

分类号：
学 号：20232014115

密 级：无
单位代码：10759

石河子大学

硕 士 学 位 论 文



褪黑素通过 SIRT3/HIF-1 α 轴介导的能量代谢重 编程缓解氟致发育神经毒性

学 位 申 请 人	马润江
指 导 教 师	牛强 教授
申请学位门类级别	医学硕士
学 科 、 专 业 名 称	公共卫生与预防医学
研 究 方 向	劳动卫生与环境卫生学
所 在 学 院	公共卫生学院

中国·新疆·石河子

2026年5月

分类号：
学号：20232014115

密级：无
单位代码：10759

石河子大学

硕士学位论文



褪黑素通过 SIRT3/HIF-1 α 轴介导的能量代谢重编程缓解氟致发育神经毒性

学位申请人	马润江
指导教师	牛强 教授
申请学位门类级别	医学硕士
学科、专业名称	公共卫生与预防医学
研究方向	劳动卫生与环境卫生学
所在学院	公共卫生学院

中国·新疆·石河子
2026年5月

**Melatonin alleviates fluoride-induced developmental neurotoxicity by
SIRT3/HIF-1 α axis-mediated energy metabolism reprogramming**

A Dissertation Submitted to

Shihezi University

In Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of

Master of Medicine

By

Ma Runjiang

(Public Health and Preventive Medicine)

Dissertation Supervisor: Prof. Niu Qiang

May, 2026

石河子大学学位论文独创性声明及使用授权声明

学位论文独创性声明

本人所呈交的学位论文是在我导师的指导下进行的研究工作及取得的研究成果。据我所知，除文中已经注明引用的内容外，本论文不包含其他个人已经发表或撰写过的研究成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中作了明确的说明并表示谢意。

研究生签名: 马润江

时间: 2026年5月20日

使用授权声明

本人完全了解石河子大学有关保留、使用学位论文的规定，学校有权保留学位论文并向国家主管部门或指定机构送交论文的电子版和纸质版。有权将学位论文在学校图书馆保存并允许被查阅。有权自行或许可他人将学位论文编入有关数据库提供检索服务。有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

研究生签名: 马润江

时间: 2026年5月20日

导师签名:



时间: 2026年5月20日

摘要

目的:

氟化物广泛分布于自然界中,其过量暴露会导致发育神经毒性,而线粒体能量代谢紊乱是氟致神经损伤的重要环节,但其具体分子机制尚未明确。沉默信息调节因子 2 相关酶 3 (silent information regulator 2-related enzyme 3, SIRT3) 可通过维持线粒体稳态调控活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 生成,而缺氧诱导因子 1 α (hypoxia-inducible factor-1 α , HIF-1 α) 作为氧依赖性的能量代谢调控因子,能够驱动能量代谢由氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation, OXPHOS) 向糖酵解重编程。褪黑素 (melatonin, Mel) 作为强效抗氧化剂,已被证实是 SIRT3 的激动剂。本研究旨在探究 SIRT3/HIF-1 α 轴介导的能量代谢重编程在氟化钠 (sodium fluoride, NaF) 致发育神经毒性中的作用,并验证 Mel 的保护效果,为环境氟暴露所致神经损伤的防控提供新的理论依据与潜在干预靶点。

方法:

体内实验:选取成年 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 36 只,按雌雄比 2:1 随机分配为 6 组:对照组 (水氟浓度低于 1 mg/L)、3 个 NaF 染毒组 (10、20、40 mg/kg/day)、Mel 组 (10 mg/kg/day) 及 Mel + NaF 共处理组 (10 mg/kg/day Mel + 40 mg/kg/day NaF),构建围产期 NaF 暴露及 Mel 干预模型。母鼠 (F₀) 自受孕起按分组每日灌胃给予 NaF 暴露,仔鼠 (F₁) 自出生后第 10 天开始延续亲代的 NaF 暴露方式和暴露剂量;Mel 干预组的 F₁ 代大鼠从出生第 8 天起每日腹腔注射 Mel,处理均持续至 F₁ 代大鼠 2 月龄。Morris 水迷宫 (morris water maze, MWM) 实验测 F₁ 代大鼠的空间学习与记忆能力;透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM) 观察海马组织线粒体超微结构;尼氏染色观察海马神经元的形态结构及完整性;免疫印迹法 (western blot, WB) 检测海马组织中 SIRT3、HIF-1 α 、泛醌 NADH 脱氢酶 Fe-S 蛋白 1 (NADH dehydrogenase ubiquinone Fe-S protein, NDUFS1)、乳酸脱氢酶 A (lactate dehydrogenase A, LDHA)、丙酮酸激酶 M2 (pyruvate kinase M2, PKM2) 和 6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶 3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3, PFKFB3) 的表达水平;用 ATP 试剂盒检测海马组织中 ATP 含量。

