

硒对氟致小鼠学习记忆损伤的改善作用

章子贵 申秀英 许晓路

浙江师范大学生命与环境科学学院, 金华 321004

摘要: 选用 Y-迷宫观察硒对氟致小鼠学习记忆能力的影响,并用透射电镜和计算机图像分析仪观测分析其学习记忆相关脑区-海马 CA₃ 区 Gray I 型突触的结构变化。结果显示:较高浓度氟可使小鼠学习能力损伤,并能引起海马 CA₃ 区突触后致密物质厚度显著变小及其突触间隙宽度显著加大。给氟同时给予适当浓度的硒可拮抗氟的这种作用;而高浓度硒与氟产生协同毒性作用。本研究在行为和形态学方面为硒拮抗氟的神经毒性提供证据。

关键词: 硒 氟 学习记忆 突触结构

中图分类号:R338.64 R151.3

文献标识码:A

Effects of selenium on the damage of learning-memory ability of mice induced by fluoride

Zhang Zigui, Shen Xiuying, Xu Xiaolu

College of Life and Environmental Science, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004, China

Abstract: Sodium fluoride added with or without sodium selenite in deionized water was administered to male mice for 8 weeks. The influences of fluoride on learning-memory behavior were tested on Y-maze, and the ultrastructure of Gray I synaptic interface in the CA₃ area hippocampus was quantitatively analyzed by electron microscopy and computer image processing appliance. The main results showed that the learning capability of mice drinking higher concentration of fluoride presented remarkable deterioration. The thickness of post-synaptic density (PSD) was decreased. The width of the synaptic cleft was remarkably increased. It was found that combined administration of fluoride and proper concentration of selenium could decrease the toxic effect of fluoride. There were synergetic toxicities if the concentration of selenium was too high. The results suggested that selenium might antagonize the neurotoxicity of fluoride on behavior and morphology.

Key words: selenium, fluorine, antagonism, learning-memory ability, synaptic structure

由于氟能透过血脑屏障^[1],氟对神经系统的直接毒性作用,近年来受到广大研究者的注意,有研究表明,长期高氟摄入对人体神经系统产生一定的危害^[2];我们的前期研究也表明:高氟能损伤小鼠的学习能力^[3],并能引起其脑内学习记忆相关脑区一些突触结构的病理性变化^[4]。硒是人体必需的微量元素,大量研究表明:适当浓度的硒对氟中毒有较强的拮抗作用^[5-7]。本文在过去工作基础上,拟通过小鼠经口摄入由不同浓度硒和氟两两相组合的溶液,分析测定小鼠分辨学习记忆能力和学习记忆相关脑区突触结构的变化,探讨氟的神经毒性和适量硒对其可能产生的影响,为预防和治疗氟中毒提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明品系雄性小鼠,体重为 180 ~ 210g,浙江省金华市药

