

心脑血管疾病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.001758

邻苯二甲酸二丁酯围生期暴露对子代大鼠认知功能的影响及机制

谢明丹, 李秀娟, 李 洋, 宋晓洁, 陈恒胜, 程 莉, 蒋 莉

(重庆医科大学附属儿童医院神经内科、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、
儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地、儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014)

【摘要】目的:研究邻苯二甲酸二丁酯(di-n-butyl phthalate, DBP)暴露对子代大鼠的神经毒性并探索其可能机制。**方法:**妊娠 SD 大鼠随机分为 DBP 低剂量($n=10$)和高剂量染毒组($n=10$), 分别给予 DBP 50 mg/(kg·d)和 200 mg/(kg·d)从妊娠第 6 天到产后 23 d 连续灌胃染毒, 并予以同等体积玉米油灌胃为对照组($n=8$)。除观察 DBP 染毒后孕鼠、子鼠的一般情况外, 采用水迷宫实验检测子鼠认知功能、皮质脑电图记录脑电活动, 观察海马形态变化, 并以 Western blot 测定子代海马脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)、雌激素受体 β (estrogen receptor β , ER β)蛋白的表达情况。**结果:**与对照组比较, 高剂量染毒组子鼠的体质量均低于同性别对照组($P<0.05$)。DBP 染毒后子鼠的逃避潜伏期延长($P<0.05$), 在目标象限的停留时间缩短($P<0.05$), 跨越平台次数减少($P<0.05$); 染毒后子鼠 δ 波比例增加($P<0.05$), θ 、 α 波比例减少($P<0.05$), δ 波+ θ 波(慢波总和)比例增加($P<0.01$)。HE 染色显示, 高剂量染毒组海马 CA3 区和 DG 区细胞层数稍减少, 细胞密集度轻度降低。低剂量和高剂量染毒组子鼠海马 BDNF、NPY、ER β 蛋白表达下降($P<0.01$)。**结论:**DBP 围生期染毒后可引起子代大鼠认知功能障碍, 脑电节律慢化, 其机制可能与 BDNF、NPY、ER β 表达下调有关。

【关键词】邻苯二甲酸二丁酯; 水迷宫; 脑电图; 雌激素受体; 脑源性神经营养因子; 神经肽 Y

【中图分类号】R748

【文献标志码】A

【收稿日期】2018-03-05

Effect of di-n-butyl phthalate on the cognitive function in offspring rats after perinatal exposure and its mechanism

Xie Mingdan, Li Xiujuan, Li Yang, Song Xiaojie, Chen Hengsheng, Cheng Li, Jiang Li

(Department of Neurology, Children's Hospital of Chongqing Medical University; Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders; China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders; Chongqing Key Laboratory of Pediatrics)

【Abstract】Objective: To study the neurotoxicity of di-n-butyl phthalate (DBP) exposure on offspring rats and explore the underlying mechanism. **Methods:** Pregnant SD rats were randomly divided into three groups; 50 mg/(kg·d) DBP (low-dose treatment group, $n=10$), 200 mg/(kg·d) DBP (high-dose treatment group, $n=10$) or vehicle only (control group, $n=8$) was given respectively by gavage once a day from gestation day-6 (GD6) to postnatal day-23 (PND23) consecutively. The general effects of DBP on pregnant and offspring rats were observed. The cognitive function of the offspring was evaluated through Morris water maze. The brain activity was recorded with electrocorticography. The morphological changes of the hippocampus were observed via HE staining. The expression levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF), neuropeptide Y (NPY) and estrogen receptor β (ER β) protein in the hippocampus were measured by Western blot analysis. **Results:** Compared with those of the same sex in the control group, the pups in the high-dose treatment group showed lower birth weight ($P<0.05$). In the water maze test, the escaping latency of both treatment groups was longer than that of the control ($P<0.05$). The pups in the treatment groups also spent less time in the target quadrant ($P<0.05$), and the numbers of crossing the platform were fewer, too ($P<0.05$). During EEG recording, the pups in DBP treatment groups were found to have more delta activity ($P<0.05$) and delta+theta activity ($P<0.01$), but less theta and alpha activity ($P<0.05$). HE staining showed that in

作者介绍: 谢明丹, Email: gianna1992@163.com,

研究方向: 环境与脑发育。

通信作者: 蒋 莉, Email: dr_jiangli@hotmail.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (编号: 8140120259)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180525.1034.010.html>

(2018-05-26)

the high-dose treatment group, the cell number in CA3 and DG region of the hippocampus decreased slightly, and so did the cell density. Furthermore, the expressions of BDNF, NPY and ER β protein in the hippocampus were significantly reduced in both treatment groups ($P<0.01$). **Conclusion:** DBP could cause cognitive dysfunction and slower brain rhythms in offspring rats

after perinatal exposure, which may be related to the down-regulated expressions of BDNF, NPY and ER β .

