

◇ 预防医学研究 ◇

青春期低剂量氰戊菊酯暴露对小鼠行为的影响

代波¹ 赵莹莹¹ 王博¹ 王华² 张程² 徐德祥² 孟秀红¹

摘要 目的 探究青春期低剂量氰戊菊酯暴露对小鼠行为的影响。方法 对出生后第 28 天的 48 只 ICR 小鼠雌雄各半分别进行不同浓度氰戊菊酯(0、0.02、0.20、2.00 mg/kg)灌胃染毒。出生后第 28~56 天。在出生后第 9 周,雌雄小鼠分别进行相关行为学实验。通过黑白巷实验、旷场实验检测小鼠的探索行为和焦虑相关行为,采用 Morris 水迷宫实验检测小鼠的空间学习和记忆相关行为。结果 各组小鼠在旷场实验中的行为差异无统计学意义。在黑白巷实验中,与 0 mg/kg 组雄性小鼠比较,0.02 mg/kg 组和 2.00 mg/kg 组雄性小鼠跨过中线的潜伏期明显延长($P=0.006$, $P=0.039$)。在 Morris 水迷宫的定位航行实验中,与 0 mg/kg 组雌鼠比较,0.02 mg/kg 组和 2.00 mg/kg 组的雌鼠登陆平台的潜伏期明显延长($P=0.011$, $P=0.014$);与 0 mg/kg 组雌鼠比较,0.20 mg/kg 组的雌鼠搜寻平台的距离明显增加($P=0.003$);而雄性小鼠各组指标之间差异无统计学意义。在 Morris 水迷宫的空间探索实验中,与 0 mg/kg 组比较,0.20 mg/kg 组雌鼠的目标象限时间比降低($P=0.046$);而雄鼠各组指标之间的差异无统计学意义。结论 青春期低剂量的氰戊菊酯暴露能够影响小鼠的多种行为,可能影响小鼠青春期的神经行为发育。

关键词 青春期;低剂量;氰戊菊酯;行为;学习记忆

中图分类号 R 977.12; R 179; R 322.811

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2015)02-0177-04

氰戊菊酯是一种 II 型拟除虫菊酯类农药,广泛应用于蔬菜、果树、棉花等农作物的害虫防治。儿童主要通过饮食、粉尘、住宅的地面等途径接触到低水平的拟除虫菊酯类农药,研究对象中大多数儿童至少接触了 1 种拟除虫菊酯类农药^[1]。拟除虫菊酯为脂溶性,可以通过胎盘屏障进入胎儿体内,也可以在哺乳期通过乳汁被幼儿摄入,对子代造成影响。母

亲怀孕期间拟除虫菊酯类农药的暴露导致婴儿的神经智力发育水平降低^[2]。尿中拟除虫菊酯类农药的代谢产物浓度较高的儿童 SDQ 量表中总困难的得分越高^[3]。拟除虫菊酯类农药及其代谢产物能够产生抗雌激素和抗雄激素作用,而且对甲状腺激素受体产生拮抗作用^[4]。青春期氰戊菊酯的暴露导致雄性小鼠大脑皮层中睾酮和雌二醇水平下降,而雌性小鼠中睾酮和雌二醇的水平略微上升^[5]。Moniz et al^[6]发现围生期氰戊菊酯暴露使子代大鼠性成熟推迟、性行为减少、发情周期异常,这些结果表明氰戊菊酯具有抗雌激素的作用。该研究通过建立青春期低剂量氰戊菊酯暴露的小鼠动物模型,观察氰戊菊酯对小鼠在旷场实验、黑白巷实验、Morris 水迷宫实验中焦虑、学习记忆等行为的影响,探讨氰戊菊酯对神经行为发育的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物 出生后第 21 天清洁级 ICR 小鼠共 48 只,8~11 g,雌雄各半,购于安徽省实验动物中心。雌鼠和雄鼠分笼饲养,饲养环境为昼夜 12 h 交替,温度控制在 20~25 °C,湿度控制在 50%~60%。小鼠适应环境 1 周后,在出生后第 28 天将小鼠按性别分为雌雄 2 组,再将每个性别小鼠随机分为 4 个不同浓度的暴露组(0、0.02、0.20、2.00 mg/kg),每组 6 只。每天同一时间对各组小鼠进行灌胃,灌胃的试剂体积为小鼠体重的 1%。出生后第 56 天进行行为学实验,行为实验的顺序依次为旷场实验、黑白巷实验、Morris 水迷宫。

