

论著

邻苯二甲酸二异丁酯对雄性小鼠空间学习记忆行为的影响

马宁 支媛 徐海滨

(中国疾病预防控制中心营养与食品安全所,北京 100021)

摘要:目的 观察邻苯二甲酸二异丁酯(DiBP)经口亚慢性暴露,对雄性小鼠空间学习记忆行为的影响。方法 每组12只雄性昆明小鼠,空白对照组和阳性对照组给予玉米油溶剂灌胃,各剂量组给予相应剂量的邻苯二甲酸二异丁酯(50、250、500、1 000 mg/kg BW)玉米油溶液灌胃,连续8周。染毒前后分别对各组动物进行旷场试验和Morris水迷宫试验,其中阳性对照组在染毒结束后进行旷场试验和Morris水迷宫试验前经腹腔注射5 mg/kg BW的氢溴酸东莨菪碱。结果 试验前各组动物的学习记忆能力一致。8周实验结束后,阳性对照组和1 000 mg/kg BW剂量组小鼠与空白对照组小鼠相比在旷场中心区域停留时间明显延长($P < 0.05$)。500 mg/kg BW剂量组和阳性对照组与空白对照组相比Morris水迷宫训练第一天的逃避潜伏期明显延长($P < 0.01$),1 000 mg/kg BW剂量组与空白对照组相比逃避潜伏期也明显延长($P < 0.05$)。其他各项指标与空白对照组相比,差异均无统计学意义。结论 在本试验条件下,DiBP会降低雄性昆明小鼠的空间学习记忆能力。

关键词:邻苯二甲酸二异丁酯;旷场试验箱;Morris水迷宫;学习记忆;小鼠

中图分类号:R15 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2010)04-0300-06

Effects of Diisobutyl Phthalate (DiBP) on the Behavior of Male Mice in Spatial Learning and Memory

MA Ning, ZHI Yuan, XU Hai-bin

(National Institute of Nutrition and Food Safety, China CDC, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective To study the effects of diisobutyl phthalate (DiBP) on the behavior of male mice in spatial learning and memory. **Method** Seventy two Kunming mice were randomly divided into six groups (12 mice in each group), including solvent control group, positive control group (scopolamine hydrobromide) and four DiBP-treated groups. The mice in solvent and positive control group were given corn oil by gavages. The mice in DiBP-treated groups were given DiBP in corn oil by gavages at the dosage of 50, 250, 500 and 1 000 mg/kg BW respectively for 8 weeks. Morris water maze and open field tests were conducted at the beginning and by the end of the experiment. Mice in positive control group were injected with scopolamine hydrobromide (5 mg/kg BW) intraperitoneally before the last test. **Results** No significant difference in learning and memory ability of each group was observed at the beginning of the experiment. By the end of 8-week experiment, the time of staying in the center of open field was longer in the positive control group and 1 000 mg/kg BW DiBP-treated group than that in solvent control group ($P < 0.05$) in the open field test. The latent time of finding a hidden platform on the first day of training was significantly increased in the positive control group and the 500 mg/kg BW and 1 000 mg/kg DiBP-treated groups in comparison with the solvent control group ($P < 0.01$) in the water maze test. **Conclusion** The spatial learning and memory ability of male kunming mice could be decreased on exposure to DiBP under the condition of this experiment.

Key words: Diisobutyl Phthalate (DiBP); Open Field Test; Morris Water Maze; Learning and Memory; Mice

邻苯二甲酸二异丁酯(diisobutyl phthalate, DiBP)为常用主增塑剂之一,是邻苯二甲酸盐类的一种,可作为纤维素树脂、乙烯基树脂、丁腈橡胶和

氯化橡胶等的增塑剂。增塑效能与邻苯二甲酸二丁酯(dibutyl phthalate, DBP)类似,具有优良的溶解性、分散性和粘着性,可做DBP的替代品使用^[1]。由于该类物质仅靠分子间作用与高分子塑料结合,所以随着时间的推移该类物质会逐渐地从塑料制品中释放出来进入环境,邻苯二甲酸酯还可从包装材料中释放迁移到食品中,从而对生物体造成潜在的危害。目前,国内外对邻苯二甲酸酯类的毒性研究多集中在生殖、发育毒性的研究^[2,3],而其神经毒性

