

纳米碳酸钙亚慢性染毒对大鼠神经行为的影响

刘卫花¹, 胡博骅¹, 冯涓¹, 钱怡¹, 张文平¹, 仇玉兰¹, 王偃倩², 唐仕川², 郑金平¹

摘要: [目的] 通过观察纳米碳酸钙亚慢性染毒对大鼠自发活动和学习记忆能力的影响, 初步探讨纳米碳酸钙的神经毒性。[方法] 选取 50 只健康雄性 SD 大鼠, 随机分为溶剂对照组、微米碳酸钙组 (200 mg/kg) 和纳米碳酸钙 12.5、50、200 mg/kg 组 5 组, 每组 10 只。滴鼻法每天染毒 1 次, 每周 5 d, 间歇 2 d, 持续 12 周; 采用旷场试验和 Morris 水迷宫试验测试各组大鼠自发活动和学习记忆功能。[结果] 微米碳酸钙和纳米碳酸钙组大鼠精神萎靡, 但各组间大鼠体质量和脑体比差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。旷场试验, 各组大鼠在暗箱中中央活动时间、中央运动总路程、站立次数差异均无统计学意义 (F 值分别为 0.799、0.623 和 0.251, P 值均大于 0.05)。Morris 水迷宫试验, 各组大鼠平均潜伏期、平均总路程、穿越平台次数、平台象限滞留时间差异均无统计学意义 (F 值分别为 0.475、0.345、0.046 和 0.252, P 值均大于 0.05)。[结论] 在本实验剂量条件下, 纳米碳酸钙对大鼠自发活动和学习记忆能力无明显影响。

关键词: 纳米碳酸钙; 神经毒性; 旷场试验; Morris 水迷宫试验; 大鼠

Neurobehavior of Rats Following Subchronic Exposure to Calcium Carbonate Nanoparticles LIU Wei-hua¹, HU Bo-hua¹, FENG Juan¹, QIAN Yi¹, ZHANG Wen-ping¹, QIU Yu-lan¹, WANG Yan-qian², TANG Shi-chuan², ZHENG Jin-ping¹ (1. Department of Toxicology, School of Public Health, Shanxi Medical University, Shanxi 030001, China; 2. Key Municipal Laboratory of Occupational Health and Safety of Beijing, Beijing Municipal Institute of Labour Protection, Beijing 100054, China). Address correspondence to ZHENG Jin-ping, E-mail: sytoxi6322@126.com; TANG Shi-chuan, E-mail: tsc3496@sina.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To assess the neurotoxicity of calcium carbonate nanoparticles (nano- CaCO_3) by observing the changes in spontaneous activity and learning and memory of rats with subchronic exposure to nano- CaCO_3 . [Methods] Fifty healthy male SD rats were randomly divided into a solvent control group (saline), a micro- CaCO_3 group (200 mg/kg), and three nano- CaCO_3 groups (12.5, 50, and 200 mg/kg), 10 rats in each group. The test substances were administered to rats by nasal instillation five times per week for twelve weeks. Open field test and Morris water maze were performed to test the spontaneous activity and the learning and memory ability of rats. [Results] Depression was found in the rats exposed to micro- CaCO_3 or nano- CaCO_3 . There was no significant difference in body weight and brain-to-body weight ratio among all groups ($P > 0.05$). The results of open field test showed no significant differences in time spent in center, total distance traveled, and times of vertical activity among all groups (F values were 0.799, 0.623, and 0.251, all $P > 0.05$). The results of Morris water maze showed no significant differences in average escape latency, average path length, times of passing through platform, and residence time in platform quadrant among all groups (F values were 0.475, 0.345, 0.046, and 0.252, all $P > 0.05$). [Conclusion] No obvious damage to spontaneous activity and learning and memory of rats exposed to nano- CaCO_3 is found in this experiment setting.

