神经科学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000655

B[a]P 致 SD 幼鼠神经组织形态学损伤及其机制研究

魏 科[1],汤 艳[2],罗 珑[1],段 利[1],秦启忠[1],周 莉[1],涂白杰[1]
（1. 重庆医科大学公共卫生与管理学院劳动与环境卫生教研室,重庆 400016;
2. 四川医科大学公共卫生学院劳动与环境卫生教研室,泸州 646000）

【摘 要】**目的**:通过观察苯并[a]芘(Benzo(a)pyrene,B[a]P)对新生 SD 大鼠脑组织形态学、超微病理学和生化指标的改变,探讨 B[a]P 神经发育毒性的分子机制。**方法**:将 48 只新生雄性 SD 大鼠随机分为溶剂对照组、低剂量组、中剂量组、高剂量组,每组各 12 只,从出生后第 5 天始,每天灌胃 1 次,持续 14 d。染毒后制切片,光镜、电镜观察海马形态学改变,化学比色法测定生化指标变化。**结果**:与溶剂组比较,染毒组幼鼠可见不同程度的脑组织损伤;海马组织超氧化物歧化酶含量、Na^+-K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶的活性明显下降,丙二醛含量明显增高,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。**结论**:B[a]P 可致新生 SD 大鼠神经发育毒性,其机制可能与海马组织氧化应激产生、Na^+-K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶活性下降有关。

【关键词】苯并[a]芘;神经发育毒性;形态学;氧化应激;三磷酸腺苷酶
【中图分类号】R114 【文献标志码】A 【收稿日期】2014-12-03

Effects of benzo(a)pyrene exposure on morphology of the nervous system and its mechanism

Wei Ke[1], Tang Yan[2], Luo Long[1], Duan Li[1], Qing Qizhong[1], Zhou Li[1], Tu Baijie[1]
(1. Teaching and Research Section of Occupational and Environmental Medicine, School of Public Health and Administration, Chongqing Medical University; 2. Teaching and Research Section of Occupational and Environmental Medicine, School of Public Health, Sichuan Medical University)

【Abstract】***Objective***: To explore the relationship between Benzo(a)pyrene(B[a]P) exposure and the changes of morphology, oxidative stress and ATPase in hippocampus in newly born SD rats, and to examine the molecular mechanism of developmental neurotoxicity caused by B[a]P. ***Methods***: Forty eight male new born SD rats were randomly assigned to one of the following four groups(n=12/group): vehicle control group, 0.02, 0.2, 2 mg/kg of B[a]P groups. The rats were given oral dose of B[a]P once a day for 14 days starting from the fifth day after birth. After infection period, optical slices and electron-microscope slices from brain(cortex, hippocampi, cerebellum and brain stem)were made to observe. The colorimetric technique was used to detect the activity of SOD, MDA, Na^+-K^+-ATPase and C^{a2+}-Mg^{2+}-ATP in hippocampus. ***Results***: Brain tissue damage at various degrees was observed in the B[a]P groups compared with that of control group. SOD content, Na^+-K^+-ATPase and Ca^{2+}-Mg^{2+}- ATPase of B[a]P groups decreased obviously compared with those of control group, and MDA content of B[a]P groups increased obviously, with statistically significant differences($P<0.05$). ***Conclusion***: B[a]P could lead to developmental neurotoxicity of new born SD rats, and the change of oxidative stress, the decreased ATPase may play an important role in B[a]P-caused developmental neurotoxicity.

【Key words】Benzo(a)pyrene; developmental neurotoxicity; morphology; oxidative stress; ATPase

苯并[a]芘(Benzo[a]pyrene,B[a]P)是多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons,PAHs)的典型代表之一,来源和分布十分广泛。B[a]P 易通过呼吸道和消化道吸收,长时间低剂量水平 B[a]P 暴露可在体内累积,诱发产生致癌、致畸、致突变和神经毒性等多种损害,给人体健康造成巨大威胁[1]。近年来,B[a]P 神经发育毒性的研究逐步成为国内外研究的热点,本课题组前期结果也已证实 B[a]P 的神经行为学毒性主要通过作用于海马组织,且可对幼鼠的学习记忆功能造成不可逆的损害[2]。研究发现,神经系统的发育时间较长,可以从胚胎早期延续至出生后。大鼠

