

· 实验研究 ·

7,8-氧化苯乙烯对大鼠学习记忆及血清和海马 NO、NOS 的影响

Effects of 7,8-styrene oxide on learning, memory, NO and NOS in hippocampus and serum of rats

李政彤¹, 李冰洁², 张霖³, 蒙泽环⁴, 金焕荣¹

(1. 沈阳医学院公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110034; 2. 抚顺市卫生学校; 3. 重庆市南岸区疾病预防控制中心; 4. 白银市会宁县疾病预防控制中心)

摘要: 选取 SD 大鼠 40 只, 随机分为对照组和 7,8-氧化苯乙烯(SO)低、中、高剂量染毒组, 雌雄各半。SO 低、中、高染毒剂量分别为 1/12 LD₅₀ (166.6 mg/kg)、1/6 LD₅₀ (333.3 mg/kg)、1/3 LD₅₀ (666.6 mg/kg), 对照组给予等量玉米油, 空腹灌胃染毒; 1 次/d, 连续染毒 3 周。染毒结束利用 Morris 水迷宫测定小鼠学习记忆能力; 之后取血清和海马组织测定一氧化氮(NO)含量及一氧化氮合酶(NOS)活性。结果显示, Morris 水迷宫定位航行实验 SO 高剂量染毒组大鼠寻找平台的潜伏期时间明显延长 ($P < 0.05$), 空间探索实验 SO 中、高剂量染毒组大鼠初次进入平台所需时间明显增加 ($P < 0.05$); 与对照组相比, SO 中、高剂量染毒组血清和海马组织中 NO 含量和 NOS 活性升高 ($P < 0.05$), SO 低剂量染毒组海马组织 NOS 活性升高 ($P < 0.05$)。提示 SO 的神经毒性作用可能与 NO 含量和 NOS 活性有关。

关键词: 7,8-氧化苯乙烯(SO); 一氧化氮(NO); 一氧化氮合酶(NOS); 大鼠; 水迷宫实验

中图分类号: R994 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2023)01-0038-03

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyx.2023.01.013

7,8-氧化苯乙烯(styrene-7,8-oxide, SO)分子式 C₈H₈O, 为苯乙烯的主要代谢产物, 其毒性高于苯乙烯, 常温下极易溶于有机溶剂^[1]。SO 被广泛应用于医药、农用化学品、有机合成等化工生产行业^[2]。人们接触 SO 的主要途径为职业环境中空气吸入和饮用受污染的水^[3], 短期接触会对皮肤和黏膜产生刺激作用, 长期接触可导致周围神经病及神经衰弱^[4]。研究表明^[5-6], SO 可致脑和肝组织的氧化损伤, 具有肺和遗传毒性^[7-8]。目前, SO 神经毒性的具体机制尚不

清楚。海马是学习记忆功能的主要区域, 学习记忆能力下降也是神经损伤的重要表现。本研究拟通过建立大鼠 SO 染毒模型, 对大鼠血清和海马组织中的一氧化氮(NO)含量和一氧化氮合酶(NOS)活性进行检测, 为 SO 神经毒性机制研究提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组 选择健康 SPF 级 SD 大鼠 40 只, 体质量 (200±20) g, 雌雄各半, 由辽宁长生生物科技股份有限公司提供, 动物合格证号: SCXK(辽)2020-0001。实验开始前对动物适应性饲养 1 周。按体质量随机分成对照组和 SO 低、中、高剂量染毒组, 每组 10 只。SO 低、中、高剂量染毒组分别给予经玉米油稀释的 SO 166.6 mg/kg (1/12 LD₅₀)、333.3 mg/kg (1/6 LD₅₀) 及 666.6 mg/kg (1/3 LD₅₀), 对照组给予等量玉米油, 每日空腹灌胃, 灌胃体积为 1 ml/100 g, 1 次/d, 连续染毒 3 周。每周称重 1 次, 根据体质量重新确定灌胃量。受试物 SO, 纯度 ≥98%, 购于美国 New Jersey 公司。

1.2 神经行为学测试 (Morris 水迷宫系统)

1.2.1 定位航行实验 大鼠 SO 染毒结束后进行 Morris 水迷宫实验。实验共 5 d, 每只大鼠每天以不同象限作为入水点, 共测试 3 次。电脑系统记录大鼠游泳路线和逃逸潜伏期。若大鼠 90 s 内爬上逃逸平台, 停留超过 5 s 则认为大鼠找到平台; 若 90 s 内未找到平台, 需引导大鼠爬上平台, 停留 10 s, 逃避潜伏期记 90 s。各组大鼠通过多次寻找水下逃逸平台, 训练其记忆平台位置和逃逸路线, 反映大鼠空间学习能力。