基金项目:浙江省自然科学基金、教委基金和大型测试基金资助项目部分成果

作者简介:章子贵,男,硕士,讲师

检所实验动物饲养中心提供。

1.2 实验分组

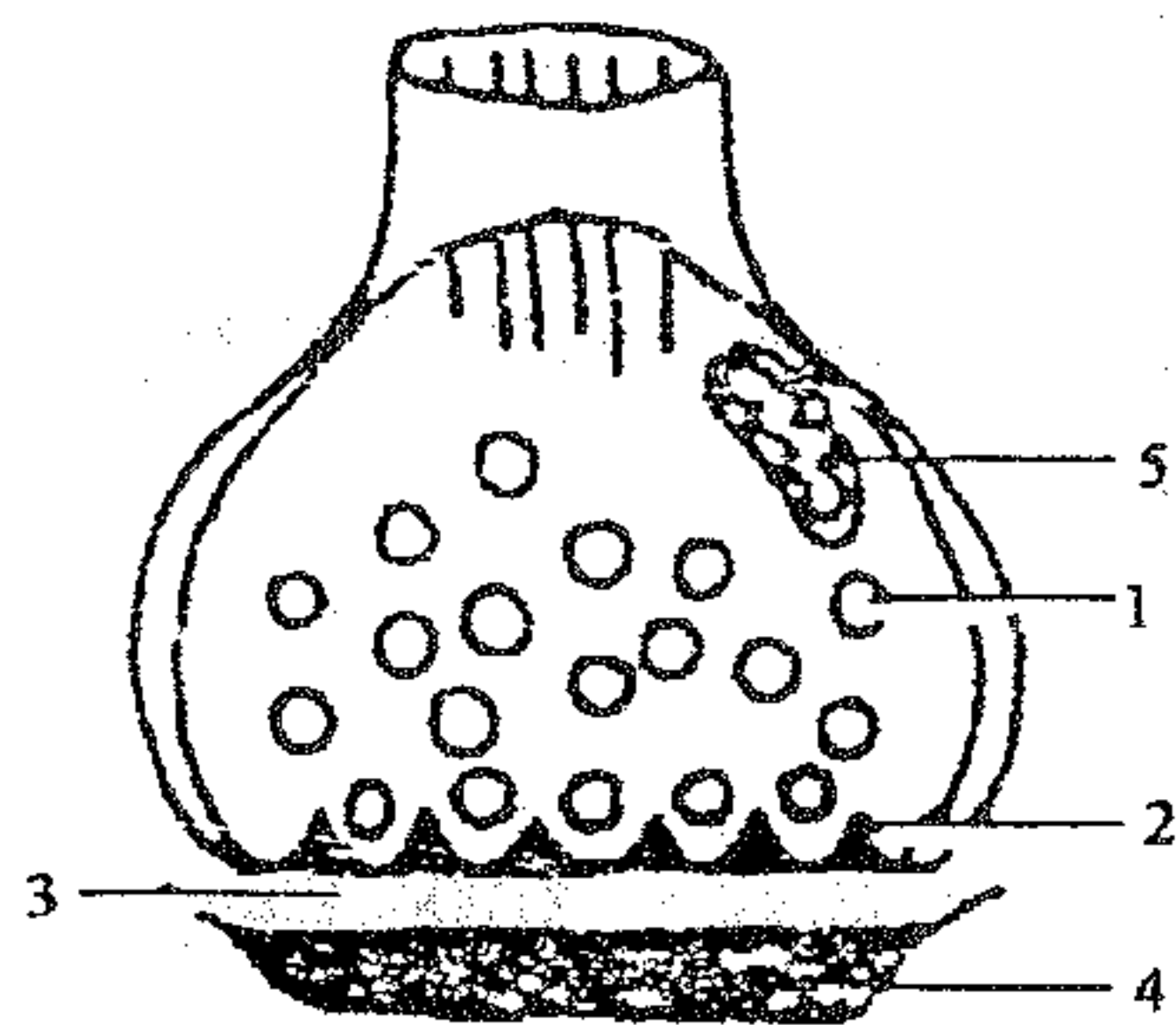
分别将 NaF 和 Na₂SeO₃ 溶解于去离子水中,然后配制成实验所需的不同浓度的 NaF 溶液和亚硒酸钠溶液。随机将小白鼠分成 13 组,即对照组,饮用去离子水;三个加氟组,分别饮用 1、5、10mg/L 的 NaF 溶液;九个氟硒组,氟 + 硒浓度依次为:1 + 7.5、1 + 1.5、1 + 0.5mg/L; 5 + 7.5、5 + 1.5、5 + 0.5mg/L; 10 + 7.5、10 + 1.5、10 + 0.5mg/L。各染毒时间均为 8 周。

1.3 分辨学习记忆能力的检测

实验在 Y-迷宫(Y-maze)中进行,以灯光信号示安全区(即不通电),安全区的方位按照 Gellerman 编排的程序随机变换,电刺激强度为 60 伏,小鼠逃脱刺激进入安全区视为正确反应。采用分段训练法,即每训练 10 次后让小鼠休息 1 分钟,以连续次训练有 9 次正确(90%正确反应)定为学会标准。小鼠的分辨学习(Discrimination learning)能力以达到此标准所需训练次数来表示,训练次数越少,表明小鼠学习记忆能力越强。24 小时后再检测其记忆保持力,连续训练 10 次,以正确反应的百分比来表示。