作者介绍:魏 科,Email:wkeeeeee@163.com,
研究方向:职业卫生。
通信作者:涂白杰,Email:baijietu@hotmail.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81372957)。
优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20150522.1631.002.html (2015-05-22)

在出生后脑组织仍处于快速发育阶段，是外源性毒物作用的敏感期。在 2008 年 Choi 等[3]队列研究中也发现 PAHs 对胎儿各项发育指标可产生显著的损害。但是，迄今 B[a]P 对新生动物神经发育毒性机制的研究还相对较少。因此，本研究拟通过观察 B[a]P 暴露后新生 SD 幼鼠大脑组织超微病理学的改变、海马氧化应激水平及 ATP 酶活性的变化，以探讨 B[a]P 的发育神经毒性的分子机制，现总结报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

8 周龄成年雌、雄性 Sprague-Dawley 大鼠，体质量区间（雌性 200~220 g，雄性 310~340 g），购买自重庆医科大学实验动物中心，动物编号：SCXK（渝）2007-0001。动物饲养环境：12 h/12 h 昼夜等分，室内恒温（22±2）℃，相对湿度（55±10）%，自来水和锯齿动物标准食物喂养，自由进食。适应实验室环境 1 周后，将未经交配的雌鼠按 2:1 的比例与雄鼠进行过夜配对交配，幼鼠出生第 1 天计作 PND0（postnatal day）。分娩之后，每窝的幼鼠尽可能保持 12 只幼鼠，体质量 0~13 g，活动能力相近，雌雄各半，以保障其在哺乳期能够从母鼠处获得均衡的营养。

1.2 主要仪器及试剂

B[a]P（纯度 99%，购于 Sigma 公司，Lot No.：090M1400V）、植物油；丙二醛（malondialdehyde，MDA）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、Na^+-K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶测定试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。日本 Olympus BX53 型电子显微镜，日立 H-600A 型透射电镜，其他实验试剂均为国产分析纯（由四川医科大学动物实验中心惠赠提供）。

1.3 动物分组及染毒

按照体质量编号取 48 只幼鼠，随机分为 4 组：植物油组（溶剂对照组）、B[a]P 低剂量（0.02 mg/kg）组、B[a]P 中剂量（0.2 mg/kg）组和 B[a]P 高剂量（2 mg/kg）组，每组各 12 只，雌雄各半（染毒剂量选择主要依据环境和食物暴露的剂量，其中 0.02 mg/kg 和 0.2 mg/kg 与食物中摄入 B[a]P 的含量接近，而 2 mg/kg 与 PAHs 污染环境中的含量相似）。

精确称取适量的 B[a]P，溶于植物油，待充分溶解后分别制成原液 A（0.002 mg/ml），原液 B（0.02 mg/ml）和原液 C（0.2 mg/ml），密封避光保存。每天上午 8:00~10:00，染毒组分别按幼鼠体质量以 0.02 mg/kg（取原液 A）、0.2 mg/kg（取原液 B）、2 mg/kg（取原液 C）灌胃给予 B[a]P，溶剂对照组给予等量植物油，连续给予 14 d。

1.4 动物一般情况观察

实验过程中记录动物体质量变化，每日观察饮食、活动等一般情况及神经系统反应。

1.5 神经组织形态

染毒实验结束后，用 0.5%（w/v）戊巴比妥钠轻度麻醉幼鼠后（每只幼鼠腹腔注射 0.5~0.6 ml），用大头针将其固定在泡沫板上，打开胸腔暴露心脏，用 4%（w/v）多聚甲醛 PBS 溶液经心脏进行全身灌注处理。动物死后立即打开颅腔，小心摘取脑组织，并剥离胸段脊髓、坐骨神经等组织，观察上述神经组织的同时剖开胸腔与腹腔观察肺、肝等内脏器官。

1.5.1 HE 染色 将各组幼鼠脑组织修整切削后保留 2 块：1 块为大脑皮质和左侧海马，另 1 块为脑干和小脑，每块大约为 0.25 cm×0.30 cm×0.40 cm，剥取 1 段（约 0.3 cm）胸段脊髓，1 段（约 2 cm，取上段）坐骨神经。进行 HE 染色，光镜观察，方法步骤见参考文献[4-5]。

