

论著

体外谱系选择法诱导胚胎干细胞神经分化特性的研究

许磊^{1,2}, 耿雪², 胡静², 于洲²

(1. 中国疾病预防控制中心, 北京 100051; 2. 国家食品安全风险评估中心, 卫生部风险评估重点实验室, 北京 100022)

摘要:目的 研究体外谱系选择法诱导胚胎干细胞(ES)神经分化的特点,建立ES细胞体外神经分化的模型。方法 通过悬滴和悬浮培养、Nestin阳性筛选培养、神经样细胞增殖培养以及神经细胞分化培养的方法,建立体外诱导未分化的ES细胞分化为多巴胺能神经元模型;观察各神经分化及各阶段的ES细胞形态,并通过RT-PCR以及荧光免疫化学方法检测各分化阶段ES细胞神经特异表达基因和蛋白的表达特点;通过高效液相检测各阶段分化细胞分泌神经递质多巴胺的能力。结果 随着分化培养阶段的延长,分化的ES细胞中可见大量神经样细胞出现,分化末期可见清晰的神经元结构(包括突触);分化早期,仅有部分神经细胞特异基因和蛋白表达,且表达水平低,随着培养阶段延长,特异基因和蛋白均表达,且表达水平明显增加;神经递质多巴胺的水平在未分化和分化早期细胞中未检出,分化的中后期可检测出并呈现随分化时间延长而增加的趋势。结论 建立的体外谱系选择培养方法可诱导ES细胞分化获得具有多巴胺能神经元特性的细胞,可为神经发育毒性研究提供模型。

关键词: 胚胎干细胞; 谱系选择法; 神经分化; 体外试验; 毒理

中图分类号: R155; Q25 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2015)02-0099-06

DOI: 10.13590/j.cjfh.2015.02.001

**The study on the characters of the neural differentiation from
embryonic stem cell induced by lineage selection method**

XU Lei, GENG Xue, HU Jing, YU Zhou

(Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100051, China)

Abstract: Objective To investigate the characters of nerve differentiation procession induced from mouse embryonic stem cells (ESCs) through lineage selection method and then develop the neural differentiation model in vitro. **Methods** Dopaminergic neurons development model was induced from undifferentiated ESCs through pendent drop and suspension culture, lineage selection culture, neuron-like cells proliferation and differentiation culture of nerve cells. The morphology was observed and the detection of characteristics of neural specific genes and proteins expression at various differentiation stages was performed by RT-PCR and immunofluorescence and immunochemistry. The secretion ability of neurotransmitter dopamine at each stages was detected by high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** With the extending of differentiation time, numerous neuron-like cells were observed in differentiating cells and some neuron structures including synapses were clearly visible in the later differentiation period. In initial differentiation period, only a limited number of neural specific genes and proteins were expressed in low levels while all relating genes and proteins expressed in significantly increased levels with culture proceeding. The neurotransmitter dopamine had not been detected in the undifferentiated and initially differentiating stages but there was a remarkable rising trend in later period. **Conclusion** The cells acquired from the ESCs differentiation using ITSFn culture has the properties of dopaminergic neurons and this is an available model for developmental neurotoxicity research.

Key words: Embryonic stem cell; neuronal differentiation; lineage selection; in vitro experiments; toxicity

神经系统发育成熟需要一个相当长的时间,

且具有高度的时间性和区域性特点,所以这一时期是神经系统对神经毒物的高敏感期,任何外来因素对神经系统发育过程的干扰都可能造成永久性的损伤^[1],因此在进行神经发育毒性作用机制研究时,一个能真实模拟体内神经发育过程的实验模型是实验的基础。由于干细胞具有一定的时间依赖的分化过程,所以国外研究机构纷纷将其

收稿日期:2015-01-09

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(81102134);转基因生物新品种培育重大专项(2012ZX08011001)

