

3-硝基丙酸的行为学效应和生化作用机制研究

(之一——行为学实验部分)

卫生部食品卫生监督检验所研究生 胡 霞

指导导师 戴 寅 张均田* 罗雪云

摘要 测定了3-硝基丙酸(β NPA)的急性毒性和行为毒性。发现 β NPA急性毒性幼年小鼠比成年鼠敏感,成年大鼠较成年小鼠敏感。行为试验采用了小鼠一次性学习行为试验——跳台和避暗反应法,大鼠多次性训练主动和被动回避反应实验——大鼠穿梭箱法以及小鼠转轮实验等来进行测定,发现 β NPA能严重影响动物的运动神经功能,但不干扰学习记忆等高级功能活动。

关键词 3-硝基丙酸 跳台法 避暗法
穿梭箱法 学习记忆

3-硝基丙酸(β NPA)是引起变质甘蔗中毒的主要毒性物质。变质甘蔗中毒是一种中枢神经系统受损的急性食物中毒,能引起儿童死亡和终生残废的后遗症^[1]。1984年,我国从引起食物中毒的变质甘蔗中分离到了一产毒霉菌——节菱孢(*Arthrrium*),并证明节菱孢是变质甘蔗中毒的病原菌^[2],它的有毒代谢产物3-硝基丙酸是引起中毒的主要致病毒素^[3],阐明了这一十多年来一直原因不明的食物中毒的病因。 β NPA对动物的学习记忆等大脑的高级功能活动是否有影响,目前国内外尚无这方面的研究报告。本研究采用行为学和生物化学等方法,研究 β NPA对不同年龄、不同种属的大、小鼠的毒性作用,检测 β NPA的行为毒性并探讨其生化作用机制。本文主要报导有关行为毒性的研究部分。

1 材 料

1.1 毒素

3-硝基丙酸(3-Nitropropionic acid),美国Aldrich化学公司产品,为白色针状结晶,纯度99%。

1.2 仪器

1.2.1 小鼠自主活动仪: GJ-8502三光道小鼠活动计数仪,天津医疗器械修配厂制造。

1.2.2 小鼠跳台仪: 医科院药物研究所仪电室制。

1.2.3 小鼠避暗箱: 日本(CHCO' HARA, CO, Ltd)产, PA-M·5·型,批号84-11-07。

1.2.4 大鼠穿梭箱: 日本(CHCO' HARA, Co., Ltd)产, GT-7750型,批号85-30-54。

1.2.5 小鼠旋转轮: 日本株式会社夏目制作所产, KN-75型。

1.3 动物

由中国医学科学院实验动物研究所动物中心提供,大鼠为Wistar品系,小鼠为昆明种和NIH纯种。

2 方 法

2.1 急性毒性: LD_{50} 测定(概率单位图解法)。结果见表1。

2.2 行为试验: 所有行为试验均在隔音室

中进行。

2.2.1 自主活动量测定 (Spontaneous Motor Activity):^[5] 用三光道小鼠活动计数器测定给 β NPA后的自主活动次数。小鼠灌胃 β NPA后半小时, 将小鼠放入活动仪后先适应 5 min, 然后开始计数, 记录 10、20、30min 的活动次数, 雌雄分别进行统计, 各剂量组雌、雄各 5 只成年小鼠, 体重 22 ± 4 g。结果见表 2。

2.2.2 一次性被动回避反应实验——小鼠跳台法 (Step-down test)^[4]: 记录训练时动物出现的错误次数, 24 小时后重测, 记录受电击的动物数、第一次跳下平台的潜伏期和 3 min 内的错误总数。动物给 β NPA 方式均为灌胃, 每组动物 10 只, 体重 20 ± 2 g, 雌雄各半。每一试验至少重复两次以上。训练前连续三天给小鼠 β NPA, 以测定它对动物记忆获得的影响; 训练后立即给小鼠 β NPA, 以观察它对动物记忆巩固的影响; 重测前 2 小时给 β NPA, 以测定其对记忆再现的影响。结果见表 3。

2.2.3 一次性波动回避反应实验——小鼠避暗法 (Step-through test)^[4]: 记录训练时每鼠从放入明室至进入暗室遇到电击所需的时间, 即潜伏期。24 小时后重测, 记录进入暗室的动物数、潜伏期和 5 min 内的电击次数。该实验同跳台法同时进行, 实验条件、要求、给药方式和每组动物数、动物体重均同跳台法。结果见表 4。

