基础研究 文章编号:0253-3626(2009)09-1221-03

壬基酚对仔代脑组织 AchE 和 ChAT 活性的影响

卢 宁[1],俞 捷[2],许 洁[2],陈佳瑜[3],张仁义[2],继海续[2]

(1. 遵义医学院第三附属医院神经内科;2. 遵义医学院预防医学教研室;3. 遵义医学院生化教研室,遵义 563003)

【摘 要】目的:研究母体暴露壬基酚对仔鼠学习记忆及脑组织 AchE 和 ChAT 活性的影响。方法:母鼠孕 9 ~ 15 d 灌胃壬基酚(0、50、100、200 mg/kg),用 Morris 水迷宫法观察壬基酚对仔鼠学习记忆的影响;检测 F1 仔鼠垂体和海马组织乙酰胆碱脂酶(AchE)和胆碱乙酰转移酶(ChAT)的活性。结果:与阴性对照组比较,NP200 mg/kg 组仔鼠水迷宫中逃避潜伏期延长,脑组织 ChAT 活性明显下降、AchE 活性上升($P<0.05$)。结论:壬基酚可透过胎盘屏障影响仔鼠学习记忆功能,机理可能与影响胆碱能神经系统功能有关。

【关键词】壬基酚;仔鼠;脑;神经毒性

【中国图书分类法分类号】R741 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-06-23

Effects of nonylphenol on the activity of AchE and ChAT in brian of filial rat

LU Ning, et al

(*Department of Neurology, the Third Affiliated Hospital of Zunyi Medical College*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effects on the activity of acetylcholinesterase (AchE) and choline acetylase(ChAT) in filial rat's brian and learning and memory capacity after the mother-rat is exposed to nonylphenol. *Methods*: At the first day of the pregnancy, the rats were divided into four groups, which were orally administered with NP at doses of 0, 50, 100 and 200 mg/kg, respectively, on gestational days 9 ~ 15. The offspring rats's Brain tissues of each groups were dissected for AchE and ChAT activity assay and cognitive function was tested by Morris water maze. *Result*: Morris water maze test results showed the escape latency was longer in the groups of NP 200 mg/kg than in control group ($P<0.05$). The AchE activity decreased while the activity of ChAT increased in the NP 200 mg/kg group, the differences mentioned above were statistical significant compared to control group, with dose-effect relationship in some degree, ($P<0.05$). *Conclusion*: Exposures to NP during gestation might influenced the activityof AchE and ChAT in brian of F1 rats.

【Key words】Nonylphenol; Offspring; Brian; Neurotoxicity

环境内分泌干扰物壬基酚(Nonylphenol,NP)可透过胎盘屏障进入子代体内,影响仔鼠生理和神经行为发育[1-6],与以往结果相同,本研究的另一组行为研究发现,NP 可影响仔鼠的学习和记忆能力,许多研究表明,胆碱能神经系统在脑的记忆功能起着重要作用,Ach 是脑内重要的神经递质,机体内的 Ach 由胆碱乙酰转移酶(Choline acetylase,ChAT)合成,胆碱酯酶(Acetylcholinesterase,AchE)分解,和共同维持着 Ach 含量的动态平衡,若 ChAT 或 AchE 活性异常,就会引起相应生物学效应改变。因此,本实验通过研究母体暴露壬基酚对仔鼠脑组织 AchE 和 ChAT 活性的影响,初步探索 NP 对机体神经行为影响的机理。

作者介绍:卢 宁(1959-),男,副主任医师,研究方向:神经内科。

通讯作者:许 洁,女,硕士,E-mail:xujie360@sina.com。

基金项目:贵州省自然科学基金(黔科 2019 号);遵义医学院院基金(2007-61-22);遵义市自然科学基金(遵市科合社字 200805)。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性清洁级 SD 大鼠 50 只,体重(260 ± 20)g,雄性 25 只,体重(180 ± 10)g,第三军医大学实验动物中心提供[SCXK(渝)20080003]。饲养条件:相对湿度(60 ± 5)%,温度(20 ± 2)℃,自然通风,12 h 光照 12 h 黑暗,自由取食、饮水。

1.2 试剂和仪器

壬基酚(东京化成株试会社),精制花生油(山东鲁花牌),ChAT 和 AchE 试剂盒(南京建成生物工程研究所),分光光度计(上海电化仪表自控公司 721-A)高速电动匀浆器(上海浦东物理光学仪器厂 FSH-2),电子天平(上海精密科

学仪器厂 FA1004N),Morris 水迷宫监测系统(成都泰盟科技有限公司)。

1.3 动物分组及染毒

大鼠雌:雄按 2:1 同笼交配,次日晨将雌鼠逐一阴道涂片镜检,发现精子当日记为孕期 0 d,将交配成功的 28 只孕鼠随机分配到 4 组,每组 6~7 只(NP 0、50、100、200 mg/kg),对照组灌胃溶剂花生油,于受孕第 9~15 d 空腹灌胃 NP,体积均为 10 ml/(kg·d)。仔鼠出生后 60 d 后进行行为学测试。