Key Words: calcium carbonate nanoparticle; neurotoxicity; open field test; Morris water maze test; rat

DOI: 10.13213/j.cnki.jeom.2014.0083

[基金项目] 北京市科技创新工程项目 (编号: PXM2012_178304_000007); 山西省优势和特色重点学科建设项目

[作者简介] 刘卫花 (1987—), 女, 硕士生; 研究方向: 神经毒理学; E-mail: 361754508@qq.com

[通信作者] 郑金平, E-mail: sytoxi6322@126.com; 唐仕川, E-mail: tsc3496@sina.com

[作者单位] 1. 山西医科大学公共卫生学院卫生毒理学教研室, 山西 030001; 2. 北京市劳动保护科学研究所职业安全健康北京市重点实验室, 北京 100054

纳米碳酸钙是指颗粒直径为 1~100 nm 的超细粉末碳酸钙, 被广泛应用在橡胶、塑料、涂料、油墨、造纸、黏合剂等行业中^[1]。纳米颗粒物可以经呼吸道、消化道、皮肤及注射等途径进入人体, 并可经过淋巴、血液循环转运到全身各个器官^[2-3]。近年来有关纳米材料的神经毒性逐步受到关注。研究表明, 氧化锰 (MnO)^[4]、氧化铁 (Fe_2O_3)^[5] 和二氧化钛 (TiO_2)^[6] 等纳米颗粒均可导致染毒大鼠或小鼠中枢神经组织损伤。但纳米碳酸钙是否具有神经毒性尚不明确。本课题组前期对某纳米碳酸钙生产企业工人进行了流行病学调查, 发现纳米碳酸钙高暴露人群神经行为功能发生改变, 情感状态、短期听觉记忆和短期视

觉记忆能力下降^[7]。由于现场暴露人群受多种环境因素影响,尚不能确定纳米碳酸钙可导致神经行为损伤。本研究模拟现场人体实际暴露途径,采用滴鼻法进行纳米碳酸钙亚慢性染毒,观察大鼠神经行为的变化,探讨纳米碳酸钙的神经毒性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

99% 微米碳酸钙(纯度 $\geq 99\%$,北京化工厂);纳米碳酸钙(纯度 $\geq 94.5\%$,粒径 15~40 nm,山西芮城华新纳米材料有限公司);66025 型超声振荡器(上海超声波仪器厂);旷场分析箱(100 cm $\times$ 100 cm $\times$ 50 cm)、Morris 水迷宫(中国医学科学院药物研究所)。

1.2 动物分组及染毒

选用清洁级健康雄性 SD 大鼠 50 只,体质量 180~200 g,由山西医科大学实验动物中心提供[动物合格证号:SCXK(晋)2009-1]。适应性喂养 1 周后,用 Morris 水迷宫进行简单行为测试,根据测试成绩将大鼠随机分为溶剂对照组(生理盐水)、微米碳酸钙组(200 mg/kg)和纳米碳酸钙 12.5、50、200 mg/kg 组 5 组,每组 10 只。微米碳酸钙粉剂及纳米碳酸钙粉剂用生理盐水配置成相应浓度的悬液,使用超声振荡器振荡处理 30 min。采用滴鼻法,按照 100 μ L/100 g 体质量进行染毒,滴注完毕后 1 min 内没有液体从大鼠鼻腔中流出视为滴注成功。每周工作日(周一—周五)上午定时染毒,每天 1 次,连续染毒 5 d 后间歇 2 d(周六、周日),持续 12 周。每周测定 1 次体质量并调整染毒剂量。

1.3 动物神经行为测试

1.3.1 旷场试验 染毒结束后第 2 天,参照文献[8]的方法进行旷场试验。每只大鼠测定 1 次,观察时间为 3 min。记录中央活动时间、中央运动总路程和站立次数。

1.3.2 Morris 水迷宫试验 染毒结束后第 3 天,按照文献[9]的方法,进行 Morris 水迷宫试验。定位航行试验,每只大鼠训练 5 d,每个象限 1 次,每次间隔 1 h,共 4 次。记录大鼠寻找平台潜伏期和寻找平台总路程。试验第 6 天撤去平台,进行空间探索试验,记录大鼠 120 s 内穿越原平台的次数以及平台象限滞留时间。

1.4 统计学分析

用 SPSS 16.0 统计软件包进行统计分析,定量资料多组比较采用单因素方差分析,所有数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

