

苯并[α]芘及丁基羟基茴香醚对大鼠学习记忆能力影响研究*

杨凯¹, 粟秋平¹, 秦启忠², 涂白杰¹ Δ

1. 重庆医科大学公共卫生与管理学院 医学与社会发展研究中心 健康领域社会风险预测治理协同创新中心(重庆 400016);
2. 重庆医科大学 实验教学中心(重庆 400016)

【摘要】 目的 探究苯并[α]芘(B[α]P)对海马学习记忆能力的毒性作用及丁基羟基茴香醚(BHA)对此的保护作用。方法 90只雄性SD大鼠随机分为空白对照组、溶剂对照组、B[α]P处理组[(2 mg/(kg·d))、BHA处理组[50 mg/(kg·d)]和B[α]P+BHA联合处理组。按分组及大鼠体质量给予相应剂量灌胃处理(空白对照组、溶剂对照组用等量生理盐水、花生油处理),1次/d,持续90 d。暴露90 d后采用Morris水迷宫测试大鼠学习记忆能力;处死大鼠,剥离脑组织,检测海马组织丙二醛(MDA)含量,超氧化物歧化酶(SOD)、ATP酶活性及海马突触体内Ca²⁺浓度。结果 Morris水迷宫行为学测试结果显示,与其他组相比,B[α]P组逃避潜伏期增加,跨平台次数减少,差异均有统计学意义($P < 0.05$);海马中MDA[(2.46 ± 0.39) nmol/mg prot.]含量及Ca²⁺浓度[(146.3 ± 16.68) nmol/L]升高,而SOD[(76.1 ± 11.42) nmol/mg prot.]和ATP酶活性降低(P 均 < 0.05)。B[α]P+BHA联合处理组较B[α]P组各指标改善(P 均 < 0.05),且与溶剂对照组比较,差异无统计学意义。结论 B[α]P引起的神经行为毒性作用可能与海马ATP酶活性降低及Ca²⁺浓度增加等氧化损伤有关,而BHA可防止此类损伤。

【关键词】 苯并[α]芘 丁基羟基茴香醚 氧化应激 ATP酶

Effect of Benzo [α]prylene and Butylated Hydroxylanisole on Learning and Memory in Rats YANG Kai¹, SU Qiu-ping¹, QIN Qi-zhong², TU Bai-jie¹ Δ . 1. Center for Research of Medicine & Social Development, the Innovation Center for Social Risk Governance in Health, School of Public Health, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Experimental Teaching Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Δ Corresponding author, E-mail: baijietu@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the neurotoxic effect of benzo[α]prylene (B[α]P) and protective effect of butylated hydroxyl anisole (BHA) on learning and memory in hippocampus of rats. **Methods** Ninety male SD rats were randomly divided into blank control group, solvent control group, B[α]P exposed group [(2 mg/(kg·d))], BHA group [50 mg/(kg·d)] and B[α]P+BHA combined group. Rats were given the appropriate dose oral treatment according to body mass and group (the same volume of saline and peanut oil were given to blank and solvent control group, respectively) for 90 d. After 90 d exposure, Morris water maze (MWM) was conducted to estimate rats' learning and memory ability. The level of malonaldehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) activity, Na⁺-K⁺-ATPase and Ca²⁺-Mg²⁺-ATPase activity and Ca²⁺ concentration were measured after rats were sacrificed and brain tissue were removed. **Results** Behavioral test results showed that the escape latency of B[α]P exposed group were significantly increased than other groups ($P < 0.05$); however, the number of crossing platform (4.13 ± 0.78) were decreased significant. The level of MDA [(2.46 ± 0.39) nmol/mg prot.] and Ca²⁺ concentration [(146.3 ± 16.68) nmol/L] in the B[α]P exposed group increased significant, while the activity of Na⁺-K⁺-ATPase and SOD [(76.1 ± 11.42) nmol/mg prot.] were significantly decreased. Compared with B[α]P group, each index in B[α]P+BHA combined group improved significantly ($P < 0.05$), besides, there were no statistically difference when compared with solvent control group. **Conclusion** The neurotoxic effect of B[α]P may be related to the decrease of ATPase activity and the increase of Ca²⁺ concentration in hippocampus, while BHA can prevent these damages.

