

# 孕期苯并[a]芘暴露对子鼠神经行为及海马 Arc mRNA 表达的影响

吕胜杰, 宁丽俊, 王琦, 聂继盛

山西医科大学公共卫生学院劳动卫生学教研室, 山西 太原 030001

## 摘要:

**[目的]** 以苯并[a]芘 (BaP) 为代表的多环芳烃所引起的儿童发育毒性可能是一个非常重要的公共卫生问题, 而有研究显示, 海马活性调控骨架相关蛋白 (Arc) 基因对出生后神经发生和学习记忆发挥着重要作用。本研究拟探讨孕期 BaP 暴露对子鼠神经行为和 Arc mRNA 表达的影响。

**[方法]** 3月龄健康 SPF 级 SD 大鼠 60 只 (雌雄比例为 1:1), 合笼交配后将 30 只怀孕 SD 大鼠随机分为空白组、橄榄油组和 10、20、40 mg/kg BaP 染毒组, 每组 6 只。BaP 由橄榄油溶解, 母鼠受孕第 17、18、19 天按体重腹腔注射染毒, 每天 1 次, 连续 3 d, 给药体积 0.2 mL/kg; 橄榄油组注射相同体积的橄榄油; 空白对照组不给任何处理。比较各组子鼠出生后第 7 天 (postnatal day 7, PND7) 悬崖回避、PND14 空中翻正的达标率情况, 以及 PND37 的水迷宫实验结果, 即逃避潜伏期、目标象限停留时间和穿越平台数。观察子鼠 PND1、PND7、PND14、PND45 海马 Arc mRNA 水平。

**[结果]** 在 PND7, 与橄榄油组 (97.56%) 相比, 20 mg/kg 染毒组 (63.64%) 和 40 mg/kg 染毒组 (60.98%) 悬崖回避实验的达标率下降 ( $P < 0.05$ )。在 PND14, 与橄榄油组 (65.71%) 相比, 40 mg/kg 染毒组 (29.73%) 空中翻正达标率下降 ( $P < 0.05$ )。水迷宫定位航行实验结果显示: 与橄榄油组相比, BaP 染毒组 PND37 在实验的第 1、3、4 天的逃避潜伏期升高 ( $P < 0.05$ )。空间探索实验结果显示, 与橄榄油组相比, BaP 染毒组 PND37 目标象限停留时间和穿越平台数减少 ( $P < 0.05$ )。对不同时间点的海马 Arc mRNA 的表达水平检测结果显示: 与橄榄油组相比, 3 个 BaP 染毒组在 PND1、PND7 的 Arc mRNA 均降低 ( $P < 0.05$ ); 在 PND14, 与橄榄油组 (14.86±2.48) 对比, 40 mg/kg 染毒组 (7.31±1.94) Arc mRNA 降低 ( $P < 0.05$ ); 在 PND45, 与橄榄油组 (39.66±6.39) 对比, 40 mg/kg 染毒组 (19.98±8.21) Arc mRNA 降低 ( $P < 0.05$ )。

**[结论]** 孕期 BaP 暴露会引起子鼠的早期神经行为异常及发育后期空间学习记忆能力下降, 而海马的 Arc mRNA 表达下降可能参与了 BaP 神经发育毒性的发生。

**关键词:** 孕期; 苯并[a]芘; 神经行为; 空间学习记忆能力; 海马; 活性调控骨架相关蛋白

**Effects of prenatal benzo[a]pyrene exposure on neurobehavior and Arc mRNA expression in hippocampus of offspring rats** Lü Sheng-jie, NING Li-jun, WANG Qi, NIE Ji-sheng (Department of Occupational Health, School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan, Shanxi 030001, China)

## Abstract:

**[Objective]** The developmental toxicity caused by polycyclic aromatic hydrocarbons represented by benzo[a]pyrene (BaP) is a major public health concern. However, studies show that the gene of activity regulated cytoskeleton associated protein (Arc) plays an important role in neurogenesis and learning and memory of offspring. This article aims to investigate the effects of prenatal BaP exposure on neurobehavior and mRNA expression of Arc in hippocampus of offspring rats.