1.2 主要试剂与器材 氰戊菊酯及其他生化试剂均购自美国 Sigma 公司;玉米油为福临门玉米油;Morris 水迷宫实验设备采用安徽医科大学药学院 ANY-maze 动物行为分析系统,购自上海欣软信息科技有限公司;旷场行为实验及黑白巷行为实验的设备均为自制。

1.3 行为实验 采用旷场实验、黑白巷实验检测小鼠的探索和焦虑相关行为, Morris 水迷宫测试小鼠青春期的空间学习和记忆能力。旷场实验时间:出生后第 57 天,记录小鼠在旷场中的跑动格数,用于

2014-10-23 接收

基金项目:安徽省自然科学基金(编号:KJ2010A173);国家自然科学基金(编号:81102155);安徽医科大学博士科研课题资助(编号:XJ201115)

作者单位:安徽医科大学公共卫生学院¹ 儿少与卫生保健学系、² 卫生毒理学系,合肥 230032

作者简介:代波,男,硕士研究生;

孟秀红,女,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: mengxh_ahmu@163.com

反应小鼠的自发活动能力,站立次数反应小鼠的探究新异环境的能力,第1格潜伏期、周边时间用于反应焦虑行为。黑白巷实验时间:出生后第58天,记录潜伏期、跨越次数和黑白巷内时间,反应小鼠的焦虑行为。Morris水迷宫实验时间:出生后第60天,记录登台潜伏期、游泳距离、目标象限时间比、平台区穿越次数。Morris实验分为两个部分:前6d的定位航行实验反应小鼠的学习能力,第7天的空间探索实验反应小鼠的记忆能力。

1.4 统计学处理 使用SPSS 10.0对数据进行分析,测定值用 $\bar{x} \pm s$ 表示。Morris水迷宫的定位航行实验数据的统计采用重复测量的方差分析,其他行为数据采用单因素的方差分析。处理组之间的两两比较采用事后检验中的最小显著差法。

2 结果

2.1 体重 本研究中小鼠出生后第28~56天每日经口给予不同浓度氟戊菊酯(0、0.02、0.20、2.00 mg/kg)暴露,各组小鼠体重在各观察时间点差异无统计学意义。

2.2 旷场实验 青春期低剂量氟戊菊酯的暴露对雄性和雌性小鼠在旷场实验中站立次数、潜伏期、周边区域活动时间、跨越的方格数等指标的影响差异无统计学意义。见表1。

表1 青春期氟戊菊酯暴露对小鼠旷场行为的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	穿越格数(格)	站立次数(次)	周边时间(s)	潜伏期(s)
雄鼠(mg/kg)				
0	108.20 ± 7.23	20.60 ± 4.18	256.00 ± 15.23	5.90 ± 0.61
0.02	95.20 ± 6.55	18.80 ± 2.44	242.20 ± 13.61	6.50 ± 0.97
0.20	122.80 ± 5.67	21.80 ± 3.29	252.80 ± 13.56	5.06 ± 0.72
2.00	99.60 ± 2.62	15.80 ± 2.67	266.20 ± 11.40	6.44 ± 1.02
雌鼠(mg/kg)				
0	88.40 ± 4.18	25.60 ± 1.40	268.40 ± 9.22	5.70 ± 1.13
0.02	97.80 ± 11.28	25.20 ± 5.90	265.60 ± 6.55	6.60 ± 1.28
0.20	86.20 ± 3.97	15.00 ± 6.11	246.60 ± 14.13	6.80 ± 0.98
2.00	86.60 ± 5.41	18.40 ± 2.29	237.40 ± 10.54	6.12 ± 0.64