2.2.4 多次性训练主动和被动回避反应实验——大鼠穿梭箱法 (Shuttle box test)^[5]: 该装置由实验箱和自动记录打印装置组成, 操作为全自动化, 可随意调节条件刺激、电击和训练间隔的时间。记录每次训练时大鼠的穿梭次数、主动和被动回避时间和电击次数, 可自行打印出结果。本实验全部选用雌性成年大鼠进行训练, 以减少性别带来的差异。实验分记忆获得和记忆巩固、再

现两部分进行。

2.2.4.1 记忆获得: 取 40 只雌性大鼠, 体重 200 ± 20 g, 随机分为五组, 每天训练一次, 连续训练六天, 记录每天的结果。于每天训练前一小时灌胃给 β NPA, 剂量为 0、4、8、12、16mg/kg, 第六次的训练结果见表 5。

2.2.4.2 记忆巩固和再现: 57 只雌性大鼠, 体重 260 ± 20 g, 先连续训练六天, 57 只中有 32 只主动回避反应百分率达 87.5% 以上。选用这 32 只大鼠, 随机分为 4 组, 停止训练两个月后给 β NPA, 剂量为 0、10、20、40mg/kg, 给药后第二天测定, 结果为 I。三天后再给一次 β NPA, 剂量同前, 3 小时后又测一次, 结果为 II。隔三天后, 再给一次 β NPA, 3 小时后测定, 结果为 III。I、II、III 次结果见表 6。

2.2.5 小鼠转轮实验 (Rotating Rod test)^[6]: 该装置为一能调节转动速度和方向的转棒仪。小鼠在水平的旋转棒上为保持身体不至跌落, 需要向转动棒的反方向走动, 并保持四肢肌肉的协调运动, 否则将从转棒上落下。落下的小鼠可使下面的自动记时器自动停止, 记录该数即是小鼠自开始在棒上行走至落下的潜伏期。测定其第一次掉下来的潜伏期、1 min 和 3 min 内的落下数。测定时选用每分钟 8 转的转速。于实验前一天训练小鼠, 挑选出能在转棒上走动 5min 以上而不落下的进行实验。实验所用小鼠为刚断乳鼠, 体重 11 ± 2 g, 随机分为六组, 每组 9—10 只, 雌雄各半。剂量为 0、80、120、150、190、220mg/kg, 从刚断乳开始一直观察到成年, 为期三周。在每一剂量组的动物恢复正常后, 又再一次给予相同剂量的 β NPA, 如此反复进行, 以测定出各种剂量是否有蓄积作用以及消退时间, 观察小鼠是否也有类似人类的“终生瘫痪”的表现。结果见表 7。

3 结果与讨论

3.1 急性毒性: LD₅₀的测定结果见下表表 1 β NP A对不同种属、不同年龄动物的LD₅₀

动物种类	给BNPA方式	体重(g)	性别	LD ₅₀ (mg/kg)	LD ₀ (mg/kg)
KM小鼠	P.O.	8 ± 1	雌	159	100
KM小鼠	P.O.	8 ± 1	雄	144	120
KM小鼠	P.O.	20 ± 1	雌	247	182
KM小鼠	P.O.	21 ± 2	雄	216	150
KM小鼠	i.P.	22 ± 4	雄	130	90
Wistar大鼠	P.O.	55 ± 5	雌	95	60
Wistar大鼠	P.O.	55 ± 5	雄	115	80
Wistar大鼠	P.O.	100 ± 20	雌	110	80
Wistar大鼠	P.O.	100 ± 20	雄	104	70
Wistar大鼠	P.O.	220 ± 10	雌	67	40
Wistar大鼠	P.O.	190 ± 20	雄	75	40

注: 表内数字均为平均数 ± 标准差(以下均同)

由表 1 可见, 幼年小鼠比成年敏感, 其 LD₅₀ 分别为 159、144 和 247、216 mg/kg, 成年大鼠较成年小鼠敏感, 其 LD₅₀ 分别为 67、75 和 247、216 mg/kg。

急性毒性分级属于中等毒性(或高毒) [6]。

大、小鼠的中毒表现相似: 大约于灌胃后 20

—30 min, 出现精神萎靡、烦躁不安, 有的表现为活动减少, 继而步态蹒跚, 共济失调、四肢瘫痪, 行走困难, 严重者昏迷、死亡。动物死亡时间从 40 min 至十几小时不等, 以 1.5 至 2.5 小时居多。

