

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.03.006
网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190114.1302.032.html(2019-01-14)

环境浓度壬基酚暴露对大鼠焦虑行为及其海马组织形态的影响^{*}

严文霞,徐卫红,陈旭,杨静,罗娅,俞捷,许洁[△]
(遵义医学院公共卫生学院,贵州遵义 563000)

[摘要] **目的** 探索环境浓度壬基酚(NP)暴露对大鼠焦虑行为及海马的影响。**方法** 选取 SD 大鼠雌雄各 20 只,分为对照组(C 组,玉米油)、低 NP 剂量(L 组)、中 NP 剂量(M 组)、高 NP 剂量(H 组),每组 10 只,NP 暴露剂量为 0、0.02、0.20、2.00 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,持续 90 d 后做高架十字迷宫和旷场实验,结束后取海马做 HE 染色和电镜。**结果** 和 C 组比较,M、H 组大鼠在开放臂停留时间缩短($P<0.05$),在闭合臂停留时间缩短($P<0.05$)。和 C 组相比,H 组在中央区停留时间缩短($P<0.05$),在中央区停留时间百分比降低($P<0.05$),M、H 组在中央区运动距离缩短($P<0.05$)。HE 染色观察海马 CA1 区发现:与 C 组相比,M 组锥体细胞减少,组织疏松有少量空泡,H 组神经元数量明显减少,细胞排列紊乱,神经元颗粒空泡变性,核溶解固缩。电镜观察海马 CA1 区显示:与 C 组对比,M 组海马组织内空泡增多,神经元轻微空泡变性,线粒体肿胀,H 组海马神经元间界限模糊,髓鞘溶解,胞体固缩,线粒体肿胀变性,出现空泡。**结论** 0.20 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ NP 暴露可使大鼠出现焦虑行为,2.00 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ NP 暴露可能通过损伤大鼠海马组织结构导致大鼠焦虑行为。

[关键词] 焦虑;壬基酚;大鼠;海马
[中图法分类号] R124 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)03-0382-04

Effects of environmental concentration of nonylphenol on anxiety behavior
and hippocampus histomorphology in rats^{*}

YAN Wenxia ,XU Weihong ,CHEN Xu ,YANG Jing ,LUO Ya ,YU Jie ,XU Jie[△]
(School of Public Health ,Zunyi Medical College ,Zunyi,Guizhou 563000 ,China)

[Abstract] **Objective** To explore the effects of environmental concentration of nonylphenol (NP) exposure on anxiety behavior and hippocampus in rats. **Methods** Each 20 male and female SD rats were selected and divided into the control group (group C, corn oil), and high (group H) low NP dose group (group L), middle NP dose group (group M) and high NP dose group (group H), 10 cases in each group. The NP exposure doses were 0, 0.02, 0.20, 2.00 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$. After continuous 90 d, the elevated cross plus maze (EPM) and open field test (OFT) were taken. After end, the hippocampus was taken for conducting the HE staining and electron microscopic examinations. **Results** Compared with the group C, the open arm time in the group M and H was shortened, while the closed arm time was extended ($P<0.05$). Compared with the group C, the standing time at the central area in the group H group was decreased ($P<0.05$), the percentage of standing time at the central area was decreased ($P<0.05$) and the movement distance at the central area in the group M and H was shortened ($P<0.05$). The HE staining observing the hippocampus CAI area found that compared with the group C, the pyramidal cells in the group M were decreased with loose tissue and a few vacuoles, and the number of neurons in the group H was significantly decreased with disordered cell arrangement, the neuron particle vacuole denaturation, the nucleus dissolves, karyolysis and pyknosis. The electronic microscope observing the hippocampus CAI area showed that compared with the group C, the vacuoles of the hippocampus tissue in the group M were increased with slight neuron vacuolar degeneration, mitochondrial swelling, the group H showed the blurred boundary between hippocampal neurons, the cell body contraction, mitochondria swelling and degeneration and vacuoles appearance. **Conclusion** 0.20 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ NP exposure can induce the anxiety behavior in rats, and 2.00 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ NP exposure might lead to the anxiety behavior

^{*} **基金项目:**国家自然科学基金资助项目(81560527,81760580);国家大学生创新创业项目基金(201710661020);贵州省优秀青年基金(黔科合平台人才[2017]5612);贵州省科技厅重点项目(2018-1429,2019);贵州省卫计委科学技术基金项目(gzwjkj2016-1-045,gzwjkj2017-1-053);遵义市 15851 人才项目(2019);遵义医学院重点学科建设经费项目(201501);遵义医学院大学生创新基金(20163718,2018-43)。 **作者简介:**严文霞(1998—),在读本科,主要从事卫生毒理学方面的研究。 [△] **通信作者,**E-mail: xujie360@sina.com。

in rats by damaging the hippocampal tissue structure.

