

餐具的可能性极大;甲醛在该条件下的迁移值高至 50 mg/dm<sup>2</sup>时,仿瓷餐具的外观上即可观察到明显的变化。总之,市场上所使用的仿瓷餐具的安全性不容乐观,需要引起相关部门的关注。

## 参考文献

- [1] 魏博. 家庭烹调油温的观察与运用[J]. 服务科技, 1998, (4):44.
- [2] 聚烯烃物卫生协会. 日本食品包装材料各种用途使用实况调查报告书[R]. 日本:聚烯烃物卫生协会, 2006.
- [3] 《欧盟食品接触材料安全法规实用指南》编委会. 欧盟食品接

触材料安全法规实用指南[M]. 北京:中国标准出版社, 2005:195-193.

- [4] 鲁杰,肖晶,杨大进,等. 食品包装用三聚氰胺成型品中甲醛迁移规律的研究[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(3): 34-37.
- [5] 杨惊,沈一丁. 三聚氰胺甲醛树脂及其衍生物的研究现状与应用前景[J]. 化工时刊, 2004, 18(12):12-15.
- [6] 常伟,齐鲁. 改性蜜胺树脂的研究现状及其主要应用[J]. 热固性树脂, 2008, 23(5):56-58.
- [7] 汪家铭. 三聚氰胺延伸产品蜜胺纤维的物化性能与制造工艺[J]. 精细化工原料及中间体, 2008, (12):41-42.

## 论著

# 邻苯二甲酸二异丁酯对小鼠主动回避行为及脑组织氧化应激的影响

马宁,高芃,曹佩,王小丹,徐海滨

(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 100022)

**摘要:**目的 对邻苯二甲酸二异丁酯(DiBP)影响小鼠主动回避学习记忆行为进行初步研究,并探讨其是否可引起脑组织氧化损伤。**方法** 将60只昆明小鼠(实验动物房内适应3d)按体重随机分对照组和4个不同剂量的DiBP试验组(4组剂量分别为50、250、500和1000 mg/kg BW)。其中,对照组给予玉米油溶剂灌胃,而各试验组给予相应剂量的DiBP玉米油溶液灌胃,实验连续进行8周,普通饲料喂饲,自由饮水。试验结束后,分别对各组动物进行穿梭箱行为学测试,并测定脑组织超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性及8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)的含量。**结果** 500和1000 mg/kg BW组与对照组比较,条件反射潜伏期(CL)延长,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ );1000 mg/kg BW组与对照组比较,条件反射次数减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );500和1000 mg/kg BW组与对照组比较,条件性回避率降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。各试验组小鼠脑组织SOD的活性与对照组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但GSH-Px活性呈现降低趋势,250和1000 mg/kg BW组与对照组比较,酶活性差异有统计学意义( $P < 0.05$ );各试验组与对照组相比,8-OHdG含量增加,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。**结论** DiBP可损伤实验小鼠主动回避学习记忆能力,并能够导致试验小鼠脑组织发生不同程度的氧化应激损伤。

**关键词:**塑化剂;邻苯二甲酸二异丁酯;主动回避;氧化应激;食品安全

中图分类号:O623.624 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2013)02-0121-04

## Effect of diisobutyl phthalate on active avoidance behavior and oxidative stress of brain tissue in mice

Ma Ning, Gao Peng, Cao Pei, Wang Xiaodan, Xu Haibin

(Key Laboratory of Food Safety Risk Assessment of Ministry of Health, China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100022, China)

**Abstract: Objective** To give a preliminary research on diisobutyl phthalate (DiBP) on active avoidance behavior, and the potential of free radical oxidation damage in brain tissues of mice. **Methods** Accommodating 60 Kunming mice to the animal room for 3 days, then dividing the mice into 5 groups according to their weights including one control group and four experimental groups were 50, 250, 500 and 1000 mg/kg BW. The mice were fed with corn oil in control group, and the

收稿日期:2013-01-03

基金项目:国家科技支撑计划课题(2006BAK02A07)