2.3 黑白巷实验 不同组间雄鼠的潜伏期差异有统计学意义($F=4.764, P=0.015$),其中与0 mg/kg组比较,0.02 mg/kg组雄鼠的潜伏期明显升高($P=0.006$);不同组间雌鼠的潜伏期差异有统计学意义($F=3.824, P=0.031$),其中与0 mg/kg组比较,2.00 mg/kg组雌鼠的潜伏期明显升高($P=0.039$)。不同组间雄鼠和雌鼠的白巷时间、跨越中线次数差异无统计学意义。见表2。

2.4 Morris水迷宫实验

2.4.1 定位航行试验 持续6d的定位航行实验中,各组小鼠的登台潜伏期随着实验天数增加逐渐降低。见图1。雌鼠各组游泳距离差异有统计学意义($F=4.638, P=0.016$)。与0 mg/kg组比较,0.20 mg/kg组游泳距离显著增加,差异有统计学意义($P=0.003$)。雌鼠各组登台潜伏期差异有统计学意义($F=3.627, P=0.036$)。与0 mg/kg组比较,0.20 mg/kg组和2.00 mg/kg组潜伏期显著延

表2 青春期氟戊菊酯暴露对小鼠黑白巷行为的影响($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	潜伏期(s)	白巷时间(s)	跨越次数(次)
雄鼠(mg/kg)			
0	8.58 ± 1.32	26.54 ± 3.64	2.40 ± 0.24
0.02	16.22 ± 2.38*	49.24 ± 2.64	2.20 ± 0.20
0.20	8.40 ± 0.88	29.42 ± 5.84	2.60 ± 0.40
2.00	12.42 ± 1.83	34.76 ± 3.21	2.60 ± 0.24
雌鼠(mg/kg)			
0	7.98 ± 1.28	34.14 ± 6.24	2.80 ± 0.20
0.02	6.16 ± 0.78	37.06 ± 1.37	3.60 ± 0.51
0.20	11.22 ± 1.83	29.66 ± 2.54	2.80 ± 0.20
2.00	13.02 ± 2.11*	42.22 ± 6.15	3.20 ± 0.37