【Key words】 Benzo[α]prylene Butylated hydroxyl anisole Oxidative stress ATPase

多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs)广泛存在于空气、水、食物和尘埃中,其产生

是多因素作用的结果。苯并[α]芘 (benzo[α]prylene, B[α]P)作为PAHs污染的主要指示物,主要来源于有机物不完全燃烧、垃圾焚毁、汽车尾气等^[1, 2],被广泛用于探究PAHs的神经毒性作用。B[α]P由于其高脂性、高代谢性及降低抗氧化性等

* 国家自然科学基金(No. 81372957)资助

Δ 通讯作者, E-mail: baijietu@hotmail.com

特性,极易透过血-脑屏障而使得大脑神经系统对其极为敏感^[3,4]。B[α]P 通过氧化应激而引起的神经行为毒性作用已有相关报道^[5],并可能与学习记忆损伤有关。

抗氧化剂如丁基羟基茴香醚(butylated hydroxyl anisole, BHA)作为食品抗氧化添加剂被广泛使用,用于延缓和抑制食物、聚合物、脂肪和油脂等的氧化降解,同样,在人类和动物衰老的抗氧化过程中也起着重要的作用^[6]。

焦炉工人等因职业的关系接触 PAHs 的剂量远远高于一般人,而儿童对 PAHs 的敏感性远远高于成年人^[7,8],职业暴露工人及生活在污染区的儿童形成两大高危人群。针对高危人群是否可以使用具有拮抗作用的药物或保健品预防 PAHs 的危害是本领域亟待解决的重要课题,而目前国内外鲜有相关的研究报告。为此,本研究用动物实验的方法探索 BHA 对 PAHs 毒性的拮抗作用及其作用机制,观察 B[α]P 对海马学习记忆能力的毒性作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组处理

90 只雄性 SD 大鼠,体质量 290~310 g,28 d 日龄,购于重庆医科大学实验动物中心。大鼠饲养于标准 12 h/12 h 明暗交替、室温(22±2)℃、相对湿度(50±20)%、自由饮水取食的动物房,实验前给予 7 d 时间以适应饲养环境。将 90 只大鼠随机分为 5 组,即空白对照组(等量生理盐水处理)、溶剂对照组(等量花生油处理)、B[α]P 处理组[2 mg/(kg·d)]、BHA 处理组[50 mg/(kg·d)]及 B[α]P+BHA 联合处理组,按分组及大鼠体质量给予相应剂量灌胃处理,1 次/d,持续 90 d。观察并记录大鼠进食、活动等一般情况。

1.2 试剂与仪器

B[α]P(纯度 99%)和 BHA(纯度 99%)均购于美国 Sigma 公司。B[α]P 和 BHA 由于其低水溶性,溶于花生油中并于 4℃ 下超声处理 30 min。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶等生物化学试剂盒购于南京建成生物工程研究所。Fura-2/AM 钙荧光探针购于 Sigma-Aldrich 公司。其他实验试剂购于重庆医药有限公司。

1.3 Morris 水迷宫实验

各组大鼠按 1.1 分组干预 90 d 后,采用 Morris

水迷宫实验(Morris water maze, MWM)观察大鼠的行为表现。实验开始前,使平台高于水面 1 cm,作为可视化适应阶段。将大鼠面朝池壁并沿池壁边缘从任一象限放入池中,使大鼠在池中自由游 120 s。接着,使平台低于水面 1 cm,将大鼠从任一象限置入池中,观察并记录大鼠在 60 s 内到达并停留在平台上的时间(即逃避潜伏期)。如若在 60 s 内未能找到平台,则由实验者将其引导至平台上,并停留 20 s,此时记录其逃避潜伏期为 60 s。每次实验后用毛巾擦拭大鼠以去除水分。连续测试 4 d,每天训练 4 次,每次至少间隔 5 min。实验最后 1 d 撤除平台,任选同一入水点将大鼠面朝池壁放入水中,记录其在 60 s 跨过平台相应位置的次数及在目标象限停留的时间。

1.4 大鼠海马组织标本的获取

水迷宫实验结束后,大鼠用戊巴比妥钠麻醉后处死,迅速剥离脑组织,分离并测定双侧海马质量。用 20 mmol Tris-HCl 缓冲液(pH=7.4)漂洗海马组织,并用预冷生理盐水将海马组织均质化(匀浆)。

1.5 海马组织 SOD 和 MDA 检测

每组取 6 只大鼠,按 1.4 获取海马组织后,将匀浆于 4℃、15 000 r/min 下离心 5 min。取上清液,按试剂盒说明测定 SOD 活性及 MDA 含量以探索 B[α]P 造成的氧化应激损害及 BHA 的保护作用。