收稿日期:2009-12-11

基金项目:国家科技支撑计划课题(2006BAK02A07)

作者简介:马宁 男 博士生 研究方向为营养与食品卫生学

E-mail:ma_ning34@yahoo.com.cn

通信作者:徐海滨 男 研究员 博士生导师 研究方向为营养与食品卫生学

问题国内外相关研究报道甚少。本文着重于研究经口亚慢性暴露于 DiBP 后对雄性昆明小鼠空间学习记忆能力的影响,探讨 DiBP 的神经毒性。

1 材料与方法

1.1 试验动物

购于中国药品生物制品检定所,SPF 级 8 周龄昆明雄性小鼠 72 只[合格证号:SCXK(京)2005-0004],于中国医学科学院实验动物研究所 SPF 级动物房[实验动物使用许可证号:SYXK(京)2008-0012]适应性喂养 3 天后用于试验。该动物实验方案和动物处理方法经伦理委员会审查并批准。

1.2 试剂

试验样品邻苯二甲酸二异丁酯(DiBP)购于美国 sigma 试剂公司,纯度为 99.9%。阳性物氢溴酸东莨菪碱购于徐州莱恩药业有限公司,规格为 0.3 mg/ml。

1.3 实验仪器

Morris 水迷宫池(北京硕林苑科技有限公司);旷场试验箱(德国 TSE 公司);视频轨迹跟踪分析系统 VideoMot2(德国 TSE 公司)。

1.4 试验设计

72 只雄性昆明小鼠,实验动物房内适应 3 天,随机分为 6 组,每组 12 只,即空白对照组(玉米油)、4 个邻苯二甲酸二异丁酯剂量组(50、250、500、1 000 mg/kg BW)和阳性对照组(氢溴酸东莨菪碱)。空白对照组和阳性对照组给予玉米油溶剂灌胃,各剂量组给予相应剂量的邻苯二甲酸二异丁酯玉米油溶液灌胃,连续 8 周。染毒前后分别对各组动物进行旷场试验和 Morris 水迷宫试验,其中阳性对照组在进行第二次旷场试验和 Morris 水迷宫试验前经腹腔注射 5 mg/kg BW 的氢溴酸东莨菪碱。

1.5 Morris 水迷宫试验

1.5.1 水迷宫装置 装置主体由一个直径 100 cm、高 50 cm 的圆形水池组成,将水池等分为 4 个象限。在第 3 象限的正中距离池壁 30 cm 处放置一个直径为 8 cm、高 25 cm 的黑色圆柱形平台,平台低于水面 1.0 cm。迷宫所在房间墙壁布置固定图案作为小鼠定位平台的空间参照物,实验期间保持周围环境恒定。小鼠的水迷宫轨迹由迷宫上方的摄像机记录并传入计算机,最后由 VideoMot2 软件分析。

1.5.2 隐性平台测试 用于测量小鼠对水迷宫学习和记忆的能力。实验历时 5 d,每天训练 3 次,训练时按随机顺序从其余 3 个象限(第 1、第 2、第 4 象限)边缘中点位置面向池壁放入水中,记录在 1 min 内找到平台的时间(逃避潜伏期)。若大于 1 min 未找到平台,由实验者用手将其引导上平台停留

10 s 后移开,潜伏期记为 60 s。本试验反映动物空间记忆的获得情况,即空间学习记忆能力。

1.5.3 空间探索试验 用于测量小鼠学会寻找平台后,对平台空间位置的记忆能力。即在训练期结束后,试验第 6 天撤掉平台,然后从任意选择的一个人水点(本试验选择第 1 象限)入水,由软件记录在 30 s 内小鼠在目标象限(第 3 象限)的停留时间和游泳距离。

1.5.4 可见平台试验 用于测量小鼠的视力及运动能力。即在第 6 天空间探索试验结束后,再将平台放回原位置,并且在平台上放置明显标志物,使小鼠对平台位置可见,由软件记录小鼠的游泳速度及是否可以找到可见平台。

1.6 旷场试验

旷场试验装置由长×宽×高:50 cm×50 cm×40 cm 的黑色 PVC 箱和长×宽:50 cm×50 cm 的红外站立检测阵列构成。试验时装置划分为中心区和边缘区。将小鼠放入中心区,记录 5 min 内小鼠在中心区域的停留时间。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 15.0 统计软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析和 LSD 两两比较。隐性平台试验中的逃避潜伏期采用重复测量的方差分析。检验水准取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 中毒症状及体征的观察