与同一性别小鼠0 mg/kg组比较: * $P < 0.05$

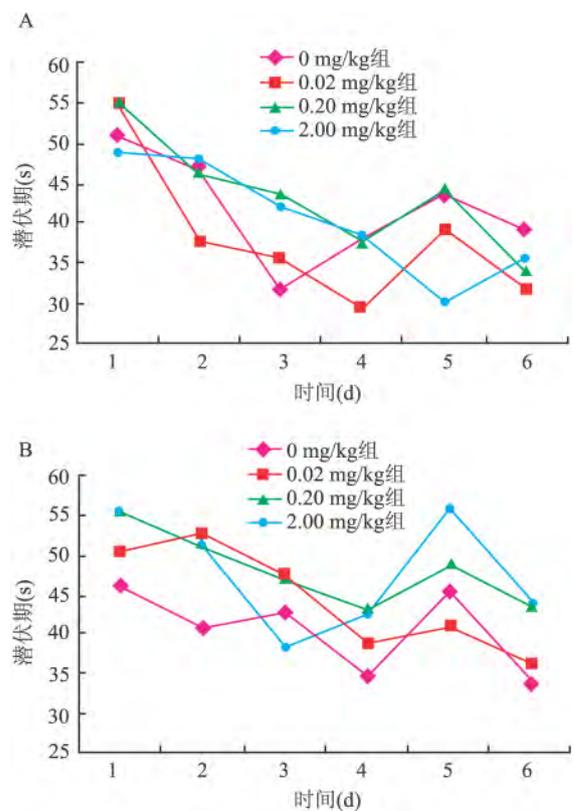


图1 青春期氟戊菊酯暴露对小鼠在Morris水迷宫定位航行实验中登台潜伏期的影响

A: 雄性小鼠; B: 雌性小鼠

长, 差异有统计学意义 ($P = 0.011$, $P = 0.014$)。不同组雌鼠的目标象限时间比差异无统计学意义。雄鼠各组游泳距离、登台潜伏期、目标象限时间比等指标差异均无统计学意义。见表 3。

表 3 青春期氰戊菊酯暴露对小鼠 Morris 水迷宫实验空间学习能力的影响 ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	潜伏期 (s)	总路程 (s)	目标象限时间比
雄鼠 (mg/kg)			
0	41.65 ± 3.06	552.20 ± 47.01	0.37 ± 0.01
0.02	38.07 ± 1.69	547.17 ± 32.84	0.41 ± 0.02
0.20	43.39 ± 1.07	583.69 ± 33.71	0.32 ± 0.02
2.00	40.52 ± 1.49	551.92 ± 37.41	0.35 ± 0.02
雌鼠 (mg/kg)			
0	40.55 ± 1.56	528.52 ± 17.60	0.36 ± 0.01
0.02	44.32 ± 2.75	552.54 ± 36.92	0.34 ± 0.02
0.20	48.16 ± 1.61*	654.21 ± 20.22*	0.30 ± 0.01
2.00	47.84 ± 1.18*	599.52 ± 23.96	0.33 ± 0.02

与 0 mg/kg 组雌鼠比较: * $P < 0.05$

2.4.2 空间探索实验 雌鼠各组目标象限区域活动时间占总时间的比值差异有统计学意义 ($F = 5.023$, $P = 0.012$), 与 0 mg/kg 组比较, 0.20 mg/kg 组目标象限时间比明显减少, 差异有统计学意义 ($P = 0.046$); 而各组雌鼠穿越平台区域的次数差异无统计学意义。雄鼠各组的目标象限时间比、穿越次数等指标差异均无统计学意义。见表 4。

表 4 青春期暴露氰戊菊酯对小鼠 Morris 水迷宫空间记忆能力的影响 ($n = 6$, $\bar{x} \pm s$)

组别	目标象限时间比	穿越平台次数 (次)
雄鼠 (mg/kg)		
0	0.32 ± 0.06	3.2 ± 1.5
0.02	0.45 ± 0.08	4.8 ± 1.8
0.20	0.33 ± 0.06	2.4 ± 1.3
2.00	0.30 ± 0.08	2.2 ± 0.9
雌鼠 (mg/kg)		
0	0.33 ± 0.05	3.0 ± 0.7
0.02	0.44 ± 0.05	4.0 ± 1.2
0.20	0.19 ± 0.01*	1.4 ± 0.2
2.00	0.37 ± 0.06	1.2 ± 0.6

与 0 mg/kg 组雌鼠比较: * $P < 0.05$

3 讨论

本实验对青春期小鼠采用低剂量氰戊菊酯经口灌胃染毒, 观察低剂量暴露氰戊菊酯对小鼠神经行为发育的影响。0.02 mg/kg 相当于国际食品法典委员会规定的氰戊菊酯每日允许摄入量, 2.00 mg/kg 相当于 1/100 LD50, 低于此前研究^[5, 7]设计的剂量