1.6 海马组织 ATP 酶活性测定

每组取 6 只大鼠,按 1.4 获取海马组织后,用 2%的匀浆根据试剂盒操作说明测定 ATP 酶(Na⁺-K⁺-ATP 酶和 Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶)活性,以探索 B[α]P 导致的能量代谢损伤及 BHA 的保护作用。

1.7 Ca²⁺ 含量测定

每组取 6 只大鼠,按 1.4 获取脑组织后,分离双侧海马突触体,参照文献^[9,10]的方法测定荧光信号强度和 Ca²⁺ 含量,并按以下公式计算突触体胞内游离 Ca²⁺ 浓度:

$$[Ca^{2+}]_i = K_d \times (F - F_{min}) / (F_{max} - F)$$

其中, K_d 为 Fura-2 和 Ca²⁺ 结合的平衡解离常数,为 224 nmol/L, F 为 340 nm 下激发波长测得的荧光强度值, F_{max} 为加入 Triton-100 后的最大荧光强度, F_{min} 为在 F_{max} 基础上再加入 EGTA 所测得的荧光强度。

1.8 统计学方法

定量资料数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用方差分析(ANOVA),组间两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Morris 水迷宫实验

水迷宫结果显示, 各组大鼠逃避潜伏期随训练时间的增加而缩短。实验第 1 d, 各组逃避潜伏期差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 随着实验天数的增加, 与溶剂对照组和 B[α]P+BHA 联合处理组比较,

B[α]P 处理组逃避潜伏期增加, 跨平台次数减少, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); B[α]P+BHA 联合处理组与溶剂对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 空白对照组、溶剂对照组、BHA 处理组大鼠逃避潜伏期及跨平台次数差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 1。

2.2 海马 MDA 含量及 SOD 活性

表 1 各处理组平均逃避潜伏期及跨平台次数 ($\bar{x} \pm s, n=18$)

Table 1 The average escape latency and the frequency of crossing platform ($\bar{x} \pm s, n=18$)

Group	Escape latency (s)				Frequency of crossing platform
	Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	
Blank control	47.12 \pm 12.38	39.25 \pm 8.83	14.20 \pm 3.12	9.57 \pm 2.38	7.23 \pm 1.38
Solvent control	46.82 \pm 12.16	38.52 \pm 8.56	13.72 \pm 3.01	9.62 \pm 2.42	7.21 \pm 1.36
B[α]P treatment	54.33 \pm 13.58	44.73 \pm 11.62*	27.52 \pm 7.15*	17.32 \pm 4.99*	4.13 \pm 0.78*
BHA	48.23 \pm 10.12	37.71 \pm 8.31	16.81 \pm 3.34	9.81 \pm 2.51	6.80 \pm 1.25
B[α]P+BHA combined	50.31 \pm 12.37	40.42 \pm 10.91**	20.30 \pm 4.06**	13.51 \pm 2.71**	5.04 \pm 0.81**
F	1.06	12.32	11.83	10.52	13.77
P	0.37	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05

* $P < 0.05$, vs. solvent control group; ** $P < 0.05$, vs. B[α]P treatment group

见表 2。方差分析结果显示, 海马中 MDA 水平和 SOD 活性的组间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。LSD 分析显示, 空白对照组、溶剂对照组、BHA 处理组 MDA 含量及 SOD 活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。B[α]P 处理组与溶剂对照组和 B[α]P+BHA 联合处理组相比, SOD 活性降低 ($P < 0.05$), MDA 含量增加 ($P < 0.05$)。B[α]P+BHA 联合处理组与溶剂对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.3 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性

见表 2。各组海马 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。LSD 分析显示, 空白对照组、溶剂对照组、BHA 处

理组 ATP 酶活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与溶剂对照组和 B[α]P+BHA 联合处理组比较, B[α]P 处理组 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATP}$ 酶和 $\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATP}$ 酶活性降低 ($P < 0.05$); B[α]P+BHA 联合处理组与溶剂对照组的差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.4 Ca^{2+} 含量