**[Methods]** Sixty healthy 3-month-old SPF SD rats (male:female=1:1) were mated, and the 30 pregnant rats were randomly divided into blank control group, olive oil group, and 10, 20, and 40 mg/kg BaP groups, and each group contained six rats. BaP was administrated intraperitoneally at 0.2 mL/kg in terms of weight at 17, 18, and 19 days after pregnancy once a day for 3 consecutive days, olive oil was used as solvent control, while the blank control group did not receive any administration. The attainment rates of cliff avoidance on postnatal day 7 (PND7) and air righting reflex on PND14, as well as escape latency, time spent in the target quadrant, and

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.18434

## 基金项目

国家自然科学基金 (81673143); 山西省自然科学基金 (2015011128); 山西省回国留学人员科研资助项目 (2016-057)

## 作者简介

吕胜杰 (1990—), 男, 硕士生;  
E-mail: 643417173@qq.com

## 通信作者

聂继盛, E-mail: niejisheng@126.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2018-06-29

录用日期 2018-12-12

文章编号 2095-9982(2019)02-0128-06

中图分类号 R135

文献标志码 A

## ► 引用

吕胜杰, 宁丽俊, 王琦, 等. 孕期苯并[a]芘暴露对子鼠神经行为及海马 Arc mRNA 表达的影响 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (2): 128-133.

## ► 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18434

## Funding

This study was funded.

## Correspondence to

NIE Ji-sheng, E-mail: niejisheng@126.com

**Competing interests** None declared

**Received** 2018-06-29

**Accepted** 2018-12-12

## ► To cite

LÜ Sheng-jie, NING Li-jun, WANG Qi, et al. Effects of prenatal benzo[a]pyrene exposure on neurobehavior and Arc mRNA expression in hippocampus of offspring rats[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(2): 128-133.

## ► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.18434

number of crossing platforms on PND37 were counted. The mRNA levels of *Arc* in hippocampus on PND1, PND7, PND14, and PND45 were measured.

**[Results]** On PND7, compared with the olive oil group (97.56%), the cliff avoidance attainment rates of the 20 mg/kg BaP group (63.64%) and the 40 mg/kg BaP group (60.98%) decreased ( $P < 0.05$ ). On PND14, compared with the olive oil group (65.71%), the attainment rate of air righting reflex of the 40 mg/kg group (29.73%) decreased ( $P < 0.05$ ). The results of place navigation test showed that compared with the olive oil group, the escape latencies on days 1, 3, and 4 of testing in the groups administrated with BaP were significantly increased ( $P < 0.05$ ). The results of probe trial showed that compared with the olive oil group, the time spent in target quadrant and the number of crossing platforms on PND37 in the groups administrated with BaP were significantly reduced ( $P < 0.05$ ). For hippocampal *Arc* mRNA expression level at different time points, on PND1 and PND7, compared with the olive oil group, the *Arc* mRNA expression levels of all the BaP administered groups were significantly lower ( $P < 0.05$ ); on PND14, compared with the olive oil group ( $14.86 \pm 2.48$ ), the *Arc* mRNA expression level of the 40 mg/kg group ( $7.31 \pm 1.94$ ) was reduced significantly ( $P < 0.05$ ); on PND45, there was a statistically significant decrease in *Arc* mRNA level in the 40 mg/kg BaP group ( $19.98 \pm 8.21$ ) compared with the olive oil group ( $39.66 \pm 6.39$ ) ( $P < 0.05$ ).

**[Conclusion]** Prenatal BaP exposure can cause offspring abnormal neurobehavior in early life and defected spatial learning and memory ability in late stage of development, and declined *Arc* mRNA in hippocampus may participate in inducing the neurodevelopmental toxicity of BaP.

**Keywords:** prenatal; benzo[a]pyrene; neurobehavior; spatial learning and memory ability; hippocampus; activity regulated cytoskeleton associated protein

以苯并[a]芘 (benzo[a]pyrene, BaP) 为代表的多环芳烃类物质是主要的职业和环境污染物之一, 广泛分布于水体、空气及土壤中。多环芳烃类物质不仅具有致癌和致畸性, 还有一定的神经毒性和胚胎发育毒性。哥伦比亚大学的人群调查成果显示, 孕期接触多环芳烃可引起儿童智力发育迟缓, 导致5岁儿童智力下降和6~7岁儿童神经行为改变<sup>[1-2]</sup>, 另有孕期BaP暴露的动物研究显示, 孕期经口鼻吸入BaP会导致子一代大鼠在出生后60~70d突触可塑性减弱<sup>[3]</sup>。