作者简介:许磊 男 硕士生 研究方向为食品生殖、发育毒理学
E-mail: xulei0649@qq.com

通讯作者:于洲 男 副研究员 研究方向为食品生殖、发育毒理学
E-mail: yuzhou@cfsa.net.cn

作为发育毒理学等方面非常有价值的体外实验模型加以重点研究。

目前,在体外胚胎干细胞(ES)神经分化诱导模型中,以体外谱系选择法建立的体外神经分化培养体系,使胚胎干细胞神经分化过程经历了:ES细胞-胚胎体-神经前体细胞-神经元/神经胶质细胞这几个阶段,并最终分化为具有一定功能性的神经元^[2]。与视黄酸(RA)诱导法不同之处在于,谱系选择法需要经过神经前体细胞(NPC)阶段再分化为成熟神经细胞,并最终可获得高比例的多巴胺能神经元^[3]。此法较RA诱导法更接近于体内神经分化的过程,现已成为研究神经发育毒性作用机制的比较好的体外模型。本研究将探索体外谱系选择法诱导ES细胞神经分化的特点,为进一步神经发育毒性筛选方法的建立奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞来源

小鼠ES细胞D3系由中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所提供。

1.1.2 主要仪器与试剂

岛津高效液相色谱仪(日本岛津)、Biometra PCR仪(德国Biometra)、上海天能凝胶成像仪(上海天能科技有限公司)。

未分化ES细胞维持培养基[knock out-DMEM培养基中加入20%特级胎牛血清(FBS)、0.1 mmol/L β -巯基乙醇、0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(hepes)、1% 谷氨酰胺(L-GLU)、1% 青霉素钠(P-S)、1% 非必需氨基酸及白血病抑制因子(1×10^6 U/L)]、ES细胞悬浮和悬滴培养基(knock out-DMEM培养基中加入15% FBS、1% hepes液、1% L-GLU、1% P-S、1% 非必需氨基酸)、巢蛋白(Nestin)阳性筛选培养基(DMEM/F-12中加入5 mg/L 胰岛素、50 μ g/L 转铁蛋白、30 nmol/L 硒酸钠、5 mg/L 纤维连接蛋白)、神经细胞增殖培养基[DMEM-F12培养基中加入N2添加剂、10 μ g/L 人碱性成纤维细胞生长因子、1 mg/L 粘连蛋白、500 μ g/L 刺猬蛋白及100 μ g/L 成纤维细胞生长因子]、神经细胞分化培养基(DMEM-F12中加入N2添加剂、1 mg/L 层粘连蛋白及200 μ mol/L 维生素C)均购自美国Gibco、Nestin抗体、TH蛋白抗体均购自美国R&D,二抗荧光标记的山羊抗兔IgG抗体(美国Santa Cruze),逆转录-聚合酶链反应试剂盒、Trizol细胞裂解液、Taq DNA聚合酶均购自上海生物工程公司。

1.2 方法

1.2.1 胚胎干细胞体外培养

取出液氮冷冻条件下保存的ES细胞D3系进

行细胞复苏,接种于已处理的胚胎成纤维细胞(MEF)饲养层上,加入未分化ES细胞维持培养基培养。当胚胎干细胞团集落达到60%~70%融合时,0.25%胰蛋白酶消化后,传代继续扩增培养。

1.2.2 胚体的培养

将长满细胞培养瓶的ES细胞用0.25%胰蛋白酶消化,用差速贴壁的方法除去MEF。取生长旺盛的ES细胞消化成单细胞悬液或小细胞团,分别作如下处理以得到胚体团(EB):①悬滴培养。ES细胞以 10^5 数量级密度悬滴培养于10 cm的细菌培养皿盖板上,每滴30 μ l;②悬滴转悬浮培养。以1%软琼脂铺底于6 cm培养皿中,将悬滴培养3 d的干细胞拟胚体转入其中继续作悬浮培养1 d,此阶段用ES细胞悬浮和悬滴培养基培养^[4]。

1.2.3 诱导神经分化

将悬浮培养的ES细胞培养基更换为Nestin阳性细胞筛选培养基培养,经过4~6 d的筛选培养后,用0.25%胰蛋白酶消化细胞,按 $(1.5 \sim 2.0) \times 10^5/\text{cm}^2$ 的密度接种细胞于预先铺有多聚鸟氨酸和层粘连蛋白(1 mg/L)的培养皿中加入神经增殖培养基扩增神经样细胞。隔日换液,连续培养6 d后,将增殖培养基更换为神经分化培养基继续诱导分化4~6 d,最终获得功能性神经元细胞。