见表 2。各组海马突触体内 Ca^{2+} 浓度差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。LSD 分析显示, 空白对照组、溶剂对照组、BHA 处理组 Ca^{2+} 浓度差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。B[α]P 处理组较溶剂对照组和 B[α]P+BHA 联合处理组 Ca^{2+} 浓度增加 ($P < 0.05$); B[α]P+BHA 联合处理组与溶剂对照组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 各组海马组织 MDA 含量, SOD、ATP 酶活性及海马突触体内 Ca^{2+} 浓度 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 The content of MDA, SOD and ATPase in the hippocampus and Ca^{2+} concentration in synaptosome ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Group	MDA concentration (nmol/mg prot.)	SOD activity (nmol/mg prot.)	$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity [$\mu\text{molPi}/(\text{mg prot.} \cdot \text{h})$]	$\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ activity [$\mu\text{molPi}/(\text{mg prot.} \cdot \text{h})$]	Ca^{2+} concentration (nmol/L)
Blank control	1.83 \pm 0.27	113.34 \pm 21.02	7.21 \pm 1.96	7.92 \pm 1.78	122.38 \pm 14.35
Solvent control	1.87 \pm 0.29	112.20 \pm 20.19	7.14 \pm 1.93	7.83 \pm 1.72	124.60 \pm 14.20
B[α]P treatment	2.46 \pm 0.39*	76.10 \pm 11.42*	3.16 \pm 0.84*	3.98 \pm 0.79*	146.30 \pm 16.68*
BHA	1.77 \pm 0.35	106.70 \pm 19.21	6.83 \pm 1.76	7.75 \pm 1.64	124.40 \pm 14.18
B[α]P+BHA combined	2.02 \pm 0.35**	90.20 \pm 12.45**	4.62 \pm 1.10**	5.02 \pm 1.20**	130.30 \pm 14.85**
F	6.34	8.21	43.23	31.01	2.49
P	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

* $P < 0.05$, vs. solvent control group; ** $P < 0.05$, vs. B[α]P treatment group

3 讨论

对 B[α]P 神经毒性的研究已有数十年, 但其机制至今仍未明确, 一些研究指出, B[α]P 的毒性作用

与海马损伤有关^[11]。海马是大脑极其重要及敏感的区域, 主要负责存储信息, 是人学习和记忆的关键部位。Morris 水迷宫实验表明, B[α]P 暴露可造成学习和记忆能力缺损。

海马的氧化应激可能与学习记忆损伤有关。MDA 作为组织氧化损伤的一项指标,是主要的氧化产物之一,其含量高低可间接反映机体脂质过氧化水平及细胞损伤程度。SOD 是机体主要的抗氧化酶和氧自由基清除剂,可清除自由基并能对细胞起到保护作用,对机体的氧化与抗氧化平衡起重要作用^[12,13]。SOD 活性下降可诱发机体产生 MDA。本研究中,B[α]P 处理组较溶剂对照组 MDA 浓度增加而 SOD 活性降低,表明 B[α]P 可通过增加 MDA 水平以及抑制 SOD 活性而产生神经毒性作用。

脑组织由于含有大量的多不饱和脂肪酸,氧耗量大及抗氧化能力低,对氧自由基导致的过氧化反应极其敏感;此外,由于突触需要大量的能量供应,拥有大量的线粒体而使其对氧化应激敏感。氧化应激激活与突触功能和生长之间有很强的关联。本研究结果表明,B[α]P 暴露引起海马 MDA 浓度明显增加,ATP 酶活性降低及 Ca^{2+} 含量增加。这表明脂质过氧化作用发生于海马神经元中,因而引起神经元损伤,进而造成空间学习和记忆能力缺损。氧化应激引起脑组织损伤,而抗氧化剂的使用可降低脂质过氧化水平,从而改进空间学习记忆能力。

BHA 是一种最常见的人工合成的酚类抗氧化剂^[14],对细胞死亡、化学致癌物以及化学致癌物代谢具有保护作用^[15]。本研究中,我们选取 BHA 作为 B[α]P 导致神经毒性作用的拮抗剂。与 B[α]P 处理组相比,B[α]P + BHA 联合处理组大鼠在 MWM 中具有更好的行为学表现,表明 BHA 能保护因 B[α]P 而产生的有害作用。此外,B[α]P + BHA 联合处理组 MDA 水平降低,SOD 活性明显升高,这也是其对 B[α]P 损害的保护作用的标志。ATP 酶活性显著改善,表明 BHA 在能量代谢中起保护作用。