1.2.2 空间探索实验 选择与定位航行实验相同时间段, 撤除逃逸平台, 将大鼠自Ⅲ象限放入水池内, 记录大鼠 90 s 内初次进入平台时间、有效进入平台次数和逃逸平台滞留时间。

基金项目: 辽宁省教育厅课题 (2019 年)

作者简介: 李政彤 (1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 工业毒物神经毒性研究。

通信作者: 金焕荣, 硕士研究生导师, 教授, E-mail: jh0315@163.com

1.3 指标检测 水迷宫实验结束后,将大鼠乙醚麻醉,采血并取血清,后将大鼠断头于冰盒上常规取海马,存于 -20°C 冰箱。测定前取海马制成匀浆,测定血清及海马组织中 NO 含量和 NOS 活性。NO 含量测定采用硝酸还原酶法, NOS 活性测定采用比色法。操作方法严格按试剂盒(南京建成生物工程研究所生产)说明书进行。

1.4 统计分析 采用 SPSS 22.0 统计软件进行方差分析和组间多重比较,正态分布的数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,并用单因素方差分析(LSD)方法进行组间比较;对于方差不齐的数据采用 Tamhane 进行组间比较;以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 SO 染毒大鼠体质量测定 各组大鼠体质量均有

增加,以对照组增加最多,SO 高剂量染毒组增加最少,与对照组相比差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 1。

表 1 SO 染毒大鼠体质量变化($\bar{x}\pm s$)[g]

组别	<i>n</i>	染毒前	第 1 周	第 2 周
对照组	10	211.6 $\pm$ 18.42	238.1 $\pm$ 9.78	247.6 $\pm$ 20.39
SO 低剂量染毒组	10	212.1 $\pm$ 18.74	229.3 $\pm$ 11.64	241.2 $\pm$ 21.96
SO 中剂量染毒组	10	212.8 $\pm$ 15.85	227.1 $\pm$ 7.94	239.7 $\pm$ 16.91
SO 高剂量染毒组	10	210.7 $\pm$ 20.25	209.4 $\pm$ 18.17 ^a	220.4 $\pm$ 25.29 ^a

注: a, 与对照组相比 $P<0.05$ 。

2.2 SO 染毒对大鼠学习记忆的影响

2.2.1 定位航行实验 训练第 3 天后 SO 高剂量染毒组大鼠寻找平台的潜伏期时间明显延长,与对照组相比差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 2 SO 染毒大鼠 Morris 水迷宫定位航行实验结果($\bar{x}\pm s$)[s]

组别	<i>n</i>	寻找平台潜伏期				
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 4 天	第 5 天
对照组	10	22.04 $\pm$ 3.30	16.77 $\pm$ 1.58	10.04 $\pm$ 3.52	10.00 $\pm$ 2.06	6.50 $\pm$ 1.76
SO 低剂量染毒组	10	20.74 $\pm$ 6.04	18.78 $\pm$ 5.45	9.16 $\pm$ 2.63	10.04 $\pm$ 1.25	9.72 $\pm$ 2.70
SO 中剂量染毒组	10	27.76 $\pm$ 5.31	17.31 $\pm$ 4.42	13.44 $\pm$ 3.25	11.88 $\pm$ 2.52	9.28 $\pm$ 1.18
SO 高剂量染毒组	10	27.98 $\pm$ 5.62	18.37 $\pm$ 2.63	14.44 $\pm$ 2.25 ^a	16.65 $\pm$ 3.46 ^a	13.28 $\pm$ 3.63 ^a

注: a, 与对照组相比 $P<0.05$ 。

2.2.2 空间探索实验 SO 高剂量染毒组大鼠初次进入平台时间明显延长($P<0.05$); SO 中、高剂量染毒组大鼠逃逸平台滞留时间明显缩短,与对照组相比差异具有统计学意义($P<0.05$)。见表 3。

2.3 血清及海马组织中 NO 含量和 NOS 活性 SO 中、高剂量染毒组血清中 NO 含量和 NOS 活性均明显高于对照组; SO 中、高剂量染毒组海马组织中 NO 含量明显升高, SO 各剂量染毒组海马组织中 NOS 活性显著高于对照组,差异具有统计学意义($P<$