[Key words] anxiety; nonylphenol; rat; hippocampus

大量国内外研究发现,环境因素与焦虑行为的产生密切相关^[1-2]。壬基酚(NP)是联合国环境保护署认定的需优先控制的持久毒性污染物之一^[3],也被《加拿大环境保护法》列为第二大优先控制污染物。但 NP 被广泛应用于非离子表面活性剂、农药、洗涤剂、增塑剂、润滑剂等工业与生活用品^[4],可通过食物链长期蓄积体内^[5-6],从而干扰机体神经内分泌系统、生殖系统与免疫等系统^[7-9]。目前,有研究表明 NP 暴露会使具有神经内分泌调节作用的激素水平产生变化从而影响机体情绪^[10-11]。同时,也有研究发现,NP 暴露会影响大鼠脑组织的正常能量代谢,改变神经递质浓度,抑制神经受体活性、MAO 酶活性,以致大鼠神经元生长发育异常,出现兴奋、焦躁现象后转为精神萎靡^[12-14]。鉴于 NP 是典型的环境内分泌干扰物,本文对环境浓度 NP 暴露能否引起大鼠焦虑行为进行研究,现将研究结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂及器材 NP(纯度大于 99%)购自东京化成株式会社;4%多聚甲醛由遵义医学院提供;高架十字迷宫(型号:XR-XG201)、旷场行为观测箱(型号:XR-XZ301)购自上海欣软信息科技有限公司;电子显微镜 JME-1400 购自日本电子株式会社;普通光学/荧光显微成像系统购自德国徕卡公司。

1.1.2 实验动物及分组 SPF 级 SD 雌雄大鼠各 20 只,体质量(200±10)g,由陆军军医大学实验动物中心提供[许可证号:SCXK(渝)2012-0005]。大鼠自由饮水,动物室按自然节律采光,单笼单只适应性喂养 1 周后分为对照组(C 组)、NP 低剂量组(L 组)、NP 中剂量组(M 组)、NP 高剂量组(H 组),分别进行浓度为 0、0.02、0.20、2.00 μg·kg⁻¹·d⁻¹,体积为 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹的 NP 染毒灌胃,灌胃时间为每天早上 8:00—9:00,C 组灌玉米油。喂养条件:温度 22~25℃,相对湿度(40±5)%,昼夜交替各 12 h。

1.2 方法

1.2.1 高架十字迷宫行为检测 大鼠持续暴露于 NP 90 d 后进行高架十字迷宫实验,实验开始时将大鼠从中央格面向闭合臂轻放入行为检测仪,观察并记录大鼠 360 s 内活动情况。为防气味干扰,每只大鼠检测后均用 75%乙醇消毒,洁净纱布抹干,避免产生偶然误差,影响实验结果。记录指标:进入开放臂次数及停留时间,进入闭合臂次数及停留时间。

1.2.2 旷场实验行为检测 高架十字迷宫行为检测结束后进行旷场实验行为检测,实验开始时将小鼠背对操作者轻放入旷场中央,随后观察并记录大鼠 360 s 内活动情况,每只动物实验结束后均用 75%乙醇消毒

箱底部,洁净纱布抹干,避免产生偶然误差影响实验结果。记录指标:中央区停留时间、中央区运动距离、中央区停留时间百分比。

1.2.3 HE 染色观察海马 CA1 区神经元细胞 在遵义医学院附属医院病理科进行包埋、切片染色,在普通光学/荧光显微成像系统下观察海马神经元改变并拍照。

1.2.4 电镜观察海马 CA1 区突触超微结构改变 待行为学检测结束,将 SD 大鼠用 4%多聚甲醛经左心室灌注固定脑组织,取海马 1 mm³的组织块,进行包埋、切片及染色处理,在电镜下观察海马突触超微结构并拍照记录。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 软件进行数据分析,计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析,检验水准 $\alpha=0.05$,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高架十字迷宫检测 NP 各组在闭合臂停留时间随 NP 剂量升高而延长,但在开放臂停留时间无明显规律。与 C 组比较,M、H 组在开放臂的停留时间明显缩短,在闭合臂的停留时间明显增长,差异有统计学意义($P<0.05$)。各组开放臂和闭合臂进入次数比较差异无统计学意义($P>0.05$),见表 1。