【Key words】di-n-butyl phthalate; water maze; electroencephalogram; estrogen receptor; brain-derived neurotrophic factor; neuropeptide Y

邻苯二甲酸酯类化合物(phthalate acid esters, PAEs)是一类普遍使用的增塑剂,被广泛应用于食品包装材料、医疗器械等各种塑料制品中,在我国食品包装物及水环境中广泛存在^[1-2]。作为最常见的环境污染物之一,其在环境及人群中的污染已达一定负荷^[3-4]。邻苯二甲酸二丁酯(di-n-butyl phthalate, DBP)是其中使用较为广泛的一种,因其稳定性、黏结性和防水性均优于其他增塑剂,常用于聚氯乙烯材料和橡胶合成中。DBP 与母体以非共价键结合,极易从塑料制品中游离出来,进入环境中。人类主要通过食物、大气、皮肤接触等途径暴露。另外,医疗器械(如静脉注射袋、血袋、透析管等)、职业接触也是 DBP 进入人体的重要途径。其中婴幼儿和儿童的暴露途径更为多样化,包括母乳喂养、婴儿护理产品的使用^[5]和塑料玩具的玩耍等,且处于发育的关键期,DBP 对婴幼儿的污染风险不容忽视。本研究通过对孕期和哺乳期雌性 SD 大鼠予以 DBP 染毒,观察 DBP 对子代大鼠神经发育的影响,并探讨其可能机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 SPF 级健康成年雌性 SD 大鼠 57 只,体质量(260 $\pm$ 23) g;雄性 SD 大鼠 10 只,体质量(310 $\pm$ 30) g,由重庆医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(渝)2017-0001,置于 SPF 级动物实验室饲养。自然昼夜,22 $^{\circ}$ C~25 $^{\circ}$ C 环境温度,标准饲料喂养,自由饮食饮水。在动物饲养和实验过程中,符合作者所在单位实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准。

1.1.2 实验试剂和仪器 DBP (Sigma-Aldrich 公司,纯度 99.0%),食用玉米油(中粮粮油工业有限公司);ER β 兔多克隆抗体(Abcam 公司),BDNF 兔单克隆抗体(Abcam 公司),NPY 兔多克隆抗体(Abcam 公司),PVDF 膜(Bio-Rad 公司);其他试剂均为国产分析纯。BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo Scientific 公司),ECL 化学发光试剂盒(Bio-Rad 公司)。G: BOX 荧光化学发光凝胶成像系统(Syngene 公司),CM1950 冰冻切片机(Leica 公司),Nikon55I 光学显微镜。

1.2 实验方法

1.2.1 孕鼠染毒和分组 所有大鼠适应性喂养 1 周后,雌雄 1:1 长期合笼,随时观察阴栓,以找到阴栓表示交配成功,同时定为妊娠第 0 天(GD₀)。将孕鼠随机分为 2 个不同浓度的

DBP 染毒组,即 50 mg/(kg $\cdot$ d)(低剂量染毒组)、200 mg/(kg $\cdot$ d)(高剂量染毒组)和 1 个溶剂对照组,从妊娠第 6 天(GD₆)开始给予各组孕鼠灌胃给药,到产后第 23 天(PND₂₃)断乳期止。

动物染毒方法:将 DBP 溶于食用玉米油,配制成 25、100 mg/mL 的浓度,按 2 mL/(kg $\cdot$ d)予大鼠经口灌胃给药,每日定时一次给药。对照组给予同体积食用玉米油。

1.2.2 染毒后的一般情况观察 染毒期间观察孕鼠和子鼠的一般行为,包括孕鼠有无流产、阴道流血,死亡,食仔等;仔鼠产后 1 d 的体质量,有无死亡、外观畸形。在 PND₂₁ 时:每组随机抽取雌雄子鼠各至少 8 只用于水迷宫实验,结束后取脑行 HE 染色;另取雌雄子鼠各 6 只进行脑电图描记,结束后取海马组织行 Western blot 检测。

1.2.3 Morris 水迷宫实验 水迷宫实验包括定位航行实验及空间探索实验。圆形水池直径 180 cm、高 60 cm,平台置于第三象限中央,水面没过平台 1.5 cm。先进行适应性训练,将大鼠放入水池中,自由游泳 60 s。后进行连续 5 d 的定位航行实验:将大鼠随机选取一个方位头朝池壁放入水中,记录在 1 min 内找到水下平台的时间(即寻台潜伏期或逃避潜伏期)及游泳轨迹。若超过 1 min 仍未找到,则将其引导至平台并停留 10 s,潜伏期记为 60 s。每只大鼠每天训练 4 次。逃避潜伏期越短,说明其空间学习记忆能力越强。定位航行实验结束后第 2 天进行探查实验,撤除平台,由原先平台象限的对侧(第一象限)放入水中,记录大鼠在 60 s 内在目标象限(第三象限)所花的时间和跨越平台次数。目标象限停留时间越长和跨越平台次数越多,表明动物的空间记忆能力越强。