在整个试验过程中,给予 DiBP 的各剂量组动物无死亡,各剂量组小鼠的体重与对照组相比无明显变化。

2.2 染毒前各组小鼠的旷场行为

在首次给予小鼠 DiBP 和溶剂前,对所有组别动物在旷场中心区域停留时间的基线值进行了测验,各组相互比较后显示差异均无统计学意义,结果见图 1。

2.3 染毒前各组小鼠 Morris 水迷宫学习的情况

2.3.1 隐性平台测试 随着训练时间的延长,各组小鼠训练后的逃避潜伏期与训练第一天相比,均明显缩短($P < 0.01$),说明训练使小鼠获得了一定的空间学习和记忆能力,而各组小鼠在同一天的训练中逃避潜伏期差异无统计学意义,说明各组小鼠的学习记忆能力在同一水平,结果见图 2。

2.3.2 可见平台测试 可见平台测试结果显示,各组小鼠均可找到有明显标志物的平台,且各组小鼠游泳速度差异无统计学意义。说明各组小鼠的视力和体力不影响学习成绩。结果见图 3。

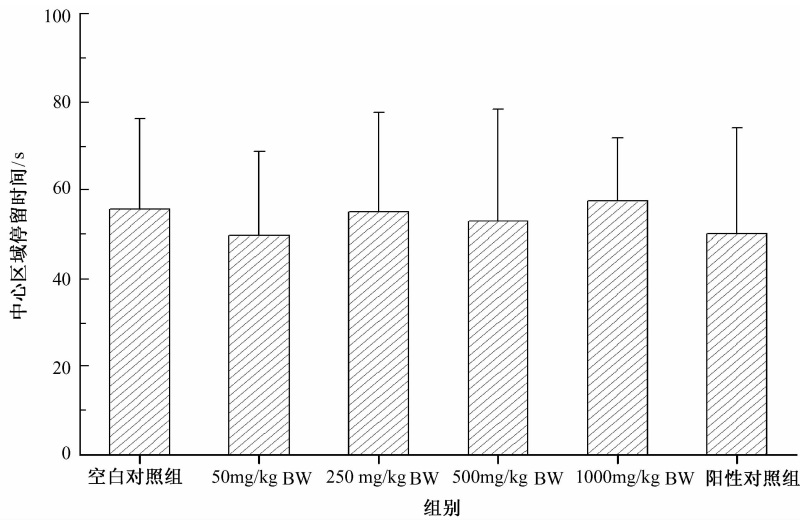


图1 试验前小鼠在中央区域停留时间

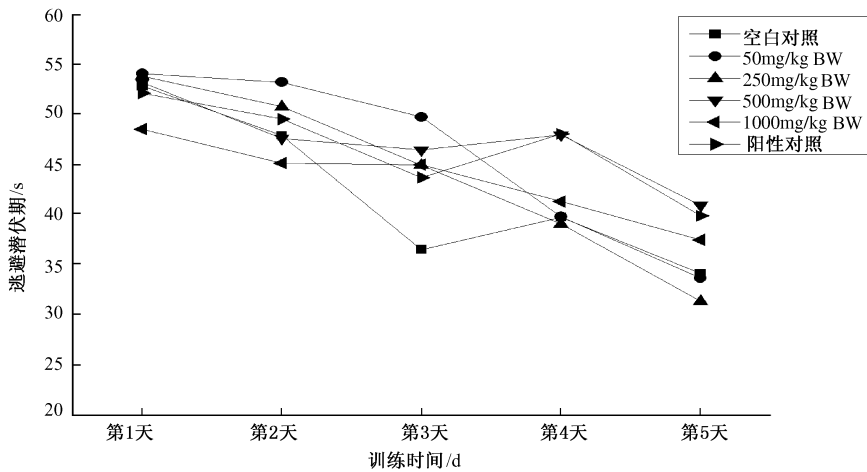


图2 试验前小鼠逃避潜伏期随时间的变化

