicotinic receptors of rat offspring with coal burning fluorosis. *Neurotoxicol Teratol*, 2010, (32): 536-541.
- [9] Spittle B, Ferguson D, Bouwer C. Intelligence and fluoride exposure in New Zealand children. *Fluoride*, 1998, (31): S13.
- [10] Franke J, Rath F, Runge H, et al. Industrial fluorosis. *Fluoride*, 1975, (8): 61-85.
- [11] Editorial. Fluoride and intelligence. *Fluoride*, 2000, (433): 49-52.
- [12] 申秀英, 章子贵, 许晓璐. 氟对中枢神经系统的影响. 中国地方病防治杂志, 2001, (16): 348-351.
- [13] 刘维群. 氟对胎鼠大脑影响的研究. 四川医学, 1990, (11): 88.
- [14] 吴南屏, 赵忠良, 高文华, 等. 氟对发育中大鼠脂质过氧化作用的影响. 中国地方病学杂志, 1993, (12): 278-279.
- [15] 李进贤, 胡爱芸, 张绪, 等. 无机氟对听力影响的配对研究. 中国地方病学杂志, 1990, (9): 330.

## 华中科技大学硕士学位论文

- [16] Holland RJ. Fluoride inhibition of protein DNA synthesis in cells invitro. *Acta Pharmacol & Toxicol*, 1979, (45): 96-101.
- [17] 谭玉彬. 氟对机体代谢及各系统的影响. *中国地方病防治杂志*, 1994, (9): 230-232.
- [18] Heba S. El-lethey, Mervet M, et al. Neurobehavioral toxicity produced by sodium fluoride in drinking water of laboratory rats. *Journal of American Science*, 2010, (6): 54-63.
- [19] 孙增荣, 刘风贞, 杨海贤, 等. 引高氟水小鼠脑海马回组织超微结构观察. *中国地方病学杂志*, 2000, (19): 333-334.
- [20] Patiala. Histopathological investigation of fluoride-induced neurotoxicity in rabbits. *Fluoride*, 2003, (36), 95-105.
- [21] Mullenix PJ, Denbesten PK, Sehunior A, et al. Neurotoxicity of sodium fluoride in rats. *Neurotoxicol Teratol*, 1995, (17): 169-177.
- [22] Bhatnagar M, Rao P, Sushma J, et al. Neurotoxicity of fluoride: neurodegeneration in hippocampus of female mice. *Indian J Exp Biol*, 2002, (40): 546-554.
- [23] 袁淑德, 谢启文, 吕伏英. 慢性氟中毒患者的神经症状及大脑神经递质. *氟研究通讯*, 1989, (3): 19.
- [24] 刘万兴, 董仲. 慢性氟中毒母鼠所生仔鼠行为学和大脑组织形态学的实验研究. *中华病理学杂志*, 1989, (48): 290-291.
- [25] 独立, 曹旭茂. 慢性氟中毒对人胎脑发育的影响. *中华病理学杂志*, 1992, (21): 218-220.
- [26] 于燕妮, 杨文秀. 地方性氟病病区胎儿大脑神经递质与受体的变化. *中国地方病学杂志*, 1996, (5): 257-259.
- [27] 陈学军, 薛占瑞, 杨春雨, 等. 慢性氟中毒大鼠缝核群 5-羟色胺水平研究. *中国地方病防治杂志*, 2005, (24): 108.
- [28] 袁淑德, 宋可钦, 吕优英, 等. 实验性慢氟中毒鼠 5-羟色胺含量和更新率变化的分区性研究. *中国地方病防治杂志*, 1993, (8): 145-146.
- [29] 韩济生主编. 神经科学纲要. 第一版. 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1993, 363-783.