组 30 mg/kg (1/8 LD50) 和 7.5 mg/kg (1/32 LD50)。

在 Morris 水迷宫定位航行实验中, 各实验组的仔鼠登台潜伏期随着实验天数的增加逐渐缩短, 说明各组小鼠通过训练均能找到平台, 而且雌性小鼠 0.20 mg/kg 组和 2.00 mg/kg 组的潜伏期与 0 mg/kg 组比较潜伏期明显延长。各组小鼠的游泳路程也随着实验天数的增加而减少。0.20 mg/kg 组雌鼠的游泳路程与 0 mg/kg 组游泳路程相比有明显增加的趋势, 青春期氰戊菊酯暴露对雌性小鼠的空间学习能力有影响。研究^[7]表明, 青春期氰戊菊酯暴露对雌雄小鼠的影响存在性别差异, 雌鼠相比雄鼠在空间学习和记忆方面受到的损伤要更加严重, 青春期的暴露还抑制了雄鼠的攻击行为, 增加了雌鼠的焦虑行为。Morris 水迷宫空间探索实验中, 雌鼠各组的目标象限时间比差异有统计学意义, 0.20 mg/kg 组的雌鼠与 0 mg/kg 组比较目标象限时间比明显减少, 说明 0.20 mg/kg 组雌鼠在目标象限中的时间相对较少。研究^[8]表明, 仔鼠的躯体感觉运动功能发育受到了氰戊菊酯暴露的影响, 而到了青春期, 小鼠的感觉运动功能又得以恢复; 小鼠成年后的空间记忆能力也受到了影响。有研究^[9]显示, 青春期暴露氰戊菊酯的小鼠在 Y 迷宫实验中表现出学习记忆能力的损伤。

在旷场实验中, 青春期氰戊菊酯暴露对于雌雄小鼠在旷场实验的穿越格数、周边时间、潜伏期等指标的影响差异无统计学意义。在黑白巷实验中, 雌雄小鼠的白巷时间、跨越次数等指标各组之间差异无统计学意义, 而氰戊菊酯暴露组的雌雄小鼠与 0.20 mg/kg 组比较潜伏期增加了。有研究^[10]表明, 哺乳期氰戊菊酯暴露导致了子代雌性大鼠在青春期探索和运动协调能力降低、焦虑行为增加, 对挖掘、囤积食物、筑巢等生活习性没有影响。

许多内分泌干扰物的暴露都能影响神经行为发育。除了本研究中的氰戊菊酯, BPA、邻苯二甲酸酯、溴氰菊酯等农药均可能影响到小鼠的焦虑抑郁等行为及学习记忆能力^[11-14]。氰戊菊酯暴露对神经行为的影响可能是通过干扰发育大脑中雌激素及其受体的正常功能和抑制神经元突起等途径实现的^[5, 15]。