1.2.4 皮质脑电图监测 PND₂₁ 子鼠以 10%水合氯醛(3~5 mL/kg)腹腔麻醉后,俯卧位固定于脑立体定位仪上,常规备皮,沿大鼠头顶正中中线做矢状切口切开头皮,钝性分离皮下组织,暴露颅骨,以前囟为“0”点,前囟后 1~2 mm、旁开 1~2 mm 为侧脑室定位点,左右各一,以标记点处钻孔穿颅骨,间脑端钻一孔用于接地;埋入事先制作好的单极三孔电极,用牙科水泥固定。记录脑电图形态,并计算脑电图各频段(δ , θ , α , β 波)的相对功率值(相对功率值=各波的绝对功率值/总功率值 $\times$ 100%)。

1.2.5 子鼠脑组织形态变化 PND₂₁ 子鼠经 4%多聚甲醛灌注固定后取脑,OCT 包埋剂冰冻包埋组织,连续冠状切片,切片厚度 20 μ m,HE 染色,显微镜下观察。

1.2.6 蛋白免疫印迹法测定海马相关蛋白的表达 PND₂₁ 子鼠以 10%水合氯醛腹腔麻醉后断头取脑,冰上分离海马,组织匀浆提取总蛋白后行 Western blot 实验测定海马脑源性神经营养因子(brain-derived neurotrophic factor, BDNF)、神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)、雌激素受体 β (estrogen receptor β , ER β)的蛋白表达水平。用 Genetool 软件分析各组间各目标

蛋白及内参的灰度值,目标蛋白/内参 β -actin 的比值表示其表达量。

1.3 统计学处理

采用统计分析软件 SASS 22.00 进行统计学处理。计数资料采用构成比表示,计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。计数资料采用卡方检验,多组间比较采用单因素方差分析进行统计学分析,并用 Bonferroni 校正 P 值;定位航行试验中的逃避潜伏期采用重复测量数据的方差分析,空间探索实验和 Western blot 实验结果采用析因设计的方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 孕鼠染毒后的一般情况

共合笼成功 57 只,其中 28 只孕鼠生产 (49.0%),10 只假孕 (17.5%),10 只流产 (17.5%),发生难产、直接死亡共 9 只 (16.0%)。最终存活雄性子鼠 136 只,雌性子鼠 140 只。所有产仔中,高剂量染毒组食仔现象较严重,且有出生畸形子鼠 19 只 (如无头,肢体与躯干粘连) 并于出生时已全部死亡;余子鼠无明显外观畸形。

围生期 DBP 染毒后,与对照组比较,染毒各组孕鼠产仔数 ($F=0.461, P=0.637$) 和子代性别变化 ($\chi^2=6.000, P=0.112$) 无明显差异;但高剂量染毒组子鼠的体质量均低于同性别对照组 (雄: $F=9.420, P=0.000$; 雌: $F=4.600, P=0.012$); 而且,不同组内子代雌鼠的出生体质量明显低于雄鼠 ($F=14.900, P=0.000$; 对照组: $P=0.002$; 低剂量染毒组: $P=0.000$; 高剂量染毒组: $P=0.003$); 随着染毒剂量的增加,子鼠的出生体质量下降

更明显,差异具有统计学意义 (雄: $P=0.000$; 雌: $P=0.022$), 见表 1。

2.2 DBP 围生期暴露对子代大鼠认知功能的影响

定位航行实验显示,随着训练天数增加,各组子鼠的逃避潜伏期有逐渐缩短趋势,提示大鼠获得了一定的学习记忆能力 (表 2)。但从不同组间子鼠在实验第 5 天的游泳轨迹图 (图 1) 可以看出, DBP 染毒后子鼠需要花费更多的时间来找到平台,游泳路径更杂乱。统计分析显示: 与对照组相比,不同剂量的 DBP 围生期染毒后,子鼠在实验第 3 天 (雄: $F=3.570, P=0.041$; 雌: $F=3.140, P=0.046$)、第 4 天 (雌: $F=2.980, P=0.049$)、第 5 天 (雄: $F=5.880, P=0.007$) 逃避潜伏期明显延长; 而与子鼠性别 (对照组: $F=7.140, P=0.017$; 低剂量染毒组: $F=2.940, P=0.104$; 高剂量染毒组: $F=0.251, P=0.622$) 无明显关系,未见明显剂量依赖性。