1.5.2 尼氏体染色 将大脑皮质、左侧海马、小脑、脑干、脊髓与坐骨神经组织石蜡切片 56 ℃ 20 min 烘烤，浸入二甲苯 5 min×2 次，梯度浓度酒精至水，0.4%天竺牡丹水溶液染色 5 min，经 80%酒精分色，镜检虎斑清晰即可终止，脱水、透明、树胶封片，光学显微镜观察。

1.5.3 硝酸银染色 本法为检测坐骨神经髓鞘损伤的特异方法，将各组幼鼠坐骨神经石蜡切片 56 ℃ 20 min 烘烤，浸入二甲苯 5 min×2 次，梯度浓度酒精至水，0.5%硝酸银水溶液 55 ℃反应 15 min，梯度浓度酒精脱水，透明、封片，光学显微镜观察。

1.5.4 成像 将上述方法染色的石蜡切片置于带有视频卡的显微镜下应用 Clipview for Adaptec Videoh 软件直接成像。

1.6 海马组织氧化应激指标的测定

染毒结束后，与前面的切片解剖同时进行，从每组处死的幼鼠中随机选择 6 只用作于本部分以及下面的 ATP 酶活性实验，断头处死大鼠，每组随机处死 6 只，迅速剥离脑组织并分离右侧海马组织，一半组织用 4 ℃预冷的生理氯化钠洗净血液，吸干水分并称重，加 9 倍体积的冰生理盐水，匀浆，4 000 r/min 离心 15 min，取上清液，用 SOD、MDA 试剂盒测定 SOD 活力和 MDA 含量。

1.7 海马组织 ATP 酶活性

将海马组织氧化应激测定实验余下的另一半右侧海马组织，用 Tris 缓冲液冲洗，加入 Tris 缓冲液后在冰浴下匀浆，作为测定样本，分别测定样本的蛋白质浓度、Na^+-K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶活性，测定过程按南京建成生物工程研究所试剂盒说明书进行。

1.8 数据处理

实验数据的处理采用 SPSS 19.0 统计软件，结果以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，多组间比较采用单因素方差分析，方差分析前作正态分布检验和方差齐性检验，符合方差齐性的指标的组间两两比较用 LSD-t 法，不符合方差齐性的指标的组间两两比较用 Dunnett T3 法。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 一般情况

高剂量染毒组于染毒后第 3 日开始，个别幼鼠出现活动能力下降、体质量增长迟缓等情况，随着染毒时间延长，出现以上情况的幼鼠逐渐增多，表现也逐渐明显。染毒第 14 日

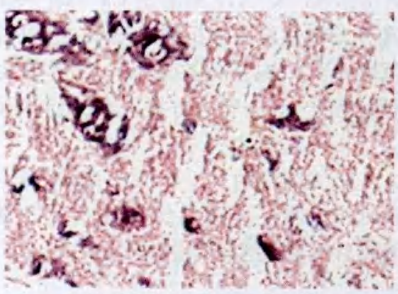
时，高剂量染毒组幼鼠全部出现以上情况。其中 1 只幼鼠于染毒第 14 日死亡，尸体解剖所见肝组织完全液化，肉眼观察呈糊状；脑组织可见软化灶。中剂量染毒组于染毒后第 14 日时有个别幼鼠出现食欲低下、活动能力下降等情况。低剂量染毒组及对照组幼鼠未见明显异常。

2.2 大体解剖观察

高剂量染毒组 12 只幼鼠中除 1 只于染毒后第 14 日死亡外，其余 11 只幼鼠中有 2 只在实验结束解剖时检出肝组织大部分糊状液化，其余未检出肉眼可见的异常。为避免全身毒性继发的神经组织损伤对实验结果的影响，在其余 9 只幼鼠中随机选取 4 只作组织取材用于后续电、光镜观察实验，随机选取 6 只用于 SOD、MDA 和 ATP 酶测量实验。中、低剂量染毒组及对照组幼鼠中未检出肉眼可见的异常，从各组 12 只幼鼠中随机选取 4 只作组织取材用于后续电、光镜观察实验，随机选取 6 只用于氧化应激、ATP 酶活性的测量实验。