3.2 行为试验

3.2.1 自主活动量测定: 结果见表 2

表 2 β NP A对小鼠自主活动量的影响

性别	剂 量 (mg/kg)	给受试物后自主活动次数		
		10min	20min	30min
雌	0	274.6 ± 56	482.8 ± 162	595.8 ± 228
雌	10	243.2 ± 58	374.2 ± 86	457.4 ± 141
雌	30	293.6 ± 98	548.4 ± 186	717.8 ± 177
雌	100	186.0 ± 52*	305.2 ± 89	404 ± 171
雄	0	264.6 ± 57	445.0 ± 125	562 ± 160
雄	30	150.8 ± 37*	292.4 ± 177	379.2 ± 305
雄	100	89.2 ± 45**	173 ± 107*	232.6 ± 151*
雄	150	68.0 ± 48***	111 ± 81**	153.2 ± 104**

注: *与对照组比较 $P < 0.05$

** $P < 0.01$

*** $P < 0.005$

表列结果表明, 雄性小鼠活动量减少较雌性明显。雄性在 30 mg/kg 而雌性在 100 mg/kg 时活动量开始明显降低 ($P < 0.05$)。雄性 100、150 mg/kg 组 10、20、30 min 活动量降

低均与对照相差显著或非常显著。

3.2.2 小鼠跳台法测定学习记忆: 结果见表 3。

表 3

用跳台法测定BNPA对小鼠不同记忆阶段的影响

记忆过程	剂量(mg/kg)	训练时错误次数	重测时潜伏期(s)	重测时错误次数	重测时受电击的动物数(%)
获得	0	1.7±0.8	150.0±57.9	0.3±0.5	30
获得	20	1.5±0.9	146.5±70.6	0.4±0.8	20
获得	40	1.5±0.9	152.4±60.2	0.2±0.4	20
获得	80	1.0±0.0	180.0±0.0	0.0±0.0	0
巩固	0	4.7±2.7	50.5±66.2	1.2±8.8	90
巩固	40	6.4±2.9	72.1±77.0	1.6±1.6	70
巩固	80	4.5±3.5	110.1±84.8	0.9±0.9	55.6
巩固	120	3.1±2.8	52.9±70.7	2.22±1.5	100
巩固	160	5.4±3.7	160.0±56.6*	0.25±0.7*	12.5 ²
再现	0	5.7±4.5	155.3±48.8	0.9±0.7	30
再现	80	5.6±2.7	135.0±69.9	0.6±0.8	40
再现	120	4.5±2.6	180.0±0.00	0.0±0.0	0
再现	150	5.8±3.6	166.5±42.7	0.2±0.6	10
再现	180	6.2±3.3	160.0±42.4	0.2±0.4	22.2

3.2.3 小鼠避暗法测定学习记忆: 结果见表 4。

表 4

用避暗法测定BNPA对小鼠不同记忆阶段的影响

记忆过程	剂量(mg/kg)	训练时潜伏期(S)	重测时潜伏期(S)	重测时错误次数	重测时受电击的动物数(%)
获得	0	26.2±29.3	195.4±136.5	1.0±1.7	40
获得	20	15.3±12.4	107.6±134.0	1.8±2.4	70
获得	40	15.9±4.9	109.4±99.6	1.3±1.1	90*
获得	80	109.2±158.5	215.2±121.2	0.56±0.7	44.4
巩固	0	11.0±2.9	191.0±120.5	0.8±0.8	60
巩固	40	21.3±25.9	210.7±105.9	1.2±1.3	60
巩固	80	14.6±12.7	216.7±122.9	0.6±0.7	44.4
巩固	120	11.4±8.5	141.8±132.8	1.1±1.3	66.7
巩固	160	10.4±2.8	225.5±128.4	0.5±0.8	37.5
再现	0	12.2±5.8	91.5±93.1	1.4±0.97	90
再现	80	10.1±3.7	138.7±122.7	1.4±1.4	80
再现	120	11.1±3.9	188.9±121.9	1.0±0.9	70
再现	150	16.9±11.1	147.3±112.5	1.1±0.9	70