1.4 Morris 水迷宫测试

水迷宫测试仪为直径 120 cm,高 30 cm 的圆形水池,划为 4 个象限盛水后加适量奶粉,使水成不透明乳白色,水温(23±2)℃,水深 25 cm,淹没平台 2 cm。

1.4.1 定位航行实验(Placenavigationtest,PNT) 实验历时 4 d,1 d 时大鼠在水池内自由游泳 3 min,熟悉环境。以后每天上下午各测试 1 组次,选平台相对象限中点为入水点,共入水 4 次,记录找到平台的时间,即逃避潜伏期,如 120 s 仍未找到,记录为 120 s;以 4 次的平均值作为学习成绩,分析动物获取空间信息的学习能力。

1.4.2 空间探索实验(Spatialprobetest,SPT) 定位航行实验完毕 2 d 时,撤除平台,重复实验操作。以潜伏期作为记忆成绩,判断动物记忆储存及提取再现能力。

1.5 海马组织 ChAT 和 AchE 活性测定

制备仔鼠脑组织匀浆:在冰盘上取出垂体和海马,电子天平称重,按 1:10(每克组织中加 10 ml 冷生理盐水)加生理盐水,用高速电动匀浆器制成 10%组织匀浆(6 s/ 次,间隔 10 s,共 20 次,匀浆过程始终处于冰水中);组织匀浆分成数份,蛋白质含量测定采用考马亮蓝法,脑组织 ChAT 和 AchE 活性依照试剂盒说明进行测定。

1.6 统计学处理

采用 SPSS13.0 统计软件,作单因素方差分析及方差齐性检验,结果以表示,有差异进一步作 LSD-t 检验(方差齐)或 Games-Howell 检验(方差不齐)进行组间差异比较,检验水准 $\alpha=0.05$。

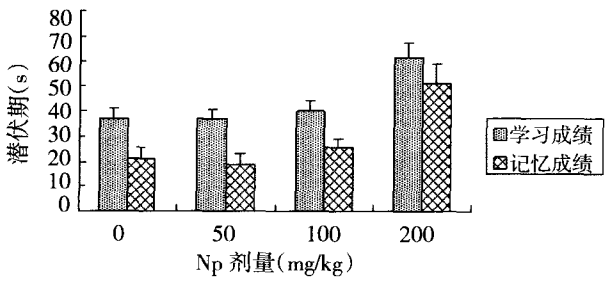


图 1 水迷宫试验鼠仔学习记忆成绩

表 2 NP 对仔鼠海马 ChAT 和 AchE 活性的影响($\bar{x}\pm s$)

NP(mg/kg)	仔鼠(只)	ChAT(U/g)	AchE(U/mg)
0	10	262.666±16.085	9.111±0.938
50	10	266.272±13.446	9.800±1.524
100	10	240.700±22.420**	10.190±1.428
200	10	197.400±13.866**	17.970±3.060**

注:与阴性对照组比较,** $P<0.01$

2 结 果

2.1 Morris 水迷宫测试结果

第 1~4 d 定位航行实验和第 5 d 空间探索实验中,与对照组比较,NP200 mg/kg 组学习和记忆成绩下降($P<0.05$):表现为仔鼠逃避潜伏期变长;NP50、100 mg/kg 组与对照组比较学习记忆成绩差异无统计学意义($P>0.05$),见图 1 和表 1。

2.2 NP 对仔鼠海马组织 ChAT 和 AchE 活性的影响

NP100、200 mg/kg 组仔鼠海马组织 ChAT 活性明显低于对照组($P<0.01$);NP200 mg/kg 组 AchE 活性高于对照组($P<0.01$),结果见表 2。

2.3 NP 对仔鼠垂体组织 ChAT 和 AchE 活性的影响

NP 暴露组仔鼠垂体组织 ChAT 活性明显低于对照组($P<0.05$);NP100、200 mg/kg 组 AchE 活性高于对照组($P<0.01$),结果见表 3。

3 讨 论

神经行为变化是一种早期和敏感的毒理学指标,行为功能的障碍常常在后代出现临床症状和生化指标改变之前就会表现。因此,神经行为学发育

表 1 NP 各暴露组仔鼠水迷宫实验中逃避潜伏期的比较($\bar{x}\pm s$,$n=7$)

NP(mg/kg)	学习成绩	记忆成绩
0	35.85±4.29	21.00±4.83
50	36.57±3.86	18.42±4.72
100	40.00±4.43	25.71±3.25
200	61.14±5.92**	51.14±7.75**