1.2.4 神经分化标记基因逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)检测

取体外谱系选择法诱导ES细胞神经分化不同阶段期的分化细胞,用0.25%胰蛋白酶消化成单细胞悬液,0.1 mol/L PBS液清洗2遍后,采用Trizol试剂盒提取分化细胞的总RNA,并用紫外分光光度计检测,选择 $A_{260/280}$ 检测以确定RNA浓度与质量。取1 μ g RNA逆转录合成cDNA,按照表1合成相关的引物进行PCR扩增,基因PCR循环次数均为34次^[5-6],产物经1%琼脂糖凝胶电泳,以1 500 Da作为核酸分子量Marker,紫外灯下观察结果并照像,RT-PCR引物序列见表1。

1.2.5 免疫荧光细胞化学检测

诱导分化的细胞用4%的多聚甲醛固定液固定10~30 min,以0.01 mol/L磷酸缓冲液洗3遍,0.3% Triton X-100孵育30 min,然后1%BSA封闭1 h,一抗4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,0.01 mol/L磷酸缓冲液洗3遍;荧光二抗室温孵育1~2 h,0.01 mol/L磷酸缓冲液洗3遍,然后于荧光倒置显微镜下观察,SPOT-RT冷却式数字显微摄像系统拍照。本试验所用抗体及稀释倍数如下:Nestin抗体(1:800)、TH抗体(1:100)。

1.2.6 分化细胞多巴胺分泌水平测定^[7]

样品处理:在各阶段分化培养末期,从进行分化培养的细胞培养板中,每孔取0.2 ml培养基,加

表1 RT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences (forward and reverse)

基因名称	引物序列(5'-3')	退火温度/℃
<i>Nestin</i>	CTC GAG CAG GAA GTG GTA GG	55
	TTG GGA CCA GGG ACT GTT AG	
<i>En-1</i>	CTT TGT CCT GAA CCG TGG TGG TAG	56
	TCA AGA CTG ACT CAC AGC AAC CCC	
<i>Nurr-1</i>	TCT GGA GTT AAG AAA TCG GAG CTG	55
	TGA AGA GAG CGG AGA AGG AGA TC	
β - <i>Tubulin</i>	CAC TCT TTC CGC ACG ACA TC	60
	TGA AGA GAG CGG AGA AGG AGA TC	
<i>GABA-α</i>	AGA TTC CAC AAG ATG GAT TCC TG	58
	AGC AGC AGA AGA AGC TCT GGC	
<i>TH</i>	CAA GCA CTG AGT GCC ATT AGC	56
	ACC AAG AGC AGC CCA TCA AAG	
<i>BF-1</i>	AAA ACT CGC TGG GCA ACA AC	56
	CAG GGG TTG AGG GAG TAG C	
<i>GAPDH</i>	GCA CAG TCA AGG CCG AGA AT	62
	ACG TCA GAT CCA CGA CGG AC	

注:*GABA- α* 为氨基丁酸基因;*TH*为酪氨酸羟化酶基因;*GAPDH*为甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因

入高氯酸和 EDTA 分别至终浓度为 0.33 mol/L 和 0.17 mmol/L,以沉淀蛋白质。去除培养中剩余的分化培养基,加入含 50 mmol/L KCl 的分化培养基,37 °C 条件下作用于分化获得的神经细胞 30 min。收集上述作用后的培养基,采用相同的方法沉淀蛋白。4 °C 14 000 × g 离心力条件下,离心 10 min,取上清液 20 μ l 采用高效液相色谱法(HPLC)对多巴胺水平进行测定和分析。

液相条件:流动相 A 为水(含有 0.01% 七氟丁酸、0.1% 甲酸),B 为乙腈(含有 0.01% 七氟丁酸、0.1% 甲酸)。抽滤并脱气,流速 0.8 ml/min。工作电极为玻璃碳电极,参比电极为 Ag/AgCl 电极,工作电压 310 mV。