## 华中科技大学硕士学位论文

- 
- [30] Polytarchou C, Papadimitriou E. Antioxidants inhibit human endothelial cell functions through down-regulation of endothelial nitric oxide synthase activity. *Eur J Pharmacol*, 2005, (510): 31-38.
  - [31] Byers DM, Irwin LN, Moss DE, et al. Prenatal exposure to the acetylcholinesterase inhibitor methanesulfonyl fluoride alters forebrain morphology and gene expression. *Brain Res Dev Brain Res*, 2005, (158): 13-22.
  - [32] Nordberg A. Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Biol Psychiatry*, 2001, (49): 200-210.
  - [33] Chen J, Shan KR, Long YG, et al. Selective decreases of nicotinic acetylcholine receptors in PC12 cells exposed to fluoride. *Toxicol*, 2003, (183): 235-242.
  - [34] Paterson D, Nordberg A. Neuronal nicotinic receptors in the human brain. *Prog Neurobiol*, 2000, (61): 75-111.
  - [35] Wisemann A. Effect of inorganic fluoride on enzymes. In: Smith FA, Ed. *Handbook of experimental pharmacology*. Berlin: Springer Verlag, 1970, (2): 48-97.
  - [36] Guan ZZ, Wang YN, Xiao KQ, et al. Influence of chronic fluorosis on membrane lipids in rat brain. *Neurotoxicol Teratol*, 1998, (20): 537-542.
  - [37] 章子贵, 许晓璐, 申秀英, 等. 氟中毒对小鼠学习记忆相关脑区突出结构的影响. *卫生研究*, 1999, (28): 210-212.
  - [38] 刘艳洁, 高勤, 官志忠. 氟中毒对大鼠脑组织Ras-Erk1/2通路及转录因子CREB的影响. *中国地方病防治杂志*, 2011, (26): 88-92.
  - [39] Shashi A, Singh JP, Thapar SP. Effect of long-term administration of fluoride on levels of protein, free amino acids and RNA in rabbit brain. *Fluoride*, 1994, (27): 155-159.
  - [40] 高建国, 王三祥, 程晓天. 高氟对大鼠脑损伤的研究. *中地方病学杂志*, 2001, (20): 44.
  - [41] 程晓天, 高建国, 王三祥. 氟中毒对大鼠血清 MBP、NSE 含量和 CHE 活性的影响. *中国地方病学杂志*, 2001, (20): 46.
  - [42] 陈俊杰. 人脑髓鞘碱性蛋白及其基因研究. 成都: 华西医科大学重组DNA研究室编. 1995.
  - [43] M. Zhang, A. Wang, T. Xia, et al. Effects of fluoride on DNA damage, S phase
-

## 华中科技大学硕士学位论文

- cell-cycle arrest and the expression of NF- $\kappa$ B in primary cultured rat hippocampal neurons. *Toxicol. Lett.*, 2008, (179): 1-5.
- [44]官志忠, 等. 慢性氟中毒大鼠所生仔鼠大脑形态学改变的研究. *中华病理学杂志*, 1986, (19): 297.
- [45]Shayiq RM, Raza H, Kidwai AM. Fluoride and lipid peroxidation: a comparative study in different rat tissue. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1986, (37): 70-76.
- [46]D. Shanthakumari, S. Srinivasulu, S. Subramanian, Effect of fluoride intoxication on lipid peroxidation and antioxidant status in experimental rats. *Toxicology*, 2004, (204): 219-228.
- [47]王志诚, 关德宏, 李晓冬, 等. 自由基对氟中毒发病的影响极其阻断方法研究. 全国第四届地氟病学术会议论文专辑. 中国地方病防治演剧中心, 1992, 25.
- [48]I. Shcherbatykh, D.O. Carpenter, The role of metals in the etiology of Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis*, 2007, (11): 191-205.
- [49]Varner JA, Jensen K, Horvath W, et al. Chronic administration of aluminum-fluoride or sodium-fluoride to rats in drinking water: alterations in neuronal and cerebrovascular integrity. *Brain Res*, 1998, (784): 284-298.
- [50]Splittle B. Fluoride and intelligence. *Fluoride*, 2000, (33): 49-52.
- [51]詹平, 荀正权, 罗子国. 碘、氟对大鼠子代脑发育形态学改变联合作用的研究. *预防医学情报杂志*, 2000, (33): 49-52.
- [52]D. Rocha-Amador, M.E. Navarro, L. Carrizales, R. Morales and J. Calderón, Decreased intelligence in children and exposure to fluoride and arsenic in drinking water. *Cad. Saude Publica*, 2007, (23): S579-587.
- [53]许晓璐, 章子贵, 申秀英. 氟中毒对小鼠学习记忆行为及脑内SOD活性和MDA含量的影响. *中国公共卫生*, 2001, (21): 102-104.
- [54]Wang JD, Ge YM, Ning HM. Effect fo high fluoride and low iodine on biochemical indexes of the brain and learning-memory of offspring rats. *Fluoride*, 2002, (37): 201-208.
- [55]Ekambaram P, Paul V. Calcium preventing locomotor behavioral and dental toxicities of fluoride by decreasing serum fluoride level in rats. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2001,

