

- 验室的肠炎沙门菌耐药监测[J]. 疾病监测, 2012, 28(5): 369-375.
- [9] 崔志刚, 王爱敏, 王鸣柳, 等. 婴幼儿腹泻感染的非伤寒沙门菌分子分型和耐药情况研究[J]. 疾病监测, 2014, 29(6): 428-431.
- [10] 张丽华, 朱学海, 郭主声, 等. 市售活鸡和腹泻患者中非伤寒沙门菌分子特征和耐药性研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(6): 605-609.
- [11] 黄熙, 黄琼, 石玮, 等. 广州市非伤寒沙门菌感染流行病学负担分析[J]. 中国食品卫生杂志, 2014, 26(3): 217-222.

## 论著

## DEHP 暴露对子代大鼠空间学习记忆能力和海马突触可塑性相关蛋白基因表达的影响

王永俊<sup>1,2</sup>, 李永宁<sup>2</sup>, 马宁<sup>2</sup>, 贾旭东<sup>2</sup>

(1. 中国疾病预防控制中心营养与健康所, 北京 100050;

2. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021)

**摘要:**目的 通过哺乳期暴露邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(di-2-ethylhexyl phthalate, DEHP), 研究 DEHP 对子代 SD 雄性大鼠空间学习记忆能力和突触可塑性相关蛋白基因表达的影响, 初步探讨其机制。方法 成熟 SD 大鼠妊娠后随机分为溶剂对照组(橄榄油)、DEHP 低剂量组(5 mg/kg BW)、中剂量组(50 mg/kg BW)和高剂量组(500 mg/kg BW)。分娩后第 1 天至断乳, 母鼠经口连续灌胃染毒 21 d。待子代大鼠出生后第 65~70 天, 进行 Morris 水迷宫测试; Real-Time PCR 法检测海马突触可塑性相关蛋白基因 mRNA 的表达情况。结果 Morris 水迷宫定位航行试验中, 500 mg/kg BW 剂量组潜伏期比对照组长, 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); 在空间探索试验中, 500 mg/kg BW 剂量组在目标象限路程百分比、目标象限停留时间百分比、穿越平台次数方面, 与对照组相比有所降低, 差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。Real-Time PCR 结果显示, 暴露于 50、500 mg/kg BW 组雄性子代大鼠海马内突触可塑性相关蛋白基因 *PSD95*、*CREB*、*PKA*、*CAMKII* mRNA 表达水平下调( $P < 0.05$ ); 500 mg/kg BW 剂量组海马内突触可塑性相关蛋白基因 *BDNF* mRNA 表达水平下调( $P < 0.05$ )。结论 一定剂量 DEHP 哺乳期暴露, 可影响子代大鼠的神经系统发育, 对空间学习记忆能力造成损害。海马内突触可塑性相关蛋白基因 *PSD95*、*CREB*、*PKA*、*CAMKII*、*BDNF* mRNA 表达受到抑制, 可能是其发生作用机制之一。

**关键词:**邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯; 塑化剂; 大鼠; 哺乳期暴露; 空间学习记忆; 突触可塑性; 基因表达

中图分类号: R155; Q7; TQ414 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)03-0237-05

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.03.004

**Effects of DEHP exposure on spatial learning and memory of offspring rats and on expressions of hippocampal synaptic plasticity related genes in rat's hippocampi**

WANG Yong-jun, LI Yong-ning, MA Ning, JIA Xu-dong

(National Institute for Nutrition And Health, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100050, China)

**Abstract: Objective** The purpose is to evaluate the effects of di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) on the spatial learning and memory of offspring rats and on expressions of hippocampal synaptic plasticity related genes in rat's hippocampi by lactation exposure and explore the molecular mechanism of this process. **Methods** Mated female rats were assigned to four groups of 8 animals each based on a weight-balanced random allocation scheme after copulation. Mated female rats were administered different concentrations of DEHP (0, 5, 50, 500 mg/kg BW) by oral gavage with a metal catheter from PND 1 through PND 21. Spatial learning and memory were measured continuous 6 days for young adults (PND 65 days to

