

胚胎期暴露 DEHP 对子代大鼠神经行为的影响

潘亮^{1,2}, 于涛¹, 刘艳华¹, 肖莎¹, 李丹丹¹, 遯晓波¹

(1. 中国医科大学公共卫生学院卫生毒理教研室, 辽宁 沈阳 110001; 2. 沈阳市第九人民医院, 辽宁 沈阳 110024)

摘要: 目的 通过邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)胚胎期暴露,评价其对子代大鼠神经行为的影响,初步探讨DEHP所致子鼠神经毒性的机制。方法 雌性Wistar大鼠从妊娠日起用10、100、500 mg/(kg·d) DEHP连续灌胃染毒19 d,观察子代大鼠的神经行为学指标。于子鼠出生第7天和第21天测定海马神经细胞凋亡率,不同剂量的DEHP染毒对海马组织 bcl-2、bax 基因的表达式的影响。结果 于子鼠出生6周后,进行水迷宫测试。结果显示,随着DEHP剂量增加,中、高剂量组错误次数增加和潜伏期延长十分明显($F=8.058, P<0.05$; $F=11.221, P<0.05$)。电穿梭测试显示,中、高剂量组电击次数增加和主动逃避时间延长较为明显($F=6.984, P<0.05$; $F=9.841, P<0.05$)。出生后7 d子代大鼠海马神经元的细胞凋亡率高于出生21 d,高剂量组尤为显著。RT-PCR检测表明,与对照组相比, bcl-2 和 bax 基因表达增高($F=253.78, P<0.05$; $F=66.67, P<0.05$),且随着DEHP暴露剂量的升高,表达亦增加。结论 DEHP对子代大鼠神经系统具有明显的毒性作用,存在着剂量-反应关系,其可能通过干扰 bcl-2 和 bax 基因的表达而影响子代大鼠神经系统发育。

关键词: 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP); 神经行为学; 细胞凋亡; bcl-2; bax

中图分类号: R114 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2012)02-0097-03

Effect of embryonic exposure to DEHP on nervous behavior of offspring rats

PAN Liang^{*}, YU Tao, LIU Yan-hua, XIAO Sha, LI Dan-dan, LU Xiao-bo

(* . Department of Hygiene Toxicology, School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: **Objective** The purpose of this study is to observe the effect of embryonic exposure to DEHP on nervous behavior in offspring rats, and explore the primary mechanism of neurotoxicity induced by DEHP. **Methods** The mature female Wistar rats were consecutively lavaged with 10 mg/(kg·d), 100 mg/(kg·d) and 500 mg/(kg·d) of DEHP respectively from the first day until the 19th day of pregnancy, and observation was made on the nervous behavior of offspring rats. The apoptosis rates in hippocampus of the offspring rats at the 7th and 21st postnatal day (PND) were detected respectively by flow cytometer (FCM). Meantime, the influence of different doses of DEHP on gene expression of bcl-2 and bax were also analysed. **Results** The water maze test showed that both false time and latency were increased in DEHP groups and was dose-dependent, especially in the 100 mg/(kg·d) and 500 mg/(kg·d) groups ($F=8.058, P<0.05$; $F=11.221, P<0.05$). Meanwhile, electricity shuttled test also showed that both shocked time and active elusion time were increased in DEHP groups, especially 100 mg/(kg·d) and 500 mg/(kg·d) groups ($F=6.984, P<0.05$; $F=9.841, P<0.05$). While the apoptosis rate in hippocampus of PND7 was higher than that of PND21, especially in 500 mg/(kg·d) group. In addition, there were statistical significance between DEHP groups and the controls in gene expression of bcl-2 and bax ($F=253.78, P<0.05$; $F=66.67, P<0.05$), and the increase of bcl-2 and bax gene expressions were dose dependent. **Conclusion** DEHP shows obvious toxicity on the offspring nervous system of DEHP exposed rats, the possible mechanism might be the interference on the expression of bcl-2 and bax, thereby affecting nervous system development.