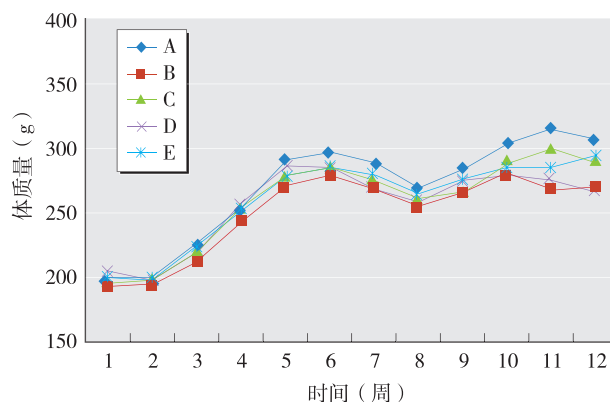
2.1 纳米碳酸钙及微米碳酸钙表征

透射电子显微镜下观测,纳米颗粒碳酸钙分散度较好,分散均匀,呈球形,直径范围为 11.851~33.860 nm,平均直径(18.607 $\pm$ 4.108)nm。在光学显微镜下观察,微米碳酸钙颗粒呈正方形及三角形,平均粒径为(13.8 $\pm$ 2.2) μ m^[10]。

2.2 一般情况

染毒期间,所有大鼠进食饮水正常。染毒结束后,对照组大鼠皮毛有光泽,动物精神状态良好,而微米碳酸钙及纳米碳酸钙亚慢性染毒大鼠的皮毛失去光泽,精神比较萎靡。大鼠体

质量自然增长,各组间差异无统计学意义($P>0.05$)(图 1)。



[注]A: 对照组; B: 微米碳酸钙组; C: 纳米碳酸钙 12.5 mg/kg 组; D: 纳米碳酸钙 50 mg/kg 组; E: 纳米碳酸钙 200 mg/kg 组

图 1 大鼠体质量变化趋势

实验结束后处死大鼠,取脑称重并计算脑体比,结果显示(表 1),大鼠脑体比各组间差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 1 大鼠脑体比结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	脑体比(%)
对照组	0.644 $\pm$ 0.117
微米碳酸钙组	0.700 $\pm$ 0.082
纳米碳酸钙 12.5 mg/kg 组	0.654 $\pm$ 0.084
纳米碳酸钙 50 mg/kg 组	0.678 $\pm$ 0.097
纳米碳酸钙 200 mg/kg 组	0.691 $\pm$ 0.091
F	0.609
P	0.658

2.3 旷场试验结果

如表 2 所示,染毒结束后,各组大鼠在旷场中央活动时间、中央运动总路程、站立次数差异无统计学意义($P>0.05$)。

表 2 大鼠旷场试验结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	中央活动时间(s)	中央运动总路程(cm)	站立次数(n)
对照组	22.68 $\pm$ 15.00	282.41 $\pm$ 186.84	16.00 $\pm$ 5.61
微米碳酸钙组	25.39 $\pm$ 20.06	322.66 $\pm$ 271.67	13.86 $\pm$ 3.81
纳米碳酸钙 12.5 mg/kg 组	19.34 $\pm$ 13.67	285.30 $\pm$ 201.45	13.75 $\pm$ 8.58
纳米碳酸钙 50 mg/kg 组	31.37 $\pm$ 12.72	416.51 $\pm$ 197.66	14.44 $\pm$ 5.32
纳米碳酸钙 200 mg/kg 组	29.73 $\pm$ 19.33	366.70 $\pm$ 221.09	15.30 $\pm$ 3.56
F	0.799	0.623	0.251
P	0.534	0.649	0.908

2.4 Morris 水迷宫试验结果

定位航行试验结果(表 3、表 4)显示,各组大鼠第 1~5 天寻找平台潜伏期、寻找平台总路程和平均潜伏期、平均总路程差异无统计学意义($P>0.05$)。空间探索试验结果(表 5)显示,各组大鼠穿越平台次数和平台象限滞留时间差异无统计学意义($P>0.05$)。