作者简介:马宁 男 助理研究员 研究方向为食品安全 E-mail:ma\_ning34@yahoo.com.cn

通信作者:徐海滨 男 研究员 研究方向为食品安全 E-mail:hb Xu1231602@vip.sina.com

other groups were fed with different dose of diisobutyl phthalate mixture by gavages last for 8 weeks. At the end point, active avoidance response was examined, then all mice were sacrificed and biomarkers in the brains, such as SOD, GSH-Px and 8-OHdG were tested. **Results** In the active avoidance response test, the mice of groups 500 and 1 000 mg/kg BW showed longer response latency than control group ( $P < 0.05$ ) and the mice of group 1 000 mg/kg BW showed fewer conditioned response than control group ( $P < 0.01$ ); the mice of groups 500 and 1 000 mg/kg BW showed a lower conditioned response rate than control group ( $P < 0.05$ ); the GSH-Px activities in groups 250 and 1 000 mg/kg BW significantly decreased ( $P < 0.05$ ), and the 8-OHdG content increase significantly comparing to the control group, ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Exposure to DiBP could decrease active avoidance ability. Oxidative stress could be induced by DiBP in mice brain tissue.

**Key words:** Plasticizer; diisobutyl phthalate (DiBP); active avoidance; oxidative stress; food safety

邻苯二甲酸二异丁酯 (diisobutyl phthalate, DiBP) 属于酞酸酯类化合物, 是塑料工业中广泛应用的增塑剂和软化剂, 其作用是增加塑料的可塑性和韧性, 提高塑料强度<sup>[1]</sup>。近些年来研究表明该类物质仅靠分子间作用与高分子塑料结合, 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, 从而对环境、生物和食品造成污染, 并可通过呼吸、饮食和皮肤接触等暴露途径进入人体内<sup>[2]</sup>。邻苯二甲酸酯类化合物均具有生殖毒性和发育毒性, Howdeshell 等<sup>[3]</sup>根据 DiBP 宫内暴露可降低雄性大鼠睾酮水平, 将其无可见有害作用水平 (NOAEL) 制定为 100 mg/kg BW。基于 DiBP 与健康安全密切相关, 对它进行危害识别和危害鉴定是开展风险评估的基础。有研究结果提示, DiBP 可导致小鼠 Morris 水迷宫和旷场试验等空间认知能力减弱<sup>[4]</sup>。另一研究结果提示, DiBP 还可导致实验小鼠肝脏组织中抗氧化酶活性明显降低, 丙二醛 (MDA) 及 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 含量增高, DNA 出现氧化损伤<sup>[5]</sup>。本课题组应用穿梭箱测定小鼠对 DiBP 引起主动回避行为的改变, 从另一角度探讨 DiBP 对小鼠认知能力的影响, 也是对前期学习记忆行为研究的补充和验证。此外, 本研究通过对各组小鼠脑组织中超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 活性及 DNA 氧化损伤情况进行研究, 以此探讨 DiBP 的神经毒性机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 试验动物

SPF 级 8 周龄雄性昆明小鼠 60 只, 体重 25 ~ 30 g, 购于中国药品生物制品检定所实验动物中心 [许可证号: SCXK (京) 2005-0004], 于中国医学科学院实验动物研究所 SPF 级动物房 [许可证号: SYXK (京) 2008-0012] 适应性喂养 3 d 后用于试验。

#### 1.1.2 主要试剂与仪器

试验样品为邻苯二甲酸二异丁酯 (纯度为

99.9% 美国 Sigma 公司)。主要仪器有谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒、超氧化物歧化酶检测试剂盒、8-羟基脱氧鸟苷检测试剂盒 (均来自 Cayman 公司)、多功能酶标仪 (Synergy4, Biotek 公司)、程控穿梭箱 (北京硕林苑科技有限公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 试验分组

将 60 只雄性昆明小鼠随机分对照组和 4 个不同剂量的 DiBP 试验组。DiBP 试验组染毒剂量分别为 50、250、500 和 1 000 mg/kg BW。对照组灌胃给予玉米油溶剂, 将 DiBP 溶解于玉米油中, 按 10 ml/kg BW 经口灌胃给予小鼠受试物。连续 8 周, 普通饲料喂饲, 自由饮水。染毒结束后进行穿梭箱试验。试验结束后, 每组随机抽取 6 只小鼠脱颈椎处死, 取全脑 -80 °C 保存备用。