Key words: di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP); neuroethology; apoptosis; bcl-2; bax

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(di-2-ethylhexyl phthalate, 简称DEHP),属于邻苯二甲酸酯类化合物(PAE)中的重要成员,是塑料工业最主要的增塑剂之一^[1]。近年来DEHP被认为是一种环境内分泌

干扰物(environmental endocrine disruptor, EED)^[2],体外培养金鲫鱼脑细胞研究DEHP对DNA的损伤作用,结果显示采用不同浓度的DEHP溶液(25、50、100、200 mg/L)对体外培养脑细胞进行染毒,处理组细胞DNA损伤的彗星百分率和尾矩均显著升高^[3]。人类广泛暴露于邻苯二甲酸酯类物质,其中女性因使用含邻苯二甲酸的化妆品和个人护理用品成为邻苯二甲酸酯的高危人群。DEHP可以通过胎盘屏障进入胎儿体内,在胎儿体内聚集,也可直接作用于胎

收稿日期: 2011-12-19; 修回日期: 2012-01-29

基金项目: 辽宁省教育厅科学技术项目(批准号 L2010703)

作者简介: 潘亮(1979—),男,硕士,主治医师, E-mail: p1976029@163.com。

通讯作者: 遯晓波,博士,教授,研究方向: 分子毒理学, E-mail: xblu@mail.cmu.edu.cn。

儿^[4,5]。本实验拟通过孕期大鼠暴露 DEHP 建立子代大鼠神经系统损伤的动物模型,探讨 DEHP 对发育中子鼠神经系统的影响,为其神经发育毒性机制深入研究提供相关理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

DEHP (分析纯), 美国 Sigma 公司; RT-PCR 试剂盒, 宝生物工程 (大连) 有限公司; 引物合成, 金思特科技 (南京) 有限公司。PCR 扩增仪, 日本株式会社。

1.2 实验动物分组及染毒

动物染毒: 清洁级 Wistar 雌性大鼠, 妊娠后进行如下处理: 对照组 (给予玉米油), 低剂量组予 10 mg/ (kg · d) DEHP, 中剂量组 100 mg/ (kg · d) DEHP, 高剂量组 500 mg/ (kg · d) DEHP。实验各组动物自由饮水, 连续染毒 19 d 至子鼠出生。

1.3 观察指标及检测方法

1.3.1 神经行为学测定

1.3.1.1 水迷宫试验 水迷宫为一黑色有机玻璃长方体水槽 (73 cm × 42 cm × 20 cm), 其中由若干隔板组成迷宫, 如图 1 所示。其中 1、2、3、4 为盲端, A、B、C 为通道, 迷宫的一角有一组台阶为终点。实验前, 迷宫中灌水, 水深 10 cm, 水温 (24 ± 1) °C, 将训练后的大鼠放置 C 点, 记录错误次数、潜伏期。

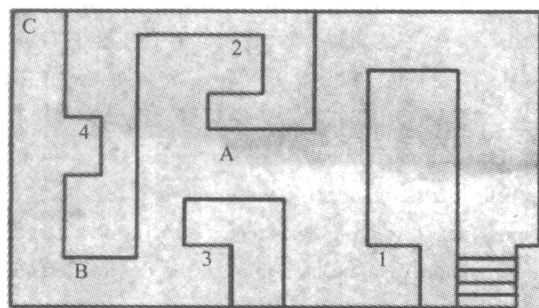


图 1 水迷宫构成

1.3.1.2 电穿梭试验 将大鼠放置于电穿梭箱内, 记录主动逃避时间和电击次数。

1.3.2 细胞凋亡率的测定 取大鼠海马神经元, 制成单细胞悬液, 应用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

1.3.3 bcl-2 和 bax mRNA 基因表达检测 Trizol 法抽提总 RNA 溶于 DEPC 水中, 进行 RT-PCR 分析。

1.4 数据处理

采用 Excel 数据库录入数据, SPSS16.0 进行实验数据处理及统计分析, 数据统计描述主要以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。根据数据的正态性和方差齐性, 采用单因素

方差分析或 Kruskal-Wallis 检验, LSD 进行多重比较, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 染毒不同剂量 DEHP 对子鼠神经行为学的影响

2.1.1 DEHP 染毒对子鼠水迷宫实验参数的影响

由表 1 所示, DEHP 各剂量组与对照组相比, 无论错误次数还是潜伏期差别均有统计学意义。

表 1 DEHP 染毒对子鼠水迷宫实验参数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	子鼠数	潜伏期 (s)	错误次数
对照组	47	46.19 ± 17.14	6.96 ± 6.51
10 mg/ (kg · d) 组	32	63.94 ± 25.34**	9.03 ± 7.06
100 mg/ (kg · d) 组	34	73.47 ± 32.84**	12.35 ± 6.05**
500 mg/ (kg · d) 组	49	75.69 ± 30.84**	13.45 ± 8.10**