图 1 各组子鼠定位航行实验第 5 天游泳轨迹图

在空间探索实验中,对照组子代雄鼠在目标象限的停留时间短于雌鼠,但无统计学差异 ($P=0.266$)。但与对照组同性别子鼠相比,不同剂量 DBP 染毒后,子鼠在目标象限的停留时间均显著缩短 (雄: $F=14.300, P=0.000$; 雌: $F=5.910, P=0.007$); 随着染毒剂量增大,高剂量 DBP 染毒后,子代雄鼠在

表 1 DBP 围生期暴露对子代大鼠性别和体质量的影响 ($\bar{x} \pm s$)

观察指标	对照组 ($n=7$)	低剂量染毒组 ($n=8$)	高剂量染毒组 ($n=7$)	F/χ^2 值	P 值
存活仔数 (个)	13.14 $\pm$ 1.95	12.00 $\pm$ 3.12	12.57 $\pm$ 1.27	0.461	0.637
性别比 (雄/雌 n)	47/45	41/55	48/40	6.003	0.112
出生体质量 (g)					
雄	6.30 $\pm$ 0.51	6.51 $\pm$ 0.48	6.02 $\pm$ 0.60 ^{ab}	9.424	0.000
雌	5.93 $\pm$ 0.50 ^c	5.93 $\pm$ 0.48 ^c	5.65 $\pm$ 0.46 ^{abc}	4.598	0.012

注: a, 与对照组同性别相比, $P<0.05$; b, 与低剂量染毒组同性别相比, $P<0.05$; c, 与同组子代雄鼠相比, $P<0.01$

表 2 DBP 围生期暴露对 PND21 子代大鼠逃避潜伏期的影响 ($\bar{x} \pm s, s$)

组别	例数 (n)	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
对照组						
雄	9	52.19 $\pm$ 11.55	49.42 $\pm$ 7.69	38.32 $\pm$ 11.37	30.54 $\pm$ 15.47	27.04 $\pm$ 8.03
雌	9	48.64 $\pm$ 12.41	42.05 $\pm$ 11.23	29.92 $\pm$ 10.93	24.50 $\pm$ 11.26	20.22 $\pm$ 8.46
低剂量染毒组						
雄	9	55.92 $\pm$ 6.21	53.10 $\pm$ 10.20	51.92 $\pm$ 9.31 ^a	42.06 $\pm$ 17.65	43.14 $\pm$ 13.41 ^a
雌	11	50.53 $\pm$ 9.22	54.67 $\pm$ 5.68 ^a	44.70 $\pm$ 16.37 ^a	35.00 $\pm$ 15.56	31.89 $\pm$ 13.92
高剂量染毒组						
雄	14	55.53 $\pm$ 6.29	53.13 $\pm$ 8.74	39.82 $\pm$ 14.02	41.76 $\pm$ 14.20	43.86 $\pm$ 13.64 ^a
雌	10	57.78 $\pm$ 4.51	50.57 $\pm$ 7.77	43.87 $\pm$ 14.86 ^a	40.81 $\pm$ 16.25 ^a	32.29 $\pm$ 14.39
F 值						
雄		0.609	0.559	3.568	1.716	5.878
雌		2.708	5.798	3.140	2.982	2.738
P 值						
雄		0.551	0.578	0.041	0.198	0.007
雌		0.085	0.008	0.046	0.049	0.083

注: a, 与对照组同性别相比, $P<0.05$; 方差分析结果: 分组主效应 (雄: $F=4.346, P=0.022$; 雌: $F=7.331, P=0.003$), 时间主效应 (雄: $F=17.603, P=0.000$; 雌: $F=26.534, P=0.000$), 交互效应 (雄: $F=1.768, P=0.090$; 雌: $F=0.831, P=0.577$)

目标象限的停留时间不仅明显短于同性别对照组($P=0.000$),且亦明显短于同组雌鼠($P=0.013$)。各组子鼠的跨越平台次数与其在目标象限的停留时间结果类似,见表 3。

表 3 DBP 围生期暴露对 PND21 子代大鼠水迷宫空间探索试验的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	停留时间(s)	跨平台次数(次)
对照组	雄 9	25.89 ± 7.50	2.39 ± 0.93
	雌 9	31.50 ± 8.79	2.50 ± 1.35
低剂量染毒组	雄 9	18.20 ± 5.37 ^a	1.22 ± 1.12 ^a
	雌 11	20.18 ± 7.05 ^a	1.05 ± 0.79 ^a
高剂量染毒组	雄 14	12.80 ± 4.54 ^a	0.39 ± 0.49 ^a
	雌 10	21.27 ± 8.01 ^{ab}	1.20 ± 0.95 ^{ab}
<i>F</i> 值	雄	14.318	15.808
	雌	5.914	5.685
<i>P</i> 值	雄	0.000	0.000
	雌	0.007	0.009