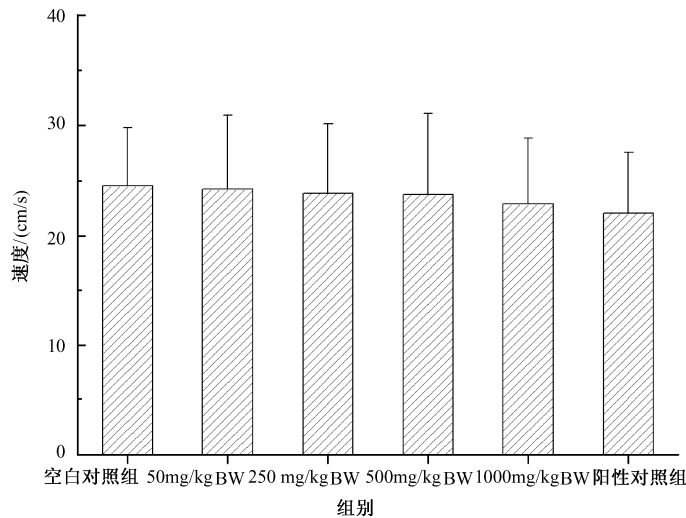


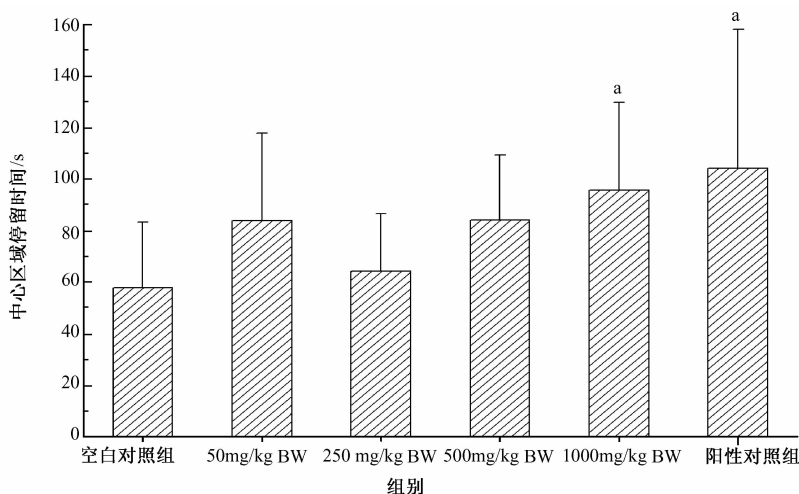
图3 试验前小鼠游泳速度

2.4 染毒后各组小鼠旷场行为的改变

染毒结束后各组小鼠在旷场中心区域停留的时间显示,阳性对照组和1 000 mg/kg BW 剂量组与空白对照组相比在旷场中心区域停留时间

明显延长($P < 0.05$),其他各剂量组均有延长趋势,但与空白对照组相比差异无统计学意义。结果见图4。

2.5 染毒后各组小鼠 Morris 水迷宫学习的情况

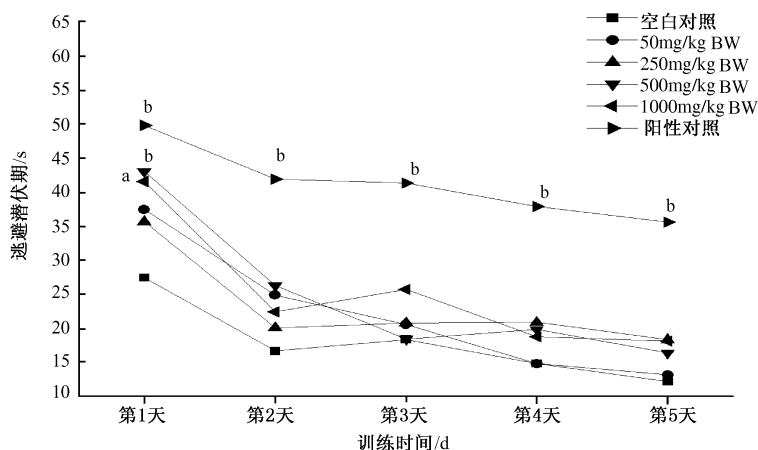


注:与空白对照组相比,a为 $P < 0.05$ 。

图4 邻苯二甲酸二异丁酯对小鼠在旷场中心区域停留时间的影响

2.5.1 隐性平台测试 随着训练时间的延长,各组小鼠训练后的逃避潜伏期与训练第1天相比,均明显缩短(时间主效应统计结果为: $P < 0.01$),说明训练使小鼠获得了一定的空间学习和记忆能力。在训练第1天500 mg/kg BW 剂量组和阳性对照组与空白对照组相比逃避潜伏期明显延长($P < 0.01$),