2.3 光镜观察

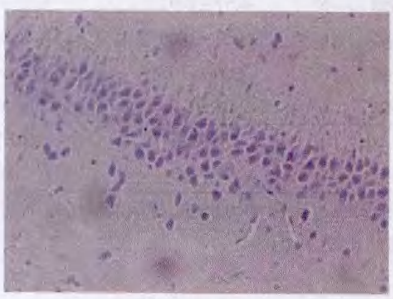
2.3.1 HE 染色 高剂量染毒组幼鼠可见脊髓、大脑皮质、小脑、海马与延脑组织损伤，其中以脊髓损伤最为严重，局部出现组织水肿（图 1），脊髓灰质与白质细胞、大脑皮质锥体层与分子层神经元、小脑颗粒层细胞、海马与延脑神经元均有严重损伤细胞发现（图 2、3），主要表现为胞核畸形、核周及胞浆空泡变性、细胞结构破坏以及细胞轮廓模糊（图 4）。未检出坐骨神经组织明显损伤。



组织肿胀，胞核严重畸形

图 1 高剂量 B[a]P 染毒 SD 幼鼠胸段脊髓（HE，200 ×）

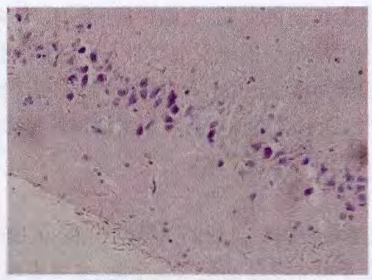
Fig.1 Morphological lesions of the spinal cord tissues in 2 mg/kg dosed B[a]P SD rat（HE，200 ×）



细胞组织正常

图 2 SD 幼鼠海马体细胞组织（HE，200 ×）

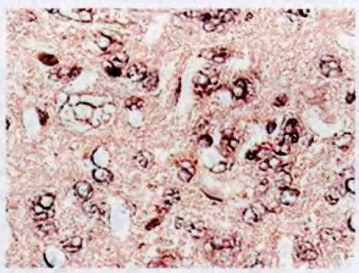
Fig.2 Issues and cells of hippocampus in control group（HE，200 ×）



正常细胞减少，胞核畸形

图 3 高剂量组 SD 幼鼠海马体（HE，200 ×）

Fig.3 Issues and cells of hippocampus in 2mg/kg dosed B[a]P SD rat（HE，200 ×）



胞核畸形，空泡变性

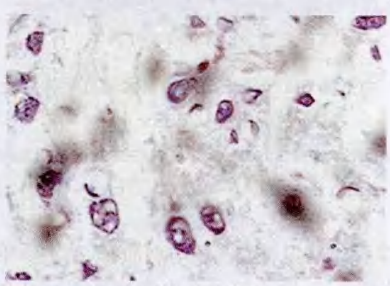
图 4 高剂量 B[a]P 染毒 SD 幼鼠小脑颗粒层细胞（HE，200 ×）

Fig.4 Morphological lesions of the cerebellum granule cells in 2mg/kg dosed B[a]P SD rat（HE，200 ×）

中剂量染毒组幼鼠解剖后在光镜下可见脊髓、大脑皮质、小脑、海马与延脑组织轻微损伤，主要表现为脊髓灰质与白质细胞、大脑皮质锥体层与分子层神经元、小脑颗粒层细胞、海马与延脑神经元细胞核被染为深蓝色、胞浆深红色、出现轻度核周空泡变性等。未检出坐骨神经组织明显损伤。

低剂量染毒组与对照组幼鼠各神经组织未检出明显病理改变。

2.3.2 尼氏体染色 高剂量染毒组幼鼠脊髓、大脑皮质、海马、小脑、延脑等组织的细胞内中检出尼氏体严重空泡变性、尼氏体缩小与减少，其中以脊髓组织的细胞内尼氏体损伤最为明显。未检出坐骨神经组织细胞内尼氏体明显损伤（图5）。



尼氏体空泡变性

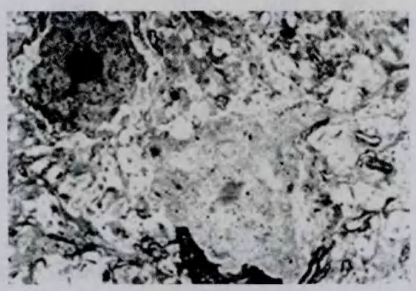
图 5 中剂量 B[a]P 染毒 SD 幼鼠延脑神经元（天竺牡丹染色，200 ×）