由于人群广泛暴露于多环芳烃, 由该类物质引发的儿童发育毒性可能是一个非常重要的公共卫生问题。虽然BaP引起的神经毒性和胚胎发育毒性是现在研究的热点, 但孕期BaP染毒的动物研究多为关注成年子鼠的神经毒性, 较少有孕期BaP暴露对出生后早期的神经行为的影响以及相关机制的研究。海马活性调控骨架相关蛋白 (activity regulated cytoskeleton associated protein, *Arc*) 基因属于即刻早期基因, 对出生后神经发生和学习记忆发挥重要的作用<sup>[4]</sup>。

出生第1天 (postnatal day 1, PND1)、PND7、PND14属于大鼠生长发育早期<sup>[5]</sup>, 而PND37—PND45属于大鼠的生长发育后期, 相当于人类生命周期里的青春期<sup>[6]</sup>。本实验通过给予孕鼠腹腔注射BaP, 用子鼠神经行为测试方法, 结合Morris水迷宫试验检测BaP对子鼠神经行为的影响, 探究孕期BaP暴露对子鼠早期神经行为以及发育后期学习记忆能力和海马*Arc* mRNA表达水平的影响, 为深入研究BaP对子代可能造成的神经发育毒性作用提供毒理学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂和器材

主要试剂: BaP (Sigma-Aldrich, 美国)、橄榄油 (成都科龙化工试剂厂, 中国)、Trizol 提取试剂 (康为世纪生物科技有限公司, 中国)、5×PrimeScript™ RT Master Mix (TOYOBO, 日本)、2×PowerUp™SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems ABI, 美国)、*Arc* 和  $\beta$ -actin 引物 (北京奥科鼎盛生物科技有限公司, 中国)。主要仪器: 5424R 冷冻离心机 (Eppendorf, 德国)、Bio Spectrometer fluorescence 分光光度计 (Eppendorf, 德国)、Mastercycler nexus gradient 反转录仪 (Eppendorf, 德国)、Quant Studio™3 实时定量荧光PCR仪 (Applied Biosystems ABI, 美国)、Morris 水迷宫 (深圳瑞沃德科技有限公司, 中国)。

### 1.2 动物分组及染毒

3月龄SPF级SD大鼠60只 (雌雄比例为1:1) [军事医学科学院实验动物中心提供, 动物生产许可证号SCXK (京)2012-0004], 雌鼠30只, 体重230~260g; 雄鼠30只, 体重300~350g; 普通饮食, 自由饮水和进食, 自然节律采光, 饲养环境为温度 (22±2) °C, 湿度50%~60%; 适应环境饲养7d后, 雌鼠与雄鼠1:1合笼12h, 次晨8时观察到阴栓视为怀孕, 记为怀孕第0天; 将30只孕鼠随机分为5组, 每组6只, 分别为空白组、橄榄油组和10、20、40 mg/kg BaP染毒组。BaP由橄榄油溶解, 自受孕第17天至第19天, 连续3d, 每天1次按体重腹腔注射给药, 给药体积为0.2 mL/kg; 空白对照组不给任何处理, 橄榄油组注射相同体积的

橄榄油。30只母鼠均正常分娩；其中20mg/kg组有1只母鼠仅分娩3只子鼠，为消除子鼠数量对实验结果的影响而将其剔除，其他母鼠产仔量均在9~15只。

### 1.3 神经行为测试

悬崖回避实验：PND7时采用随机数字表法从每窝随机选出6~9只子鼠用于悬崖回避实验。将子鼠放于约30cm高的平台边缘，头和前肢越过边缘，60s内头或身体往平台内侧移动即为阳性，每只子鼠连续测量3次，阳性次数≥2则为达标，统计PND7各组达标率。

空中翻正实验：PND14时随机抽取每窝5~8只子鼠用于空中翻正实验。子鼠置于距离海绵垫40cm的垂直高度上，腹面朝上，待子鼠平静下来后，使其自由落下，至少三肢先着地则记为达标，统计PND14各组达标率。