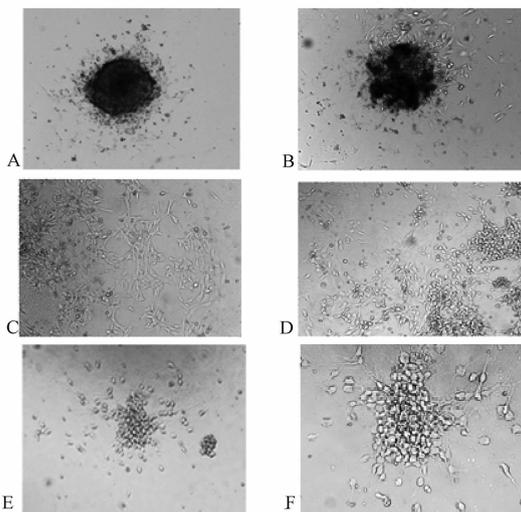
2 结果

2.1 体外诱导 ES 细胞神经分化过程的形态观察

ES 细胞分化初期,形成胚体团的周围细胞向外突出生长,随着培养时间的延长,*Nestin* 阳性筛选培养阶段出现了少量具有神经形态特点的细胞;至扩增培养阶段,在分化的 ES 细胞中可见大量神经样结构的细胞出现;分化培养阶段最终可见具有神经元明显的结构细胞,并可见胞体上有突触向外延伸现象,见图 1。

2.2 分化诱导过程中 ES 细胞神经特异基因表达的情况

体外谱系选择法神经分化诱导过程中,部分神经细胞内源性基因 *BF*、*Nestin* 等在悬浮和悬滴培养阶段即有表达,且随着培养时间的延长,表达水平逐渐增高,而 *TH*、*GABA* 等多巴胺能神经元中可表达的基因在分化诱导培养阶段才表达,表明多巴胺能

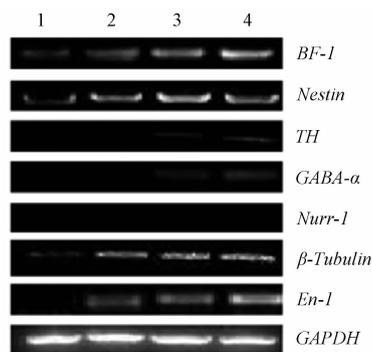


注:A 为悬滴培养末期 ES 细胞($\times 100$);B 为悬浮培养末期 ES 细胞($\times 100$);C 为 *nestin* 阳性筛选培养末期 ES 细胞($\times 100$);D 为神经样细胞增殖培养末期 ES 细胞($\times 100$);E 和 F 为神经细胞分化培养末期 ES 细胞($\times 100$ 、 $\times 200$)

图 1 体外诱导 ES 细胞神经分化过程

Figure 1 Terminal differentiation of ES cells to a DN phenotype at different stages

神经元的分化只在分化诱导阶段才开始。另外,*Nurr-1* 基因在整个 ES 细胞诱导分化培养的过程中均未检测到其基因的表达。



注:1 为悬浮培养末期 ES 细胞;2 为 *Nestin* 阳性筛选培养末期 ES 细胞;3 为神经样细胞增殖培养末期 ES 细胞;4 为神经细胞分化培养末期 ES 细胞