表 1 各组高架十字迷宫检测数据比较($\bar{x} \pm s$)

组别	开放臂 进入次数	开放臂 停留时间(s)	闭合臂 进入次数	闭合臂 停留时间(s)
C 组	1.70±14.84	84.41±52.61	7.70±4.99	176.52±72.53
L 组	5.33±4.84	45.77±50.07	7.33±3.70	226.92±64.29
M 组	4.11±2.14	31.60±23.82 ^a	7.89±4.19	249.50±30.92 ^a
H 组	3.00±2.66	41.96±38.05 ^a	5.60±3.53	241.68±46.31 ^a
F	1.278	6.286	0.621	3.330
P	0.298	0.053	0.606	0.031

^a: $P<0.05$,与 C 组比较

表 2 各组旷场行为检测数据比较($\bar{x} \pm s$)

组别	中央区停留 时间(s)	中央区运动 距离(cm)	中央区停留 时间百分比(%)
C 组	569.82±29.59	5 945.90±2 380.55	94.99±4.93
L 组	571.96±29.04	5 551.84±1 969.74	95.33±4.83
M 组	562.91±73.69	3 647.20±1 606.80 ^a	93.82±12.27
H 组	439.00±203.93 ^a	2 773.29±2 493.62 ^a	73.16±33.96 ^a
F	3.090	4.533	3.098
P	0.041	0.009	0.041