注:** 表示与阴性对照组比较,$P<0.01$

表 3 NP 对仔鼠垂体 ChAT 和 AchE 活性的影响($\bar{x}\pm s$)

NP(mg/kg)	仔鼠(只)	ChAT(U/g)	AchE (U/mg)
0	10	208.000±10.111	21.377±2.798
50	10	197.454±8.153*	22.718±3.535
100	10	191.800±11.380**	22.836±4.157
200	10	147.500±10.211**	32.900±3.045**

注:与阴性对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$

的研究对于确定环境污染物对后代的神经毒性影响具有重要的实际意义。学习、记忆是高等动物大脑的重要功能,Morris 水迷宫实验旨在用于检测动物空间探索和辨别的学习记忆能力,以动物找到平台的潜伏期作为评定学习记忆能力的指标。本实验结果显示,第 1~4 d 定位航行实验中,NP200 mg/kg 组仔鼠逃避潜伏期延长,说明仔鼠获取空间信息的学习能力下降;空间探索实验成绩下降,说明子代记忆储存及提取再现能力降低。

乙酰胆碱(Ach)是脑内重要的神经递质,其主要功能是维持意识的清醒,促进学习和记忆的改善,与学习记忆密切相关。目前认为,胆碱酯酶(AchE)在神经细胞发育过程中起重要的作用,在脑发育的关键时期可作为神经营养因子,起着信息联系与终止细胞复制并促进胆碱能靶部位细胞分化和结构构建的功能[7]。NP 弱雌激素样作用影响垂体,干扰下丘脑-垂体-性腺轴的调节功能,改变下丘脑 GnRH 和垂体 LH 和 FSH 的释放,影响体内激素水平,那么 NP 是否会作用于垂体影响神经递质的释放呢?海马直接参与了学习记忆信息的识别、编码、和储存过程,因此本研究对垂体和海马组织中 ChAT 和 AChE 活性进行了检测。本研究结果显示:NP 降低海马和垂体组织 ChAT 活性、增强 AChE 活性,Ach 由胆碱乙酰转移酶 (ChAT) 合成,AChE 分解,ChAT 活性下降或 AChE 活性增强均会降低脑内 Ach 水平,导致学习记忆水平下降。

神经系统的发育需要经历一个精密的时程化改变过程,而这一过程中每个环节都必须在时间和空间上准确无误,任何一个环节发生障碍都将导致神经功能改变,因此推测,引起成年雄性仔鼠神经行为影响的机制可能为以下几个方面:①NP 对母体的毒性作用可能会通过胎盘屏障进入子代体内导致了对仔鼠神经系统的毒性。②NP 的细胞毒性作用,透过血脑屏障直接损伤发育中的神经细胞。③孕 9~15 d 正是胎鼠神经系统发育关键期,体内内分泌系统脆弱,在该期暴露 NP,其弱雌激素样作用可干扰下丘脑—垂体—性腺轴的调节功能,改变胎鼠体内的性激素代谢的平衡,影响处于器官形成期胎鼠神经系统的发育。④NP 可通过胎盘进入子代体内并蓄积,可降低乙酰胆碱水平,从而抑制神经肌肉接点处的兴奋传导,影响神经细胞生长、分化和脑的正常功能,最终导致子代神经系统发育延缓,学习记忆水平下降,部分揭示了 NP 的神经毒作用机理。

参 考 文 献

[1] 许 洁,俞 捷,刘晓云,等,壬基酚对胎鼠发育的毒性作用研究[J]. 工业卫生与职业病,2009,35(3):132-135.

[2] 许 洁,范奇元,胡斌丽,等.妊娠期壬基酚暴露对雄性仔鼠生长发育的影响[J]. 环境与健康,2007,24(11):901-904.

[3] 许 洁,罗军敏,范奇元,等,孕期暴露壬基酚对雄性仔鼠免疫功能影响[J]. 中国公共卫生,2008,24(5):611-612.

[4] Negishi T, Kawasaki K, Suzaki S, et al. Behavioral alterations in response to fear-provoking stimuli and tranylcypromine induced by perinatal exposure to bisphenol A and nonylphenol in male rats[J]. Environ Health Perspect,2004,112(11):1159-1164.

[5] Xia Y Y, Zhan P,Wang Y.Effects of nonylphenol on brain gene expression profiles in F1 generation rats[J]. Biomed Environ Sci,2008,21(1):1-6.

[6] 刘 艳,李 哲,段志文,等,壬基酚对孕鼠生殖和仔鼠行为发育的影响[J]. 工业卫生与职业病,2007,33(3):140-143.

[7]Uryu S S,Tokuhiro S,Murasuqi T,et al.Anovelcompound,Rs 178, specifically inhibits neuronal cell death mediated by beta amyloid induced macrophage activation in vitro[J]. BrainRes,2002,946(2):298-306.

(责任编辑:冉明会)

欢迎投稿,欢迎订阅