Fig.5 Nissl bodies vacuoles degeneration of medulla oblongata neuron in 0.2 mg/kg dosed B[a]P SD rat（Dahlia，200 ×）

中剂量染毒组幼鼠脊髓、大脑皮质、海马、小脑、延脑等组织的细胞内中检出尼氏体空泡变性、尼氏体缩小与减少，但程度较高剂量染毒组轻微。未检出坐骨神经组织细胞内尼氏体明显损伤。低剂量染毒组与对照组幼鼠各神经组织细胞内尼氏体未检出明显损伤。

2.4　电镜观察

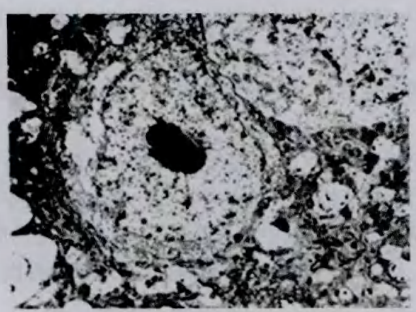
高、中剂量染毒组幼鼠脊髓灰质与白质、大脑皮质锥体层在电镜视野下可见零散的受损伤细胞，主要表现为胞核变形及界限不清，核仁固缩，染色质小团块，核周及胞浆较大空泡变性，细胞器坏死（图 6）。其余大脑皮质分子层、小脑颗粒层、脑干等处可见零星的中轻度损伤细胞，主要表现为核周及胞浆较小空泡变性，内质网高度扩张、线粒体肿胀、胞浆界限不清等（图 7）。



核仁浓缩，胞浆结构破坏

图 6　中剂量 B[a]P 染毒 SD 幼鼠胸段脊髓神经元（透射电镜，4 000 ×）

Fig.6　Electron micrograph of the spinal cord neuron in 0.2 mg/kg dosed B[a]P SD rat（TEM，4 000 ×）



核仁浓缩，核周空泡变性

图 7　中剂量 B[a]P 染毒 SD 幼鼠大脑皮质神经元（透射电镜，4 000 ×）

Fig.7　Electron micrograph of the cerebral cortex neuron in 0.2 mg/kg dosed B[a]P SD rat（TEM，4 000 ×）

低剂量染毒组幼鼠脊髓灰质与白质、大脑皮质锥体层与分子层、小脑颗粒层、脑干等处在电镜视野下可见个别的损伤细胞，主要表现为核周及胞浆较小空泡变性，内质网高度扩张。

溶剂对照及空白对照组幼鼠各神经组织未检出明显的细胞与亚细胞结构损伤。

2.5　B[a]P 对大鼠海马组织氧化应激的影响

通过对指标 SOD、MDA 正态检验和方差齐性检验分析结果显示：2 个指标的正态性检验 P 值均大于 0.05，符合正态分布。方差齐性检验中 $P_{SOD}>0.05$，符合方差齐性，组间两两比较用 LSD-t 法；$P_{MDA}<0.05$，不符合方差齐性，组间两两比较用 Dunnett T3 法。

由表 1 可见：染毒组 SOD 的活力明显低于对照组，MDA 含量明显高于对照组（$P<0.05$）；染毒各组 SOD 的活力随染毒剂量的增加而减少，MDA 含量随染毒剂量的增加而增加（$P<0.05$）。

表 1　各组大鼠氧化应激指标（$\bar{x}\pm s$）

Tab.1　Effects of B[a]P on the oxidative stress（$\bar{x}\pm s$）

组别	动物（只）	SOD（U/mgprot）	MDA（nmol/mgprot）
溶剂对照组	6	41.41 ± 3.02	7.29 ± 2.49
0.02 mg/kg 组	6	34.45 ± 3.31[a]	14.21 ± 2.28[a]
0.2 mg/kg 组	6	24.96 ± 1.41[ab]	15.60 ± 1.96[a]
2 mg/kg 组	6	16.45 ± 1.80[abc]	20.49 ± 6.39[a]
F 值		49.070	10.320
P 值		0.000	0.000