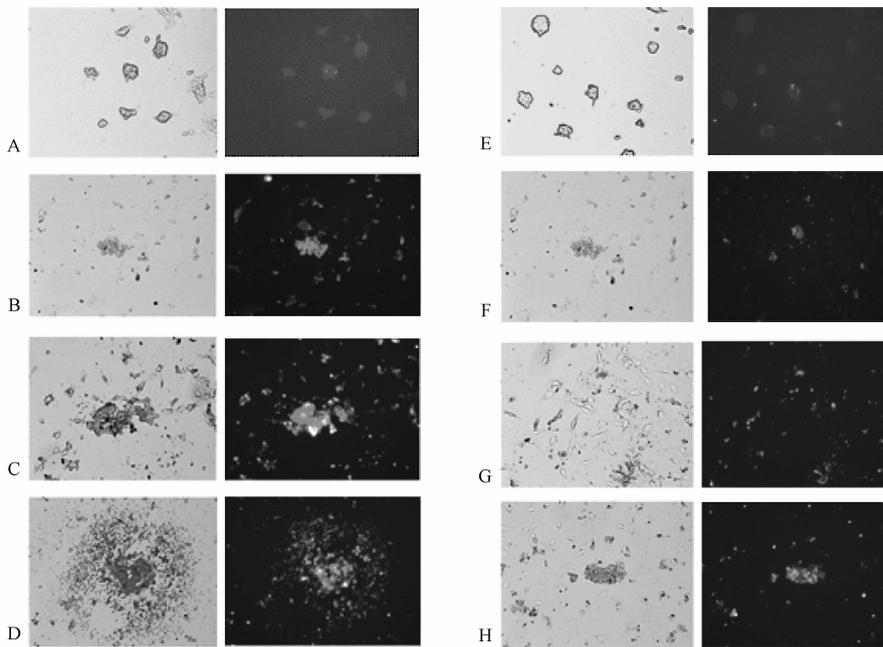
图 2 神经分化不同阶段的 ES 细胞神经源性基因表达情况
Figure 2 Semi-quantitative RT-PCR analysis of the DA neuron-specific regulatory genes at different stages

2.3 分化诱导过程中 ES 细胞神经源性蛋白免疫荧光检测结果

随着时间的延长,ES 细胞神经分化培养获得的细胞中,*Nestin* 蛋白在 *Nestin* 筛选培养阶段可表达,且随着分化培养的延长,表达水平逐渐增加;*TH* 蛋白在 *Nestin* 筛选培养和神经分化诱导阶段无表达或表达水平低,直至神经分化培养阶段末期才检测到其表达,且表达水平仍较 *Nestin* 蛋白低;上述神经源

性特异蛋白在诱导分化过程的表达特点与基因表

达的情况基本符合,见图3。



注:A和E分别为悬浮培养末期ES细胞Nestin和TH蛋白表达情况;B和F为Nestin阳性筛选培养末期ES细胞Nestin和TH蛋白表达情况;C和G为神经样细胞增殖培养末期ES细胞Nestin和TH蛋白表达情况;D和H为神经细胞分化培养末期ES细胞Nestin和TH蛋白表达情况

图3 不同阶段分化的ES细胞神经源性蛋白表达情况(×100)

Figure 3 Result of immunohistochemistry show that cells at different stages are labeled with Nestin and TH

2.5 分化诱导获得的神经细胞多巴胺分泌水平检测结果

未分化的ES细胞中多巴胺递质的水平未检出;当在诱导培养条件下启动神经分化过程后,至Nestin阳性筛选阶段诱导获得的神经样细胞其分泌的多巴胺的水平仍未检出,表明该阶段仅获得了神经样细胞,但该细胞不具有分泌多巴胺的功能;至增殖培养末期神经元分化诱导阶段获得细胞中可检出多巴胺递质的分泌,其水平为 (6.96 ± 1.31) ng/ml;分化阶段末期,分化细胞中多巴胺水平进一步增加至 (12.20 ± 1.89) ng/ml,可见通过体外谱系选择法诱导ES细胞培养可以获得分泌多巴胺神经递质的神经细胞,且获得多巴胺神经细胞主要在神经增殖和分化培养阶段获得,见图4。