注:a,与对照组同性别相比, $P<0.05$;b,与该组子代雄鼠相比, $P<0.05$;方差分析结果:停留时间:分组主效应($F=15.851, P=0.000$),性别主效应($F=9.174, P=0.004$),交互效应($F=1.184, P=0.314$);跨平台次数:分组主效应($F=16.924, P=0.000$),性别主效应($F=1.058, P=0.308$),交互效应($F=1.594, P=0.212$)

2.3 DBP 围生期暴露对子代大鼠脑电活动的影响

不同组间子鼠脑电图的形态如图 2 所示,各组不同频率脑电波的相对功率见表 4。结果显示:正常组子鼠 EEG 以 1.25~4.5 Hz 的 δ 节律为主(占 32.42%,主频率 3 Hz 左右),其次为 θ 波和 α 波(各占 10.30%、14.12%),脑电波规则整齐,雌雄无明显差异。与对照组相比,DBP 染毒后子鼠脑电图 δ 波明显增多($F=5.750, P=0.014$), θ 波($F=7.240, P=0.006$)和 α 波($F=6.100, P=0.012$)相对减少, δ 波+ θ 波(慢波总和)比例增

加($F=4.230, P=0.035$);随着染毒剂量增大,EEG 慢波改变更为明显($P=0.039$);各组 β 波变化不大($F=1.940, P=0.179$)。

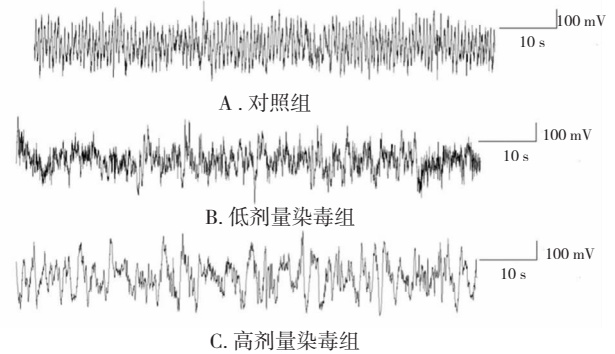


图 2 各组子鼠脑电图形态比较

2.4 海马形态学观察

子鼠海马 HE 染色后可见:对照组海马结构完整,细胞排列整齐,细胞密集度高,低剂量和高剂量染毒组海马结构正常,细胞形态、胞核无明显异常,各组均未见明显细胞坏死、液化,无明显核固缩。与对照组比较,高剂量染毒组 CA3 区和 DG 区细胞层数稍减少,细胞密集度轻度降低。各组内雌雄子鼠没有明显差异(图 3)。

2.5 海马 BDNF、NPY、ER β 蛋白表达的改变

Western blot 检测海马 BDNF、NPY、ER β 蛋白表达结果(表 5、图 4)显示:DBP 染毒后,子鼠 BDNF 表达量均明显低于同性别对照组(雄: $F=36.700, P=0.000$;雌: $F=4.410, P=0.022$);且随着染毒剂量增大,高剂量 DBP 染毒后,与相同性别对照组相比,雄鼠 BDNF 表达量下降更明显($P=0.000$)。值得注意的是,尽管对照组子代雄鼠 BDNF 表达量高于雌鼠($P=0.001$),但在高剂量 DBP 染毒后,子代雄鼠 BDNF 表达量甚