收稿日期: 2014-12-15

基金项目: 国家自然科学基金(81202212)

作者简介: 王永俊 男 硕士生 研究方向为营养与食品卫生 E-mail: wangyongjun519@163.com

通讯作者: 马宁 男 副研究员 研究方向为食品安全评估和食品毒理学 E-mail: maning@cfsa.net.cn

贾旭东 男 研究员 研究方向为食品毒理学 E-mail: jiaxudong@cfsa.net.cn

70 days) with Morris water maze and the effects on expressions of hippocampal synaptic plasticity related genes mRNA in rats' hippocampi were detected by Real-Time PCR. **Results** In the location-navigation test in Morris maze, the latency time of 500 mg/kg BW group was longer than control group, and there was statically significant difference ( $P < 0.05$ ). In the spatial probe test, the distance percent in the target quadrant, time percent spent in the target quadrant and the frequency of crossing platform of 500 mg/kg DEHP group were less compared with control group ( $P < 0.05$ ). According to the data of Real-Time PCR, comparing with control group, the expressions of hippocampal synaptic plasticity related *PSD95*, *CREB*, *PKA* and *CAMKII* mRNA in 50 and 500 mg/kg BW groups were significantly down-regulated respectively ( $P < 0.05$ ). The expression of hippocampal synaptic plasticity related BDNF was down-regulated in 500 mg/kg DEHP group compared with control group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Lactation exposure to DEHP (500 mg/kg BW) could produce developmental neurotoxicity and has effect on spatial learning and memory of offspring rats. The inhibition of expressions of hippocampal synaptic plasticity related genes such as *PSD95*, *CREB*, *PKA*, *CAMKII* and *BDNF* could be the mechanism of this process.

**Key words:** Di-2-ethylhexyl phthalate; plasticizer; rats; lactation exposure; spatial learning and memory; synaptic plasticity; gene expression

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(di-2-ethylhexyl phthalate, DEHP)是一种常见增塑剂,属邻苯二甲酸酯类化合物(phthalic acid esters, PAE),可增加塑料的柔韧性和弹性,被广泛用于化妆品、食品包装材料和医疗产品<sup>[1]</sup>。DEHP具有一定的迁移特性,可从包装材料等中释放到环境中(如水、空气、土壤)<sup>[2-4]</sup>,并进入食物链<sup>[5]</sup>。另有部分研究显示,在人体尿液<sup>[6]</sup>以及乳汁<sup>[7-8]</sup>中均可检测到 DEHP,提示可能会通过乳汁造成婴儿哺乳期 DEHP 暴露。此外,在生长发育早期,血脑屏障尚未发育完全,DEHP 容易进入中枢神经系统,从而影响脑部发育,造成神经损害。目前,各国研究多集中于 DEHP 的生殖毒性、肝脏毒性、致癌性和胚胎毒性<sup>[9-10]</sup>,对于哺乳期暴露产生的神经发育毒性研究较少。本试验拟通过哺乳期大鼠 DEHP 暴露,评价哺乳期 DEHP 暴露对子代大鼠空间学习记忆能力以及海马突触可塑性相关蛋白基因 mRNA 表达的影响,初步探究神经发育毒性产生的机制,为下一步研究以及安全性评价提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 实验动物

实验动物购自北京维通利华实验动物科技有限公司[生产许可证号:SCXK(京)2012-0001],SPF级雌性SD大鼠40只,体质量220~250g;雄性大鼠40只,体质量230~250g。中国疾病预防控制中心动物实验室[实验动物使用许可证号:SYXK(京)2009-0032],温度20~24℃,相对湿度40%~70%,适应性喂养1周后用于试验。

#### 1.1.2 主要仪器与试剂

IQ5 实时定量 PCR 仪、电泳仪均购自美国 Bio-Rad, Morris 水迷宫池(北京硕林苑科技有限公司),

VideoMot 2 视频轨迹跟踪分析系统(德国 TSE), ND-1000 微量紫外/可见分光光度计(美国 Nanodrop)。

DEHP、DEPC 水均购自美国 Sigma, 橄榄油(益海嘉里公司), 动物组织总 RNA 提取纯化试剂盒、cDNA 合成试剂盒、Real-Time PCR Master Mix 试剂盒均购自北京博乐通生物科技有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 实验动物分组及处理