1000 mg/kg BW 剂量组与空白对照组相比逃避潜伏期也明显延长($P < 0.05$)。随着训练天数的增加在训练的第2、3、4、5天各剂量组与空白对照组的逃避潜伏期相比差异均无统计学意义,但阳性对照组在训练期间逃避潜伏期始终延长,并与空白对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果见图5。



注:与空白对照组相比,a为 $P < 0.05$, b为 $P < 0.01$ 。

图5 邻苯二甲酸二异丁酯对小鼠水迷宫逃避潜伏期的影响

2.5.2 空间探索试验 在空间探索试验中除阳性对照组外,其余各组小鼠在目标象限的游泳时间及探索距离都超过25%,表明训练中获得了一定的记忆。阳性对照组与空白对照组相比差异有统计学意义($P < 0.01$)。各剂量组与空白对照组相比差异均无统计学意义。结果见表1。

2.5.3 可见平台试验 可见平台测试结果显示,各组小鼠均可找到有明显标志物的平台,且各组小鼠游泳速度无明显差异。结果见图6。

表1 邻苯二甲酸二异丁酯对小鼠在目标象限游泳时间和距离的影响(%)

组别	游泳时间百分比	游泳距离百分比
空白对照组	33.4 ± 11.6	33.1 ± 9.9
50 mg/kg BW	35.0 ± 9.8	34.6 ± 8.5
250 mg/kg BW	27.7 ± 8.8	27.0 ± 7.1
500 mg/kg BW	34.2 ± 14.8	33.9 ± 14.7
1000 mg/kg BW	34.6 ± 11.6	33.0 ± 9.9
阳性对照组	16.3 ± 7.2 ^b	17.1 ± 7.4 ^b

注:与空白对照组相比,^b为 $P < 0.01$ 。

文献报道,小鼠亚慢性暴露于邻苯二甲酸二乙基己酯[Di-(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP]后在脑组织中可检测到DEHP^[4]。流行病学资料表明邻苯二甲酸类的化合物对神经系统有一定的损害作用^[5]。

3 讨论

邻苯二甲酸类物质可在人和动物体内蓄积,有

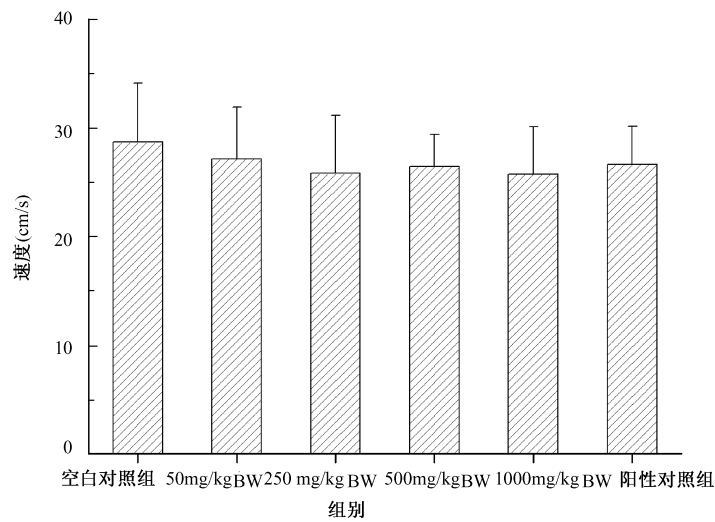


图6 邻苯二甲酸二异丁酯对小鼠游泳速度的影响

Andrade^[6]研究认为孕期染毒 DEHP 使新生大鼠下丘脑视前交叉区芳香化酶 (acromatase) 表达减低, 并对其活性产生影响。李元锋等^[7]研究表明 DBP 孕期和哺乳期暴露会降低子代雄性大鼠的学习记忆能力。DiBP 与 DBP 和 DEHP 为同系物, 同样被广泛作为增塑剂使用, 因此该物质也会通过环境及食品暴露于人群, 并可能会对认知能力产生影响。