表3 大鼠寻找平台潜伏期结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	试验时序					平均潜伏期(s)
	第1天(s)	第2天(s)	第3天(s)	第4天(s)	第5天(s)	
对照组	47.87 ± 22.08	30.49 ± 8.68	24.99 ± 7.46	29.06 ± 9.19	28.23 ± 7.20	32.13 ± 14.06
微米碳酸钙组	45.55 ± 21.93	36.27 ± 16.20	29.77 ± 15.85	22.15 ± 13.81	17.04 ± 6.31	30.36 ± 18.01
纳米碳酸钙 12.5 mg/kg 组	47.63 ± 21.66	32.47 ± 15.22	21.50 ± 7.21	26.63 ± 14.82	17.53 ± 11.89	29.16 ± 17.82
纳米碳酸钙 50 mg/kg 组	49.28 ± 8.36	32.04 ± 24.24	22.32 ± 17.25	21.43 ± 11.10	16.94 ± 5.57	28.41 ± 18.38
纳米碳酸钙 200 mg/kg 组	51.81 ± 21.05	24.47 ± 9.80	20.08 ± 7.23	20.52 ± 8.96	18.41 ± 9.10	27.06 ± 17.29
F	0.132	0.682	0.933	0.705	2.085	0.475
P	0.970	0.608	0.455	0.593	0.101	0.754

表4 大鼠寻找平台总路程结果($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	试验时序					平均总路程(cm)
	第1天(cm)	第2天(cm)	第3天(cm)	第4天(cm)	第5天(cm)	
对照组	564.93 ± 338.8	337.45 ± 109.0	290.71 ± 120.2	348.43 ± 100.8	367.2 ± 134.1	381.73 ± 196.3
微米碳酸钙组	595.37 ± 333.6	434.75 ± 173.7	378.26 ± 265.1	307.90 ± 218.8	188.7 ± 90.1	380.98 ± 259.5
纳米碳酸钙 12.5 mg/kg 组	649.39 ± 356.7	434.32 ± 255.9	245.32 ± 130.4	369.91 ± 247.4	220.46 ± 237.0	383.88 ± 290.5
纳米碳酸钙 50 mg/kg 组	645.56 ± 149.8	401.03 ± 339.7	241.39 ± 222.8	279.55 ± 155.7	202.58 ± 91.4	354.02 ± 257.45
纳米碳酸钙 200 mg/kg 组	660.00 ± 276.4	299.50 ± 130.5	229.49 ± 104.3	266.21 ± 154.1	218.8 ± 125.0	334.80 ± 232.8
F	0.143	0.672	1.042	0.505	1.541	0.345
P	0.965	0.616	0.398	0.732	0.209	0.847

表5 大鼠穿越平台次数和平台象限滞留时间($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	穿越平台次数(n)	平台象限滞留时间(s)
对照组	6.33 ± 3.55	28.45 ± 7.23
微米碳酸钙组	7.11 ± 3.48	31.84 ± 5.35
纳米碳酸钙 12.5 mg/kg 组	6.70 ± 3.13	29.92 ± 7.17
纳米碳酸钙 50 mg/kg 组	6.66 ± 4.79	28.88 ± 9.25
纳米碳酸钙 200 mg/kg 组	6.70 ± 2.45	29.63 ± 7.77
F	0.046	0.252
P	0.996	0.907

3 讨论

国内外研究证实, 纳米颗粒可以通过3种途径进入中枢神经系统: 跨越血脑屏障进入中枢神经系统; 经鼻腔黏膜转运至嗅球, 再经嗅神经转运至中枢神经系统; 经感觉神经末梢直接摄入并转运至中枢神经系统^[11]。KWON等^[12]用荧光磁性纳米材料(FMNPs, 粒径50 nm)经呼吸道亚慢性染毒ICR小鼠, 发现小鼠脑组织中FMNPs明显增多, 表明FMNPs可经肺组织进入血循环, 穿过血脑屏障进入脑组织。WANG等^[6]用不同粒径的纳米TiO₂经消化道染毒ICR小鼠, 发现小鼠脑内Ti含量明显升高, 且80 nm和155 nm的TiO₂染毒小鼠海马神经元出现空泡现象。WANG等^[13]用¹²⁵I标记的羟基化单壁碳纳米管(¹²⁵I-SWCNT, 直径1.4 nm, 长400 nm)经腹腔注射、皮下注射、灌胃和静脉注射4种方式染毒小鼠, 均可观察到小鼠脑内含有少量的¹²⁵I-SWCNT。ELDER等^[4]给雄性大鼠鼻腔滴注MnO颗粒(30 nm), 发现嗅球内Mn含量增加3.5倍, 且纹状体、额叶皮质和小脑内Mn含量增加。当堵塞大鼠右侧鼻孔进行暴露实验时, 仅在左侧嗅球观察到Mn含量增加。纳米颗粒可能通过诱发氧化应激或炎症反应而引起中枢神经系统的损伤。