### 1.4 Morris水迷宫实验

在PND37，每组按随机数字表法选出10~13只子鼠进行Morris水迷宫实验，池壁标记东南西北4个方向，用不同形状的标志识别，以正东方向为X轴、正北方向为Y轴，分为4个象限，定位航行实验时池水越过平台0.5~1cm，水温(23±2)℃。定位航行实验：实验前1天，将子鼠放于没有平台的水池里游泳120s，使其先适应实验环境和筛选出运动能力缺陷的大鼠。实验进行5d，每天训练一个时段，每个时段训练4次，分别从4个入水点将子鼠头朝池壁轻轻放入水，记录在每个入水点子鼠找到平台的时间，如果120s内没有找到平台，则用木棍将其引导到平台上，让其对周围的环境记忆10s，逃避潜伏期则记录为120s，每天4次逃避潜伏期的均值作为当天训练的成绩，连续统计5d的逃避潜伏期。空间探索实验：实验的第6天，定位导航实验结束后进行，撤去平台，在东北象限的中点面朝池壁放入子鼠，记录120s内子鼠的游泳轨迹，分析子鼠在东北象限的停留时间和穿越平台的次数，评价其空间记忆成绩。

### 1.5 RT-PCR法检测不同时点海马Arc mRNA表达水平

分别在PND1、PND7、PND14、PND45相应的行为学实验完成后，采用随机数字表法处死每窝2~4只子鼠，分离海马和皮质，并在每组按随机数字表从处死的子鼠中选6只用于RT-PCR实验，取30mg的海马组织，按照Trizol试剂提取RNA的操作步骤提取总RNA，使用Bio Spectrometer fluorescence分光光度计测定样品光密度值、纯度以及浓度值。按照5×PrimeScript™ RT Master Mix试剂说明书将总RNA反转录成cDNA（反

转录反应条件：7℃ 15min，85℃ 5s，4℃ 15min），按照2×PowerUp™SYBR™ Green Master Mix试剂操作步骤进行RT-PCR实验（RT-PCR反应条件：95℃ 30s，1个循环；95℃ 5s、60℃ 30s，45个循环；95℃ 60s、65℃ 30s、95℃，1个循环）。每个样品做3个平行样，得每个样品的扩增曲线及溶解曲线，将各样品目的基因Ct值减去内参基因β-actin的Ct值得到ΔΔCt，根据 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 公式计算Arc mRNA的相对表达量。引物序列：β-actin正向引物，5'-ATCTCGTGTGGATTGGTGGC-3'；反向引物，5'-CGCAGCTCAGTAACAGTCCG-3'；Arc正向引物，5'-GCAGAATCAGAGATGGCCGA-3'；反向引物，5'-ACCCTGAGAGGGGAGCTATG-3'。

### 1.6 统计学分析

应用SPSS 20.0软件进行统计分析，服从正态分布且方差齐性的计量资料采用单因素方差分析，多组间均数两两比较用LSD-t检验；计数资料用率表示，采用卡方检验；多个率间的两两比较采用校正后的检验水准α'比较。双侧检验水准α=0.05。

## 2 结果

### 2.1 子鼠PND7悬崖回避实验结果

悬崖回避达标率各组不同；空白组和橄榄油组对比，悬崖回避达标率差异无统计学意义(P>0.05)；与橄榄油组对比，20mg/kg组和40mg/kg组的悬崖回避达标率降低，差异具有统计学意义(P<0.05)。见表1。

表1 孕期BaP暴露对PND7子鼠悬崖回避的影响  
Table 1 Effect of prenatal exposure to BaP on cliff avoidance of offspring on PND7

| 组别<br>Group      | 例数<br>Number | 达标数<br>Attainment number | 达标率(%)<br>Attainment rate | $\chi^2$ | P     |
|------------------|--------------|--------------------------|---------------------------|----------|-------|
| 空白<br>Blank      | 42           | 42                       | 100.00                    | 37.246   | 0.000 |
| 橄榄油<br>Olive oil | 41           | 40                       | 97.56                     |          |       |
| 10 mg/kg BaP     | 50           | 43                       | 86.00                     |          |       |
| 20 mg/kg BaP     | 33           | 21                       | 63.64*                    |          |       |
| 40 mg/kg BaP     | 41           | 25                       | 60.98*                    |          |       |

[注]\*：与橄榄油组比较，P<0.05。

[Note]\*：Compared with the olive oil group, P<0.05.