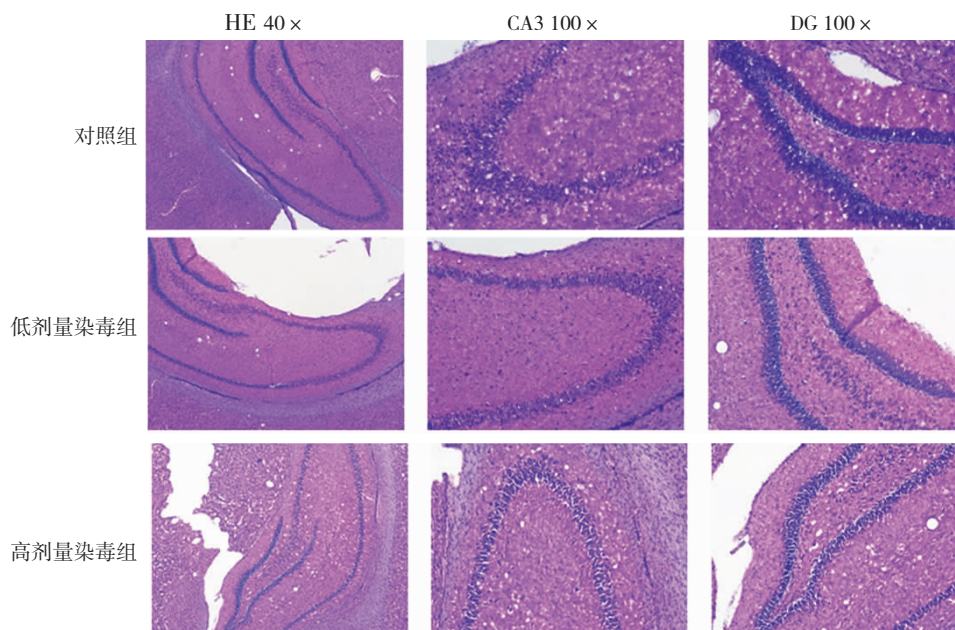


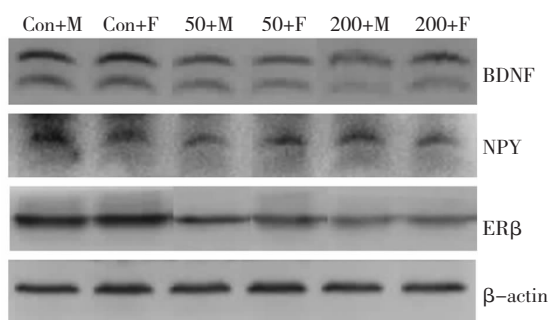
图 3 各组海马形态变化

表 4 DBP 围生期暴露后 PND21 子代大鼠 EEG 各频段相对功率值的变化 ($\bar{x} \pm s, \%$)

组别	例数	δ	θ	α	β	$\delta + \theta$
对照组	6	32.42 $\pm$ 6.83	10.30 $\pm$ 1.15	14.12 $\pm$ 8.21	7.96 $\pm$ 2.84	42.72 $\pm$ 6.05
低剂量染毒组	6	39.05 $\pm$ 7.69	6.98 $\pm$ 2.10 ^a	3.64 $\pm$ 3.62 ^a	4.71 $\pm$ 4.24	46.03 $\pm$ 9.46
高剂量染毒组	6	46.69 $\pm$ 7.35 ^a	8.33 $\pm$ 1.10	6.66 $\pm$ 2.33	5.03 $\pm$ 1.92	55.02 $\pm$ 6.81 ^a
F 值		5.749	7.241	6.100	1.937	4.228
P 值		0.014	0.006	0.012	0.179	0.035

注:a,与对照组相比, $P < 0.05$

至低于同组雌鼠,差异具有统计学意义($P=0.007$)。各组子鼠 NPY 蛋白的表达变化与其 BDNF 表达改变类似(表 5)。ER β 蛋白的表达变化如下:对照组子代雄鼠 ER β 表达量与雌鼠相近。DBP 染毒后,子鼠 ER β 表达量均明显低于同性别对照组(雄: $F=149.000, P=0.000$;雌: $F=64.600, P=0.000$);子代雄鼠表现出剂量依赖性,随着染毒剂量增大,高剂量 DBP 染毒后,与相同性别对照组相比,雄鼠 ER β 表达量下降更明显($P=0.000$)。



Con+M:对照组子代雄鼠;Con+F:对照组子代雌鼠;50+M:低剂量染毒组子代雄鼠;50+F:低剂量染毒组子代雌鼠;200+M:高剂量染毒组子代雄鼠;200+F:高剂量染毒组子代雌鼠

图 4 各组子鼠海马 BDNF、NPY、ER β 蛋白的表达表 5 DBP 围生期暴露对 PND21 子代大鼠海马 BDNF、NPY、ER β 蛋白表达的影响(OD 值) ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	BDNF	NPY	ER β
对照组	雄 6	1.57 $\pm$ 0.29	3.04 $\pm$ 0.25	1.43 $\pm$ 0.20
	雌 6	1.17 $\pm$ 0.21 ^c	2.93 $\pm$ 0.23	1.49 $\pm$ 0.27
低剂量染毒组	雄 6	1.17 $\pm$ 0.23 ^a	1.22 $\pm$ 0.22 ^a	0.69 $\pm$ 0.04 ^a
	雌 6	0.96 $\pm$ 0.14	1.17 $\pm$ 0.13 ^a	0.55 $\pm$ 0.16 ^a
高剂量染毒组	雄 6	0.63 $\pm$ 0.21 ^{ab}	0.89 $\pm$ 0.16 ^{ab}	0.25 $\pm$ 0.05 ^{ab}
	雌 6	0.94 $\pm$ 0.22 ^{ac}	1.18 $\pm$ 0.14 ^{ac}	0.41 $\pm$ 0.04 ^a
F 值	雄	36.704	233.559	149.302
	雌	4.409	282.866	64.588
P 值	雄	0.000	0.000	0.000
	雌	0.022	0.000	0.000