体外实验:以小鼠海马神经元细胞 (HT22) 为研究对象,设置不同浓度 NaF 染毒组 (0、20、40、60 mg/L)、Mel 组 (20 μ M)、Mel + NaF 共处理组 (20 μ M Mel + 60 mg/L NaF)。用 HIF-1 α 小干扰 RNA (HIF-1 α siRNA) 转染 HT22 细胞建立分子干预模型。流式细胞术检测细胞内 ROS 水平;用 JC-1 探针评估线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP);利用 Seahorse XFe96 分析仪测细胞耗氧率 (oxygen consumption rate, OCR) 和胞外酸化率 (extracellular acidification rate, ECAR),以反映 OXPHOS 和糖酵解水平;通过 WB 检测 SIRT3、HIF-1 α 及能量代谢相关蛋白 (NDUFS1、PFKFB3、LDHA 和 PKM2) 的表达;用试剂盒检测细胞 ATP、丙酮酸及乳酸含量。

结果:

1. NaF 暴露损害 F₁ 代大鼠海马神经元和认知功能: MWM 结果显示, 40 mg/kg NaF 组大鼠的逃避潜伏期显著高于对照组, 游泳速度显著低于对照组 ($P < 0.05$); 与对照组比, 20 和 40 mg/kg NaF

组的平台穿越次数、目标象限的距离和时间占比均显著降低 ($P < 0.05$)。尼氏染色显示, 与对照组比, NaF 暴露大鼠海马 CA1 区神经元尼氏小体数量减少, 神经元出现胞体萎缩和核固缩改变。

2. NaF 暴露导致海马组织和 HT22 细胞的线粒体损伤及 ATP 减少: 与对照组比, 40 mg/kg NaF 组大鼠海马线粒体出现明显的嵴断裂、嵴溶解和空泡化, 且 ATP 含量降低 ($P < 0.05$)。NaF 暴露的 HT22 细胞模型中, 与对照组比, NaF 暴露组的细胞内 ROS 水平显著升高, MMP 和 ATP 含量显著降低 ($P < 0.05$)。

3. NaF 暴露通过调控 SIRT3/HIF-1 α 轴诱导能量代谢重编程: 与对照组比, NaF 暴露下调了海马组织及 HT22 细胞中 SIRT3 和 NDUFS1 蛋白的表达, 同时上调了 HIF-1 α 、LDHA、PFKFB3 和 PKM2 的表达 ($P < 0.05$)。Seahorse 能量分析表明, 与对照组比, 60 mg/L NaF 组 HT22 细胞的 OCR 及线粒体基础呼吸、ATP 产生、最大呼吸和呼吸潜力均降低, 而 ECAR、糖酵解、糖酵解能力和储备均增加 ($P < 0.05$)。此外, 相比于对照组, NaF 暴露使 HT22 细胞的丙酮酸和乳酸含量增加 ($P < 0.05$)。

4. HIF-1 α 沉默可改善 NaF 诱导的能量代谢重编程: 与 NaF + siRNA-NC 组比, NaF + siRNA-HIF-1 α 组 HT22 细胞的 OCR 及线粒体呼吸功能显著增加, 而 ECAR 及糖酵解水平显著降低 ($P < 0.05$); NaF + siRNA-HIF-1 α 组 HT22 细胞的 ATP 含量和 NDUFS1 表达显著上升, 而糖酵解酶 (LDHA、PFKFB3、PKM2) 和糖酵解产物 (丙酮酸和乳酸) 均显著下降 ($P < 0.05$)。

5. Mel 减轻 F₁ 代大鼠海马神经元和认知功能的损伤: 与 40 mg/kg NaF 组比, 40 mg/kg NaF + Mel 组大鼠海马 CA1 区神经元尼氏小体的数量增加, 平台穿越次数、目标象限的距离和时间占比均显著上升 ($P < 0.05$), 而第四天的逃避潜伏期显著降低 ($P < 0.05$)。