表 5

用穿梭箱法测定BNPA对大鼠记忆获得的影响

剂量(mg/kg)	穿梭次数	主动回避时间(Sec)	被动回避时间(Sec)	主动回避成功率(%)
0	25.5±4.2	5.7±2.8	0.45±0.6	68.1
4	23.0±10.1	5.7±2.6	1.5±3.3	73.1
8	24.6±3.9	4.9±2.2	0.39±0.9	83.6
12	22.6±3.7	5.1±1.4	0.12±0.3	92.5
16	20.9±7.8	4.7±2.4	1.2±3.4	84.4

连续六天实验说明, BNPA组与对照组间均无显著性差异($P>0.05$), 表明 BNPA

A不影响大鼠的记忆获得能力。

3.2.4.2 记忆巩固和再现 结果见表6

表6 用穿梭箱法测定BNPA对大鼠记忆巩固和再现的影响

实验次数	剂量(mg/kg)	穿梭次数	主动回避时间(Sec)	被动回避时间(Sec)	主动回避反应率(%)
I	0	11.63±2.9	4.87±1.97	0.14±0.16	78.75
	10	11.25±1.5	4.88±1.64	0.10±0.08	80.00
	20	11.38±1.1	5.07±2.40	0.39±0.79	72.50
	40	10.85±1.1	6.54±1.98	1.03±2.04	67.14
II	0	11.38±2.13	4.08±2.78	0.089±0.18	86.25
	10	11.25±2.38	4.94±2.05	0.109±0.13	80.00
	20	11.50±1.51	5.08±2.65	0.58±1.38	71.25
	40	10.50±1.05	4.45±2.33	0.93±2.23	83.3
III	0	11.13±1.36	4.83±1.99	0.204±0.45	83.75
	10	10.50±0.76	5.29±1.41	0.113±0.15	83.75
	20	11.57±2.69	4.49±2.19	0.066±0.10	87.14
	40	10.83±1.33	4.03±1.66	0.557±1.27	88.33

在第I次训练后, 20和40mg/kg剂量组各有一只大鼠中毒致死。在第II次训练时, 最高剂量组又有一只大鼠出现走路不稳的中毒症状。上述结果无一具有统计学差异,

说明BNPA不影响大鼠的主动和被动回避反应。

3.2.5 小鼠转轮实验 结果见表7

表7 用转棒法测定BNPA对小鼠行为的影响

剂 量 (mg/kg)	动物只数	给 受 试 物 次 数									
		1		2		3		4		5	
		落 下 动物数	中毒持续 时间(天)	落 下 动物数	中毒持续 时间(天)	落 下 动物数	中毒持续 时间(天)	落 下 动物数	中毒持续 时间(天)	落 下 动物数	中毒持续 时间(天)
0	10	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1
80	9	0	2	1	2	1	2	3	3	2	4
120	9	1	2	5	4	0	2	2	2	8	5
150	9	5	6	4	4	5	5				
190	9	6	9	5	5						
220	10	9*	6	6	6	7	12				

*死2只

由表7看出, 80mg/kg组的中毒持续时间(是指从症状出现到消失所持续的时间)为2—4天, 120mg/kg组为2—5天, 150mg/kg组为4—6天, 190mg/kg组为5—9天, 220mg/kg组为6—12天。剂量愈大, 落下动物数愈多, 中毒持续时间愈长, 表明BNPA能严重影响小鼠的肌张力和协调运动能力。未观察到动物有人类的“终生瘫痪”现象, 如果中毒动物不死亡, 则几天后就能从瘫痪状态恢复正常, 估计其蓄积作用不强, 排泄较快。

参 考 文 献

- [1] 刘兴阶·变质甘蔗中毒病因研究概况·中华预防医学杂志 1986; 20(5):306
- [2] 刘兴阶, 等。变质甘蔗中毒的病因研究II, 病原菌的分离和毒性试验·卫生研究 1984; 13(5):28。
- [3] 胡文娟, 等·变质甘蔗节菱孢毒性物质——3-硝基丙酸的分离与鉴定·中华预防医学杂志 1986; 20(6):321。
- [4] 张均田, 等·十二种化学药品破坏小鼠被动回避性行为——跳台试验和避暗试验的作用的比较观察·药理学报 1986; 21(1):12。
- [5] 中国医学科学院药物研究所。《行为药理与神经递质受体》讲义 1985。
- [6] 李寿祺主编·卫生毒理学基本原理和方法。第一版·四川: 四川科学技术出版社, 1987; 74—75