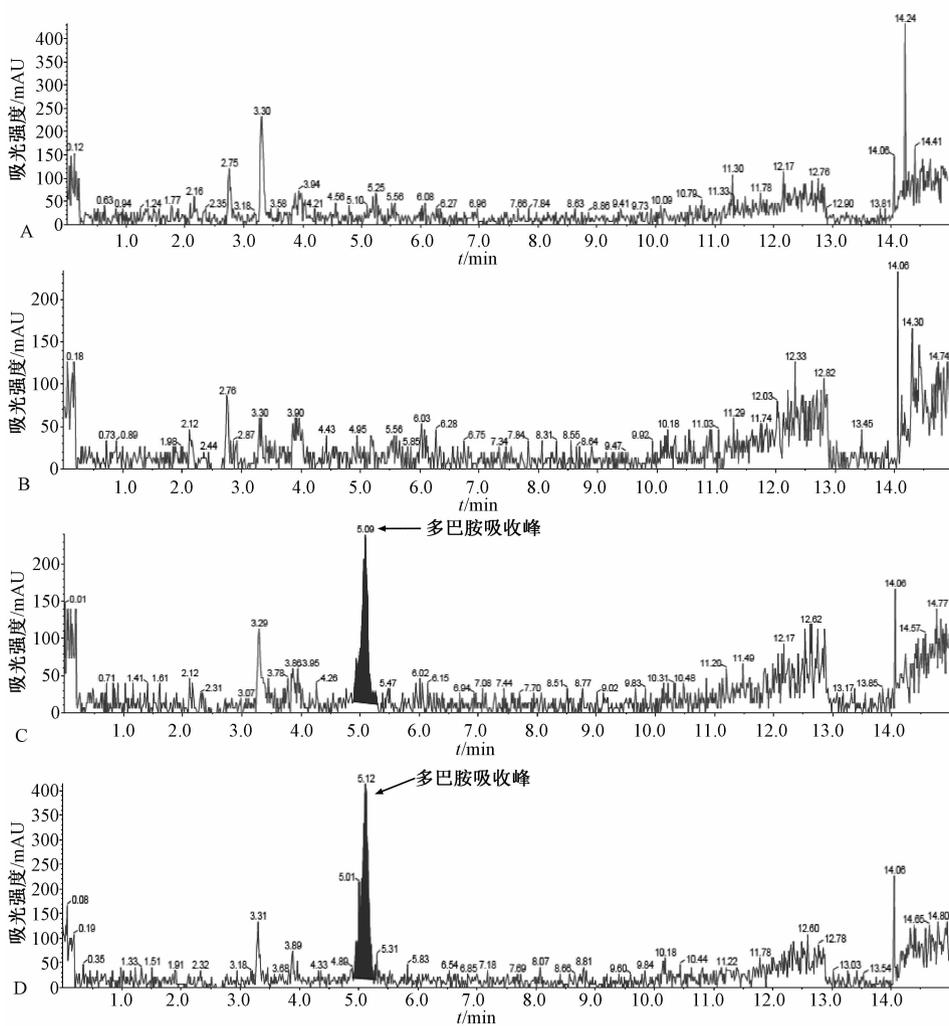
3 讨论

由于ES细胞能在细胞核分子水平重演胚胎发育过程,并且在EB分化过程中,早期胚胎发育的标志基因按一定的顺序先后表达,同时各组织的特异性基因的表达的顺序也很好的重演了体内胚胎发育的基因表达图式^[8]。因此,ES细胞时间依赖的分化过程,为哺乳动物的发育生物学、发育毒理学等方面的研究提供一个有价值的体外模型。本研究也是在本实验室前期ES细胞发育毒性评价模型研

究基础上展开。

目前ES细胞向神经细胞自发分化能力有限,因此为了提高神经细胞的分化效率,需利用一些特殊的诱导分化途径如RA诱导法。高浓度的RA能有效地诱导ES细胞向神经细胞分化,并可在分化的细胞中检测到神经细胞的特异性蛋白、基因、离子通道和一些受体的表达。但RA诱导的神经细胞发育模式和存活能力是有限的。前期研究发现,RA诱导神经细胞的效率很高,但诱导后的细胞不能再增殖,培养后5d内大多数神经元已死亡^[9]。由于神经前体细胞在体外容易分化为星形胶质细胞、少突神经胶质细胞和成熟神经元等3个神经谱系,因此目前在ES细胞向神经细胞定向分化的研究中,大多倾向于从细胞谱系分化出发,获得多潜能神经前体细胞(NP),最终得到所需类型的神经细胞。建立谱系选择的基本方法是先解除对ES细胞的分化抑制,促进ES细胞形成EB,之后促进EB细胞向神经前体细胞(NPC)分化,并对NPC进行扩增,最终促进细胞向功能型神经细胞分化,如多巴胺能神经元等^[10]。