6. Mel 减轻海马组织及 HT22 细胞的线粒体损伤并增加 ATP 水平: 与 40 mg/kg NaF 组比, 40 mg/kg NaF + Mel 组大鼠海马线粒体嵴结构趋于完整、空泡化程度明显减轻, 且 ATP 的含量增加 ($P < 0.05$)。与 60 mg/L NaF 组比, 60 mg/L NaF + Mel 组 HT22 细胞内 ROS 水平显著降低 ($P < 0.05$), MMP 和 ATP 含量显著升高 ($P < 0.05$)。

7. Mel 通过调控 SIRT3/HIF-1 α 轴改善 NaF 诱导的能量代谢重编程: 与 NaF 组比, NaF + Mel 组大鼠海马组织及 HT22 细胞的 SIRT3 和 NDUFS1 蛋白表达显著上升, 而 HIF-1 α 和糖酵解酶 (LDHA、PFKFB3、PKM2) 显著下降 ($P < 0.05$)。与 60 mg/L NaF 组比, 60 mg/L NaF + Mel 组 HT22 细胞的 OXPHOS 水平增加, 而糖酵解降低 ($P < 0.05$); 同时丙酮酸和乳酸含量降低 ($P < 0.05$)。

结论:

NaF 通过抑制 SIRT3 表达, 诱发线粒体功能障碍和细胞内 ROS 蓄积, 进一步激活 HIF-1 α , 促使神经细胞能量代谢由 OXPHOS 向糖酵解重编程, ATP 生成不足, 最终损害 F₁ 代大鼠认知功能。Mel 可通过调控 SIRT3/HIF-1 α 轴介导的线粒体功能障碍和能量代谢重编程, 减轻 NaF 所致的发育神经毒性。本研究揭示了氟致发育神经毒性的新分子机制, 明确了 Mel 的干预潜力及 SIRT3/HIF-1 α 轴的关键作用, 为氟暴露致神经发育损伤的防控提供了新的思路和干预靶点。

关键词: 氟化钠; 褪黑素; SIRT3/HIF-1 α 信号轴; 发育神经毒性; 能量代谢

Abstract

Objective:

Fluoride is widely distributed in the natural environment, and excessive exposure can lead to developmental neurotoxicity. Disruption of mitochondrial energy metabolism serves as a key mechanism underlying fluoride-induced neural injury; however, the specific molecular mechanisms remain unclear. Silent information regulator 2-related enzyme 3 (SIRT3) modulates reactive oxygen species (ROS) generation by maintaining mitochondrial homeostasis. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α), a key oxygen-sensitive modulator of energy metabolism, promotes the shift of metabolic pattern from oxidative phosphorylation (OXPHOS) toward glycolysis. Melatonin (Mel), a potent antioxidant, has been identified as an agonist of SIRT3. This study aimed to investigate the role of the SIRT3/HIF-1 α axis-mediated energy metabolic reprogramming in sodium fluoride (NaF)-induced developmental neurotoxicity and verify the protective effects of Mel, thereby providing a novel theoretical basis and potential intervention targets for the prevention and control of neurotoxicity caused by environmental fluoride exposure.

Methods:

In vivo experiment: A total of 36 adult Sprague-Dawley (SD) rats with a female-to-male ratio of 2:1 were randomly divided into six groups: a control group (water fluoride concentration below 1 mg/L), three NaF exposure groups (10, 20, 40 mg/kg/day), a Mel-treated group (10 mg/kg/day), and a Mel + NaF co-treatment group (10 mg/kg/day Mel + 40 mg/kg/day NaF), to establish a model of perinatal NaF exposure with Mel intervention. From the onset of pregnancy, maternal rats (F₀) were given daily intragastric NaF administration corresponding to their respective group. The offspring rats (F₁) were continuously exposed to the same NaF dosage regimen starting from postnatal day 10. F₁ rats in the Mel intervention groups received daily intraperitoneal Mel injection from postnatal day 8, and all interventions lasted until the F₁ rats were 2 months old. The morris water maze (MWM) test was used to assess spatial learning and memory abilities in F₁ rats; Transmission electron microscopy (TEM) was employed to observe mitochondrial ultrastructure in the hippocampus; Nissl staining was performed to evaluate the morphology and integrity of hippocampal neurons; Western blot (WB) was applied to detect the expression levels of SIRT3, HIF-1 α , NADH dehydrogenase ubiquinone Fe-S protein 1 (NDUFS1), lactate dehydrogenase A (LDHA), pyruvate kinase M2 (PKM2), and 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3 (PFKFB3) in hippocampal tissue; And an ATP assay kit was used to measure ATP content in the hippocampus.