注: 与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

2.1.2 DEHP 染毒对电穿梭实验参数的影响 由表 2 可见, 电穿梭测试时, DEHP 各染毒剂量组与对照组相比, 电击次数、主动逃避时间差异均有统计学意义。

表 2 DEHP 不同剂量染毒对子鼠电穿梭实验影响 ($\bar{x} \pm s$)

组别	子鼠数	电击次数	主动逃避时间 (s)
对照组	47	9.47 ± 2.06	16.26 ± 5.56
10 mg/ (kg · d) 组	32	10.18 ± 1.71	19.53 ± 5.39**
100 mg/ (kg · d) 组	34	11.45 ± 2.10*	19.79 ± 3.55**
500 mg/ (kg · d) 组	49	11.29 ± 2.61**	21.51 ± 4.39**

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2 DEHP 胚胎期染毒对子鼠海马神经细胞凋亡率的影响

出生后 7 d 子代大鼠的海马神经元细胞凋亡率明显高于出生后 21 d, 且出生后 7 d 时, 随着 DEHP 染毒剂量的增加, 子代大鼠海马神经元的细胞凋亡率有一定的上升趋势。见表 3。

表 3 DEHP 染毒对子鼠不同时段海马神经细胞凋亡率的影响 ($n = 3$, $\bar{x} \pm s$) %

组别	出生后 7 d	出生后 21 d
对照组	11.18 ± 1.069	4.020 ± 0.302
10 mg/ (kg · d) 组	13.04 ± 0.820	5.080 ± 0.166
100 mg/ (kg · d) 组	12.34 ± 0.984	4.313 ± 0.748
500 mg/ (kg · d) 组	18.76 ± 1.325**	4.470 ± 0.231

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.3 DEHP 不同染毒剂量对海马组织 bcl-2、bax 基因表达的影响

由表 4 可见, 对 bcl-2 基因凝胶电泳图像灰度进行分析, 差别具有统计学意义 ($P = 253.78$, $P = 0.000$)。说明 DEHP 染毒剂量由低到高, bcl-2 基因 mRNA 水平增多。对 bax 基因凝胶电泳图像灰度进行分析, 差别亦

具有统计学意义 ($F = 66.67$, $P = 0.000$)。说明 DEHP 染毒剂量由低到高 bax 基因表达增多。

表 4 bcl-2 和 bax mRNA 水平的 RT-PCR 半定量分析
(目的基因与 β -actin 灰度比值, $n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	bax	bcl-2
对照组	0.920 $\pm$ 0.050	0.537 $\pm$ 0.007
10 mg/ (kg $\cdot$ d) 剂量组	1.175 $\pm$ 0.075 **	0.525 $\pm$ 0.011
100 mg/ (kg $\cdot$ d) 剂量组	1.243 $\pm$ 0.041 **	0.699 $\pm$ 0.043 **
500 mg/ (kg $\cdot$ d) 剂量组	1.508 $\pm$ 0.028 **	0.972 $\pm$ 0.002 **

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

3 讨论

DEHP 可经胃肠道、肺和皮肤吸收, 通常以胃肠道为主要吸收途径^[4]。DEHP 进入体内后被迅速降解, 美国环境保护署报道 DEHP 在人体内的半衰期平均为 12 h, DEHP 及其代谢产物主要分布于血液、肝脏、肾脏、胃肠道以及脂肪组织^[5]。文献记载利用质谱分析仪检测到小鼠脑组织中的痕量 DEHP; 在大鼠的脑组织中有人也曾检测到 DEHP 的代谢产物 MEHP, 但也有研究认为 DEHP 或其代谢产物是否通过成熟血脑屏障值得怀疑^[6]。通过神经行为学检测发现, 随着 DEHP 的染毒剂量增加, 子鼠在水迷宫测试时, DEHP 各剂量组与对照组相比, 无论错误次数还是潜伏期差别均有统计学意义。电穿梭测试时, DEHP 各剂量组与对照组相比, 电击次数、主动逃避时间差异也有统计学意义。可见, DEHP 中、高剂量染毒可以使子鼠的学习记忆能力下降, 提示在神经系统发育关键期如暴露 DEHP 会影响神经行为的发育。