#### 1.2.2 穿梭箱试验方法

试验时将小鼠放入箱内任何一侧, 适应 5 s 后开始呈现蜂鸣音, 持续 20 s, 其后 10 s 内同时给以电刺激 (50 V)。小鼠在遭电击后即逃避, 必须跑到另一室中才安全, 即在每次电击前给予条件刺激 (蜂鸣音), 反复强化后小鼠在接受条件刺激后即跑向另一室中, 这样的训练每天一回, 每回 30 次, 连续 4 d, 并记录试验结果。

#### 1.2.3 穿梭箱检测指标

①条件性回避率 (CR%) : 在 4 d 的试验中, 每天所出现条件反射的百分率; ②试验总时间 (TT) : 完成 4 d 试验所用时间的总和, 单位为秒 (s); ③条件反射潜伏期 (CL) : 小鼠在条件刺激下穿过中门时, 记录从条件刺激开始到小鼠通过中门的时间, 累计 4 d 试验中条件反射潜伏期的总和, 取平均值, 单位为秒 (s); ④条件反射次数 (CR) : 在 4 d 试验中条件反射次数的和。

#### 1.2.4 抗氧化酶类活性和 DNA 氧化损伤指标测定

将冻存的全脑组织加入 WIP 组织裂解液进行匀浆、裂解, 10 000 × g 离心 5 min, 取上清采用 Cayman 的生化试剂盒检测 SOD 和 GSH-Px 酶活性,

按照说明书的标准操作规范进行;将 50 mg 全脑组织加入 1 ml 预冷的 PBS 进行匀浆,离心收集上清后,用酶联免疫法(ELISA)检测 8-OHdG,操作方法按照说明书的标准操作规范进行。

### 1.3 统计学分析

采用 SPSS 15.0 统计软件包进行实验数据分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,试验数据采用单因素方差分析(One-way ANOVA)法分析总体差异,方差齐者以 LSD 法对多组均数进行 post-hoc 分析,方差不齐者以 Tamhane 和 Dunnett 法进行 post-hoc 分析。检验水准取  $\alpha = 0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 邻苯二甲酸二异丁酯实验小鼠穿梭箱试验结果

穿梭箱试验可反映小鼠的主动回避能力。由表 1 可见,对照组和各试验组相比,完成 4 d 穿梭试验所用时间的总和(TT)有延长趋势,但差异无统计学意义( $P > 0.05$ );500 和 1 000 mg/kg BW 组与对照组相比,条件反射潜伏期(CL)延长,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );1 000 mg/kg BW 组与对照组相比,条件反射次数(CR)减少,差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。由图 1 可见,随着训练天数的增加对照组及各试验组的条件性回避率呈上升趋势,但在训练第 3 天,1 000 mg/kg BW 组与对照组相比条件性回避率降低,差异有统计学意义( $P < 0.01$ );训练第 4 天,500 和 1 000 mg/kg BW 组与对照组相比条件性回避率降低,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

表 1 DiBP 对小鼠主动回避行为的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Table 1 Effect of DiBP on active avoidance behavior of mice

剂量 (mg/kg BW)	TT(s)	CL(s)	CR(次)
0	1 356.5 ± 129.6	1 095.0 ± 38.3	24.9 ± 8.4
50	1 515.9 ± 185.9	1 139.8 ± 35.8	18.7 ± 9.5
250	1 415.9 ± 132.2	1 116.6 ± 52.9	22.2 ± 12.1
500	1 505.5 ± 153.7	1 154.6 ± 45.1 <sup>a</sup>	13.8 ± 9.9
1 000	1 463.5 ± 110.9	1 169.9 ± 23.2 <sup>b</sup>	7.8 ± 4.6 <sup>b</sup>