In vitro experiment: Mouse hippocampal neuronal cells (HT22) were treated with varying concentrations of NaF (0, 20, 40, and 60 mg/L), Mel (20 μ M), or a combination of Mel and NaF (20 μ M Mel + 60 mg/L NaF). A molecular intervention model was established by transfecting HT22 cells with

HIF-1 α small interfering RNA (HIF-1 α siRNA). Flow cytometry was used to detect intracellular ROS levels; The JC-1 probe was employed to assess mitochondrial membrane potential (MMP); A Seahorse XFe96 analyzer was used to measure the oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) to evaluate OXPHOS and glycolysis levels; WB was performed to detect the expression of SIRT3, HIF-1 α , and energy metabolism-related proteins (NDUFS1, PFKFB3, LDHA, and PKM2); and commercial kits were used to measure cellular ATP, pyruvate, and lactate contents.

Results:

1. NaF exposure impairs hippocampal neurons and cognitive function in F₁ rats: MWM results showed that the escape latency of rats in the 40 mg/kg NaF group was significantly higher than that in the control group, while swimming speed was significantly lower ($P < 0.05$). Compared with the control group, the platform crossing number, as well as the distance and time percentages in the target quadrant, were significantly decreased in the 20 and 40 mg/kg NaF groups ($P < 0.05$). Nissl staining revealed that compared with the control group, NaF-exposed rats exhibited fewer Nissl bodies in hippocampal CA1 neurons, accompanied by neuronal soma atrophy and pyknosis.

2. NaF exposure induces mitochondrial damage and decreased ATP levels in hippocampal tissue and HT22 cells: Compared with the control group, rats in the 40 mg/kg NaF group exhibited obvious cristae rupture, cristae lysis and vacuolization in hippocampal mitochondria, accompanied by decreased ATP content ($P < 0.05$). In the HT22 cell model of NaF exposure, intracellular ROS levels were significantly elevated, while MMP and ATP contents were markedly reduced in the NaF exposure group relative to the control group ($P < 0.05$).

3. NaF exposure induces energy metabolic reprogramming by regulating the SIRT3/HIF-1 α axis: Compared with the control group, NaF exposure downregulated the expression of SIRT3 and NDUFS1 proteins in hippocampal tissue and HT22 cells, while upregulating the expression of HIF-1 α , LDHA, PFKFB3, and PKM2 ($P < 0.05$). Seahorse energy metabolism analysis showed that compared with the control group, HT22 cells in the 60 mg/L NaF group exhibited decreased OCR, mitochondrial basal respiration, ATP production, maximal respiration, and spare respiratory capacity, whereas ECAR, glycolysis, glycolytic capacity, and glycolytic reserve were significantly increased ($P < 0.05$). Additionally, NaF exposure significantly elevated pyruvate and lactate contents in HT22 cells compared with the control group ($P < 0.05$).

4. HIF-1 α silencing ameliorates NaF-induced energy metabolic reprogramming: Compared with the NaF + siRNA-NC group, the NaF + siRNA-HIF-1 α group exhibited significantly increased OCR and mitochondrial respiratory function, along with significantly decreased ECAR and glycolysis levels in HT22 cells ($P < 0.05$). ATP content and NDUFS1 expression were significantly elevated, whereas glycolytic enzymes (LDHA, PFKFB3, PKM2) and glycolytic products (pyruvate and lactate) were significantly

reduced ($P < 0.05$).

5. Mel attenuates hippocampal neuronal and cognitive impairment in F₁ rats: Compared with the 40 mg/kg NaF group, the 40 mg/kg NaF + Mel group exhibited an increased number of nissl bodies in hippocampal CA1 neurons, significantly increased platform crossing number, as well as elevated distance and time percentages in the target quadrant ($P < 0.05$), while the escape latency on day 4 was significantly decreased ($P < 0.05$).

6. Mel alleviates mitochondrial damage and increases ATP levels in hippocampal tissues and HT22 cells: Compared with the 40 mg/kg NaF group, rats in the 40 mg/kg NaF + Mel group showed restored mitochondrial cristae structure and markedly alleviated vacuolization in the hippocampus, accompanied by significantly increased ATP content ($P < 0.05$). Compared with the 60 mg/L NaF group, intracellular ROS levels were significantly decreased, while MMP and ATP contents were significantly elevated in HT22 cells of the 60 mg/L NaF + Mel group ($P < 0.05$).