注：a，与溶剂对照组比较，$P<0.05$；b，与低剂量组溶剂比较，$P<0.05$；c，与中剂量组比较，$P<0.05$

2.6　B[a]P 对大鼠海马 ATP 酶的影响

通过对指标 Na^+-K^+-ATP 酶活性、Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶活性正态检验和方差齐性检验分析结果显示：2 个指标的正态性检验 P 值均大于 0.05，符合正态分布。方差齐性检验中 2 个指标 P 值均大于 0.05，符合方差齐性，组间两两比较用 LSD-t 法。

由表 2 可见：染毒组的 Na^+-K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶活性明显低于对照组；染毒各组 Na^+-K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶活性随染毒剂量的增加而减少（$P<0.05$）。

表 2　B[a]P 对大鼠海马 ATP 酶的影响（$\bar{x}\pm s$）

Tab.2　Effects of B[a]P on ATPase in the hippocampus（$\bar{x}\pm s$）

组别	动物（只）	Na^+-K^+-ATP 酶活性（umolPi·mgprot^{-1}·h^{-1}）	Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶活性（umolPi·mgprot^{-1}·h^{-1}）
溶剂对照组	6	4.57 ± 0.97	6.02 ± 1.13
0.02 mg/kg 组	6	3.27 ± 0.69[a]	4.56 ± 1.51[a]
0.2 mg/kg 组	6	2.80 ± 0.73[a]	4.39 ± 0.91[a]
2 mg/kg 组	6	2.03 ± 0.44[ab]	2.55 ± 0.58[abc]
F 值		12.710	10.190
P 值		0.000	0.000

注：a，与溶剂对照组比较，$P<0.05$；b，与低剂量组溶剂比较，$P<0.05$；c，与中剂量组比较，$P<0.05$

3　讨　论

B[a]P 是一类亲脂性化学物质，容易聚集在含脂

质成分较多的神经组织中，B[a]P 及其代谢物极易透过血脑屏障进入中枢神经组织，对中枢神经系统有一定的影响[6]。ATSDR 组织 1995 年的报告显示，大气中 B[a]P 含量分别为 4 mg/m³，食物中的 B[a]P 的含量区间为 0.002~0.9 mg/kg，环境污染较重的地区其 B[a]P 的含量可达 2~4 mg/kg[7]。目前已有文献研究，分别采用急性、亚急性染毒模型对成年大小鼠的 B[a]P 神经行为毒性做了一些研究，其剂量的选择均与作者所选剂量相近，均符合环境毒理学的剂量选择的基本原则[8-10]。

已为多个研究结果证明，神经系统的发育期长，可以从胚胎早期延续至出生后，大鼠在出生后脑组织（神经细胞、海马颗粒细胞、突触、髓鞘等）仍处于发育阶段，即处于毒作用的敏感期[11-13]。本文选择新生 SD 幼鼠的 B[a]P 染毒模型为 B[a]P 神经发育毒性的研究对象，既符合以往的研究，又具有一定的创新性。研究所选择的染毒时间从出生后第 5 天至第 20 天止，这个过程均是 SD 大鼠神经元、突触及髓鞘形成的时期，也是其 B[a]P 暴露的特异敏感时期。

研究显示，大脑内氧自由基的过量生成与神经毒性的产生密切相关[14]。氧自由基可在脑组织中引起细胞和细胞膜上不饱和脂肪酸的过氧化和破坏，从而导致学习记忆能力等神经生理功能的降低，诱发神经毒性[15]。值得注意的是，脑组织在遭受氧化损伤后，利用抗氧化剂能有效降低脂质过氧化水平，改善和恢复神经功能[16]，充分表明氧化应激是 B[a]P 诱发神经毒性的关键机制之一。海马是脑边缘系统的重要结构，也是多种高级神经活动发生的主要部位。本研究结果发现，出生后急性 B[a]P 染毒可导致海马组织抗氧化酶 SOD 活性的降低及脂质过氧化产物 MDA 的含量升高，提示 B[a]P 暴露能引起脑组织中氧自由基的过量堆积，破坏氧化-抗氧化系统的平衡，进而引起神经元的脂质过氧化反应，诱发氧化损伤，呈现明显的神经发育毒性。