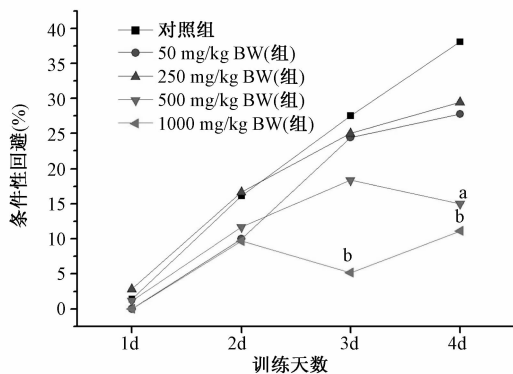
注:a 与对照组相比, $P < 0.05$ ; b 与对照组相比, $P < 0.01$ 。

### 2.2 邻苯二甲酸二异丁酯试验小鼠全脑组织 SOD 和 GSH-Px 活性测定

小鼠脑组织 SOD 和 GSH-Px 酶活性测定结果显示(见表 2),各试验组小鼠脑组织中 SOD 的活性与对照组比较差异无统计学意义,但 GSH-Px 活性呈现降低趋势,250 和 1 000 mg/kg BW 组与对照组相比,酶活性差异均有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.3 邻苯二甲酸二异丁酯试验小鼠全脑组织 8-OHdG 含量测定

小鼠脑组织 8-OHdG 含量测定结果显示(见



注:a 与对照组相比, $P < 0.05$ ; b 与对照组相比, $P < 0.01$ 。

图 1 DiBP 对小鼠条件性回避率的影响( $\bar{x} \pm s, n = 12$ )

Figure 1 Effect of DiBP on conditioned response rate of mice

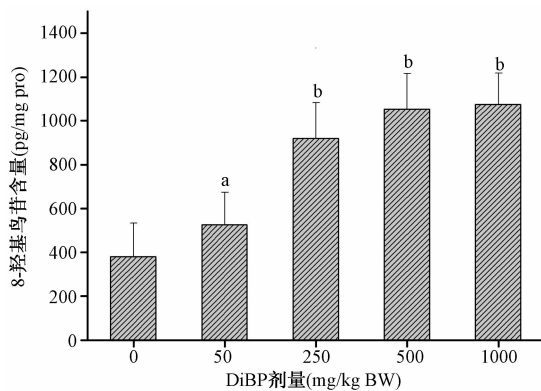
表 2 DiBP 对小鼠脑组织 SOD 和 GSH-Px 活性的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 2 Effect of DiBP on activity of SOD and GSH-Px in mice brain

剂量 (mg/kg BW)	SOD 活性 (U/mg pro)	GSH-Px 活性 [nmol/(min·ml)]
0	62.07 ± 12.00	262.17 ± 44.24
50	53.78 ± 16.50	228.63 ± 51.48
250	51.98 ± 3.91	186.33 ± 54.40 <sup>a</sup>
500	75.94 ± 17.56	214.81 ± 44.94
1 000	80.88 ± 10.93	39.17 ± 15.68 <sup>b</sup>

注:a 与对照组相比, $P < 0.05$ ; b 与对照组相比, $P < 0.01$ 。

图 2),不同试验组与对照组相比,8-OHdG 含量增加,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。



注:a 与对照组相比, $P < 0.05$ ; b 与对照组相比, $P < 0.01$ 。

图 2 DiBP 对小鼠脑组织 8-OHdG 含量的影响( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Figure 2 Effect of DiBP on 8-OHdG content of mice brain

## 3 讨论

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<sup>[6]</sup>。李元锋、庄梅株等<sup>[7]</sup>研究表明邻苯二甲酸二丁酯(DBP)在孕期和哺乳期暴露会降低子代雄性大鼠的学习记忆能力。考虑 DiBP 与 DBP 为同系物,且同样被广泛作为增