本课题组前期在纳米碳酸钙生产企业进行的人群流行病学调查结果显示纳米碳酸钙高暴露人群愤怒-敌意、慌张-困

惑、疲劳-惰性情感得分和数字跨度(总分、顺序、倒序)、视觉记忆等神经行为功能得分明显低于非暴露组, 提示纳米碳酸钙对职业暴露人群情感、短期听觉记忆和短期视觉记忆等能力有所损伤^[7]。但本次采用滴鼻法亚慢性染毒纳米碳酸钙, 仅观察到染毒大鼠有精神萎靡的症状, 未观察到纳米碳酸钙对大鼠自主活动和学习记忆能力产生明显影响。上述研究结果提示, 目前针对人群流行病学研究发现的神经行为改变可能是多种因素综合作用的结果, 职业暴露可能仅是其一, 还与生活习惯、心理状态等多种因素有关。染毒方式对结果影响方面, WANG等^[14]给小鼠鼻腔滴注纳米TiO₂, 发现TiO₂会沉积在海马组织, 存在潜在的神经毒性。吉俊伟^[15]报道, 大鼠鼻腔滴注纳米氧化铝颗粒, 观察到纳米氧化铝可以进入中枢神经系统, 导致大鼠学习记忆能力损伤。张阳等^[16]采用气管灌注法给大鼠染毒纳米硫化铅(PbS), 提示PbS经呼吸道染毒可以损伤学习记忆能力。因此, 滴鼻法和气管灌注法都是目前常用的纳米材料经呼吸道染毒的方式。相比于气管灌注, 滴鼻法可以更好地模拟人体吸入纳米碳酸钙的途径。在实验过程中发现, 鼻腔滴注过程中由于手法和纳米碳酸钙剂型(悬浮液)等原因, 纳米碳酸钙不可避免地有一部分损耗, 因此滴鼻法不能精确地控制纳米碳酸钙进入大鼠鼻腔内的剂量, 实际进入大鼠体内的量比染毒剂量少, 可能会对实验结果产生一定的影响, 但更重要的是与纳米碳酸钙本身的毒性有关。与前述纳米颗粒相比, 纳米碳酸钙本身毒性作用较小, 部分纳米碳酸钙经肺入血后还可能被吸收和代谢^[17], 而本次研究剂量条件下, 染毒时间较短, 进入并沉积于脑组织的量可能较少, 不足以引起明显的神经毒性。因此, 本课题组将进一步探索长期较高剂量纳米碳酸钙暴露对大鼠神经行为的影响, 从而进一步深入研究纳米碳酸钙的神经毒性。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] KATO T, SUGAWARA A, HOSODA N. Calcium carbonate-organic hybrid materials[J]. *Adv Mater*, 2002, 14(12): 869-877.
- [2] 丁玲, 刘鹏, 李世迁. 纳米材料毒性和安全性研究进展[J]. *材料导报*, 2010, 24(3): 29-32.
- [3] STERN ST, MCNEIL SE. Nanotechnology safety concerns revisited[J]. *Toxicol Sci*, 2008, 101(1): 4-21.
- [4] ELDER A, GELEIN R, SILVA V, et al. Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system[J]. *Environ Health Perspect*, 2006, 114(8): 1172-1178.
- [5] WANG B, FENG WY, ZHU MT, et al. Neurotoxicity of low-dose repeatedly intranasal instillation of nano- and submicron-sized ferric oxide particles in mice[J]. *J Nanopart Res*, 2009, 11(1): 41-53.
- [6] WANG JX, CHEN CY, ZHOU GQ, et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration[J]. *Toxicol Lett*, 2007, 168(2): 176-185.
- [7] 刘卫花, 冯娟, 胡博骅, 等. 纳米碳酸钙对人群及大鼠神经行为功能的影响(摘要)[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013, 27(增刊1): 222-223.
- [8] 林晓春, 李云鹏, 卞艳芳, 等. 大鼠旷场实验指标检测及参考值的探讨[J]. *毒理学杂志*, 2010, 24(3): 224-225.
- [9] VORHEES CV, WILLIAMS MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J]. *Nat Protoc*, 2006, 1(2): 848-858.
- [10] 王慧, 宋秋坤, 刘凤琴, 等. 纳米碳酸钙和微米碳酸钙亚急性染毒对大鼠肺组织的毒性作用[J]. *环境与健康*, 2011, 28(5): 390-392.
- [11] 王云, 丰伟悦, 赵宇亮, 等. 纳米颗粒物的中枢神经毒性效应[J]. *中国科学(B辑: 化学)*, 2009, 39(2): 106-120.
- [12] KWON JT, HWANG SK, JIN H, et al. Body distribution of inhaled fluorescent magnetic nanoparticles in the mice[J]. *J Occup Health*, 2008, 50(1): 1-6.
- [13] WANG H, WANG J, DENG X, et al. Biodistribution of carbon single-wall carbon nanotubes in mice[J]. *J Nanosci Nanotechnol*, 2004, 4(8): 1019-1024.
- [14] WANG J, LIU Y, JIAO F, et al. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles[J]. *Toxicology*, 2008, 254(1): 82-90.
- [15] 吉俊伟. 鼻腔滴注纳米氧化铝颗粒致小鼠认知损伤的探讨[D]. 太原: 山西医科大学, 2011.
- [16] 张阳, 曹燕花, 李清钊, 等. 纳米PbS经呼吸道染毒对大鼠神经递质的影响[J]. *中国工业医学杂志*, 2012, 25(1): 22.
- [17] 谭翔文, 匡艳华, 许金华, 等. 纳米碳酸钙对大鼠骨骼和血钙的影响[J]. *湖南师范大学学报: 医学版*, 2007, 4(3): 10-12.