动物交配:雌雄大鼠以 1:1 同笼,次日早晨于盘底及阴道检查阴栓,查出阴栓者,记为妊娠 0 d。将查出阴栓的母鼠编号称重,另笼饲养。将受孕大鼠按体重随机分为 1 个对照组和低、中、高 3 个剂量组,每组 8 只。母鼠自然分娩后,从产后第 1 天开始,连续 21 d 对母鼠经口灌胃染毒。剂量组分别每天灌胃给予 5、50 和 500 mg/kg BW DEHP-橄榄油溶液;对照组给予 5 ml/kg BW 橄榄油溶液。子鼠出生后第 4 天,每窝子鼠数量调整为 8 只,雌雄各半。子鼠出生后第 65 天,每组从各窝中随机选取雄性子鼠 1 只,进行 Morris 水迷宫试验。

#### 1.2.2 Morris 水迷宫试验<sup>[11-12]</sup>

试验用水迷宫为一直径 180 cm,高 60 cm 的圆形水池,水深 40 cm,水温恒定为 22~25℃。水池等分为 I、II、III 及 IV 4 个象限,在 IV 象限中间距边缘 30 cm 处放一直径为 10 cm、高 30 cm 的黑色圆柱形平台,平台低于水面 1 cm。水迷宫上方安置摄像机,与计算机相连,最后由 VideoMot 2 软件采集试验数据。隐性平台测试 5 d,每天训练 3 次,分别将大鼠于 I、II、III 象限池边的各自固定点面向池壁入水,记录大鼠 60 s 内找到平台的时间(逃避潜伏期)。如果 60 s 内未找到平台,则人为引导其至平台,并保持 10 s,逃避潜伏期记录为 60 s。第 6 天进行空间探索试验,即撤去平台,大鼠在第 II 象限固定点入水,其余条件不变。记录大鼠入水后 60 s 内在各

象限区的游泳轨迹、时间和穿越平台位置次数。在空间探索试验结束后进行可见平台试验,即将平台放回原位置,并且在平台上放置明显标志物,使大鼠对平台位置可见,由软件记录大鼠的游泳速度及是否可以找到可见平台。

### 1.2.3 Real-Time PCR 测定基因表达情况

子鼠出生后第 65 天,随机选取雄性子鼠 1 只/窝,每组共计 8 只雄鼠,麻醉后冰上快速取出脑组织并分离海马,取适量海马组织,利用总 RNA 提取试剂盒提取组织总 RNA,对总 RNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测,并通过 ND-1000 微量紫外/可见分光

光度计测定  $A_{260}/A_{280}$  比值来检测 RNA 的纯度。RNA 纯度测定后,利用 cDNA 合成试剂盒将 2  $\mu\text{g}$  RNA 逆转录为 cDNA。PCR 扩增条件:95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min,94  $^{\circ}\text{C}$  10 s,退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  30 s,40 个循环(退火温度见表 1)。循环结束后 60 ~ 95  $^{\circ}\text{C}$  缓慢升温,生成各基因的溶解曲线。通过 Bio-Rad 公司自带的 PCR 系统软件,观察扩增曲线,记录  $C_t$  值,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行相对定量: $\Delta C_t = C_{t_{\text{目的基因}}} - C_{t_{\text{内参基因}}}$ ;  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{\text{处理组}}} - \Delta C_{t_{\text{对照组}}}$ ;用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  来反映各处理组目的基因的相对表达水平。各基因的引物序列相关信息见表 1。

表 1 基因的 GeneBank ID、引物序列、退火温度、片段长度

Table 1 GenBank ID of primers, gene sequences of primers, annealing temperature and fragment length