本研究表明 B[α]P 亚慢性暴露可引起学习和记忆能力损伤、海马中 $Na^+ - K^+ - ATP$ 酶和 $Ca^{2+} - Mg^{2+} - ATP$ 酶活性降低,SOD 活性降低和氧自由基增加。相反,BHA 可一定程度上抑制上述有害作用,与程燕等^[16]研究报告一致。这表明,B[α]P 的神经行为毒性作用可能与海马氧化损伤、ATP 酶活性降低以及 Ca^{2+} 浓度增加有关。此外,BHA 作为食品添加剂,由于其化学稳定性、低成本和易获得性使其在实验和临床应用中具有一定的价值。

以往对 BHA 的研究主要在于探讨其作为食品

添加剂对食物的抗氧化作用方面,其作为 PAHs 拮抗剂的研究尚处于探索阶段,BHA 是否是最理想的 PAHs 拮抗剂有待更加深入系统的研究。

参 考 文 献

- Marta S, Bozena G, Maggalena B, *et al.* Factors controlling benzo(a) pyrene concentration in aerosols in the urbanized coastal zone. A case study: Gdynia, Poland (Southern Baltic Sea). *Environ Sci Pollut Res Int*,2013;20(6):4154-4163.
- Qi YB, Chen CZ, Tang Y, *et al.* The synergistic effect of benzo[α]pyrene and lead on learning and memory of mice. *Toxicol Ind Health*,2013;29(5):387-395.
- Schellenberger MT, Grova N, Farinelle S, *et al.* Modulation of benzo[α]pyrene induced neurotoxicity in female mice actively immunized with a B[α]P-diphtheria toxoid conjugate. *Toxicol Appl Pharmacol*,2013;271(2):175-183.
- 陈承志, 汤 艳, 蒋学君等. 苯并[α]芘对大鼠学习记忆及海马神经元影响. *中国公共卫生*,2011;27(5):608-610.
- Saunders CR, Das SK, Ramesh A, *et al.* Benzo(a) pyrene-induced acute neurotoxicity in the F-344 rat: role of oxidative stress. *J Appl Toxicol*,2006;26(5):427-438.
- Lin X, Ni Y, Kokot S. Glassy carbon electrodes modified with gold nanoparticles for the simultaneous determination of three food antioxidants. *Anal Chim Acta*,2013;2(26):54-62.
- 郭 亮, 聂继胜, 郑红梅等. 职业接触苯并[α]芘对焦炉工人胆碱能系统及淋巴细胞凋亡率的影响. *中国药物与临床*,2012;12(7):907-909.
- Chen C, Tang Y, Jiang X, *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. *Toxicol Sci*,2012;125(1):248-261.
- 段 利, 汤 艳, 陈承志等. 苯并[α]芘对大鼠海马组织氧化应激及 ATP 酶的影响. *中华劳动卫生职业病杂志*,2013;31(7):500-503.
- Hagan CE, McDevitt RA, Liu Y, *et al.* 5-HT (1B) autoreceptor regulation of serotonin transporter activity in synaptosomes. *Synapse*,2012;66(12):1024-1034.
- Qiu C, Cheng S, Xia Y, *et al.* Effects of subchronic benzo(a) pyrene exposure on neurotransmitter receptor gene expression in the rat hippocampus related with spatial learning and memory change. *Toxicology*,2011;289(2-3):83-90.
- 高强, 杨 杨, 孙增春等. 鹿茸血酒对去势大鼠的升雌激素与抗氧化作用的初步研究. *四川大学学报(医学版)*,2014;45(1):134-137.
- 江晓琴, 倪 娟, 杨沛等. 吗啡预处理对兔缺氧/复氧损伤肾脏组织 SOD 和 MDA 的影响. *四川大学学报(医学版)*,2010;41(5):885-887.
- 杨 杰, 方从容, 杨大进. 液相色谱法和气相色谱法测定食品中抗氧化剂叔丁基羟基茴香醚、2,6-二叔丁基对甲酚和特丁基对苯二酚的研究和对比. *卫生研究*,2013;42(1):114-118.
- Park S, Shin H, Cho Y. Shikonin induces programmed necrosis-like cell death through the formation of receptor interacting protein 1 and 3 complex. *Food Chem Toxicol*,2013;5(55):36-41.
- 程 燕, 王立新, 林三仁. 叔丁基羟基茴香醚对小鼠醋酐中毒性肝损伤的保护作用. *胃肠病学*,2000;5(2):109-111.

(2015-03-13 收稿,2015-08-11 修回)

编辑 沈 进