^a: $P<0.05$,与 C 组比较

2.2 旷场行为检测 NP 各组反复运动的移动距离随 NP 剂量升高逐渐缩小,中央区停留时间逐渐缩短。

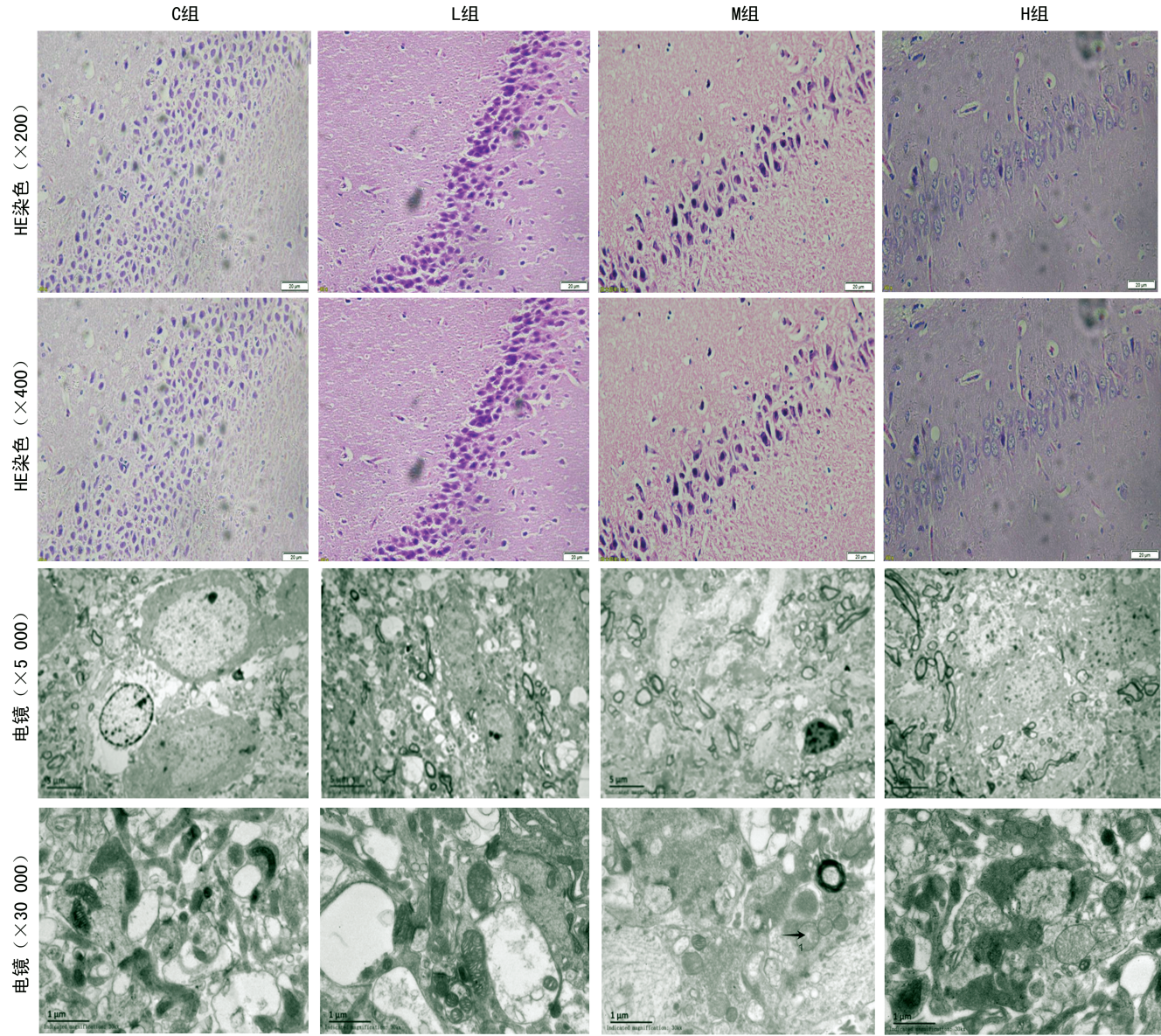


图 1 海马 HE 染色与电镜照片

与 C 组相比,H 组在中央区停留时间明显缩短,在中央区停留时间百分比明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$);M、H 组较于 C 组,中央区运动距离均缩短,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 2。

2.3 HE 染色观察海马 CA1 区神经元改变 C 组大鼠海马组织细胞层厚,细胞密度大,排列整齐、紧密;与 C 组相比,L 组细胞排列、数目无明显异常;M 组锥体细胞减少,细胞周围组织疏松,出现少量空泡;H 组细胞排列紊乱,锥体细胞大量缺失,细胞核出现溶解、固缩、消失现象,细胞肿胀发生空泡颗粒变性现象,见图 1。

2.4 电镜观察海马 CA1 区突触超微结构改变 C 组海马神经元线粒体、内质网等细胞器结构清晰,髓鞘清晰,细胞核明显,形态正常;与 C 组相比,L 组海马神经元和线粒体结构无明显改变;M 组海马神经元轻微空泡变性,线粒体内部结构异常,发生肿胀,海马组织内空泡增多;H 组髓鞘发生溶解,线粒体明显肿胀,

内部结构模糊不清,发生空泡变性,见图 1。

3 讨 论

高架十字迷宫行为学实验是探讨焦虑行为的经典实验,其利用大鼠对新奇环境的探究特性与对高悬敞开臂的恐惧心理形成矛盾行为,对开放臂的探究心理及对封闭臂的逃避心理使大鼠发生“探究-回避”的冲突行为进而导致其焦虑状态^[15],对比 C 组,M、H 组大鼠进入开放臂的停留时间均明显缩短,进入闭合臂的停留时间均明显增长。旷场行为实验是用以考察大鼠自主活动和探究行为的典型实验,大鼠在中央区的停留时间增长代表其对新环境的认知能力变差,在中央区的移动距离缩短、速度变慢暗示其神经兴奋受到抑制^[16],对比 C 组,H 组在中央区停留时间增长,M、H 组在中央区运动距离明显缩短,H 剂量组在中央区停留时间百分比降低。以上两种行为学实验结果,提示 $0.20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ NP 暴露可使大鼠出现焦虑行为。研究显示,大鼠情绪、神经性行为 and 空间学习

记忆等活动主要由海马 CA1 区调控完成^[17],海马神经细胞丢失、神经树突萎缩与突触点减少,可通过影响海马在 HPA 轴反馈抑制导致焦虑症^[18],电镜和 HE 染色观察海马 CA1 区发现,2.00 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ NP 暴露即可使海马神经元形态结构出现明显病理改变,线粒体发生严重损伤,综上认为 2.00 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ NP 暴露可通过损伤大鼠海马神经元使大鼠出现焦虑行为。鉴于 NP 是类雌激素性的典型环境内分泌干扰物^[19],环境剂量 NP 暴露使大鼠出现焦虑行为的具体机制还需深入研究,可进一步实验检测环境剂量 NP 暴露是否改变大鼠睾酮、雌激素水平、性激素相应受体活性或是影响 5-羟色胺、多巴胺等神经递质水平及其相应受体活性,并进行行为学实验统计分析大鼠是否出现焦虑行为,从而探讨环境剂量 NP 暴露是否会通过干扰大鼠体内性激素水平、神经递质水平及其相应受体活性从而致使大鼠出现焦虑行为。另外,环境剂量 NP 暴露是否与人群出现焦虑行为有必然联系还需检测焦虑人群的血清、尿液中 NP 水平,并与其焦虑、抑郁行为做相关分析,开展进一步的流行病学调查,以明确环境剂量 NP 暴露是否能导致人群出现焦虑、抑郁行为和其作用途径和方式。