注:a,与对照组同性别相比, $P < 0.01$;b,与低剂量染毒组同性别相比, $P < 0.05$;c,与该组子代雄鼠相比, $P < 0.05$;方差分析结果——BDNF:分组主效应($F=35.262, P=0.000$),性别主效应($F=2.881, P=0.096$),交互效应($F=14.029, P=0.000$);NPY:分组主效应($F=502.560, P=0.000$),性别主效应($F=0.604, P=0.441$),交互效应($F=4.870, P=0.013$);ER β :分组主效应($F=177.565, P=0.000$),性别主效应($F=0.224, P=0.639$),交互效应($F=3.194, P=0.054$)

3 讨论

DBP 作为一种环境污染物,可对人类和动物的脑发育产生重要影响。大量研究证实 DBP 污染对发育期神经系统具有毒性作用,引起认知行为异常^[6-8]。本实验采用 DBP 对大鼠孕期及哺乳期进行灌胃染毒,建立 DBP 围生期暴露模型,以生后 21 d 子代鼠为研究对象,采用水迷宫实验、脑电图描记结合 HE 染色从大鼠认知功能、脑电活动和形态结构的变化,探索 DBP 对子代大鼠的神经毒性。水迷宫结果显示,子鼠的逃避潜伏期延长,在目标象限的停留时间和跨越平台次数减少,提示 DBP 染毒后子代大鼠的空间学习记忆能力受损,发生认知功能障碍。进一步的皮质脑电图监测显示,与对照组相比,染毒后子鼠 δ 波比例增加, θ 、 α 波比例减少, δ 波+ θ 波(即慢波总和)比例增加,提示 DBP 染毒后子代大鼠脑电节律慢化,脑功能受到抑制或减退。本实验采用不同剂量染毒发现,DBP 对认知功能和脑功能的影响具有一定剂量依赖性,随着染毒剂量增加,脑功能损害加重。

HE 染色结果显示,DBP 染毒后未发现细胞坏死、液化、核固缩等,仅高剂量染毒组可见细胞层数稍减少,细胞密集度轻度降低。既往报道采用尼氏染色也发现 DBP 围生期暴露可导致幼年子鼠海马神经细胞丢失增加,神经元排列疏松,另外还发现尼氏小体溶解^[9]。DBP 是否导致超微结构改变有待进一步研究。

迄今为止 DBP 所致神经毒性的机制尚未明确。目前认为可能与内分泌干扰作用、氧化应激损伤^[10]、海马区神经细胞凋亡、突触结构与功能异常^[9]、神经递质系统紊乱等有关^[11]。DBP 是一种环境雌激素,可干扰脑内雌激素信号相关通道。已知雌激素具有脑保护作用,其受体 ER β 与学习记忆密切相关^[12]。雌激素与 ER β 结合后,可激活位于 BDNF 基因上的雌激素反应元件,增强 BDNF 蛋白表达,进而又诱

导 NPY 表达增加^[13-15]。这提示脑内可能存在 ER β -BDNF-NPY 的级联反应。BDNF 和 NPY 是具有广泛的神经营养及保护作用的物质,参与海马神经元的存活、突触形成等,对情绪、学习记忆等有明显的调控作用^[16-17]。本研究发现,DBP 染毒后可引起子代认知功能障碍,伴有海马 ER β 、BDNF、NPY 蛋白表达降低。DBP 极有可能作用于雌激素受体介导的信号通道从而阻滞神经系统发育。

有研究者在 DEHP 暴露模型中观察到其毒性作用的性别差异性^[18-19]。本实验采用 DBP 染毒发现,与低剂量染毒组比较,高剂量染毒组子代雄鼠在目标象限的停留时间和跨平台次数明显降低,子代雌鼠没有差别。同时高剂量染毒组子代雄鼠的 BDNF、NPY 蛋白表达量较低剂量染毒组降低,雌鼠没有类似改变。证实 DBP 的神经毒性也表现出性别差异,高剂量 DBP 染毒对子代雄鼠的影响更大。其机制尚不明确,可能与 PAEs 在高剂量时具有抗雄激素活性、影响发育关键期的脑性分化有关。有研究表明,PAEs 生命早期暴露可降低血清睾酮水平^[20-21]。