1.4 海马 CA₃ 区突触结构参数

参照我们过去报道的方法^[4],行为观测结束后,各组随机取2只小鼠,杀鼠取全脑,迅速用5%戊二醛固定,4℃冰箱中存放24小时,再按照边缘系统解剖图取海马CA₃区脑组织,用常规方法制备超薄切片,然后用JEM-1200EX型透射电镜观察并拍摄各组小鼠学习记忆相关脑区—海马CA₃区Gray I型(兴奋型)突触照片(附图为示意图),并用CIA—I型计算机图像分析仪观测并统计上述脑区突触界面结构参数,即突触界面曲率、突触活性区长度(active zone)、突触间隙宽度和突触后致密物质的厚度(post-synaptic density, PSD)的变化。活性带弧长与弦长之比等于界面曲率,每个突触间隙宽度用多点平均法测定。每组测定25~40突触照片。最后比较不同浓度氟及不同浓度硒与氟联合作用对小鼠海马CA₃区突触界面结构参数的影响。本实验的观察和测量采用双盲法进行。



1 突触囊泡 2 突触前致密突起 3 突触间隙
4 突触后致密物质 5 线粒体

附图 Gray I型突触示意图

1.5 统计方法

各数据统计均采用 *t* 检验法。

2 结果

2.1 分辨学习记忆能力的检测结果

表1表明,与对照组相比,单独染氟时,小鼠达到学会标准所需次数随氟浓度升高而增多,中氟和高氟组小鼠学习能力显著地低于对照组($P < 0.05$),说明较高浓度氟能损伤小鼠学习能力;各氟硒组中,中氟中硒组和高氟中硒组小鼠学会标准所需次数几乎与对照组相同,说明对中剂量硒对氟致小鼠学习记忆损伤有较好的保护作用;而低氟高硒组、低氟低

硒组、中氟高硒组、中氟低硒组、高氟高硒组、高氟低硒组小鼠学会标准所需次数均显著少于对照组($P < 0.05$),说明高剂量表现为与氟的协同毒性作用,而低硒与中高氟搭配,由于低剂量硒不足以拮抗氟中毒也使小鼠记忆受损。各组记忆能力则无显著性差异。

2.2 海马CA₃区突触结构参数的观测结果

表2数据说明,与对照组相比,单独染氟时,中氟组和高氟组小鼠学习记忆相关脑区—海马CA₃区PSD厚度极显著变小($P < 0.001$),突触间隙宽度极显著变大($P < 0.01$),说明长期摄入较高剂量的氟能引起小鼠脑内学习记忆相关脑区—海马CA₃区突触界面一些结构参数的显著变化;各氟硒组和对照组相比,低氟高硒组、低氟中硒组、低氟低硒组、中氟高硒组、中氟低硒组、高氟高硒组、高氟低硒组小鼠学习记忆相关脑区—海马CA₃区PSD厚度均极显著变小,突触间隙宽度极显著变大($P < 0.01$),说明高剂量硒对氟起协同毒性作用,低剂量硒由于不足不能拮抗氟中毒对海马CA₃区突触界面一些结构的影响;而中氟中硒组和高氟中硒组小鼠学习记忆相关脑区—海马CA₃区PSD厚度,突触间隙宽度则无显著性变化($P > 0.05$),说明一定剂量的硒对能逆转氟致脑内学习记忆相关脑区—海马CA₃区突触界面一些结构参数的病理性变化,突触界面曲率、突触活性区长度则未见有统计学意义的变化。

表1 硒对氟致小鼠学习记忆力损伤的保护作用($\bar{x} \pm s$)

组别	n	氟+硒 (mg/L)	达到学会标准 所需训练次数	24h后记忆 保持率(%)
对照组	14	蒸馏水	23.6 ± 10.6	84.1 ± 14.9
低氟组	21	1+0	27.8 ± 5.5	84.2 ± 15.4
中氟组	18	5+0	35.3 ± 6.5 ⁽¹⁾	77.8 ± 13.7
高氟组	12	10+0	36.3 ± 9.9 ⁽¹⁾	85.2 ± 12.8
低氟高硒组	18	1+7.5	34.9 ± 13.2 ⁽¹⁾	76.4 ± 16.2
低氟中硒组	7	1+1.5	31.3 ± 11.1	75.0 ± 11.5
低氟低硒组	17	1+0.5	34.7 ± 11.6 ⁽¹⁾	78.9 ± 16.5
中氟高硒组	14	5+7.5	35.8 ± 12.3 ⁽¹⁾	80.3 ± 13.0
中氟中硒组	12	5+1.5	24.1 ± 9.7	82.2 ± 11.0
中氟低硒组	19	5+0.5	35.7 ± 8.6 ⁽¹⁾	77.8 ± 16.6
高氟高硒组	10	10+7.5	33.5 ± 7.2 ⁽¹⁾	79.5 ± 17.5
高氟中硒组	10	10+1.5	25.8 ± 5.5	92.3 ± 8.3
高氟低硒组	7	10+0.5	44.4 ± 13.2 ⁽¹⁾	81.5 ± 15.7