细胞凋亡又称细胞程序性死亡, 是受基因调控的细胞主动自杀现象。蔡文琴等应用 Tunel 法测定大鼠大脑半球皮层、皮层下皮质、海马、基底节区等脑区的神经细胞凋亡, 发现高峰期发生在出生后 7 d, 而出生 28 d 以后在各脑区神经细胞的凋亡基本停止^[8]。本实验应用流式细胞仪定量分析细胞凋亡, 出生后 7 d 子代大鼠的海马神经元细胞凋亡率明显高于出生后 21 d。另外, 对于出生后 7 d 子鼠, 随着 DEHP 宫内暴露剂量的增加, 海马区细胞凋亡率也在增加; 但出生后 21 d 这种细胞凋亡的差别尚不明显。原因可能为: 幼鼠出生后 7 d 为神经系统发育进程中生理性的细胞编程性死亡高峰期, 对影响细胞凋亡的因素更为敏感, 这样可能导致海马细胞凋亡数量的增加; 而出生 21 d 后, 生理性的细胞编程性死亡过程已基本结束, 机体保护性调控作用加强, 故并未改变细胞凋亡的数量。

bcl-2 基因家庭成员在细胞凋亡的基因调控过程

中起着至关重要的作用。bcl-2 家族可以分为两类: 一类是抗细胞凋亡基因, 以 bcl-2 基因为代表; 另一类是促细胞凋亡基因, 以 bax 基因为代表, 它们通过激活一系列下游基因发挥调节凋亡作用^[10]。本研究发现, 随着 DEHP 染毒剂量的增加, 出生后 7 d 海马神经元凋亡率有升高趋势, 并且与 bax 基因的表达结果相一致, 但有趣的是, 我们同样检测到 bcl-2 基因表达也相应升高。有研究显示 bcl-2 基因过度表达可抑制各种刺激所诱导的细胞凋亡, 所以这种矛盾现象可以解释为保护神经元的过度凋亡, bcl-2 表达会与 bax 基因表达成正向变化, 但最终是否发生凋亡, 取决于 bcl-2/bax 的比值, 当 bcl-2 表达超过 bax 时, 细胞凋亡受到抑制; 反之, 当 bax 表达占多数时, 细胞易发生凋亡。所以我们推测, bax 基因表达的增加占主要地位, 有报道称 bax 基因表达增加时, 会使细胞线粒体膜稳定性下降, 从而启动细胞凋亡的级联程序, 导致细胞凋亡的发生^[11]。而我们的研究恰好佐证了这一结论。

参考文献:

- [1] 赵文红, 厉曙光. VitC、VitE 对 DEHP 致果蝇脂质过氧化作用的拮抗 [J]. 同济大学学报医学版, 2003, 24: 179-181.
- [2] 张蕴辉. 邻苯二甲酸二乙基酯对环境和生物体的危害 [J]. 国外医学卫生学分册, 2002, 29 (2): 73-77.
- [3] 陈莉, 李学彬, 杨光涛, 等. 邻苯二甲酸二乙基酯 (DEHP) 对金鲫鱼脑细胞 DNA 的损伤 [J]. 亚州毒理学杂志, 2008, 3 (2): 144-148.
- [4] Xu Y, Agrawal S, Cook T J, et al. Di-(2-ethylhexyl)-phthalate affects lipid profiling in fetal rat brain upon maternal exposure [J]. Arch Toxicol, 2007, 81 (1): 57-62.
- [5] Xu Y, Kanipp G T, Cook T J. Effect of di-(2-ethylhexyl)-phthalate and its metabolites on the lipid profiling in rat HRP-1 trophoblast cells [J]. Arch Toxicol, 2006, 80 (5): 293-298.
- [6] 于淑红, 安丽红, 李杰. 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯毒性作用 [J]. 中国公共卫生, 2005, 22 (5): 589-591.
- [7] Api A M. Toxicological profile of diethyl phthalate: a vehicle for fragrance and cosmetic ingredients [J]. Food and Chemical Toxicology, 2001, 39 (2): 97-108.
- [8] 遯晓波, 刘秋芳, 靳翠红, 等. DEHP 短期重复暴露对大鼠神经行为学及脑脂质过氧化的影响 [J]. 沈阳医学院学报, 2008, 10 (4): 198-201.
- [9] 赵士福, 蔡文琴. 牛磺酸对大鼠脑缺血再灌注损伤时细胞凋亡的影响 [J]. 中国病理生理杂志, 1999, 15 (5): 21-22.
- [10] 吴晓康, 吴玉莲. 胰腺癌细胞凋亡与 bcl-2, bax 基因的表达 [J]. 中国普通外科杂志, 2002, 11 (3): 171-173.
- [11] 王彤, 刘存志, 刘玉珍, 等. bcl-2/bax 基因调控机体细胞凋亡的机制研究进展 [J]. 中华老年医学杂志, 2008, 28 (15): 9-10.