7. Mel ameliorates NaF-induced energy metabolic reprogramming by regulating the SIRT3/HIF-1 α axis: Compared with the NaF group, the NaF + Mel group exhibited significantly elevated protein expression of SIRT3 and NDUFS1, as well as decreased expression of HIF-1 α and glycolytic enzymes (LDHA, PFKFB3, PKM2) in rat hippocampus and HT22 cells ($P < 0.05$). Compared with the 60 mg/L NaF group, the 60 mg/L NaF + Mel group showed enhanced OXPHOS and suppressed glycolysis in HT22 cells ($P < 0.05$), accompanied by reduced pyruvate and lactate contents ($P < 0.05$).

Conclusion:

NaF induces mitochondrial dysfunction and intracellular ROS accumulation by downregulating SIRT3 expression. This effect further activates HIF-1 α , thereby triggering neuronal energy metabolic reprogramming from OXPHOS to glycolysis, reducing ATP production, and ultimately impairing cognitive function in F₁ offspring rats. Mel attenuates NaF-induced developmental neurotoxicity via improving mitochondrial dysfunction and reprogramming energy metabolism mediated by the SIRT3/HIF-1 α signaling axis. This study elucidates a novel molecular mechanism underlying fluoride-induced developmental neurotoxicity, clarifies the pivotal role of the SIRT3/HIF-1 α axis as well as the intervention value of Mel, and offers new insights and potential therapeutic targets for preventing fluoride-related neurodevelopmental impairment.

Key words: sodium fluoride; melatonin; SIRT3/HIF-1 α signaling axis; developmental neurotoxicity; energy metabolism

目录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
主要英文缩略词表.....	VII
1. 前言.....	1
2. 材料与amp;方法.....	4
2.1 试剂与耗材.....	4
2.2 主要仪器.....	4
2.3 相关试剂配制.....	5
2.4 动物的饲养及处理.....	7
2.5 细胞的培养及处理.....	7
2.6 实验方法.....	9
2.7 统计分析.....	15
3. 结果.....	16
3.1 NaF 暴露损害 F ₁ 代大鼠的认知功能.....	16
3.2 NaF 暴露破坏 F ₁ 代大鼠海马 CA1 区神经元尼氏小体.....	17
3.3 NaF 暴露导致线粒体损伤及 ATP 含量降低.....	17
3.4 NaF 暴露影响 SIRT3/HIF-1 α 信号轴及能量代谢重编程.....	20
3.5 HIF-1 α 沉默可改善 NaF 诱导的能量代谢重编程.....	24
3.6 Mel 缓解 NaF 暴露致 F ₁ 代大鼠的认知功能损伤.....	27
3.7 Mel 减轻 NaF 暴露致 F ₁ 代大鼠海马 CA1 区神经元尼氏小体的损伤.....	29
3.8 Mel 改善 NaF 诱导的线粒体损伤及 ATP 含量降低.....	30
3.9 Mel 通过 SIRT3/HIF-1 α 信号轴调控能量代谢重编程.....	32
4. 讨论.....	38
5. 结论.....	42
6. 局限性及展望.....	43
文献综述.....	44
参考文献.....	49
致谢.....	60
作者简介.....	61
导师评阅表.....	62

主要英文缩略词表

缩写	英文全称	中文全称
ACTB	Actin beta	肌动蛋白 β
ATP	Adenosine triphosphate	腺嘌呤核苷三磷酸
AP	Ammonium persulfate	过硫酸铵
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CCK-8	Cell counting kit-8	细胞计数试剂盒
DMEM	Dulbecco's modified eagle's medium	改良型 Eagle 培养基
DMSO	Dimethyl sulfoxide	二甲基亚砷
ECAR	Extracellular acidification rate	胞外酸化率
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
HIF-1 α	Hypoxia-inducible factor-1 α	缺氧诱导因子 1 α
HT22	Mouse hippocampal neuronal cells	小鼠海马神经元细胞
LDHA	Lactate dehydrogenase A	乳酸脱氢酶 A
Mel	Melatonin	褪黑素
MMP	Mitochondrial membrane potential	线粒体膜电位
MWM	Morris water maze	Morris 水迷宫
NaF	Sodium fluoride	氟化钠
NDUFS1	NADH dehydrogenase ubiquinone Fe-S protein	泛醌 NADH 脱氢酶 Fe-S 蛋白 1
OCR	Oxygen consumption rate	耗氧率
OXPHOS	Oxidative phosphorylation	氧化磷酸化
PBS	Phosphate buffer saline	磷酸盐缓冲剂
PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶 3
PKM2	Pyruvate kinase M2	丙酮酸激酶 M2