### 2.2 子鼠PND14空中翻正实验结果

PND14子鼠的空中翻正达标率5组不全相同。空白组和橄榄油组对比，空中翻正达标率差异无统计学意义(P>0.05)；与橄榄油组和10mg/kg BaP组对比，



40 mg/kg 组的空中翻正达标率降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见表 2。

表 2 孕期 BaP 暴露对 PND14 子鼠空中翻正的影响  
Table 2 Effect of prenatal exposure to BaP on air righting reflex of offspring on PND14

| 组别<br>Group      | 例数<br>Number | 达标数<br>Attainment number | 达标率 (%)<br>Attainment rate | $\chi^2$ | $P$   |
|------------------|--------------|--------------------------|----------------------------|----------|-------|
| 空白<br>Blank      | 32           | 22                       | 68.75                      | 20.147   | 0.000 |
| 橄榄油<br>Olive oil | 35           | 23                       | 65.71                      |          |       |
| 10 mg/kg BaP     | 41           | 26                       | 63.41                      |          |       |
| 20 mg/kg BaP     | 28           | 9                        | 32.14                      |          |       |
| 40 mg/kg BaP     | 37           | 11                       | 29.73 * $\Delta$           |          |       |

[注] \*: 与橄榄油组比较,  $P<0.05$ ;  $\Delta$ : 与 10 mg/kg BaP 组比较,  $P<0.05$ 。

[Note] \*: Compared with the olive oil group,  $P<0.05$ ;  $\Delta$ : Compared with the 10 mg/kg BaP group,  $P<0.05$ 。

## 2.3 子鼠 PND37 水迷宫结果

在定位航行实验中, 第 1、3、4 天的逃避潜伏期 5 组间不全相同。空白组和橄榄油组比较, 5 天的逃避潜伏期差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 训练的第 1 天, 与橄榄油组比较, 10、20 mg/kg BaP 组的逃避潜伏期延长 ( $P<0.05$ ); 训练的第 3 天, 与橄榄油组和 10 mg/kg 比较, 40 mg/kg 组的逃避潜伏期延长 ( $P<0.05$ ); 训练第 4 天, 10 mg/kg 和 40 mg/kg 组的逃避潜伏期比橄榄油组长, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。空间探索实验中, 目标象限停留时间和穿越平台次数, 空白组与橄榄油组比较差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ ); 与橄榄油组对比, 10、20、40 mg/kg BaP 组的目标象限停留时间缩短, 10、40 mg/kg BaP 组的穿越平台数减少, 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见表 3。

表 3 孕期 BaP 暴露对 PND37 子鼠逃避潜伏期及空间探索的影响 ( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 3 Effects of prenatal exposure to BaP on escape latency and spatial probe of offspring on PND37

| 组别<br>Group      | 例数<br>Number | 逃避潜伏期 (Escape latency, s) |                   |                             |                   |                  | 空间探索实验 (Spatial probe test)                   |                                        |
|------------------|--------------|---------------------------|-------------------|-----------------------------|-------------------|------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------|
|                  |              | 第 1 天<br>Day 1            | 第 2 天<br>Day 2    | 第 3 天<br>Day 3              | 第 4 天<br>Day 4    | 第 5 天<br>Day 5   | 目标象限停留时间 (s)<br>Time spent in target quadrant | 穿越平台次数<br>Number of crossing platforms |
| 空白<br>Blank      | 13           | 36.84 $\pm$ 9.77          | 31.85 $\pm$ 10.74 | 20.92 $\pm$ 7.49            | 15.00 $\pm$ 4.56  | 14.56 $\pm$ 5.60 | 38.21 $\pm$ 4.96                              | 4.33 $\pm$ 1.22                        |
| 橄榄油<br>Olive oil | 12           | 41.76 $\pm$ 9.03          | 31.35 $\pm$ 7.75  | 24.70 $\pm$ 12.66           | 15.31 $\pm$ 7.13  | 14.44 $\pm$ 6.43 | 37.69 $\pm$ 7.25                              | 4.45 $\pm$ 1.57                        |
| 10 mg/kg BaP     | 13           | 56.99 $\pm$ 13.96*        | 31.88 $\pm$ 8.37  | 23.33 $\pm$ 8.17            | 21.14 $\pm$ 8.04* | 13.54 $\pm$ 5.96 | 31.14 $\pm$ 7.45*                             | 3.30 $\pm$ 1.06*                       |
| 20 mg/kg BaP     | 10           | 52.12 $\pm$ 10.55*        | 37.57 $\pm$ 10.13 | 31.15 $\pm$ 8.21            | 20.28 $\pm$ 6.83  | 18.21 $\pm$ 5.08 | 31.08 $\pm$ 5.74*                             | 3.62 $\pm$ 1.28                        |
| 40 mg/kg BaP     | 12           | 47.60 $\pm$ 15.15         | 37.09 $\pm$ 7.46  | 36.93 $\pm$ 13.33* $\Delta$ | 23.03 $\pm$ 7.93* | 17.51 $\pm$ 5.73 | 31.67 $\pm$ 4.73*                             | 2.90 $\pm$ 0.87*                       |
| F                | —            | 6.883                     | 1.386             | 5.091                       | 3.173             | 1.469            | 3.145                                         | 2.929                                  |
| P                | —            | 0.000                     | 0.251             | 0.001                       | 0.020             | 0.225            | 0.023                                         | 0.032                                  |