0.05)。见表 4。

表 3 SO 染毒大鼠 Morris 水迷宫空间探索实验结果($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	初次进入平台时间 (s)	有效进入平台次数	逃逸平台滞留时间 (s)
对照组	10	4.56 $\pm$ 1.18	5.73 $\pm$ 1.57	4.68 $\pm$ 1.72
SO 低剂量染毒组	10	8.25 $\pm$ 1.39	5.33 $\pm$ 1.74	4.10 $\pm$ 1.22
SO 中剂量染毒组	10	8.11 $\pm$ 1.44	5.00 $\pm$ 1.89	2.66 $\pm$ 0.38 ^a
SO 高剂量染毒组	10	27.88 $\pm$ 3.19 ^a	4.63 $\pm$ 1.07	2.54 $\pm$ 0.42 ^a

注: a, 与对照组相比 $P<0.05$ 。

表 4 SO 对染毒大鼠血清及海马组织中 NO 含量和 NOS 活性的影响 ($\bar{x}\pm s$)

组别	<i>n</i>	血清		海马组织	
		NO 含量($\mu\text{mol/L}$)	NOS 活性(U/ml)	NO 含量($\mu\text{mol/mg prot}$)	NOS 活性(U/mg prot)
对照组	10	2.31 $\pm$ 0.35	28.56 $\pm$ 2.70	0.21 $\pm$ 0.02	2.02 $\pm$ 0.31
SO 低剂量染毒组	10	2.64 $\pm$ 0.61	31.57 $\pm$ 1.19	0.39 $\pm$ 0.01	2.79 $\pm$ 0.46 ^a
SO 中剂量染毒组	10	5.03 $\pm$ 1.99 ^a	32.95 $\pm$ 3.04 ^a	0.59 $\pm$ 0.03 ^a	2.92 $\pm$ 0.35 ^a
SO 高剂量染毒组	10	4.80 $\pm$ 0.81 ^a	36.04 $\pm$ 4.77 ^a	0.57 $\pm$ 0.11 ^a	3.09 $\pm$ 0.71 ^a

注: a, 与对照组相比 $P<0.05$ 。

3 讨论

在与学习记忆有关的脑区中,海马是关键区域^[9]。SO 是一种具有神经系统毒性作用的化合物,可能对学习记忆能力产生一定的损害作用。目前,

Morris 水迷宫实验是评价动物空间学习记忆能力最广泛和标准的行为学实验^[10]。Morris 水迷宫实验由定位航行实验和空间探索实验两部分组成。定位航行实验反映动物的记忆能力和对物体的识别能力,空间探索实验评价空间记忆能力。本研究 Morris 水迷宫定位

航行实验发现,随着染毒时间和剂量的增加,SO 高剂量染毒组大鼠寻找平台的潜伏期时间明显延长;空间探索实验中,大鼠初次进入平台时间 SO 染毒组高于对照组,逃逸平台滞留时间 SO 染毒组低于对照组;表明 SO 使大鼠的空间学习记忆能力受到损害。

国外学者研究显示,空间记忆和海马长时程增强(LTP)之间存在联系,因为两者都依赖于 *N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NMDA)受体^[11]。NO 是中枢神经系统中一种独特的具有神经调节作用的气体递质,由 *L*-精氨酸通过 NOS 合成^[12]。海马区的 NO 作为逆行信使在 LTP 和随后的学习和记忆过程中发挥着重要作用^[13]。Phillips 等^[14]发现,通过敲除小鼠的 NOS 基因会导致其空间学习能力下降。现已确定的三种 NOS 亚型分别为神经型 NOS(nNOS)、诱导型 NOS(iNOS)和内皮型 NOS(eNOS)。nNOS 在中枢神经系统中分布广泛而丰富,是一种钙/钙调素依赖性酶。NO 可能通过 NO-cGMP-PKG 通路,进而影响大鼠神经元发育、突触可塑性、学习和记忆功能^[15]。NO 还可以通过调节海马区神经递质的释放对学习记忆产生影响^[16-17]。

在中枢神经系统中,生理性 NO 作为神经递质或神经调节剂对各种脑部刺激作出反应,并在 LTP 和突触可塑性中发挥重要作用^[15]。然而,随着时间的推移,NO 过量会导致亚硝化应激反应,从而产生神经毒性,影响学习记忆功能^[18]。NO 也可能通过干扰空间学习中的谷氨酸能受体释放造成细胞内 Ca^{2+} 超载,使神经细胞损伤,导致大鼠空间学习记忆障碍^[12,19]。本研究显示,SO 高剂量染毒组大鼠学习记忆能力下降,且血清及海马组织中的 NO 含量和 NOS 活性明显增加,说明 NO 含量升高会损伤海马学习记忆能力。