基因名称	GenBank ID	引物序列	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$	片段长度/bp
PSD95	116681	F:5'-GCGGCAACCTTATCTTCTCA-3' R:5'-CCAACATCACAGGCATCATC-3'	57.6	110
CREB	81646	F:5'-TACTGCCAGCAACCAAGTT-3' R:5'-GGGAGGACGCCATAACAAC-3'	53.0	114
BDNF	24225	F:5'-AGCCTCCTCTGCTCTTTCTG-3' R:5'-TGTGACCCACTCGCTAATACTG-3'	56.0	140
PKA	25636	F:5'-CCGAACCTGGACCTTGTGTG-3' R:5'-AACCAGCAGCCATCTCGTAG-3'	57.6	125
CAMKII	24246	F:5'-CATACTTCGGCTCACACAGTA-3' R:5'-TATTCTGCCACTTCCCATCAC-3'	53.0	104
$\beta$ -actin	81822	F:5'-GGGAAATCGTCGCTGACATT-3' R:5'-GCGGCAGTGGCCATCTC-3'	56.0	76

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 11.0 统计软件进行试验数据分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, Morris 水迷宫试验中隐性平台试验的逃避潜伏期采用重复测量的方差分析<sup>[13]</sup>;其他数据采用单因素方差分析,用 LSD 法对数据进行组间分析比较,检验水准取  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

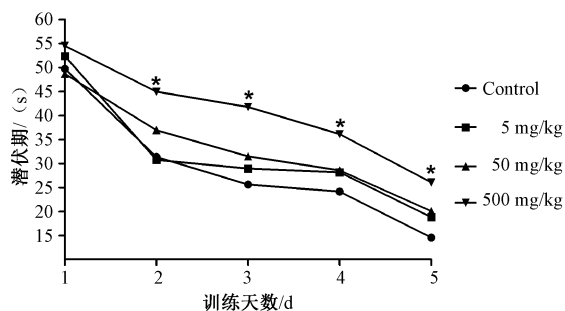
### 2.1 DEHP 对大鼠 Morris 水迷宫学习行为的影响

#### 2.1.1 隐性平台试验

随着训练天数的延长,各组子鼠训练后的逃避潜伏期均出现明显缩短 ( $P < 0.05$ )。高剂量组 (500 mg/kg BW) 在训练后第 2 ~ 5 天的潜伏期与对照组比较,缩短幅度较小,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。详见图 1。

#### 2.1.2 空间探索试验

在空间探索试验中,随着 DEHP 暴露剂量的增加,各组目标象限路程百分比、目标象限停留时间百分比和穿越平台次数都出现下降趋势(见表 2)。与对照组比较,500 mg/kg BW 剂量组子鼠在目标象限路程百分比、目标象限停留时间百分比、穿越平台次数方面均有降低,且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。



注: \* 为与对照组相比  $P < 0.05$

图 1 DEHP 对子鼠 Morris 水迷宫逃避潜伏期的影响

Figure 1 Latency time in Morris Water Maze test of rat offspring

表 2 DEHP 对子鼠在目标象限游泳路程、时间和穿越平台次数的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 8$ )

Table 2 Data of space probe trial of Morris water maze test of rat offspring

组别	目标象限路程百分比/%	目标象限停留时间百分比/%	穿越平台次数/次
对照组	41.44 $\pm$ 10.69	43.53 $\pm$ 10.23	6.00 $\pm$ 1.86
低剂量组 (5 mg/kg BW)	40.70 $\pm$ 9.18	40.60 $\pm$ 9.56	5.50 $\pm$ 1.42
中剂量组 (50 mg/kg BW)	39.79 $\pm$ 5.52	38.10 $\pm$ 5.90	4.76 $\pm$ 1.48
高剂量组 (500 mg/kg BW)	30.01 $\pm$ 9.54 *	26.73 $\pm$ 3.73 **	2.76 $\pm$ 1.04 **

注: \* 为与对照组比较  $P < 0.05$ ; \*\* 为与对照组比较  $P < 0.01$

### 2.1.3 可见平台试验

可见平台测试结果表明,各组子鼠均可在 60 s 内找到有明显标准物的平台,且游泳速度基本一致 ( $P > 0.05$ ),表明各组子鼠与游泳相关的感觉运动功能处于正常状态,见图 2。