(收稿日期: 2013-10-28)

(英文编审: 汪源; 编辑: 洪琪; 校对: 王晓宇)

【EHP 专栏】

评估鱼类消费建议的有效性: 模拟产前、产后和儿童期持久性有机污染物暴露

Matthew J. Binnington, Cristina L. Quinn, Michael S. McLachlan, Frank Wania

摘要: [背景] 由于人类持久性有机污染物 (POPs) 暴露主要是缘于摄入受污染的食物, 监管机构针对人们关注的食物颁布饮食消费建议, 阐述摄入量的安全水平, 特别是鱼类。[目的] 评估鱼类消费建议对于降低婴儿和儿童 POPs 暴露的有效性。[方法] 采用时间-变量机制模型 CoZMoMAN, 根据产妇指南的不同场景, 按照假设恒定的以及实际上随时间变化的化学物质排放, 评估和比较产前、产后和儿童期的多氯联苯同系物 PCB-153 暴露。场景因依从性的长度 (1 年与 5 年)、鱼类替代的程度 (全部与一半) 以及更换膳食 (未受污染的农产品与牛肉) 等条件而各不相同。评估一系列理论上化学品潜在暴露的减少, 以探讨指南的有效性如何随着化学物的分类和降解能力而发生变化。[结果] 在假设存在建议依从性的实际时间段的前提下, 暂时取消或减少产妇食用鱼类, 在很大的程度上对于降低产前和产后在人类体内清除半衰期长的物质暴露是无效的, 尤其是在环境排放降低的时期。以牛肉取代鱼类实际上可能导致更高的某些类别环境污染物的暴露。另一方面, 对于减少清除半衰期短于依从性长度的物质暴露, 消费建议可能非常有效。[结论] 上述模型评估提示, 对于在人体内清除半衰期长的化合物, 鱼类消费建议不太可能有效地减少产前、产后以及童年期的暴露。

原文详见 *Environmental Health Perspective*, 2014, 122(2): 178-186.