[注] \*: 与橄榄油组比较,  $P<0.05$ ;  $\Delta$ : 与 10 mg/kg BaP 组比较,  $P<0.05$ 。

[Note] \*: Compared with the olive oil group,  $P<0.05$ ;  $\Delta$ : Compared with the 10 mg/kg BaP group,  $P<0.05$ 。

## 2.4 子鼠海马不同时点 Arc mRNA 表达水平

Arc mRNA 在子鼠不同生长发育阶段的表达水平并不是稳定不变, 随着时间的推移, Arc mRNA 急剧增多, 空白组的 Arc mRNA 在 PND45 表达水平是 PND1 的 37.98 倍。在 PND1、PND7、PND14、PND45, 空白组和橄榄油组的 Arc mRNA 的表达量差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。与橄榄油组对比, 所选的 4 个时间段, BaP 组 Arc mRNA 的表达水平明显下降, 其中, 孕期 BaP 暴露导致 Arc mRNA 表达下调在出生早期 (PND1、PND7) 最为明显, 体现在 3 个剂量组均观察到与橄榄油组的差异 ( $P<0.05$ ), 而在 PND14、PND45 时, 主要是 40 mg/kg 组与橄榄油组对比存在差异 ( $P<0.05$ )。见表 4。

表 4 孕期 BaP 暴露对子鼠海马不同时点 Arc mRNA 的影响 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=6$ )

Table 4 Effect of prenatal exposure to BaP on the expression of Arc mRNA in hippocampus of offspring at different time points

| 组别<br>Group      | PND1             | PND7                      | PND14            | PND45                      |
|------------------|------------------|---------------------------|------------------|----------------------------|
| 空白<br>Blank      | 1.00 $\pm$ 0.87  | 8.26 $\pm$ 0.73           | 17.41 $\pm$ 5.51 | 37.98 $\pm$ 7.12           |
| 橄榄油<br>Olive oil | 0.92 $\pm$ 0.05  | 7.56 $\pm$ 0.43           | 14.86 $\pm$ 2.48 | 39.66 $\pm$ 6.39           |
| 10 mg/kg BaP     | 0.48 $\pm$ 0.17* | 5.21 $\pm$ 0.44*          | 10.14 $\pm$ 3.61 | 34.73 $\pm$ 4.01           |
| 20 mg/kg BaP     | 0.50 $\pm$ 0.26* | 2.60 $\pm$ 0.91* $\Delta$ | 13.17 $\pm$ 2.36 | 33.81 $\pm$ 10.11          |
| 40 mg/kg BaP     | 0.31 $\pm$ 0.15* | 2.76 $\pm$ 0.33* $\Delta$ | 7.31 $\pm$ 1.94* | 19.98 $\pm$ 8.21* $\Delta$ |
| F                | 10.442           | 55.564                    | 4.299            | 3.517                      |
| P                | 0.001            | 0.000                     | 0.020            | 0.030                      |

[注] \*: 与橄榄油组对比,  $P<0.05$ ;  $\Delta$ : 与 10 mg/kg BaP 组对比,  $P<0.05$ 。

[Note] \*: Compared with the olive oil group,  $P<0.05$ ;  $\Delta$ : Compared with the 10 mg/kg BaP group,  $P<0.05$ 。

### 3 讨论

本研究结果显示：孕期BaP暴露除了会引起大鼠子代早期神经行为的改变，还会导致发育后期学习记忆能力的下降，主要体现在BaP暴露会降低大鼠学习的速度，但经过不断的重复学习后，会巩固其短时记忆从而转化成长时记忆，最后能达到与空白组对照组的大鼠相似的学习能力。而BaP引起的海马Arc mRNA表达水平的下调，可能是BaP引起神经发育毒性的主要机制。