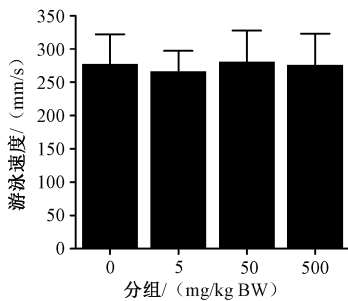
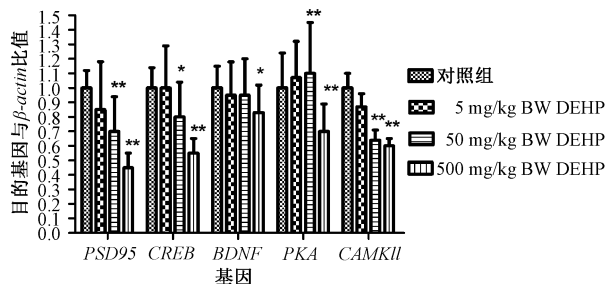


图2 DEHP对子鼠在可见平台试验中游泳速度的影响

Figure 2 Swimming speed in visible platform test for rat offspring

### 2.2 大鼠海马突触可塑性相关基因表达情况

50、500 mg/kg BW 剂量组大鼠子代海马内 *PSD95*、*CREB*、*PKA*、*CAMKII* mRNA 表达水平与对照组比较分别出现不同程度的下调,且差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 500 mg/kg BW 剂量组海马内 *BDNF* mRNA 表达水平与对照组比较明显降低,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ),见图 3。



注: \* 为与对照组比较  $P < 0.05$ ; \*\* 为与对照组比较  $P < 0.01$

图3 DEHP对子鼠海马突触可塑性相关蛋白基因 mRNA 表达水平的影响

Figure 3 Effects of DEHP on expressions of hippocampal synaptic plasticity related genes

### 3 讨论

Morris 水迷宫试验由英国心理学家 Morris 在 20 世纪 80 年代初设计并应用于学习记忆研究<sup>[14]</sup>, 随后被广泛用于神经生物学领域的基础和应用性研究中。Morris 水迷宫试验能够提供较多的试验参数,系统全面地考察实验动物的空间认知过程,客观地反映其认知水平,是评价动物空间学习记忆能力的经典工具。本研究 Morris 水迷宫试验结果发现,暴露于高剂量 DEHP (500 mg/kg BW) 的子鼠与对照组比较,潜伏期明显延长,目标象限路程百分

比、目标象限停留时间百分比以及穿越平台位置的次数均出现减少现象。以上结果表明,通过乳汁高剂量 DEHP 暴露可使子鼠空间学习记忆行为改变,提示神经系统发育关键期高剂量 DEHP 暴露会影响子鼠认知能力发育。刘艳华等<sup>[15]</sup>研究 Wistar 大鼠胚胎期 DEHP 暴露对子鼠神经行为发育的影响,发现暴露于 100、500 mg/kg BW DEHP 组 6 周龄子鼠在水迷宫中寻找平台的潜伏期延长。唐佳琦等<sup>[16]</sup>对昆明小鼠重复染毒 10 d 后, Morris 水迷宫试验结果显示 50、500 mg/kg BW DEHP 组小鼠学习能力受到损害。以上研究结果与本次研究结果相一致。另外, Smith 等<sup>[17]</sup>发现,在海马发育的敏感时期(出生后第 16 ~ 22 天),暴露于 10 mg/kg BW DEHP 可降低雄性大鼠海马 CA3 区的轴突标记物水平,同时还减少齿状回 (DG) 和 CA3 区神经元的密度,对海马发育造成一定的影响。这一研究也在一定程度上为本次研究结果提供了依据。