主要英文缩略词表续表

PMSF	Phenylmethyl-sulfonyl fluoride	苯甲基磺酰氟
PNT	Place navigation test	定位航行实验
PVDF	Polyvinylidene fluoride	聚偏二氟乙烯膜
ROS	Reactive oxygen species	活性氧
SDS	Sodium dodecyl sulfonate	十二烷基磺酸钠
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis	聚丙烯酰胺凝胶电泳
SIRT3	Silent information regulator 2-related enzyme 3	沉默信息调节因子 2 相关酶 3
SOD	Superoxide dismutase	超氧化物歧化酶
SPT	Spatial probe test	空间探索实验
TBST	Tris-buffered saline containing 0.05% tween-20	洗脱缓冲液
TEM	Transmission electron microscope	透射电子显微镜
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine	四甲基乙二胺

1. 前言

氟具有高电负性与活泼的化学性质,可与多种元素结合生成氟化氢、氟化钠(sodium fluoride, NaF)等化合物,并以化合物的形式广泛存在于岩石、土壤、空气和水体中^[1]。在澳大利亚中部、北美西部、巴西东部以及非洲和亚洲的许多地区地下水的氟化物含量已超过了世界卫生组织规定的低于 1.5 mg/L 的标准^[2, 3]。日常生活中,氟化物主要通过呼吸道、消化道和皮肤接触^[4]等途径进入人体。适量的氟摄入有利于强化骨骼和预防龋齿,但过量的氟暴露则导致氟在体内蓄积引起氟中毒,对健康造成严重损害^[5]。氟中毒不仅可引起骨相系统损伤,还会造成其他系统损伤,如生殖、泌尿、心血管、神经系统都会在氟的蓄积作用下产生毒性作用^[6-8]。因此,氟中毒引起人们广泛关注。

胎儿期是大脑发育的关键时期,神经系统尚未发育完全,极易受到产前不良暴露的影响^[9]。研究表明,氟化物能够穿透胎盘屏障、血—脑屏障并作用于发育中的大脑,且该阶段的大脑对氟化物等环境暴露引发的毒性损伤具有高敏感性^[10, 11]。流行病学证据表明,生命早期氟化物的暴露会对儿童的智力和认知产生不利影响,且产前暴露与认知能力的损伤存在相关性^[8, 12]。动物实验证明围产期氟暴露可导致子代大鼠和小鼠的学习记忆、记忆保持力下降,并显著改变海马结构和神经递质积累^[13, 14]。氟化物诱导的神经毒性是多种机制共同作用的结果,细胞骨架蛋白表达异常、氧化应激、炎症反应、神经递质及相关酶异常、自噬阻滞、细胞内钙超载及信号传导、铁死亡和线粒体功能障碍等均参与其中^[15-18]。此外,氟化物会对三羧酸循环酶、脂肪酸氧化相关酶和蛋白质与核苷酸等多种代谢相关酶的活性产生抑制作用,扰乱胆碱和花生四烯酸等的代谢^[14, 19]。尽管这些研究表明,氟化物会引起大脑的氧化应激、功能障碍和代谢紊乱,但是其对于代谢紊乱的具体机制尚未阐明。因此,需要更多的研究来揭示氟化物诱导发育神经毒性的机制。

大脑虽仅占人体总重量的 2%,却消耗人体 20%的能量。线粒体作为能量生成关键细胞器,广泛存在于神经元的胞体、树突、轴突和突触末端,其主要通过氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)过程,并辅以细胞质中的糖酵解为神经元提供能量,进而维持大脑的基本功能^[20];其中糖酵解产物丙酮酸在无氧时还原为乳酸,有氧条件下会进入线粒体转化为乙酰辅酶 A,进一步参与 OXPHOS^[21]。线粒体可通过 OXPHOS 产生大量的腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)以支撑功能性突触和电兴奋性维持等关键生理过程,进而加速神经元成熟^[22]。当线粒体结构和功能受损时,会出现活性氧(reactive oxygen species, ROS)升高、线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)下降、OXPHOS 解偶联和线粒体肿胀等一系列异常,直接