Na^+-K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶活性是体内反映 Ca^{2+} 代谢及功能作用的重要指标。当 Na^+-K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶活性降低时，胞浆游离 Ca^{2+} 可出现急剧升高，引发 Ca^{2+} 超载；重要的是，细胞内 Ca^{2+} 浓度的增加，还可在膜内侧与 Mg^{2+} 竞争结合位点，抑制 Na^+-K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶的活性，引起 Ca^{2+} 依赖性生理生化反应超常运转，促使 ATP 耗竭，线粒体破坏，产生大量自由基，加重氧化损伤[17]。本研究结果显示，B[a]P 染毒后幼鼠海马组织 Na^+-K^+-ATP 酶和 Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶活性显著降低，表明 B[a]P 可在一定程度上促使胞浆内 Ca^{2+} 发生超载，引起神经元产生大量的自由基，同时也能够导致机体清除氧自由基的酶活性下降，进而加剧海马组织内大量自由基的堆积。

综上所述，本研究结果提示 B[a]P 染毒可导致神经发育毒性，主表现为染毒后幼鼠的活动能力下降、体质量增长迟缓，脑组织超微病理学改变，引起海马组织 Na^+-K^+-ATP 酶、Ca^{2+}-Mg^{2+}-ATP 酶和 SOD 酶活性降低及 MDA 含量的升高。

参 考 文 献

[1] Edwards SC, Jedrychowski W, Butscher M, et al. Prenatal exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons and children's intelligence at 5 years of age in a prospective cohort study in Poland[J]. Environ Health Perspect, 2010, 118(9): 1326-1331.

[2] Chen CZ, Tang Y, Jiang XY, et al. Early postnatal benzo(a)pyrene exposure in Sprague-Dawley rats causes persistent neurobehavioral impairments that emerge postnatally and continue into adolescence and adulthood[J]. Toxicol Sci, 2012, 125(1): 248-261.

[3] Choi H, Perera F, Pac A, et al. Estimating individual-level exposure to airborne polycyclic aromatic hydrocarbons throughout the gestational period based on personal, indoor, and outdoor monitoring[J]. Environ Health Perspect, 2008, 116(11): 1509-1518.

[4] 王 巧. HE 染色方法在临床病理诊断中的应用[J]. 临床合理用药, 2014, 7(11): 118-119.

[5] 张献彩, 张 雷. 糖尿病小鼠小肠黏膜扫描电镜的观察[J]. 重庆医学, 2011, 40(28): 2815-2817.

[6] 聂继盛, 赵 捷, 王 静, 等. 侧脑室重复注射苯并芘致大鼠海马细胞病理学改变和细胞凋亡的研究[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2009, 27(1): 40-43.

[7] Boström CE, Gerde P, Hanberg A, et al. Cancer risk assessment, indicators, and guidelines for polycyclic aromatic hydrocarbons in the ambient air[J]. Environ Health Perspect, 2002, 110(s3): 451-488.

[8] Saunders CR, Das SK, Ramesh A, et al. Benzo(a)pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: role of oxidative stress[J]. J Appl Toxicol, 2006(26): 427- 438.

[9] Grova N, Valley A, Turner JD, et al., Modulation of behavior and NMDA-R1 gene mRNA expression in adult female mice after sub-acute administration of benzo(a)pyrene[J]. Neurotoxicology, 2007, 28(3): 630-636.

[10] Brown LA, Khousbouei H, Goodwin JS, et al. Down-regulation of early ionotrophic glutamate receptor subunit developmental expression as a mechanism for observed plasticity deficits following gestational ex-