旷场试验中央格停留时间可反映小动物的空间认知能力, 小鼠的本能习性喜欢沿着墙根走, 避开空旷的中央区^[8], 因此空间认知能力正常的动物会避开空旷环境, 迅速离开中央区而沿周边活动。Morris 水迷宫是英国心理学家 Morris 于 20 世纪 80 年代初设计并应用于学习记忆脑机制研究^[9]。经典的 Morris 水迷宫测试程序主要包括隐性平台试验、空间探索试验和可见平台试验 3 部分。隐性平台试验中, 动物通过反复学习、认识迷宫周围物体的空间位置, 寻找记忆里接近迷宫中平台的最佳路线, 并用最短时间找到平台, 如果动物的空间学习记忆能力下降, 其逃避潜伏期将延长; 空间探索试验用于测量动物学会寻找平台后, 对平台空间位置记忆的能力, 通过观察动物在目标象限停留时间和游泳距离, 来评价动物对平台空间位置的记忆能力; 可见平台试验主要用于测量小动物的视力和游泳能力, 通过观察小动物是否可以找到可见平台和在迷宫中的游泳速度, 从而排除因视力和体力因素对学习记忆行为产生影响的可能。因此 Morris 水迷宫试验能够提供较多的实验参数, 系统全面地考察实验动物空间认知加工的过程, 客观地反映小动物学习记忆能力, 并将实验动物的学习记忆障碍、感觉和运动缺陷等分离开来, 减少对学习记忆过程检测的干扰^[10]。

本研究应用旷场和 Morris 水迷宫两种行为学试验, 观察 DiBP 染毒对小鼠空间认知能力的影响。

神经行为是机体的重要功能, 是整个神经系统的终点表现, 它由神经系统支配, 协调机体正常活动, 又受相关器官功能的制约, 常被视为最复杂、最敏感的功能系统之一^[11]。因此对试验进行质量控制尤为重要, 本研究在染毒前, 对所有组别动物的各项行为学指标的基线值进行了测验, 各组小鼠的行为指标相比差异无统计学意义。表明各项行为指标在染毒测试前条件均衡, 实验中获得测量值结果可信。另外, 阳性对照物氢溴酸东莨菪碱是一种公认的学习记忆损伤剂, 在此次试验结束后阳性对照组旷场试验及 Morris 水迷宫试验行为改变和空白对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明阳性对照组造模成功, 各项行为学试验操作良好, 结果真实可信。

实验染毒结束后, 旷场试验显示, 1 000 mg/kg BW 剂量组与空白对照组相比小鼠在旷场中心区域停留时间明显延长 ($P < 0.05$), 提示 DiBP 在该剂量下对小鼠的空间认知能力产生了一定的损伤。Morris 水迷宫实验显示, 小鼠在训练第 1 天 500 mg/kg BW 剂量组与空白对照组相比逃避潜伏期明显延长 ($P < 0.01$), 1 000 mg/kg BW 剂量组与空白对照组相比逃避潜伏期也明显延长 ($P < 0.05$)。由于各组小鼠均可找到有明显标志物的平台, 且各组小鼠游泳速度差异无统计学意义, 因此排除了视力或体力对小鼠空间学习记忆行为的干扰, 提示 DiBP 对小鼠空间学习记忆能力具有一定的损害作用。各剂量组小鼠在隐性平台训练的后 4 天逃避潜伏期和空白对照组相比差异无统计学意义, 空间探索试验中各剂量组在目标象限停留时间及游泳距离和空白对照组相比差异均无统计学意义, 这可能是由于 DiBP 只对记忆获得产生了一定的影响, 而对记忆巩固和记忆再现没有产生影响。

通过本研究可提示 DiBP 能够导致小鼠空间学习能力相对减弱。虽然小鼠和人在 DiBP 的代谢上有很多不一致的地方, DiBP 对小鼠学习记忆的影响尚不能直接外推到人,但低剂量长期暴露产生的危害比较隐匿,提示今后在评估 DiBP 暴露(尤其是和多种邻苯二甲酸类化合物联合暴露)对人体健康的影响时,认知指标应引起充分重视。另外,大量的实验证实啮齿类动物的海马在空间学习记忆过程中起重要作用^[12,13]。因此,有必要进一步对小鼠海马组织的生理、生化水平改变进行研究,以探讨 DiBP 可能的学习记忆损伤机制。