综上所述,SO 暴露可使 NOS 活性增强,NO 含量升高,对 LTP 的诱导和维持产生影响,这可能是 SO 降低大鼠空间学习记忆能力的机制之一。

参考文献

- [1] Vettori MV, Caglieri A, Goldoni M, *et al.* Analysis of oxidative stress in SK-N-MC neurons exposed to styrene-7,8-oxide [J]. *Toxicology in Vitro*, 2005, 19 (1): 11-20.
- [2] National Toxicology Program, Department of Health and Human Services. Report on carcinogens, Fifteenth Edition [EB/OL]. <https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/content/profiles/styreneoxide.pdf>. [2018-02-12].
- [3] Rappaport SM, Yeowell-O'Connell K, Bodell W, *et al.* An investigation of multiple biomarkers among workers exposed to styrene and styrene-7,8-oxide [J]. *Cancer Research*, 1996, 56 (23): 5410-5416.
- [4] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Styrene, styrene-7,8-oxide, and quinoline [R]. Lyon (FR): International Agency for Research on Cancer, 2019: 20-26.
- [5] 王向明, 谢怀江, 张志友, 等. 7,8-氧化苯乙烯对小鼠 SOD 活性及 MDA 含量的影响 [J]. *中国工业医学杂志*, 2016, 29 (2): 128-129, 151.
- [6] Corsi P, D'Aprile A, Nico B, *et al.* Synaptic contacts impaired by styrene-7,8-oxide toxicity [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2007, 224 (1): 49-59.
- [7] Ollikainen T, Hirvonen A, Norppa H. Influence of GSTT1 genotype on sister chromatid exchange induction by styrene-7,8-oxide in cultured human lymphocytes [J]. *Environ Mol Mutagen*, 1998, 31 (4): 311-315.
- [8] Harvilchuck JA, Pu X, Klaunig JE, *et al.* Indicators of oxidative stress and apoptosis in mouse whole lung and Clara cells following exposure to styrene and its metabolites [J]. *Toxicology*, 2009, 264 (3): 171-178.
- [9] Qi YQ, Wang SR, Luo YM, *et al.* Exercise-induced nitric oxide contributes to spatial memory and hippocampal capillaries in rats [J]. *International Journal of Sports Medicine*, 2020, 41 (13): 951-961.
- [10] Othman MZ, Hassan Z, Che Has AT. Morris water maze: A versatile and pertinent tool for assessing spatial learning and memory [J]. *Experimental Animals*, 2022, 71 (3): 264-280.
- [11] Moosavi M, Abbasi L, Zarifkar A, *et al.* The role of nitric oxide in spatial memory stages, hippocampal ERK and CaMKII phosphorylation [J]. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2014 (122): 164-172.
- [12] Ren P, Xiao B, Wang LP, *et al.* Nitric oxide impairs spatial learning and memory in a rat model of Alzheimer's disease via disturbance of glutamate response in the hippocampal dentate gyrus during spatial learning [J]. *Behavioural Brain Research*, 2022 (422): 113750.
- [13] Bon CLM, Garthwaite J. On the role of nitric oxide in hippocampal long-term potentiation [J]. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2003, 23 (5): 1941-1948.
- [14] Phillips KG, Hardingham NR, Fox K. Postsynaptic action potentials are required for nitric-oxide-dependent long-term potentiation in CA1 neurons of adult GluR1 knock-out and wild-type mice [J]. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 2008, 28 (52): 14031-14041.
- [15] Chong CM, Ai N, Ke MJ, *et al.* Roles of nitric oxide synthase isoforms in neurogenesis [J]. *Molecular Neurobiology*, 2018, 55 (3): 2645-2652.
- [16] Kourosh-Arami M, Hosseini N, Mohsenzadegan M, *et al.* Neurophysiologic implications of neuronal nitric oxide synthase [J]. *Reviews in the Neurosciences*, 2020, 31 (6): 617-636.
- [17] Hölscher C. Nitric oxide, the enigmatic neuronal messenger: Its role in synaptic plasticity [J]. *Trends in Neurosciences*, 1997, 20 (7): 298-303.
- [18] Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity [J]. *Chemical Research in Toxicology*, 2008, 21 (1): 172-188.
- [19] 刘鹏, 伟忠民, 佟宇. NO、NOS 对学习记忆和神经毒性作用的研究进展 [J]. *辽宁医学院学报*, 2009, 30 (4): 369-372, 375.

(收稿日期: 2022-12-01; 修回日期: 2022-12-17)