注:(1)与对照组比较 $P < 0.05$

表2 硒对氟致小鼠脑内海马CA₃区突触结构参数影响($\bar{x} \pm s$)

组别	n	氟+硒 (mg/L)	突触曲率	突触间隙宽度 (nm)	PSD厚度 (nm)	突触活性带长度 (nm)
对照组	29	蒸馏水	1.23 ± 0.16	17.87 ± 1.31	42.42 ± 5.78	240.57 ± 45.66
低氟组	37	1+0	1.16 ± 0.12	17.63 ± 1.64	39.91 ± 5.54	235.55 ± 58.91
中氟组	24	5+0	1.22 ± 0.17	19.12 ± 1.51 ⁽¹⁾	31.18 ± 3.11 ⁽²⁾	217.81 ± 50.68
高氟组	34	10+0	1.20 ± 0.14	19.42 ± 1.41 ⁽¹⁾	32.68 ± 5.24 ⁽²⁾	240.57 ± 62.25
低氟高硒组	30	1+7.5	1.18 ± 0.19	19.28 ± 2.08 ⁽¹⁾	38.09 ± 4.43 ⁽²⁾	240.17 ± 74.85
低氟中硒组	29	1+1.5	1.18 ± 0.15	17.98 ± 2.08	38.59 ± 4.43 ⁽²⁾	253.17 ± 74.85
低氟低硒组	29	1+0.5	1.19 ± 0.14	19.65 ± 2.13 ⁽¹⁾	32.88 ± 5.10 ⁽²⁾	272.04 ± 75.05
中氟高硒组	28	5+7.5	1.18 ± 0.15	19.01 ± 2.43 ⁽¹⁾	31.72 ± 7.21 ⁽²⁾	268.15 ± 83.89
中氟中硒组	31	5+1.5	1.14 ± 0.14	18.23 ± 1.72	39.56 ± 4.92	261.63 ± 71.96
中氟低硒组	26	5+0.5	1.27 ± 0.18	19.73 ± 2.12 ⁽¹⁾	36.19 ± 4.41 ⁽²⁾	276.09 ± 79.76
高氟高硒组	10	10+7.5	1.25 ± 0.18	19.53 ± 1.29 ⁽¹⁾	37.23 ± 4.41 ⁽²⁾	219.10 ± 49.56
高氟中硒组	10	10+1.5	1.19 ± 0.14	18.34 ± 2.10	40.46 ± 5.29	270.26 ± 46.77
高氟低硒组	7	10+0.5	1.21 ± 0.19	19.71 ± 1.68 ⁽¹⁾	34.18 ± 4.63 ⁽²⁾	219.11 ± 56.39

注:(1)与对照组比较 $P < 0.01$ (2)与对照组比较 $P < 0.001$

彗星试验检测 DNA 交联的研究

张遵真 衡正昌 贺芳¹ 庞学文¹

华西医科大学公共卫生学院,成都 610041

摘要:为了寻求一种简便、快速的 DNA 交联检测方法,本文以过氧化氢(H₂O₂)为标准断裂剂,用彗星试验检测了甲醛(formaldehyde, FA)诱导的 TK6 细胞的 DNA 交联作用,并对两种实验方案进行了比较。结果显示:随着甲醛浓度的增加,由过氧化氢造成的 DNA 迁移距离减小;当甲醛浓度为 1000 μmol/L 时,无一个细胞拖尾,提示甲醛完全抑制了过氧化氢诱导的 DNA 迁移。此外,两种实验方案均可检出甲醛的 DNA 交联作用,但以先加交联剂、后加断裂剂的方案优于先加断裂剂、后加交联剂的方案,因为前一方案操作更简便,不受 DNA 修复的影响,所测 DNA 交联的剂量—反应关系更好。因此,彗星试验确为一种灵敏、简便和快速的 DNA 交联检测方法。