综上所述, 青春期低剂量氰戊菊酯暴露对小鼠青春期神经行为发育存在影响。

参考文献

[1] Morgan M K. Children's exposures to pyrethroid insecticides at

- home: a review of data collected in published exposure measurement studies conducted in the United States [J]. *Int J Environ Res Public Health* 2012, 9(8):2964-85.
- [2] 齐小娟, 郑明岚, 鄢春华, 等. 宫内拟除虫菊酯类农药暴露对 1 岁幼儿神经发育的影响 [J]. *卫生研究* 2011, 40(6):693-7.
- [3] Oulhote Y, Bouchard M F. Urinary metabolites of organophosphate and pyrethroid pesticides and behavioral problems in Canadian children [J]. *Environ Health Perspect* 2013, 121(11-12):1378-84.
- [4] Du G, Shen O, Sun H, et al. Assessing hormone receptor activities of pyrethroid insecticides and their metabolites in reporter gene assays [J]. *Toxicol Sci* 2010, 116(1):58-66.
- [5] Liu P, Meng X H, Wang H, et al. Effects of pubertal fenvalerate exposure on testosterone and estradiol synthesis and the expression of androgen and estrogen receptors in the developing brain [J]. *Toxicol Lett* 2011, 201(2):181-9.
- [6] Moniz A C, Cruz-Casallas P E, Salzgeber S A, et al. Behavioral and endocrine changes induced by perinatal fenvalerate exposure in female rats [J]. *Neurotoxicol Teratol* 2005, 27(4):609-14.
- [7] Meng X H, Liu P, Wang H, et al. Gender-specific impairments on cognitive and behavioral development in mice exposed to fenvalerate during puberty [J]. *Toxicol Lett* 2011, 203(3):245-51.
- [8] 张玉媛, 王取南, 王志刚, 等. 出生后接触氰戊菊酯对仔鼠神经行为发育及学习记忆的影响 [J]. *毒理学杂志* 2008, 22(2):88-91.
- [9] 岳颖, 蔡蕤, 乔辉, 等. 氰戊菊酯染毒对小鼠学习和记忆功能的影响 [J]. *中国免疫学杂志* 2011, 27(S1):1200-2.
- [10] 章恒, 项静英, 宁萑, 等. 母体哺乳期氰戊菊酯染毒对子代青春期雌鼠行为发育的影响 [J]. *中华劳动卫生与职业病杂志* 2012, 30(4):289-92.
- [11] Tian Y H, Baek J H, Lee S Y, et al. Prenatal and postnatal exposure to bisphenol a induces anxiolytic behaviors and cognitive deficits in mice [J]. *Synapse* 2010, 64(6):432-9.
- [12] Xu X, Hong X, Xie L, et al. Gestational and lactational exposure to bisphenol-A affects anxiety- and depression-like behaviors in mice [J]. *Horm Behav* 2012, 62(4):480-90.
- [13] Boberg J, Christiansen S, Axelstad M, et al. Reproductive and behavioral effects of diisononyl phthalate (DINP) in perinatally exposed rats [J]. *Reprod Toxicol* 2011, 31(2):200-9.
- [14] Chen N N, Luo D J, Yao X Q, et al. Pesticides induce spatial memory deficits with synaptic impairments and an imbalanced tau phosphorylation in rats [J]. *J Alzheimers Dis* 2012, 30(3):585-94.
- [15] 杨叶新, 王取南, 夏玉宝, 等. 体外氰戊菊酯暴露抑制小鼠海马神经元突起形成 [J]. *安徽医科大学学报* 2010, 45(3):289-93.

Effects of pubertal exposure to low dose fenvalerate on behaviors in mice

Dai Bo, Zhao Yingying, Wang Bo, et al

(Dept of Maternal, Child Adolescent Health, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the effects of low dose of fenvalerate exposure during puberty on behaviors in mice. **Methods** Twenty four male and twenty four female ICR mice in postnatal day 28 were randomly divided into four groups respectively: the control group (0 mg/kg) and fenvalerate group, 0.02, 0.20, 2.00 mg/kg. Mice were treated with corn oil as a vehicle control or fenvalerate by gavage daily from postnatal day 28 to 56. At the age of 9 weeks, open field, black and white alley, Morris water maze were used to test anxiety, exploratory behavior, spatial learning and memory in mice. **Results** Exposure to fenvalerate did not alter mice behaviors in open field test. In black and white alley test, pubertal exposure to fenvalerate (0.02 mg/kg) significantly increased latency in male mice ($P=0.006$); exposure to fenvalerate (2.00 mg/kg) significantly increased latency in female mice ($P=0.039$). The results of spatial learning test in Morris water maze showed that pubertal exposure to fenvalerate (0.20 mg/kg and 2.00 mg/kg) significantly increased the escape latency of female mice ($P=0.011$, $P=0.014$); exposure to fenvalerate (0.20 mg/kg) significantly extended the escape distance in the female ($P=0.003$). Spatial memory test results showed that the time proportion of objective quadrant was significantly decreased in female mice treated with 0.20 mg/kg ($P=0.046$). Exposure to fenvalerate did not alter behaviors of male mice in Morris water maze test. **Conclusion** Pubertal exposure to low dose fenvalerate disrupts multiple behaviors and may affect neurobehavioral development in mice.

Key words puberty; low dose; fenvalerate; behaviors; learning and memory