造成神经细胞能量供应不足, 继而引发代谢紊乱, 并参与神经退行性疾病的发生与发展^[23, 24]。线粒体稳态和能量代谢的正常维持依赖多种酶的协同作用, 这也是保障 ATP 稳定产生的关键。OXPHOS 作为线粒体核心的能量生成环节, 其异常会进一步诱发氧化应激、ATP 生成不足和信号通路受损, 最终损害神经元发育, 后期有社交能力差和刻板行为等表现^[25]。有研究表明, 氟化物不仅会破坏神经细胞线粒体功能, 抑制 OXPHOS 复合物的表达, 还可干扰能量代谢相关酶的活性, 进而导致神经元死亡及神经发育缺陷^[26, 27]。然而, 关于氟化物如何通过干扰能量代谢诱发发育神经毒性的具体分子机制尚未完全明确。

沉默信息调节因子 2 相关酶(silent information regulator 2-related enzymes, Sirtuins) 是哺乳动物中高度保守的 NAD⁺依赖性去乙酰化酶家族, 其中沉默信息调节因子 2 相关酶 3 (silent information regulator 2-related enzyme 3, SIRT3) 是定位于线粒体的一种去乙酰化酶, 在线粒体稳态和代谢调节等方面发挥着关键的作用^[28]。SIRT3 作为一种重要的能量调节因子, 不仅能影响线粒体的能量代谢, 同时也能调控细胞内 ROS 的水平, 其通过增加超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 的活性, 从而使 ROS 水平降低^[29]。研究表明, 氟暴露会降低海马组织中 SIRT3 蛋白表达水平, 导致其下游蛋白 SOD 发生高乙酰化, 进而引起细胞内 ROS 的积累^[27, 29]。生理水平的 ROS 在细胞信号传导和维持细胞稳态中发挥重要作用, 而过量 ROS 的产生会诱发胞质钙超负荷、能量耗竭、细胞凋亡/坏死及炎症反应等细胞损伤相关过程^[30]。ROS 爆发会对线粒体蛋白和脂质造成氧化损伤, 从而破坏线粒体电子传递链功能、增加线粒体膜通透性进而损害线粒体能量代谢^[31]。此外, ROS 的累积会上调细胞内转录因子——缺氧诱导因子 (hypoxia-inducible factor, HIF) 的表达^[32]。HIF 为核转录因子, 由 3 种 α 亚基 (HIF-1 α 、HIF-2 α 、HIF-3 α) 中的一种与 β 亚基共同构成异二聚体; 其中, HIF-1 α 可调控数千个基因的表达, 这些基因编码的产物涵盖生长因子、酶、转录因子、细胞因子等多种功能分子, 而这些分子在细胞正常功能的维持以及功能障碍的发生过程中均发挥着关键作用^[33, 34]。HIF-1 α 作为调控氧稳态和能量代谢的关键转录因子, 在缺氧或应激条件下其可促使细胞能量代谢由 OXPHOS 向糖酵解转换, 通过上调葡萄糖转运蛋白及乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase A, LDHA)、磷酸甘油酸激酶 1 等糖酵解相关酶的表达、抑制丙酮酸向乙酰辅酶 A 转化、促进线粒体蛋白 COX4-1 降解等途径, 增强糖酵解活性并降低线粒体代谢通量, 最终发生能量代谢重编程^[35-37]。此外, HIF-1 α 还可抑制线粒体中辅酶 A 代谢及线粒体生物发生过程^[38]。研究表明, 氟可通过上调 HIF-1 信号通路中相关酶的活性, 影响细胞的能量获取, 进而参与氟斑牙的发生^[39]; 氟还可通过激活 HIF-1 α , 触发 Wnt/ β -catenin 信号通路的激活, 从而导致大鼠骨硬化^[40]。综上, 氧化应激状态下, HIF-1 α 上调会抑制线粒体的 OXPHOS、增强葡萄糖的摄取与糖酵解水平; 而神经元高度依赖 OXPHOS 产生 ATP 以维持正常功能, OXPHOS 受损最终可引发神经细胞损伤。

但氟是否通过 SIRT3/HIF-1 α 信号轴影响神经细胞的线粒体能量代谢，目前尚不可知。基于此，我们提出假说：NaF 暴露可能通过抑制 SIRT3，使细胞内 ROS 含量增加，从而激活 HIF-1 α 介导的能量代谢重编程，诱发发育神经毒性。