在中国，随着工业的发展，环境污染的加剧，使人们有越来越多的机会接触到多环芳烃类毒物，其中BaP就是其中的代表物质，近些年来，BaP引起的神经发育毒性越来越受到人们的关注。据已有的流行病学调查显示，孕期多环芳烃的暴露会导致新生儿出生体重、头围、智商和认知功能下降<sup>[7-9]</sup>。动物实验显示，孕期BaP暴露会下调谷氨酸受体的水平和引起神经元细胞突触可塑性下降<sup>[10]</sup>，并且会引起子鼠出生后40~60d学习记忆损害<sup>[11]</sup>。这些研究结果与我们的实验结果相符。现有的动物实验研究多集中在孕期BaP暴露对动物生长发育后期或者成年期神经行为的影响，而本研究不仅仅研究孕期BaP暴露对大鼠生长发育后期(PND37，大鼠出生后第37—45天相当于人类生命周期中的青春期)神经行为的影响，还探讨了对大鼠出生后早期(PND1—PND14)神经行为的影响，结果提示，孕期BaP暴露会对出生后早期以及青春期的神经行为产生影响。

即刻早期基因如*c-Fos*、*Arc*、*BDNF*和*Egr1*是重要的神经元活性调控基因，在神经发育、突触可塑性记忆这些学习记忆功能中扮演着重要的角色。如，*Arc*与记忆相关的神经元活性以及神经行为密切相关，饮水的慢性砷暴露会抑制海马*Arc* mRNA的表达，并引起学习记忆下降<sup>[12]</sup>。本研究显示，海马*Arc* mRNA表达水平的下调，可能是BaP引起神经发育毒性的主要机制。本次研究不足之处是只能观察到孕期BaP暴露引起*Arc* mRNA表达水平的下调，但无法明确*Arc*在孕期BaP暴露引起的神经毒性起到的具体作用。未来可用*Arc*抑制表达和过表达实验模型，进一步探讨*Arc* mRNA在BaP神经发育毒性发挥的作用。

基因的调控方式有很多，其中表观遗传是近些年来研究的重点，表观遗传修饰可始于胚胎时期，且胚胎时期异常表观遗传修饰可对出生后和成年乃至下一代的生长发育以及健康产生重要影响<sup>[13-14]</sup>。有研

究显示，砷的暴露引起大鼠学习记忆能力下降，并伴随着海马*Arc* mRNA的表达下降和全基因组甲基化、去甲基化水平增高<sup>[12]</sup>，提示DNA甲基化修饰可能与*Arc* mRNA的表达水平有关，可将*Arc*表观遗传修饰水平作为对孕期BaP暴露的神经毒性机制研究重点。

综上所述，孕期BaP暴露会引起子鼠出生后早期以及后期神经行为改变，*Arc* mRNA表达下降可能参与了BaP神经发育毒性的发生。

### 参考文献

- [1] EDWARDS S C, 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] PERERA F P, TANG D L, WANG S, et al. Prenatal polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) exposure and child behavior at age 6-7 years [J]. *Environ Health Perspect*, 2012, 120 (6): 921-926.
- [3] WORMLEY D D, CHIRWA S, NAYYAR T, et al. Inhaled benzo (a) pyrene impairs long-term potentiation in the F1 generation rat dentate gyrus [J]. *Cell Mol Biol*, 2004, 50 (6): 715-721.
- [4] MARDIROSSIAN S, RAMPON C, SALVERT D, et al. Impaired hippocampal plasticity and altered neurogenesis in adult Ube3a maternal deficient mouse model for Angelman syndrome [J]. *Exp Neurol*, 2009, 220 (2): 341-348.
- [5] MELO P, MORENO V Z, VAZQUEZ S P, et al. Myelination changes in the rat optic nerve after prenatal exposure to methamphetamine [J]. *Brain Res*, 2006, 1106 (1): 21-29.
- [6] CLARK S M, NOTARANGELO F M, LI X, et al. Maternal immune activation in rats blunts brain cytokine and kynurenine pathway responses to a second immune challenge in early adulthood [J]. *Prog Neuro-Psychoph*, 2019, 89: 286-294.
- [7] LEE J, KALIA V, PERERA F, et al. Prenatal airborne polycyclic aromatic hydrocarbon exposure, LINE1 methylation and child development in a Chinese cohort [J]. *Environ Int*, 2017, 99: 315-320.
- [8] ZEDLER B K, MANN A L, KIM M M, et al. Buprenorphine compared with methadone to treat pregnant women with opioid use disorder: a systematic review and meta-analysis of safety in the mother, fetus and child [J]. *Addiction*,