神经病学

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000784

吡咯烷二硫代氨基甲酸对大鼠脑缺血后神经功能的影响

杨瀚杰，李光勤，陈　帅，吴　远，沈　雪，刘蜀东，胡万群
（重庆医科大学附属第一医院神经内科，重庆　400016）

【摘　要】目的：观察核因子-κB p50(nuclear factor-κB subunit p50，NF-κB p50)特异性抑制剂吡咯烷二硫代氨基甲酸(pyrrolidine dithiocarbamate，PDTC)抑制 NF-κB p50 后，炎症因子 TNF-α 及相关康复蛋白 Reelin、突触素、Lingo-1 表达的变化，进一步观察大鼠神经功能评分、海马神经细胞形态的变化。**方法**：本实验的研究对象为雄性健康 SD 大鼠，随机分为 3 组：假手术组(S 组，n=6)、缺血组(I 组，n=18)、PDTC 干预组(P 组，n=18)。脑缺血模型采用永久性 MCAO 法。P 组的大鼠在造模后 30 min 进行腹腔注射 PDTC(100 mg/kg)，每天 1 次。S 组大鼠于第 3 天处死，I 组和 P 组大鼠分别于 1、3、7 d 处死。用 Longa 评分对 3 组大鼠进行神经功能损害程度进行评估，用 Western blot 检测大鼠缺血海马 NF-κB p50、TNF-α、Reelin、突触素蛋白的表达，用 HE 染色方法观察 3 组大鼠海马神经元细胞的形态，用免疫组化法检测 Lingo-1 在脑组织内的表达情况。**结果**：①P 组及 I 组大鼠Longa 评分较 S 组均有所升高，术后第 1 天和第 3 天 P 组较 I 组 Longa 评分降低，但无统计学意义(P>0.05)；在术后第 7 天，P 组较 I 组显著降低(P<0.05)。②I 组大鼠海马神经细胞出现异常，而 P 组大鼠中，海马神经元细胞的结构基本保持正常。③术后 1、3 天，I 组和 P 组大鼠缺血海马中 NF-κB p50 较 S 组升高(P<0.05)，但 P 组 NF-κB p50 表达较 I 组降低(P<0.05)；术后 7 天，3 组变化无统计学意义。④术后 1、3、7 天，I 组和 P 组大鼠 TNF-α 表达较 S 组升高，但 P 组 TNF-α 较 I 组降低(P<0.05)；⑤术后第 1、3 天，P 组大鼠缺血海马中突触素和 Reelin 蛋白的表达明显高于 I 组(P<0.05)，第 7 天两组差别无统计学意义(P>0.05)。S 组大鼠脑组织内可见少量 Lingo-1 阳性细胞表达，P 组大鼠脑组织内 Lingo-1 阳性细胞数在第 7 天时明显低于 I 组。**结论**：PDTC 可改善神经功能，维持海马神经元正常形态，这可能与其抑制 NF-κB p50 表达，减少 TNF-α 等相关炎症因子生成及调节 Reelin、突触素及 Lingo-1 表达有关。

【关键词】吡咯烷二硫代氨基甲酸；脑缺血；神经功能；核因子-κB p50；康复蛋白
【中图分类号】R743.3　　**【文献标志码】**A　　**【收稿日期】**2015-05-30

作者介绍：杨瀚杰，Email：6522275@qq.com，
研究方向：脑血管疾病。
通信作者：李光勤，Email：liguangqin@tom.com。
基金项目：重庆市教委资助项目(编号：KJ130306)；重庆市渝中区科委资助项目(编号：20130140)；卫计委国家临床重点专科建设资金资助项目(卫办医政函【2012】649 号)。
优先出版：http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20151015.2053.002.html (2015-10-15)

posure to benzo(a)pyrene[J].Neurotoxicology，2007，28(5)：965-978.
[11] Sunde N，Laurberg S，Zimmer J，et al.Brain grafts can restore irradiation-damaged neuronal connections in newborn rats[J].Nature，1984，310(5972)：51-53.
[12] Basarsky TA，Parpura V，Haydon PG.Hippocampal synaptogenesis in cell culture：developmental time course of synapse formation，calcium influx，and synaptic protein distribution[J]J Neurosci，1994，14(1)：6402-6411.
[13] Abrahám H，Vincze A，Jewgenow I，et al.Myelination in the human hippocampal formation from midgestation to adulthood[J].Int J Dev Neurosci，2010，28(5)：401-410.
[14] Huang TT.Redox balance- and radiation-mediated alteration in hippocampal neurogenesis[J].Free Radic Res，2012，46(8)：951-958.
[15] Tarkowski E，Ringqvist A，Blennow K，et al.Intrathecal release of nitric oxide in Alzheimer's disease and vascular dementia[J].Dement Geriatr Cogn Disord，2000，11(6)：322-326.
[16] Row BW，Liu R，Xu W，et al.Intermittent hypoxia is associated with oxidative stress and spatial learning deficits in the rat[J].Am J Respir Crit Care Med，2003，167(11)：1548-1553.
[17] Crnkovic S，Riederer M，Lechleitner M，et al.Docosahexaenoic acid-induced unfolded protein response，cell cycle arrest，and apoptosis in vascular smooth muscle cells are triggered by Ca^{2+}-dependent induction of oxidative stress[J].Free Radic Bio Med，2012，52(9)：1786-1795.

（责任编辑：关蕴良）