塑剂使用,因此该物质也会通过环境及食品暴露于人群,并可能会对人的认知能力产生影响。作者应用 Morris 水迷宫及旷场试验研究表明,DiBP 能够导致小鼠空间学习行为改变<sup>[4]</sup>,但其是否可影响小鼠主动回避行为,尚无研究报道。本研究应用穿梭箱测试了小鼠的主动回避行为,进一步观察和验证 DiBP 对小鼠学习记忆行为的影响。穿梭箱试验是用于检测动物主动回避能力的一种常用实验方法,主要反应了动物的非陈述记忆的能力,其原理是根据条件反射原理,训练动物逃避电击的能力,动物在遭受电击后即逃避至对侧,以躲避电击,在每次电击前声音作为刺激条件,反复训练,使动物在接受条件刺激后即跑向对侧而逃避电击,此为主动回避反应,该试验可以检测动物逃避电击的学习记忆能力<sup>[8]</sup>。通过本研究提示:DiBP 可导致小鼠主动回避能力减退,进一步证实了 DiBP 对小鼠学习记忆能力的损伤作用。

考虑 DiBP 可导致小鼠肝脏组织中 SOD 与 GSH-Px 活性降低,MDA 和 8-OHdG 含量增加,外周血淋巴细胞的 DNA 损伤加重<sup>[5]</sup>,以及神经元细胞膜含大量易被氧化的多不饱和脂肪酸,易受氧自由基攻击,本研究测量了小鼠脑组织中的抗氧化酶和脂质过氧化产物,试图说明 DiBP 通过血脑屏障后引起的脑氧化损伤改变。研究发现 DiBP 可导致试验组小鼠脑组织中 GSH-Px 活性降低,8-OHdG 含量增加,并且具有剂量反应关系,说明 DiBP 对小鼠脑组织中抗氧化酶活性具有抑制作用,脑组织氧化损伤程度逐渐加重。由于氧化剂、抗氧化剂平衡的破坏是细胞损伤的主要原因,可直接引起生物膜脂质过氧化、细胞内蛋白及酶变性、DNA 损伤、最后导致细胞死亡或凋亡、组织损伤、疾病发生<sup>[9]</sup>。因此,提示

DiBP 致小鼠脑组织氧化损伤可能是其神经行为改变的机制之一。

关于 DiBP 的神经毒性还需要开展更为广泛的研究。特别是要结合其发育毒性和内分泌干扰作用,探索研究其神经发育毒性及内分泌干扰作用机制。

## 参考文献

- [1] National Industrial Chemicals Notification and Assessment. DIBP Hazard Assessment Draft for Comment[R]. Australia: NICNAS, 2007:1-20.
- [2] Borch J, Axelstad M, Vinggaard AM, et al. Diisobutyl phthalate has comparable antiandrogenic effects to di-n-butyl phthalate in fetal rat testis[J]. Toxicol Lett, 2006, 163(3):183-190.
- [3] Howdeshell KL, Wilson VS, Furr J, et al. A mixture of five phthalate esters inhibits fetal testicular testosterone production in the sprague-dawley rat in a cumulative dose-additive manner[J]. toxicological sciences, 2008, 163(1):153-165.
- [4] 马宁,支媛,徐海滨,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[J]. 中国食品卫生杂志, 2010, 22(4): 300-305.
- [5] 马宁,张文众,冯永全,等. 邻苯二甲酸二异丁酯对小鼠抗氧化酶活性及 DNA 损伤影响的研究[J]. 卫生研究, 2010, 39(5):549-551.
- [6] 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.
- [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] 陈祖培,王栋,姚德淼,等. 穿梭式条件反射测试仪简介[J]. 心理科学通讯, 1984, (2):60.
- [9] 陈媛,周玫. 自由基医学基础与病理生理[M]. 3版. 北京:人民卫生出版社, 2002:582-601.

## · 法规文件 ·

# 卫生部关于印发《卫生部食品安全事故应急预案(试行)》的通知

卫应急发[2013]2号

部机关各司局,中国疾病预防控制中心、卫生部卫生监督中心、国家食品安全风险评估中心、中国健康教育中心(卫生部新闻宣传中心),国家食品药品监督管理局、国家中医药管理局:为贯彻落实《食品安全法》、《国家食品安全事故应急预案》,有效组织开展食品安全事故的医疗卫生应对工作,卫生部制定了《卫生部食品安全事故应急预案(试行)》。现印发给你们,请遵照执行。

附件:卫生部食品安全事故应急预案(试行).doc(略)

卫生部

二〇一三年一月七日