参考文献

- [1] HARLEY K G, GUNIER R B, KOGUT K, et al. Prenatal and early childhood bisphenol A concentrations and behavior in school-aged children[J]. *Environ Res*, 2013, 126 (7):43-50.
- [2] ROEN E L, WANG Y, CALAFAT A M, et al. Bisphenol A exposure and behavioral problems among inner city children at 7-9 years of age[J]. *Environ Res*, 2015, 142 (10):739-745.
- [3] 陈慰双. 我国水环境中壬基酚的污染现状及生态风险评估[D]. 青岛:中国海洋大学,2013.
- [4] 戴智勇,莫红卫,彭喜洋,等. 壬基酚在食品和食品包装材料中暴露及迁移至食品的情况综述[J]. *农产品加工*, 2017, 16(1):81-87.
- [5] 孙凯峰,孙东,禁世斌,等. 壬基酚对浮游生物的毒性效应及其食物链传递研究[J]. *中国环境科学*, 2016, 36(12): 3816-3823.
- [6] 王建霞,李林锋,赵文博,等. 壬基酚对中华新米虾几种生化指标的影响[J]. *河北渔业*, 2017, 45(3):27-28.
- [7] SHIRDEL I, KALBASSI M R. Effects of nonylphenol on key hormonal balances and histopathology of the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) [J].

Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2016(183/184):28-35.

- [8] PENG F L, JI WEN L, ZHU F, et al. A study on phthalate metabolites, bisphenol A and nonylphenol in the urine of Chinese women with unexplained recurrent spontaneous abortion[J]. *Environ Res*, 2016(150):622-628.
- [9] DUAN P, HU C H, QUAN C, et al. 4-Nonylphenol induces apoptosis, autophagy and necrosis in sertoli cells; involvement of ROS-mediated AMPK/AKT-mTOR and JNK pathways[J]. *Toxicology*, 2016(341/343):28-40.
- [10] 杨雪松,杨静,许洁. 环境内分泌干扰物与代谢综合征关系研究进展[J]. *实用预防医学*, 2016, 23(2):247-249.
- [11] XIA J, NIU C, PEI X. Effects of chronic exposure to nonylphenol on locomotor activity and social behavior in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *J Environ Sci*, 2010, 22(9):1435-1440.
- [12] JIE Y, PAN W, WENXIA Y, et al. The effects of gestational and lactational exposure to Nonylphenol on c-jun, and c-fos expression and learning and memory in hippocampus of male F1rat[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2017, 20 (4):386-391.
- [13] JIE Y, XUEFENG Y, MENGXUE Y, et al. Mechanism of nonylphenol-induced neurotoxicity in F1 rats during sexual maturity [J]. *Wien Klin Wochenschr*, 2016, 128 (11/12):426-434.
- [14] 赖玉婷,欧阳俊彦,郭佑廷,等. 壬基酚对大鼠 5-羟色胺分解代谢通路的影响[J]. *中国环境科学*, 2014, 34(9):2408-2412.
- [15] WALF A A, FRYE C A. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents [J]. *Nat Protoc*, 2007, 2(2):322-328.
- [16] 孙世光. 基于“行为组学”模式焦虑动物模型评价技术体系构建[D]. 济南:山东中医药大学,2016.
- [17] KONDO H, KURAHASHI M, MORI D, et al. Hippocampus-dependent spatial memory impairment due to molar tooth loss is ameliorated by an enriched environment [J]. *Arch Oral Biol*, 2015(61):1-7.
- [18] DIAS G P, BEVILAQUA M C, DA LUZ A C, et al. Hippocampal biomarkers of fear memory in an animal model of generalized anxiety disorder[J]. *Behav Brain Res*, 2014 (263):34-45.
- [19] 徐成斌,董文灵,董兴,等. NP 的微生物降解研究[J]. *环境科学与管理*, 2017, 42(3):43-46.

(收稿日期:2018-07-22 修回日期:2018-10-07)