综上所述,本研究证实了 DBP 染毒后可引起子代大鼠认知功能障碍,脑电节律慢化,脑功能受到抑制,其机制可能与 ER β 、BDNF 及 NPY 参与的雌激素信号通道受阻有关。同时还发现 DBP 所致神经毒性具有一定的剂量依赖性和性别差异。但其具体量效关系还需细化实验分组以及检测血药浓度来进一步验证。BDNF、NPY 在脑内作用广泛,参与多条信号通路,DBP 神经毒性的具体分子机制尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 曹国洲,肖道清,朱晓艳. 食品接触制品中邻苯二甲酸酯类增塑剂的风险评估[J]. 食品科学,2010,31(5):325-327.
- [2] 孙翠竹,李富云,涂海峰,等. 邻苯二甲酸酯类对水生食物链的影响研究进展[J]. 生态毒理学报,2016,11(6):12-24.
- [3] 高海涛,李瑞仙,邱倩南,等. 我国人群邻苯二甲酸酯类的暴露水平及风险[J]. 癌变·畸变·突变,2017,29(6):471-475.
- [4] 柳春红,孙远明,杨艺超,等. 邻苯二甲酸酯类增塑剂的污染及暴露评估现状[J]. 现代食品科技,2012,28(3):339-341.
- [5] 易路遥,刘绪平,张春华,等. 婴幼儿洗护用品中 3 种邻苯二甲酸酯污染状况调查[J]. 现代预防医学,2017,44(12):2171-2191.
- [6] Percy Z,Xu Y,Sucharew H,et al. Gestational exposure to phthalates and gender-related play behaviors in 8-year-old children:an observational study[J]. Environ Health,2016,15(1):87-95.

- [7] Jurewicz J,Polańska K,Hanke W. Exposure to widespread environmental toxicants and children's cognitive development and behavioral problems[J]. Int J Occup Med Environ Health,2013,26(2):185-204.
- [8] Kim JJ,Hong YC,Shin CH,et al. The effects of maternal and children phthalate exposure on the neurocognitive function of 6-year-old children[J]. Environ Res,2017,156:519-525.
- [9] Li XJ,Jiang L,Chen L,et al. Neurotoxicity of dibutyl phthalate in brain development following perinatal exposure:a study in rats[J]. Environ Toxicol Pharmacol,2013,36(2):392-402.
- [10] Yan B,Guo J,Liu X,et al. Oxidative stress mediates dibutyl phthalate-induced anxiety-like behavior in Kunming mice[J]. Environ Toxicol Pharmacol,2016,45:45-51.
- [11] 薄存香,杨治峰,杜忠君. 邻苯二甲酸酯的神经毒性作用研究进展[J]. 环境与健康杂志,2015,32(7):647-649.
- [12] Frankfurt M,Luine V. The evolving role of dendritic spines and memory:interaction(s) with estradiol[J]. Horm Behav,2015,74:28-36.
- [13] Sohrabji F,Miranda RC,Toran-Allerand CD. Identification of a putative estrogen response element in the gene encoding brain-derived neurotrophic factor[J]. Proc Natl Acad Sci U S A,1995,92(24):11110-11114.
- [14] Malva JO,Xapelli S,Baptista S,et al. Multifaces of neuropeptide Y in the brain—neuroprotection,neurogenesis and neuroinflammation[J]. Neuropeptides,2012,46(6):299-308.
- [15] Veliskova J,Iacobas D,Iacobas S,et al. Oestradiol regulates neuropeptide Y release and gene coupling with the GABAergic and glutamatergic synapses in the adult female rat dentate gyrus[J]. J Neuroendocrinol,2015,27(12):911-920.
- [16] Andero R,Choi DC,Ressler KJ. BDNF-TrkB receptor regulation of distributed adult neural plasticity, memory formation, and psychiatric disorders[J]. Prog Mol Biol Transl Sci,2014,122:169-192.
- [17] Rangani RJ,Upadhyay MA,Nakhate KT,et al. Nicotine evoked improvement in learning and memory is mediated through NPY Y1 receptors in rat model of Alzheimer's disease[J]. Peptides,2012,33(2):317-328.
- [18] Andrade AJ,Grande SW,Talsness CE,et al. A dose-response study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP):non-monotonic dose-response and low dose effects on rat brain aromatase activity[J]. Toxicology,2006,227(3):185-192.
- [19] Smith CA,Macdonald A,Holahan MR. Acute postnatal exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate adversely impacts hippocampal development in the male rat[J]. Neuroscience,2011,193:100-108.
- [20] Howdeshell KL,Rider CV,Wilson VS,et al. Dose addition models based on biologically relevant reductions in fetal testosterone accurately predict postnatal reproductive tract alterations by a phthalate mixture in rats[J]. Toxicol Sci,2015,148(2):488-502.
- [21] Li X,Jiang L,Cheng L,et al. Dibutyl phthalate-induced neurotoxicity in the brain of immature and mature rat offspring[J]. Brain Dev,2014,36(8):653-660.

(责任编辑:冉明会)