## 华中科技大学硕士学位论文

---

(9): 141-146.

- [56] Quanyong Xiang, Youxin Liang, Bingheng Chen, et al. Serum Fluoride Level and Children's Intelligence Quotient in Two Villages in China. ENVIRONMENTAL HEALTH PERSPECTIVES, 2010.
- [57] Calderon J, Blenda M, Marielena N, et al. Influence of fluoride exposure on reaction time and visuospatial organization in children. Epidemiol, 2000, (11): S153.

# 华中科技大学硕士学位论文

## 附录

硕士学位攻读期间参与发表的学术论文：

1. 陈义虎, 吴雪, 张小非, 王爱国等. 2,2',4,4'-四溴联苯醚对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞胞内钙离子浓度影响[J]. 环境与健康杂志, 2011, 28(8): 659-662.
2. Chunyang Jiang, Shun Zhang, Hongling Liu, Qiang Zeng, Tao Xia, Yihu Chen, Gang kuang, Guodong Zhao, Xue Wu, Xiaofei Zhang, Aiguo Wang. The role of the IRE1 pathway in PB DE-47-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells in vitro. Toxicology Letters, 2012, 211 (3): 325-333. (IF=3.581)

# 华中科技大学硕士学位论文

---

## 致 谢

在此论文完成之际，回顾两年来以来的硕士学习和科研工作，我在学业、科研和生活上得到了许多老师、同学和朋友们的热心帮助和有力支持。在此，我要对帮助我的所有人表示感谢。

首先，我要对我的导师—王爱国教授，表示我由衷的感谢。在我研究生的学习、生活期间，王老师给了我大量的、极其有益的建议和指导，并在论文的撰写和审稿中倾注了大量的心血。导师渊博的知识、严谨而求真务实的科研态度和工作作风，让我受益匪浅。在此，谨向王爱国教授表达我诚挚的谢意和敬意。

衷心感谢夏涛老师，感谢夏老师两年来的帮助和关心，在我遇到难题时，夏老师总是亦师亦友的帮助和鼓励我。谢谢您！

衷心感谢本教研室的陈学敏教授、杨克敌教授、鲁文清教授、袁晶教授、吴志刚教授、刘爱林老师、谢虹老师、吕玲和王文华老师，感谢你们给与的指导和帮助！

衷心感谢我的师兄姜春阳、匡刚、赵国栋、崔玉山、张舜、陈义虎，师姐杨璐，同门吴雪，师妹雷蓉蓉、张成，谢谢你们在我的学习、实验及生活中我提出的宝贵意见和建议！

感谢我的一群朋友们，谢谢你们给我的无私的帮助！

特别感谢我的父母、哥哥、姐姐、谢谢你们给我的支持、呵护和无私的爱！

再次感谢所有给我帮助的老师、朋友和家人！