学习和记忆是大脑的高级功能,并是一个多阶段的动态神经过程。海马作为组成大脑边缘系统的一部分,担当着有关学习记忆以及空间定位的作用。突触可塑性被认为是神经系统生长发育、神经损伤与修复、学习与记忆的神经生物学基础。有研究证实脑的发育、学习记忆等生理过程均涉及到突触可塑性的变化,学习记忆功能的障碍与突触可塑性的变化有关<sup>[18]</sup>。突触可塑性变化涉及众多蛋白,突触可塑性长效改变需要 cAMP 依赖性蛋白激酶 (PKA) 和 cAMP 反应元件结合蛋白 (CREB) 的激活。另外,在长时程记忆形成期间,PKA 的 C 亚基可移位到细胞核内,使包括 CREB 在内的多种蛋白质磷酸化,而磷酸化的 CREB 能增强多种与学习记忆相关的基因的转录,通过  $Ca^{2+}$  依赖的形式调节 BDNF 的表达,促进形成新的突触联系,进而形成长时程记忆。PSD95 是突触后致密物 (PSD) 中的一种特殊的胞质内蛋白质,作为突触可塑性及学习记忆的调控通路的一部分,在长时程增强产生及维持的过程中具有关键性的作用<sup>[19-20]</sup>。CaMK II 是一种具有 10 个亚单位的酶,它是脑内含量最丰富的蛋白激酶,在海马和新皮层的突触后神经元致密层密度最高,处于激活状态的 CaMK II 可通过使突触通道磷酸化而实现其对信息储存的作用,包括长时程增强和学习记忆的行成。Silva 等<sup>[21]</sup>选择性将小鼠 CaMK II  $\alpha$  亚基敲除后,发现小鼠空间学习能力大大降低。脑源性神经营养因子 BDNF 广泛分布在中枢神经系统,其中大脑皮质、海马等部位含量较为丰富,对中枢神经系统多种类型神经元的生长、发育、分化、维持和损伤修复都具有重要作用;另外,

BDNF 与突触功能和可塑性的调控有关。MU 等<sup>[22]</sup>向大鼠脑内注射一定量的 BDNF 抗体抑制 BDNF 的作用,发现大鼠在水迷宫中的空间学习记忆能力明显减弱;McDowell 等<sup>[23]</sup>应用 Morris 水迷宫测试 BDNF 基因敲除的小鼠,发现小鼠存在学习记忆能力的缺损。本研究 Real-Time PCR 结果发现,大鼠子代海马内与突触可塑性相关的 *PSD95*、*CREB*、*PKA*、*CAMKII*、*BDNF* 基因 mRNA 表达水平分别出现不同程度的下调( $P < 0.05$ ),结合在水迷宫试验中雄性子鼠出现的空间学习记忆能力受到抑制的现象,推测 DEHP 在一定程度上可抑制海马内突触可塑性蛋白表达,进而导致子鼠空间认知信息整合能力不足,造成空间学习记忆能力受到抑制。但本次研究不足之处在于未能在蛋白水平上对突触可塑性相关蛋白进行测定,只是在基因水平上进行简单的探讨,还有待进一步探索和研究。