- 2016, 111 (12): 2115-2128.
- [9] JEDRYCHOWSKI W A, PERERA F P, CAMANN D, et al. Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and cognitive dysfunction in children [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2015, 22 (5): 3631-3639.
- [10] BROWN LA, KHOUSBOUEI H, GOODWIN JS, et al. Down-regulation of early ionotropic glutamate receptor subunit developmental expression as a mechanism for observed plasticity deficits following gestational exposure to benzo (a)pyrene [J]. *NeuroToxicology*, 2007, 28 (5): 965-978.
- [11] MCCALLISTER M M, LI Z, ZHANG T, et al. Revealing behavioral learning deficit phenotypes subsequent to in utero exposure to Benzo (a)pyrene [J]. *Toxicol Sci*, 2016, 149 (1): 42-54.
- [12] DU X, TIAN M, WANG X, et al. Cortex and hippocampus DNA epigenetic response to a long-term arsenic exposure via drinking water [J]. *Environ Pollut*, 2018, 234: 590-600.
- [13] OKADA Y, YAMAGUCHI K. Epigenetic modifications and reprogramming in paternal pronucleus: sperm, preimplantation embryo, and beyond [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74 (11): 1957-1967.
- [14] CABOT B, CABOT RA. Chromatin remodeling in mammalian embryos [J]. *Reproduction*, 2018, 155 (3): R147-R158.
- (英文编辑: 汪源; 编辑: 丁瑾瑜; 校对: 童玲)

# (上接第 127 页)

- 分会第七届预防医学学术交流会议论文集. 西安: 中华预防医学会石油系统分会, 2011: 84-87.
- [11] 周琳. 我国煤矿安全评价与职业病危害评价整合研究 [D]. 太原: 太原理工大学, 2014.
- [12] 宋志方, 鹿德智, 甄惠君, 等. 煤矿井下工人心理健康水平研究 [J]. *中国健康心理学杂志*, 2010, 18 (1): 48-50.
- [13] 陈文红. 220 例矽肺患者的生存质量及其影响因素 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2015, 33 (2): 116-118.
- [14] 汤乃军, 曹树义, 赵力军, 等. 流水线作业对女工神经行为功能的影响 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2000, 18 (4): 238-239.
- [15] 邓明明, 孙林岩, 孙林辉, 等. 煤矿工人反应时、暗适应测试与事故倾向调查 [J]. *工业工程与管理*, 2013, 18 (3): 102-106.
- [16] HAN L, LI Y, YAN W, et al. Quality of life and influencing factors of coal miners in Xuzhou, China [J]. *J Thorac Dis*, 2018, 10 (2): 835-844.
- [17] MOHD RIDZWAN S F, ANUAL Z F, SAHANI M, et al. Neurobehavioral performance of estate residents with privately-treated water supply [J]. *Iran J Public Health*, 2013, 42 (12): 1374-1386.
- [18] 李卫星, 张红明, 胡志鹏, 等. 焦炉工人神经行为改变及其影响因素研究 [J]. *环境与职业医学*, 2011, 28 (4): 205-209.
- [19] 丁常美. 护士睡眠状况调查 [J]. *健康心理学杂志*, 2002, 10 (1): 67-68.
- [20] 纪文武, 周健, 李海霞, 等. 回、汉族高血压患者心理行为状况及影响因素 [J]. *环境与职业医学*, 2012, 29 (2): 104-106.
- [21] SALGADO-DELGADO R, OSORIO AT, SADERI N, et al. Disruption of circadian rhythms: a crucial factor in the etiology of depression [J]. *Depress Res Treat*, 2011, 2011: 839743.
- [22] YOU S, WOOD PA, XIONG Y, et al. Daily coordination of cancer growth and circadian clock gene expression [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2005, 91 (1): 47-60.
- [23] 张熙. 睡眠生物节律紊乱与健康及作业安全 [J]. *中华保健医学杂志*, 2015, 17 (2): 83-84.
- [24] 李宜培, 杨国俊, 秦紫芳, 等. 睡眠节律紊乱复制 Alzheimer 样大鼠模型的研究探讨 [J]. *中风与神经疾病杂志*, 2015, 32 (6): 497-500.
- (英文编辑: 汪源; 编辑: 丁瑾瑜; 校对: 陈姣)