参考文献

- [1] National Industrial Chemicals Notification and Assessment. DIBP hazard assessment-draft for comment [R]. Australia: NICNAS, 2007:1-20.
- [2] SAILLENFAIT A M, SABATE J P, GALLISSOT F. Diisobutyl phthalate impairs the androgen-dependent reproductive development of the male rat [J]. *Reprod Toxicol*, 2008, 26(2): 107-115.
- [3] SAILLENFAIT A M, SABATE J P, GALLISSOT F. Developmental toxic effects of diisobutyl phthalate, the methyl-branched analogue of di-n-butyl phthalate, administered by gavage to rats [J]. *Toxicol Lett*, 2006, 165(1): 39-46.
- [4] 赵文红, 厉曙光. 染毒后小鼠各脏器含量的测定及其意义 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2005(3): 262-263.
- [5] GILIOLI R A. Transversal and longitudinal neurological study of a working population engaged in the production of phthalates. Preliminary data [J]. *Med Lav*, 1978, 69(5): 620-631.
- [6] ANDRADE A J. 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.
- [7] 李元锋, 庄梅株, 李涛, 等. 邻苯二甲酸二丁酯对雄性子代大鼠学习记忆及海马 Spinophilin 表达的影响 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2008(5): 380-384.
- [8] WALSH R N, CUMMINS R A. The Open-Field Test: a critical review [J]. *Psychol Bull*, 1976, 83(3): 482-504.
- [9] MORRIS R G. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions [J]. *Nature*, 1982, 297(5868): 681-683.
- [10] VORHEES C V, WILLIAMS M T. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory [J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(2): 848-858.
- [11] 马宁, 徐海滨. 神经行为毒理学测试方法的现状和进展 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2009, 21(1): 63-67.
- [12] BECKER J T, WALKER J A, OLTON D S. Neuroanatomical bases of spatial memory [J]. *Brain Res*, 1980, 200(2): 307-320.
- [13] O'KEEFE J, SPEAKMAN A. Single unit activity in the rat hippocampus during a spatial memory task [J]. *Exp Brain Res*, 1987, 68(1): 1-27.

论著

固相萃取-超高效液相色谱串接四级杆质谱同时测定调味品中 12 种工业染料

赵 榕 李 兵 赵海燕 薛 颖 吴国华 刘 伟 赵 耀
(北京市疾病预防控制中心, 北京 100013)

摘要:目的 建立调味品中苏丹橙、苏丹黄、苏丹 I~IV、溶剂蓝 35、对位红、苏丹黑 B、苏丹红 7B、苏丹红 G、苏丹棕等工业染料的固相萃取-超高效液相色谱串接四级杆质谱(SPE-UPLC-MS/MS)测定方法。方法 以含 10% 乙醇的丙酮溶液作为提取溶剂,利用 MAX 强阴离子交换固相萃取柱(60 mg, 3 ml)对样品进行净化,UPLC-MS/MS 测定试样中 12 种工业染料的含量。结果 方法的线性范围:对位红 10.0~800.0 ng/ml,其他 11 种染料 5.0~400.0 ng/ml。12 种工业染料的定性检出限为 0.3~10.4 μg/kg。定量检出限为 0.8~31.2 μg/kg。高、中、低 3 个浓度水平的加标回收率 77.1%~141.9%,相对标准偏差 5.5%~26.4%。结论 本方法灵敏、准确,可用于调味品中苏丹橙、苏丹黄、苏丹 I~IV、溶剂蓝 35、对位红、苏丹黑 B、苏丹红 7B、苏丹红 G、苏丹棕等 12 种非法添加的工业染料的同时测定及确证。

关键词:苏丹;工业染料;调味品;固相萃取-超高效液相色谱串接四级杆质谱

中图分类号:R155.5+1;R151.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1004-8456(2010)04-0305-08

收稿日期:2009-06-20

基金项目:北京市卫生局、北京市中医管理局青年科学研究资助项目(QN2007-16)

作者简介:赵 榕 女 副主任技师 研究方向为食品中污染物及营养成分 E-mail:lxue@yeah.net