## 参考文献

- [ 1 ] WAN H T, Leung P Y, ZHAO Y G, et al. Blood plasma concentrations of endocrine disrupting chemicals in Hong Kong populations[J]. *Hazard Mater*,2013,261:763-769.
- [ 2 ] XIE Z, Ebinghaus R, Temme C, et al. Occurrence and air-sea exchange of phthalates in the Arctic[J]. *Environ Sci Tech*,2007,41(13):4555-4560.
- [ 3 ] WANG W X, ZHANG Y L, WANG S L, et al. Distributions of phthalic esters carried by total suspended particulates in Nanjing, China[J]. *Environ Monit Assess*,2012,184(11):6789-6798.
- [ 4 ] KONG S F,JI Y Q,LIU L L, et al. Diversities of phthalate esters in suburban agricultural soils and wasteland soil appeared with urbanization in China[J]. *Environ Pollut*,2012,170:161-168.
- [ 5 ] Schecter A, Lorber M, GUO Y, et al. Phthalate concentrations and dietary exposure from food purchased in New York State [J]. *Environ Health Perspect*,2013,121(4):473-494.
- [ 6 ] Meeker J D, Calafat A M, Hauser R, et al. Di (2-ethylhexyl) phthalate metabolites may alter thyroid hormone levels in men [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2007, 115 ( 7 ): 1029-1034.
- [ 7 ] Simone Z, Ludwig G, Martin S, et al. Determination of phthalic acid diesters in human milk at low ppb levels [J]. *Food Additives Contaminants:Part A*,2012,29(11):1780-1790.
- [ 8 ] Fromme H, Gruber L, Seckin E, et al. Phthalates and their metabolites in breast milk-results from the Bavarian Monitoring of Breast Milk (BAMBI) [J]. *Environment Int Ernational*,2011,37(4):715-722.
- [ 9 ] Erkekoglu P, Zeybek N D, Giray B, et al. The effects of di (2-ethylhexyl) phthalate exposure and selenium nutrition on sertoli cell vimentin structure and germ-cell apoptosis in rat testis[J]. *Arch Environ Contam Toxicol*,2012,62(3):539-547.
- [ 10 ] Laqos-Cobré R, Moreno R D. Contribution of environmental pollutants to male infertile: a working model of germ cell apoptosis induced by plasticizers [J]. *Biol Res*,2012,45(1):5-14.
- [ 11 ] Brandeis R, Brandys Y, Yehuda S. The use of the Morris water maze in the study of memory and learning [J]. *Neurosci*,1989,48(1/2):29-69.
- [ 12 ] D'Hooge D, De Deyn P P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory[J]. *Brain Res Rev*,2001,36(1):60-90.
- [ 13 ] 邱宏,金国琴,金如峰,等. 水迷宫重复测量数据的方差分析及其在 SPSS 中的实现 [J]. *中西医结合学报*,2007,5(1):101-105.
- [ 14 ] Morris R G, Garrud P, Rawlins J N, et al. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions[J]. *Nature*,1982,297:681-683.
- [ 15 ] 刘艳华,刘秋芳,潘亮,等. 邻苯二甲酸二(2-乙基)己酯 (DEHP) 胚胎期暴露对子代大鼠神经行为发育的影响 [J]. *毒理学杂志*,2011,25(6):414-417.
- [ 16 ] 唐佳琦,张平,袁烨,等. 增塑剂邻苯二甲酸二乙基己酯对小鼠学习和记忆能力的影响 [J]. *玉林师范学院学报:自然科学版*,2011,32(2):7-11.
- [ 17 ] Smith C A, Holahan M R. Acute postnatal exposure to di (2-ethylhexyl) phthalate adversely impacts hippocampal development in male distance [J] *Neuroscience*,2011,193(13):100-108.
- [ 18 ] Reselli F, Tirard M, LU J, et al. Soluble beta-amyloid (1-40) induces NMDA-dependent degradation of postsynaptic density-95 at glutamatergic synapses [J]. *Neurosci*, 2005, 25 ( 48 ): 11061-11070.
- [ 19 ] Love S, Siew L K, Dawbarn D, et al. Premorbid effects of APOE on synaptic proteins in human temporal neocortex [J]. *Neurobiology Aging*,2006,27(6):797-803.
- [ 20 ] Nyffeler M, ZHANG W N, Feldon J, et al. Differential expression of PSD proteins in age-related spatial learning impairments [J]. *Neurobiol Aging*,2007,28(1):143-155.
- [ 21 ] Silva A J, Paylor R, Wehner J M, et al. Impaired spatial learning in alpha-calcium-calmodulin kinase II mutant mice [J]. *Science*, 1992,257(5067):206-211.
- [ 22 ] MU J S, LI W P, YAO Z B, et al. Deprivation of endogenous brain-derived neurotrophic factor results in impairment of spatial learning and memory in adult rats [J]. *Brain Research*,1999,835(2):259-265.
- [ 23 ] McDowell K A, Hutchinson A N, Wong-Goodrich S J, et al. Reduced cortical BDNF expression and aberrant memory in Carf knock-out mice [J]. *Neurosci*,2010,30(22):7453-7465.