本研究中采用体外谱系选择法诱导ES细胞分化为神经细胞,即让ES细胞在没有抑制分化因子(如白血病抑制因子)的培养液中悬滴培养形成EB,撤去培养基中的白血病抑制因子,诱导EB的形



注:A 为未分化培养阶段细胞多巴胺分泌水平结果;B 为 Nestin 阳性筛选培养末期细胞多巴胺分泌水平结果;C 为神经细胞增殖培养末期细胞多巴胺分泌水平结果;D 为神经细胞分化培养末期细胞多巴胺分泌水平结果

图 4 不同阶段分化的 ES 细胞多巴胺递质分泌水平 HPLC 检测结果

Figure 4 Result of intracellular levels of dopamine in ES cell-derived cultures analyzed by HPLC.

成,是体外诱导 ES 细胞向神经细胞分化的前提。悬滴 3 d,再悬浮培养 1 d 后,在培养基中加入 Nestin 阳性筛选培养基,再诱导 4 ~ 6 d,ES 细胞出现了较多的神经样细胞,此后再经历增殖和分化培养阶段,获得神经样细胞具有轴突等神经细胞形态特点。在这一分化过程中,细胞团内的 ES 细胞逐渐减少,免疫组化结果 Nestin 和 TH 阳性细胞数逐渐增多,而这些 Nestin 和 TH 阳性细胞目前被认为是神经元和胶质细胞共同前体的特征性抗原标记。同时各阶段末期细胞克隆球的神经细胞标志 *Nestin*、*β-Tubulin*、*EN-1* 等基因,RT-PCR 结果显示均在部分再分化早期即表达,而有些如 *TH-1* 等则至神经分化阶段才表达,但上述基因均呈现表达随着培养时间的延长而增加的趋势。另外,体外谱系选择法诱导分化各阶段得到的神经样细胞,只有在诱导末期即神经增殖和分化阶段才能检测出,且随着分化时间延长分泌水平增加。上述结果在本试验诱

导条件下可获得具有一定多巴胺能神经元特性的神经细胞。

虽然通过 ES 细胞诱导分化为神经细胞建立了一定的神经元发育通路模型,可以很好的模拟神经系统发育过程中的复杂事件,但目前相关方法的研究还有许多问题需要解决。首先,对细胞外调控 ES 细胞向特定细胞类型的神经元分化的因子还缺乏深入认识,分化条件仍需完善;其次,诱导 ES 细胞分化获得神经细胞的增殖缓慢,要获得大量分化细胞比未分化细胞更难;再次,体外培养过程中一些不可知因素的影响及培养条件的变化均有可能导致细胞自身生物学特性发生改变,影响细胞的功能^[11-12]。因此,高效的 ES 细胞神经分化模型的建立并将其应用于安全性评价领域还需要进一步研究,希望经过不断努力,使 ES 细胞神经细胞分化模型在毒理学等领域中发挥更大的作用。