关键词:彗星试验 DNA 交联 DNA 断裂

中图分类号:Q523 Q331

文献标识码:A

Detection of DNA crosslinks with comet assay

Zhang Zunzhen, Heng Zhengchang, He Fang, Pang Xuewen

School of Public Health, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China

Abstract: A simple and rapid method for the detection of DNA cross-links was explored. DNA cross-links was induced by formaldehyde (FA) in TK6 cells. Hydrogen peroxide was used as a standard DNA breakage agent. Two protocols on de-

3 讨论

我们前期的研究结果已经表明,长期高氟摄入能对动物的高级神经行为—学习能力造成一定程度的损伤^[3],并能引起其脑内学习记忆相关脑区突触界面一些结构的显著变化^[4]。本文研究结果再次表明,高氟确能影响动物的学习能力并能引起脑内学习记忆相关脑区突触界面一些结构的病理性变化,并进一步证明适当浓度的硒能较好的改善氟致小鼠学习能力的损伤,并且这种改善作用可能和硒逆转氟致学习记忆相关脑区突触界面一些结构的病理性变化有关,但硒浓度过高会与氟产生协同毒性作用,这与邓海等的研究结果相一致^[5]。

氟是化学性质极活泼的元素,过量氟可导致机体内氧自由基和脂质过氧化物增多,并使抗氧化酶活性下降从而损害机体引发氟中毒;而硒是谷胱甘肽过氧化物酶的重要组成部分,能提高 GSH-Px 活性,拮抗氟中毒所引起的脂质过氧化作用^[6],并已有实验证实硒化物具有抑制自由基损伤的能力^[7],所以适当浓度的硒摄入具有拮抗氟中毒的作用;但硒摄入量过高时,尽管硒可促进氟经尿排出,但并不能拮抗氟的毒性,过量硒加剧了对机体的损害,而表现与氟的协同作用^[6];在硒摄入不足时,由于过量氟会导致机体内氧自由基和脂质过氧化物增加,为清除这些物质可能会增加硒的需要量。我

们前期的研究结果已表明,宏观上氟致小鼠学习能力的损伤与其学习记忆相关脑区内的 PSD 厚度,突触间隙等微观结构相平行^[3,4],本研究结果再次提示,小鼠海马 CA₃ 区突触 PSD 厚度及突触间隙宽度等突触界面结构是敏感易变的指标,环境因子的变化会引起机体内环境的变化,从而导致脑内突触界面一些结构的变化,最终影响突触神经信息的传递,宏观上表现为学习能力的变化。本研究将宏观上的学习记忆行为与微观上的突触亚微结构结合起来进行对比研究,为硒拮抗氟神经毒性提供了行为学和形态学方面的证据。本实验中 Na₂SeO₃ 拮抗小鼠氟中毒的最佳浓度水平为 1.5mg/L。

4 参考文献

- 1 于燕妮,杨文秀. 地方性氟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, 15(5): 257—259
- 2 官志忠,于燕妮,刘家骥. 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, 15(4): 297—299
- 3 章子贵,徐晓虹,申秀英,等. 慢性氟中毒对小鼠学习记忆行为和运动耐力的影响. 中国公共卫生, 1999, 15(3): 186—188
- 4 章子贵,许晓路,申秀英,等. 氟中毒对小鼠学习记忆相关脑区突触结构的影响. 卫生研究, 1999, 28(4): 210—212
- 5 邓海,梁玉香,曹静祥,等. 不同剂量水平硒、氟对大鼠的联合作用研究. 卫生研究, 1996, 25(2): 106—109
- 6 曹静祥,严本虎,张淑兰,等. 高硒高氟环境与人体健康关系的研究. 卫生研究, 1996, 25(5): 287—290
- 7 王爱国,杨克敌,李贤相,等. 硒氟联合作用对雄性大鼠生殖毒性的影响. 中国地方病学杂志, 1996, 15(4): 202—204

基金项目:国家自然科学基金资助项目(NO. 39670625)

作者简介:张遵真,女,硕士,副教授

1. 95 级预防医学本科班实习生

(2000-08-03 收稿)