褪黑素 (melatonin, Mel) 可穿过血—脑屏障且具有镇静、催眠、抗氧化等生物学活性，已被用作阿尔茨海默病、帕金森病等神经退行性疾病的神经保护剂，其对神经的保护作用是通过减轻氧化应激、改变细胞因子释放和保护线粒体功能等实现^[41]。既往研究已明确 Mel 是 SIRT3 的特异性激动剂，其保护效应与 SIRT3 调控直接相关：在脓毒症诱导的小肠和急性肾损伤中，Mel 通过上调 SIRT3 保护线粒体功能并激活自噬以减轻损伤^[42, 43]；在阿霉素致心脏损伤模型中，Mel 可激活 SIRT3/TFEB 信号通路恢复自噬流^[44]；尤其成肌细胞分化中，Mel 通过 SIRT3 增强线粒体能量代谢、激活线粒体抗氧化酶，但是 SIRT3 的沉默会完全消除这种作用^[45]。此外，研究表明，在缺血损伤时，褪黑素会特异性恢复受损侧海马的 SIRT3 下调，但并不影响对侧海马和对照组海马中 SIRT3 的表达^[46]。这些研究结果表明，SIRT3 是 Mel 发挥保护效应的核心介导因子。然而，Mel 是否能够缓解氟诱导的神经毒性，以及这种保护作用是否通过 SIRT3/HIF-1 α 信号轴及其对能量代谢的调控，目前尚不清楚。

因此，本研究采用 Sprague-Dawley (SD) 大鼠建立体内模型，从亲代大鼠 (F₀) 妊娠期开始通过灌胃的方式暴露于 NaF (0、10、20、40 mg/kg/day) 至子代 (F₁) 两月龄，以此来模拟人体接触环境并覆盖神经发育的关键时期，同时给予 Mel (10 mg/kg/day) 处理，检测 F₁ 代大鼠认知功能及相关分子机制。此外，采用 NaF (0、20、40、60 mg/L) 和 Mel (20 μ M) 处理小鼠海马神经元细胞 (HT22)，并且转染 HIF-1 α siRNA 建立体外模型，明确 SIRT3/HIF-1 α 轴的具体作用。本研究旨在探究 SIRT3/HIF-1 α 轴是否介导氟诱导的神经细胞能量代谢紊乱；明确 Mel 是否通过靶向该信号通路改善代谢紊乱，进而缓解氟诱导的发育神经毒性，为 Mel 作为防治氟致神经发育障碍的潜在干预药物提供理论依据。

2. 材料与方法

2.1 试剂与耗材

本研究涉及的主要试剂和实验耗材见表 2-1。

表 2-1 主要试剂及实验耗材

试剂名称	生产厂家
NaF、Mel	美国 Sigma 公司
SIRT3、PFKFB3、NDUFS1、PKM2、LDHA、GAPDH 抗体	武汉三鹰生物技术有限公司
HIF-1 α 抗体	上海 Abmart 公司
HIF-1 α siRNA	上海壹学盛生物科技有限公司
β -actin 抗体	北京中杉金桥生物技术有限公司
ROS 试剂盒、JC-1 试剂盒、Tween-20、RIPA 裂解液、PMSF、5 \times Loading buffer、0.25%胰蛋白酶、青链霉素	北京索莱宝科技有限公司
丙酮酸检测试剂盒	北京索莱宝科技有限公司
乳酸测定试剂盒	武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司
ATP 测定试剂盒	上海碧云天生物技术股份有限公司
预染 Marker、PBS 粉末、TBS 粉末	武汉赛维尔生物技术有限公司
Tris 6.8、Tris 8.8、30% Acr-Bis 制胶液、CCK-8 试剂盒	合肥白鲨生物科技有限公司
DMEM 培养基、胎牛血清	以色列 Biological Industries 公司
Lipofectamine 2000 转染试剂	美国 Thermo 公司
ECL 化学发光底物试剂盒	合肥白鲨生物科技有限公司
脱脂奶粉	内蒙古伊利实业集团股份有限公司
PVDF 膜	美国 Millipore 公司
6 孔板、96 孔板、细胞培养瓶	广州甄选生物科技有限公司
乳胶手套、医用口罩、微量移液器枪头	南京建成生物工程研究所

2.2 主要仪器

本研究涉及的主要仪器设备信息见表 2-2。