参考文献

- [1] Kim G D, Rhee G S, Seok J H, et al. Differentiation of endothelial cells derived from mouse embryoid bodies: a possible in vitro vasculogenesis model [J]. *Toxicol Lett*, 2008, 180 (3): 166-173.
- [2] Hayess K, Riebeling C, Pirow R, et al. The DNT-EST: a predictive embryonic stem cell-based assay for developmental neurotoxicity testing in vitro [J]. *Toxicology*, 2013, 314 (1): 135-147.
- [3] Lee S H, Nadya L, Lorenz S, et al. Efficient generation of midbrain and hindbrain neurons from mouse embryonic stem cells [J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18 (6): 675-679.
- [4] 刘海波, 支媛, 冯永全, 等. 以 ITSF α 诱导法为基础的神经发育毒性评价模型的建立及其有效性研究 [J]. *中国食品卫生杂志*, 2013, 25 (1): 6-11.
- [5] Díaz N F, Díaz-Martínez N E, Camacho-Arroyo I, et al. Estradiol promotes proliferation of dopaminergic precursors resulting in a higher proportion of dopamine neurons derived from mouse embryonic stem cells [J]. *Int J Dev Neurosci*, 2009, 27 (5): 493-500.
- [6] Kadereit S, Zimmer B, Van Thriel C, et al. Compound selection for in vitro modeling of developmental neurotoxicity [J]. *Front Biosci*, 2012, 17: 2442-2460.
- [7] Harrill J A, Freudenrich T M, Robinette B L, et al. Comparative sensitivity of human and rat neural cultures to chemical-induced inhibition of neurite outgrowth [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 256 (3): 268-280.
- [8] Spielmann H. The way forward in reproductive/developmental toxicity testing [J]. *Altern Lab Anim*, 2009, 37 (6): 641-656.
- [9] Visan A, Hayess K, Sittner D, et al. Neural differentiation of mouse embryonic stem cells as a tool to assess developmental neurotoxicity in vitro [J]. *Neurotoxicology*, 2012, 33 (5): 1135-1146.
- [10] WU S M, TAN K S, CHEN H, et al. Enhanced production of neuroprogenitors, dopaminergic neurons and identification of target genes by overexpression of sonic hedgehog in human embryonic stem cells [J]. *Stem Cells Dev*, 2012, 21 (5): 729-741.
- [11] Hayashi M A, Guerreiro J R, Cassola A C, et al. Long-term culture of mouse embryonic stem cell-derived adherent neurospheres and functional neurons [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010, 16 (6): 1493-1502.
- [12] WANG C, LIU F, Patterson T A, et al. Utilization of neural stem cell-derived models to study anesthesia-related toxicity and preventative approaches [J]. *Mol Neurobiol*, 2013, 48 (2): 302-307.

论著

钇对子代大鼠神经行为和认知能力的影响

李晨汐^{1,2}, 耿雪², 马川², 方海琴², 支媛², 于洲², 贾旭东², 徐海滨²

(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 研究硝酸钇对子代大鼠神经行为和认知能力的影响。方法 将孕鼠随机分为对照和受试物低、中、高4个试验组, 20只/组。从孕期第6天(GD 6)至分娩后第21天(PND 21), 受试物组每天分别灌胃给予硝酸钇溶液5、15、45 mg/kg BW, 对照组灌胃给予蒸馏水。断乳后, 继续给予子鼠原剂量受试物直至PND 63天。观察不同剂量硝酸钇对子鼠生长发育、脏器组织和神经行为的影响。结果 在PND 21天时, 雄鼠低、中、高3个剂量组体重均高于对照组, 且差异有统计学意义($P < 0.05$)。但从PND 42天开始至试验结束, 雄性高剂量组体重明显低于对照组, 导致高剂量组雄鼠总增重和总进食量均低于对照组, 且差异有统计学意义($P < 0.05$), 但食物利用率无变化。PND 42天时雌鼠低剂量组体重和雄鼠高剂量组脑体比均高于对照组, 且差异有统计学意义($P < 0.05$), 但不认为有生物学意义。Morris水迷宫试验中仅高剂量组雌鼠第5天的潜伏期高于对照组, 且差异有统计学意义($P < 0.05$), 其他神经行为试验结果均未见差异。结论 在本试验条件下, 断乳后持续给予硝酸钇受试物会导致高剂量组雄性子鼠的体重下降, 但不会影响脑组织重量, 也不会成年早期对子鼠的痛觉、运动活力和认知能力等神经行为造成影响。

关键词:硝酸钇; 神经发育; 神经行为; 稀土; 毒理试验**中图分类号:** R155; O614.32⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-8456(2015)02-0104-06**DOI:** 10.13590/j.cjfh.2015.02.002

收稿日期: 2014-12-08

基金项目: 食品化学污染物与新资源危害识别关键技术研究(2012BAK01B04)

作者简介: 李晨汐 男 助理研究员 研究方向为营养与食品卫生 E-mail: lichenxi@cfsa.net.cn

通讯作者: 徐海滨 男 研究员 研究方向为营养与食品卫生 E-mail: hbxu1231602@vip.sina.com